

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THÈSE présentée par :

Camille PAOLETTI

soutenue le : **12 décembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Biophysique**

**Mécanismes de ségrégation asymétrique
des agrégats protéiques liés à Hsp104
chez *Saccharomyces cerevisiae***

THÈSE dirigée par :

M. Gilles CHARVIN

Chargé de Recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Anne-Laure BULTEAU

M. Nicolas MINC

Chargée de Recherche, Université de Pau

Chargé de Recherche, Université Paris-Diderot

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. Serge POTIER

M. Ariel LINDNER

M. Michael KNOP

Professeur, Université de Strasbourg

Directeur de Recherche, Faculté de Médecine Paris-Descartes

Professeur, Université de Heidelberg

Mécanismes
de ségrégation asymétrique des agrégats protéiques
liés à Hsp104 chez *Saccharomyces cerevisiae*

Camille Paoletti

*À Olive et Evence,
vos étoiles brillent toujours plus fort.*

Remerciements

La thèse est une lente ascension, rythmée par l'alternance de moments intellectuellement, scientifiquement et émotionnellement intenses et de passages plus complexes, qu'il faut apprendre à négocier patiemment. Tout au long de cet apprentissage, j'ai eu la chance de rencontrer et d'être entourée par de nombreuses personnes que j'aimerais ici remercier sincèrement.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Anne-Laure Bulteau, Nicolas Minc, Michael Knop, Ariel Lindner et Serge Potier, qui ont accepté d'évaluer ce travail. Mes remerciements vont tout particulièrement à Anne-Laure et Nicolas pour avoir porté l'attention nécessaire à ce manuscrit requise par la fonction de rapporteur.

Je remercie évidemment Gilles Charvin qui m'a accueillie au sein de son tout nouveau laboratoire, dans lequel j'ai eu le privilège d'occuper la place de première doctorante. Gilles, je tiens à te remercier pour la qualité des discussions scientifiques qui nous ont animés et la patience dont tu as fait preuve face à mon entêtement.

Je remercie chaleureusement les membres actuels et passés du laboratoire. Steffen, avec qui j'ai eu l'occasion d'initier ce travail, Youlian, roi de la statistique, Cecilia, dont l'arrivée au sein du labo a sans aucun doute contribué à créer du lien, Sandrine, que j'ai assaillie de questions, Audrey, toujours disponible quand on a besoin d'un coup de main, and Ryan, whose big voice made lab meeting more entertaining. Lea, I won't forget that you were the one teaching me how to dissect yeast! Je n'oublie pas non plus les différents étudiants passés par là et en particulier Delphine, dont l'encadrement a réellement été un plaisir. Ce paragraphe ne serait pas complet si Karine, spécialiste "couleurs", et Arthur, doctorant à l'avenir prometteur, n'y figuraient pas en tant que "presque-membres" du laboratoire. Merci à tous pour nos discussions scientifiques, mais pas que, et pour la quantité astronomique de chocolat que nous avons partagée. Je souhaite également remercier nos voisins, Adèle, Véro, Hussein et Naël, avec qui cela a toujours été un plaisir d'échanger - qu'il s'agisse d'ependorfs, de sucreries ou de conversations - et je tiens à rendre hommage à Elisabeth Georges-Labouesse, trop vite disparue.

Je remercie également Serge Taubert et l'atelier mécanique de l'IGBMC, qui m'ont permis de mener à bien ce projet en réalisant différentes pièces de qualité, en m'apportant des conseils techniques et en me prêtant de très nombreuses fois leur fer à souder. Merci au plateau de microscopie, et en particulier à Marc Koch, qui s'est toujours rendu disponible en cas de besoin, et à Didier Hentsch, meilleur décoinceur d'objectif jamais rencontré. Didier, je tiens à te le dire ici, la sensibilité dont tu sais faire preuve m'a touchée à de nombreuses reprises. Je souhaiterais aussi remercier Denis Fumagalli, toujours présent en cas d'urgence et Alexis Hubaud, sans qui j'aurais probablement mis un temps considérable à dompter le LSM et avec qui j'ai partagé des discussions scientifiques fort intéressantes. Merci également à l'ensemble du service info de l'IGBMC pour son efficacité hors pair et notamment à Anthony, Matthieu et Guy, qui ont toujours répondu présents lors de mes multiples descentes en salle 0108. Merci aussi à Serge Uge de m'avoir enseigné à dompter surf et toutes mes excuses à Julien Seiler pour ma gourmandise en espace disque. À ce propos, Julien, je m'envole bientôt pour de nouveaux horizons, mais je te laisse mes data :) I would also like to warmly thank Paulo Alves for his support. Mes remerciements vont enfin à Maité, qui, je l'ai découvert trop tard, sait où dénicher n'importe quel article, et qui, je l'ai su bien vite, est toujours là pour prêter main forte aux thésards désemparés devant le Xerox ou le massicot électronique. Maité, ta disponibilité et ta gentillesse vont cruellement manquer à l'institut quand la retraite t'en éloignera.

Merci aussi à l'équipe Membranes et Microforces de l'Institut Charles Sadron, et particulièrement à Fabrice Thalmann et Thierry Charitat, en qui j'ai pu trouver des pairs lorsque des

discussions entre physiciens s'imposaient, tout comme cela a été le cas avec Daniel Riveline. Je tiens également à remercier à l'ensemble du groupe de Joseph Schacherer, pour les échanges scientifiques et les moments conviviaux que nous avons partagés.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'opportunité de réaliser deux missions complémentaires d'intérêt. Je souhaiterais remercier très chaleureusement Thierry Charitat, qui m'a permis d'effectuer ma charge d'enseignement en Physique, ainsi que Paul-Antoine Hervieux, avec qui il a été un réel plaisir de travailler et qui a su m'orienter vers le Jardin des Sciences le moment voulu. Lors de ma seconde mission au sein du Jardin des Sciences, j'ai eu la chance d'être supervisée par Anne-Catherine Robert, qui m'a accordé sa confiance, offert une réelle indépendance et l'opportunité de réaliser un projet de communication scientifique innovant. Anne-Catherine, je souhaite te remercier une dernière fois ici pour tout cela. Je n'oublie bien sûr pas Amandine Duluard, Clémence Bohn, Emma Carreira et Sébastien Soubiran, sur qui j'ai toujours pu compter, ainsi que toute l'équipe du JDS.

Mes remerciements "académiques" se tournent enfin vers Lyon et l'école qui m'a formée. Merci au LIP, et en particulier à l'équipe Plume, qui m'a accueillie pendant une partie non négligeable de ma rédaction et avec qui j'ai eu la chance de palper une façon différente de mener des travaux de recherche. Merci à Peter Holdsworth, qui a su convaincre l'université de Strasbourg de l'existence et la légitimité du statut d'élève fonctionnaire stagiaire et qui a toujours considéré l'individualité de chaque élève du département de Physique. Je tiens enfin, bien sûr, à remercier très sincèrement et chaleureusement Cendrine Moskalenko, Éric Freyssingéas et Martin Castelnovo : je n'oublierai pas le soutien que vous m'avez apporté lorsque j'ai traversé le "nuage", comme Uri Alon aime l'appeler.

Et parce qu'une thèse ne se réalise pas sans soutien, je tiens à remercier du fond du cœur...

... Les copines de l'IGBMC. Laure, l'unique, la classieuse, la première, Gabi, toujours pleine de projets qu'on a eu la chance de parfois pouvoir partager (et j'espère bien que ce n'était que le début !), Sylvia et Caro, vos pauses-bibli m'ont tant aidée, et je n'évoque même pas les précieuses péripéties co-voiturage, et enfin Charlène, que je suis vraiment très heureuse d'avoir rencontrée (même si c'était sur la fin). Je ne suis pas près d'oublier ces quelques semaines qu'on a passées toutes les deux sur notre perchoir, pleines de rires, de rebondissements, de surprises et petits mots, de moments "t'en dis quoi de ma figure" et surtout de petits pains ! Merci les filles d'avoir été là.

... Lulu, Didi et notre Kiludiloc. Au jour le jour, lors de cette dernière année (et demie), c'est vous qui avez été là. C'est vous qui avez préparé les repas quand je ne décollais plus de mon bureau, vous qui m'avez apporté de la soupe quand j'étais clouée au fond de mon lit par la grippe, vous qui avez écouté mes plaintes récurrentes et m'en avez fait rire. Didi, un jour, promis, je verrai un de tes concerts et je créerai une super énigme pour toi :) Lulu, merci pour ta présence et ta bienveillance inégalable, je te dois énormément. Et longue vie à la tarte fine !

... Le Palace. Ah, le Palace... On ne peut en parler sans une certaine émotion. Les gens qui y sont passés le savent et le comprennent. À vous tous, Birbiri, Florette, Sissou, Lauren, Flex, Antoine et Antoine, Pierrick, Laura, Aline, Matt, je voudrais dire un énorme MERCI ! Merci de m'avoir accueillie, merci de m'avoir aidé à supporter les aléas de ma vie strasbourgeoise, qui m'a définitivement donné du fil à retordre, merci pour nos fous rires et nos discussions SCP passionnantes, merci de m'avoir initiée à tout plein de nouvelles techniques graphiques, merci d'avoir cuisiné les deux meilleures recettes de tartare au monde (non, n'insistez pas, je ne trancherai pas, et surtout pas ici) et de m'avoir nourrie intellectuellement, merci de nous avoir offert cet espace de vie et de création si prolifique, merci d'être revenus me voir après que tout le monde s'en est allé. Je nous souhaite de continuer à être coupaings pour longtemps, parce je

pense vraiment qu'on le vaut bien !

... La koo crew. Pour vous, j'aurais dû le slamer, il n'y a qu'ça qui fait science pour éveiller vos sens. Ç'aurait été voler, dans la chasse bien gardée, réservée aux garçons de notre bande de stolons. Je ne peux y songer, je resterai donc humble et je me contenterai d'encore vous l'affirmer : l'ombre du canapé rouge, de bid, et de nos bides, remplis de saucissons et de fromages bien gras, planera encore longtemps, au dessus d'ma p'tite tête. René est retrouvé, nous sommes au grand complet, aux quatre coins du monde, mais jamais loin d'une blonde.

... Les copains de Lyon, parce que quand même, c'était mieux avant. Pauline, Agnès, Julia, MJ, Coline, Squi, Nath, Martin, Wiki, Guigui, Pierre, JM et puis tout ceux que je ne vais pas énumérer ici mais qui se reconnaîtront. On a vraiment passé de super moments ensemble, et même si je me suis un peu éloignée (géographiquement hein) de vous ces trois dernières années, vous avez toujours répondu présents aux moments clefs. Je me souviendrai des brunchs furtifs du dimanche matin avant de reprendre le train, de notre week-end au pâquis des fées, d'un club très fermé et très blond auquel je souhaite une longue vie, du roi des serveurs russes dont le nom est la contrepèterie d'un fruit, du téléphone de Paulinette qui décroche toujours quand il le faut, de la cascade du Luc et de retrouvailles particulières. Ce paragraphe doit également être le bon pour remercier Anne, qui a été la première (et la seule) à me dire "tu vas voir, c'est génial d'écrire une thèse!". Quoi de mieux pour se donner le courage de commencer ? Enfin, c'est aussi ici que le mot-clef Nor Poulette a sa place. Nor, je ne sais si tu sais à quel point ta présence m'est précieuse. Un jour on l'aura cette maison, pour y passer nos vies, ou simplement des vacances, mais on l'aura.

... Les strasbourgeois. Steph, même si je n'étais pas à la hauteur pour votre coloc' :p, Pierre et Camille, déménageurs hors du commun toujours prêts pour une petite échappée (la Corse en vélo ? Easy!), Cam et Grem, à qui je devrais énormément d'invitations à dîner si on tenait des comptes et qui m'ont également énormément écoutée lors de ces trois années, Fannie, la meilleure des petites joueuses d'ultimate qui sait définitivement se bouger lorsqu'il s'agit de venir visiter les copains, Frede, qu'il faut toujours avoir près de soi pour allumer un feu sous l'orage, les Sesquis, avec qui j'aurais aimé passer tellement plus de temps et lancer tellement plus de disques, et enfin Schips et sa grande famille. Shipssou, je ne vais pas énumérer les bons moments passés avec toi car l'intégralité des personnes qui liront ces remerciements risquerait de nous détester pour la longueur d'un tel paragraphe. Je me contenterai donc seulement de te dire que je n'oublierai aucune de nos aventures en montagne ni ma lampe frontale, que ta rencontre restera un moment fort de ma vie et que je te souhaite sincèrement de rester aussi vraie que tu l'as été depuis que nous nous connaissons.

... La promo 2010-2011 d'IPB. Car notre capacité à rester liés malgré notre éclatement géographique et la dérive de certains vers des domaines pas tout à fait orientés recherche me donne toujours le sourire lorsqu'il m'arrive d'y penser. J'espère que les prochaines années nous donneront l'occasion de nous rencontrer plus souvent et que je raterai moins de célébrations d'obtention de poste CNRS que je n'ai manqué de pots de thèse !

... Sixtine et Céline. Même si j'aurais aimé vous voir plus lors de ces presque 4 années, je tiens à vous remercier mille fois pour les (trop rares) moments qu'on a passés ensemble et le soutien que vous m'avez apporté lorsque j'en ai eu besoin. Sixtine, je n'oublierai pas ton passage à Strasbourg et mon séjour à Toulouse pendant que tu préparais tes concours, Céline sois sûre que nos moments Ninkasi sont bien ancrés dans un coin de ma tête. Merci les filles !

... Steph et Marine, qui sont de sacrées copines ! Merci d'avoir passé des heures au téléphone avec moi, sans jamais me juger ni cesser de me soutenir, me faire rire ou d'attendre que je daigne enfin montrer mon nez du côté de Paris... Marinou, tu gagnes sans nul doute la palme de la meilleure grammairo-orthographe du monde (ou au moins du mien) et je tiens à signaler que

nous ne nous sommes jamais demandé très longtemps qui appeler, ma thèse et moi, lorsque la langue de Molière nous questionnait. Steph, je n'oublierai jamais ta venue à Strasbourg avec les loulous lorsque la maladie a frappé ni la fameuse potion rose dégoûtante que tu m'as alors fait avaler :) Je pense que je me dois aussi de remercier Léon qui a supporté ma présence sur son canapé sans jamais rouspéter (ou du moins pas devant moi...), qui a activement contribué à la future existence de cette thèse en m'évitant de mourir de froid en juillet 2004 et qui m'a offert l'occasion de te rencontrer.

... Ma grande famille. La liste est longue, alors je ne citerai pas tout le monde. Mais merci aux tontons, aux tatas, aux cousins, aux cousines et aux Pioupiou. Vous m'avez tous accordé un soutien sans faille ces dernières années, chacun à votre manière, et soyez bien sûrs que je suis consciente de la chance que j'ai de vous avoir ! Spéciale dédicace à ma super tata Anne-Marie, qui a pris le temps de venir s'occuper de moi lorsque j'en ai eu besoin, à Grand-père, sacré lecteur dont j'espère que la migraine est passée, à Maminou et ses coups de fil depuis l'escalier de la Varenne. Et puis bien évidemment, mille mercis gigantesquement très grands à Ju, Nanouchka, mon papa et ma maman (ça c'est pour JP :) Ju, ta photo donne sacrément la patate, je la regarde alors que j'écris ces mots et, câlisse, elle me donne toujours autant le sourire ! Nanouche, ma petite princesse, tu es née la dernière, et même si tu grandis très (très) vite et que c'est toujours toi qui découvres les meilleures musiques, tu resteras à jamais mon petit koala adoré. Désolée de te l'annoncer, mais tu ne peux rien y changer :p Enfin, Papa et Maman, merci du fond du cœur de m'avoir toujours écoutée, entourée, câlinée et soutenue quels que soient mes choix parfois un peu farfelus. On ne vous le dit pas assez, mais vous êtes vraiment de super parents, vraiment-vraiment.

... Valentin, qui en bon cavalier, m'a mis le pied à l'étrier et sans qui je n'aurais probablement jamais terminé cette thèse. Le pays dans lequel tu as décidé de m'entraîner n'est pas réputé pour son soleil, mais heureusement, on y trouvera des eaux chaudes et des clous dorés pour accrocher nos tableaux. Je nous souhaite une immense collection de photos prises avec le retardateur, parce que définitivement, ce sont les meilleures...

Je souhaiterais aussi avoir une pensée pour Solange, reine des anniversaires. Tu nous as quittés le jour même du début de la rédaction de ce manuscrit, dont tu aurais été, sans aucun doute, la première à relayer l'existence. Tu n'es plus là pour le faire, mais j'ai souvent pensé à toi et ta petite voiture durant son écriture.

Enfin, Olive, je ne peux oublier de te remercier. J'ai passé une bonne partie de ma thèse à te regarder droit dans les yeux, perché sur ton rocher. Lorsque je doutais, lorsque je m'ennuyais, lorsque je n'avais plus d'idée et que je me sentais un peu perdue, ou simplement lorsque j'avais envie de prendre un peu de temps pour penser à toi. Je suis sûre que tu le sais, mais je préfère te le dire ici, au cas où : ton sourire qu'on n'oubliera jamais m'a donné une sacrée force dans ces moments. Tu peux être sûr que ta tronche continuera à partager mes nouvelles aventures, jamais très loin de mon kayak playmobil. Tu nous manques mec.

Sommaire

Table des figures	xiii
Table des films	xv
Table des sigles et des abréviations	xvii
Introduction	1
Partie I Agrégation protéique et vieillissement chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Chapitre 1 L'agrégation protéique	7
1.1 Naissance d'une protéine fonctionnelle et agrégation	8
1.1.1 La structure d'une protéine détermine sa fonction	8
1.1.2 Paysage énergétique et conformation native	9
1.1.3 Repliement incorrect et agrégation	11
1.2 Système de contrôle qualité des protéines	12
1.2.1 Protéines chaperons	12
1.2.2 Protéasome et lysosome	18
1.3 Réponse de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à un stress thermique	20
Chapitre 2 Le vieillissement chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et son lien avec l'agrégation protéique	23
2.1 Théories fondamentales du vieillissement	24
2.1.1 Définition du vieillissement et lois empiriques	24
2.1.2 Théories générales du vieillissement	25
2.1.3 Différents modèles d'études du vieillissement	27
2.1.4 Pertinence des unicellulaires	29
2.2 Vieillissement chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.2.1 Vieillissement chronologique	33

2.2.2	Vieillessement répliatif	34
2.3	Paradigme du vieillissement répliatif chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.3.1	Accumulation asymétrique de facteurs de vieillissement	37
2.3.2	Revue des différents facteurs potentiels de vieillissement	38
2.4	La protéine de choc thermique Hsp104, marqueur des agrégats protéiques et du vieillissement	40
2.4.1	Colocalisation d'Hsp104 avec les agrégats de protéines carbonylées	41
2.4.2	Hsp104, protéine utilisée comme marqueur du vieillissement	42

Chapitre 3 Mécanismes de ségrégation asymétrique des agrégats protéiques liés à Hsp104 45

3.1	Transport actif des agrégats de la fille vers la mère	46
3.1.1	Transport actif des agrégats grâce au réseau polarisé de câbles d'actine	46
3.1.2	Rôle du répresseur <i>SIR2</i>	46
3.2	Diffusion limitée des agrégats au sein de la mère	46
3.2.1	Diffusion limitée chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
3.2.2	Diffusion observée chez d'autres unicellulaires	47
3.3	Rétention organelles-dépendante des agrégats	47
3.3.1	Rétention au sein de JUNQ et IPOD	47
3.3.2	Rétention par accrochage au réticulum endoplasmique et aux mitochondries	48
3.4	Limitations des méthodologies expliquant la ségrégation asymétrique des agrégats liés à Hsp104	48
3.4.1	Cinétique d'agrégation et dynamique des organelles non quantifiées	48
3.4.2	Population asynchrone de cellules, observation postérieure à la formation d'agrégats	49
3.4.3	Observation d'agrégats induits artificiellement	49

Objectifs de la thèse 51

Partie II Développement de nouvelles stratégies pour suivre la dynamique d'agrégation protéique *in vivo* en temps réel

Chapitre 1 Contrôle précis de l'environnement de cellules uniques grâce à la microfluidique 55

1.1	Origines de la microfluidique	56
1.2	Utilisation de la microfluidique en biologie cellulaire	57

1.2.1	La puce microfluidique, un système parfaitement adapté à l'imagerie cellulaire sur de longues périodes	57
1.2.2	Piégeage et adressage de cellules uniques grâce à la microfluidique	59
1.2.3	Contrôle précis des paramètres de l'environnement cellulaire	60
1.2.4	Parallélisation et standardisation	63
1.3	De la question initiale à la réalisation d'une puce	65
1.3.1	Identification des besoins et esquisse d'une puce adaptée	65
1.3.2	Dessin industriel de la puce	67
1.3.3	Fabrication du moule	68
1.3.4	Réalisation des puces	73
Chapitre 2 Analyse quantitative des données de microscopie		75
2.1	Exemple de données acquises en microscopie time-lapse dans notre puce microfluidique	76
2.2	Détection automatisée des contours d'intérêt	76
2.2.1	Détection des contours cellulaires	76
2.2.2	Détection des contours des agrégats	78
2.2.3	Détection des contours nucléaires	80
2.3	Suivi automatisé des cellules et des noyaux	81
Chapitre 3 Dispositif pour étudier la dynamique d'agrégation protéique après un choc thermique		87
3.1	Mise au point du dispositif expérimental	88
3.1.1	Description du dispositif expérimental	88
3.1.2	Étalonnage de la température	89
3.1.3	Dynamique des changements de température dans la puce	90
3.1.4	Maintien de la mise au point	90
3.1.5	Optimisation de la température de formation des agrégats protéiques	91
3.2	Preuve de principe : cinétique d'induction des agrégats liés à Hsp104 au cours d'un choc thermique	95
3.2.1	Cinétique d'induction de l'agrégation au cours d'un choc de 30°C à 38°C	95
3.2.2	Contrôle de l'absence d'induction à 30°C	96
3.2.3	La cinétique d'agrégation dépend de la température du choc	98
Chapitre 4 Dispositif permettant de suivre l'agrégation protéique <i>in vivo</i> au cours du vieillissement		101
4.1	Description du dispositif expérimental CLiC	102
4.1.1	Principe du dispositif	102

4.1.2	Validité des durées de vie réplivative dans le CLiC	102
4.1.3	Vérification de l'apport en nutriment dans le CLiC	104
4.2	Intérêts multiples du dispositif CLiC	106
4.2.1	Étude du vieillissement réplcatif de cellules mères	106
4.2.2	Étude de la sénescence induite par un raccourcissement des télomères	107
4.3	Améliorations du dispositif et perspectives	109

Partie III Article : Establishment of asymmetrical distribution of protein aggregates during stress and aging in *S.Cerevisiae*

Conclusion et perspectives	149
Annexes	151
Annexe A Fehrmann <i>et al.</i> , <i>Cell Reports</i> (2013)	153
Annexe B Xu <i>et al.</i> , <i>en préparation</i>	187
Annexe C Protocole de création par lithographie UV du moule décrit en section II-1.3.3	223
Index	225
Bibliographie	227
Publications	249

Table des figures

1	Repliement d'une protéine	8
2	Interactions locales et à distance au sein des polymères	9
3	Paysage énergétique en entonnoir mettant en évidence la compétition entre le repliement correct et l'agrégation.	10
4	Exemple de fibre amyloïde	11
5	Réseau permettant l'homéostasie protéique	13
6	Organisation hautement conservée des chaperons	14
7	Désagrégation par le chaperon Hsp104	17
8	Schématisation des différentes voies de dégradation	19
9	Formation d'agrégats protéiques liés à Hsp104 lors d'un choc thermique	21
10	Principe d'une courbe de survie et définition de la mortalité	24
11	Conservation du mécanisme de longévité activé par la restriction calorique	28
12	Division symétrique chez <i>E. coli</i> et <i>S. pombe</i>	29
13	Diminution du taux de croissance au vieux pôle chez <i>E. coli</i>	30
14	Croissance robuste et vieillissement chez <i>E. coli</i>	31
15	Vieillessement controversé chez <i>S. pombe</i>	32
16	Division morphologiquement asymétrique de <i>S. cerevisiae</i> et <i>C. crescentus</i>	33
17	Vieillessement chronologique chez <i>S. cerevisiae</i>	34
18	Vieillessement réplicatif chez <i>S. cerevisiae</i>	35
19	Sénescence et rajeunissement chez <i>S. cerevisiae</i>	37
20	Paradigme du vieillissement chez <i>S. cerevisiae</i>	37
21	Accumulation de protéines carbonylées et d'agrégats protéiques au cours du vieillissement	41
22	Colocalisation d'Hsp104 avec les agrégats de protéines carbonylées	42
23	Photographie d'une puce microfluidique développée au laboratoire	56
24	Méthode de fabrication d'une puce à partir d'un moule selon le principe de lithographie "molle"	58
25	Montages classiques de microscopie	58
26	Aperçu de la diversité des architectures de puces microfluidiques	61
27	Principe des valves pneumatiques	62
28	Parallélisation et standardisation des puces	64
29	Schéma de la puce à différentes échelles	66
30	Principe de la photolithographie de contact à résine négative	69
31	Déformation du motif du masque en cas de mauvais contact	69
32	Détail des fichiers CAD à l'origine des masques	70

Table des figures

33	Exemple de transformation d'un fichier CAD en masque polymère	71
34	Principe de l'alignement	72
35	Exemple de données acquises avec notre système microfluidique	76
36	Méthode de détection des contours cellulaires	77
37	Méthode de détection des contours des agrégats	79
38	Principe du filtre "top-hat"	80
39	Méthode de détection des contours nucléaires	81
40	Exemple de détection de différents contours sur une même image	82
41	Principe de la méthode d'affectation des contours	83
42	Association des contours cellulaires et nucléaires	84
43	Montage expérimental	88
44	Étalonnage de la température	89
45	Induction des agrégats liés à Hsp104-GFP en fonction de la température	91
46	Quantification de l'induction des agrégats en fonction de la température	92
47	Induction d'agrégats en fonction des températures absolues et relatives du choc thermique	93
48	Temps de doublement en fonction de la température	94
49	Cinétique d'induction de l'agrégation protéique au cours d'un choc de 30°C à 38°C	96
50	Cinétique d'induction des agrégats protéiques à différentes températures	97
51	Principe du dispositif CLiC	103
52	Suivi des divisions cellulaires et mesure du RLS	104
53	Mesure des propriétés de diffusion/convection au sein du dispositif CLiC	105
54	Analyse de lignée unique grâce à la puce CLiC	109
55	Comparaison du dispositif original et du dispositif amélioré	110

Table des films

Film n°0 : Division asymétrique de *Saccharomyces cerevisiae*

Film n°1 : Effet d'un choc thermique de 30 à 38°C sur un cluster de cellules

Film n°2 : Contrôle à 30°C

Film n°3 : Effet d'un choc thermique de 30 à 35°C sur un cluster de cellules

Film n°4 : Effet d'un choc thermique de 30 à 40°C sur un cluster de cellules

Film n°5 : Suivi d'une cellule de la naissance à la mort dans le dispositif CLiC

Table des sigles et des abréviations

2D : 2 Dimensions
3D : 3 Dimensions
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARS : Autonomously Replicating Sequence (séquence de réplication autonome)
ATG : AuTophagy-related protein (protéine de l'autophagie)
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATPase : enzyme liée au métabolisme énergétique (hydrolyse et synthèse de l'ATP)
BAG-1 : BCL2-Associated Athanogene 1
BAG-3 : BCL2-Associated Athanogene 3
CAD : Computer-Aided Design (conception assisté par ordinateur)
CAP : Chaperone-Assisted Proteasomal degradation (dégradation protéasomale assistée par les chaperons)
CASA : Chaperone-Assisted Selective Autophagy (autophagie sélective assistée par les chaperons)
CCT : Chaperonin-Containing Tailless complex polypeptide-1
CFU : Colony Forming Unit (unité de colonies formées)
CHIP : C terminus of Hsc70-Interacting Protein (protéine interagissant avec le C-terminus de Hsc70)
ClpB : Homologue bactérien de Hsp104
CLS : Chronological LifeSpan (durée de vie chronologique)
CMA : Chaperone-Mediated Autophagy (autophagie arbitrée par les chaperons)
Cmd1p : CalMoDulin protein (calmoduline)
DEL : Diode ElectroLuminescente
DnaJ : Homologue bactérien de Hsp40
DnaK : Homologue bactérien de Hsp70
dNTP : désoxyriboNucléotides Tri-Phosphates
eccDNA : extra chromosomal circular DNA (ADN circulaire extra-chromosomique)
ER : Endoplasmic Reticulum (réticulum endoplasmique)
ERAD : ER Associated Degradation (dégradation associée au réticulum endoplasmique)
ERC : Extrachromosomal rDNA Circles (cercles extra-chromosomiques d'ADN ribosomique)
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching (redistribution de fluorescence après photoblanchiment)
GFP : Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte)
HIP : Huntingtin Interacting Protein
HOP : Hsp90 Organizing Protein

Hsc70 : Heat Shock Cognate 70
HSE : Heat Shock Element (élément de choc thermique)
Hsf1p : Heat Shock transcription Factor 1 (facteur de transcription de choc thermique 1)
HSJ-1 : Homologue de DnaJ
Hsp : Heat Shock Protein (protéine de choc thermique)
Hsp104 : Heat Shock Protein 104 disaggregase (protéine chaperon de choc thermique impliquée dans la désagrégation)
Hsp26 : small Heat SHock Protein 26 (petite protéine chaperon de choc thermique)
Hsp40 : Heat Shock Protein 40 co-chaperone (protéine chaperon de choc thermique)
Hsp42 : small Heat SHock Protein 42 (petite protéine chaperon de choc thermique)
Hsp70 : Heat Shock Protein 70 (protéine chaperon de choc thermique, ATPase impliquée dans le repliement protéique)
Hsp70L1 : Heat Shock 70 kDa Protein 14 isoform 1 (homologue mammifère de Hsp70)
Hsp90 : Heat Shock Protein 90 co-chaperone (protéine chaperon de choc thermique)
HspB8 : Heat Shock 22kDa Protein 8 (protéine de choc thermique 8)
IbpA : Inclusion body protein A (protéine de corps d'inclusion A)
IPOD : Insoluble PrOtein Deposit
ISS : Insulin/IGF-1-like Signaling (voie de régulation Insuline-IGF1)
JUNQ : JUxta-Nuclear Quality control compartment
kDa : kilodalton
KO : Knock-Out
LAMP-2A : Lysosome-associated membrane protein 2 (protéine associée à la membrane du lysosome 2)
LARPs : Long-lived Asymmetrically Retained Proteins (protéines à longue durée de vie retenues asymétriquement)
MDR : MultiDrug Resistance (résistance à de multiples drogues)
MEMS : MicroElectroMechanical System (microsystème électromécanique)
mLSI : microfluidic Large-Scale Integration (systèmes microfluidiques intégré à large échelle)
MPP11 : Homologue humain de Hsp40
MSD : Mean Square Displacement (carré moyen des déplacements)
Msn2p : Multicopy suppressor of SNF1 mutation Protein
Msn4p : Multicopy suppressor of SNF1 mutation Protein
Myo2p : MYOsine 2 (moteur moléculaire)
NA : Numerical Aperture (ouverture numérique)
NAC : Nascent polypeptide-Associated Complex (complexe associé à la chaîne naissante)
NEF : Nucleotide Exchange Factor (facteur d'échange de nucléotides)
PDMS : Polydimethylsiloxane
PFD : Prefoldin
PKA : Protein Kinase A (protéine kinase A)
PQC : Protein Quality Control (système de contrôle qualité des protéines)
PSF : Point Spread Function (fonction d'étalement du point)
RAC : Ribosome-Associated Complex (complexe associé au ribosome)
RFP : Red Fluorescent Protein (protéine fluorescente rouge)
RLS : Replicative LifeSpan (durée de vie réplivative)
ROI : Region Of Interest (région d'intérêt)
ROS : Reactive Oxygen Species (espèces chimiques réactives contenant de l'oxygène)
SCD : Synthetic Complete Dextrose medium (milieu de culture synthétique complet glucose)
SCH9 : gène codant pour une protéine kinase orthologue de la kinase mammifère S6

Sch9p : protéine kinase orthologue de la kinase mammifère S6
SIR2 : Silent Information Regulator 2
STRE : STress Responsive Element (élément de réponse au stress)
sHSP : small Heat Shock Protein (petites protéine de choc thermique)
TF : Trigger Factor
TOR : Target Of Rapamycin (cible de la rapamycine)
TRiC : Tailles complex polypeptide-1 Ring Complex
UPS : Ubiquitin-Proteasome System (système ubiquitine-protéasome)
UV : ultraviolet
V-ATPase : Vacuolar H^+ -ATPase (H^+ -ATPase de la vacuole)
YFP : Yellow Fluorescent Protein (protéine fluorescente jaune)

Introduction

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* se divise de façon asymétrique : une cellule mère produit un bourgeon qui se développe et devient une cellule fille après la division. En 1959, Mortimer et Johnston ont été les premiers à décrire le vieillissement répliatif de *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Ils ont en effet observé qu'une cellule mère produit une vingtaine de cellules filles avant d'entrer en sénescence et finalement mourir. Au contraire, il a été constaté que les cellules filles naissent avec un potentiel répliatif intact [2] [3]. Il existe donc un processus de rajeunissement.

Pour l'expliquer, Egilmez et Jazwinski ont proposé dès 1989 le paradigme suivant : des facteurs cytoplasmiques délétères pourraient s'accumuler au sein des mères vieillissantes sans être transmis aux cellules filles nouvellement formées [2]. Depuis, différents facteurs potentiels de vieillissement ont été identifiés. Il s'agit de structures qui, du fait d'un processus de ségrégation mère/fille biaisé, s'accumulent dans les mères au cours de leur vie : les cercles extra-chromosomiques d'ADN ribosomique (ERC) [4], les mitochondries [5] [6] et les vacuoles [7] non-fonctionnelles ainsi que les agrégats de protéines oxydées [8].

Ces derniers ont d'abord été détectés par des marquages par immunofluorescence sur des cellules fixées [8]. Il a ensuite été montré que les agrégats de protéines oxydées comprenaient également des protéines chaperons de choc thermique Hsp104 [9]. Ceci a alors permis l'observation *in vivo* des agrégats protéiques grâce à l'utilisation d'une protéine fluorescente de fusion Hsp104-GFP [9]. Ainsi, la protéine chaperon Hsp104 est un marqueur des agrégats protéiques et du vieillissement observable *in vivo*. À l'aide d'un tel marqueur, on peut se demander quels sont les mécanismes de ségrégation asymétrique qui conduisent à l'accumulation d'agrégats protéiques dans les cellules mères.

Afin de mimer le vieillissement, les agrégats peuvent par exemple être induits en augmentant la température ou en déstabilisant le protéasome. En utilisant de telles méthodes, trois mécanismes de ségrégation asymétrique ont déjà été suggérés. Tout d'abord, il a été proposé que les agrégats protéiques formés dans le bourgeon après un choc thermique subissent un transport rétrograde du bourgeon vers la cellule mère grâce au réseau polarisé de câbles d'actine prenant naissance au sein du polarisome [10] [11]. La ségrégation asymétrique des agrégats découlerait donc d'un processus biologique actif s'appuyant sur le cytosquelette. Cependant, ce scénario a été vivement remis en question par une autre étude qui tend à montrer que le mouvement des agrégats induit par un choc thermique est diffusif, ce qui est incompatible avec un transport directif le long du cytosquelette [12]. Tirant profit d'une approche biophysique, Zhou *et al.* ont à l'inverse proposé un mécanisme de rétention des agrégats dans les mères uniquement basé sur un processus physique. La diffusion anormale, lente et contrainte géométriquement des agrégats au sein de la cellule mère empêcherait ces derniers de se déplacer vers le bourgeon.

Néanmoins, une autre étude, se focalisant sur la localisation des agrégats protéiques induits par inhibition du protéasome, avait auparavant révélé que ces agrégats étaient recrutés dans des

compartiments bien définis à la périphérie du noyau (ou de la vacuole) nommés JUNQ (ou IPOD) [13]. Ce phénomène d'accrochage des agrégats à de grosses structures a par la suite été proposé pour expliquer l'origine de leur diffusion limitée ainsi que leur ségrégation asymétrique. Celle-ci pourraient en effet être due à la rétention de JUNQ et d'IPOD au sein des cellules mères [14]. Cependant, le mécanisme qui empêche la transmission de ces corps d'inclusion aux cellules filles demeure inconnu. Récemment, Zhou *et al.* ont également proposé un mécanisme de rétention des agrégats par accrochage à des organelles [8], mais qui impliquerait cette fois-ci le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Dans ce modèle, la rétention des agrégats au sein des cellules mères serait assurée par une division biaisée des mitochondries entre les mères et les filles, selon un mécanisme également inconnu à ce jour.

Ainsi, la question du mécanisme de ségrégation asymétrique des agrégats de protéines oxydées dans la cellule mère reste ouverte. En particulier, nous ne savons toujours pas si cette ségrégation peut s'expliquer uniquement à l'aide de concepts physiques (comme la diffusion limitée, l'étroitesse du cou du bourgeon, ...) ou si, à l'inverse, elle nécessite un mécanisme biologique contrôlant l'établissement et la maintenance de la distribution asymétrique des agrégats (comme un transport actif ou une séquestration au sein d'organelles spécifiques).

Cette controverse est en partie due aux limitations des méthodologies utilisées pour apprécier la dynamique des agrégats protéiques dans les études précédentes. En effet, afin d'induire la formation d'agrégats protéiques, deux stratégies différentes ont été employées.

La première consiste à soumettre les cellules à un choc thermique sévère à 42°C durant 30 minutes [10] [11] [12] [8]. La division et la plupart des processus cellulaires sont alors fortement altérés. De plus, les agrégats ne sont pas observés au cours du choc thermique mais durant une période de rétablissement à 30°C qui suit le choc et le suivi de cellules uniques n'est pas effectué. La distribution initiale des agrégats au sein des mères et des bourgeons n'est donc pas connue. L'interprétation de l'asymétrie mère/fille observée est alors ambiguë : elle pourrait aussi bien découler d'un processus actif établissant l'asymétrie que d'une induction des agrégats dissymétrique dès le départ. Le suivi de cellules uniques tout au long du processus de choc thermique est donc nécessaire, en particulier dans le but de préciser les mécanismes d'établissement et de maintien de l'asymétrie. De plus, les expériences sont effectuées sur des populations de cellules asynchrones sans mesurer la progression dans le cycle cellulaire. Les moyennes réalisées ne permettent donc pas d'étudier un mécanisme de ségrégation mère/fille couplé au processus de croissance et de division. Enfin, étant donné la croissance et le phénomène de désagrégation observé lors de la période de rétablissement [12], le biais de ségrégation et la localisation des agrégats pourraient être impactés par le choix du moment d'observation. Là encore, le suivi tout au long du choc thermique de cellules uniques est primordial.

La seconde stratégie adoptée pour induire des agrégats protéiques consiste à déstabiliser le protéasome par l'utilisation de mutants ou de drogues [13] [14]. Ceci ne permet alors pas d'évaluer le rôle éventuel du protéasome dans les mécanismes de ségrégation asymétrique des agrégats. En outre, les cellules ne sont pas suivies sur plus de deux générations, ce qui est limitant pour l'étude d'un processus se déroulant sur plusieurs dizaines de divisions.

Dans un cas comme dans l'autre, malgré l'utilisation de techniques d'imagerie à haute résolution [8] [14], la cinétique complexe de l'agrégation des protéines dénaturées, qui implique le recrutement de nombreux chaperons, et la dynamique rapide des organelles considérées, comme les mitochondries, ne sont pas évaluées. Ainsi, nous ne savons toujours pas si les agrégats sont générés directement au contact de leurs organelles cibles comme Zhou *et al.* l'ont récemment proposé [8] ou s'ils sont formés avant d'être recrutés par des compartiments spécifiques tels que JUNQ et IPOD [14]. Cette distinction pourrait fortement influencer leur capacité à ségréger entre

les mères et les filles.

Enfin, dans l'ensemble des études décrites, il n'est pas évident que les observations effectuées puissent être transposées dans un contexte de vieillissement.

L'objet de cette thèse est donc double. D'une part, il s'agit de mieux comprendre les mécanismes d'établissement et de maintien de la ségrégation asymétrique qui conduisent à l'accumulation dans les cellules mères d'agrégats protéiques liés à Hsp104, en observant continûment, avant, pendant et après l'induction d'agrégats par un choc thermique, une population de cellules uniques dont la croissance n'a pas été stoppée. D'autre part, il s'agit de décrire la dynamique de formation des agrégats protéiques marqués par Hsp104-GFP au sein de cellules vieillissantes, de vérifier si les observations précédentes sont bien transposables dans ce contexte et de s'interroger sur la causalité entre la présence d'agrégats et le phénomène de sénescence.

Le plan de ce manuscrit est le suivant. La première partie décrit les mécanismes connus d'agrégation protéique et de vieillissement. En particulier, elle permet de détailler le lien existant entre ces deux phénomènes ainsi que les processus controversés proposés pour expliquer la ségrégation asymétrique des agrégats protéiques d'Hsp104.

La seconde partie présente les nouvelles stratégies qui ont permis d'étudier la dynamique d'agrégation protéique *in vivo* et en temps réel. Après avoir introduit brièvement les principes et intérêts majeurs de la microfluidique dans un premier chapitre, le second chapitre présente un exemple classique de données de microscopie acquises dans une puce microfluidique et expose les méthodes d'analyse quantitative développées au laboratoire. Les deux chapitres suivants sont consacrés à la description des deux dispositifs mis en place pour d'une part induire et étudier l'agrégation protéique et la ségrégation des agrégats au sein de cellules uniques se divisant, d'autre part suivre la formation *in vivo* des agrégats au cours du vieillissement au sein de cellules uniques.

Enfin, la troisième partie s'attache à décrire, sous forme d'article, les observations réalisées grâce aux nouvelles approches expérimentales développées. Je montrerai comment le suivi avant, pendant et durant un choc thermique de cellules uniques se divisant a permis d'établir que la ségrégation asymétrique des agrégats protéiques induits par augmentation de température est principalement due à la croissance cellulaire et à la division et non à un processus actif de transport rétrograde. Je décrirai également comment le suivi de cellules mères de la naissance jusqu'à la mort a quant à lui permis de montrer que dans des conditions classiques de croissance, les agrégats protéiques liés à Hsp104 ne s'accumulent pas progressivement au sein des cellules mères, contrairement au postulat admis. En revanche, une accumulation de ces agrégats est observée lorsque le protéome est déstabilisé par augmentation de la température. La durée de vie des cellules est alors réduite et le processus de sénescence semble différent.

Première partie

Agrégation protéique et vieillissement
chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chapitre 1

L'agrégation protéique

Les protéines, macromolécules biologiques constituées d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés, assurent quasiment toutes les tâches nécessaires à la vie cellulaire [16]. Elles sont ainsi notamment responsables de la forme des cellules et de leur organisation interne, de la fabrication, de la maintenance et du nettoyage d'autres protéines, du transport de molécules ou de la réponse de la cellule à des signaux extérieurs. Briques essentielles de la vie, elles tirent d'ailleurs leur nom du grec ancien *prôtos* qui signifie "premier" [17]. Pour le bon fonctionnement d'une cellule, il est important de conserver une quantité équilibrée de protéines fonctionnelles, quelles que soient les contraintes extérieures : on parle d'homéostasie [18].

Les fonctions des protéines, très diverses, sont déterminées par leurs structures tridimensionnelles [19]. Pour assurer l'homéostasie protéique, ou protéostasie, un repliement correct des protéines est donc nécessaire. Le problème du repliement protéique est central en biologie [20]. Du fait de l'encombrement moléculaire et de la vitesse de traduction relativement lente, les protéines sont particulièrement vulnérables à un mauvais repliement et à l'agrégation [21].

Dans ce chapitre, je décrirai le processus de formation d'une protéine fonctionnelle et les conditions qui peuvent déclencher son agrégation, puis j'exposerai le fonctionnement général du système de contrôle qualité des protéines, qui permet à la cellule d'éviter le phénomène d'agrégation. Enfin, je détaillerai des effets d'un choc thermique sur la cellule, et plus particulièrement l'agrégation induite par un tel choc chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Sommaire

1.1	Naissance d'une protéine fonctionnelle et agrégation	8
1.1.1	La structure d'une protéine détermine sa fonction	8
1.1.2	Paysage énergétique et conformation native	9
1.1.3	Repliement incorrect et agrégation	11
1.2	Système de contrôle qualité des protéines	12
1.2.1	Protéines chaperons	12
1.2.2	Protéasome et lysosome	18
1.3	Réponse de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à un stress thermique . .	20

1.1 Naissance d'une protéine fonctionnelle et agrégation

Les divers processus qui prennent place au sein d'une cellule s'appuient sur l'action coordonnée de nombreuses protéines. Chez l'humain, il existe ainsi plus de 20 000 protéines différentes [22] alors qu'on en trouve environ 6000 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [23] dont certaines sont présentes à plus de 10^6 copies par cellule [24]. La naissance d'une protéine est initialisée par la création d'une chaîne linéaire d'acides aminés par le ribosome. Comment une telle chaîne devient-elle une protéine fonctionnelle ?

1.1.1 La structure d'une protéine détermine sa fonction

Comme nous l'avons évoqué en introduction de ce chapitre, une grande majorité des protéines doivent se replier selon une structure tridimensionnelle bien définie, unique et spécifique, afin d'acquérir leur fonction [19] (figure 1). On parle de "conformation native". Cette conformation native est le résultat d'une organisation structurale selon quatre niveaux hiérarchiques.

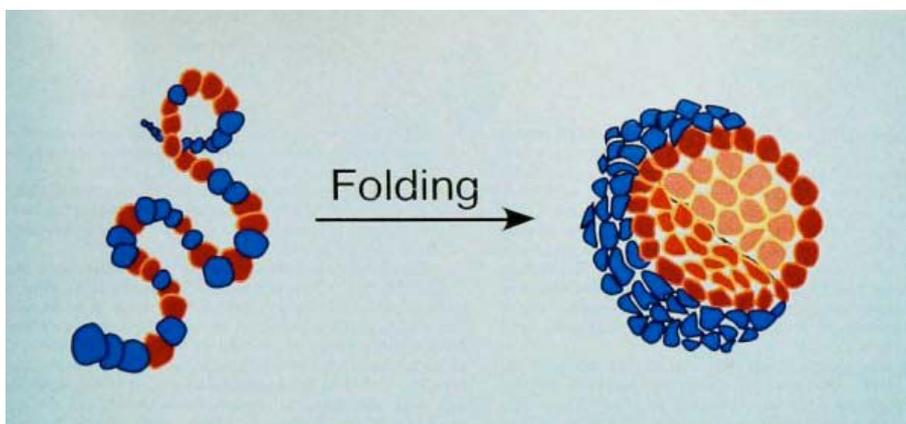


FIGURE 1 – Repliement d'une protéine à partir de son état dénaturé (gauche - séquence primaire d'acides aminés) vers son état natif, unique et compact (droite), dont la structure est encodée dans la séquence primaire. Figure issue de [20].

À un niveau élémentaire, le génome code l'ordre dans lequel les acides aminés s'enchaînent au sein d'une chaîne polypeptidique [25]. Il s'agit de la structure primaire de la protéine. La structure secondaire correspond quant à elle au repliement local des acides aminés en structures répétées et stabilisées par des liaisons hydrogènes, telles que les hélices α et les feuillets β [26] ou les différents types de tours [27]. Un second niveau de repliement permet un agencement stable dans l'espace de ces structures secondaires : on parle de structure tertiaire. Ce niveau de structure correspond à la conformation native de la protéine qui est alors biologiquement active. L'organisation tridimensionnelle de la protéine est ici stabilisée par différentes interactions (liaisons covalentes, interactions électrostatiques et de van der Waals, interactions avec le solvant) à distance, *i.e.* entre monomères qui sont proches dans l'espace, mais éloignés les uns des autres dans la séquence (figure 2). Les parties hydrophobes de la protéine sont enfouies tandis que les résidus polaires sont exposés à l'extérieur. Enfin, la structure quaternaire correspond à l'assemblage de différentes chaînes polypeptidiques, généralement appelées sous-unités [28].

Les études pionnières d'Anfinsen ont montré que les petites protéines dénaturées se replient spontanément *in vitro* [29]. Ceci prouve donc que leur structure tertiaire est encodée dans leur structure primaire. Pour l'expliquer, Anfinsen a proposé "l'hypothèse thermodynamique" selon

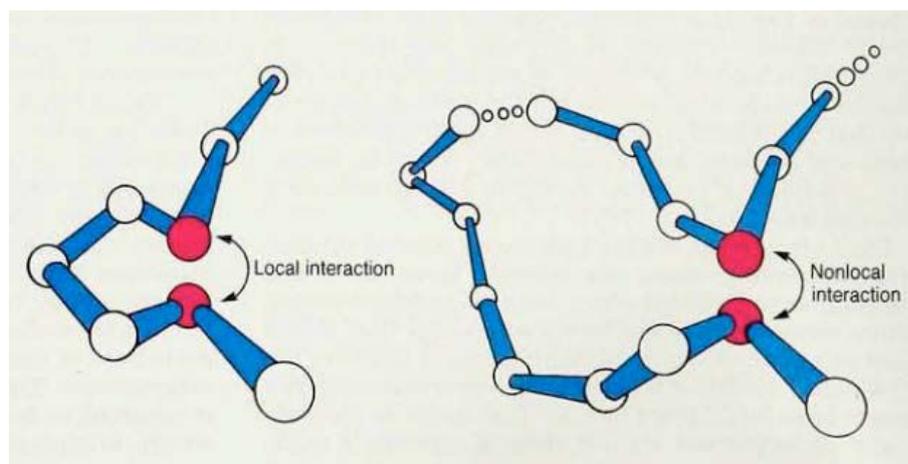


FIGURE 2 – Interactions locales et à distance. Au sein des polymères, les interactions peuvent être subdivisées en deux groupes : les interactions locales, *i.e.* entre proches voisins dans la séquence (gauche) et les interactions non locales, ou à distance, *i.e.* entre monomères proches dans l'espace mais éloignés dans la séquence (droite). Les interactions locales interviennent principalement dans la structure secondaire tandis que la structure tertiaire résulte majoritairement d'interactions à distance. Figure issue de [20].

laquelle "la structure tridimensionnelle d'une protéine native dans son milieu physiologique [...] est celle qui minimise l'énergie libre de Gibbs du système". Pour créer une protéine fonctionnelle à partir d'une chaîne d'acides aminés, il suffirait donc de minimiser l'énergie. Comment l'énergie est-elle ainsi minimisée *in vivo* ?

1.1.2 Paysage énergétique et conformation native

Le nombre de conformations qu'une chaîne polypeptidique peut théoriquement adopter étant très important, le repliement correct des protéines ne peut se faire au hasard et repose sur la coopération de multiples interactions faibles [30].

Paradoxe de Levinthal

Levinthal a formalisé cette idée en 1968 en soulevant un paradoxe depuis devenu éponyme [31]. Il s'est demandé combien de temps mettait une protéine pour se replier selon sa structure native (supposée comme unique et minimisant l'énergie libre totale du système), en considérant que la protéine explore l'espace des conformations possibles de manière aléatoire. Dans la version standard du paradoxe, Levinthal considère une chaîne de 101 acides aminés et suppose que chaque liaison peut adopter 3 états différents [32]. Ainsi, il existe $3^{100} = 5.10^{47}$ configurations possibles. En considérant que la protéine peut passer d'un état à l'autre en 10^{-13} seconde, il ne faudrait pas moins de 10^{27} années pour essayer toutes les possibilités. Une recherche aléatoire de la configuration native n'est donc pas efficace et est incompatible avec la vie, dont les échelles de temps sont bien moins importantes.

Sachant que le repliement de protéines s'effectue en fait sur des échelles de temps variant de la microseconde à la minute [33], la protéine doit suivre un chemin de repliement et non parcourir l'espace des possibles au hasard [31].

Paysage énergétique en entonnoir

L'hypothèse actuelle est que les protéines progressent vers leur état natif en explorant un paysage énergétique en entonnoir impliquant divers intermédiaires (figure 3) plutôt que de suivre un chemin préférentiel déterminé par l'existence d'intermédiaires de repliement imposés [34] [35]. Ceci est notamment supporté par le fait que les types de conformations de protéines non repliées ou partiellement repliées sont très nombreux et hétérogènes, rendant très peu probable l'existence d'un chemin unique menant à la conformation native [36].

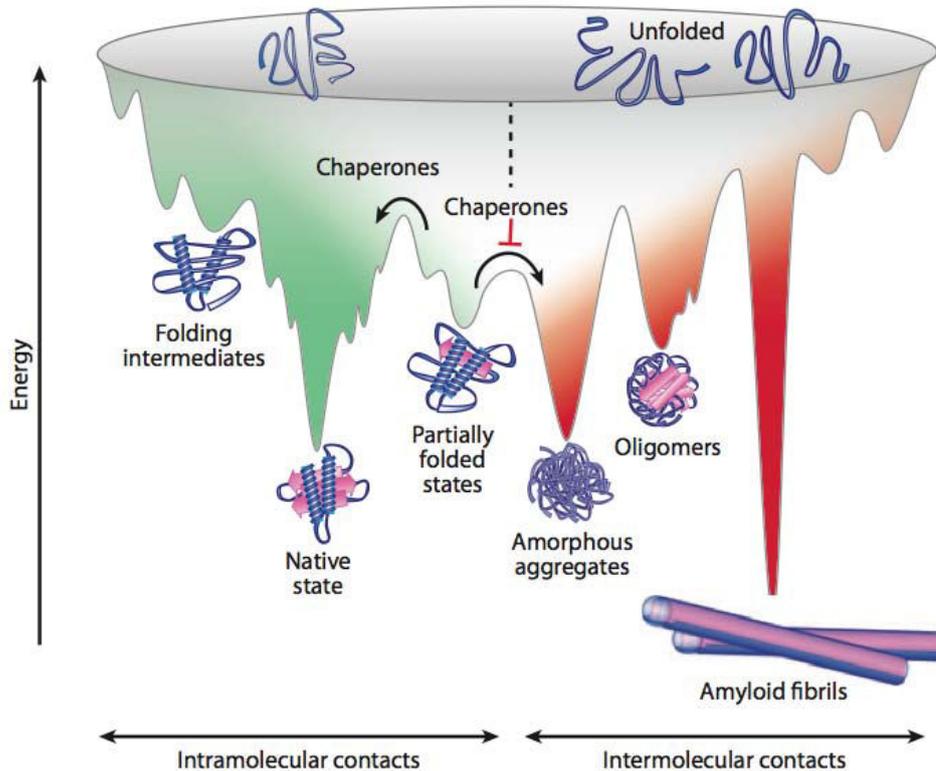


FIGURE 3 – Paysage énergétique en entonnoir mettant en évidence la compétition entre le repliement correct et l'agrégation. Les protéines se replient en parcourant un paysage énergétique dont la pente mène vers leur conformation native. Les interactions intramoléculaires favorables (zone verte) stabilisent les états intermédiaires. Les interactions favorables énergétiquement mais non-natives produisent des protéines partiellement repliées ou mal repliées piégées dans des états de basse énergie. Les protéines chaperons permettent d'éviter l'accumulation de protéines dans ces états et la formation d'interactions intermoléculaires (zone rouge) conduisant à l'agrégation (agrégats amorphes, oligomères riche en feuillets β , fibres amyloïdes). Figure extraite de [30].

Le processus de repliement correspond donc à une série de transitions entre différents états d'énergie, toujours plus bas, guidant la protéine vers sa conformation la plus stable : sa conformation native. Les fluctuations aléatoires permettent d'échantillonner divers contacts natifs et non-natifs. Les interactions natives étant généralement plus stables que les autres, le nombre de conformations disponibles est donc diminué [37]. Ainsi, l'espace des conformations à explorer pour atteindre l'état de protéine fonctionnelle est limité : le paradoxe de Levinthal est levé.

Dans l'état natif, les contacts intramoléculaires qui stabilisent la structure sont assez importants pour contrebalancer la perte d'entropie engendrée par le repliement [38], d'où la stabilité

de cet état. Parmi les différentes interactions non covalentes qui entrent en jeu lors du repliement, les interactions hydrophobes jouent un rôle particulier dans le compactage de la chaîne et l'enfouissement des acides aminés non polaires au sein de la protéine repliée [30].

Les protéines courtes (typiquement moins de 100 acides aminés) à domaine unique se replient généralement rapidement (moins d'une seconde) [39], ne faisant intervenir que deux états (l'état non replié et l'état natif) séparés par une unique barrière énergétique [40]. Les protéines plus lourdes font intervenir plusieurs intermédiaires, probablement car les longues chaînes polypeptidiques ont tendance, dans les solvants aqueux, à former des états compacts contenant des interactions non-natives [37]. Une réorganisation induisant parfois le passage d'une barrière d'énergie libre importante est alors nécessaire (figure 3). Ceci peut conduire à la formation d'intermédiaires non-natifs cinétiquement piégés, mais aussi à des états de repliement incorrect qui peuvent déclencher un phénomène d'agrégation des polypeptides [30] [37].

1.1.3 Repliement incorrect et agrégation

Les états partiellement repliés et de repliements non-natifs et incorrects s'accompagnent souvent de l'exposition de résidus hydrophobes au solvant, ce qui peut favoriser l'agrégation [41] [42]. Cependant, l'agrégation et le mauvais repliement ne doivent pas être confondus. Le mauvais repliement correspond à un état dans lequel la protéine est partiellement repliée, dans un état non-natif mais suffisamment stable pour qu'elle y soit piégée (figure 3 - domaine vert). De telles protéines sont souvent dépendantes de chaperons pour atteindre leur structure native [43], comme je le détaillerai par la suite. Ces protéines mal repliées ne vont pas toutes s'agréger [44]. L'agrégation a lieu lorsque des liaisons intermoléculaires entre protéines sont élaborées, conduisant à des structures pouvant être plus stables thermodynamiquement que la structure native (figure 3 - domaine rouge). Différents types d'agrégats sont alors observés.

Différents types d'agrégats et pathogénéicité

L'agrégation conduit tout d'abord à la formation de structures amorphes, résultant de contacts intermoléculaires principalement induits par des forces hydrophobes [45]. Ces agrégats sont classiquement nommés "corps d'inclusion" chez la bactérie *E. coli* [46] [47], mais cette terminologie n'est pas reprise chez tous les eucaryotes.

Des structures très ordonnées, appelées fibres amyloïdes, ont également été décrites [45]. Elles se caractérisent par la présence de feuillets β perpendiculaires à l'axe de la fibre (figure 4) et sont associées à des maladies neuro-dégénératives humaines telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [49] ou bien au diabète de type II [50]. Ces structures sont généralement formées selon un processus de nucléation-polymérisation [51]. Après l'étape limitante de création d'un noyau stable, la fibre grandit rapidement par ajout de monomères à ses extrémités [52]. *In vitro*, de très nombreuses protéines peuvent acquérir ces structures en feuillets [53]. *In vivo*, la formation de fibres amyloïdes existe, mais est limitée par l'intervention des protéines chaperons [54].

La formation de fibres amyloïdes est souvent accompagnée par la formation d'oligomères riches en feuillets β (figure 3), qui sont eux aussi toxiques pour la cellule [55].

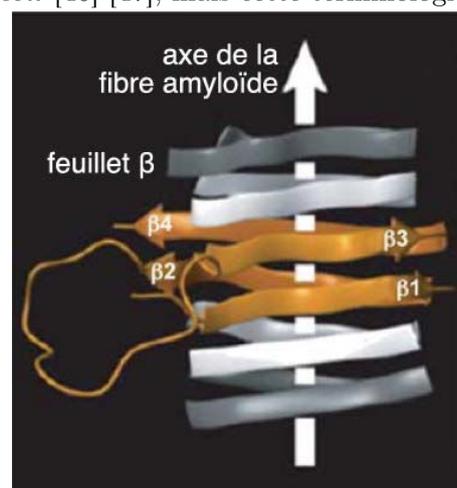


FIGURE 4 – Fibre du domaine C-terminal 218-289 de la protéine amyloïde prion HET. Figure adaptée de [48].

La toxicité relative des oligomères et des fibres amyloïdes est un sujet d'étude actuel [56].

Repliement *in vivo*

Pour comprendre le repliement des protéines *in vivo*, il faut tenir compte des différences majeures qui existent entre les propriétés physiques d'un tube à essai et celles de l'environnement cellulaire [57]. L'environnement cellulaire est en effet beaucoup plus encombré que l'environnement utilisé *in vitro*, avec une concentration moyenne totale en protéines et autres macromolécules¹ d'environ 300 à 400 $mg.mL^{-1}$ [58]. Les travaux de Minton ont montré que cet encombrement et ses effets de volume exclu (majeure partie du volume cellulaire indisponible) induisent des contraintes sur le repliement des chaînes polypeptidiques et favorisent des états non-natifs, plus compacts [59]. De plus, en augmentant l'affinité entre les macromolécules [60], l'encombrement moléculaire encourage la propension des protéines à s'agréger [61].

En outre, les acides aminés supposés interagir sont souvent dispersés le long de la chaîne polypeptidique dont seul le repliement permet de les mettre en contact [62]. Le tunnel de sortie de la grande sous-unité du ribosome, s'il permet l'élaboration de structures secondaires ou de la structure tertiaire de petits éléments, est trop étroit (~ 100 Å de long et ~ 20 Å de large) pour permettre un repliement total de la structure tertiaire *in situ* [63] [64]. Il faut donc attendre l'émergence complète d'un domaine protéique pour que son repliement puisse s'effectuer [65]. La vitesse de translation (inférieure à 21 acides aminés par seconde) étant faible devant celle du repliement des protéines (celle-ci durant parfois quelques micro-seconde seulement) [66], la chaîne naissante doit être protégée avant la sortie complète d'un domaine et son repliement [67].

Environ 20% des protéines pourraient ne jamais atteindre leur conformation native sans l'assistance de chaperons [68] et ainsi être rapidement dégradées [69]. Si le repliement initial d'une protéine est essentiel à sa fonction, il est également important de maintenir la structure de la protéine tout au long de sa durée de vie. En effet, les interactions stabilisant la conformation native d'une protéine étant contrebalancées par la diminution d'entropie, la stabilité de la protéine est relative [62]. La cellule dispose donc d'un système de contrôle qualité des protéines permettant d'assurer et de conserver un repliement correct et ainsi de maintenir l'homéostasie.

1.2 Système de contrôle qualité des protéines

Le système de contrôle qualité des protéines (PQC) est un réseau hautement conservé [70] qui permet le repliement correct des protéines et le maintien de l'homéostasie cellulaire [71]. Les protéines natives ou endommagées sont ainsi réparées par les chaperons et dégradées par le protéasome ou le lysosome, réduisant le niveau de molécules sujettes à l'agrégation (figure 5).

1.2.1 Protéines chaperons

Les protéines chaperons contrôlent à la fois le repliement initial des protéines et leur maintien ultérieur sous forme native dans la cellule (transport, dégradation, dissociation des agrégats, repliement...) [72]. Selon la définition originale, il s'agit d'un groupe de protéines, issues de divers classes, qui assurent l'assemblage correct d'autres protéines mais ne font pas partie de la structure fonctionnelle finale [73]. Ce ne sont ni des modèles, ni le support d'un code pour cette structure finale, mais des protéines aidant à éviter ou à inverser de mauvaises conformations [49].

1. La concentration de chaque molécule n'est pas élevée, mais l'ensemble des molécules présentes à faible concentration entraînent un environnement très encombré.

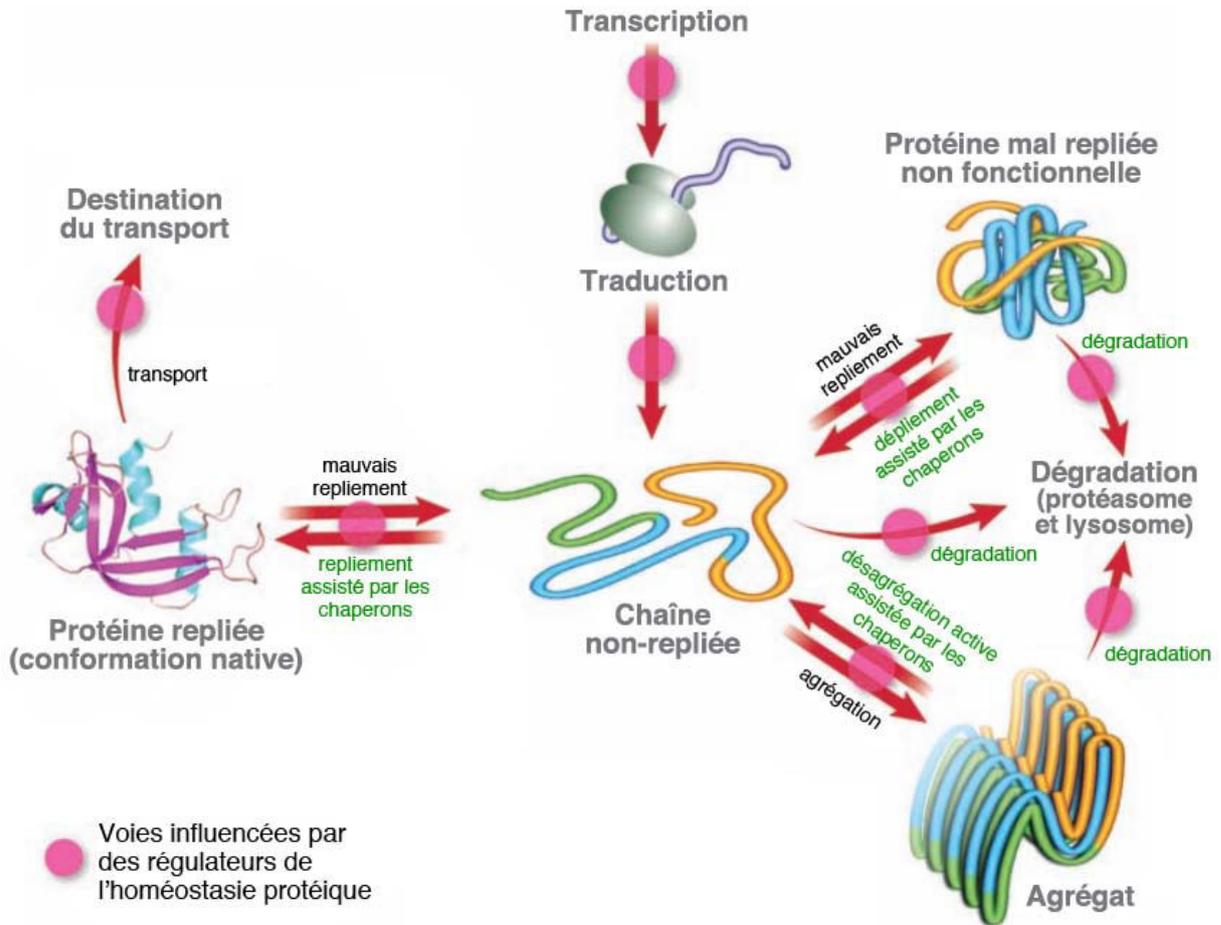


FIGURE 5 – Réseau permettant l'homéostasie protéique ou protéostasie. Les différentes voies (flèches rouges) du réseau sont modulées par des régulateurs de la protéostasie (cercles roses). Le système de contrôle qualité (vert) permet d'éviter un déséquilibre de l'homéostasie protéique conduisant souvent à l'agrégation. Figure adaptée de [71].

Le repliement est considéré comme efficace lorsqu'il est plus rapide que les phénomènes d'agrégation ou d'association protéine/chaperons. Si le repliement est trop lent, la protéine peut être transférée vers un système de chaperons différents, ou même vers la machinerie de dégradation [30]. Lorsque la concentration d'intermédiaires de repliement est trop élevée par rapport à la capacité des chaperons, on observe des phénomènes d'agrégation [30].

Les protéines chaperons sont classées en différents groupes en fonction de leurs homologues de séquence [30]. Nombre d'entre elles sont des protéines de choc thermique (Hsp) [62] : leur synthèse est induite ou augmentée pour répondre à la déstabilisation des protéines qui suit un choc thermique ou d'autres types de stress (e.g. stress oxydant, éthanol, hypoxie...). À l'origine, les différents chaperons ont été nommés en fonction de leur poids moléculaire. On retrouve donc les Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 et les petites Hsp (small Hsps).

Chaperons agissant sur le ribosome

Comme nous l'avons discuté plus haut (section 1.1.3), afin de minimiser le risque d'agrégation à la sortie du ribosome, il existe un système de protection de la chaîne naissante durant son

repliement. Les chaperons liés au ribosome (figure 6, éléments violets) permettent ainsi d'éviter l'exposition des parties hydrophobes de la protéine. Chez les procaryotes, on retrouve le "trigger factor" (TF) [74], tandis que les eucaryotes et les archae disposent de complexes spécialisés de la famille des Hsp70 [75] (Nascent-chain-Associated Complex NAC chez les archae et les eucaryotes, Ribosome-Associated Complex RAC chez *Saccharomyces cerevisiae*, MPP11 et Hsp70L1 chez les mammifères) dont la structure est différente du TF, mais qui assurent la même fonction [76].

Chez les procaryotes, la majeure partie des protéines (~ 70%) sont petites et se replient ensuite d'elles-mêmes [62] (figure 6 A, voie de gauche). Les protéines restantes ainsi que les protéines des archae et des eucaryotes sont elles prises en charge par d'autres chaperons.

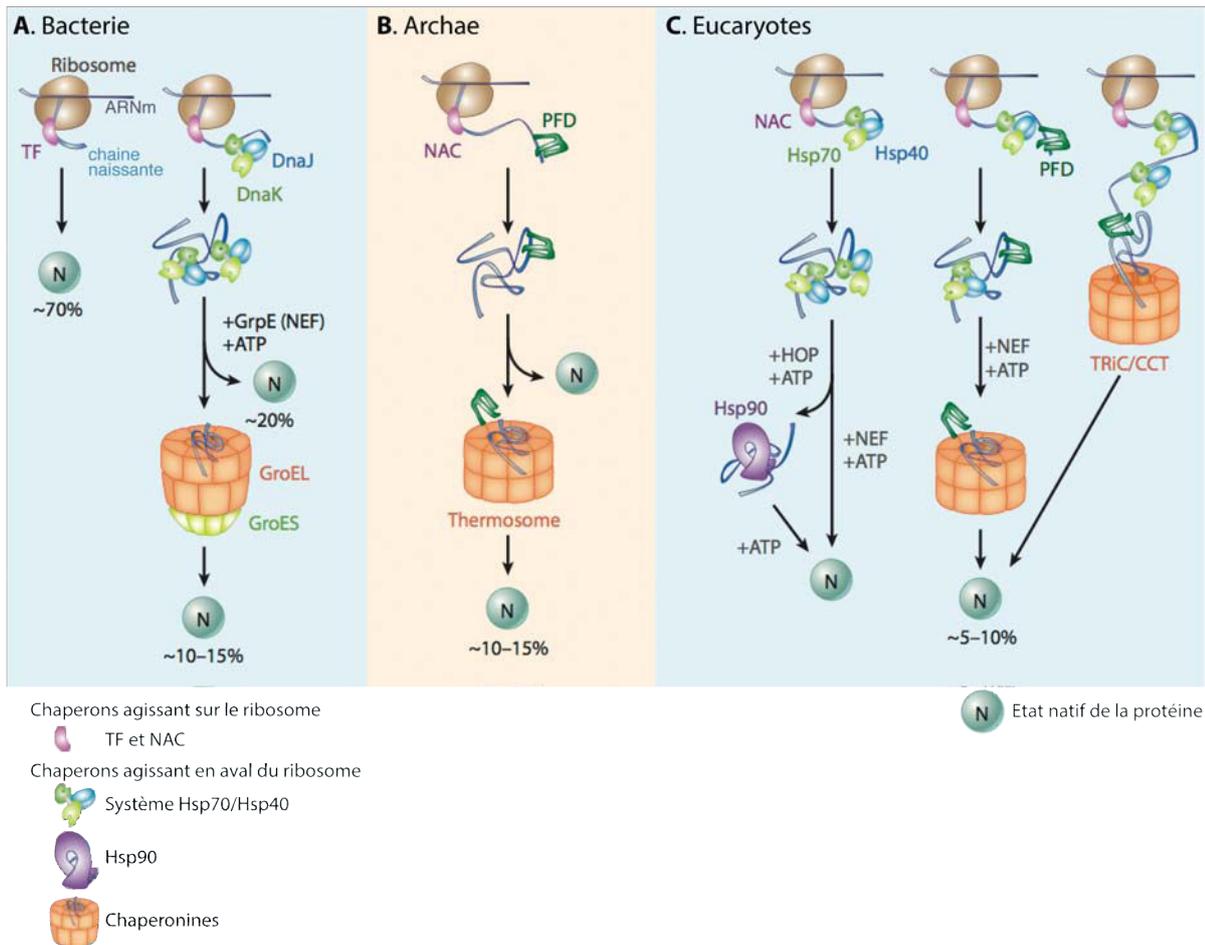


FIGURE 6 – Organisation hautement conservée des chaperons. Chez la bactérie (A), les archées (B) et les eucaryotes (C), les chaperons liés au ribosome (TF et NAC) assistent le repliement co-translational en se fixant aux parties hydrophobes de la chaîne naissante. Pour les chaînes naissantes longues, chez la bactérie et les eucaryotes, le système Hsp70/Hsp40 (DnaK/DnaJ chez la bactérie) et les facteurs d'échanges de nucléotides (NEF) permettent le repliement co- et post-translational. Chez les archées qui ne disposent pas de ce système, prefoldin (PFD) aide au repliement. Dans environ 10% des cas, les protéines partiellement repliées sont transférées aux chaperonines (GroEL-GroES chez la bactéries, thermosome chez les archées et TRiC/CCT chez les eucaryotes). Chez les eucaryotes, l'action coordonnée de Hsp90 et Hsp70 permet également le repliement de certaines protéines ciblées à l'aide de cofacteurs. Figure adaptée de [30].

Chaperons agissant an aval du ribosome

Le repliement *de novo* des protéines est assuré par le système Hsp70/Hsp40, Hsp90 et les chaperonines par l'intermédiaire de processus d'accrochage-relargage consommant de l'ATP. Hsp70 tient un rôle central dans ce réseau [54]. Il comprend un grand nombre de cofacteurs (plus de 40 chez l'homme) [77] lui permettant de réaliser des tâches très diverses, comme la translocation membranaire de protéines adressées à des organelles, le contrôle des fonctions et de la durée de vie cellulaire de protéines régulatrices et bien sûr le repliement et l'assemblage des polypeptides naissants ainsi que des protéines non-correctement repliées [49].

Système de repliement Hsp70/Hsp40

Hsp70 (DnaK chez la bactérie) n'interagit pas avec le ribosome [78]. Ce chaperon se fixe directement à la protéine naissante (figure 6 A & C, vert clair), principalement par l'intermédiaire de petites régions hydrophobes de 7 acides aminés [79]. Avec l'aide de son co-chaperon Hsp40 (DnaJ chez la bactérie, figure 6 A & C, bleu) et de facteurs d'échange des nucléotides (NEF), il permet de protéger la chaîne naissante et de l'assister dans son processus de repliement, par l'intermédiaire de cycles d'accrochage et de relargage du substrat conduisant ce dernier vers un état plus stable [30].

La fonction d'Hsp70 est assurée par DnaK chez la bactérie, Ssa1-4 chez la levure et Hsc70 chez les métazoaires [80]. La plupart des espèces d'archae ne contiennent pas d'Hsp70, qui peut alors être substitué par le chaperon prefoldin PFD [76] (figure 6 B). PFD se lie à certaines chaînes naissantes ($\sim 10 - 15\%$) et assure leur transfert vers un complexe de chaperons cylindrique afin de permettre leur repliement (figure 6 B) [81]. De même, chez les eucaryotes et la bactérie, les protéines non repliées par Hsp70 sont transférées vers le système Hsp90 [82] ou les chaperonines [81].

Hsp90 et son action coordonnée à Hsp70

Chez les eucaryotes, de nombreuses protéines sont transférées d'Hsp70 vers Hsp90, dont la fonction de régulation de la conformation est similaire. Le transfert est assuré par la protéine HOP (Hsp90 Organizing Protein), aussi connue sous le nom de Sti1 et p60, qui tire profit de répétitions tétratricopeptides pour relier Hsp70 et Hsp90 [83]. De la même façon que pour Hsp70, la maturation de la protéine et son relargage est assuré par un processus ATP-dépendant [82].

Chaperonines Hsp60

Pour environ 10% des protéines, aussi bien chez la bactérie et les archae que chez les eucaryotes, une dernière classe de chaperons entre en jeu dans le repliement : les chaperonines. Aussi appelées Hsp60, ces chaperons sont de gros complexes de 800 à 1000 kDa présentant une structure en double anneaux (figure 6, orange), au sein de laquelle une cavité centrale isolée du cytosol, appelée "cage d'Anfinsen", permet aux protéines de se replier à l'abri [84].

Les chaperonines sont classifiées en deux groupes. Les chaperonines du groupe I (GroEL chez la bactérie, Hsp60 dans les mitochondries et Cpn60 dans les chloroplastes) fonctionnent en association avec un chapeau (respectivement GroES, Hsp10 et Cpn10/20) permettant d'encapsuler les substrats [85]. Les chaperonines du groupe II consistent en le thermosome des archae et son homologue eucaryote TRiC, dont le chapeau est intégré à la structure [85].

Les chaperonines interviennent généralement de manière post-translationnelle (figure 6 A-bas, B-bas et C-voie centrale). Cependant, chez les eucaryotes, TRiC peut interagir avec Hsp70 [86], se lier à la chaîne naissante et ainsi contribuer à son repliement de manière co-translationnelle (figure 6 C-voie de droite) [87].

Les protéines chaperons jouent donc un rôle clef dans le repliement des chaînes natives. Cependant, leurs fonctions ne se confinent pas à cela. Elles sont également impliquées dans les processus de dissociation et de dégradation des agrégats.

Chaperons impliqués dans la désagrégation

De nombreux chaperons sont impliqués dans la désagrégation. En particulier, les protéines chaperons homologues à Hsp104 permettent de déplier les protéines agrégées afin qu'elles puissent être repliées correctement par les chaperons décrits dans le paragraphe précédent.

Hsp104 : élément de base de la désagrégation

Le dépliement des protéines agrégées est assuré par ClpB chez la bactérie et par son homologue Hsp104 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Chez les métazoaires, Hsp104 n'existe pas. Cependant, une étude récente a montré que l'activité conjuguée d'Hsp110, Hsp70 et d'Hsp40 permet de désagréger et de réactiver des protéines dans une moindre mesure [88]. Les homologues d'Hsp104 constituent une sous-classe de la super-famille des "ATPases associées à divers activités cellulaires", les AAA+ ATPases [89]. Ce sont donc des chaperons "motorisées", qui transforment l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP en travail mécanique [90].

Le domaine N-terminal et les deux domaines de liaison à l'ATP présents au sein de chaque monomère d'Hsp104 (figure 7 A) sont essentiels pour former des hexamères (figure 7 B) et ainsi assurer la fonction de ce chaperon [91]. En effet, la structure hexamérique [92] permet la formation d'un pore axial (figure 7 B) dans lequel la protéine agrégée passe afin d'être dépliée (figure 7 C) [93]. L'importance du passage par ce pore a notamment été confirmée par mutagenèse du canal [94]. Le mécanisme de dépliement est réalisé en collaboration avec Hsp70, selon un processus qui n'est toujours pas décrit dans son intégralité. Cependant, les études de Weibezahn *et al.* [93] et de Zietkiewicz *et al.* [95] ont montré que les protéines étaient d'abord recrutées par Hsp70, puis dépliées par Hsp104. De plus, selon les récents résultats de Lee *et al.*, Hsp70 pourrait activer le moteur de dépliement d'Hsp104 [96]. Il faut ajouter que bien que Hsp104 puisse fonctionner sans Hsp70, son action est alors très lente [97]. L'action coordonnée d'Hsp70 et d'Hsp104 est en outre hautement spécifique, puisque Glover et Lindquist ont décrit que des chaperons issus du même organisme étaient nécessaires, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, pour observer une activité normale de désagrégation [98]. Dans ce processus de désagrégation, Hsp104 est également assisté par les petites Hsp (sHsp).

Petites Hsp : chaperons tampons limitant l'agrégation

Les petites Hsp sont des chaperons dont le poids moléculaire est inférieur à 43 kDa [99] [100]. Ces protéines α -cristallines sont capables de maintenir partiellement la solubilité de protéines mal repliées et d'agrégats, de manière indépendante de l'ATP, en se liant à leurs domaines hydrophobes exposés au cytoplasme [62]. Elles se retrouvent donc principalement dans les fractions insolubles des extraits protéiques de bactéries stressées² [101]. Dans les conditions physiologiques, les sHsp s'organisent sous forme de gros oligomères qui échangent constamment des sous-unités [102]. Lorsque la température est augmentée, les sHsp passent dans une forme active et leur affinité avec les agrégats est augmentée [103]. Elles viennent alors s'insérer dans les agrégats (figure 7 D), permettant une plus grande efficacité du système Hsp104/Hsp70 [104] [105]. Si le mécanisme d'action n'est aujourd'hui pas élucidé, il est cependant clair que ces petits chape-

2. Ceci est d'ailleurs à l'origine de la dénomination de deux gènes codant pour des sHsp chez la bactérie : IbpA et IbpB pour "inclusion body protein".

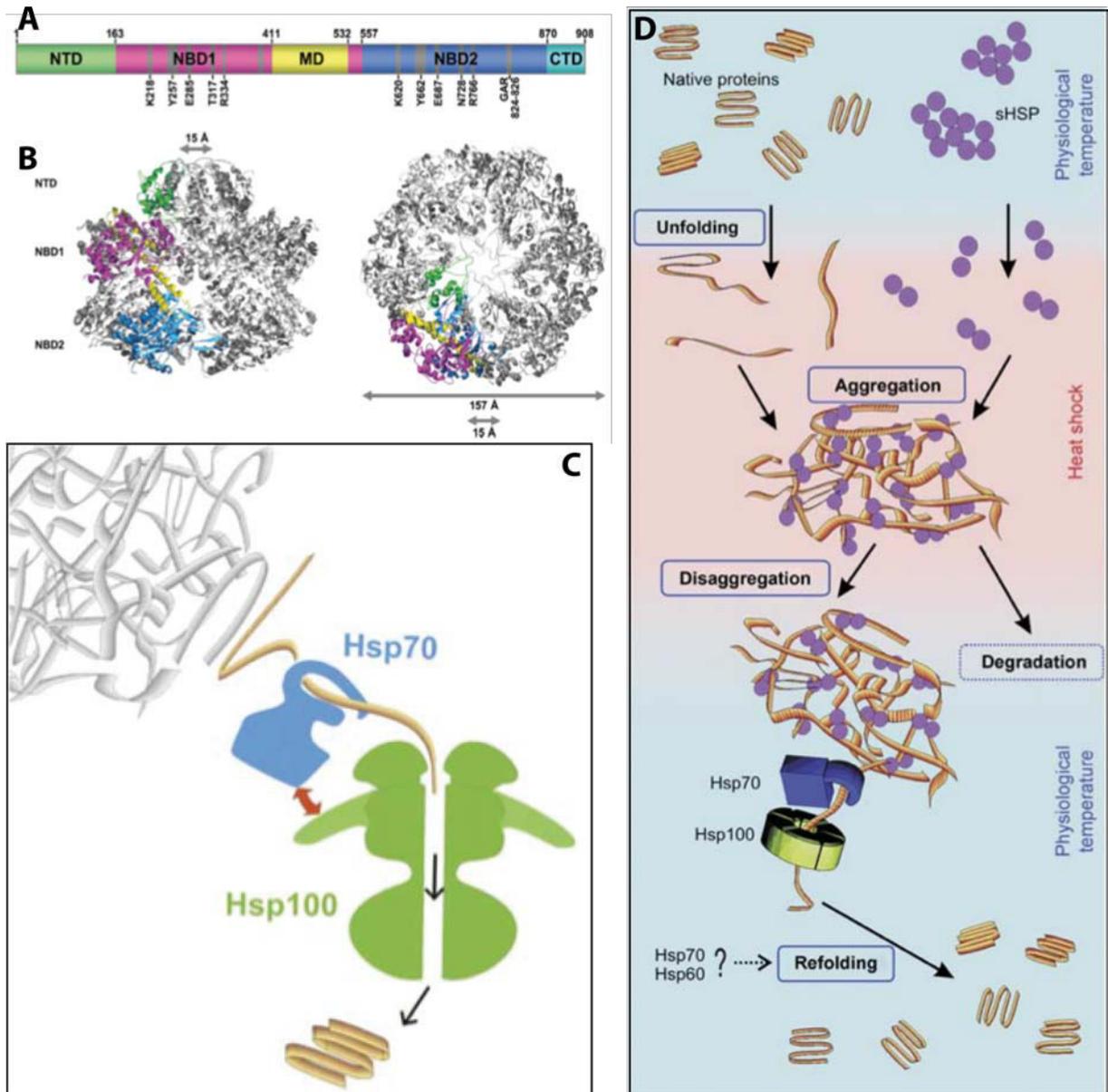


FIGURE 7 – Désagrégation par le chaperon Hsp104. A) Organisation des domaines des résidus clefs d’Hsp104. NTD : domaine N-terminal, MD : domaine central, CTD : domaine C-terminal, NBD : domaine de liaison. B) Reconstitution par cryo-électromicroscopie de l’héxamère d’Hsp104 vu de côté (gauche) et de haut (droite). Couleurs correspondant aux domaines décrits en (A). Le domaine CTD n’a pu être résolu et est donc manquant. C) Modèle du mécanisme de désagrégation des agrégats protéiques assuré par Hsp104 (famille Hsp100) et Hsp70. Hsp70 libère la chaîne polypeptidique agrégée, qui est ensuite recrutée par Hsp104 pour être dépliée par passage dans le pore central, grâce à un mécanisme ATP-dépendant et coordonné (flèche rouge). La protéine se replie ensuite d’elle-même ou à l’aide d’autres chaperons. D) Rôle des petites protéines de choc thermique (sHSP) dans le processus de désagrégation. Figure adaptée de [62] et [90].

rons jouent un rôle déterminant dans les maladies neurodégénératives humaines [106]. Chez *S. cerevisiae*, les deux petites Hsp majeures identifiées sont Hsp26 [107] et Hsp42 [108].

En plus de contribuer au repliement natif des protéines, les chaperons, et en particulier le système Hsp104/Hsp70 et les petites Hsp, permettent de replier correctement les protéines agrégées. Cependant, certaines protéines ne peuvent être réparées. Afin d'assurer l'homéostasie cellulaire, elles sont alors détruites par le protéasome ou le lysosome.

1.2.2 Protéasome et lysosome

Le catabolisme, *i.e.* l'ensemble des réactions de dégradation moléculaire, est important afin de réguler finement la durée de vie des protéines [109], de recycler les acides aminés, mais aussi pour éliminer les protéines non fonctionnelles et toxiques et prévenir l'agrégation [110]. Chez les eucaryotes et les archaées, deux voies principales de dégradation existent : le système ciblé ubiquitine-protéasome [111] et le système de dégradation massive ou ciblée autophagie-lysosome [112]. Ces deux systèmes sont intimement liés à l'existence de certains chaperons [113] [114].

Système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) dégrade les protéines de manière ciblée grâce à l'ubiquitination spécifique des protéines dont le temps de vie cellulaire est dépassé ou qui sont mal repliées. Les protéines ubiquitinylées sont ensuite reconnues par le protéasome où elles sont dégradées. Le protéasome 26S est constitué de 50 sous unités protéiques arrangées pour former un canal creux au sein duquel a lieu la protéolyse [115]. Le protéasome déplie les protéines avant de pouvoir les dégrader [116] : la protéolyse requiert donc la présence de chaperons pour maintenir les protéines dans un état non agrégé [117].

De plus, chez les eucaryotes supérieurs, les chaperons et les ubiquitine-ligases coopèrent pour la reconnaissance et l'adressage des protéines endommagées vers le protéasome [111]. On parle de la voie CAP (pour Chaperone-Assisted Proteasomal degradation). Par exemple, Hsp70 et Hsp90 coopèrent avec l'ubiquitine-ligase CHIP (protéine interagissant avec le C-terminus de Hsc70) pour l'ubiquitination de protéines clientes (figure 8 B) telles que certaines hormones ou protéines agrégées impliquées dans les maladies neurodégénératives [118]. Ce système peut être stimulé par l'accrochage de BAG-1 (figure 8 B) ou de HSJ-1 au complexe CHIP-Hsp70-Hsp90 ou au contraire enrayé par l'accrochage respectif de HOP ou HIP aux sites de liaison de CHIP ou BAG-1 [118]. Lorsque le système UPS est altéré, une augmentation de l'agrégation est observée [119]. Dans des souris KO pour la protéine CHIP, les agrégats s'accumulent et altèrent la longévité [120].

Le protéasome peut également permettre de dégrader de manière ciblée des protéines mal repliées et agrégées impliquées dans le vieillissement, comme les agrégats de protéines oxydées [121], par un processus ubiquitine-indépendant [122]. La diminution de l'activité du protéasome observée avec l'âge pourrait donc être étroitement liée avec le processus de vieillissement [123].

Enfin, le système UPS ne se limite pas à la dégradation de protéines présentes dans le cytosol. Par l'intermédiaire de la dégradation associée au réticulum endoplasmique (voie ERAD), les protéines mal repliées du réticulum endoplasmique peuvent être ramenées vers le cytosol et ensuite prises en charge par le protéasome [124].

S'il existe un lien ténu entre le système UPS et les chaperons, ces derniers sont aussi impliqués dans certains processus d'autophagie.

Système autophagie-lysosome

L'autophagie, digestion d'une partie de la cellule par les lysosomes ou par la vacuole chez les plantes et les fungi [125], ne contribue pas seulement à la régulation de la mort cellulaire et à l'élimination des organelles dysfonctionnels et des pathogènes, mais aussi au système de contrôle qualité [126]. Les protéines agrégées insolubles qui ne peuvent pas être dépliées pour

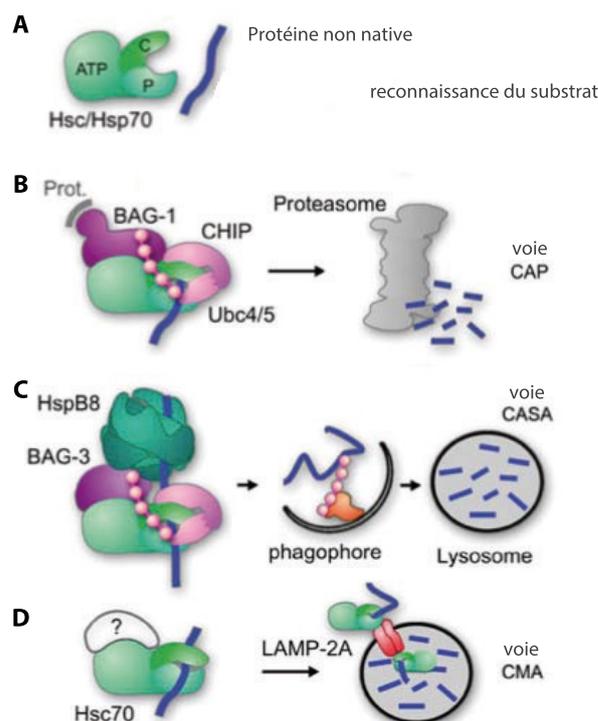


FIGURE 8 – Schématisation des différentes voies de dégradation. A) Reconnaissance initiale des protéines clients mal repliées par le complexe Hsc/Hsp70. B) Voie CAP. L'accrochage de l'ubiquitine ligase CHIP et de BAG-1 initie la dégradation par le protéasome assistée par les chaperons. C) Voie CASA. L'accrochage de BAG-3 et de HspB8 au complexe Hsc/Hsp70 induit l'autophagie sélective des protéines à dégrader. L'ubiquitination assurée par CHIP permet la reconnaissance du substrat par le phagophore qui fusionne ensuite avec le lysosome, au sein duquel la dégradation a lieu. D) Voie CMA. Le substrat est directement transféré à travers la membrane du lysosome par la protéine membranaire LAMP-2A avant d'être dégradé dans le lumen. La régulation par d'éventuels cochaperons n'est pas connue (?). Figure adaptée de [118].

une dégradation par le protéasome sont en effet détruites par autophagie [127]. Il existe trois types d'autophagie. Lors de la macro-autophagie, les molécules à détruire sont englouties au sein d'un autophagosome, puis détruites lors de la fusion de ce dernier avec un lysosome [128] ou la vacuole [129]. Lors de la micro-autophagie, les molécules à détruire sont englouties directement par le lysosome ou la vacuole [130]. La dernière voie nommée CMA correspond à l'autophagie arbitrée par les chaperons (Chaperone-Mediated Autophagy) [118]. Pour l'instant, elle n'a été identifiée que chez les mammifères [131].

La macro-autophagie est souvent non-spécifique (agrégats protéiques, organelles, microbes...), mais peut aussi être ciblée vers des protéines spécifiquement ubiquitinylées [132]. Chez les mammifères, ce processus implique notamment BAG-3 et HspB8, co-chaperons du système Hsp70/Hsp90 (figure 8 C) ainsi que CHIP [128]. On parle de voie CASA (Chaperone-Assisted Selective Autophagy). CHIP étant impliqué à la fois dans la voie CASA et la voie CAP en interaction avec les différents complexes BAG, la régulation des domaines BAG semble particulièrement importante et pourrait permettre de passer d'un mode de dégradation à l'autre [133]. Chez la levure, la macro-autophagie spécifique par ubiquitination de protéines membranaires telles que le récepteur aux phéromones Ste2p [134] ou la perméase Fur4p [135] a également été observée (voir Horak *et al.* pour un aperçu plus complet des protéines membranaires ubiquitinylées avant leur dégradation à la vacuole [136]).

La voie CMA est quant à elle indépendante de l'ubiquitination. Les protéines contenant un motif KFERQ sont reconnues par Hsc70, délivrées au récepteur lysosomal LAMP-2A et importées directement dans le lysosome où elles sont dégradées [137] (figure 8 D). Cette voie n'implique pas la formation de vésicules et s'oppose donc aux autres voies de l'autophagie.

Chez la souris, la perte de l'autophagie cause l'accumulation d'agrégats et la neurodégénérescence même en l'absence de stress, montrant l'importance de cette voie pour l'homéostasie protéique [138]. En outre, il a été montré que l'activité lysosomale diminue avec l'âge et conduit

à l'accumulation d'agrégats [127] [139]. Chez la levure, la délétion de la plupart des gènes en lien avec l'autophagie (famille *ATG*) induit un vieillissement prématuré [140]. La perte de l'autophagie pourrait donc être étroitement liée au vieillissement selon un mécanisme conservé.

Nous avons vu que le repliement initial n'assure pas en lui-même la stabilité d'une protéine, qui peut ensuite être affectée par de nombreux facteurs induisant une déstabilisation, suivie d'une agrégation. Lorsque les différentes voies du système de contrôle qualité des protéines ne parviennent pas à replier correctement ou à détruire les protéines mal repliées, les agrégats subsistent. Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer [141], d'Huntingtin [142], de Parkinson [143] ou les encéphalites spongiformes [144], mais également des maladies musculaires [145] [146] ou de l'œil [147] sont associées à un type particulier d'agrégats : les agrégats à plaques amyloïdes. Chez la levure de boulanger, de telles maladies peuvent être étudiées grâce au modèle prion [148] comme l'a montré le groupe de Susan Lindquist [149]. Les chocs thermiques peuvent également être à l'origine de la formation d'agrégats.

1.3 Réponse de *Saccharomyces cerevisiae* à un stress thermique

Chez les micro-organismes et les plantes, qui évoluent dans un environnement (température, osmolarité, nutriments à disposition...) très variable, une réponse adaptée au stress est particulièrement importante afin de réparer les dommages produits, de s'adapter aux conditions environnementales et de prévenir les potentiels stress à venir [150]. Chez la levure de boulanger, l'exposition à un stress léger peut ainsi permettre de développer la résistance à une dose plus élevée de ce stress ou à un autre type de stress [151]. On parle de tolérance et de protection croisée. La protection croisée est notamment permise grâce à la réponse générale au stress, qui coordonne l'induction de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress par l'intermédiaire d'un élément commun existant au sein de leur promoteurs, l'élément de réponse au stress STRE (STress Responsive Element) [150]. L'accrochage de Msn2p et Msn4p aux STRE permet l'activation de la transcription de nombreux gènes lors des stress [152], comme cela est discuté en détail dans la revue de Morano *et al.* [153].

Lorsque *S. cerevisiae*, qui pousse de manière optimale entre 25 et 30°C [153], est soumise à une température plus élevée (typiquement supérieure à 35°C), un autre élément régulateur peut moduler la transcription, de manière additive ou redondante : l'élément de choc thermique HSE (Heat Shock Element) [150]. De la même façon que Msn2p/Msn4p modulent l'expression des STRE, la fixation du facteur de transcription de choc thermique Hsf1p au niveau des HSE induit l'activation de la transcription lors de l'élévation de température [154]. Lors de tels chocs thermiques, de nombreuses protéines de choc thermique (Hsp) sont produites [155]. L'expression du chaperon Hsp104 est notamment fortement induite [156] et permet alors de lutter contre les phénomènes d'agrégation [30].

En 1982, Li et Werb ont montré que chez les fibroblastes de hamster chinois la synthèse des protéines de choc thermique corrèle avec l'acquisition de la thermotolérance, *i.e.* le développement d'une résistance à des températures létales après l'exposition à un premier choc thermique plus doux [157]. Sanchez et Lindquist ont ensuite montré que chez la levure, Hsp104 est nécessaire à l'acquisition de la thermotolérance [156], mais également à la tolérance à d'autres types de stress comme l'exposition à l'éthanol, au froid prolongé ou à l'arsénite [158]. De la même manière, ClpB [159] et Hsp101 [160], homologues respectifs d'Hsp104 chez la bactérie et les plantes, sont nécessaires à leur survie à haute température. Comme nous l'avons vu en section 1.2.1, Hsp104 (respectivement ClpB) participe en effet au processus de désagrégation des agrégats induits par augmentation de température chez *S. cerevisiae* [92] (respectivement *E. coli* [161]), qui sont

supposés toxiques pour la cellule. Lorsque *S. cerevisiae* est soumise à un choc thermique, on observe ainsi la formation d'agrégats protéiques liés à Hsp104 [94] [162] (figure 9).

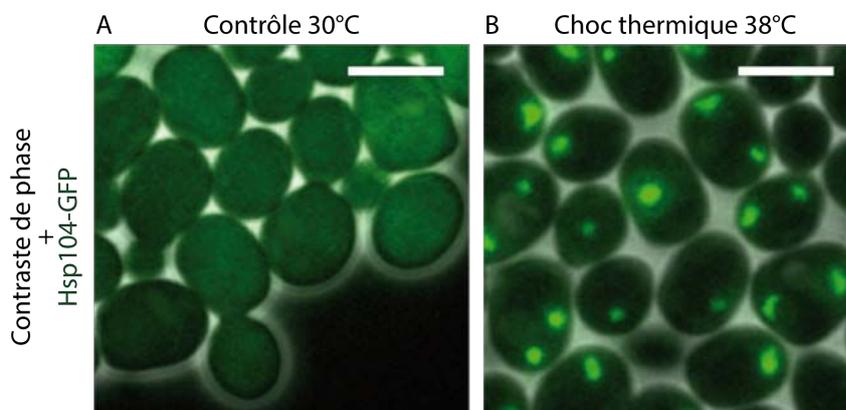


FIGURE 9 – Formation d'agrégats protéiques liés à Hsp104 lors d'un choc thermique à 38°C chez *Saccharomyces cerevisiae* : souche BY4741 (S288C) contenant une protéine de fusion Hsp104-GFP (Invitrogen™ YLL026W). A) Contrôle à 30°C. La protéine Hsp104-GFP est visible dans le cytoplasme mais ne forme pas d'agrégats. B) Choc à 38°C . Des agrégats protéiques liés à Hsp104-GFP sont visibles. Conditions d'observation, d'illumination et de seuillage équivalentes pour les deux images. Barre d'échelle : 5 μ m.

De la même manière que l'activité du protéasome [123] et du lysosome [127] diminue avec l'âge, conduisant notamment à la formation d'agrégats, la réponse au stress et l'activité des chaperons déclinent lors du vieillissement et de certaines maladies [163]. Ceci pourrait être impliqué par la diminution de l'activité du facteur de transcription Hsf1p [49]. Le maintien de l'homéostasie protéique n'étant plus assuré, des agrégats protéiques se forment, impliquant chez les eucaryotes supérieurs l'apparition de maladies neurodégénératives [164] et liées au vieillissement [41]. Dans le chapitre suivant, je présenterai les théories fondamentales du vieillissement et leur lien avec l'agrégation protéique chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Chapitre 2

Le vieillissement chez *Saccharomyces cerevisiae* et son lien avec l'agrégation protéique

Michael R. Rose a défini le vieillissement comme un déclin de la fertilité et une augmentation de la mortalité avec l'âge [165]. Pour étudier le vieillissement, on s'intéresse donc classiquement aux modifications qui ont lieu chez les espèces biologiques au cours du temps. En 1961, Leonard Hayflick a observé que des cellules fœtales humaines cultivées *in vitro* se divisaient un nombre fini de fois avant de s'arrêter [166]. L'état de vieillesse, appelé "sénescence", est donc notamment caractérisé par une capacité limitée à se diviser, mais également à répondre au stress (*i.e.* modification des conditions de vie), ainsi que par une augmentation du risque de maladie [167] [168].

Les mécanismes de dégénérescence et de vieillissement sont un sujet de recherche actuel [168]. Comme l'a constaté Georges Williams, "il est remarquable qu'après la prouesse de la morphogénèse un métazoaire complexe soit incapable de mener à bien la tâche bien plus aisée consistant simplement à maintenir ce qui a déjà été formé" [169]. Comprendre pourquoi les organismes vieillissent est donc une question fondamentale de la biologie [170]. Dans ce chapitre, je décrirai brièvement les théories et modèles principaux du vieillissement, puis je montrerai qu'il peut être étudié chez *S. cerevisiae* et exposerai quel est son lien avec l'agrégation protéique.

Sommaire

2.1	Théories fondamentales du vieillissement	24
2.1.1	Définition du vieillissement et lois empiriques	24
2.1.2	Théories générales du vieillissement	25
2.1.3	Différents modèles d'études du vieillissement	27
2.1.4	Pertinence des unicellulaires	29
2.2	Vieillissement chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.2.1	Vieillissement chronologique	33
2.2.2	Vieillissement réplicatif	34
2.3	Paradigme du vieillissement réplicatif chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.3.1	Accumulation asymétrique de facteurs de vieillissement	37
2.3.2	Revue des différents facteurs potentiels de vieillissement	38
2.4	La protéine de choc thermique Hsp104, marqueur des agrégats protéiques et du vieillissement	40
2.4.1	Colocalisation d'Hsp104 avec les agrégats de protéines carbonylées	41
2.4.2	Hsp104, protéine utilisée comme marqueur du vieillissement	42

2.1 Théories fondamentales du vieillissement

2.1.1 Définition du vieillissement et lois empiriques

En 1951, Peter Medawar définissait le vieillissement comme "les changements qui se produisent au sein des entités biologiques et qui dépendent de l'âge ou du temps" [170]. Selon Dillin *et al.*, ces changements constituent l'un des facteurs de risque les plus importants à l'origine des maladies comme le cancer, la neurodégénérescence et le diabète [171]. Le vieillissement est donc associé à l'idée de déclin des fonctions physiologiques, entraînant finalement la mort. Pour l'étudier, on observe classiquement l'évolution au cours du temps du taux de survie d'une population.

Calcul du taux de survie et de la mortalité

Le taux de survie $s(t)$ se définit comme le quotient du nombre $n(t)$ de personnes en vie à l'instant t sur le nombre total d'individus initialement présents N_{tot} :

$$s(t) = \frac{n(t)}{N_{tot}} \quad (2.1)$$

En suivant les naissances et les morts d'une population au cours du temps, on peut noter le temps t_M de la mort de chaque individu (figure 10 A), connaître le nombre $n(t)$ d'individus encore en vie à l'instant t et tracer une courbe de survie comme celle présentée en figure 10 B.

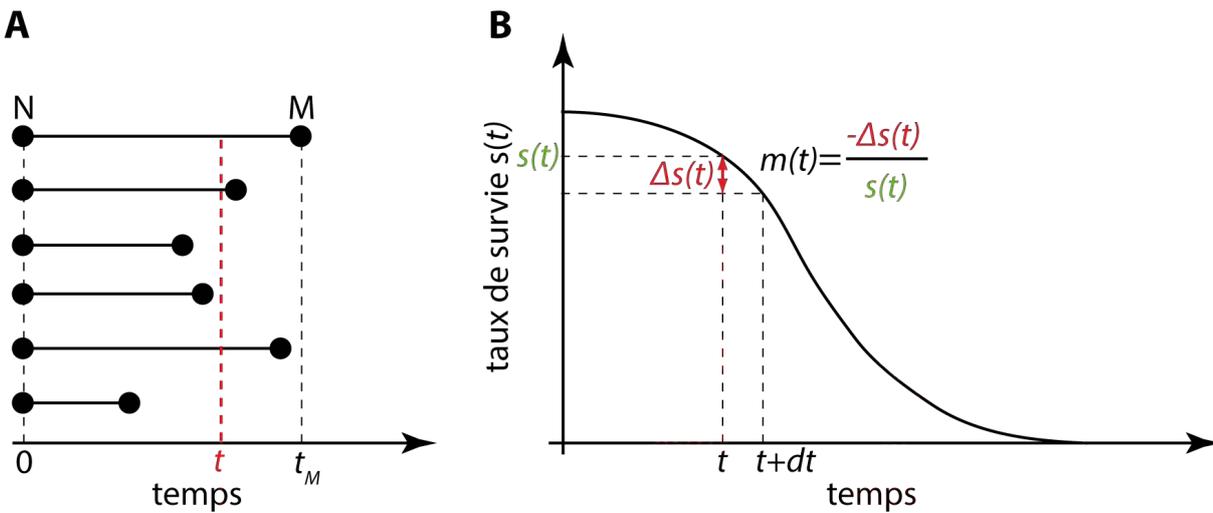


FIGURE 10 – Principe d'une courbe de survie et définition de la mortalité. A) Calcul du taux de survie. La naissance N (à $t = 0$) et la mort M (à t_M) de chaque individu d'une population est suivie au cours du temps. Au temps t indiqué en rouge, 3 individus sont encore en vie alors que le nombre total d'individus était au départ de $N_{tot} = 6$. Le taux de survie est alors de $s(t) = 3/6 = 0.5 = 50\%$. B) Aspect typique du taux de survie $s(t)$ et calcul de la mortalité. La mortalité $m(t)$ correspond au nombre de morts $\Delta n(t) = -\Delta s(t) \times N_{tot}$ qui ont lieu entre l'instant t et l'instant $t + dt$ rapporté au nombre d'individus $n(t) = s(t) \times N_{tot}$ présents à l'instant t .

À partir du taux de survie $s(t)$, on peut calculer la mortalité. La mortalité $m(t)$ correspond au nombre d'individus qui meurent entre l'instant t et l'instant $t + dt$ rapporté au nombre d'individus présents à l'instant t . On a donc :

$$m(t) = \frac{n(t) - n(t + dt)}{n(t)} \quad (2.2)$$

soit, en utilisant l'équation (2.1) :

$$m(t) = \frac{s(t) - s(t + dt)}{s(t)} = -\frac{\Delta s(t)}{s(t)} = -\frac{d}{dt} \ln(s(t)) \quad (2.3)$$

Comme nous l'avons vu en introduction de ce chapitre, le vieillissement se définit notamment par l'augmentation de la mortalité avec l'âge [165].

Loi de Gompertz–Makeham

En 1825, Benjamin Gompertz a décrit une augmentation exponentielle de la mortalité avec l'âge selon la loi suivante :

$$m(t) = \alpha \exp(\beta t) \quad (2.4)$$

avec les constantes positives et découplées α et β respectivement définies comme le taux basal de mort et la vitesse de vieillissement [172]. Chez de nombreuses espèces, comme l'homme, le rat, la souris [173] ou encore la drosophile [174], le ver [175] et la levure [176], la mortalité suit la loi de Gompertz. La courbe de survie est alors sigmoïdale, telle celle présentée en figure 10 B.

En 1860, William Makeham a affiné cette loi en ajoutant un terme indépendant de l'âge à l'expression de la mortalité [177]. La mortalité est aujourd'hui classiquement exprimée selon la loi de Gompertz-Makeham :

$$m(t) = \alpha \exp(\beta t) + \lambda \quad (2.5)$$

avec α , β et λ des constantes positives. Dans un environnement protégé, tel que celui du laboratoire, le terme λ indépendant de l'âge est souvent négligeable. La loi suivie est alors celle de Gompertz présentée en équation (2.4). Cependant, cette loi n'est pas toujours vérifiée. Dans certains cas, les organismes meurent selon la loi de puissance de Weibull, habituellement constatée chez les machines, comme ça a déjà été observé chez certains vers et certaines drosophiles [178]. En outre, il existe des organismes pour lesquels la mortalité est totalement indépendante de l'âge, comme l'hydre [179]. La courbe de survie $s(t)$ décroît alors exponentiellement et aucune sénescence n'est constatée. Enfin, pour certains organismes, la mortalité décroît même avec l'âge, comme c'est le cas pour la tortue du désert [180]. On parle alors de sénescence négative [181].

Le suivi du temps de survie des organismes permet donc de savoir s'ils sont sujets à la sénescence ou non. Cependant, il ne permet pas d'expliquer ce phénomène. Pour mieux comprendre l'origine de la sénescence, la clef serait de disposer d'un modèle de vieillissement hautement prédictif et explicatif.

2.1.2 Théories générales du vieillissement

Si un tel modèle n'a pas encore été décrit, il existe différentes hypothèses expliquant le vieillissement qui peuvent être regroupées au sein de deux théories générales s'opposant : la théorie du vieillissement programmé et celle de l'accumulation d'erreurs.

Théorie du vieillissement programmé

Le principe de vieillissement programmé a été suggéré en 1882 par August Weismann [182], selon qui un mécanisme spécifique déclenchant la mort était nécessaire pour éliminer les individus vieux et donc "épuisés" d'une population [183]. D'après cette théorie, le vieillissement n'est pas dû à un déclin progressif des fonctions physiologiques mais à un processus programmé et contrôlé, qui induit l'apoptose [184] et la mort des organismes à un moment déterminé, grâce à l'existence d'une horloge biologique [185]. Chez les eucaryotes, cette horloge biologique pourrait par exemple être

liée au raccourcissement des extrémités des chromosomes [186], nommées télomères, qui s'opère à chaque réplication du génome et donc à chaque division [187] [188] et qui peut engendrer, à terme, l'apoptose ou la sénescence [189].

Les phénomènes de mort programmée induite par un signal donné connus chez les nematodes et les vertébrés [190] ont également été observés chez *S. cerevisiae* [191] et chez *E. coli* [192]. Au cours de la vie, l'expression des gènes serait modifiée induisant des changements notamment dans la maintenance et la réparation et déclenchant ainsi la mort. Une des hypothèses avancée, nommée théorie reproductive du cycle-cellulaire, propose une modification de l'expression des hormones de la reproduction à l'origine du phénomène de sénescence [193] [194].

Cependant, d'après Thomas Kirkwood, la théorie du vieillissement programmé est incorrecte car on ne connaît pas, à l'heure d'aujourd'hui, de gène ayant évolué spécifiquement pour causer le vieillissement [195]. De plus, selon Alexander Comfort, la sénescence induite n'est pas pertinente du point de vue de l'évolution puisqu'aucun organisme à l'état sauvage n'atteint l'âge où il entre en sénescence [196]. Une seconde théorie générale a donc été proposée : la théorie d'accumulation d'erreurs.

Théorie de l'accumulation stochastique d'erreurs

Principe

Selon cette théorie, le vieillissement ne serait pas programmé, mais déclenché par une accumulation stochastique d'erreurs. En 1963, Leslie Orgel propose que les mutations des protéines à l'origine du traitement de l'information génétique conduisent à l'accumulation exponentielle d'erreurs dans la synthèse protéique et finalement à la détérioration des cellules, qui pourrait induire le vieillissement et la mort [197]. De nombreuses autres théories d'accumulation d'erreurs existent, comme la théorie de Denham Harman de l'accumulation de radicaux libres générés lors de la respiration [198] [199], la théorie de l'accumulation de protéines agrégées [49] évoquée dans le chapitre précédent ou celle de Harris Bernstein de l'accumulation de dommages de l'ADN [200] [201]. De même, le raccourcissement des télomères proposé par Alekseï Olovnikov [187] puis observé par Calvin Harley [188] peut être considéré comme une accumulation de dommages. Toutes ces hypothèses ont un point commun, le déclin des fonctions physiologiques est supposé lié à l'accumulation de dommages.

La création de dommages pourrait être accélérée en fin de vie avec la diminution des mécanismes de réparation et de suppression des dommages, notamment assurés par le protéasome [121], l'autophagie [128] ou les chaperons [163]. Cette rupture de l'équilibre entre création et réparation de dommages, nécessaire à l'homéostasie cellulaire, serait à l'origine de la sénescence [202].

Lien avec la théorie de l'évolution

D'un point de vue évolutif, les animaux à l'état sauvage mourant souvent avant d'atteindre l'état de sénescence [203], la pression sélective est plus forte en début de vie qu'en fin de vie [204]. La sélection naturelle est donc peu efficace pour influencer sur la survie à des âges avancés et peu conduire à l'accumulation de mutations néfastes [205], comme l'a proposé Peter Medawar dans sa théorie d'accumulation de mutations [170]. Cette théorie se base sur les travaux de Ronald Fisher, qui a décrit l'idée de "valeur reproductive", *i.e.* le fait que la contribution d'un organisme à la sélection naturelle dépend de son taux de reproduction et donc de son âge [206]. L'accumulation de mutations profitables en début de vie mais délétères en fin de vie est donc possible. George Williams l'a formalisé dans sa théorie de la pléiotropie antagoniste [169].

Une autre théorie évolutive du vieillissement consiste à penser que la mortalité pourrait être une stratégie visant à économiser l'énergie dépensée pour la régulation des erreurs au sein des cellules somatiques vieillissantes. Il s'agit de la théorie du "soma jetable" (disposable soma theory) de Thomas Kirkwood [207]. Selon Kirkwood, les organismes doivent optimiser l'allocation de leurs ressources métaboliques, qui sont limitées, entre les processus de réparation et de maintenance des cellules somatiques et les autres processus comme celui de la reproduction, dans le but de maximiser leur valeur sélective (fitness) [208]. Les cellules somatiques ont donc une durée de vie limitée alors que les cellules germinales, qui sont responsables de la formation de la descendance, sont protégées et immortelles et requièrent un niveau élevé de réparation et de maintenance.

Ceci est notamment supporté par le fait que le taux de mutation est moins élevé dans les cellules souches embryonnaires murines que dans les cellules somatiques [209] tandis que les mécanismes de réponse au stress oxydant y sont plus importants [210]. La théorie du vieillissement lié aux télomères confirme également un partage asymétrique du travail et des dommages entre cellules germinales et somatiques [186]. En effet, il a été montré que la télomérase, une enzyme qui permet d'assurer le maintien de la longueur des télomères, est exprimée dans des cellules germinales, notamment chez le rat [211], et dans des cellules souches embryonnaires dérivées de blastocytes humains [212], mais rarement dans les cellules somatiques [213]. Cependant, cette théorie est controversée car chez les mammifères, le nombre de divisions des cellules somatiques n'exprimant pas la télomérase pourraient être assez faible et ne pas induire de sénescence [214] [215].

L'élongation de la durée de vie lors de la suppression de dommages est également controversée, remettant en cause la théorie de l'accumulation stochastique et non-programmée des erreurs [216]. Ainsi, la sur-expression d'enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutases) induit un allongement de la durée de vie chez *Drosophila melanogaster* [217] et *Caenorhabditis elegans* [218], mais pas chez la souris [219]. Chez la levure de boulanger, en revanche, l'ajout de glutathion dans le milieu de croissance, un anti-oxydant physiologique, allonge la durée de vie [220]. La construction d'une théorie générale ne peut donc s'affranchir de l'étude du vieillissement au sein de différents modèles.

2.1.3 Différents modèles d'études du vieillissement

Comme nous l'avons aperçu à travers les différents exemples proposés dans les sections précédentes, le vieillissement peut-être étudié à l'échelle de la cellule ou de l'organisme.

Vieillessement *in vitro* de cellules en culture

Les organismes multicellulaires contiennent deux grands types de cellules : les cellules post-mitotiques, qui ne se divisent plus, et les cellules mitotiques, qui peuvent encore se diviser [221]. Un état de sénescence répllicative avec arrêt de la division cellulaire a été observé pour différents types de cellules mitotiques chez de nombreux mammifères [221], comme l'homme [166] [222], le babouin [223] ou le rat [224]. Il est donc possible d'étudier le phénomène de sénescence répllicative sur des cellules en culture afin de réaliser des observations plus rapidement (de l'ordre de la semaine) que lors de l'étude à l'échelle de l'organisme (vieillessement sur jusqu'à plusieurs dizaines d'années).

Cependant, bien que le nombre de cellules sénescents augmente avec l'âge et dans les sites reliés à des pathologies liées à l'âge, le lien entre le vieillissement des cellules en culture et celui de l'organisme n'est pas direct [225]. Il est donc important d'observer ce phénomène à l'échelle de

l'organisme également. Ceci est d'autant plus important du fait que, bien que le vieillissement ait à l'origine été étudié à l'échelle des organelles, des tissus ou des organes, on s'oriente aujourd'hui vers une version intégrée du vieillissement prenant en compte les interactions entre ces différents éléments [171].

Vieillessement *in vivo* à l'échelle des organismes

Un modèle classique utilisé pour l'étude du vieillissement est le nématode *Caenorhabditis elegans* [226] dont la durée de vie est relativement courte (dizaine de jours [227] [228]) et chez qui les manipulations génétiques sont facilitées, notamment grâce au système d'ARN interférent [229]. De même, la mouche *Drosophila melanogaster*, qui vit environ 50 jours [217], est un modèle très usité pour évaluer l'effet des perturbations génétiques sur la durée de vie [230]. Chez les mammifères, la souris *Mus musculus* est également un modèle d'étude classique [231] [232] [233].

Chez ces trois eucaryotes ainsi que chez la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*, des mutations génétiques ciblées ont permis d'identifier des voies de signalisation conservées pour la régulation de la durée de vie [234] (figure 11 A et B), comme la voie insuline/IGF1 [235] ou les voies PKA (proteïn kinase A) [236], TOR (Target Of Rapamycin) et Sch9 [237], toutes les quatre impliquées dans la régulation énergétique. La diminution de l'apport en nutriments, nommée restriction calorique, induit en effet une élongation de la durée de vie chez de très nombreux eucaryotes, des levures [238] aux primates [239] en passant notamment par le ver [240], la mouche [174], la souris [241] et le rat [242] (figure 11 B). Ce mécanisme, dont l'effet a initialement été proposé par Raymond Pearl en 1928 [243], est donc hautement conservé.

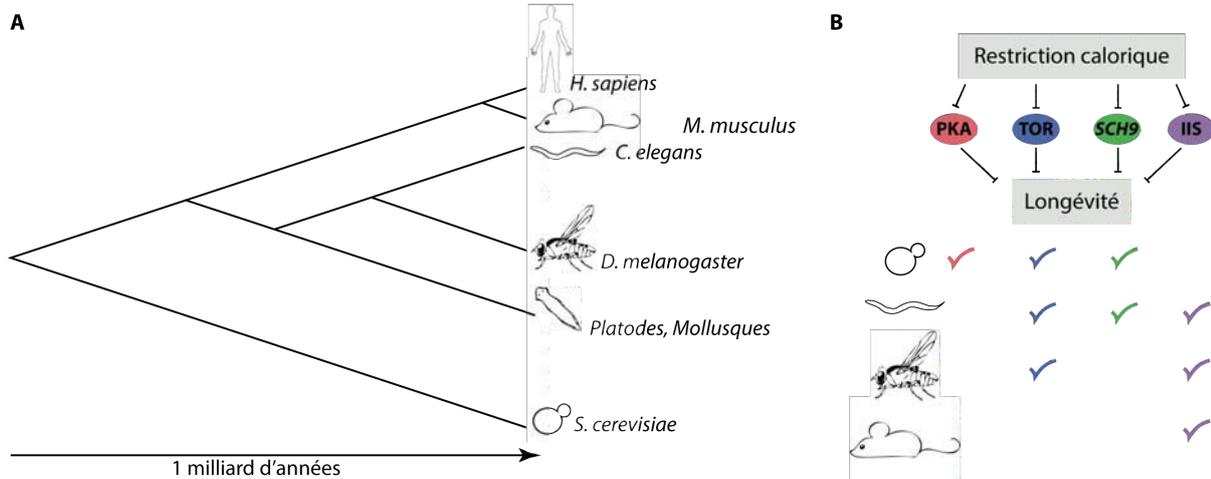


FIGURE 11 – Conservation du mécanisme de longévité activé par la restriction calorique. A) Arbre phylogénétique comprenant les principaux modèles utilisés pour étudier le vieillissement. Figure inspirée de [244]. B) Effet sur la longévité de kinases hautement conservées (voies PKA, TOR, SCH9, et Insuline-IGF1 (ISS)) dans des organismes séparés par des centaines de millions d'années d'évolution. La restriction calorique inhibe les voies de signalisation présentées impliquées dans la régulation énergétique et conduit à l'allongement de la durée de vie dans différents modèles. Figure inspirée de [236] et [237].

La longévité serait-elle alors contrôlée par les gènes ? Si l'on considère que le vieillissement n'est pas programmé, on peut se demander pourquoi on retrouve ce même processus chez des organismes séparés pas plusieurs centaines de millions d'années d'évolution (figure 11) et s'interroger en particulier sur la conservation de gènes spécifiques modulant la sénescence. D'après

l'étude de Smith *et al.* sur les gènes orthologues de la levure et du nématode impliqués dans la longévité, il pourrait exister une pression sélective sur les organismes eucaryotes portant sur l'évaluation de la nourriture disponible et la modification de leur comportement en fonction, afin de maximiser leur valeur reproductive [245].

Certains mécanismes du vieillissement étant hautement conservés, il est pertinent d'étudier ce sujet chez les organismes unicellulaires, dont la sénescence est plus rapide que celle des eucaryotes supérieurs.

2.1.4 Pertinence des unicellulaires

Le vieillissement se caractérise par une inflexion dans la courbe de survie, comme nous l'avons vu en section 2.1.1, mais également par un déclin des fonctions physiologiques et notamment une diminution de la croissance et de la division [246]. Les organismes unicellulaires comme la bactérie *Escherichia coli* ou la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont ainsi des modèles intéressants de par leur temps de génération court [247] [248] et leur durée de vie limitée [249]. La facilité avec laquelle ils peuvent être cultivés et manipulés génétiquement, ainsi que le fait que leur génome soit totalement séquencé et annoté [250] [251] les rendent également avantageux.

Bien que certaines protéines, comme les sirtuines, soient hautement conservées de la bactérie aux mammifères [252], on peut tout de même s'interroger sur la validité de l'étude des organismes unicellulaires dans le cadre du vieillissement. Dans cette section, je montrerai la pertinence de l'utilisation de certains de ces organismes en décrivant quelques exemples d'unicellulaires se divisant de manière symétrique ou asymétrique.

Organismes à division symétrique : *E. coli* et *S. pombe*

La bactérie *Escherichia coli* (figure 12 A) et la levure *Schizosaccharomyces pombe* (figure 12 B) sont toutes deux des organismes unicellulaires cylindriques (forme en bâtonnet) dont la division morphologique est symétrique, par fission médiane.

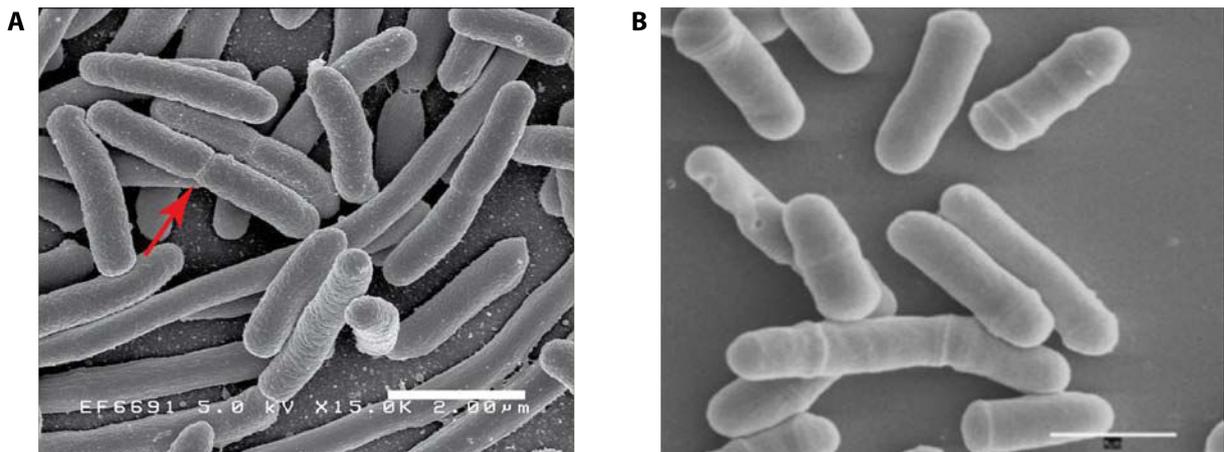


FIGURE 12 – Division morphologiquement symétrique chez *E. coli* et *S. pombe*. Images de microscopie électronique à balayage de bactéries *E. coli* (A) et de levures à fission *S. pombe* (B). Flèche rouge : septum mettant en évidence la symétrie de la division. Barres d'échelle : 2 μm et 5 μm . Source images : Wikipédia common.

Vieillesse chez *Escherichia coli*

Les théories du vieillissement s'appuient généralement sur une différenciation entre "parents" et "descendants" d'un point de vue morphologique et physiologique, associée à la présence d'une phase juvénile [208]. *E. coli* donnant naissance à deux filles morphologiquement identiques après sa division, elle a donc été longtemps considérée comme immortelle [253]. Cependant, Stewart *et al.* ont montré que la bactérie présente bien des signes physiologiques de vieillissement [254]. Lorsque la bactérie se divise, le septum formé en son centre permet la formation de deux nouveaux "pôles", alors que les pôles présents aux extrémités ont été formés auparavant (figure 13 A). On peut donc définir l'âge d'une bactérie comme l'âge de son pôle le plus vieux, *i.e.* le nombre de divisions que son pôle le plus vieux a connu. En suivant des cellules uniques sur jusqu'à neuf divisions, Stewart *et al.* ont mis en évidence une diminution du taux de croissance des bactéries avec l'âge du vieux pôle (d'environ 1% par génération sur les sept premières générations), alors que le taux de croissance augmente pour les cellules héritant du nouveau pôle (figure 13 B), qui peuvent donc être considérées comme "rajeunissant".

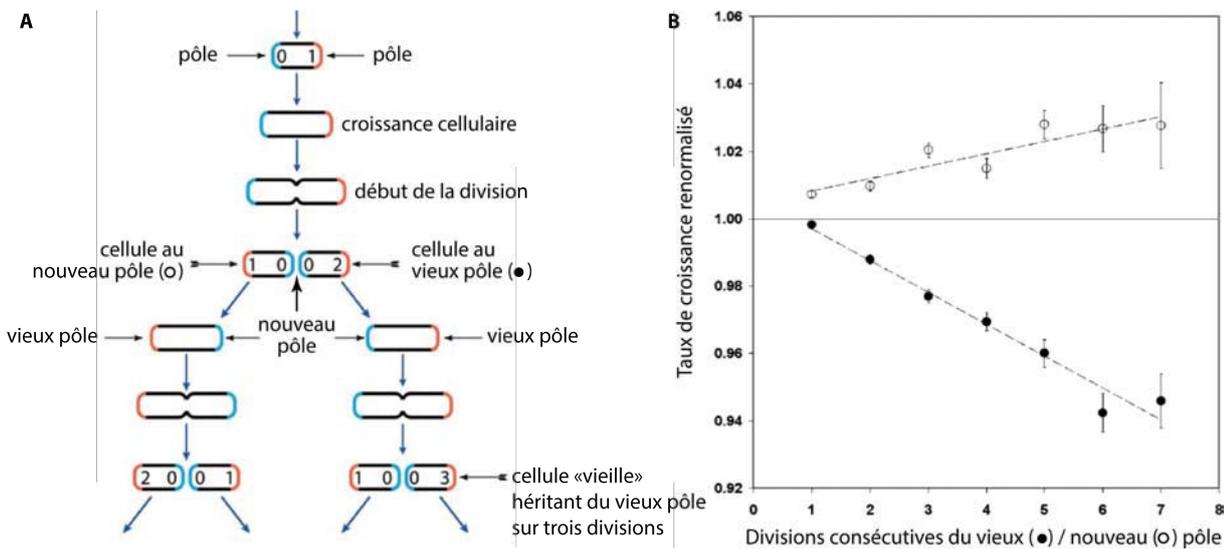


FIGURE 13 – Diminution du taux de croissance au vieux pôle chez *E. coli*. A) Définition du vieux pôle. Lors de la division, le septum formé au centre définit deux "nouveaux" pôles (en bleu) alors que les pôles des extrémités ont été formés auparavant (en rouge). L'âge de la cellule (nombre indiqué) est considéré comme l'âge de son vieux pôle. B) Représentation du taux de croissance des cellules contenant le nouveau pôle (cercle ouvert) ou le vieux pôle (cercle plein) en fonction de l'âge du vieux pôle (taux de croissance des cellules contenant le vieux ou le nouveau pôle renormalisé par le taux de croissance moyen de l'ensemble des cellules à la génération donnée). Le taux de croissance des cellules "âgées" ralentit alors que celui des cellules "jeunes" augmente. Figure adaptée de [254].

Cependant, ce phénomène de diminution du taux de croissance avec l'âge du vieux pôle ne perdure a priori pas [255]. En effet, grâce à un dispositif nommé "mother machine" (figure 14 A), Wang *et al.* ont ensuite réussi à observer l'évolution de la cellule contenant le vieux pôle de *E. coli* sur plus de 200 générations et ainsi montré qu'après une légère diminution du taux de croissance sur les 10 premières générations³, ce dernier est remarquablement stable et distribué

3. La diminution du taux de croissance en début de vie a été observée pour la souche MG1655 également utilisée dans l'étude de Stewart *et al.*, mais pas pour l'autre souche testée (B/r).

de façon gaussienne (figure 14 B). Ces résultats ont été confirmés par une étude de Rang *et al.* montrant que le taux de croissance des bactéries héritant du vieux pôle converge vers un point attracteur [256]. En revanche, la mortalité augmente bien avec l'âge du vieux pôle (figure 14 C) : on observe donc un phénomène de sénescence chez la bactérie [255].

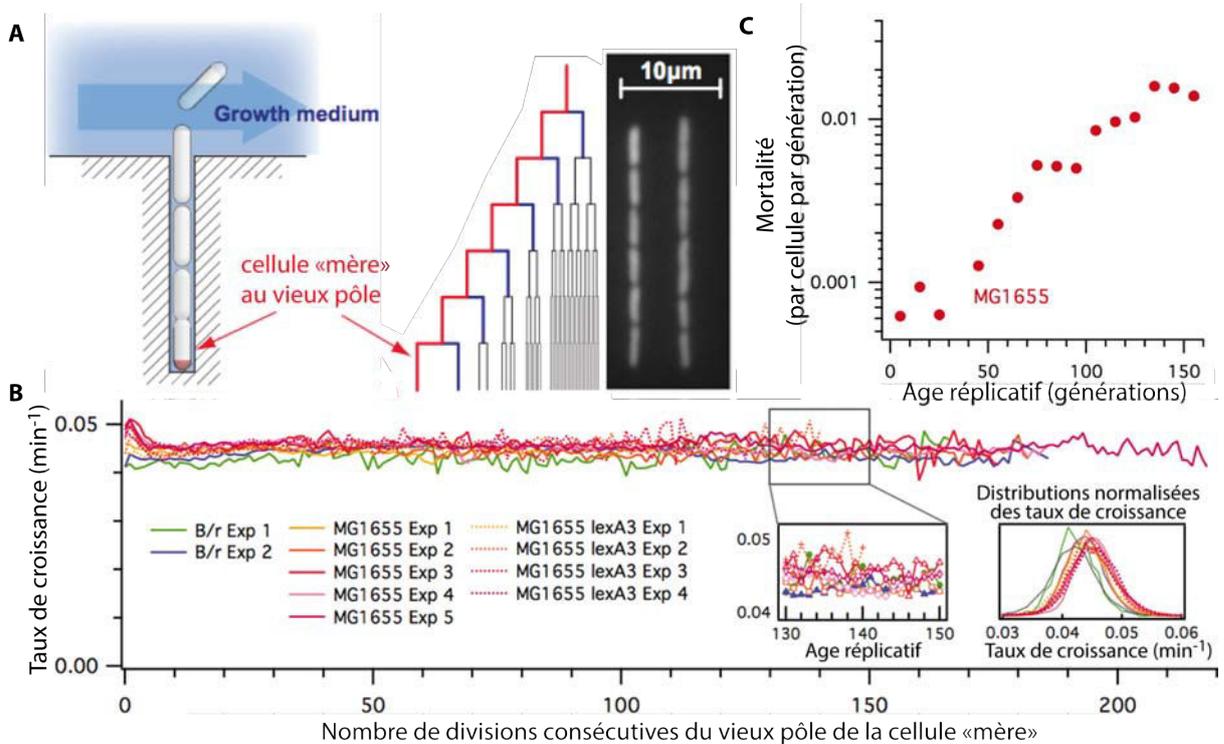


FIGURE 14 – Croissance robuste et vieillissement chez *E. coli*. A) Principe de la "mother machine". Gauche : schéma du dispositif microfluidique montrant que la cellule dite "mère" héritant du vieux pôle est retenue au fond du canal vertical et peut ainsi être suivie sur de nombreuses générations. Droite : image typique de fluorescence montrant des bactéries dans le dispositif. B) Le taux de croissance des différentes souches testées (B/r, MG1655 et MG1655 lexA3) est constant sur plus de 200 générations après le déclin initial et suit une distribution gaussienne (insert de droite). Des fluctuations à hautes fréquences sont visibles (insert de gauche). C) La mortalité augmente avec le nombre de générations, montrant le vieillissement de la bactérie. Figure adaptée de [255].

Vieillessement chez *Schizosaccharomyces pombe*

Chez la levure à fission *S. pombe*, on peut de même définir l'existence d'un vieux pôle et suivre la cellule qui en hérite. En 1999, Barker *et al.* ont réalisé ce suivi [257] grâce à la méthode de micro-dissection manuelle classiquement utilisée pour étudier le vieillissement de *S. cerevisiae* [1] et ont mis en évidence un temps de vie réplcatif (*i.e.* nombre de générations produites) fini pour la cellule héritant du vieux pôle, avec une médiane de 9 générations (figure 15 A). Ce résultat est cependant controversé par l'étude de Coelho *et al.* qui n'a pas observé d'augmentation de la mortalité avec l'âge chez la cellule héritant du vieux pôle et qui a montré que le temps de division des cellules héritant du vieux pôle et du nouveau pôle n'augmente pas et est comparable [258] (figure 15 B). Néanmoins, cette même étude montre une augmentation de la mortalité et du temps de division chez les cellules âgées lorsqu'elles sont stressées (choc thermique ou oxydant).

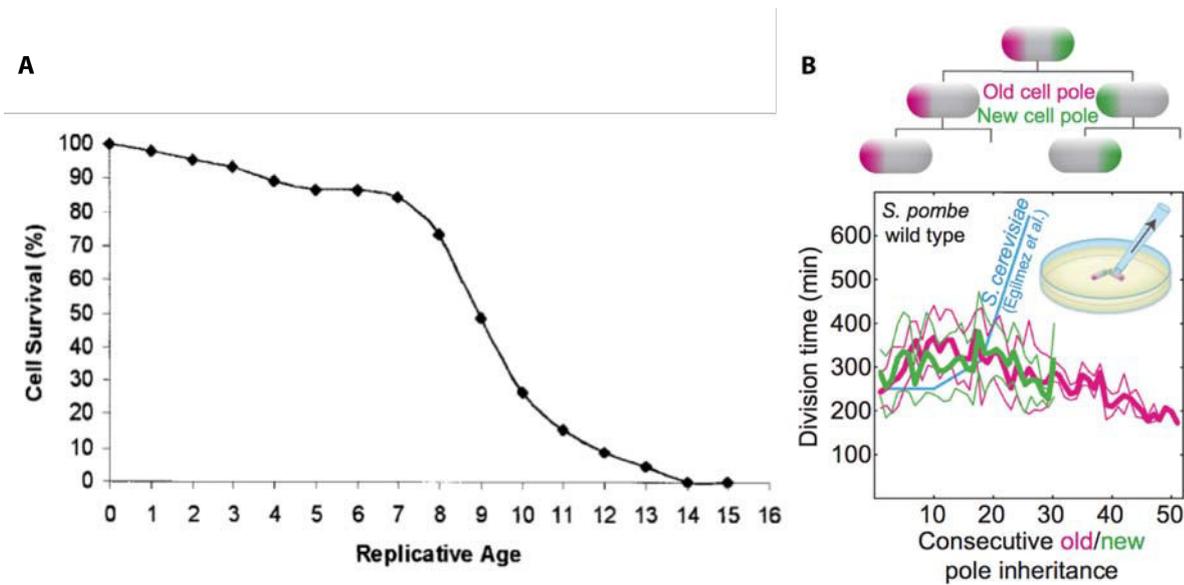


FIGURE 15 – Vieillesse controversée chez *S. pombe*. A) Courbe de survie en fonction du nombre de génération du vieux pôle chez *S. pombe* (NCY132) issue [257]. n=48 cellules. B) Temps de division moyen des cellules héritant consécutivement du vieux (rose, n=10) ou du nouveau (vert, n=32) pôle en fonction de la génération (micro-dissection manuelle). Courbes fines : erreur standard. Le temps de division moyen n'augmente pas avec l'âge, questionnant l'existence d'un processus de vieillissement. Figure issue de [258].

Il est donc possible d'observer un phénomène de vieillissement chez les organismes unicellulaires se divisant symétriquement, bien que celui-ci ne soit pas toujours constaté dans des conditions physiologiques. Chez d'autres organismes unicellulaires, la division donne lieu à deux entités morphologiquement différentes, qui s'apparentent à un parent et son descendant. On parle d'organismes à division asymétrique.

Organismes à division asymétrique : *S. cerevisiae* et *C. crescentus*

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* (figure 16 A) et la bactérie *Caulobacter crescentus* (figure 16 B) sont deux unicellulaires dont la division est morphologiquement asymétrique (figure 16 C et D). Cela donne lieu à la formation d'une cellule mère vieillissante, comparable au soma, et d'une cellule fille avec une phase juvénile, comparable à la lignée germinale [253].

Ackermann *et al.* ont ainsi montré que le taux de division et donc de reproduction des cellules "tiges" de *C. crescentus*, attachées à un substrat, diminuait avec le nombre de générations produites, parfois jusqu'à ce que la division soit totalement stoppée [260]. À l'inverse, quelque soit l'âge répliatif de leur progéniteur, lorsque les cellules "nageuses" produites se différencient en cellules "tiges", leur taux de division est comparable à celui des cellules "tiges" jeunes initialement observées. Il existe donc un phénomène de sénescence et de rajeunissement.

Le vieillissement de *S. cerevisiae* sera décrit plus précisément dans la section suivante. Brièvement, les cellules mères produisent un nombre limité de filles alors que ces dernières naissent avec un potentiel répliatif intact [1]. La levure de boulanger a joué un rôle important dans la découverte des mécanismes de longévité [261]. La petite taille de son génome (12 000 paires de bases), son temps de doublement faible (~80 minutes), les manipulations génétiques aisées, le fait qu'elle dispose d'une reproduction sexuée et que des mécanismes soient conservés de la levure

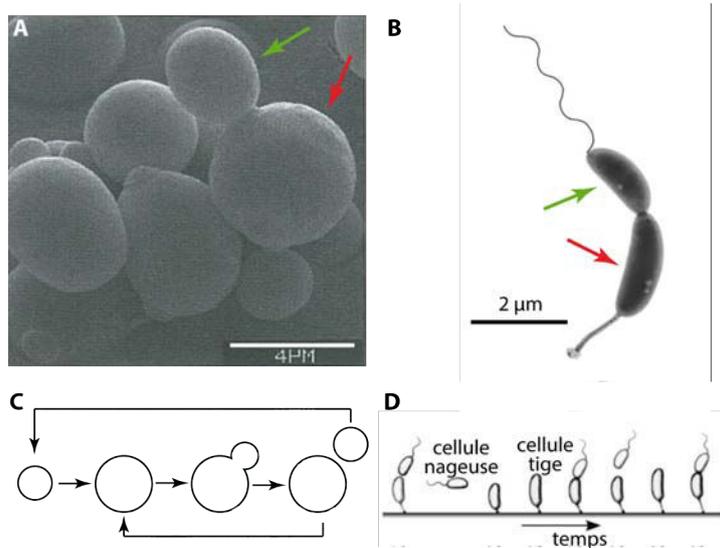


FIGURE 16 – Division morphologiquement asymétrique de *S. cerevisiae* et *C. crescentus*.

A et B) Images en microscopie électronique à balayage montrant les divisions asymétriques mère (flèche rouge) / fille (flèche verte) chez *S. cerevisiae* (A - image issue de [259]) et chez *C. crescentus* (B - crédit : Christine Jacobs-Wagner).

C et D) Schémas représentant la division asymétrique chez *S. cerevisiae* (C) et chez *C. crescentus* (D - figure adaptée de [260]).

à l'homme en font un modèle aujourd'hui très utilisée pour étudier les phénomènes basiques de la vie eucaryote, dont le vieillissement [259].

2.2 Vieillessement chez *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme unicellulaire eucaryote appartenant au règne des *Fungi* et à la classe des *Saccharomycetes*. Sa forme est quasi-sphérique, avec un diamètre compris entre 3 et 5 μm (figure 16 A). Comme nous l'avons vu dans la section précédente, la division de cette cellule est asymétrique : la cellule mère bourgeonne pour donner naissance à une cellule fille, plus petite (figure 16 A-C et film 0), qui deviendra à son tour une mère lorsqu'elle aura atteint une taille suffisante [262] (figure 16 B).

Il existe deux grands modèles indépendants de vieillissement chez la levure, qui ont tous les deux des similarités avec le vieillissement chez l'humain, mais qui sont très différents l'un de l'autre [263] : le vieillissement chronologique et le vieillissement réplcatif.

2.2.1 Vieillessement chronologique

Le vieillissement chronologique consiste à étudier la survie de cellules en phase stationnaire, qui ne se divisent donc plus. On peut ainsi le comparer avec le vieillissement des cellules humaines post-mitotiques, comme par exemple les neurones du système nerveux central [259].

Le principe d'étude est le suivant : les cellules sont cultivées pendant plusieurs semaines dans un volume fixé de milieu (généralement milieu complet SCD [264] ou mixture SC Hopkins [265]), à température, aération et agitation constante. À intervalle de temps constant, une aliquote est prélevée avant d'être étalée sur une boîte de Petri de milieu complet YPD (figure 17 A). Le nombre de colonies ayant poussé est quantifié après 3 jours de croissance sur boîte et exprimé en unité de colonies se formant (CFU) ou en pourcentage de colonies formées au temps t par rapport au nombre formé initialement [266]. On obtient alors des courbes de survie telles que celle présentée en figure 17 B et C qui permettent de mesurer la durée de vie chronologique (CLS).

La mesure de telles courbes a par exemple montré la longévité des mutants *sch9 Δ* [266], qui grossissent moins vite mais survivent trois fois plus longtemps que les cellules sauvages (fi-

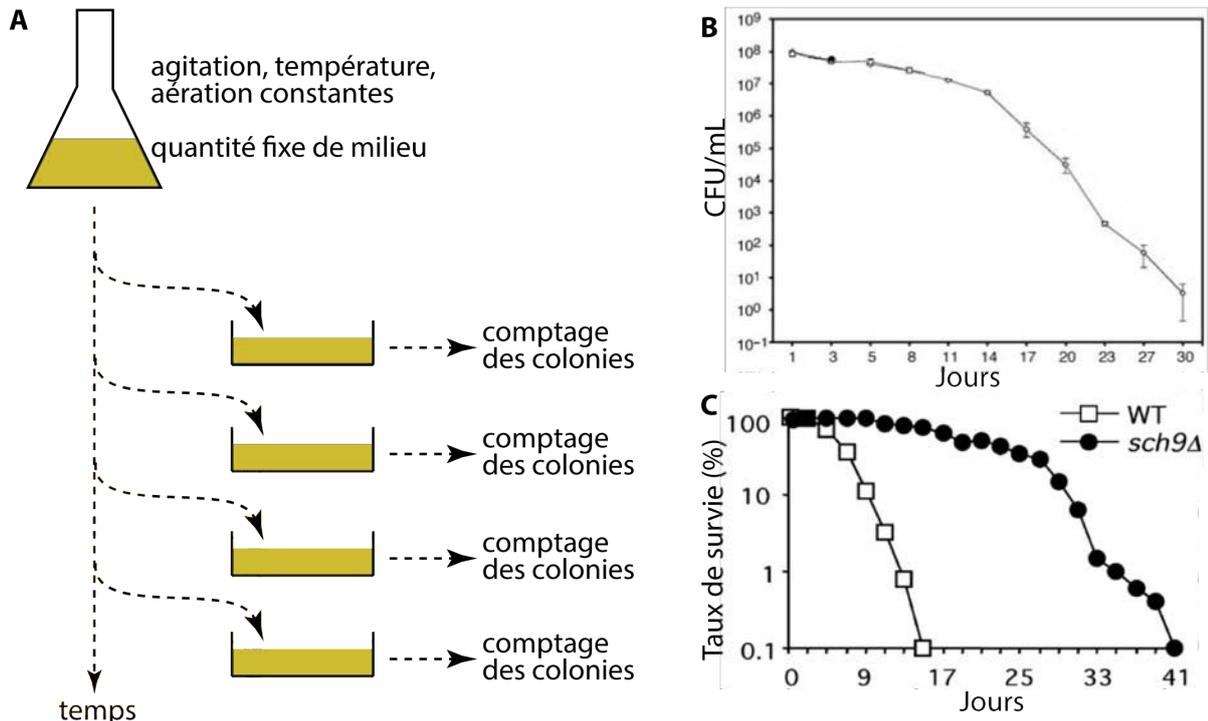


FIGURE 17 – Vieillissement chronologique chez *S. cerevisiae*. A) Schéma de principe. Des cellules cultivées dans une quantité fixe de milieu sont prélevées à intervalle de temps constant et mises en culture sur boîte de Petri. Le nombre de colonies est compté après 3 jours de croissance sur boîte. B et C) Courbes de survie obtenues en unité de colonies se formant (CFU - (B) - figure adaptée de [267]) ou en pourcentage de colonies formées par rapport au nombre initial ((C) - figure adaptée de [266]). C) WT : sauvage, *sch9Δ* : mutant de délétion pour la protéine Sch9p.

gure 17 C). Sch9p est une protéine kinase qui stimule la croissance et la glycolyse [268], dont l'homologue chez le nématode, lorsqu'il est muté, est également impliqué dans un phénotype de longévité à travers la voie insuline/IGF1 [266]. L'étude du CLS des 4800 mutants de délétion pour des gènes non essentiels chez *S. cerevisiae* a également permis de mettre en évidence la longévité de cet organisme lorsque la voie de signalisation TOR, impliquée dans la réponse aux nutriments, est inhibée [269]. Le vieillissement chronologique permet donc notamment d'étudier des voies de signalisation conservées en lien avec la restriction calorique. Cependant, la comparaison directe des résultats obtenus chez la levure et chez l'homme doit se faire prudemment, les cellules humaines post-mitotiques étant métaboliquement très active, à l'inverse des levures en phase stationnaire [263]. De plus, les mutants de longévité observés par vieillissement chronologique chez *S. cerevisiae* ont rarement le même phénotype lors de l'étude du vieillissement répliatif [263].

2.2.2 Vieillissement répliatif

Étude classique du vieillissement répliatif

Depuis plus de 50 ans, la division morphologiquement asymétrique de *S. cerevisiae* permet d'étudier son vieillissement répliatif. En 1959, Robert Mortimer et John Johnston ont ainsi pu-

blié la première étude de vieillissement chez la levure de boulanger [1]. En utilisant un microscope à dissection doté d'une aiguille pour micro-manipuler les cellules (figure 18 A), ils ont éliminé les descendants successifs de cellules mères (clairement identifiables par la taille) et ainsi montré que leur durée de vie répliative, *i.e.* le nombre de cellules filles produites, était finie (figure 18 B). *Saccharomyces cerevisiae* est donc mortelle : sa capacité limitée à produire des filles est nommée vieillissement répliatif.

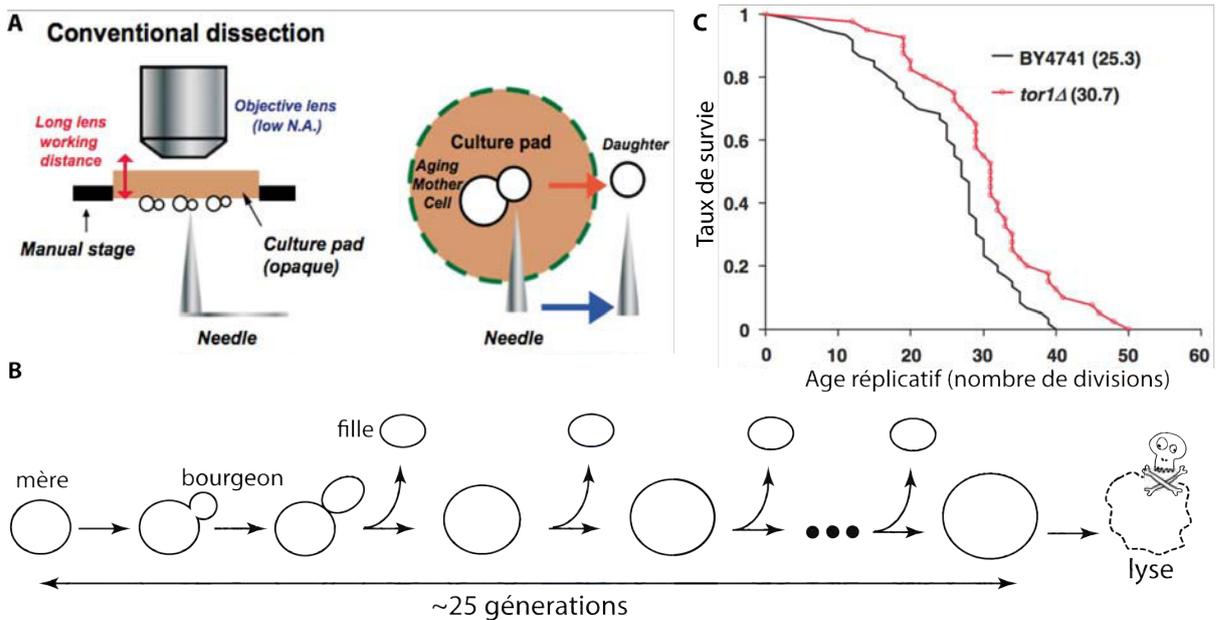


FIGURE 18 – Vieillesse répliatif chez *S. cerevisiae*. A) Principe de l'étude du vieillissement par micro-dissection manuelle. Les filles successives sont enlevées manuellement à l'aide de l'aiguille d'un microscope à dissection (flèche bleue). Les cellules se divisent sur un coussin d'agar opaque et épais, qui limite la résolution des images de microscopie, du fait de la distance de travail importante qu'il impose. Figure issue de [270]. B) Représentation schématique du vieillissement répliatif. Le nombre de filles produites correspond à l'âge répliatif de la cellule mère, qui grossit au cours du temps. C) Courbe de survie en fonction de l'âge répliatif pour la souche BY4741 et un mutant de délétion *tor1Δ*. Parenthèses : âge répliatif médian. La délétion de *TOR1* augmente la durée de vie. Figure adaptée de [271].

La durée de vie répliative (RLS) ne se compte donc pas en temps calendaire, comme c'est le cas pour le vieillissement chronologique, mais en nombre de générations. En suivant des cellules mères et en mesurant le nombre de générations produites (*i.e.* nombre de divisions) lorsqu'elles meurent, on peut donc calculer le taux de survie (défini en section 2.1.1 - équation (2.1)) en fonction du nombre de générations. On obtient alors des courbes de survie telles que celle présentée en figure 18 C. De telles courbes de RLS permettent d'étudier les facteurs affectant la durée de vie répliative [272]. En condition de laboratoire, la médiane du RLS est de l'ordre de 20 à 30 générations (figure 18 C), avec une distribution des durées de vie qui suit la loi de Gompertz-Makeham⁴ présentée en section 2.1.1 [176]. La mortalité décroît donc exponentiellement pour finalement atteindre un plateau dans le cas des derniers survivants [176]. Comme

4. Cette médiane est plus élevée dans le cas d'isolats naturels, mais suit toujours la loi de Gompertz-Makeham [176].

pour le vieillissement chronologique, la médiane de la durée de vie répllicative est affectée chez certains mutants de délétion, dont *tor1Δ* (figure 18 C) et *sch9Δ* qui induisent un allongement du RLS [271].

Nouveaux dispositifs microfluidiques pour l'étude du vieillissement réplcatif

Récemment, des systèmes microfluidiques ont été développés afin d'automatiser le piégeage des mères et l'élimination des cellules filles, qui doit être fait de manière entièrement manuelle lorsque la méthode classique de micro-dissection est utilisée [273]. Chaque cellule mère produisant environ 25 filles et ces dernières devenant également mères à leur tour, il est primordial d'éliminer la progéniture d'une mère, sans quoi elle se retrouverait, à la fin de sa vie, entourée de plus de dix millions de cellules. Différents types de pièges ont été développés : les mères peuvent être attachées par une interaction biotin-streptavidine [274], isolées dans des prisons individuelles [275] [276], coincées sous des colonnes [270] [277] ou retenues au fond de cavités [278]. Le fonctionnement de ce dernier système, élaboré au laboratoire en adaptant le principe de la "mother machine" [255], sera détaillé en partie II.

Lorsque le système permet de piéger la cellule mère dès sa naissance [278], des RLS équivalentes à celles de la méthode manuelle proposée par Mortimer et Johnston [1] peuvent être obtenues. Pour les autres systèmes piégeant aléatoirement les cellules à partir d'une population en phase exponentielle de croissance, la majorité des cellules étant alors vierges ou s'étant divisées peu de fois, les RLS sont comparables [270] [276] [277].

De plus, grâce à ces dispositifs, on peut suivre les cellules en microscopie time-lapse tout au long de leur vie, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de vieillissement et notamment évaluer la causalité.

Description de la sénescence et du rajeunissement chez *S. cerevisiae*

En suivant les levures tout au long de leur vie, on peut observer que leur taille augmente [1] et que le cycle cellulaire des dernières divisions ralentit fortement (figure 19 A). De plus, une diminution de la fertilité est observée chez les cellules vieilles [279]. En fin de vie, les cellules atteignent donc un état de sénescence, qui corrèle notamment avec une augmentation des instabilités génomiques (perte d'hétérozygotie) [280] et des marqueurs de l'apoptose [281]. Avec l'âge, la taille des cellules filles augmente également et il devient alors difficile de les distinguer des mères lors d'une expérience de micro-dissection classique [3].

Kennedy *et al.* ont montré que les filles de vieilles mères (plus de 40% de la durée de vie écoulée) ont en outre une durée de vie répllicative limitée (figure 19 B). À l'inverse, lorsque les mères sont assez jeunes, la durée de vie répllicative de leurs filles n'est pas modifiée et ne dépend pas de l'âge de la mère [282] [3]. Dans cette même étude, Kennedy *et al.* ont également observé que les filles de filles de vieilles mères (petites-filles) ont une durée de vie répllicative normale (figure 19 B). Ces différentes observations montrent qu'il existe un phénomène de rajeunissement chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Le processus de rajeunissement et d'asymétrie de l'âge observé chez la levure de boulanger peut être comparé à celui des cellules souches dont la division asymétrique donne naissance à une nouvelle cellule souche réjuvenée et à une cellule différenciée [5]. Cependant, une fois encore, il faut rester prudent quant à cette comparaison : la qualité des cellules souches musculaires, par exemple, est modifiée au cours du temps et on peut donc considérer qu'elles vieillissent [259]. Cette comparaison reste néanmoins valable pour les cellules souches de la lignée germinale [259]. Il est donc particulièrement intéressant d'utiliser le modèle levure et de comprendre les mécanismes de vieillissement et de rajeunissement qui existent chez *Saccharomyces cerevisiae* [5].

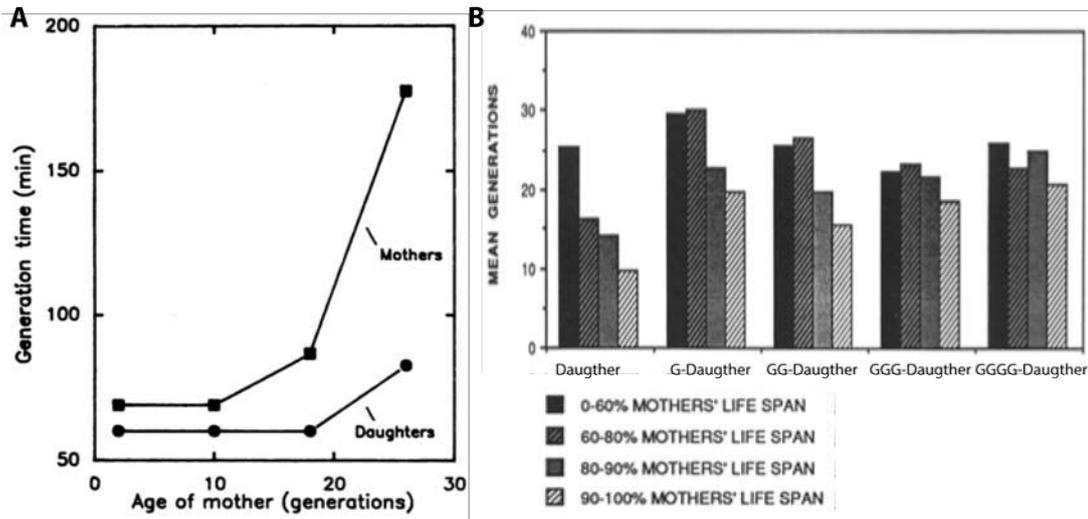


FIGURE 19 – Sénescence et rajeunissement chez *S. cerevisiae*. A) Temps de division moyen des cellules mères et filles en fonction de l'âge des mères. Ce temps augmente constamment avec l'âge chez les mères, alors que les filles produites ont un temps de division stable (sauf lorsqu'elle sont issue de vieilles mères). Figure adaptée de [2]. B) Âge réplcatif moyen chez les filles, petites-filles, arrière-petites-filles... en fonction de l'âge des mères. L'âge est exprimé en % de la durée de vie. Les filles de vieilles mères ont un âge réplcatif limité, mais ce phénomène diminue chez leurs descendants. Figure adaptée de [3].

2.3 Paradigme du vieillissement réplcatif chez *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1 Accumulation asymétrique de facteurs de vieillissement

Pour expliquer le vieillissement et le rajeunissement, Nejat Egilmez et Michal Jazwinski ont proposé en 1989 le paradigme suivant [2] : des facteurs dommageables induisant le vieillissement pourraient s'accumuler de manière asymétrique lors de la division et être retenus chez la cellule mère (figure 20). L'hypothèse d'une accumulation excessive de ces facteurs, alliée à une diminution de leur rétention chez la mère, pourrait alors également expliquer que les filles de vieilles mères aient un potentiel réplcatif amoindri [3]. De plus, le fait que le bon fonctionnement des processus de maintenance et de réparation ait été associé à une augmentation de la longévité va aussi dans ce sens [202].

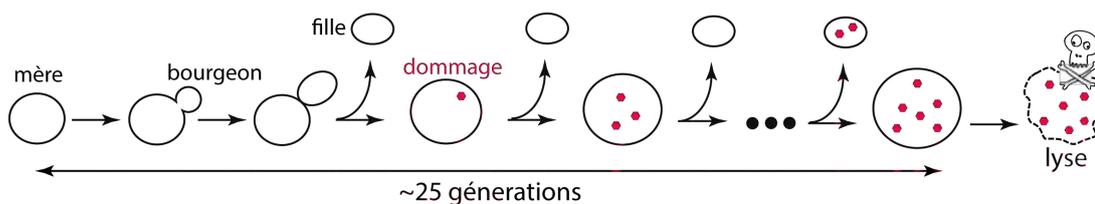


FIGURE 20 – Paradigme du vieillissement chez *S. cerevisiae*. L'accumulation progressive et asymétrique de facteurs de vieillissement (rouge) conduit à la mort de la cellule mère alors que la fille naît rajeunie.

De nombreux facteurs modulent le vieillissement, tels que les stress intrinsèques et extrinsèques, le niveau de nutriments, la température et l'aléatoire de la reproduction [202] [263]. Cependant, d'après Thomas Kirkwood et Steven Austad, le processus se ramène toujours à un problème d'équilibre entre accumulation de dommages et réparation [202]. Depuis la proposition du paradigme d'Elgimez et Jazwinski expliquant le vieillissement chez la levure de boulanger, différents facteurs potentiels de vieillissement, s'accumulant asymétriquement chez la mère, ont été proposés [272] [283].

2.3.2 Revue des différents facteurs potentiels de vieillissement

Lorsque l'on cultive des levures en phase exponentielle de croissance, la moitié de la population est âgée d'une génération seulement, le quart de deux générations, le huitième de trois générations et ainsi de suite. La fraction de cellules "vieilles" est donc négligeable. Afin d'étudier les facteurs s'accumulant dans les vieilles mères chez *Saccharomyces cerevisiae*, il est possible d'enrichir la population en cellules vieilles grâce à des techniques de tri cellulaire tel que l'élutriation, la cytométrie de flux et le tri par billes magnétiques⁵ [285].

En utilisant ces techniques, cinq principaux facteurs ont été décrit comme s'accumulant asymétriquement au sein de la cellule mère au cours de la vie : les cercles d'ADN ribosomique (ERC), les mitochondries non-fonctionnelles, les vacuoles défectives, les protéines LARPS et MDR et les agrégats de protéines carbonylées. Ces différents facteurs sont détaillés dans cette section.

ERCs (cercles extra-chromosomique d'ADN ribosomique)

Les ERC sont des cercles d'ADN ribosomique (ARNr) générés par excision des répétitions tandem du locus de l'ARNr et capables de s'autorépliquer via les séquences de réplication autonomes (ARS) présentes dans chaque répétition de l'ARNr [4]. Sinclair et Guarente ont montré que les ERC s'accumulent au sein des vieilles cellules mères et pourraient induire leur sénescence [4].

Shcheprova *et al.* ont quant à eux proposé un mécanisme septine-dépendant de rétention active des ERC au sein des cellules mères grâce à leur ancrage aux pores nucléaires et à l'existence d'une barrière de diffusion au niveau de l'enveloppe nucléaire limitant la translocation des pores de la mère vers la fille [286]. Ce mécanisme est notamment appuyé par le fait que les mutants de délétion pour la septine Bud6p, faisant partie du cercle de septines qui agit en tant que barrière de diffusion, ne sont pas capables de rajeunissement [286].

Cependant, Khmelinskii *et al.* ont remis ce mécanisme en cause en observant une transmission des pores nucléaires des mères vers les filles [287], puis que l'accrochage artificiel de plasmides circulaires ARS aux pores nucléaires promeut leur transmission aux cellules filles [288]. Gehlen *et al.* ont ensuite montré que les ERC et les plasmides ARS ne contenant pas de séquence centromérique diffusaient librement dans le noyau [289]. Les auteurs ont également proposé une simulation numérique prouvant que la géométrie du noyau en division et la durée de la mitose empêchent la diffusion passive des ERC dans le noyau des filles [289].

L'ADN circulaire extra chromosomique (eccDNA) ne semble pas être une cause de vieillissement chez les métazoaires [272] et pourrait donc constituer un mécanisme propre à la levure de boulanger.

5. Depuis 2012, l'utilisation des systèmes microfluidiques décrits dans la section précédente permet également d'isoler des cellules mères. Les intérêts de tels systèmes microfluidiques seront développés en partie II de ce manuscrit. L'élimination des cellules filles en induisant artificiellement leur mort par une construction génétique spécifique (Mother Enrichment Program) a également été développée par l'équipe de Dan Gottschling [284], mais reste peu utilisée.

Mitochondries non-fonctionnelles

Lai *et al.* ont montré que les mitochondries non-fonctionnelles, se caractérisant par la perte de leur potentiel membranaire, s'accumulent chez les cellules âgées [5]. De plus, la mutation du gène *ATP2*, encodant pour la sous-unité β de la F_0-F_1 -ATPase de la mitochondrie et qui entraîne le dysfonctionnement des mitochondries, abolit l'asymétrie mère-fille et induit une sénescence clonale [5]. Cela fait donc des mitochondries non-fonctionnelles un facteur potentiel de vieillissement.

Le lien entre les mitochondries non-fonctionnelles et le vieillissement a été confirmé par différentes études [290] [291] [292] et pourrait s'expliquer par l'effet délétère des ROS, dont la quantité augmente avec l'âge, sur les mitochondries [293] et le fait que les mitochondries non-fonctionnelles sont retenues chez la mère alors que les filles héritent de mitochondries intactes [6] [294]. Un mécanisme de filtration des mitochondries entre la mère et la fille impliquant le réseau de câbles d'actine a été proposé récemment par Higuchi *et al.* [295].

Perte d'acidité et vacuoles défectives

Hugues *et al.* ont montré que l'acidité des vacuoles des mères diminue avec leur âge, entraînant la perte du potentiel mitochondrial décrite dans le paragraphe précédent, alors qu'elle est restaurée une fois les vacuoles héritées par les filles [7]. Ils ont également observé que lorsqu'on supprime cette diminution d'acidité dans la vacuole des mères par augmentation de l'activité de la H^+ -ATPase de la vacuole (V-ATPase), la longévité est augmentée [7]. Ainsi, l'accumulation de vacuoles défectives peut être considérée comme un facteur de vieillissement.

Selon Henderson *et al.*, la perte d'acidité dans les cellules mères vieillissantes s'étend à l'ensemble du cytosol, alors que le cytosol des cellules filles reste acide, et est due à la ségrégation asymétrique du régulateur principal du pH cytosolique, la H^+ -ATPase de la membrane plasmique Pma1p [296]. L'accumulation de Pma1p dans les cellules mères pourrait fonctionner de manière antagoniste avec la V-ATPase, qui permet de conserver un pH acide au sein des vacuoles, et donc entraîner une augmentation de pH [296]. Depuis peu, Pma1p peut donc également être considéré comme un facteur de vieillissement.

Rétention asymétrique des protéines LARPs et MDR

Les protéines à longue durée de vie, *i.e.* dont la durée de vie s'approche de celle de l'organisme qui les contient, ont été impliquées dans le déclin associé à l'âge chez les métazoaires [297]. Récemment, Thayer *et al.* ont montré que des protéines à longue durée de vie s'accumulent au sein des cellules mères vieillissantes (~ 18 générations) existent chez *S. cerevisiae* [298]. Ils ont ainsi identifié 135 protéines à longue durée de vie retenues asymétriquement qu'ils ont nommées LARPs (Long-lived Asymmetrically Retained Proteins). Par microscopie time-lapse, les auteurs ont observé que certains LARPs, comme Pma1p, sont localisés à la membrane plasmique et sont retenus de manière stable chez la mère. D'autres LARPs, comme la petite protéine de choc thermique Hsp26, se trouvent au sein de larges structures cytoplasmiques qui ségrègent également de manière biaisée chez la mère. Le niveau des LARPs augmentant avec l'âge, ils pourraient constituer de potentiels facteurs de vieillissement induisant la sénescence [298].

De même, certains transporteurs de la membrane plasmique de la famille des protéines de résistance à de multiples drogues (MDR), ont été décrits comme s'accumulant asymétriquement dans les mères sans être transmis aux cellules filles [299]. Au cours de la division, les protéines MDR nouvellement formées sont transmises à la fille alors que les protéines synthétisées auparavant restent dans la mère, attachées à son cortex [299]. Le développement d'un modèle prédisant

la diminution de l'activité des protéines MDR au cours de la vie d'une part, et l'observation d'une durée de vie réduite en l'absence de ces protéines d'autre part, conduisent à penser que les protéines MDR pourraient être des facteurs de vieillissement [299].

Agrégats de protéines carbonylées

Enfin, différents groupes ont montré que, chez la levure de boulanger, des changements génétiques et environnementaux augmentant la quantité en espèces chimiques réactives contenant de l'oxygène (ROS) réduisent la durée de vie [220] [300] [301] et que des ROS sont présents dans les vieilles cellules mères [281]. Selon Georges Martin, l'effet des dommages oxydatifs sur le vieillissement serait d'ailleurs un mécanisme "public", puisqu'on le retrouve chez de nombreux organismes [302]. Cependant, les études réalisées chez la levure n'ont pas quantifié le niveau de ROS au cours du temps et n'ont donc pas montré que l'accumulation des ROS est progressive tout au long de la vie, comme ce devrait être le cas selon la paradigme d'Egilmez et Jazwinski [2].

La carbonylation des protéines est un dommage oxydatif irréversible qui conduit à leur dégradation [303]. En 2003, Aguilaniu *et al.* ont montré que, chez la levure de boulanger, les protéines carbonylées s'accumulent asymétriquement au sein des mères (figure 21 A) et que leur niveau moyen augmente progressivement avec l'âge de ces dernières (figure 21 B) [8]. De même l'accumulation de protéines carbonylées a été observée au vieux pôle chez *S. pombe* [304].

Les protéines carbonylées forment des agrégats chez *S. cerevisiae* [9], mais également chez *E. coli* [306], chez *S. pombe* [258], chez certaines cellules souches de drosophile [307] [308] et chez des cellules intestines humaines [308]. L'accumulation asymétrique et progressive de ces agrégats au sein des cellules mères de levure de boulanger (figure 21 C et D) en font des facteurs potentiels de vieillissement [9].

Une accumulation comparable des agrégats aux vieux pôles des bactéries [305] (figure 21 E), qui corrèle avec une diminution du taux de croissance, a également été démontrée. À l'inverse, chez la levure à fission, en condition normale de croissance, la présence d'agrégats dans une cellule n'implique pas d'augmentation de la durée du cycle cellulaire (figure 21 F) [258]. En revanche, lorsque la cellule est stressée, on observe une corrélation entre le nombre d'agrégats contenu et la mortalité (figure 21 G) [258]. Enfin, chez les cellules d'eucaryotes supérieurs, l'héritage des agrégats protéiques lors de la mitose se fait également de manière polarisée, indiquant probablement un mécanisme de préservation de l'asymétrie [308].

Ces différentes observations confirment la théorie de l'agrégation, selon laquelle l'accumulation d'agrégats de protéines endommagées induirait la sénescence ou le développement de maladies [49] [309]. Dans cette thèse, je me suis intéressée à l'accumulation de tels agrégats dans les cellules mères de *S. cerevisiae*. Comme nous l'avons vu, chez la levure de boulanger, ces agrégats s'accumulent progressivement de façon asymétrique et sont donc des facteurs potentiels de vieillissement. Cependant, leur nocivité, bien que communément acceptée, n'a pour l'instant pas été démontrée. Ces agrégats protéiques sont néanmoins communément utilisés comme marqueurs du vieillissement et peuvent être étudiés *in vivo* grâce au chaperon Hsp104 [9].

2.4 La protéine de choc thermique Hsp104, marqueur des agrégats protéiques et du vieillissement

Hsp104 est une protéine chaperon impliquée dans la désagrégation des agrégats de protéines mal repliées et endommagées, dont l'expression augmente lorsque la cellule est soumise à un stress [90]. La structure de cette protéine ainsi que son mécanisme d'action sont décrits en

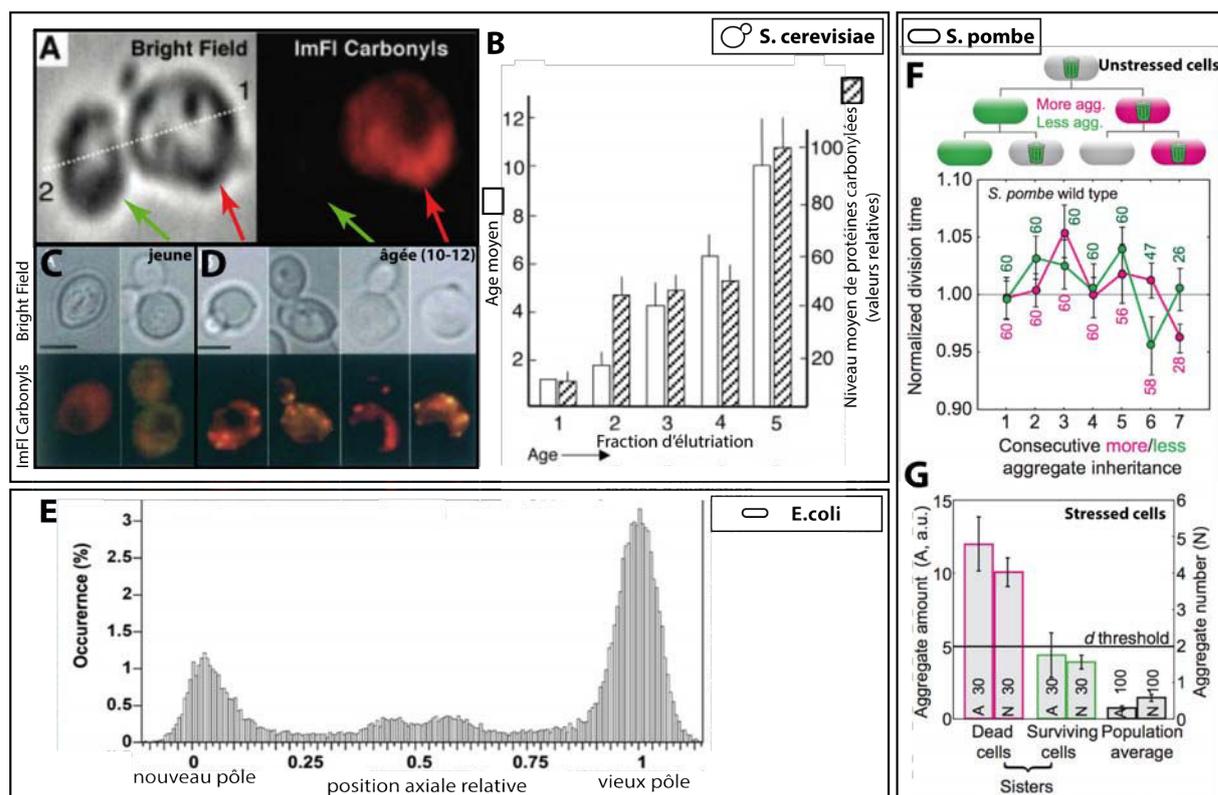


FIGURE 21 – Accumulation de protéines carbonylées et d’agrégats protéiques au cours du vieillissement. A-B-C-D) Agrégats et protéines carbonylées chez *S. cerevisiae*. A) Ségrégation asymétriques des protéines carbonylées (marqués par immunofluorescence) chez une mère (flèche rouge) et non chez sa fille (flèche verte). Figure adaptée de [8]. B) Accumulation progressive de la quantité de protéines carbonylées au sein de mères triées par élutriation. Blanc : âge moyen de la fraction. Hachuré : niveau moyen de protéines carbonylées. Figure adaptée de [8]. C et D) Marquage par immunofluorescence des protéines carbonylées dans de jeunes (C) et vieilles (D) mères. On observe la formation d’agrégats dans les vieilles mères (D). Barres d’échelle 5 μm . Figures adaptées de [9]. E) Distribution d’agrégats protéiques marqués par la protéine de fusion IbpA-YFP le long de l’axe cellulaire de *E. coli*, orienté du nouveau pôle vers le vieux pôle. On observe un quantité élevée d’agrégats au vieux pôle. Figure adaptée de [305]. F) Temps de division de cellules de *S. pombe* non stressées héritant de plus (rose) ou moins (vert) d’agrégats au cours des divisions successives. La quantité d’agrégats n’influe pas sur le temps de division. G) Corrélation entre la quantité d’agrégats et la mort chez des cellules *S. pombe* stressées. Figures adaptées de [258].

section 1.2.1 de cette partie (p. 12). Brièvement, Hsp104 forme un pore à travers lequel les protéines dénaturées sont pompées et dépliées [90]. Ce mécanisme d’action implique le recrutement d’Hsp104 à proximité des agrégats protéiques [95].

2.4.1 Colocalisation d’Hsp104 avec les agrégats de protéines carbonylées

Fujita *et al.* ont réalisé des expériences de microscopie électronique avec immunomarquage des protéines Hsp104 et ainsi mis en évidence l’accumulation d’Hsp104 à la périphérie des agrégats protéiques formés lorsque des cellules de levures sont soumises à un choc thermique modéré [310]

(figure 22 A).

En utilisant une protéine Hsp104 fusionnée à la GFP et en obtenant de vieilles (10 à 12 générations) cellules mères de levure de boulanger par élutriation, Erjavec *et al.* ont montré que les agrégats de protéines carbonylées marqués par immunofluorescence et observés dans ces vieilles mères colocalisent avec Hsp104-GFP (figure 22 B) [9].

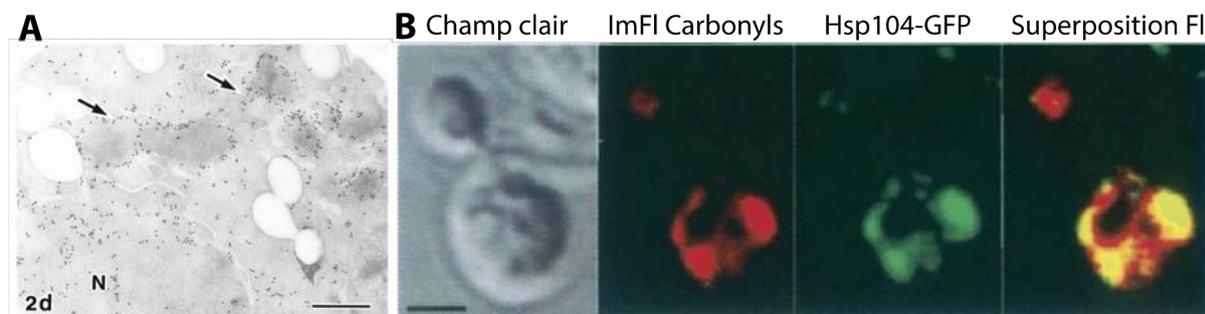


FIGURE 22 – Colocalisation d'Hsp104 avec les agrégats de protéines carbonylées. A) Image de microscopie électronique avec immunomarquage des protéines Hsp104 montrant une cellule de levure ayant subi un choc thermique modéré (43°C). On voit que Hsp104 s'accumule à la périphérie des agrégats protéiques, électroniquement denses. Figure adaptée de [310]. B) Agrégats de protéines carbonylées marquées par immunofluorescence et de Hsp104 fusionnée à la GFP dans des cellules vieilles (10 à 12 générations). D'après la colocalisation des signaux, Hsp104 peut être utilisé pour marquer les agrégats protéiques. Figure adaptée de [9].

Hsp104, qui se lie aux agrégats de protéines endommagées, est donc un marqueur communément utilisé de ces agrégats, et par extension du vieillissement.

2.4.2 Hsp104, protéine communément utilisée comme marqueur du vieillissement

Hsp104 fusionnée à la GFP a ainsi été utilisée pour étudier la ségrégation asymétrique *in vivo* des agrégats protéiques chez *S. cerevisiae* [10] [12] mais également chez *S. pombe* [258] [311]. D'une manière comparable, la petite protéine de choc thermique IbpA fusionnée à YFP a permis de suivre les agrégats protéiques *in vivo* chez *E. coli* [305]. Ces différentes études ont montré l'accumulation asymétrique *in vivo* des agrégats au sein des cellules mères de levure de boulanger ou du vieux pôle des bactéries dans des conditions classiques, et au vieux pôle des levures à fission lors d'un stress.

L'asymétrie morphologique et/ou fonctionnelle de la division est à la base de la théorie du vieillissement par accumulation de dommages [2]. L'asymétrie dans la distribution des dommages serait nécessaire pour prévenir le vieillissement clonal, qui pourrait aboutir à la mort de l'intégralité des descendants et donc à la disparition de l'espèce [304]. Ainsi, la distribution asymétrique des dommages pourrait présenter un avantage évolutif [312] et donc avoir été sélectionnée par l'évolution [305]. Différents modèles théoriques, validant l'hypothèse de Thomas Kirkwood du "soma jetable" [207], ont ainsi proposé que la ségrégation asymétrique permet une croissance plus rapide [313] [314] et une meilleure valeur sélective (fitness) [304] [315] dès lors que la charge de dommages s'accumulant est trop importante et induit la mort cellulaire [316].

Cependant, les mécanismes précis de ségrégation asymétrique des dommages ne sont toujours pas compris. L'objet de cette thèse est notamment de déterminer les mécanismes de ségrégation

2.4. La protéine de choc thermique Hsp104, marqueur des agrégats protéiques et du vieillissement

asymétrique des agrégats protéiques liés à Hsp104 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les différents modèles controversés proposés pour expliquer ces derniers sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Mécanismes de ségrégation asymétrique des agrégats protéiques liés à Hsp104

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les agrégats protéiques liés à Hsp104 s'accumulent asymétriquement au sein des mères chez *Saccharomyces cerevisiae*. Selon la théorie du vieillissement par accumulation de dommages, ils sont donc des facteurs potentiels de sénescence. Aujourd'hui, ces agrégats sont communément utilisés comme marqueurs du vieillissement, notamment *in vivo* grâce à la protéine de fusion Hsp104-GFP [9]. Cependant, l'induction de la sénescence par l'accumulation de tels agrégats protéiques n'a pas été prouvée et les mécanismes qui gouvernent leur ségrégation asymétrique entre la mère et la fille restent controversés [317].

Dans ce chapitre, je présenterai les différents mécanismes proposés pour expliquer la ségrégation asymétrique des agrégats protéiques liés à Hsp104 et je démontrerai la nécessité de développer une nouvelle approche expérimentale pour comprendre comment cette ségrégation est établie puis maintenue.

Sommaire

3.1	Transport actif des agrégats de la fille vers la mère	46
3.1.1	Transport actif des agrégats grâce au réseau polarisé de câbles d'actine	46
3.1.2	Rôle du répresseur <i>SIR2</i>	46
3.2	Diffusion limitée des agrégats au sein de la mère	46
3.2.1	Diffusion limitée chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
3.2.2	Diffusion observée chez d'autres unicellulaires	47
3.3	Rétention organelles-dépendante des agrégats	47
3.3.1	Rétention au sein de JUNQ et IPOD	47
3.3.2	Rétention par accrochage au réticulum endoplasmique et aux mitochondries	48
3.4	Limitations des méthodologies expliquant la ségrégation asymétrique des agrégats liés à Hsp104	48
3.4.1	Cinétique d'agrégation et dynamique des organelles non quantifiées	48
3.4.2	Population asynchrone de cellules, observation postérieure à la formation d'agrégats	49
3.4.3	Observation d'agrégats induits artificiellement	49

Jusque récemment, il n’existait pas de méthode permettant d’isoler et de suivre continûment une cellule mère de levure de boulanger par microscopie à épifluorescence tout au long de sa vie [270]. L’observation d’agrégats s’accumulant dans les vieilles mères n’était donc pas triviale.

Cependant, afin d’étudier la ségrégation asymétrique des agrégats protéiques sans avoir besoin d’obtenir de vieilles mères, ces agrégats peuvent être induits par déstabilisation de la conformation [310] ou des processus de traitement [13] des protéines. Grâce à de telles inductions artificielles d’agrégats, trois principaux mécanismes, dont certains sont contradictoires, ont été proposés pour expliquer la ségrégation asymétrique des agrégats de protéines endommagées liés à Hsp104.

3.1 Transport actif des agrégats de la fille vers la mère

3.1.1 Transport actif des agrégats grâce au réseau polarisé de câbles d’actine

Il a tout d’abord été montré par Liu *et al.* que les agrégats protéiques liés à Hsp104 se formant dans les filles après un choc thermique subissent un transport rétrograde vers la cellule mère, et ce grâce au réseau polarisé de câbles d’actine [10]. Ceci permet d’expliquer l’établissement d’une asymétrie mère-fille et confirme l’observation faite plus tôt par le même groupe que la dépolymérisation du cytosquelette d’actine induit une distribution symétrique de dommages tout en limitant la durée de vie répllicative [9]. Tessarz *et al.* avaient également préalablement observé que la distribution asymétrique des protéines carbonylées dépend de la formation de la polarité par un mécanisme actine-dépendant impliquant directement Hsp104 [318].

L’ensemble de ces résultats ont conduit Liu *et al.* à proposer l’existence d’un mécanisme actif contrôlant la ségrégation des agrégats protéiques grâce à l’accrochage et au transport de ces derniers le long du réseau polarisé de câbles d’actine selon une orientation fille-mère [10]. Ce mécanisme permet d’éviter l’accumulation d’agrégats dans les filles au cours de la mitose et pourrait être à l’origine du processus de rajeunissement observé chez les filles de mères vieillissantes [11].

3.1.2 Rôle du répresseur *SIR2*

Des défauts de ségrégation asymétrique sont également observés chez les mutants *sir2Δ* [8] [9]. *SIR2* est une désacétylase d’histone de la famille des sirtuines impliquée dans la régulation de la durée de vie chez de nombreux organismes [319]. Chez la levure de boulanger, sa délétion induit un vieillissement prématuré tandis que sa sur-expression augmente la durée de vie [320]. Récemment, Song *et al.* ont montré que le réseau d’interaction de *SIR2* comprend des gènes essentiels à la ségrégation asymétrique incluant notamment des éléments du cytosquelette d’actine : le moteur moléculaire associé à l’actine Myo2p et la protéine d’organisation de l’actine Cmd1p [321]. Ceci pourrait donc expliquer les défauts de ségrégation observés chez les mutants *sir2Δ*.

Cependant, ce scénario d’un mécanisme actif d’établissement et de maintien de l’asymétrie a rapidement été remis en cause par une étude du groupe de Rong Li proposant un mécanisme passif de ségrégation.

3.2 Diffusion limitée des agrégats au sein de la mère

3.2.1 Diffusion limitée chez *Saccharomyces cerevisiae*

En effet, en suivant par microscopie confocale le mouvement à travers le cou du bourgeon d’agrégats induits après un choc thermique identique à celui réalisé par Liu *et al.*, Zhou *et al.*

n'ont pas observé de biais de transport dans le sens fille-mère [12]. De plus, selon les auteurs, la rétention des agrégats au sein des cellules mères peut être expliquée par des arguments purement physiques, *i.e.* leur diffusion lente et anormale dans l'environnement confiné que constitue la cellule. En effet, au vu des coefficients de diffusion mesurés, le transport des agrégats à travers le cou du bourgeon est peu probable sur l'échelle de temps du cycle cellulaire [12]. Le mécanisme est ici similaire à celui proposé par Gehlen *et al.* pour expliquer la rétention des ERC au sein des cellules mères [289] (*cf.* partie I - section 2.3.2).

Une étude théorique récente des propriétés de transport de matériels cellulaires dans divers contextes tend à confirmer cette hypothèse (Michael Knop, communication personnelle), tout comme des études expérimentales similaires réalisées chez les unicellulaires *S. pombe* et *E. coli*.

3.2.2 Diffusion observée chez d'autres unicellulaires

Ainsi, la localisation des agrégats protéiques au vieux pôle de la bactérie *E. coli* [305] semble résulter de la diffusion libre des agrégats [322] au sein de la bactérie couplée à un fort encombrement cellulaire qui confine leur mouvement à la région ne comprenant pas le nucléoïde [306] [322].

De même, chez la levure à fission *S. pombe*, les agrégats diffusent librement au sein de la cellule [311]. Lorsque plusieurs agrégats sont formés, ils fusionnent pour créer un unique agrégat qui ségrège donc de manière asymétrique entre les deux filles résultant de la division [311]. Cependant, contrairement à ce qui est observé chez la bactérie, les agrégats ségrègent indifféremment au vieux ou au nouveau pôle des cellules [311].

Les agrégats protéiques semblent donc diffuser librement de de façon anormales chez différents organismes unicellulaires. Lorsque cette diffusion est assez lente, elle peut suffire à expliquer la rétention de ces structures au cours des divisions successives au sein de la cellule qui les contient initialement. Cependant, ce processus n'explique pas l'établissement de l'asymétrie mère-fille observée lors de la première division après induction des agrégats chez *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, d'autres études ont montré que les agrégats protéiques peuvent être recrutés dans des compartiments spécifiques liés aux organelles.

3.3 Rétention organelles-dépendante des agrégats

3.3.1 Rétention au sein de JUNQ et IPOD

Kaganovich *et al.* ont en effet montré que les agrégats amorphes (formés par détérioration du protéasome, de type prion ou issus de mutants induisant artificiellement l'agrégation) ne diffusent pas librement dans le cytosol mais sont recrutés dans des compartiments péri-nucléaire et péri-vacuolaire respectivement nommés JUNQ et IPOD [13]. Cette accrochage aux larges structures JUNQ et IPOD permet alors d'expliquer le comportement de diffusion anormale des agrégats ainsi que leur ségrégation asymétrique [14]. En effet, Spokoini *et al.* ont montré que JUNQ et IPOD sont retenus dans la cellule mère au cours de la division. La ségrégation asymétrique des agrégats peut donc être expliquée par la ségrégation asymétrique de ces compartiments [14].

Selon les observations de Specht *et al.*, la petite protéine de choc thermique Hsp42 est nécessaire au recrutement des agrégats au sein de IPOD, compartiment qui se forme préférentiellement en sa présence, alors que la formation de JUNQ est Hsp42-indépendante. Il faut également noter que des compartiments similaires à JUNQ et IPOD ont été identifiés au sein de cellules humaines en culture [323], chez qui JUNQ est aussi hérité de manière asymétrique selon un mécanisme de polarisation impliquant le cytosquelette [324]. Ce mécanisme pourrait donc être conservé.

3.3.2 Rétention par accrochage au réticulum endoplasmique et aux mitochondries

Récemment, une dernière étude en faveur d'une rétention des agrégats par l'intermédiaire de l'accrochage à des organelles a également été publiée par Zhou *et al.* [8]. Cependant, selon les auteurs, les agrégats formés lors de différents stress protéotoxiques ne seraient pas associés à la vacuole ou au noyau mais au réticulum endoplasmique puis aux mitochondries. La nécessité d'un réticulum endoplasmique fonctionnel pour la formation d'agrégats induits par un choc thermique avait d'ailleurs été montrée préalablement par Escusa-Toret *et al.* [325]. D'après le modèle de Zhou *et al.*, la ségrégation asymétrique des agrégats est assurée par la scission biaisée des mitochondries, qui sont retenues au sein de la mère lorsque des agrégats y sont liés selon un mécanisme qui n'est pour l'instant pas décrit [8]. Comme pour le modèle de Spokoini *et al.*, l'accrochage aux organelles pourrait expliquer l'observation de la diffusion anormale des agrégats.

L'étude de Song *et al.* discutée plus haut dans ce chapitre tend à confirmer l'implication du réticulum endoplasmique dans le processus de ségrégation asymétrique des agrégats. En effet, différentes protéines impliquées dans les fonctions du réticulum endoplasmique ou dans le transfert réticulum endoplasmique/appareil de Golgi (Sec53p, Sec18p, Sec20p, Sec22p, Kar2p, Cdc48p) ont été détectées comme des interacteurs de *SIR2* induisant un défaut de ségrégation asymétrique lorsqu'ils sont mutés [321]. En particulier, lorsque l'ATPase Kar2p, qui est impliquée dans l'import de protéines au réticulum endoplasmique, est mutée, le nombre d'agrégats augmente. Ceci confirme l'hypothèse de nucléation des agrégats au réticulum endoplasmique avancée dans la dernière étude de Zhou *et al.*

Les organelles semblent donc être impliqués dans le mécanisme de ségrégation asymétrique des agrégats qui y sont recrutés. Cependant, les mécanismes de rétention des organelles au sein des cellules mères n'ont pas été élucidés et certaines observations récentes ne permettent pas d'exclure totalement l'implication du cytosquelette [321]. Les mécanismes de ségrégation des agrégats protéiques restent donc controversés. Ceci est notamment dû aux limitations des méthodologies utilisées dans les études précédentes. La prochaine section s'attache à décrire ces limitations.

3.4 Limitations des méthodologies utilisées précédemment pour expliquer la ségrégation asymétrique des agrégats liés à Hsp104

Différents facteurs méthodologiques pourraient induire les résultats controversés décrits précédemment dans ce chapitre.

3.4.1 Cinétique d'agrégation et dynamique des organelles non quantifiées

Tout d'abord la cinétique complexe d'agrégation des protéines dénaturées, qui implique le recrutement de nombreux chaperons (*cf.* partie I - section 1.2.1), n'a pas été décrite quantitativement. Bien que la colocalisation des organelles et des agrégats ait été étudiée à l'aide de techniques de microscopie à haute résolution (microscopie à illumination structurée) [8] [14], la dynamique propre de ces organelles et en particulier son lien potentiel avec le phénomène d'agrégation reste flou. L'effet du processus de fusion-fission des mitochondries pourrait par exemple jouer un rôle qui n'a pas été considéré à ce jour.

De plus, le phénomène même de nucléation des agrégats est controversé. Nous ne savons toujours pas si les agrégats sont produits directement à leur organelle cible, comme Zhou *et al.*

l'ont récemment proposé [8] ou si, à l'inverse, ils sont générés par fusion d'agrégats plus petits au sein du cytoplasme puis recrutés au sein de compartiments spécifiques [14]. Le processus de ségrégation asymétrique pourrait être très différent en fonction du lieu de nucléation.

3.4.2 Population asynchrone de cellules, observation postérieure à la formation d'agrégats

Dans les études précédentes, les agrégats ont été induits par différents stress déstabilisant la conformation ou le traitement des protéines, puis observés plus tard, après une période de rétablissement cellulaire. Les cellules considérées n'étant pas synchronisées, leur histoire peut alors être très différente. Par exemple, certaines cellules sont bourgeonnantes au moment du stress alors que d'autres bourgeonnent durant la période de rétablissement, après le stress. L'interprétation de la présence ou l'absence d'agrégats dans le bourgeon et la cellule fille est alors complexe : une fille ne contenant pas d'agrégat peut aussi bien résulter d'un phénomène d'établissement d'asymétrie mère-fille si elle était présente au moment du stress que d'un phénomène de pure rétention des agrégats au sein de la mère si elle est née après le stress. Le moment choisi pour l'observation de la population asynchrone de cellules peut donc induire un biais dans la mesure.

De plus, durant la période de rétablissement cellulaire, les agrégats sont partiellement désagrégés et la croissance reprend [12]. La localisation des agrégats et leur mouvement à travers le cou du bourgeon peuvent alors être forcement influencée par le moment choisi pour observer les cellules.

Pour être capable de distinguer clairement les phénomènes d'établissement et de maintien de l'asymétrie ainsi que de s'abstraire des biais de mesure induits par l'absence de synchronisation des cellules, il est donc nécessaire de développer une méthodologie nouvelle permettant d'observer des cellules uniques aussi bien avant que pendant et après le choc thermique.

3.4.3 Observation d'agrégats induits artificiellement

Enfin, les agrégats observés pour déterminer les mécanismes de ségrégation asymétrique sont produits selon des méthodes qui affectent fortement la physiologie de la cellule (arrêt de la croissance, détérioration du protéasome...) et qui ne miment pas nécessairement les agrégats formés naturellement au cours du vieillissement.

Malgré un comportement similaire des agrégats induits par un choc thermique ou lors du vieillissement [12], il faut noter que les agrégats ne colocalisent plus avec les mitochondries dans ces cellules vieilles [8]. Ceci pourrait aussi bien être dû à la modification de la dynamique des mitochondries dans les cellules sénescents qu'au fait que ces agrégats sont intrinsèquement différents. Spokoini *et al.* ont également mis en évidence un comportement très différent pour les agrégats induits par choc thermique et ceux spécifiquement recrutés au sein de JUNQ et IPOD [14].

Pour comprendre les mécanismes de ségrégation asymétrique des agrégats induits au cours du vieillissement, il est donc nécessaire de développer un système permettant de suivre l'émergence et l'héritabilité de ces derniers dans des cellules uniques tout au long de leur vie. De plus, à ce jour, il n'a toujours pas été prouvé que l'accumulation d'agrégats de protéines dénaturées est à l'origine du phénomène de vieillissement. Nous ne savons en effet pas si les agrégats sont responsables de la sénescence ou s'ils sont seulement la marque de ce phénomène [49]. Cette observation serait clef dans le but de valider le modèle d'accumulation progressive de dommages, paradigme du vieillissement réplcatif chez la levure du boulanger, comme cela a été fait chez la bactérie [305] [306] ou la levure à fission [258].

Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la question du mécanisme de ségrégation des agrégats de protéines oxydées dans la cellule mère reste ouverte. En particulier, nous ne savons toujours pas si cette ségrégation peut s'expliquer uniquement à l'aide de concepts physiques (comme la diffusion limitée, l'étranglement du cou du bourgeon, ...) ou si, à l'inverse, elle nécessite un mécanisme biologique contrôlant l'établissement et le maintien de la distribution asymétrique des agrégats (comme un transport actif ou une séquestration au sein d'organelles spécifiques).

Cette controverse est en partie due aux limitations des méthodologies utilisées dans les études précédentes, déstabilisant la protéostasie, pour apprécier la dynamique des agrégats protéiques (*c.f.* partie I - chapitre 3). De plus, il n'est pas évident que les observations ainsi effectuées puissent être transposées dans un contexte de vieillissement. De nouvelles approches sont ainsi nécessaires afin, tout d'abord, de trancher entre les différents mécanismes proposés, et ensuite d'étudier l'effet sur la cellule des agrégats protéiques induits au cours du vieillissement.

L'objet de cette thèse est donc double.

D'une part, il s'agit de mieux comprendre les mécanismes d'établissement et de maintien de la ségrégation asymétrique qui conduisent à l'accumulation dans les cellules mères d'agrégats protéiques liés à Hsp104 induits par un choc thermique, en observant continûment, avant, pendant et après l'induction d'agrégats, une population de cellules uniques dont la croissance n'a pas été stoppée.

D'autre part, il s'agit de décrire la dynamique de formation des agrégats protéiques marqués par Hsp104-GFP au sein de cellules vieillissantes, de vérifier si les observations précédentes sont bien transposables dans ce contexte et d'interroger la causalité entre la présence d'agrégats et le phénomène de sénescence.

Pour ce faire, nous avons développé deux dispositifs microfluidiques spécifiquement adaptés à chacune des questions posées. Ces dispositifs et leur validation expérimentale seront présentés dans la deuxième partie de cette thèse tandis que les principaux résultats obtenus seront exposés sous forme d'article dans la troisième partie.

Deuxième partie

Développement de nouvelles stratégies
pour suivre la dynamique d'agrégation
protéique *in vivo* en temps réel

Chapitre 1

Contrôle précis de l'environnement de cellules uniques sous le microscope grâce à la microfluidique

La microfluidique peut être définie comme la science et la technologie des systèmes manipulant des fluides à l'échelle micrométrique [326]. C'est donc à la fois un domaine de recherche fondamentale et un outil. Certains s'attachent ainsi à comprendre les lois qui régissent l'écoulement des fluides dans un environnement dont au moins l'une des distances caractéristiques est de l'ordre du micromètre. D'autres utilisent la microfluidique comme un outil et créent de véritables laboratoires micrométriques appelés puces (figure 23). Dans de telles puces, on peut écouler de très petits volumes (avec des débits typiques de l'ordre du nanolitre au microlitre par minute) de différents fluides (gaz ou liquides) à travers des micro-canaux. Cela permet de développer des applications aussi diverses que des têtes d'imprimantes à jet d'encre, des systèmes d'affichages, d'analyse rapide de l'ADN ou de diagnostic. S'il existe depuis longtemps des systèmes microfluidiques dans la nature, comme au sein des arbres [327], ce domaine de recherche est en plein essor depuis les années 2000 seulement.

Dans ce chapitre, après avoir exposé brièvement d'où vient la microfluidique, je présenterai ses principaux intérêts et décrirai le processus de création d'une puce.

Sommaire

1.1	Origines de la microfluidique	56
1.2	Utilisation de la microfluidique en biologie cellulaire	57
1.2.1	La puce microfluidique, un système parfaitement adapté à l'imagerie cellulaire sur de longues périodes	57
1.2.2	Piégeage et adressage de cellules uniques grâce à la microfluidique .	59
1.2.3	Contrôle précis des paramètres de l'environnement cellulaire	60
1.2.4	Parallélisation et standardisation	63
1.3	De la question initiale à la réalisation d'une puce	65
1.3.1	Identification des besoins et esquisse d'une puce adaptée	65
1.3.2	Dessin industriel de la puce	67
1.3.3	Fabrication du moule	68
1.3.4	Réalisation des puces	73

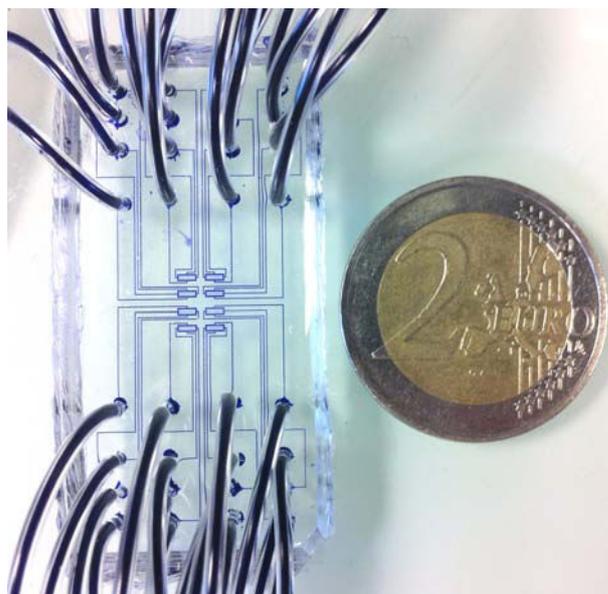


FIGURE 23 – Photographie d'une puce microfluidique développée au laboratoire. Possibilité de réaliser 8 expériences différentes de concert au sein des 8 rectangles centraux. Pour chaque condition, plusieurs centaines de cellules sont observées simultanément.

1.1 Origines de la microfluidique

Le premier dispositif microfluidique date de 1979. Il s'agissait d'un système microscopique permettant de réaliser des chromatographies en phase gazeuse, développé par l'université de Stanford [328]. Ce système était principalement composé de canaux de silicium, gravés par des méthodes chimiques et de photolithographie.

Mais l'émergence de la microfluidique en tant qu'outil remonte aux années 1980 et au développement intensif des procédures de gravure du silicium pour l'industrie micro-électronique [329]. Ces nouvelles méthodes de gravure ont alors permis la commercialisation des premiers systèmes composés d'éléments microscopiques mobiles intégrés à des plaques de silicium : les microsystèmes électromécaniques (MEMS) [330].

Dans les années 1990, les MEMS ont notamment été adaptés à l'utilisation en biologie et en chimie avec par exemple le développement de micro-détecteurs chimiques permettant des diagnostics *in vitro* ou des criblages de médicaments [331], mais aussi la réalisation de *pace-makers* ou de systèmes de distribution de médicaments [332]. Le mouvement des fluides dans des micro-canaux a alors dû être contrôlé précisément, marquant un nouveau développement de la microfluidique. À cette époque, les dispositifs microfluidiques étaient encore majoritairement fabriqués en silicium et en verre selon des procédés assez complexes requérant des salles blanches⁶ et un important savoir-faire.

En 1999, Georges Whitesides a permis la démocratisation de la microfluidique en développant une nouvelle méthode de fabrication des puces [333], plus simple d'utilisation et bon marché : la lithographie "molle" (soft lithography) [334]. Cette technique autorise de répliquer les structures d'une matrice par le moulage de polymères et d'ensuite créer facilement des puces microfluidiques telles que celle présentées en figure 23. De nos jours, grâce à la lithographie "molle", des milliers

6. Salles propres selon la norme ISO 14644-1 dans lesquelles la concentration en particules est maîtrisée afin d'en minimiser l'introduction, la génération et la rétention.

de chercheurs développent de nouvelles applications biologiques très diverses allant des systèmes de diagnostic ou d'analyse rapide de l'ADN [335] [336] aux dispositifs permettant le tri, la capture ou l'arrangement en motifs de cellules uniques [337] [338] en passant par des outils micrométriques d'analyse de protéines (spectrométrie de masse, immuno-essai, séparation de protéines, ...) [337] [339]. Le nombre d'articles publiés utilisant la microfluidique augmente ainsi chaque année [340].

Selon Georges Whitesides, la microfluidique "offre de nombreuses perspectives nouvelles - et peut-être même révolutionnaires" [326]. Comme nous l'avons vu, les champs d'applications sont très disparates (de l'imprimante jet d'encre au diagnostic médical) et ne se limitent pas à la biologie. Dans la section suivante, je développerai les intérêts de la microfluidique dans le cadre spécifique de la biologie cellulaire, et plus particulièrement de la culture cellulaire *in situ*, sous le microscope.

1.2 Utilisation de la microfluidique en biologie cellulaire

L'utilisation de la microfluidique en biologie cellulaire présente de nombreux intérêts. La spécificité des écoulements à l'échelle microscopique permet de les contrôler précisément dans l'espace et dans le temps, et ainsi de réaliser des modifications rapides de milieu ou de température ou encore de piéger et cultiver des cellules uniques sous le microscope. En outre, nous verrons que les systèmes microfluidiques sont particulièrement adaptés à la microscopie, utilisent de faibles quantités de réactifs par rapport aux études macroscopiques et offrent des solutions nouvelles à des questions biologiques très diverses. Enfin, en tirant profit de la miniaturisation, la parallélisation et la standardisation de systèmes macroscopiques, certaines puces microfluidiques permettent de manipuler simultanément un nombre élevé de cellules de manière indépendante et selon différentes conditions expérimentales et ainsi de réaliser des études à haut-débit.

1.2.1 La puce microfluidique, un système parfaitement adapté à l'imagerie cellulaire sur de longues périodes

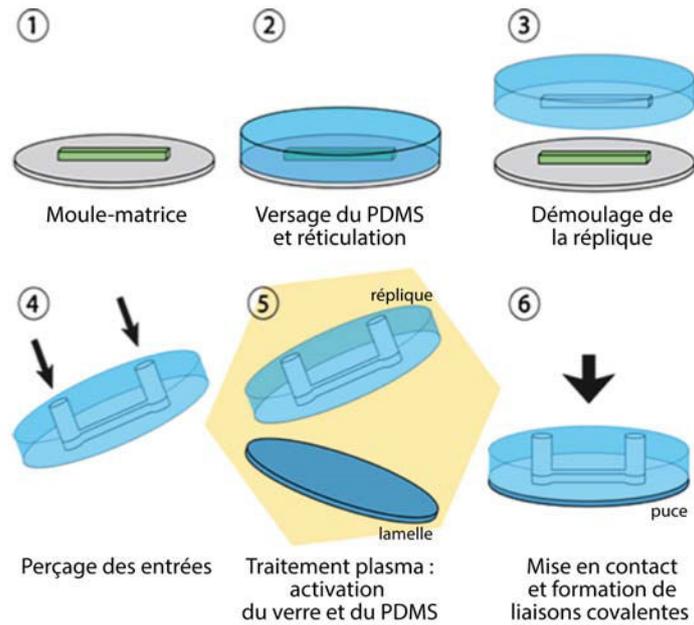
Fabrication d'une puce par lithographie "molle" et utilisation en microscopie

Grâce à la méthode de lithographie "molle" développée par Georges Whitesides [333], les puces microfluidiques s'adaptent très bien à la microscopie. En effet, cette méthode est basée sur la réplique des motifs d'un moule-matrice par moulage de polymères (figure 24) dont les caractéristiques physiques sont compatibles avec l'imagerie.

Le moule, fabriqué par des méthodes de photolithographie présentées en section 1.3.3, peut générer des répliques plusieurs centaines de fois s'il est utilisé précautionneusement. La réplique issue du moule est ensuite liée de manière covalente à une lamelle de verre grâce à un traitement plasma ionisant pour former une puce microfluidique scellée (figure 24).

Le polymère le plus couramment utilisé pour la création de puces adaptées à la biologie cellulaire est le polydiméthylsiloxane (PDMS). Cet élastomère est optiquement transparent de 240 à 1100 nm [341] et peu autofluorescent [342]. Il convient donc parfaitement aux conditions d'imagerie classiques (contraste de phase, champ clair, fluorescence, ...). Ce composé est de plus bio-compatible [343], perméable aux gaz [341] et capable de reproduire des motifs à une résolution inférieure au micron [344]. Il satisfait donc à la culture d'organismes unicellulaires et de cellules mammifères. En outre, ses propriétés élastiques permettent d'assurer des connexions sans fuite à l'interface de la puce avec l'extérieur, et ainsi de renouveler le milieu contenu dans la puce. Ainsi, on est capable d'assurer un apport de nutriments constant aux cellules piégées dans le système et de les cultiver *in situ* tout en les observant.

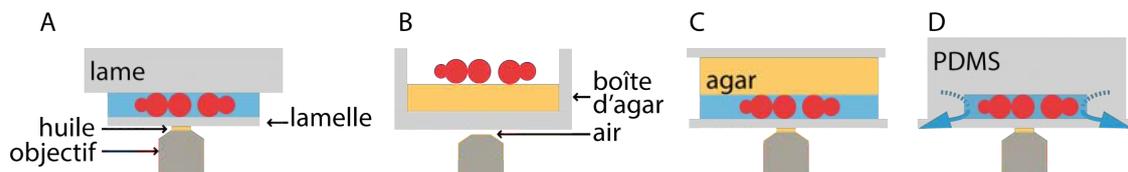
FIGURE 24 – Méthode de fabrication d'une puce à partir d'un moule (1) selon le principe de lithographie "molle". Le polydiméthylsiloxane (PDMS) non polymérisé, mélangé à son agent de réticulation, est versé sur le moule (2). Il polymérise à la cuisson et peut alors être découpé et démoulé (3). Après perçage des entrées (4), l'activation (création de radicaux libres) du PDMS et de la lamelle de verre par nettoyage au plasma (5) permet de créer des liaisons covalentes lors de la mise en contact des deux entités (6) et de former une puce. Figure adaptée de [338].



Suivi dynamique des cellules sur de longues périodes

L'alliance de la microscopie et de la microfluidique permet donc de suivre dynamiquement des cellules sur de longues périodes (plusieurs jours), ce qui est impossible à l'aide de techniques classiques. En effet, les méthodes classiques de microscopie consistent à observer un échantillon monté entre lame et lamelle ou déposé sur une boîte d'agar (figure 25 A et B). L'utilisation de ces techniques limite la qualité des images et le temps d'observation (dessèchement de l'échantillon et manque de nutriments).

Tandis que les cellules ne peuvent se développer correctement entre lame et lamelle faute d'apport de nutriments, l'imagerie à travers une boîte de Petri est limitée du fait d'une distance de travail élevée (de l'ordre du centimètre) entre l'objectif et les cellules et de l'utilisation d'objectifs à air. Un montage sous bloc d'agar permet d'améliorer la qualité des images [345] tout



qualité imagerie	+	-	+	+
apport nutriments	-	+	+	+
croissance dans le plan focal	+	-	-	+

FIGURE 25 – Montages classiques de microscopie. A) Montage entre lame et lamelle. B) Observation directe d'une boîte d'agar. C) Montage sous bloc d'agar. D) Puce microfluidique.

en nourrissant les cellules, leur observation étant possible avec un objectif à huile directement à travers une lamelle (figure 25 C). Cependant, on ne peut observer des cellules montées de la sorte plus de quelques heures. Assez rapidement⁷, ces dernières croissent dans une direction perpendiculaire à l'axe d'observation, en dehors du plan focal, et il n'est alors plus possible de les imager correctement.

À l'inverse, la rigidité des puces microfluidiques permet de contraindre les cellules à se développer en deux dimensions, dans le plan focal (figure 25 D). De plus, un apport constant en nutriments est assuré par le renouvellement continu de milieu (flèches bleues) et permet ainsi de cultiver les cellules sur de longues périodes. Ainsi, en 2005, Cookson *et al.* ont proposé un système microfluidique permettant de suivre la croissance de cellules de levures jusqu'à 20 heures de suite [346] tandis que Balagaddé *et al.* suivaient des bactéries pendant plus de 100 heures [347] et Tourovskaia *et al.* des cellules musculaires sur plusieurs semaines [348].

1.2.2 Piégeage et adressage de cellules uniques grâce à la microfluidique

Intérêts du suivi de cellules uniques en temps réel

Les dispositifs microfluidiques permettent également le suivi en temps réel de cellules uniques. La résolution à l'échelle de la cellule unique est nécessaire pour s'affranchir des effets de moyenne et pour avoir accès à l'histoire d'une cellule.

Mesure de la variabilité au sein d'une population

La mesure d'une grandeur moyenne sur un ensemble de cellules ne tient pas compte de l'hétérogénéité de la population, qui existe même lorsque celle-ci est isogénique [349]. Suivre des cellules uniques permet de mesurer le bruit : d'échantillonner la variabilité phénotypique de la population [350]. Au lieu de mesurer la quantité moyenne d'une protéine par Western blot, on pourra ainsi par exemple étudier la variation dans l'expression du gène correspondant au sein d'une population isogénique de cellules soumises à un environnement contrôlé et identique [351] [352], comme cela a été fait chez la bactérie [353], chez la levure [354] ou chez les eucaryotes supérieurs [355] [356].

Observation de l'histoire des cellules

Suivre une cellule unique permet également de connaître son "histoire" et donc d'étudier les mécanismes impliquant une modification au cours de la vie de la cellule (adaptation à une drogue, vieillissement, mémoire ...) [357]. Si en cytométrie de flux on peut acquérir rapidement des données à l'échelle de la cellule unique [358] [359], il est impossible de suivre la dynamique d'une cellule donnée. La microscopie usuelle couplée à la microfluidique, elle, le permet. Ce suivi est par exemple capital pour comprendre l'effet à long terme du niveau d'expression d'un gène [275] [360] ou les conséquences de l'état physiologique de la cellule sur son destin [278] [357].

Piégeage de cellules uniques

Afin de suivre une cellule unique sur un temps long devant le cycle cellulaire, il est nécessaire de la piéger. Après traitement des micro-canaux avec des polypeptides ioniques comme la polylysine [361] ou des protéines comme la fibronectine [362], des cellules adhérentes s'attachent à leur surface et sont alors immobilisées. Les cellules adhérentes peuvent donc être placées directement dans le flux de nutriments s'il est assez faible⁸ [348] [363]. Pour être piégées, les cellules non

7. Typiquement après 3 à 4 heures pour un bloc à 2% d'agar dans le cas des levures.

8. De l'ordre de quelques micro-litres par minute.

adhérentes, en revanche, doivent être protégées de ce flux et maintenues mécaniquement (par exemple par un plafond bas) dans des chambres de culture [364] [365] [366] (figure 26 A) ou bien retenues dans un piège hydrodynamique [367]. Dans le cas de cellules non adhérentes, la hauteur du plafond doit donc être adaptée au type de cellules, comme Cookson *et al.* l'ont montré en adaptant un même type de système pour *S. cerevisiae* et *E. coli* [346].

L'architecture développée pour piéger les cellules dépend aussi de la durée sur laquelle on veut suivre une cellule et de l'intérêt que l'on porte ou non à sa descendance. On peut par exemple vouloir mesurer la croissance de l'ensemble d'un clone sur quelques heures et donc avoir intérêt à isoler la cellule initiale et sa descendance [357] (figure 26 C-1). On peut au contraire vouloir suivre le plus longtemps possible une cellule vieillissante et avoir intérêt à éliminer sa descendance [255] (figure 26 C-2).

Adressage de cellules uniques

La possibilité de fabriquer des dispositifs microfluidiques à plusieurs couches ainsi que la souplesse du PDMS (module d'Young faible d'environ 400 kPa) permet l'intégration de micro-valves pneumatiques [368]. Le principe de ces valves, à l'origine développées par Stephen Quake, est présenté en figure 27. Une couche de contrôle, dans laquelle la pression de l'air est maîtrisée, est superposée à la couche d'écoulement contenant les canaux et les chambres (figure 27 A et B). En augmentant la pression de l'air, on peut déformer le PDMS jusqu'à fermer totalement le canal d'écoulement (figure 27 C). Grâce à ces valves, les cellules peuvent être adressées individuellement vers des chambres [369].

Ces valves permettent également de développer des systèmes intégrés (mLSI) au sein desquels on peut combiner plusieurs opérations de manière automatisée comme l'isolation des cellules, leur lyse, la purification d'ADN [369] ou d'ARNm [370], la récupération du produit et la synthèse d'ADNc (dans le cas de la récupération d'ARNm) [371].

Une autre manière de manipuler des cellules uniques est d'utiliser des générateurs de micro-gouttelettes [373] dont les volumes sont de l'ordre du picolitre au microlitre. Schmitz *et al.* ont ainsi développé une puce microfluidique au sein de laquelle ils ont généré des milliers de gouttelettes contenant des cellules uniques de levures [374] tandis que Chabert et Viovy ont utilisé la même technique pour encapsuler des lymphocytes cancéreux [375]. Les gouttelettes offrent un environnement confinés dans lequel l'évolution du nombre de molécules peut par exemple être étudié [373], cependant, aucun échange de milieu ne peut être effectué et ce système n'est donc pas compatible pour cultiver les cellules sur de longues périodes.

Enfin, en intégrant des électrodes dans les puces, les cellules peuvent être manipulées à l'aide de champs électriques [376]. Cependant, ces techniques requièrent l'accès à une salle blanche pour la fabrication de chaque puce et sont donc moins faciles d'utilisation que celles sus-citées.

1.2.3 Contrôle précis des paramètres de l'environnement cellulaire

Un autre atout de taille des systèmes microfluidiques demeure dans la possibilité de contrôler finement l'environnement cellulaire. Dans des conditions de culture classiques, le micro-environnement d'une cellule (*i.e.* la composition chimique et la température du milieu qui l'entoure) est facilement contrôlable pour l'ensemble de la population. La microfluidique permet de maîtriser ce micro-environnement à l'échelle micrométrique et offre de plus la possibilité d'en modifier les paramètres de façon rapide et automatisée.

En effet, les puces microfluidiques peuvent constituer de véritables laboratoires micrométriques. Une fois les cellules piégées en leur sein grâce au choix d'une géométrie particulière, il est possible de créer un chemostat (croissance des cellules sous paramètres constants) [347] [377] ou

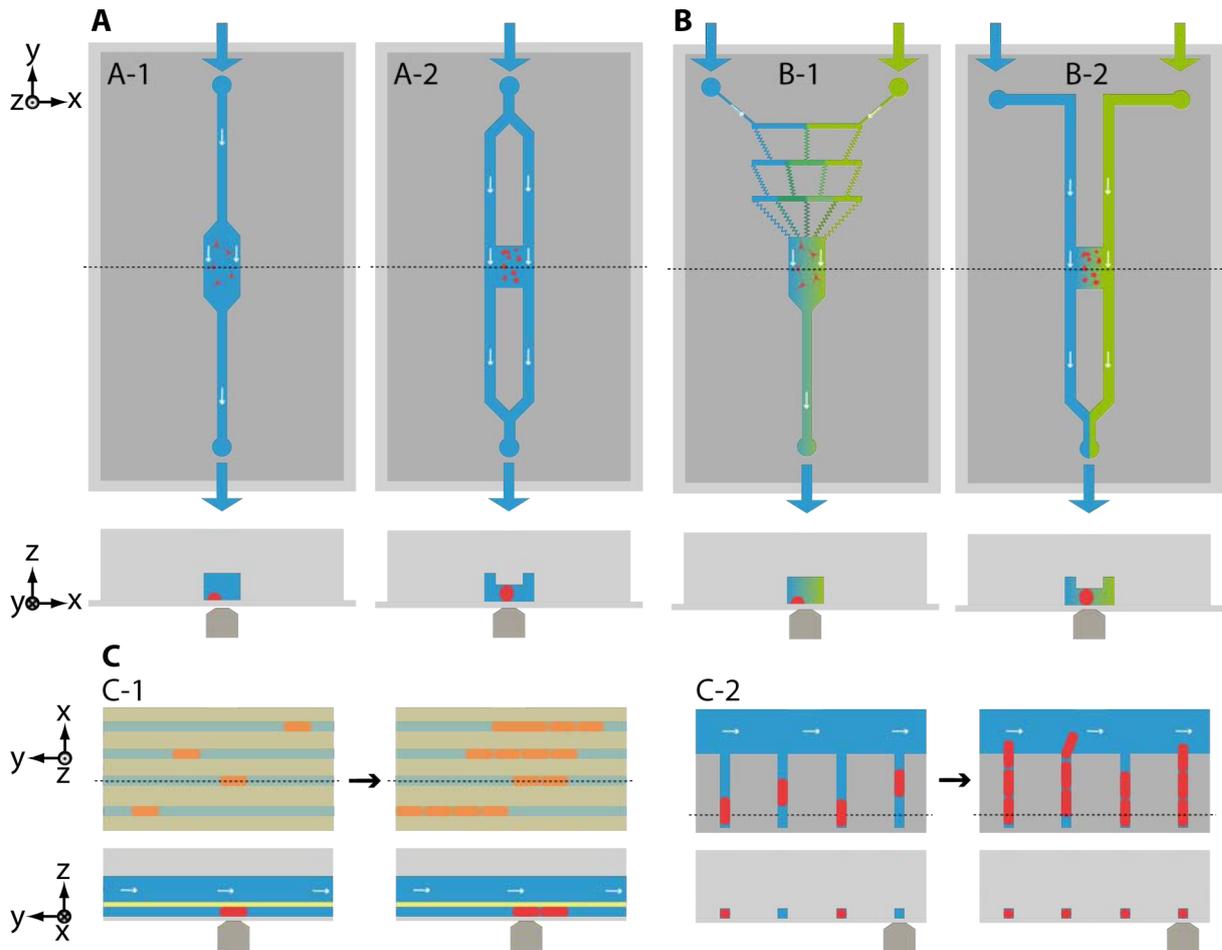


FIGURE 26 – Aperçu de la diversité des architectures de puces microfluidiques. Dimensions arbitraires pour une meilleure visibilité. Observation selon la direction z . A-B) haut : vue de dessus - bas : vue de côté, coupe selon la ligne pointillée - flèches épaisses : entrée et sortie de milieu, les couleurs différentes indiquent différents milieux - flèches blanches : flux dans la puce. A) Méthodes de piégeage en fonction du type de cellules. A-1 : cellules adhérentes directement sous le flux de milieu [363] et non contraintes en z . A-2 : cellules non adhérentes piégées entre la lamelle et le PDMS dans une zone sans écoulement [366]. Apport de milieu par diffusion des canaux verticaux vers la zone de piégeage. B) Méthodes de création d'un gradient. B-1 : méthode active dite de "l'arbre de Noël". Gradient formé activement par mélange successif de deux milieux. B-2 : méthode passive. Gradient établi selon la direction x par diffusion des deux milieux à travers le canal horizontal. C) Adaptation de l'architecture à la question biologique : zoom sur les cellules piégées. Haut : vue de dessus - bas : vue de côté, coupe selon la ligne pointillée - flèches blanches : flux dans la puce. C-1 : isolement de clones de bactérie dans des canaux individuels [357]. Cellules piégées entre le PDMS (gris) et une membrane de cellulose (jaune). Apport de milieu par diffusion à travers la membrane du canal supérieur vers le canal inférieur. Gauche : état initial - droite : évolution du système après quelques divisions. Possibilité de mesurer précisément la croissance du clone. C-2 : isolement de cellules "mères" (vieux pôle) au sein de la "mother machine" [255]. Cellules "mères" piégées au fond des canaux verticaux et élimination des cellules "filles" par le flux du canal d'apport de nutriments. Gauche : état initial - droite : évolution du système après quelques divisions. Possibilité d'isoler une mère de ses filles.

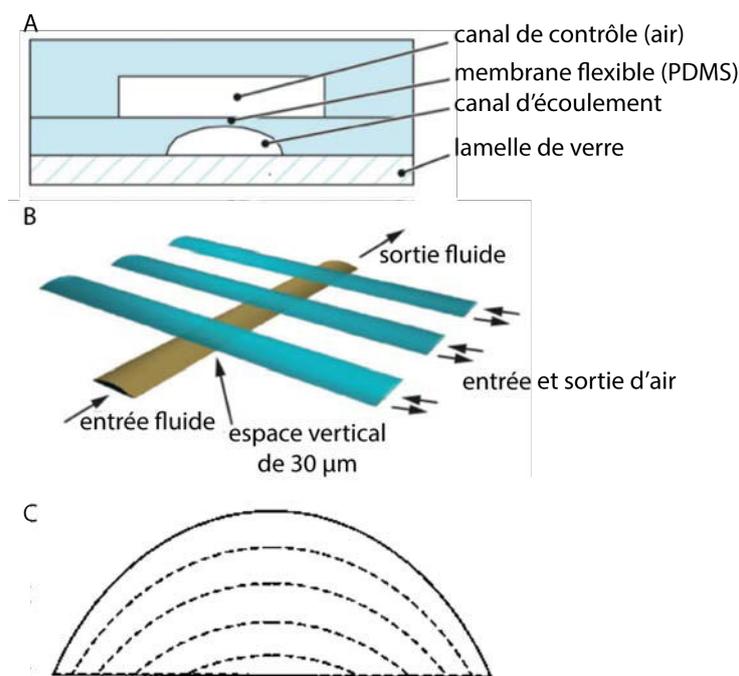


FIGURE 27 – Principe des valves pneumatiques. A) Superposition en coupe de la couche d'écoulement et de la couche de contrôle. B) Schéma représentant 3 valves en série. C) Fermeture d'une valve pour le canal rond représenté en A. Les lignes pointillées indiquent le contour supérieur du canal lorsque la pression augmente. Figure adaptée de [368] et [372].

de modifier le milieu [378] et la température [379] à la demande. Balaban *et al.* ont ainsi testé la résistance de bactéries à un stress antibiotique en réalisant des changements successifs de milieu (avec et sans drogue) [357]. Charvin *et al.* ont quant à eux tiré profit des modifications de milieu et de l'existence des promoteurs inductibles pour induire sélectivement des protéines du cycle cellulaires chez la levure et contrôler ce dernier [364]. Du fait des quantités minimales de fluides utilisées, ces changements peuvent en outre être très rapides. Bennett *et al.* et Hersen *et al.* se sont ainsi intéressés à la réponse à des modifications périodiques de milieu alternant les sources carbonées [380] ou modifiant l'osmolarité [381] à des fréquences allant du millihertz à l'hertz. Un système intégrant des valves pneumatiques permet même des modifications de milieu en quelques millisecondes [368]. Pour étudier la réponse à ces changements binaires ou continus de milieu, Bennett *et al.* ont développé des mixeurs *in situ* [380] alors que Hersen *et al.* ont choisi d'utiliser des commutateurs sous contrôle de pression intégrés à la puce [381]. La température peut quant à elle être modifiée de plusieurs dizaines de degrés en moins d'une dizaine de secondes [382].

De la même façon qu'on peut étudier de manière globale et dynamique la tension de sortie délivrée par un système électronique en fonction de la tension d'entrée appliquée, on peut observer la réponse générale d'une cellule (physiologie, expression des gènes ...) à l'environnement dans laquelle on la place. Les modifications environnementales rapides et à façon autorisées par la microfluidique permettent ainsi de revisiter des questions biologiques majeures comme celle des réseaux de gènes en étudiant leurs propriétés de manière dynamique [383].

Afin de mimer les stimuli existant naturellement au cours de processus biologiques tels que la migration cellulaire, la différenciation ou le développement, il est également intéressant de pouvoir produire des gradients de concentration au sein des puces microfluidiques. Les écoulements microfluidiques étant réguliers et s'effectuant sans mélange, il faut alors ajouter un élément générant ces gradients qui peut être très différent en fonction de la façon dont les cellules sont piégées (figure 26 B). Brièvement, des générateurs actifs de gradient permettront d'établir ces derniers au sein d'un canal dans lequel on écoule du milieu (figure 26 B-1) tandis que des générateurs passifs

permettront de créer un gradient par diffusion dans une chambre sans flux entre deux canaux d'écoulements (figure 26 B-2). Pour une description extensives des générateurs de gradients, on peut se référer à la revue de Keenan et Floch [384].

Avec l'aide de tels générateurs, Jeon *et al.* ont par exemple étudié la migration de cellules sanguines humaines dans des gradients de facteurs de chemotaxie [363] tandis que Thompson *et al.* se sont penchés sur la réponse d'un facteur de transcription en fonction du niveau de cytokines dans des cellules HeLa [360] et que Paliwal *et al.* ont observé les modifications transcriptionnelles et phénotypiques associées à l'accouplement en fonction du niveau de phéromones chez la levure [385].

1.2.4 Parallélisation et standardisation

Enfin, la microfluidique permet de paralléliser et de standardiser les systèmes expérimentaux [372] et ainsi de réaliser des études à haut-débit [386] [387].

Standardisation des conditions expérimentales et du positionnement des cellules

En créant un réseau périodique de pièges, il est possible standardiser la position des cellules et ainsi d'augmenter l'efficacité de l'imagerie aussi bien que la stabilité des conditions expérimentales. Di Carlo *et al.* ont développé un tel réseau présenté en figure 28 A pour immobiliser des cellules HeLa et leur assurer un environnement uniforme au cours du temps [367].

L'application de conditions expérimentales variées peut également être automatisée au sein d'une puce. On peut ainsi s'abstraire de l'utilisation de robots couteux. Yamada *et al.* ont développé un système microfluidique simple permettant de cultiver des cellules sur une gamme de dilution générée automatiquement *in situ* par dilution successive de deux milieux [388]. Ce système leur a permis d'étudier l'effet de la concentration du milieu en éthanol sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. Cooksey *et al.* ont quant à eux créé une puce permettant de générer, à partir de 16 entrées, 64 combinaisons différentes de milieux [389].

Parallélisation et études à haut-débit

En plus de standardiser les conditions expérimentales, l'usage de la microfluidique permet de multiplier le nombre d'expériences réalisées de concert au sein d'une unique puce. À cet effet, Thorsen *et al.* ont prouvé l'efficacité du concept des valves pneumatiques en créant une série de 1000 chambres contrôlables de façon indépendantes [390].

Gomez-Sjoberg *et al.* ont utilisé ce principe pour développer une puce dans laquelle ils ont cultivé des cellules souches mésenchymales au sein de 96 chambres dans différentes conditions (figure 28 B) et ont observé leur différenciation en adipocytes ou en ostéocytes [391]. Sur le même principe, Hung *et al.* ont créé une puce permettant de cultiver dix lignées cellulaires dans dix conditions de dilution (figure 28 C) qu'ils ont testé sur des cellules HeLa pendant 16 jours [392] tandis que la puce de Taylor *et al.* permet de suivre huit souches différentes de levures soumises à 32 séquences uniques de phéromones au sein de 2048 chambres de piégeage [393]. Cette dernière puce élève donc le nombre de conditions expérimentales testées de concert à 256 et a ainsi permis d'observer l'effet de perturbations génétiques et de séquences chimiques sur l'accouplement.

Récemment, Dénervaud *et al.* ont élevé le rendement en réalisant une puce au sein de laquelle 1152 souches de levures du boulanger peuvent être suivies à une résolution temporelle de 20 minutes [394]. En utilisant une collection de souches pour laquelle les protéines sont fusionnées à un marqueur fluorescent (GFP), les auteurs ont étudié l'expression et la localisation de 4085 protéines en réponse à un traitement au méthanesulfonate. Une puce réalisée sur le même principe a également permis à Nobs *et al.* de suivre 100.000 divisions cellulaires chez *Schizosaccharomyces*

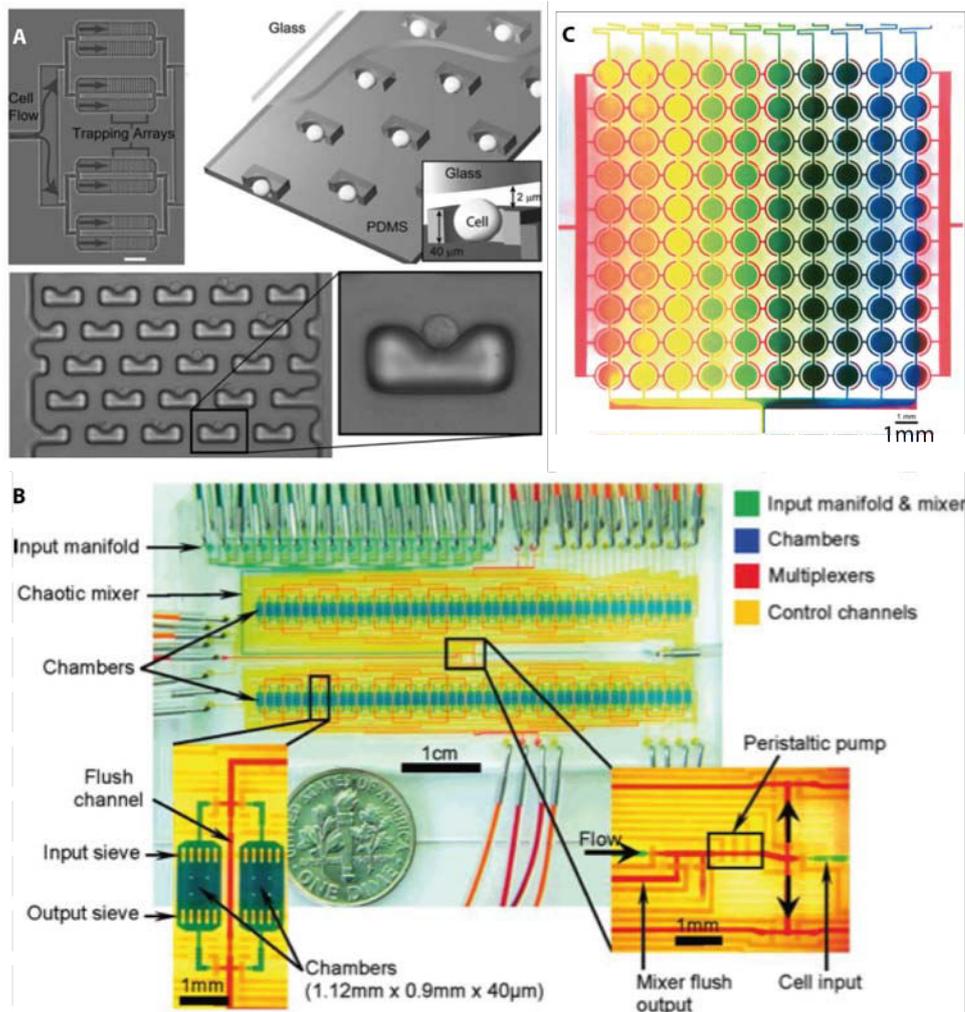


FIGURE 28 – Parallélisation et standardisation des puces. A) Réseau périodique de pièges développé par Di Carlo *et al.* pour standardiser la position des cellules imagé en champ clair à différentes échelles. En bas : zoom sur le réseau de pièges. Barre d'échelle : 500 μm. À gauche : schéma à l'échelle décrivant le dispositif. Figure adaptée de [367] B) Image annotée de la puce développée par Gomez-Sjoberg *et al.* comportant 96 chambres indépendantes. Canaux remplis par des colorants pour indiquer les différentes parties du dispositif. Insert de gauche : zoom sur deux chambres de culture. Figure adaptée de [391]. C) Image du réseau de 10 × 10 chambres de culture développé par Hung *et al.* permettant d'appliquer un gradient à différentes lignes de cellules. Des colorants bleu et jaune ont initialement été introduit par deux ports distincts à l'entrée du générateur de gradient alors que les chambres étaient remplies de colorant rouge. Figure adaptée de [392].

pombe et d'analyser l'effet d'un changement de température sur la longueur et la croissance de ces unicellulaires [395].

Pour conclure, ce bref aperçu souligne le fait que l'outil microfluidique, particulièrement flexible, peut s'adapter à de nombreuses questions biologiques et rend possible l'observation dynamique et quantitative de cellules uniques sur des périodes longues devant le cycle cellulaire,

tout en contrôlant parfaitement les paramètres environnementaux. Son utilisation est donc souvent féconde pour la compréhension de phénomènes complexes impliquant la variabilité cellulaire et dépendant de l'histoire de la cellule. Il s'adapte ainsi parfaitement à notre objet d'étude.

Dans la section à venir, nous présenterons la démarche qui conduit d'une question biologique à la réalisation finale d'une puce microfluidique.

1.3 De la question initiale à la réalisation d'une puce

Dans la section précédente, j'ai montré l'intérêt à utiliser la microfluidique pour répondre à des questions biologiques diverses. Quelle est la démarche à adopter pour construire une puce permettant de répondre à une question biologique donnée? Dans cette section, je présenterai cette démarche sur un exemple concret s'appliquant directement à la problématique de cette thèse : le suivi dynamique des agrégats protéiques liés à Hsp104 chez *Saccharomyces cerevisiae in vivo*, en temps réel, sur quelques divisions cellulaires et dans des conditions physiologiques.

1.3.1 Identification des besoins et esquisse d'une puce adaptée

Afin de réaliser une puce permettant de répondre à un problème biologique donné, il convient en premier lieu d'identifier les besoins inférés par la question posée.

Identification des besoins

Dans le cadre de cette thèse, les besoins sont les suivants :

- cultiver sous le microscope des cellules de levures dans des conditions physiologiques ;
- suivre les cellules d'intérêt au cours du temps sur plusieurs divisions ;
- suivre les cellules avant, pendant et après un choc thermique (typiquement 30 à 38°C afin d'induire l'agrégation protéique) et donc procéder à un choc thermique *in situ*, sous le microscope.

Notons que le PDMS et le verre qui constituent la puce microfluidique sont stables aux températures considérées. L'aspect thermique pourra donc être envisagé dans un second temps. Pour élaborer une esquisse de l'architecture de la puce, nous devons ainsi nous concentrer sur la croissance et le suivi de cellules de levures sur plusieurs divisions dans des conditions physiologiques.

Immobilisation des cellules

Les cellules de levures ne sont pas adhérentes. Comme nous l'avons vu dans la section précédente, il est donc nécessaire de les piéger mécaniquement dans un environnement sans écoulement pour les immobiliser. Comment peut-on créer un tel environnement? Avec les valeurs typiques de dimensions, de vitesses d'écoulement, de viscosité et de densité des fluides utilisées dans les systèmes microfluidiques, les écoulements y sont laminaires [396]. En effet, on considère typiquement des écoulements à des vitesses faibles ($v \sim 10^{-6} - 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$) de fluide de viscosité et de densité similaires à l'eau (viscosité $\mu \sim 10^{-3} \text{ Pa.s}$ - densité $\rho \sim 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$) sur des échelles de distance micrométriques à millimétriques ($L \sim 10^{-6} - 10^{-3} \text{ m}$). Le nombre de Reynolds

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu} \quad (1.1)$$

qui mesure le ratio entre les forces d'inertie et les forces visqueuses est alors inférieur à 1 (typiquement compris entre 10^{-6} et 10^{-1}). Les forces visqueuses dominent, l'écoulement est donc laminaire, et non turbulent. Les lignes de courant sont alors parallèles et faciles à prédire (figure

29 A). Ainsi, théoriquement, aucun fluide ne s'écoule dans un canal perpendiculaire à l'écoulement. Il suffit donc de placer la chambre de culture perpendiculairement au flux pour éviter tout écoulement en son sein (figure 29 A - chambre bleu clair).

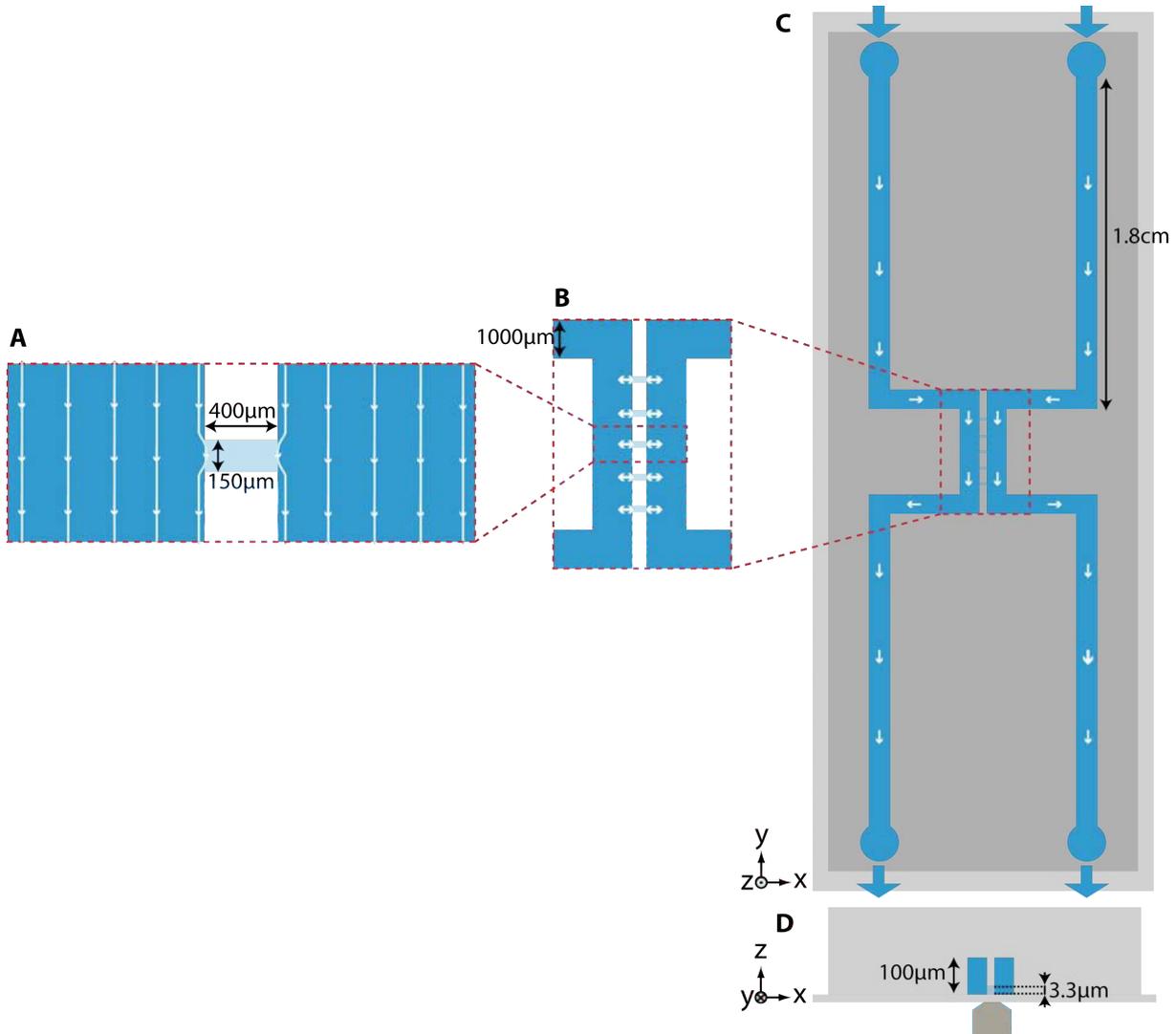


FIGURE 29 – Schéma de la puce à différentes échelles. (A) Zoom sur une chambre de piégeage (bleu clair) alimentée par ses canaux d’approvisionnement (bleu foncé). Les lignes de courant sont indiquées en blanc. (B) Zoom sur l’ensemble des 5 chambres de piégeage. Les flèches blanches indiquent l’échange de milieu par diffusion entre les canaux d’approvisionnement et les chambres. (C) Aperçu de l’intégralité de la puce (observation selon la direction z). Flèches blanches : flux dans la puce. Flèches bleues : entrée et sortie du milieu. (D) Vue en coupe montrant la différence d’épaisseur entre les canaux d’approvisionnement et les chambres. Les cellules sont coincées entre la lamelle (gris clair) et un plafond bas de PDMS (gris foncé). (A) (B) et (C) sont à l’échelle. Dimension en z non respectées pour (D) pour permettre une meilleure visualisation. Principe de la puce initialement développé par Gilles Charvin [366].

Le piège mécanique des cellules s’opère en les coincant entre une lamelle et un plafond bas de PDMS (figure 29 D). Ceci permet de confiner leur croissance au plan focal du microscope, et

ainsi de pouvoir suivre les cellules au cours du temps.

Apport de nutriments et répliquats

Pour que les conditions de croissance soient contrôlées et constantes, le piège doit être alimenté continûment en nutriments. Les canaux d'approvisionnement sont donc proches des chambres de culture pour permettre un échange par diffusion rapide devant le temps typique de consommation par les cellules (figure 29 B, flèches horizontales). De plus, leur hauteur est fixée à une valeur assez élevée afin d'éviter que des cellules puissent y rester piégées, s'y développer et modifier la concentration du milieu nutritif (figure 29 D).

En outre, il est préférable que le système permette d'effectuer des répliquats au sein d'une même puce. Ainsi, 5 chambres de culture sont présentes en parallèle au sein de la puce (figure 29 B & C).

1.3.2 Dessin industriel de la puce

Une fois l'esquisse élaborée, on crée un plan précis de la puce au format CAD (Computer Aided Design) à l'aide d'un logiciel de dessin industriel⁹. Ce plan correspond à la projection 2D de la puce selon la perpendiculaire à l'axe d'observation (et donc à la figure 29 C). Il sera ensuite "extrudé" lors de la fabrication du moule (décrite en 1.3.3). Les dimensions choisies pour ce plan sont critiques. En effet, afin de faciliter la fabrication du moule, le rapport d'aspect (ratio hauteur/largeur) des canaux de la puce ne doit pas excéder quelques unités [397] ou être de moins de quelques centièmes [398]. Un rapport d'aspect trop important ou trop faible peut conduire à l'effondrement des structures formées¹⁰. De plus, certaines des dimensions doivent par exemple être adaptées à la taille des cellules ou tenir compte des propriétés de diffusion des nutriments pour en assurer un apport constant.

Dimensions de la chambre d'immobilisation

Dans notre cas, la hauteur des chambres d'immobilisation est fixée à $3.3 \mu m$ (pour assurer le maintien des cellules de levures dont le diamètre est compris entre 3 et $5 \mu m$). Leur largeur ne doit donc pas excéder $150 \mu m$ (rapport d'aspect 2 : 100). La longueur maximale des chambres est quant à elle fixée par la vitesse de diffusion des nutriments. En effet, les nutriments entrent par diffusion depuis le canal d'approvisionnement jusqu'au centre de la chambre de culture. Le temps moyen de diffusion variant comme le carré de la longueur parcourue, si la longueur de la chambre est trop importante, la quantité de nutriment apportée par unité de temps sera trop faible. Vérifions que la longueur L fixée pour notre puce ne limite pas l'apport de nutriments. On souhaite que le flux de nutriments Φ_n arrivant par diffusion suffise à nourrir les cellules de la cavité. En considérant un régime stationnaire dans lequel les cellules consomment tout le glucose au centre de la cavité et en appliquant la première loi de Fick, le flux maximal de nutriments Φ_n existant au sein de la cavité peut-être évalué comme $\Phi_n \sim 2.D.S.C_0/L$, avec $D = 5.7 \times 10^{-10} m^2.s^{-1}$ le coefficient de diffusion du glucose, $S = 3.3 \times 150 \mu m^2$ la surface de contact entre la chambre et les canaux d'approvisionnement, $C_0 = 20 g/L$ la concentration de glucose au sein de ces canaux et L la longueur de la chambre. Pour $L = 400 \mu m$, $\Phi_n \sim 3.10^{-11} g/sec$. Comparons ce flux à l'import de glucose par les cellules se divisant en tube à essai dans des conditions standards. Un volume $V = 1 mL$ de culture saturée de levure dans du milieu SCD initialement à une concentration $c = 20 g/L$ contient $n = 5.10^7$ cellules. Une masse de glucose

9. Au laboratoire, nous utilisons AutoCAD®.

10. Il est possible de réaliser des puces avec des rapports d'aspects extrêmes, mais la fabrication est plus complexe et les structures sont moins stables [399] [400].

$m = c \times V = 2.10^{-2}$ g a donc été consommée. La quantité de glucose requise pour former une cellule est donc de $m_c = m/n = 4.10^{-10}$ g. Si l'on considère que la population de $N = 100$ cellules présentes au sein de la zone de piégeage double tous les $\Delta t = 90$ min, il faut assurer un flux minimal de glucose de $\Phi_{min} = m_c \times N/\Delta t = 4.10^{-11}$ g/min soit $\Phi_{min} = 1.10^{-11}$ g/sec. Pour notre largeur de cavité $L = 400 \mu m$, on a donc bien $\Phi_n > \Phi_{min}$. Néanmoins, la marge de manœuvre est assez faible (facteur 3) et ce calcul ne tient pas compte de l'encombrement des cellules.

Les contraintes imposées sur les dimensions de la puce (longueur L et section S) sont donc importantes. Ceci pourrait expliquer pourquoi la croissance des cellules imagées dans le dispositif de Rowat *et al.* est limitée une fois que leurs chambres de longueur supérieure à 2 cm et de $5 \mu m$ de large contiennent une centaine de cellules [401]. Cependant, le taux de croissance des cellules est constant dans notre dispositif (*cf.* section II-3.2.2, p.96 - figure 50 B) : le flux de nutriments semble donc suffisant. Fehrmann *et al.* ont en effet montré qu'un courant de fuite, qui résulte de l'inégalité de pression entre les deux côtés de la chambre, s'ajoutait à la diffusion et permettait d'obtenir, dans un dispositif aux dimensions comparables aux nôtres, un flux de nutriment supérieur d'un ordre de grandeur au flux minimal nécessaire [278].

Dimensions des canaux d'approvisionnement

La hauteur et la largeur des canaux d'approvisionnement doivent être assez importantes pour éviter tout encombrement par des cellules. On fixe la largeur à $1000 \mu m$ et la hauteur à $100 \mu m$ (rapport d'aspect 1 : 2). Leur longueur est quant à elle imposée par le cône de contraste de phase du dispositif d'imagerie. Il faut en effet éviter tout contact entre ce dernier et les tuyaux d'approvisionnements qui viennent s'insérer sur la puce. Les extrémités des canaux sont donc reléguées au bord de la puce et imposent une longueur de canal de 1.8 cm.

1.3.3 Fabrication du moule

Après la réalisation du plan, vient l'étape de prototypage du moule. Comme cela a été présenté en section 1.2.1 et en figure 24, la puce en PDMS est créée selon la méthode de lithographie "molle" [333] à partir d'un moule correspondant à son négatif. Un tel moule peut être fabriqué selon différentes techniques de gravure ou de lithographie. Lors de ma thèse, j'ai utilisé la lithographie à rayons ultraviolets (UV), communément appelée photolithographie de contact. Elle présente l'avantage d'être peu coûteuse et surtout rapide [402]. Plusieurs moules peuvent ainsi être fabriqués dans une même journée, permettant de tester différentes architectures ou diverses hauteurs de plafond pour une architecture donnée.

Principe de la photolithographie de contact

La lithographie consiste à transférer un motif sur un substrat. La photolithographie de contact est basée sur l'utilisation de résines photosensibles. Ces résines naturellement solubles à un développeur polymérisent sous l'action de rayons ultraviolets et deviennent ainsi insolubles¹¹. Pour créer un haut-relief sur le masque, il suffit donc de le recouvrir uniformément de résine, puis d'exposer uniquement les futures parties en relief à la lumière et enfin de détacher la résine non exposée (non polymérisée) à l'aide d'un développeur (figure 30 A). L'exposition aux UV est contrôlée en appliquant un masque polymère¹² en contact direct avec le moule [403] [404], afin

11. Nous utilisons ici des résines SU8 dites "négatives". La polymérisation serait inversée dans le cas de résines "positives".

12. Il est également possible d'utiliser un masque en chrome. La définition est alors meilleure et les contours des reliefs obtenus sont plus nets. Cependant, la réalisation d'un masque en chrome est plus lourde et son coût

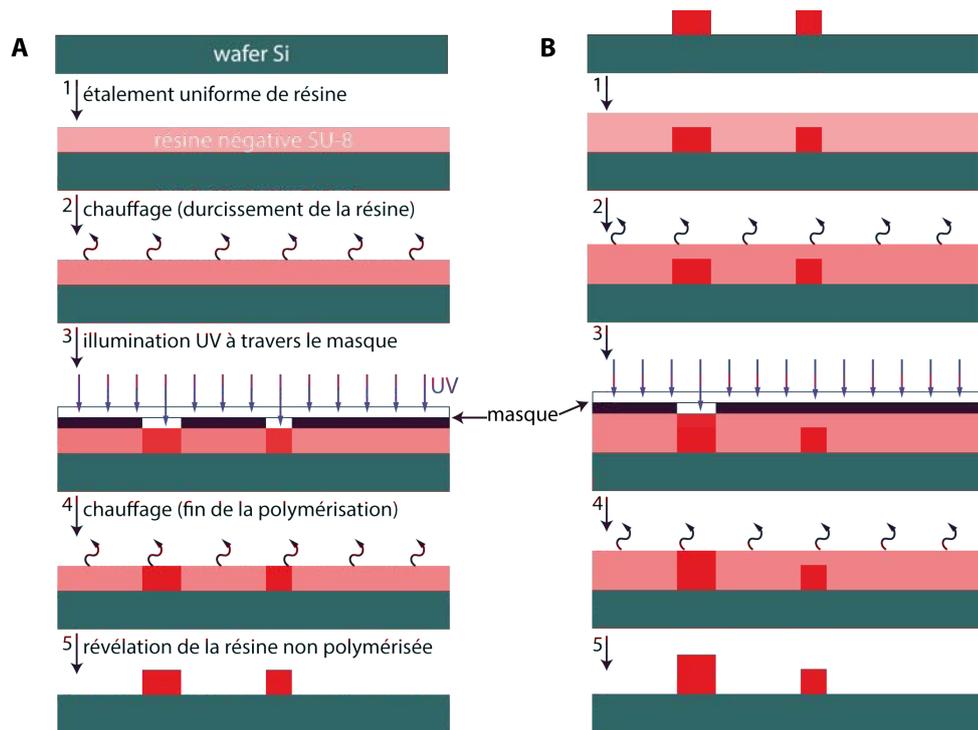


FIGURE 30 – Principe de la photolithographie de contact à résine négative. A) Réalisation de la première couche. La résine SU8 est étalée uniformément sur un wafer en silicium (1) puis chauffée (2) avant d'être illuminée à travers un masque qui ne laisse passer les UV que partiellement (3). La résine exposée aux UV polymérise et devient insoluble au développeur après chauffage (4). La résine non polymérisée peut finalement être détachée (5) et laisser apparaître le motif correspondant aux parties transparentes du masque. B) Superposition d'une seconde couche sur la couche réalisée en A. Répétition de la procédure décrite en A avec un masque différent. Des motifs de hauteur différentes peuvent ainsi être réalisés.

d'éviter toute diffraction (figure 31) qui entrainerait la déformation du motif [405]. Ce masque est transparent au niveau des zones à exposer et opaque en tout autre point.

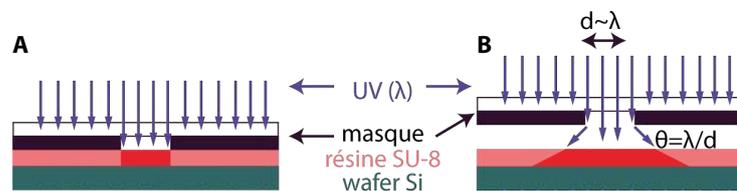


FIGURE 31 – Déformation du motif du masque en cas de mauvais contact. A) Exemple d'illumination UV (flèches) à travers un masque en cas de contact parfait. La résine illuminée (rouge) correspond exactement au motif du masque. B) Exemple d'illumination UV avec mauvais contact. La largeur d du motif du masque étant du même ordre de grandeur que la longueur d'onde d'illumination λ , la lumière est diffractée selon un angle $\theta = \lambda/d$. La zone de résine illuminée est plus large que le motif du masque à transférer et les murs réalisés ne sont pas droits.

dix fois plus élevé que pour un masque polymère. On préférera donc utiliser des masques polymères lorsque c'est possible, notamment durant les phases de prototypage.

L'étape de photolithographie présentée en figure 30 A peut être répétée en utilisant un masque différent. On peut ainsi obtenir des motifs de hauteurs variées au sein du même moule (figure 30 B). La première étape de la fabrication d'un moule consiste donc à fabriquer les différents masques nécessaires à sa réalisation.

Création et impression des masques

Les masques polymères sont imprimés à haute résolution (50 000 dpi) à partir de fichiers CAD. Pour créer un masque, on part donc directement du dessin industriel décrit précédemment et visible en figure 33. Dans le cas d'un moule dont l'épaisseur est uniforme, ce plan est directement utilisable. Dans le cas qui nous concerne, les canaux d'approvisionnement et les chambres d'immobilisation n'ont pas la même épaisseur. On doit donc réaliser deux masques se complétant et correspondant chacun aux motifs d'épaisseur différente.

Le premier masque correspond à la couche fine de $3.3 \mu m$ qui permet de piéger les cellules. Le second masque correspond uniquement aux canaux d'approvisionnement, d'une hauteur de $100 \mu m$. Trois points sont à respecter pour la réalisation de fichiers CAD à l'origine de ces masques :

- des zones de recouvrement doivent exister entre les deux masques pour assurer la création d'un motif en résine continu (et donc s'assurer de la continuité des canaux) ;
- des motifs permettant d'aligner le second masque sur le moule après la première étape de lithographie doivent figurer sur les différents masques ;
- l'ensemble des contours doivent être fermés (nécessaire au processus d'impression).

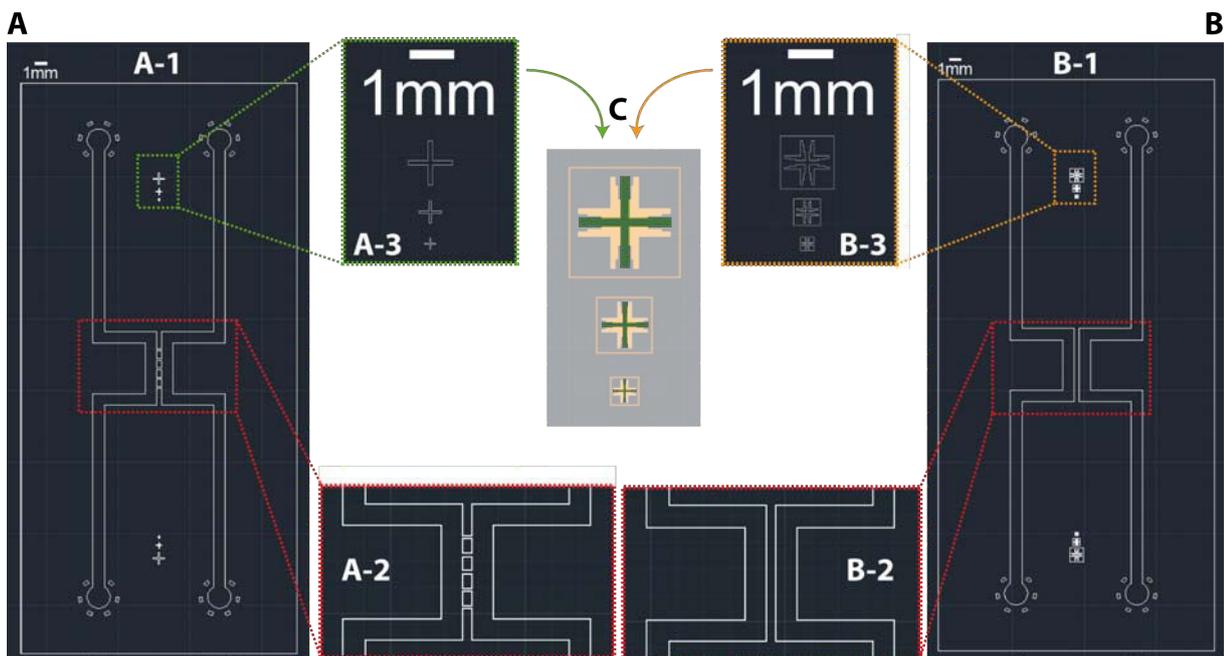


FIGURE 32 – Détail des fichiers CAD à l'origine des masques. A) Masque correspondant à la première couche. A1 : vue d'ensemble. A2 : détail des chambres de culture, placées à l'horizontal, perpendiculairement aux canaux d'approvisionnement. A3 : croix d'alignement n°1. B) Masque correspondant à la seconde couche. B1 : vue d'ensemble. B2 : détail au niveau des chambres de culture. Seuls les canaux d'approvements subsistent. B3 : croix d'alignement n°2. C) Alignement des croix n°2 sur les croix n°1.

Pour maximiser le recouvrement, on choisit de réaliser un premier masque contenant canaux d'approvisionnement et chambres d'immobilisation (figure 32 A1 & A2) sur lequel on superpose un second masque correspondant uniquement aux canaux d'approvisionnement (figure 32 B1 & B2).

Pour permettre l'alignement, on place des croix complémentaires sur ces deux masques (figure 32 A3 & B3). Les premières croix, qui ressortent après la première étape de lithographie, doivent être visibles à travers les secondes (figure 32 C).

Un exemple de transformation du fichier CAD en masque est proposé en figure 33. En bref, la polarité noir/transparent du masque est inversée à chaque fois qu'une ligne du fichier CAD est franchie (d'où la nécessité de créer un fichier CAD dont tous les contours sont fermés). On peut ensuite utiliser directement ce masque pour fabriquer le moule selon la technique de photolithographie de contact présentée précédemment (figure 30).

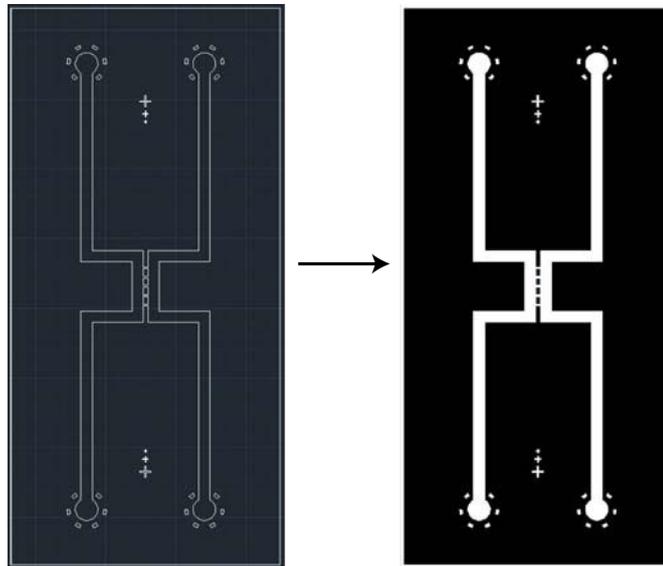


FIGURE 33 – Exemple de transformation d'un fichier CAD en masque polymère. À gauche : fichier CAD. À droite : masque polymère (noir : parties opaques - blanc : parties transparentes).

Réalisation du moule

Le moule est réalisé par lithographie à UV dans une salle dite "blanche". En effet, au vu de la taille des motifs créés, il est nécessaire de se placer dans un environnement sans aucune poussière. Notre moule possède des motifs de deux hauteurs différentes. Deux étapes successives de lithographie sont donc nécessaires à sa réalisation.

Première couche : chambres d'immobilisation

Lors de la première étape, on doit créer un motif de précisément $3.3 \mu m$ de haut correspondant aux chambres d'immobilisation (et aux canaux d'approvisionnement).

La création d'une couche uniforme de résine sur le wafer est réalisée à l'aide d'un spin-coater (*cf.* annexe C pour un protocole précis). L'adaptation de la vitesse de rotation du spin-coater permet d'obtenir une couche de la hauteur désirée (diminution de l'épaisseur avec la vitesse de rotation). Après avoir recouvert le wafer de résine, une première cuisson est effectuée pour évaporer le solvant et ainsi augmenter l'adhérence résine-substrat [400]. Typiquement, la température est

augmentée progressivement jusqu'à 95°C. Des températures trop élevées pourraient initier une réticulation non spécifique de la résine [406] tandis que des températures trop faibles conduisent à d'importantes contraintes dans la couche [407]. La résine SU-8 utilisée contient des groupes acides labiles et un générateur de photo-acidité. L'irradiation UV à travers le premier masque (figure 32 A) augmente localement la concentration en acide fort, qui catalyse le processus de réticulation. La cuisson ultérieure de la résine (95°C) active alors la réticulation, régénère le catalyseur et stabilise les régions exposées contre l'action des solvants, qui a lieu pendant la phase suivante de développement [400]. Le développement est réalisé en immergeant le wafer dans du 1-méthoxy-2-propyl acétate à température ambiante puis en le rinçant à l'isopropanol. Le wafer est finalement cuit à 200°C pour figer le motif révélé.

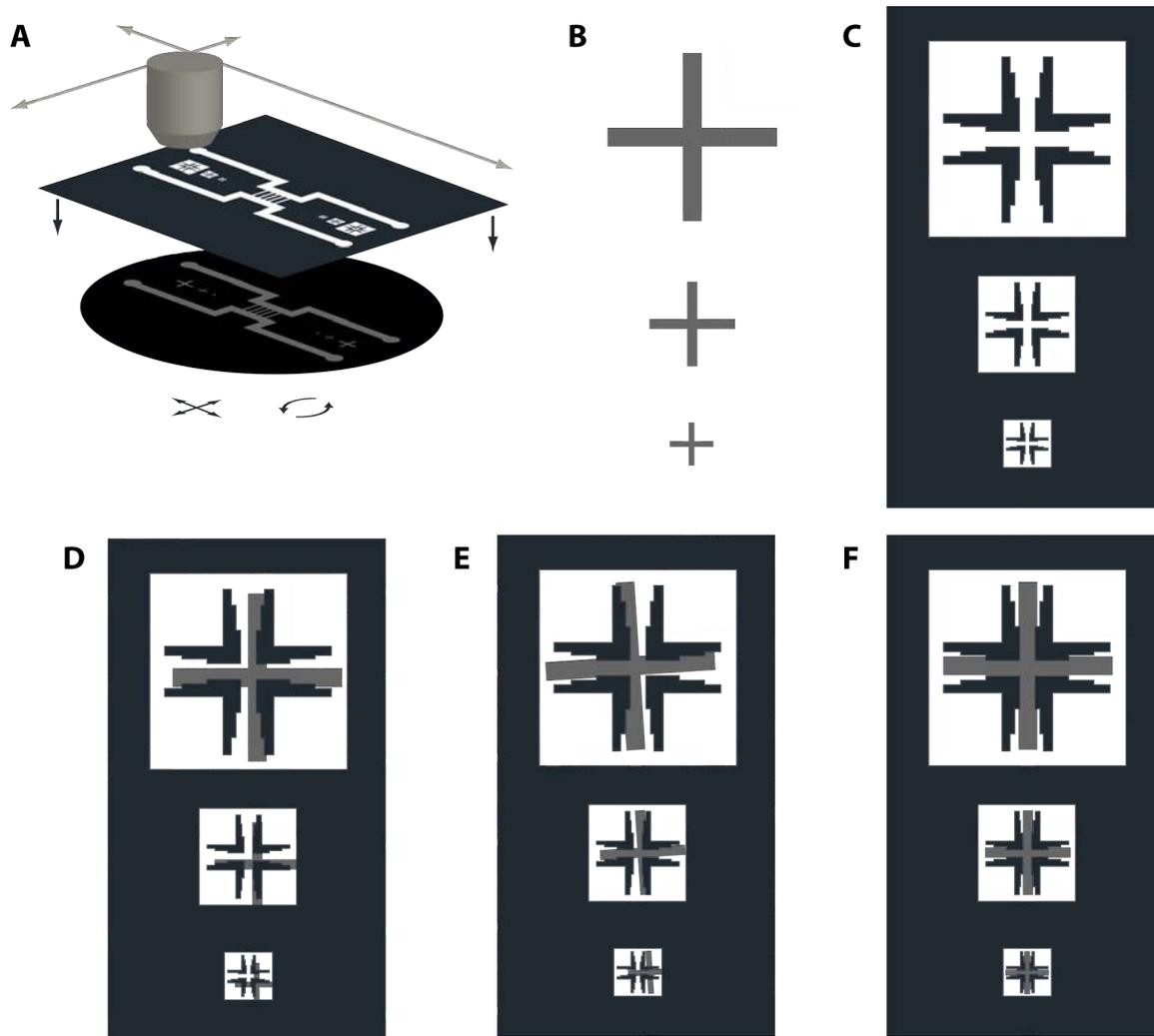


FIGURE 34 – Principe de l'alignement. A) Superposition du second masque (fixe) sur le wafer contenant un premier motif en résine (degré de liberté du wafer en translation et en rotation dans le plan grâce à l'aligneur de masque). Un objectif pouvant se déplacer surmonte le tout afin de pouvoir visualiser tour à tour les deux groupes de croix d'alignement sans bouger le wafer et le masque. B) Aperçu des croix d'alignement sur le wafer. C) Aperçu des croix d'alignement du masque. D) Masque et wafer à aligner par translation dans le plan. E) Masque et wafer à aligner par rotation dans le plan. F) Masque et wafer parfaitement alignés. Figure inspirée de [396].

Ce motif peut ensuite être analysé à l'aide d'un profilomètre à contact. Une pointe en diamant se déplace sur la surface du moule et reconstitue ainsi sa topographie. On peut alors vérifier que l'épaisseur des chambres d'immobilisation est bien celle souhaitée. Si ce n'est pas le cas, on recommence cette première étape de lithographie sur un nouveau wafer en adaptant la vitesse du spin-coater. Une fois que l'on a obtenu un motif de l'épaisseur voulu, on passe à la deuxième étape de lithographie.

Deuxième couche : canaux d'approvisionnement

Lors de cette deuxième étape, on doit créer un motif d'environ $100\ \mu\text{m}$ de haut correspondant aux canaux d'approvisionnement. Contrairement à la première couche, la hauteur n'est ici pas critique. En revanche, cette deuxième couche doit être parfaitement alignée avec la première pour que les canaux d'approvisionnement soient en contact avec les chambres d'immobilisation sans toutefois empiéter sur ces dernières.

Les étapes de spin-coating et de solidification sont répétées en adaptant les paramètres expérimentaux à une épaisseur de $100\ \mu\text{m}$ (*cf.* annexe C). Le second masque (figure 32 B) et le wafer sont ensuite placés sur un aligneur sans qu'ils soient en contact (figure 34 A) pour procéder à l'alignement du second masque avec le motif de la première couche du wafer. Le wafer est posé sur une platine qui se déplace en translation selon deux directions orthogonales et en rotation. Le masque est quant à lui immobile. Le wafer et le masque peuvent être observés simultanément par le dessus à l'aide d'un dispositif de microscopie qui permet de se déplacer d'une croix d'alignement à l'autre sans modifier la position de la platine (figure 34 A). De proche en proche, en se déplaçant d'une paire de croix à l'autre et en jouant sur la rotation (figure 34 E) et une des translations (figure 34 D) de la platine, on arrive ainsi à modifier la position du wafer pour l'aligner parfaitement avec le masque. Les croix sont alors dans la configuration décrite en figure 34 F. Après avoir mis le masque et le wafer en contact, on procède aux étapes d'illumination, de seconde cuisson, de développement, de cuisson finale et de vérification de la topographie décrites précédemment. Le moule est alors prêt à l'usage.

1.3.4 Réalisation des puces

Les puces sont créées au laboratoire à partir du moule selon la méthode de lithographie "molle" décrite précédemment (figure 24). Le PDMS est versé sur le moule (ratio élastomère : agent de réticulation de 10 : 1) et cuit 1h à 100°C . Il est ensuite découpé à l'aide d'un scalpel et démoulé pour être collé à une lamelle de verre. Afin de permettre au PDMS et à la lamelle de créer des liaisons covalentes et donc des canaux fermés, on les expose au nettoyeur plasma (Zepto, Diener Electronic, Allemagne - puissance 40, 0.5 bar, 1') avant de les mettre en contact. Le moule peut être utilisé pour créer des puces aussi longtemps qu'il n'est pas détérioré.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons un exemple de données acquises avec de telles puces et l'analyse quantitative qu'il est possible d'en faire.

Chapitre 2

Analyse quantitative des données de microscopie

Il y a 20 ans, Chalfie *et al.* utilisaient pour la première fois la protéine fluorescente verte (GFP) pour détecter l'expression de gènes et visualiser la localisation de protéines par microscopie optique [408]. Couplée à la microscopie time-lapse, la fusion d'une protéine de GFP à une protéine d'intérêt permet dès lors de suivre son évolution (quantité et localisation) *in vivo*, dans des conditions physiologiques et sans avoir besoin d'ajouter aucun substrat. Avec le développement de variants de la GFP [409] [410] [411] et de techniques de détection toujours plus précises [412] [413], l'imagerie *in vivo* de cellules est aujourd'hui devenue un outil très utilisé en biologie moléculaire, cellulaire et du développement [414].

Mais l'acquisition d'images de fluorescence de haute qualité n'est pas tout. Pour comprendre précisément les phénomènes biologiques sous-jacents à l'observation qualitative, une analyse quantitative des images obtenues est souvent nécessaire [415] [416].

Dans ce chapitre, je décrirai les méthodes d'analyse quantitative d'images développées et couramment utilisées au laboratoire. Je commencerai tout d'abord par présenter un exemple typique de données acquises en microscopie time-lapse dans la puce décrite précédemment (*cf.* chapitre 1, section 1.3, p.65) afin de pouvoir par la suite exposer les méthodes d'analyse sur un cas concret.

Sommaire

2.1	Exemple de données acquises en microscopie time-lapse dans notre puce microfluidique	76
2.2	Détection automatisée des contours d'intérêt	76
2.2.1	Détection des contours cellulaires	76
2.2.2	Détection des contours des agrégats	78
2.2.3	Détection des contours nucléaires	80
2.3	Suivi automatisé des cellules et des noyaux	81

2.1 Exemple de données acquises en microscopie time-lapse dans notre puce microfluidique

Rappelons que notre puce nous permet d’immobiliser et de suivre des cellules de levures sur une dizaine d’heure en contrôlant parfaitement leur environnement. Pour ce premier exemple, plaçons-nous dans un cadre simple, à température et milieu constant (38°C, milieu synthétique glucose) et suivons des constituants classiques de la cellule : son noyau et les agrégats protéiques liés à Hsp104.

Le noyau est marqué par la fusion d’une protéine fluorescente rouge à l’extrémité C-terminale des histones H2B (Htb2-mCherry, construction Miermont *et al.* [417]). Les agrégats sont marqués par la fusion d’une protéine fluorescence verte à l’extrémité C-terminale des protéines Hsp104 (Hsp104-GFP, construction invitrogen). Les images typiquement obtenues lors de l’observation en time-lapse (intervalle de temps 3 *min*, temps total 3*h*30) sont présentées en figure 35.

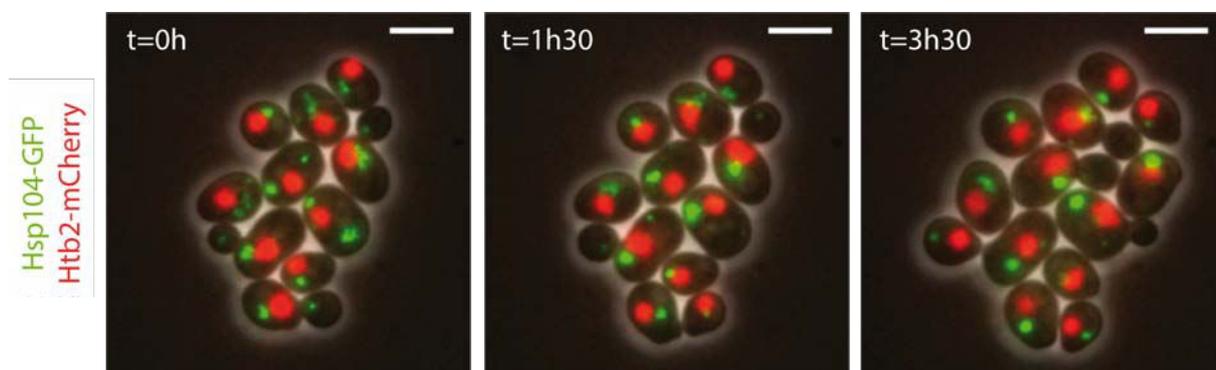


FIGURE 35 – Exemple de données acquises avec notre système microfluidique. Division des cellules selon le plan focal du microscope. Images en contraste de phase superposées avec deux canaux de fluorescence (vert : Hsp104-GFP , rouge : Htb2-mCherry). Barre d’échelle : 5 μm .

De telles images peuvent être analysées quantitativement selon la méthodologie décrite dans les sections suivantes de ce chapitre.

2.2 Détection automatisée des contours d’intérêt

Le premier niveau d’analyse consiste à détecter automatiquement les contours des éléments d’intérêt. Cela permettra par la suite de lier un contour à un autre dans le temps (pour suivre une cellule au cours du temps par exemple, *cf.* section 2.3, p.81), de quantifier les valeurs de fluorescence à l’intérieur d’un contour ou plus simplement de mesurer certaines grandeurs caractéristiques de l’élément (taille ou position d’une cellule ou d’un agrégat par exemple).

Dans cette section, je décrirai le principe des algorithmes de détection de contours dans le cas de cellules, d’agrégats et de noyaux. Ces algorithmes de détection de contours, ou segmentation, ont principalement été écrits par Gilles Charvin.

2.2.1 Détection des contours cellulaires

Intéressons-nous tout d’abord à la détection des contours des cellules. Nous imageons les cellules de levures en microscopie à contraste de phase [418] (figure 36 - image brute). Ceci permet d’obtenir des images dans lesquelles les contours cellulaires sont très contrastés (blanc

sur noir) [418]. Pour l'œil humain, il est donc facile d'identifier les cellules les unes des autres. En revanche, l'implémentation d'un algorithme permettant de détecter automatiquement les contours des cellules n'est pas immédiat.

Seuillage et segmentation par ligne de partage des eaux

En effet, un simple seuillage binaire crée un premier découpage des cellules mais ne permet pas de dissocier totalement les cellules les unes des autres au niveau des zones de contact (figure 36 A1 - flèches jaunes). En particulier, les cellules filles bourgeonnantes ne sont jamais séparées de leurs cellules mères (figure 36 A1 - flèche verte). Pour un meilleur découpage, une opération

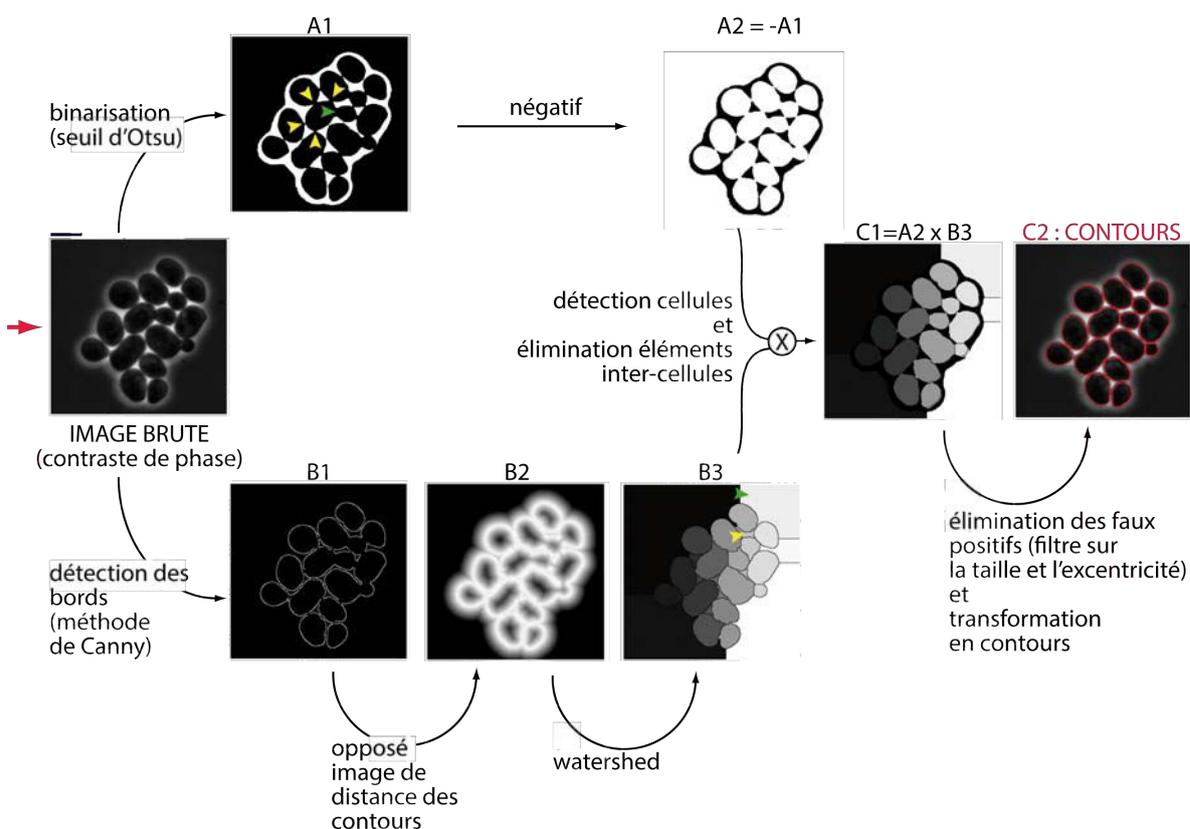


FIGURE 36 – Méthode de détection des contours cellulaires. Barre d'échelle (image brute) : $5 \mu m$. A) Opération de seuillage. A1 : image obtenue par application d'un seuil déterminé par la méthode d'Otsu (noir : pixel de valeur nulle, blanc : pixel de valeur 1). Flèches jaunes : exemple de cellules non dissociées aux zones de contact. Flèche verte : mère et fille non dissociées. A2 : opposé de A1. Première détection des cellules (découpage partiel). B) Opération de watershed. B1 : Détection des bords (blanc) par une méthode de Canny. B2 : opposé de l'image de distance de B1. B3 : découpage de B2 par watershed. Flèche jaune : détection d'un espace inter-cellulaire. Flèche verte : détection d'un élément à l'extérieur de l'amas cellulaire. C) Détection des contours. C1 : Détection précise des cellules (watershed) et élimination des éléments inter-cellules (masque binaire) par multiplication de A2 et B3. C2 : contours obtenus (rouge) superposés à l'image brute de contraste de phase.

classique utilisée en analyse d'image consiste à opérer une segmentation par ligne de partage des eaux (watershed) [419]. Le principe est le suivant : une image en niveaux de gris est interprétée

comme un relief topographique. Des sources d'eau sont placées dans chaque cuvette (minimum local) de ce relief et les remplissent peu à peu. Un contour est assigné quand deux sources d'eau se rencontrent. Appliquée à notre problème, cette technique permet un découpage correct, mais génère également des contours ne correspondant à aucune cellule dans les espaces inter-cellulaires (figure 36 B3 - flèche jaune) ou à l'extérieur de l'amas de cellules (figure 36 B3 - flèche verte). Aucune de ces deux techniques classiques ne permet donc une détection immédiate des contours cellulaires.

Adaptation à la détection des cellules de levure

Cependant, l'association d'une opération de seuillage binaire et d'une opération de watershed donne, elle, un résultat satisfaisant (figure 36 C2). La méthode retenue est donc la suivante.

D'une part, l'image brute est binarisée selon un seuil obtenu par la méthode d'Otsu¹³ [420]. Tous les pixels au-dessus du seuil se voient attribuer une valeur égale à 1 (figure 36 A1 - pixels blancs), tous les pixels en-dessous une valeur égale à 0 (figure 36 A1 - pixels noirs). On prend ensuite l'opposé de cette image afin que les cellules correspondent à une valeur non nulle et les espaces inter-cellulaires à une valeur nulle (figure 36 A2).

D'autre part, les contours de l'image brute sont détectés par la méthode de Canny [421]. L'image obtenue est de valeur nulle en tout point, sauf en ceux correspondant aux contours où elle prend la valeur 1 (figure 36 B1). À partir de cette image, on calcule une image de distance : la valeur de chaque pixel correspond à la distance au pixel non nul (et donc appartenant au contour) le plus proche. L'opposé de cette image (figure 36 B2) sert à initialiser l'opération de watershed, qui permet un découpage idoine des cellules (figure 36 B3).

La multiplication des images obtenues par les deux méthodes (figure 36 C1) permet alors à la fois de découper correctement les cellules (watershed) et d'éliminer les faux positifs correspondant aux espaces inter-cellulaires, à l'extérieur de l'amas de cellules (seuillage d'Otsu). Une dernière opération de filtrage des faux positifs restants conduit à la segmentation présentée en figure 36 C2. Ce filtrage est effectué grâce à une opération morphologique d'élimination des petites structures et la suppression des éléments ayant une aire ou une excentricité aberrantes (aire supérieure à $130 \mu m^2$ ou inférieure à $0.06 \mu m^2$ et excentricité supérieure¹⁴ à 0.9).

Cette méthode de segmentation présente l'avantage de ne comporter aucun paramètre à adapter en fonction de l'image de contraste de phase obtenue. En effet, les seuls paramètres libres (excentricité maximale et aires minimale et maximale des cellules) ont été ajustés sur des images tests et sont désormais fixés, indépendamment de l'expérience ou du point de temps.

2.2.2 Détection des contours des agrégats

Les agrégats protéiques liés à Hsp104 imagés en microscopie de fluorescence (protéine de fusion Hsp104-GFP) peuvent également être détectés automatiquement (figure 37 A et C). Tout comme pour les cellules, la reconnaissance de leurs contours ne peut s'effectuer par un simple seuillage. En effet, la méthode de segmentation doit permettre d'isoler des agrégats de taille et d'intensité très diverses (figure 37 A, flèches jaunes). De plus, le niveau du bruit cytoplasmique n'est pas uniforme dans la cellule, notamment du fait de l'intégration du signal selon la direction d'observation (figure 38 A1).

13. Brièvement, le seuil optimal est sélectionné de façon à ce que les histogrammes des pixels de l'image en niveau de gris résultant des deux groupes de binarisation soient séparés au mieux.

14. L'excentricité varie continument de 0 pour un cercle à 1 pour une parabole, toutes les valeurs intermédiaires correspondant à des ellipses de plus en plus oblongues.

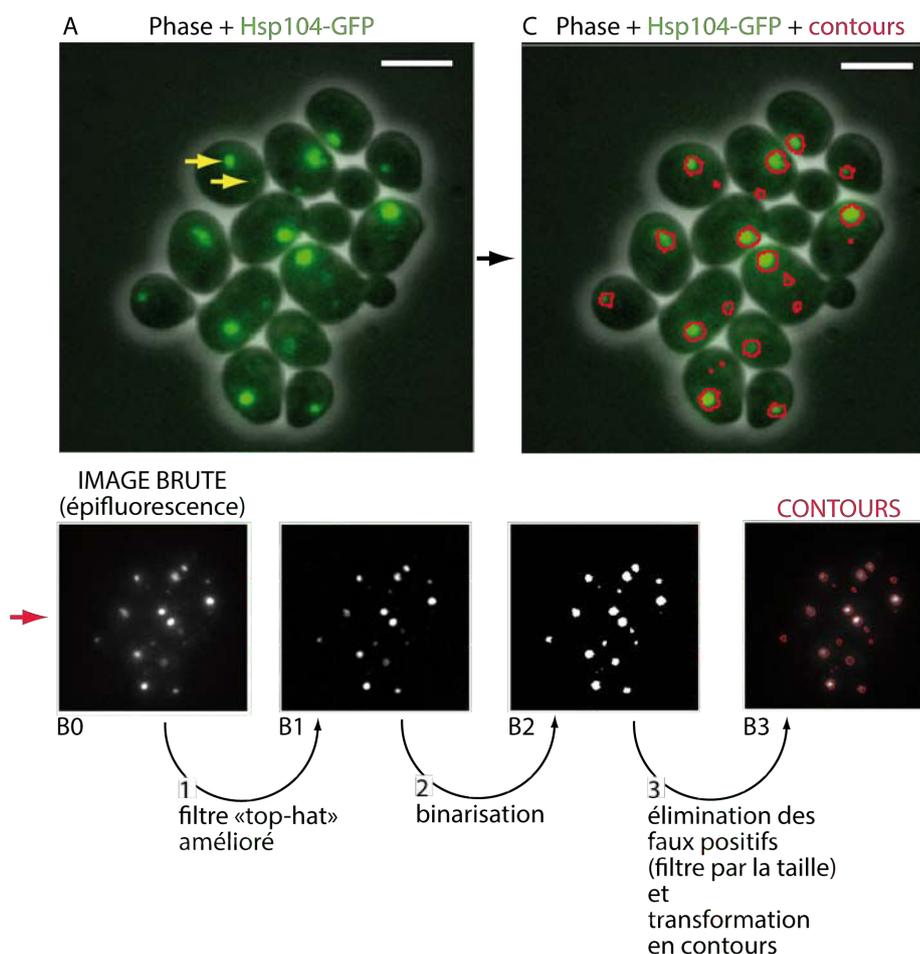


FIGURE 37 – Méthode de détection des contours des agrégats. A) Superposition des canaux de contraste de phase et de fluorescence Hsp104-GFP (vert). Flèches jaunes : agrégats de taille et d'intensité très différentes. B) Détection des contours. Image brute (B0) débruitée (B1) et seuillée (B2) afin d'obtenir les contours des agrégats (B3). C) Superposition des contours obtenus (en rouge) et de A. Barres d'échelles : $5 \mu m$.

Élimination du bruit de fond par un filtre "top-hat"

Pour illustrer ce propos, un profil typique du signal de fluorescence est présenté en figure 38 A1. Le signal cytoplasmique augmente de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (aspect bombé de la courbe). Les deux agrégats représentés sont facilement détectables à l'œil comme des "bosses". Cependant, ils ne peuvent pas être détectés automatiquement par un seuil. Soit le seuil est trop élevé pour prendre en compte l'agrégat de gauche (seuil rouge - figure 38 A2), soit le seuil est trop faible pour couper les deux agrégats (seuil vert - figure 38 A3). Une méthode classique d'analyse d'image consiste à détecter le bruit de fond (figure 38 B2) puis à le soustraire de l'image initiale (figure 38 B3). Un simple seuillage peut alors être appliqué pour reconnaître les agrégats. Cette opération est appelée filtre "top-hat" [422].

Filtre "top-hat" amélioré adapté pour la détection des agrégats

Classiquement, la détection du bruit de fond dans un filtre "top-hat" s'opère par une simple

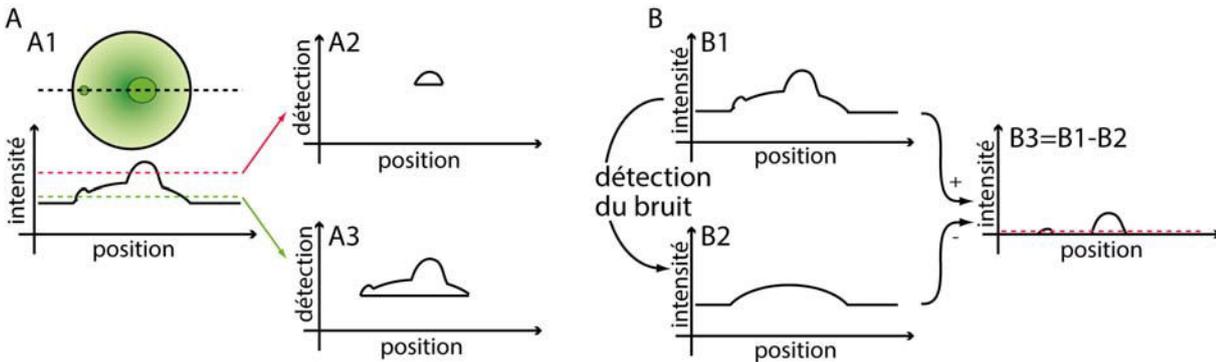


FIGURE 38 – Principe du filtre "top-hat". A) Seuillage binaire. A1 : profil typique de fluorescence coupant une cellule et deux agrégats (profil selon la ligne pointillée noire). A2 et A3 : éléments détectés par un seuillage au niveau des lignes pointillées rouge et verte. B) Filtre "top-hat". B1 : voir A1. B2 : détection du bruit de fond de B1. B3 : application du filtre (B1-B2). Agrégats détectables par seuillage binaire (ligne rouge pointillée) de l'image filtrée.

ouverture morphologique¹⁵ de l'image à l'aide d'un élément structurant circulaire. Dans notre cas, un filtre classique ne suffit pas. En effet, certains agrégats sont éloignés d'une distance inférieure à leur taille et un tel filtre ne permet alors pas de les séparer. Nous utilisons donc un filtre amélioré, développé par Kimori *et al.* [424]. Ce filtre consiste à faire tourner l'image brute dans toutes les directions puis à opérer une ouverture morphologique sur chaque image tournée à l'aide d'un élément structurant linéaire très fin (finesse de l'ordre de la taille d'un agrégat). La projection maximale des images tournées est ensuite soustraite à l'image originale. Combiner la rotation des images et l'utilisation d'un élément structurant linéaire permet de soustraire le bruit tout en préservant une bonne résolution (figure 37 B1).

Après l'application de ce filtre "top-hat" amélioré, l'image débruitée est binarisée selon un seuil fixe (optimisé sur des images test pour obtenir le moins de faux positifs et négatifs possibles, figure 37 B2). Les contours de l'image binaire sont ensuite détectés et un filtre sur l'aire des éléments est appliqué pour éliminer les faux positifs restants (aire supérieure à $6 \mu m^2$ ou inférieure à $0.006 \mu m^2$, figure 37 B3). Les contours ainsi obtenus sont présentés en figure 37 C.

2.2.3 Détection des contours nucléaires

Nous détectons aussi automatiquement le noyau, par exemple pour visualiser le compartiment péri-nucléaire JUNQ [13] ou repérer l'anaphase¹⁶ (et donc la progression dans le cycle cellulaire). Les noyaux sont imagés en microscopie de fluorescence (protéine de fusion Htb2-mCh - figure 39 A). Comme pour les contours cellulaires, la détection des contours nucléaires est basée sur la combinaison d'un seuillage et d'un watershed.

Un filtre "top-hat" classique (*cf.* section 2.2.2) est appliqué à l'image brute (figure 39 B1) afin de s'abstraire du bruit de fond. Un seuillage binaire est ensuite opéré sur l'image débruitée pour détecter les contours nucléaires (figure 39 B2). D'autre part, l'image de distance de l'image binaire (figure 39 B2 bis) permet d'initier une opération de watershed (*cf.* section 2.2.1) afin de découper les noyaux proches ou en anaphase (figure 39 B2 ter). Un exemple de noyau en anaphase découpé par l'opération de watershed est présenté en figure 39 C. La multiplication

15. Érosion de l'image suivie d'une dilatation : *cf.* [423] pour plus de détails sur cette opération.

16. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'anaphase se traduit par la séparation du noyau en deux entités distinctes et peut ainsi être détectée automatiquement.

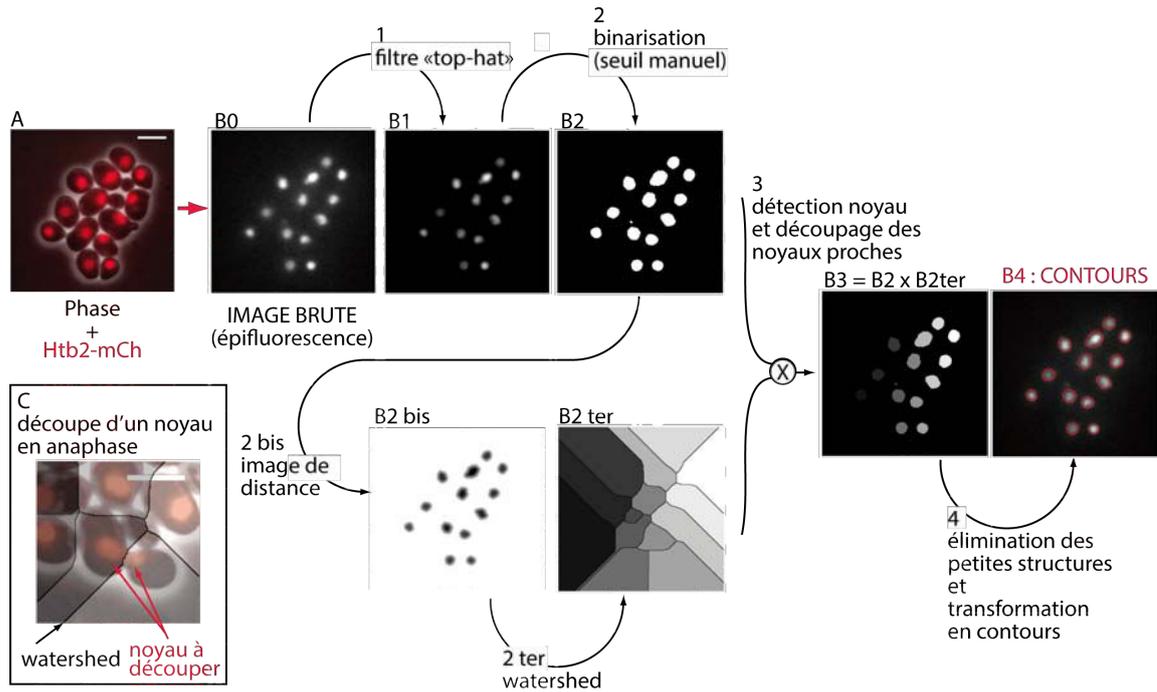


FIGURE 39 – Méthode de détection des contours nucléaires. A) Superposition des canaux de contraste de phase et de fluorescence Htb2-mCh (rouge). B) Détection des contours. Image brute (B0) débruitée (B1) puis seuillée (B2) : détection des noyaux. Image de distance de B2 (B2bis) utilisée pour initialiser un watershed (B2ter) : coupure des noyaux proches. Combinaison de B2 et B2ter (B3) : détection fidèle des contours (B4 - en rouge). C) Zoom sur un exemple de découpage de noyau en anaphase. Barres d'échelles : $5 \mu m$.

de l'image seuillée et du watershed permet une détection fidèle des noyaux et la séparation de noyaux proches ou en anaphase (figure 39 B3). Les contours obtenus sont présentés en figure 39 B4.

Dans cette section, j'ai présenté les méthodes de détection automatique des contours cellulaires, nucléaires et des agrégats sur une image donnée (figure 40 A). Pour un point de temps fixé, nous sommes donc capables de récapituler automatiquement la forme et la position des cellules, des agrégats et des noyaux (figure 40 B).

Dans la section suivante, nous considérerons une suite d'images acquises en microscopie time-lapse et décrirons comment lier automatiquement deux contours correspondant à la même entité au cours du temps pour pouvoir suivre quantitativement la dynamique de l'entité d'intérêt.

2.3 Suivi automatisé des cellules et des noyaux

Le cadre considéré est le suivant : nous disposons d'une suite d'images acquises en microscopie time-lapse pour lesquelles les contours d'intérêt (cellules et noyaux) ont été détectés. On souhaite désormais suivre un élément d'intérêt au cours du temps pour pouvoir en analyser la dynamique. Différents algorithmes de suivi ont été développés par le passé [425]. En bref, trois grandes catégories d'approches existent. La première approche consiste à chercher la meilleure association possible entre les contours de deux points de temps successifs. La seconde approche consiste

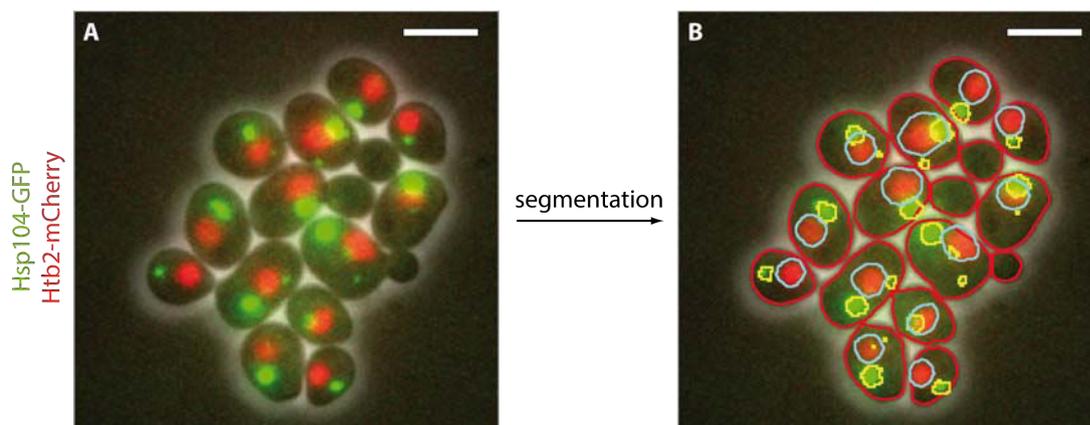


FIGURE 40 – Exemple de détection de différents contours sur une même image. A) Superposition d'images en contraste de phase et épifluorescence (rouge : Htb2-mCh, vert : Hsp104-GFP). B) Superposition des détections automatiques de contours présentées dans la section et de A. Contours rouges : cellules, jaunes : agrégats, bleus : noyaux. Barre d'échelle : $5 \mu\text{m}$.

à considérer plus de deux points de temps successifs pour l'optimisation de l'association des contours et donc notamment les traces des positions des contours au cours du temps. Enfin, la dernière approche consiste à modéliser le mouvement des éléments d'intérêt et à comparer les prévisions du modèle aux données expérimentales.

Méthode hongroise d'affectation des contours

Au laboratoire, nous utilisons une méthode d'affectation des contours issue de la première approche : l'algorithme hongrois, ou algorithme de Kuhn–Munkres [426]. Il s'agit donc d'associer les contours $c(t)$ d'un point de temps donné à ceux $c(t - 1)$ du point de temps précédent (figure 41 A). La question est ramenée au problème classique d'association : un coût d'association A_{ij} est calculé pour la formation de chaque couple $(c_i(t - 1), c_j(t))$ (figure 41 B). On cherche ensuite à retenir les couples permettant de minimiser le coût total d'association (somme des coûts A_{ij} correspondant aux couples choisis).

Une façon brutale de procéder serait de considérer toutes les combinaisons possibles de couples et de calculer le coût total d'association pour chacune d'entre elles, puis de choisir la combinaison correspondant au coût total le plus bas. Cependant, le temps d'une telle opération augmente exponentiellement avec le nombre n de couples, soit en $\mathcal{O}(n!)$. Si l'on considère une centaine de cellules par image et un temps par opération d'un milliardième de seconde, il faudrait de l'ordre de 10^{34} secondes pour résoudre le problème (soit un milliard de milliard d'années).

Une solution polynomiale au problème d'affectation a été proposée en 1955 par Harold Kuhn [426], qui l'a baptisée "algorithme hongrois". La matrice de coût A donnée, le choix des n couples minimisant le coût total d'association est désormais calculable en $\mathcal{O}(n^3)$ [427]¹⁷, soit dans notre cas en quelques millièmes de seconde. C'est donc cette méthode que nous utilisons pour associer les contours (figure 41 C).

17. Grâce aux améliorations successives apportées à l'algorithme original de Kuhn [426] par Munkres [428] puis Edmonds et Karp [427].

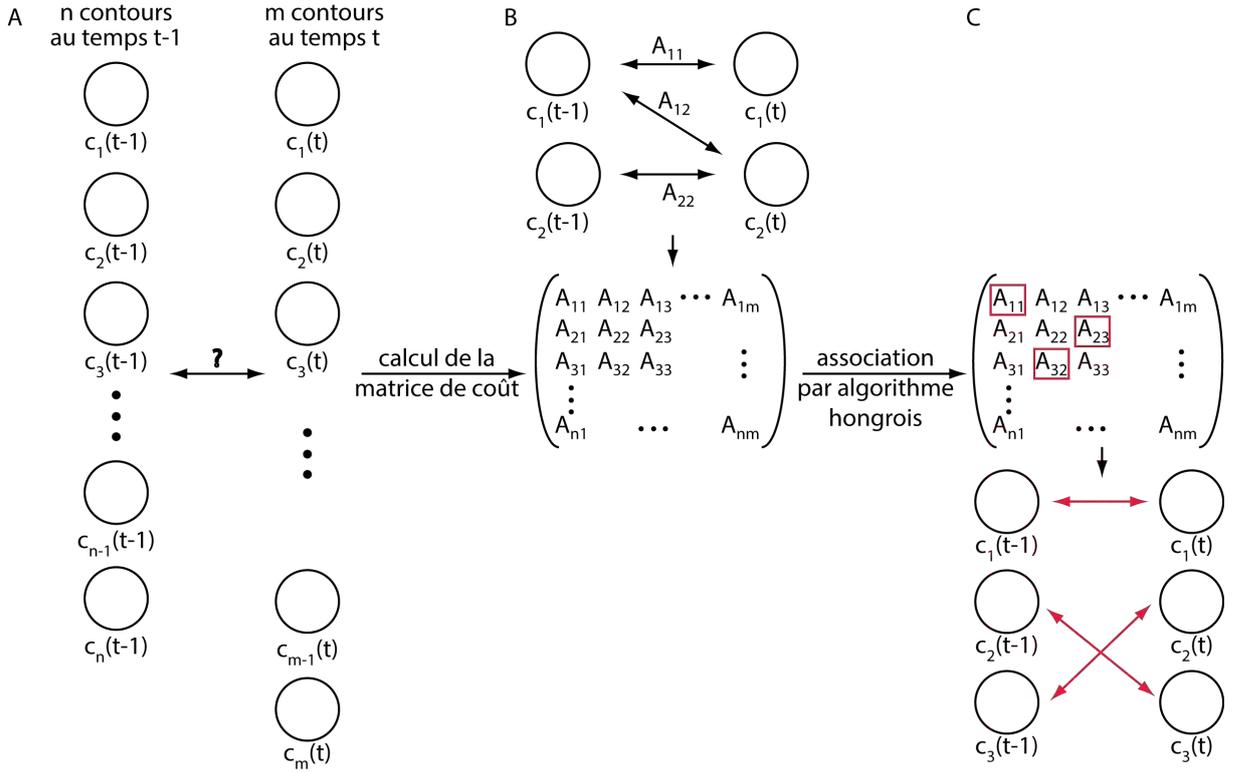


FIGURE 41 – Principe de la méthode d'affectation des contours. A) Problème d'association : n contours présents à l'instant $t-1$ sont à associer aux m contours de l'instant t . B) Calcul du coût d'association de chaque couple et construction de la matrice de coût A . C) Choix des couples à sélectionner par la méthode hongroise.

Calcul de la matrice de coût

Avant d'implémenter l'algorithme hongrois, il faut déterminer la matrice de coût associée aux contours. Dans notre cas, la méthode hongroise est appliquée pour associer deux contours correspondant à une même cellule (ou noyau) au cours du temps. Les cellules de levures sont coincées dans la puce et se déplacent donc peu dans l'intervalle de temps considéré (3 minutes). Typiquement, leur déplacement maximal (du à la croissance de l'amas cellulaire) est de l'ordre du dixième de micron au micron et donc inférieure à la taille de la cellule. En revanche, leur taille évolue au cours du temps et de nouvelles cellules apparaissent tandis que d'autres disparaissent (mort). Pour associer deux contours, la distance les séparant doit donc être pénalisée alors que leur variation de taille ne doit pas l'être. Le coût A_{ij} associé à la formation d'un couple $(c_i(t-1), c_j(t))$ entre le contour i au temps $t-1$ et le contour j au temps consécutif t a ainsi été fixé comme la distance aux centres $C_i(t-1)$ et $C_j(t)$ des contours :

$$A_{ij} = \|\overrightarrow{C_i(t-1)C_j(t)}\| \quad (2.1)$$

De plus, si les centres de deux cellules (ou noyaux) sont éloignés de plus de $3.2 \mu\text{m}$, le coût est considéré comme infini.

Notre méthode de calcul de coût est donc élémentaire¹⁸, mais elle suffit à suivre les cellules

18. Une méthode plus raffinée pourrait par exemple consister à utiliser à la fois la distance entre cellules et leur différence d'aires $a_i(t-1) - a_j(t)$, en associant des poids différents à chaque paramètre.

ou les noyaux au cours du temps. Pratiquement, un numéro unique est associé à chaque contour correspondant à une même cellule ou un même noyau sur les différentes images se succédant. Une cellule nouvellement apparue se voit attribuer un nouveau numéro. Le résultat de l'association des cellules et des noyaux des données introduites en début de chapitre (figure 35) est présenté en figure 42.

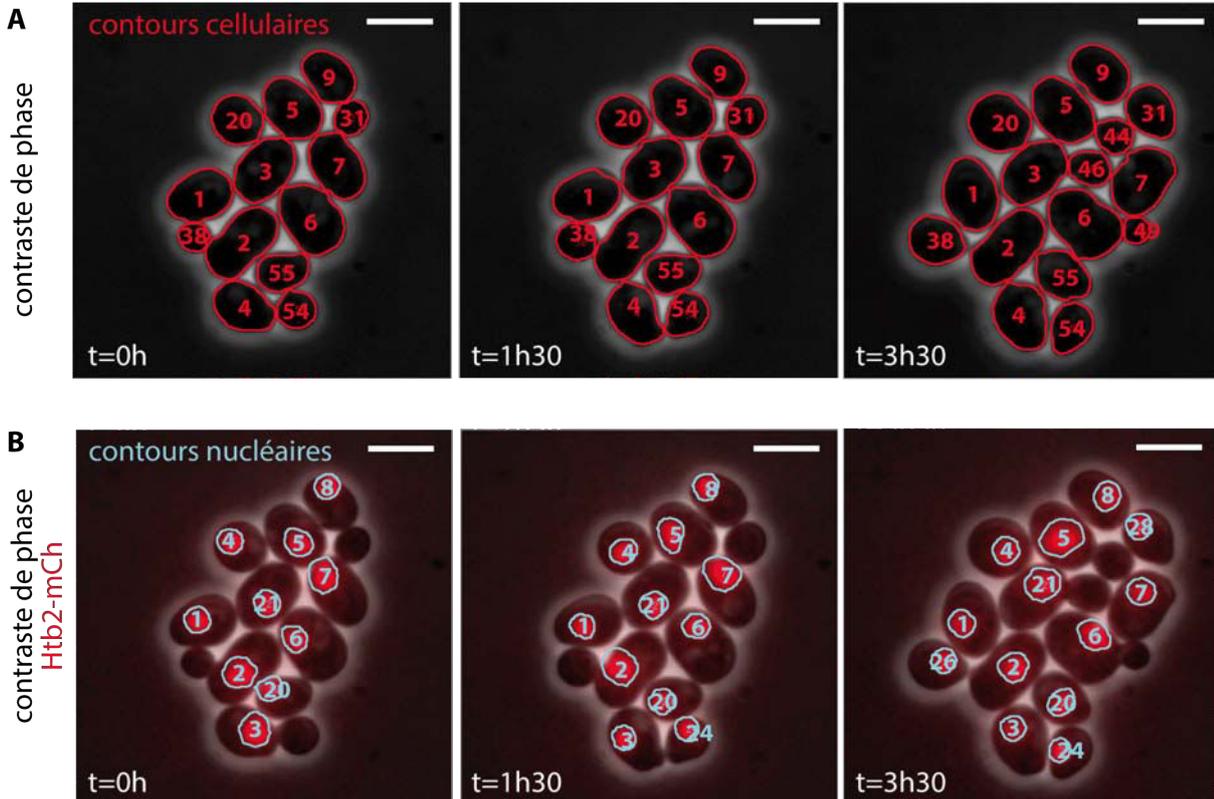


FIGURE 42 – Association des contours cellulaires et nucléaires au cours d'un time-lapse typique ($\Delta t = 3 \text{ min}$, $t_{tot} = 3h30$). Les numéros affectés aux contours les entourant montrent l'efficacité du suivi des cellules et des noyaux. A) Superposition des images en contraste de phase et des contours/numérotations cellulaires (rouge). B) Superposition des images en contraste de phase, du marquage nucléaire Htb2-mCh (rouge) et des contours/numérotations nucléaires (bleu). Barre d'échelle : $5 \mu\text{m}$.

Le même type de suivi peut-être implémenté pour les gros agrégats protéiques. En revanche, l'évolution des petits agrégats est trop rapide pour pouvoir les suivre à la résolution temporelle adoptée (intervalle de temps de 3 min).

Dès lors, il est possible de suivre quantitativement l'évolution de signaux de fluorescence au sein d'une même cellule ou les grandeurs caractéristiques de l'élément associé à un contour donné. Au laboratoire, nous suivons classiquement l'aire des cellules et des noyaux pour évaluer le taux de croissance ou le temps de division, le centre de masse des différents éléments pour analyser leur mouvement et le niveau de fluorescence pour étudier sa dynamique d'évolution au cours de l'expérience.

L'analyse quantitative des données est effectuée au sein de phyloCell, un logiciel libre développé en MATLAB par Andrei Ungureanu et Gilles Charvin. Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'amélioration du code source et au développement de nouveaux modules. Grâce à cet outil et

au dispositif présenté dans le chapitre suivant, nous avons notamment pu étudier la formation et la ségrégation des agrégats protéiques induits lors d'un choc thermique.

Chapitre 3

Dispositif permettant l'étude de la dynamique d'agrégation protéique *in vivo* en temps réel après un choc thermique

Lors de cette thèse, mon premier objectif a été de développer un système permettant d'observer des agrégats protéiques *in vivo* dans des conditions physiologiques. En effet, dans les études précédentes, les stratégies utilisées pour déstabiliser la conformation des protéines et promouvoir la formation d'agrégats (mutation du protéasome [13] [14] ou choc thermique sévère suivi d'une période de récupération [10] [12]) affectent potentiellement l'interprétation des résultats (*cf.* section I- chapitre 3). Afin de s'abstraire des limitations des méthodologies précédentes, j'ai développé une nouvelle stratégie permettant de suivre la formation et le mouvement des agrégats protéiques liés à Hsp104 en temps réel dans des cellules uniques se divisant.

Dans ce chapitre, je décrirai le montage expérimental ainsi que les étalonnages effectués dans le but de valider cette nouvelle méthodologie. En particulier, j'exposerai la batterie de tests que j'ai opérés afin de trouver une plage de température permettant d'induire l'agrégation protéique sans affecter la division cellulaire. Enfin, je montrerai l'efficacité du principe de cette nouvelle méthodologie en suivant de la cinétique d'induction des agrégats protéiques liés à Hsp104 au cours d'un choc thermique.

Sommaire

3.1	Mise au point du dispositif expérimental	88
3.1.1	Description du dispositif expérimental	88
3.1.2	Étalonnage de la température	89
3.1.3	Dynamique des changements de température dans la puce	90
3.1.4	Maintien de la mise au point	90
3.1.5	Optimisation de la température de formation des agrégats protéiques	91
3.2	Preuve de principe : cinétique d'induction des agrégats liés à Hsp104 au cours d'un choc thermique	95
3.2.1	Cinétique d'induction de l'agrégation au cours d'un choc de 30°C à 38°C	95
3.2.2	Contrôle de l'absence d'induction à 30°C	96
3.2.3	La cinétique d'agrégation dépend de la température du choc	98

3.1 Mise au point du dispositif expérimental

3.1.1 Description du dispositif expérimental

Pour suivre les cellules au cours du temps, l'approche classique du laboratoire consiste à utiliser un microscope inversé à épifluorescence automatisé et associé à un système microfluidique. Ici, les cellules se divisent et sont immobilisées au sein du dispositif microfluidique présenté dans le détail précédemment (*cf.* section II-1.3) et reproduit en figure 43 A. En bref, une couche unique de cellules peut-être imagée en microscopie de contraste de phase et de fluorescence sur jusqu'à 9 générations (*cf.* article présenté en partie III pour les détails techniques). Un flux constant de milieu nourrit les cellules au cours de l'expérience (figure 43 A et B, flèches bleues).

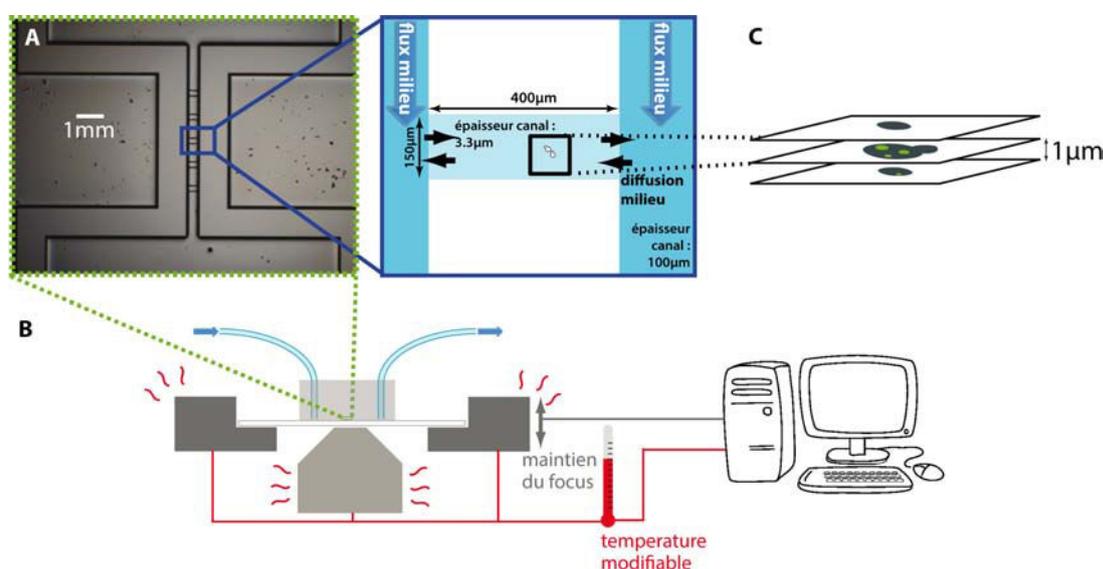


FIGURE 43 – Montage expérimental. A) Puce microfluidique développée afin de cultiver sous le microscope des cellules uniques sur une seule couche et de les suivre sur jusqu'à 9 générations. Gauche : image en contraste de phase, grossissement 10X. Droite : schéma d'une chambre d'immobilisation. B) Schéma du dispositif créé afin de procéder à des chocs thermiques automatisés *in situ*. Dispositif classique du laboratoire couplé à une platine et une bague d'objectif chauffantes fait maison ainsi qu'à un système de maintien de la mise au point. C) Cellules imagées au sein du système avec un microscope à épifluorescence standard automatisé avec acquisition de fluorescence selon 3 plans.

Parallèlement à l'utilisation des systèmes microfluidique et d'imagerie, un dispositif permettant de contrôler et de modifier précisément la température au sein de l'échantillon a du être développé par mes soins. Il s'appuie sur l'utilisation d'une platine chauffante et d'une bague d'objectif chauffante fabriquées durant cette thèse en collaboration avec l'atelier mécanique de l'IGBMC. Grâce à ce système, on peut appliquer des chocs thermiques *in situ* à la température désirée de manière automatisée (*cf.* section 3.1.2).

Les changements de températures étant associés à une dérive importante de l'échantillon par rapport au plan focal, une stratégie particulière a également été développée pour maintenir la mise au point, en particulier au cours du choc thermique (*cf.* section 3.1.4).

3.1.2 Étalonnage de la température

Afin de maîtriser précisément la température au sein de la puce et de procéder à des chocs thermiques contrôlés, le premier test mis en place consistait à évaluer la différence entre la température imposée à la platine et à l'objectif et celle effectivement ressentie par les cellules. Pour cela, j'ai introduit au sein de la puce microfluidique une sonde de température millimétrique qui mesurait la température efficace de l'échantillon (figure 44 A et B). Sur une large gamme de températures de consigne testées (30°C à 45°C - figure 44 B), les températures de la platine (courbe bleue) et de l'objectif (courbe verte) sont strictement égales à la température requise (courbe noire). En revanche, la température de l'échantillon (courbe rouge) est systématiquement inférieure de 0.5°C à la consigne. Ainsi, la température effective ressentie par les cellules se déduit facilement de la température de consigne en appliquant une correction constante de -0.5°C .

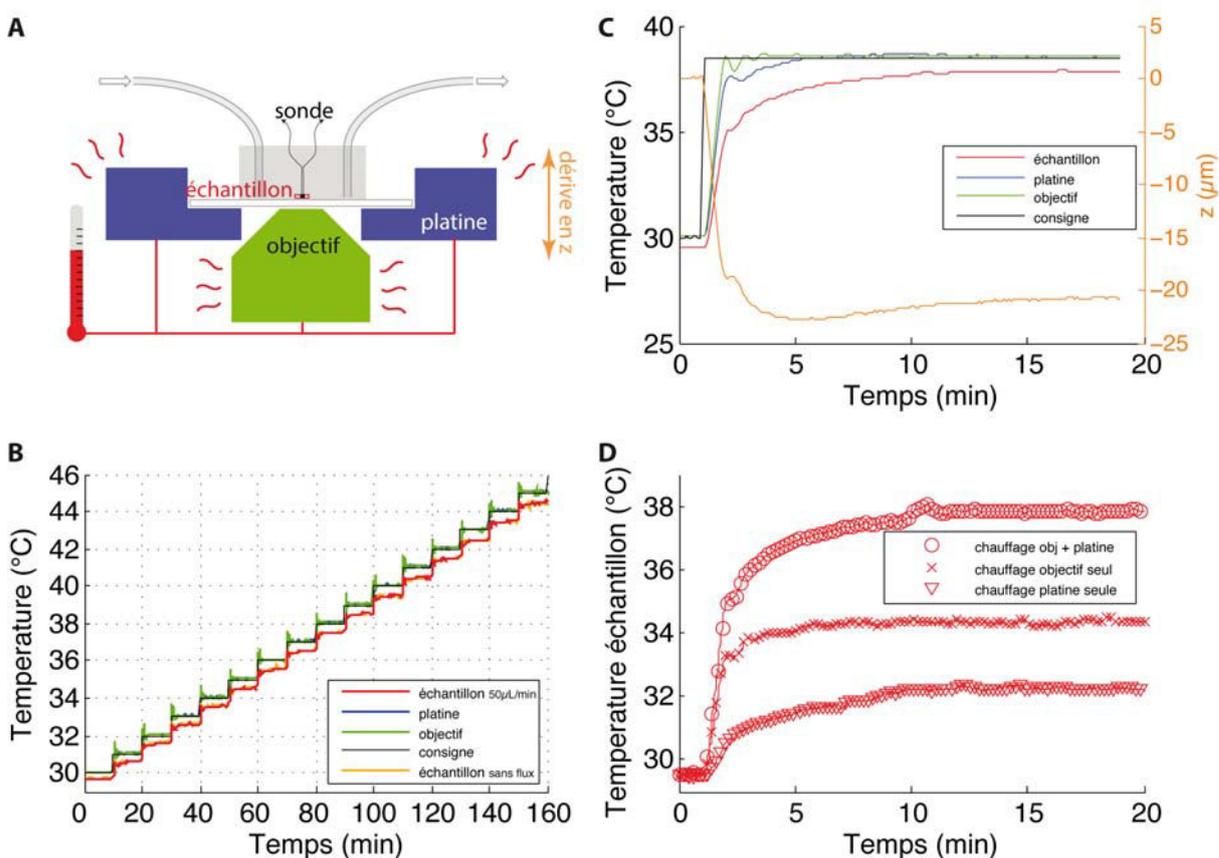


FIGURE 44 – Étalonage de la température. A) Schéma du dispositif couplant microscopie, microfluidique, contrôle de la température et correction de la mise au point. Les couleurs des éléments correspondent à celles de leurs courbes de température. B) Température des différents éléments sur une large gamme de température de consigne (pas de 1°C toutes les 10 minutes). C) Réponse en température et dérive en z de la platine lors d'un choc thermique typique de 30°C à 38°C . D) Température de l'échantillon en fonction du mode de chauffage (platine seule, objectif seul ou combinaison platine et objectif).

Au sein du dispositif microfluidique, le volume de la chambre est entièrement renouvelé par du milieu nutritif plus de 10 fois par seconde. J'ai donc également testé que la température de l'échantillon ne dépendait pas du flux de milieu en répétant l'expérience de mesure (figure 44 B) avec (courbe rouge) et sans (courbe orange) flux. Les deux courbes se superposent parfaitement, le flux n'a donc pas d'influence sur la température effective de l'échantillon.

Enfin, on peut se demander si le système de chauffage peut être réduit à la platine ou à l'objectif. La mesure de température au niveau de l'échantillon a donc été répétée (figure 44 D) pour un choc typique de 30°C à 38°C en chauffant uniquement la platine (∇), uniquement l'objectif (\times) ou l'ensemble platine et objectif (\circ). Malgré une température de consigne de 38.5°C la température de l'échantillon stagne à 32°C si seule la platine chauffe (∇) et à 34°C si seul l'objectif chauffe (\times). Les pertes thermiques au niveau de la platine et de l'objectif ne sont donc pas compensées en absence de chauffage. Il est nécessaire de chauffer les deux éléments pour atteindre la température désirée au niveau de l'échantillon (\circ).

En chauffant l'objectif et la platine, nous pouvons donc contrôler précisément la température ressentie par les cellules au sein de notre système, et ce sur une plage de température classiquement utilisée pour des chocs thermiques chez la levure, quelque soit le flux imposé.

3.1.3 Dynamique des changements de température dans la puce microfluidique

Nous verons en section 3.1.5 que les cellules sont classiquement soumises à un choc de 30°C à 38°C. Afin d'évaluer la cinétique de changement de température au sein de la puce lors d'un tel choc, les températures de l'échantillon, de la platine et de l'objectif ont été mesurées au cours du temps après une transition brutale de la température de consigne (30 à 38°C figure 44 C). L'objectif atteint la valeur de consigne en moins de 3 minutes (courbe verte) et la platine en moins de 5 minutes (courbe bleue) alors qu'il faut environ 10 minutes à l'échantillon (courbe rouge) pour parvenir à l'équilibre thermique (avec cependant un temps à mi-hauteur de seulement 50 secondes).

Ces temps d'équilibrage thermique auraient bien sûr pu être améliorés par un développement plus poussé de la platine et de la bague chauffante de l'objectif. Cependant, la cinétique du système est déjà assez rapide devant le cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* (90 minutes) pour assurer des chocs thermiques fiables sur des cellules uniques se divisant.

3.1.4 Maintien de la mise au point

Lors d'une modification de température, les différents éléments du microscope et de la platine se dilatent spécifiquement. Lorsque les changements de température sont rapides, ce phénomène présente d'importantes implications du point de vue du maintien de la mise au point. Ainsi, en maintenant la distance entre l'objectif et la puce constante grâce au système commercial de Definite Focus (Zeiss) lors d'un choc thermique soudain de 30°C à 38°C, on mesure une dérive du plan focal de 23 micromètres (figure 44 C, courbe orange). Il est donc nécessaire de corriger la mise au point si l'on souhaite suivre les cellules au cours d'un choc thermique.

Le système de Definite Focus permet de corriger la dérive du plan focal sur de grandes amplitudes (dizaines de microns) uniquement si la platine ne subit pas de mouvement de translation dans le plan focal. Il est donc impossible de conserver une mise au point correcte et d'imager plusieurs positions en utilisant uniquement ce système. Afin d'acquérir des répliquas au sein d'une même puce, Gilles Charvin et moi-même avons développé une nouvelle approche pour corriger la mise au point malgré une dérive de grande amplitude et des modifications de position. Briè-

vement, Definite Focus éteint, la position approximative du plan focal est déterminée comme suit. On acquiert en contraste de phase une série d'images à intervalle régulier selon différents plans sur une hauteur couvrant la dérive attendue. Le plan de l'image dont le gradient est le plus fortement contrasté est alors retenu comme le plan focal approché. Le Definite Focus est ensuite utilisé ponctuellement pour établir précisément la position du plan focal. Cette technique nous permet de suivre 5 positions avec une résolution temporelle de 3 minutes lors de chocs thermiques *in situ* entraînant des dérives de plus de 30 micromètres.

3.1.5 Optimisation de la température de formation des agrégats protéiques

Une limitation importante des études précédemment publiées réside dans le fait que les chocs thermiques sévères appliqués aux cellules (*e.g.* 30 min à 42°C) afin d'induire des agrégats protéiques affectent le processus de division cellulaire. La dernière étape de mise au point du dispositif expérimental permettant de suivre la dynamique d'agrégation protéique *in vivo* a donc consisté à optimiser la température du choc thermique appliqué à ces dernières. Le but était de trouver une température qui induit l'agrégation protéique sans affecter la division cellulaire.

En utilisant une souche portant une protéine de fusion Hsp104-GFP, nous avons tout d'abord pu évaluer la formation des agrégats protéiques en fonction de la température. Trois plans distants d'un micron étaient imagés afin de collecter le signal provenant de tous les agrégats (indépendamment de leur position dans la cellule).

La quantité et la taille des agrégats formés augmentent avec la température

Afin de déterminer quelle température minimale était requise pour former des agrégats, différents chocs thermiques ont été appliqués de $T_0 = 30.0^\circ\text{C}$ à $T_f = 30.0, 31.5, 33.0, 34.5, 36.0, 37.0, 38.0,$ et 39.5°C sur des cellules montées sous coussin d'agar (figure 45).

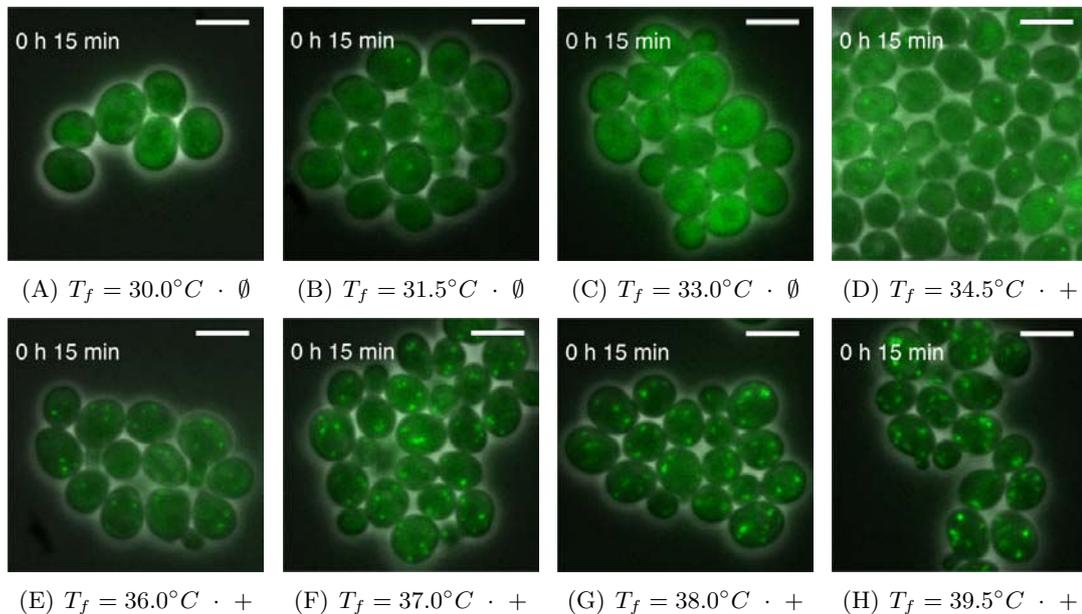


FIGURE 45 – Induction des agrégats liés à Hsp104-GFP (fausse couleur verte) en fonction de la température. Choc thermique appliqué à $t = 1$ min des températures $T_0 = 30^\circ\text{C}$ à T_f . "+" indique la présence d'agrégats induits et " \emptyset " l'absence d'induction. Barre d'échelle : $5 \mu\text{m}$

La quantification du nombre moyen d'agrégats par cellule 14 minutes après le choc thermique (figure 46 A) montre une transition entre deux régimes distincts d'agrégation à une température critique T_c comprise entre 33.0°C et 34.5°C. En dessous de cette température critique T_c , le nombre d'agrégats par cellule est stable, faible (moins de 0.5 agrégat par cellule) et comparable à la valeur du contrôle à une température constante de 30.0°C (test de Wilcoxon, $p - value > 0.2$). L'augmentation de température n'induit donc pas la formation de nouveaux agrégats en dessous de T_c . En revanche, au-dessus de T_c et jusqu'à 39.5°C au moins, le nombre d'agrégats par cellules est significativement plus élevé qu'à 30.0°C (test de Wilcoxon, $p - value < 10^{-5}$) et augmente avec la température de 0.5 à 3.5 agrégats par cellule.

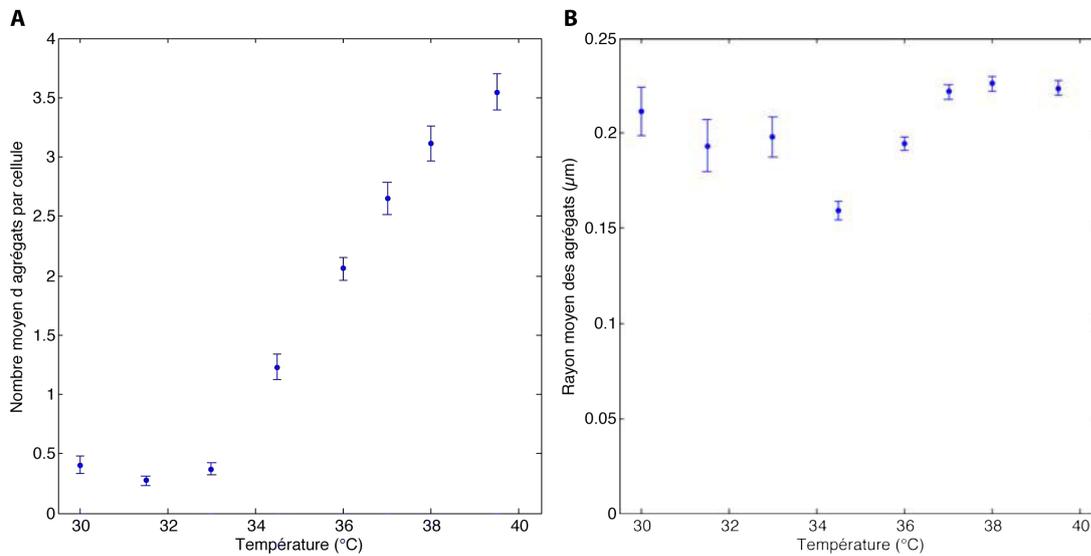


FIGURE 46 – Quantification de l'induction des agrégats en fonction de la température 14 minutes après le choc thermique. Barre d'erreur : erreur standard. A) Nombre moyen d'agrégats par cellules en fonction de la température. Tailles respectives des échantillons : $n=57, 175, 187, 145, 218, 152, 173$ et 178 cellules. B) Rayon moyen des agrégats au sein des cellules quantifiées en A en fonction de la température. Tailles respectives des échantillons : $23, 49, 70, 181, 460, 413, 544$ et 643 agrégats.

La transition entre les deux régimes distincts se retrouve également dans l'évolution du rayon moyen des agrégats, mesuré 14 minutes après le choc thermique (figure 46 B). En dessous de T_c , le rayon moyen des agrégats est constant et de $0.20 \pm 0.02 \mu m$. Au-dessus de T_c , le rayon moyen augmente avec la température du choc thermique de $0.16 \pm 0.005 \mu m$ à $0.23 \pm 0.005 \mu m$. La baisse brutale du rayon moyen observée autour de T_c s'explique par le fait que de nombreux agrégats plus petits que ceux présents initialement à 30°C sont nouvellement formés lors de l'augmentation de température au-dessus de cette valeur critique.

Nous pouvons donc conclure que l'agrégation protéique est induite au-dessus de 34°C (pour des cellules initialement à 30°C) et que le nombre et la taille des agrégats augmentent avec la température.

La quantité et la taille des agrégats formés dépendent à la fois de la température absolue et l'amplitude du choc thermique

Nous nous sommes ensuite demandé si l'induction de l'agrégation était modulée par la température absolue atteinte après le choc thermique, ou si, alternativement, elle dépendait uniquement de l'amplitude du choc.

Ainsi, nous avons comparé l'induction d'agrégats dans le cas de chocs de même amplitude conduisant à différentes température finale T_f . Avec une même amplitude $\Delta T = 8^\circ\text{C}$ et deux températures finale $T_f = 33^\circ\text{C}$ et $T_f = 38^\circ\text{C}$ (figure 47 A et B), on voit que l'abondance (figure 47 D) et la taille (figure 47 E) des agrégats obtenus augmentent significativement avec la température finale (test de Wilcoxon, p -value = 10^{-12} et 10^{-16}). L'induction des agrégats dépend donc de la température absolue.

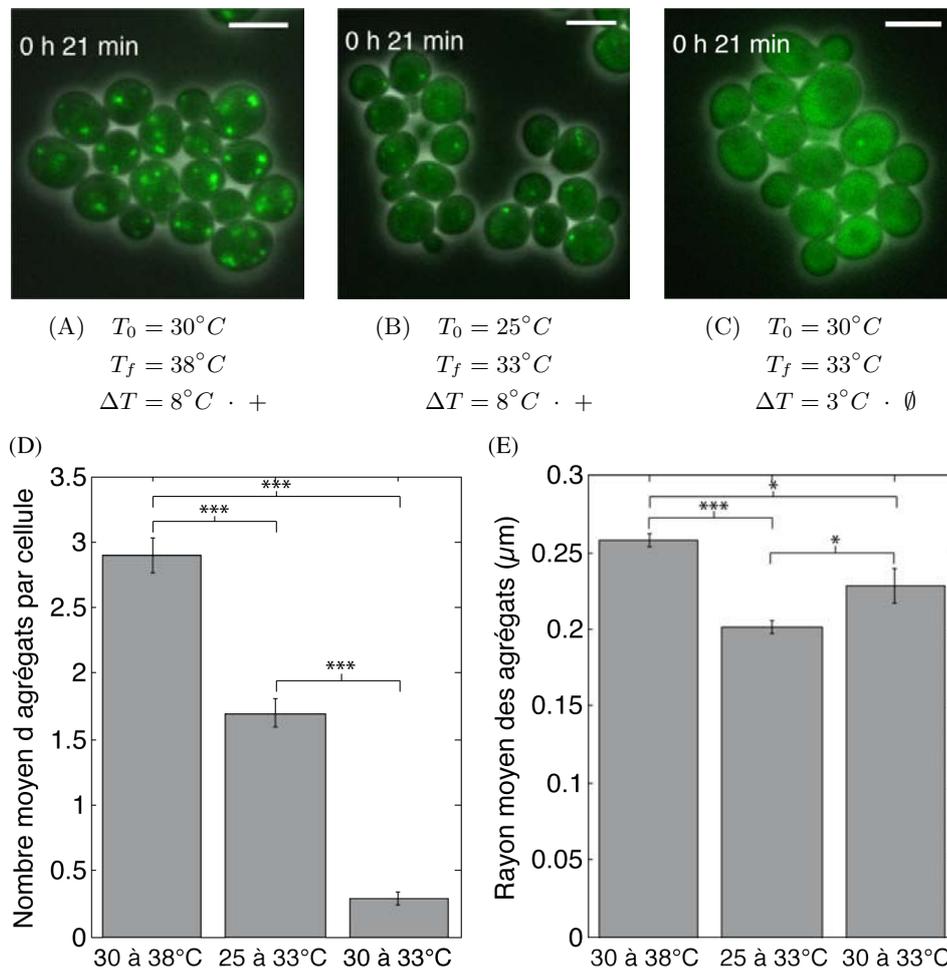


FIGURE 47 – Comparaison de différents chocs thermiques d'amplitudes ΔT , démarrants de températures T_0 pour atteindre des températures T_f . Choc thermique appliqué à $t = 1\text{min}$. (A) (B) et (C) : Superposition des images de contraste de phase et de fluorescence Hsp104-GFP. "+" indique l'induction d'agrégats et "∅" l'absence d'induction. Barre d'échelle : $5\ \mu\text{m}$. (D-E) Quantification du nombre (D) et du rayon (E) moyens des agrégats formés 20 minutes après différents chocs thermiques. Test de Wilcoxon - * : p -value < 0.05, *** : p -value < 10^{-10} .

Pour tester si l'induction des agrégats dépend également de l'amplitude du choc thermique,

comparons deux chocs d'amplitudes ΔT différentes conduisant à une température finale analogue T_f . Un choc d'amplitude 8°C et d'une température finale de $T_f = 33^\circ\text{C}$ génère des agrégats (figure 47 B et D : choc de 25°C à 33°C) alors qu'un choc conduisant à une température finale identique par une amplitude de 3°C ne génère pas d'agrégat (figure 47 C et D : choc de 30°C à 33°C). Ainsi, l'induction de l'agrégation protéique dépend de l'amplitude de température du choc et pas seulement de la température finale absolue. Le système est donc sensible à la dérivée de la température et pourrait être adaptatif.

En bref, l'induction d'agrégats protéiques augmente à la fois avec l'amplitude et la température finale absolue du choc thermique.

Mesure du taux de croissance en fonction de la température

Pour trouver une température qui induit l'agrégation protéique sans affecter la division cellulaire, nous avons ensuite évalué la croissance en fonction de la température.

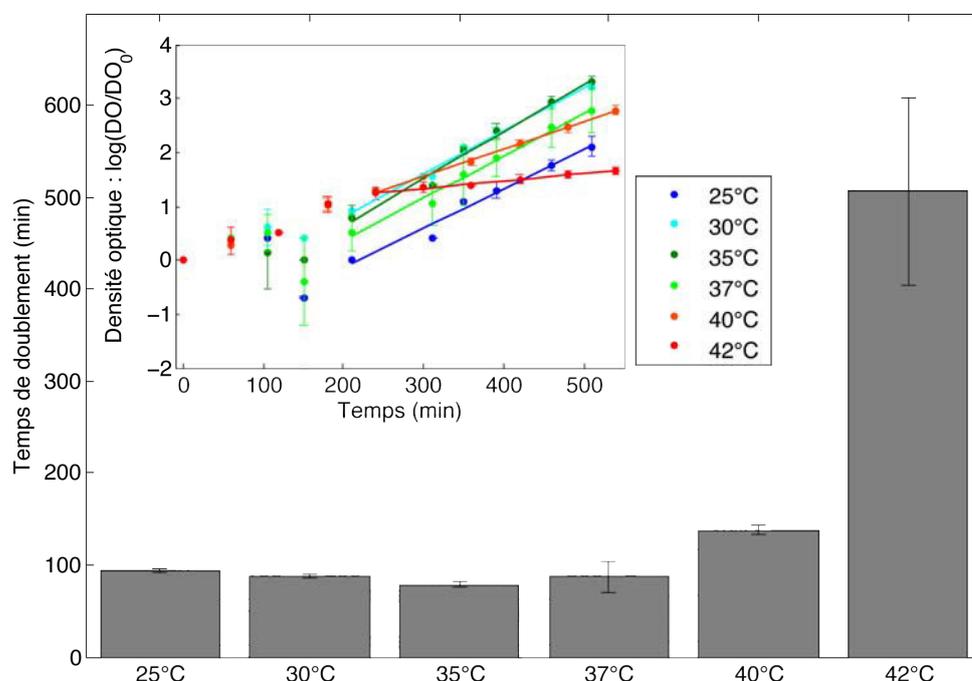


FIGURE 48 – Temps de doublement de CP03-1 en fonction de la température. Temps extrapolés à partir des courbes de croissance présentées en insert. Barres d'erreur : intervalles de confiance (seuil de confiance 5%). Insert : courbes de croissance à différentes températures. DO/DO_0 : densité optique renormalisée par rapport au point à $t = 0$ min. Moyenne sur trois réplicats pour chaque point. Cellules cultivées à 30°C puis transférées à $t = 120$ min à la température indiquée en légende. Temps de doublement interpolés sur les parties linéaires des courbes correspondant à une phase de croissance exponentielle. Pour chaque droite d'interpolation, $R^2 > 0.99$ et ajustement des données convainquant (test du χ^2 de Pearson - $Q = 1$).

Les cellules ont été cultivées dans 50 mL de milieu SCD à 30°C jusqu'à l'observation d'un premier doublement de la population avant d'être transférées dans des incubateurs à 25, 30, 35, 37, 40 et 42°C ($t = 120$ min). La mesure de la densité optique toutes les heures par prélèvement de 1mL de culture permet d'obtenir les courbes de croissance présentées en insert de la figure 48. Les

temps de doublement t_d (figure 48), extraits de l'interpolation de la partie linéaire des courbes de croissance (phase exponentielle), montrent que la division cellulaire n'est pas affectée jusqu'à 37°C (temps de doublement comparables de 95 ± 2 , 87 ± 4 , 79 ± 4 et 88 ± 16 min) alors qu'elle ralentit à 40°C ($t_d = 138 \pm 6$ min) et est totalement stoppée dès 42°C ($t_d = 507 \pm 100$ min).

Pour induire quantitativement l'agrégation protéique sans affecter la division cellulaire, les températures doivent donc être supérieures à 35°C et strictement inférieures à 40°C. Dans la section suivante, je montrerai que la combinaison du système expérimental exposé dans ce chapitre et de la méthodologie d'analyse d'image présentée dans le chapitre précédent permet de suivre finement la cinétique d'induction des agrégats protéiques liés à Hsp104. En particulier, nous verrons que notre approche permet de détecter des différences dans la cinétique d'induction en fonction de la température appliquée aux cellules.

3.2 Preuve de principe : suivi de la cinétique d'induction des agrégats liés à Hsp104 au cours d'un choc thermique

Une fois notre système mis au point, nous avons tout d'abord cherché à décrire la cinétique d'induction de l'agrégation protéique au cours d'un choc thermique. Pour suivre cette dynamique, nous avons soumis les cellules à un changement de température *in situ* dans le dispositif décrit précédemment (figure 49 A) et ensuite quantifié automatiquement la formation des agrégats protéiques selon la méthodologie présentée en II-2 (figure 49 B).

3.2.1 Cinétique d'induction de l'agrégation au cours d'un choc de 30°C à 38°C

Après une phase de croissance à 30°C, la température est brutalement augmentée à 38°C ($t = 2$ h 02 min - figure 49 A & B - film 1). 7 minutes après ce choc thermique, de nombreux agrégats apparaissent (distribution s'étalant de 0 à 16 agrégats par cellule, écart type de 2.2, moyenne de 2.0 ± 0.1) avec une moyenne maximale de 2.6 ± 0.1 agrégats par cellules 16 minutes après le choc (figure 49 D). Par la suite, le nombre d'agrégats diminue pour atteindre 1.2 ± 0.05 agrégats par cellule 2h après le choc alors que leur rayon moyen augmente quasi-linéairement de $0.16 \pm 0.005 \mu m$ à $0.36 \pm 0.005 \mu m$: les petits agrégats fusionnent pour former un unique agrégat plus gros au sein de chaque cellule (figure 49 D & E). Le nombre et la taille des agrégats est ensuite stable.

Ainsi, au cours des deux premières heures suivant le choc thermique, les agrégats sont très dynamiques. La phase d'induction caractérisée par la formation de nombreux petits agrégats est rapidement suivie par une phase transitoire de fusion, qui mène à la création d'agrégats plus gros. La détection automatisée des contours des cellules permet de mesurer leur aire $A(t)$ au cours du temps et d'en déduire une approximation du taux de croissance $\mu(t)$ comme

$$\mu(t) = \frac{A(t + dt) - A(t)}{A(t).dt} \quad (3.1)$$

avec dt l'intervalle de temps entre deux images. La mesure du taux de croissance au cours du temps montre que la croissance des cellules ralentit durant les phases d'induction et de fusion pour ensuite reprendre normalement (figure 49 C). Un tel processus ne pouvait être observé avec les méthodes décrites précédemment dans la littérature.

Grâce à notre système, nous avons induit des agrégats protéiques sous le microscope et suivi leur formation et leur dynamique en temps réel dans des cellules uniques se divisant. Couplé à une analyse d'image automatisée, cette stratégie nous a permis de mieux comprendre la dynamique

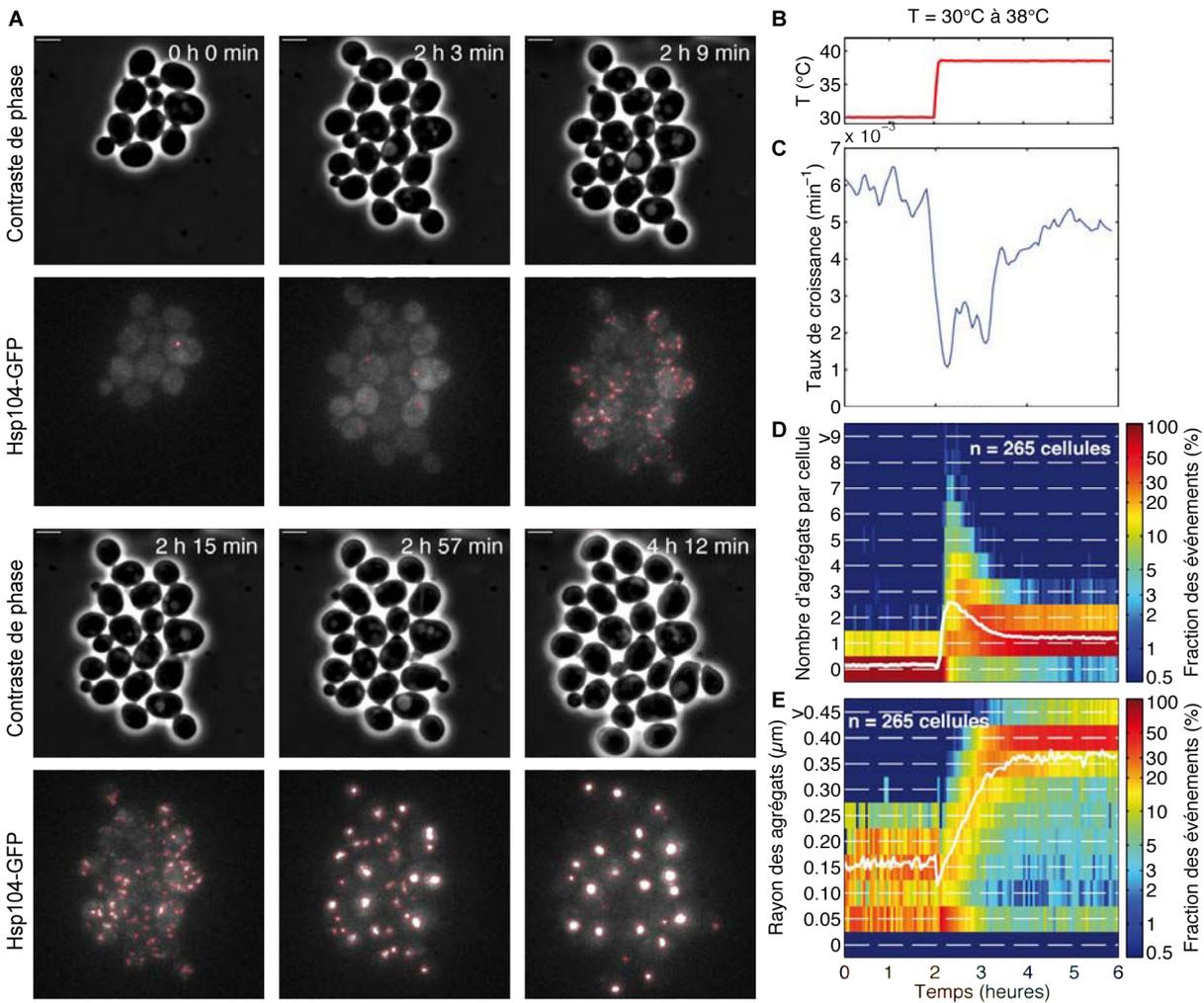


FIGURE 49 – Cinétique d'induction de l'agrégation protéique au cours d'un choc de 30°C à 38°C à $t = 2$ h. A) Images obtenues au cours d'un choc typique. Détection automatique des contours des agrégats représentée en rouge. Barre d'échelle : $5 \mu\text{m}$. B à E) Analyse quantitative de l'induction des agrégats sur 265 cellules présentes au moment du choc thermique. B) Température de la platine en temps réel. C) Évolution du taux de croissance au cours du temps. D) Histogramme 2D du nombre d'agrégats par cellule au cours du temps. Courbe blanche : valeur moyenne. E) Histogramme 2D du rayon des agrégats au cours du temps. Courbe blanche : valeur moyenne.

de l'agrégation protéique et les processus de ségrégation asymétrique des agrégats formés. En particulier, nous avons mis en évidence un lien entre la ségrégation asymétrique et la division cellulaire (*cf.* article présenté en partie III).

3.2.2 Contrôle de l'absence d'induction à 30°C

Afin de suivre la cinétique d'induction des agrégats au cours du temps, les cellules sont immobilisées et imagées en fluorescence toutes les 3 minutes selon 3 plans pendant plusieurs heures (typiquement 6 à 10 heures). Nous avons donc vérifié que les conditions de croissance et d'illumination utilisées n'induisaient pas la formation d'agrégats en réalisant une expérience en tout point similaire à celle décrite précédemment, sans choc thermique (voir film 2 - température

3.2. Preuve de principe : cinétique d'induction des agrégats liés à Hsp104 au cours d'un choc thermique

constante de 30°C, 3 plans imagés toutes les 3 minutes pendant 11 heures).

La figure 50 (contrôle-30°C) montre que le nombre d'agrégats est très faible (0.1 ± 0.05 agrégat par cellule) et constant pour ce contrôle. De même, leur rayon n'évolue pas avec une valeur constante de $0.15 \pm 0.03 \mu\text{m}$. Les conditions d'illumination et de croissance des cellules n'induisent donc ni une augmentation du nombre des agrégats, ni une augmentation de leur taille.

Le nombre et le rayon moyen des agrégats sont légèrement plus faibles que ceux quantifiés en figure 46. Cela peut s'expliquer par une détection différente des agrégats pour des images obtenues en coussin d'agar et en microfluidique. Le bruit est en effet plus élevé avec un montage sous coussin d'agar et peut induire la détection de faux positifs et la mauvaise détection de petites structures. En effet, les agrégats de rayon inférieur à $0.1 \mu\text{m}$ semblent moins bien détectés qu'en microfluidique (données non présentées).

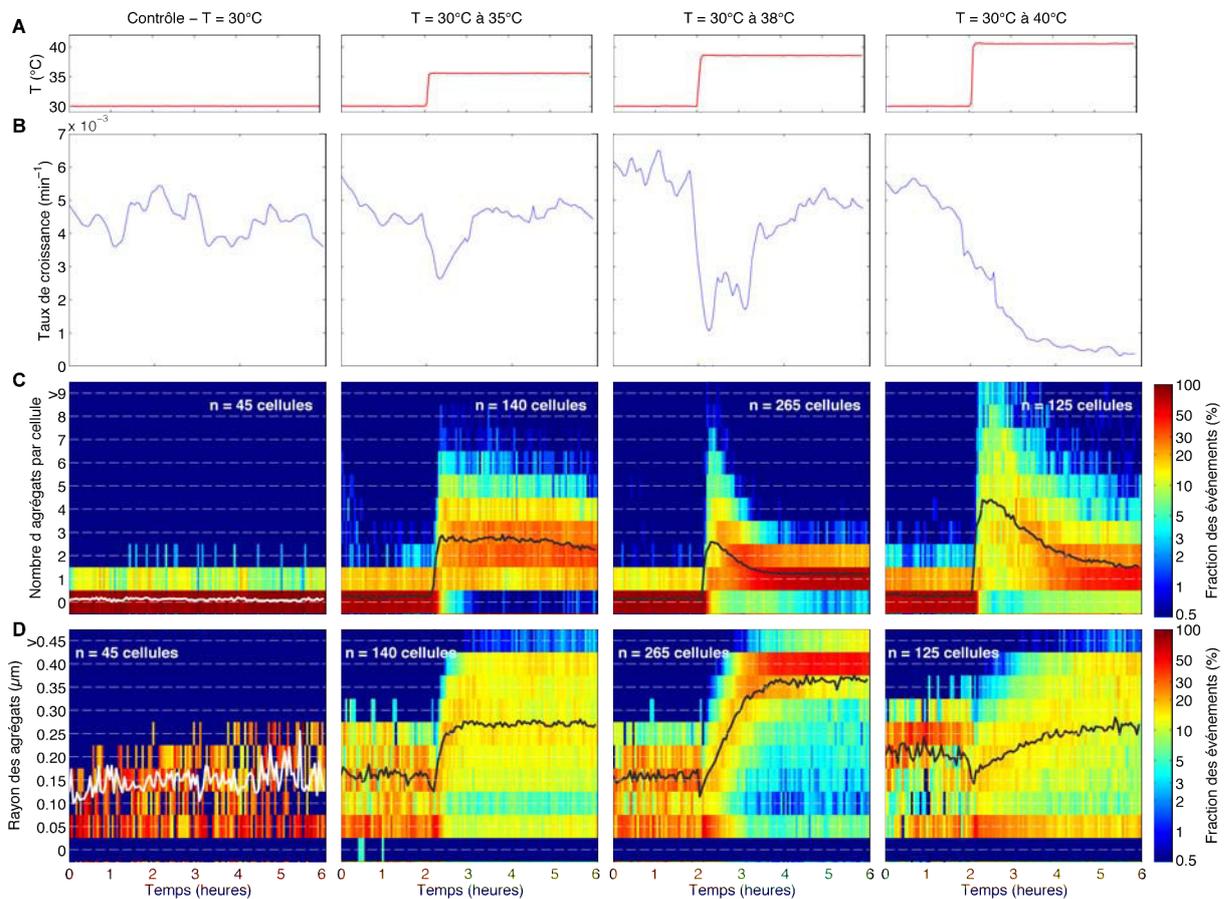


FIGURE 50 – Cinétique d'induction des agrégats protéiques à différentes températures. A) Température de la platine en temps réel. B) Évolution du taux de croissance au cours du temps. C) Histogramme 2D du nombre d'agrégats par cellule au cours du temps. Courbe blanche ou noire (adaptation de la couleur pour une meilleure visualisation) : valeur moyenne. D) Histogramme 2D du rayon des agrégats au cours du temps. Courbe blanche ou noire : valeur moyenne.

Nous avons également vérifié que les agrégats présents ne sont pas induits par l'injection des cellules dans le système en quantifiant le nombre d'agrégats observés à 30°C entre lame et lamelle (0.2 ± 0.1 agrégat par cellule) qui n'est pas significativement différent de celui observé à 30°C en microfluidique (0.1 ± 0.05 agrégat par cellule, test de Wilcoxon - p - value = 0.57).

Ainsi, l'induction observée dans la section précédente 3.2.1 correspond uniquement à la réponse des cellules au choc thermique. Nous nous sommes ensuite demandé comment la cinétique d'induction dépendait de la température appliquée aux cellules sur la plage à considérer (35°C à 40°C).

3.2.3 La cinétique d'agrégation dépend de la température du choc

Pour compléter les observations faites à 30°C et lors d'un choc de 30°C à 38°C, nous avons répété l'expérience de choc thermique *in situ* dans une puce microfluidique de 30°C à 35°C et de 30°C à 40°C (figure 50 et films 3 et 4).

Comparaison de l'effet des différents chocs thermiques sur le taux de croissance

L'analyse quantitative des données montre que le taux de croissance défini en équation 3.1 est faiblement affecté lors du choc à 35°C (baisse de 40%) avant de revenir à la normale (figure 50 B - 35°C), de manière comparable au choc à 38°C (figure 50 B - 38°C). Ceci est également en accord avec les courbes de croissance présentées en figure 48. En revanche, lors du choc à 40°C, le taux de croissance baisse continuellement pour atteindre une valeur quasi-nulle de $5 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ (figure 50 B - 40°C) qui correspond à un temps de doublement de plus de 1300 minutes. La transition déjà observée grâce aux courbes de croissance au sein d'Erlemeyers (figure 48) entre une croissance non affectée en dessous de 38°C et une croissance ralentie à partir de 40°C est donc confirmée. Pour comprendre les mécanismes de ségrégation asymétrique des agrégats sur des cellules se divisant, la température du choc ne doit donc pas excéder 38°C.

La différence importante de temps de doublement t_d observée à 40°C en microfluidique ($t_d = 1300 \text{ min}$) et en Erlemeyer ($t_d = 138 \text{ min}$) peut s'expliquer par le fait que le choc thermique est beaucoup plus brutal en microfluidique (stabilisation de la température en moins de 10 min - cf. figure 44 C) qu'en Erlemeyer (stabilisation de la température en environ 2h30 - données non présentées). Les cellules pourraient donc avoir le temps de s'adapter dans le second cas et pas dans le premier. Je n'ai malheureusement pas eu le temps de tester cette hypothèse. Cependant le dispositif expérimental mis au point pourrait le permettre en appliquant des rampes de températures de différentes pentes puis en mesurant automatiquement le taux de croissance.

Effet des différents chocs thermiques sur la cinétique d'agrégation

L'analyse quantitative des données montre également que la vitesse d'induction des agrégats augmente avec la température (figure 50 C). Ainsi les temps d'induction à mi-hauteurs sont respectivement de 11 min, 6 min et 5 min pour les chocs à 35°C, 38°C et 40°C.

L'évolution du nombre moyen d'agrégats par cellule dépend aussi de la température du choc. Lors des chocs à 38°C et 40°C, ce nombre atteint un maximum en 16 minutes puis diminue pour atteindre une valeur stable après quelques heures (figure 50 C) alors que le rayon moyen augmente (figure 50 D - processus de fusion). Pour un choc à 35°C, ce nombre est maximal 6 minutes plus tard (22 minutes après le choc) et reste stable à la valeur maximale de 2.7 ± 0.05 agrégats par cellule (figure 50 C). Le rayon moyen des agrégats est également stable ($0.26 \pm 0.005 \mu\text{m}$ - figure 50 D). Le processus de fusion décrit précédemment lors du choc à 38°C ne semble donc pas s'opérer à 35°C.

Pour le choc à 40°C, on constate que les distributions du nombre d'agrégats par cellules et plus particulièrement du rayon des agrégats sont moins uniformes qu'à 38°C (figure 50 C & D). Ainsi, l'erreur standard sur le rayon est deux fois plus élevée à 40°C qu'à 38°C (0.010 contre 0.005). La comparaison des films 1 (38°C) et 4 (40°C) montre que les agrégats sont en effet de forme moins régulière à 40°C.

Les données présentées en figure 50 montrent que le dispositif expérimental développé permet une induction contrôlée et une analyse quantitative fine de l'agrégation protéique liée à Hsp104. Au vu des observations décrites dans ce chapitre, pour étudier les mécanismes de ségrégation asymétrique des agrégats, nous avons décidé de réaliser des chocs thermiques de 30°C à 38°C afin d'induire une quantité importante d'agrégats sans affecter la division cellulaire.

Il faut cependant noter que la correspondance entre les agrégats induits par un choc thermique et les agrégats observés dans des populations enrichies en cellules vieilles n'a jamais été démontrée. Au laboratoire, nous avons également mis en place un dispositif expérimental permettant de suivre une cellule de sa naissance jusqu'à sa mort et donc de potentiellement observer l'accumulation d'agrégats protéiques dans les cellules vieilles. Ce dispositif rend ainsi possible une approche nouvelle dans la compréhension des mécanismes de ségrégation asymétrique. Dans le chapitre suivant, je présenterai le principe de ce second dispositif expérimental en précisant quel a été mon rôle dans son élaboration, puis j'exposerai brièvement deux exemples mettant en avant les différents intérêts de ce dispositif et discuterai les perspectives qu'il offre.

Chapitre 4

Dispositif permettant de suivre la dynamique d'agrégation protéique *in vivo* en temps réel au cours du vieillissement

Dans les études précédentes, différentes stratégies ont été mises en place pour étudier les mécanismes de ségrégation asymétrique d'agrégats protéiques induits artificiellement (par altération du protéasome [13] [14] ou choc thermique sévère [10] [12]). Cependant, il n'est pas évident que ces observations puissent être transposées dans un contexte de vieillissement.

De plus, l'observation de l'accumulation progressive d'agrégats au cours du vieillissement dans une même cellule n'a jamais pu être décrite directement. En effet, une des limitations des études classiques de vieillissement chez la levure tient dans l'impossibilité de suivre les cellules en temps réel au cours de leur durée de vie. Au laboratoire, nous avons développé une puce microfluidique permettant de suivre des cellules de levure de leur naissance jusqu'à leur mort. Ce dispositif ouvre donc de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de vieillissement chez *Saccharomyces cerevisiae* [278]. En particulier, dans le cadre de cette thèse, il a permis d'observer pour la première fois s'il existait bien une formation continue et une ségrégation des agrégats protéiques liés à Hsp104 au cours du vieillissement.

Dans ce chapitre, je présenterai le principe du dispositif expérimental créé pour suivre des cellules de levure tout au long de leur vie en précisant quel a été mon rôle dans son élaboration, puis j'exposerai brièvement deux exemples mettant en avant les différents intérêts de ce dispositif et discuterai les perspectives qu'il offre.

Sommaire

4.1	Description du dispositif expérimental CLiC	102
4.1.1	Principe du dispositif	102
4.1.2	Validité des durées de vie répliquative dans le CLiC	102
4.1.3	Vérification de l'apport en nutriment dans le CLiC	104
4.2	Intérêts multiples du dispositif CLiC	106
4.2.1	Étude du vieillissement répliquatif de cellules mères	106
4.2.2	Étude de la sénescence induite par un raccourcissement des télomères	107
4.3	Améliorations du dispositif et perspectives	109

4.1 Description du dispositif expérimental CLiC

Bien que nous sachions suivre les cellules au cours du temps sur quelques générations (*cf.* II-2.3), le suivi d'une même cellule sur la totalité de sa durée de vie n'est pas évident. En effet, une cellule de levure du boulanger produit en moyenne 25 filles avant de mourir. Sachant que chaque fille devient également mère et produit alors ses propres filles, à la fin de sa vie, une cellule mère au départ isolée est ainsi théoriquement entourée de plus de dix millions de cellules.

Pour espérer pouvoir suivre une cellule tout au long de sa vie et lui apporter des nutriments en quantité suffisante, il faut donc concevoir un système permettant à la fois de l'isoler, de la nourrir et d'éliminer automatiquement sa progéniture. Récemment, différentes puces microfluidiques ont été développées en ce sens [270] [274] [277] [276]. Cependant, bien qu'ayant montré l'intérêt d'utiliser la microfluidique pour étudier le vieillissement chez *Saccharomyces cerevisiae*, ces puces ne permettent pas d'isoler les cellules mères dès leur naissance.

Au laboratoire, nous avons développé un système microfluidique particulier, nommé CLiC, permettant d'insérer une cellule mère unique et vierge au fond d'une cavité ("CLiC" pour "Cell Loaded into a Cavity") et ainsi de la suivre sous le microscope de sa naissance jusqu'à sa mort [278]. De plus, la progéniture de la cellule mère d'intérêt peut également être suivie sur quelques générations.

4.1.1 Principe du dispositif

Le principe du dispositif microfluidique est le suivant. Des cellules en phase de croissance exponentielle sont insérées dans une série de zones de piégeage (longueur×largeur×hauteur : $90 \times 40 \times 3.3 \mu\text{m}$ - figure 51 A & B - flèches noires) où elles prolifèrent au cours de l'expérience (pendant environ 120h). Ces zones de piégeage sont alimentées continûment en nutriments par contact direct avec des canaux d'approvisionnement (placés perpendiculairement), qui permettent également d'éliminer l'excès de cellules (figure 51 A, flèches vertes).

La croissance au sein des zones de piégeage conduit progressivement à la colonisation de 60 petites cavités (longueur×largeur×hauteur : $35 \times 6 \times 3.3 \mu\text{m}$) par quelques cellules (figure 51 B). Les cellules haploïdes bourgeonnant toujours du même côté, une fois qu'une cellule a atteint le fond de la cavité, elle aura tendance à toujours créer ses filles vers la sortie de la cavité (figure 51 C & D). Il est alors possible d'en suivre les divisions successives au cours du temps (figure 52 A & B et film 5).

4.1.2 Validité des durées de vie répliquative dans le CLiC

L'imagerie en contraste de phase toutes les 10 minutes des cellules piégées permet de déterminer la durée de vie répliquative (RLS) de chaque cellule (figure 52 B), définie comme le nombre de filles produites au cours de leur vie.

Les RLS obtenues avec cette méthode présentent une médiane de 32.4 ± 1.4 générations pour la souche BY4741 cultivée en milieu synthétique complet glucose (figure 52 C, courbe rouge - estimateur de Kaplan-Meier, $n = 191$ cellules). Cette valeur n'est pas significativement différente (test log-rank - p - *value* = 0.3) de celle de 31.5 ± 1.0 obtenue par une méthode classique de micro-dissection (figure 52 C, courbe verte, $n = 63$ cellules).

Il faut noter que les cellules piégées au fond des cavités peuvent éventuellement les quitter (erreur de polarité du bourgeonnement ou rotation). Cependant, la probabilité de perdre une cellule a été évaluée à moins de 35%. L'estimateur de Kaplan-Meier utilisé pour évaluer la médiane des RLS permet de prendre en compte uniquement les cellules qui quittent la cavité avant leur

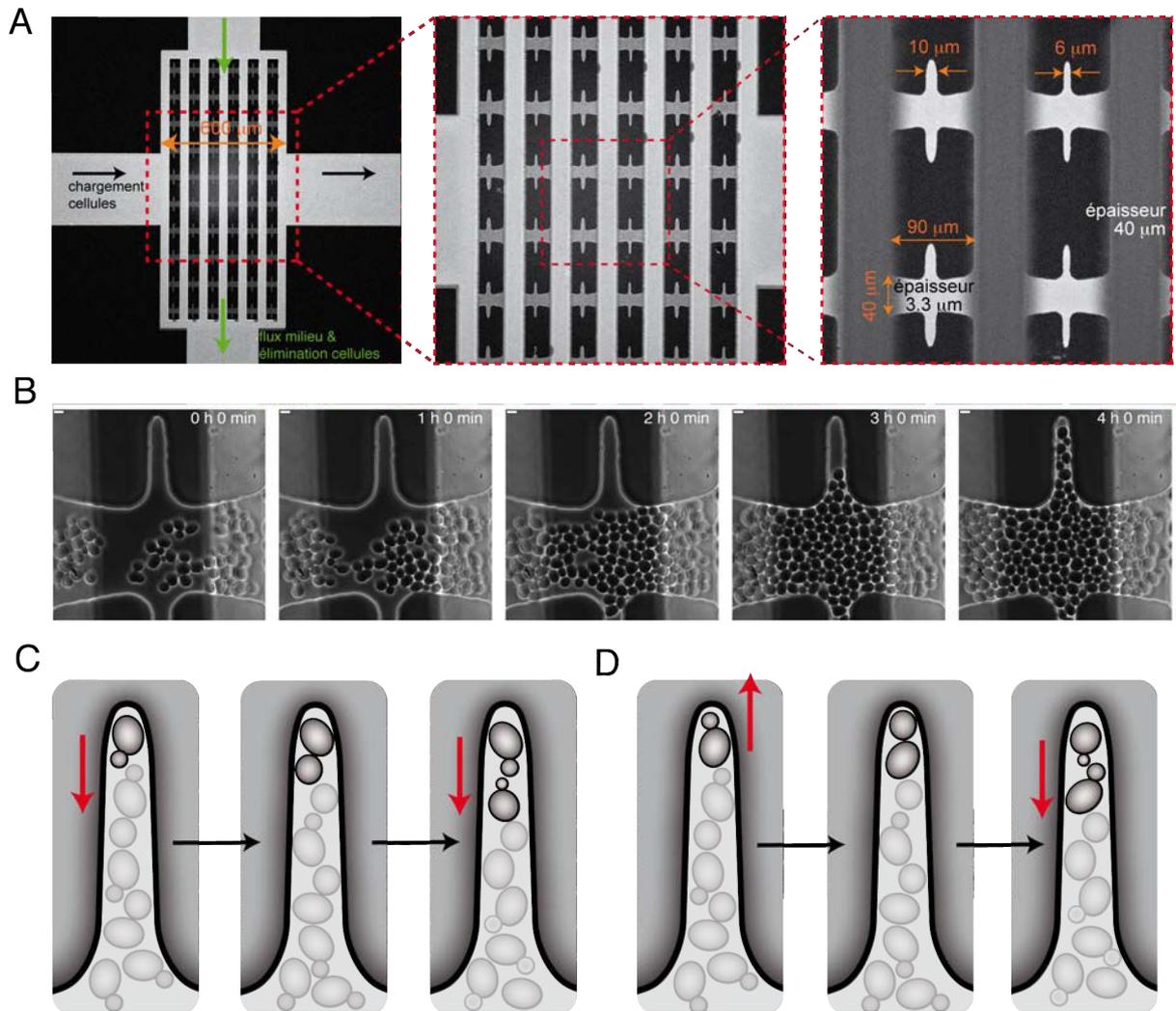


FIGURE 51 – Principe du dispositif CLiC. A) Dispositif microfluidique à différentes échelles. Images acquises au microscope confocal montrant les motifs de résine photorésistante SU-8 imprimés sur le wafer de silice. Gauche : les entrées/sorties pour l'insertion des cellules (flèches noires) sont perpendiculaires aux entrées/sortie pour l'approvisionnement en milieu et l'élimination des cellules (flèches vertes). Centre : grille de zone de piégeages connectées par des canaux d'approvisionnement. Droite : zones de piégeages et cavités. Différentes largeurs de cavités (6 et 10 μm) ont été créées pour étudier les potentiels effets délétères de la géométrie de la cavité sur la survie des cellules. B) Colonisation du dispositif par prolifération des cellules. Séquence d'images en contraste de phase montrant les cellules immédiatement après leur insertion (par les canaux de chargement) et au cours de leur prolifération jusqu'au remplissage de la cavité. Barre d'échelle : 4 μm . C et D) Diagramme d'orientation des cellules dans le dispositif CLiC. Lorsque la cellule mère commence à bourgeonner vers la sortie de la cavité (C, flèche rouge), l'ensemble des nouveaux bourgeons seront également dirigés vers la sortie grâce au bourgeonnement axial des cellules haploïdes. Si le bourgeon initial est dirigé vers le fond de la cavité (D), une fois devenu mère, celui-ci produira une nouvelle cellule à côté de sa cicatrice de bourgeonnement et donc vers la sortie.

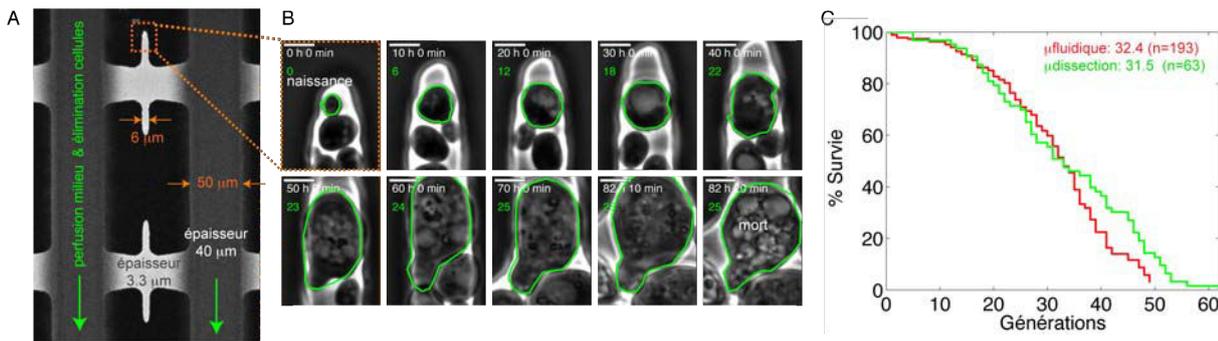


FIGURE 52 – Suivi des divisions cellulaires et mesure du RLS. A) Image du dispositif CLiC. B) Séquence d'images en contraste de phase au cours de la durée de vie d'une même cellule d'intérêt (contour vert). Nombres verts : âge réplcatif. Barre d'échelle : $4 \mu\text{m}$. C) Courbes de probabilité de survie pour des cellules cultivées dans le dispositif microfluidique (courbe rouge, estimation de Kaplan-Meier) ou micro-disséquées manuellement sur boîte d'agar (courbe verte).

mort. Ainsi, la médiane estimée déterminée par cette méthode n'est pas biaisée et peut bien être comparée à celle obtenue lors des expériences de micro-dissection.

4.1.3 Vérification de l'apport en nutriment dans le CLiC

Bien que les médianes mesurées par les méthodes de micro-dissection et de microfluidique soient comparables, suggérant que la survie des cellules piégées n'est pas affectée par le dispositif microfluidique, nous avons contrôlé que l'apport en nutriments était suffisant au fond des cavités.

Pour ce faire, nous avons mesuré la cinétique de diffusion/convection du milieu à travers une chambre (zone de piégeage et cavités) remplie de cellules en ajoutant de la fluorescéine (Sigma) au milieu et en réalisant des expériences de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP - figure 53 A). Après avoir rempli le dispositif microfluidique de fluorescéine, le flux était arrêté et la totalité du champ contenant les cellules, la zone de piégeage et les cavités était photoblanchi par une illumination continue durant 3 minutes. L'acquisition time-lapse d'images de fluorescence était ensuite démarrée dès l'arrêt du photoblanchiment ($t = 0$ s).

La quantification du niveau de fluorescence (figure 53 B) a été effectuée dans deux régions d'intérêt (ROI) au sein d'un canal d'approvisionnement et au bout de la cavité supérieure (comme indiqué en figure 53 A). À $t = 4.4$ s, le flux de milieu contenant de la fluorescéine était redémarré à $25 \mu\text{L}/\text{min}$. Dans le canal d'approvisionnement, on voit que le niveau de fluorescence atteint instantanément une valeur stationnaire (figure 53 B, courbe verte). À l'inverse, le temps $t_{1/2}$ nécessaire pour parvenir à la valeur à mi-hauteur au bout de la cavité est de 3.1 s (figure 53 B, courbe rouge). Nous interprétons ce temps comme le temps requis pour remplacer le volume de milieu à l'intérieur de l'intégralité de la zone de piégeage.

Pour vérifier que le taux d'échange de milieu suffit à délivrer des nutriments à l'ensemble des cellules de la chambre (zone de piégeage et cavités), nous l'avons comparé au taux d'import de glucose pour une population de cellules se divisant dans un tube à essai dans des conditions standards. Nous savons qu'un millilitre de culture saturée de levure dans du milieu SCD contient $n = 5.10^7$ cellules. Le milieu de culture étant à une concentration de 20 g/L de glucose, 1 mL de culture initiale contient une masse $m = 2.10^{-2}$ g de glucose. Ainsi, la quantité de glucose requise pour créer une nouvelle cellule est typiquement de $m_c = m/n = 4.10^{-10}$ g. En considérant que la population de $N = 150$ cellules contenue dans la zone de piégeage double toutes les

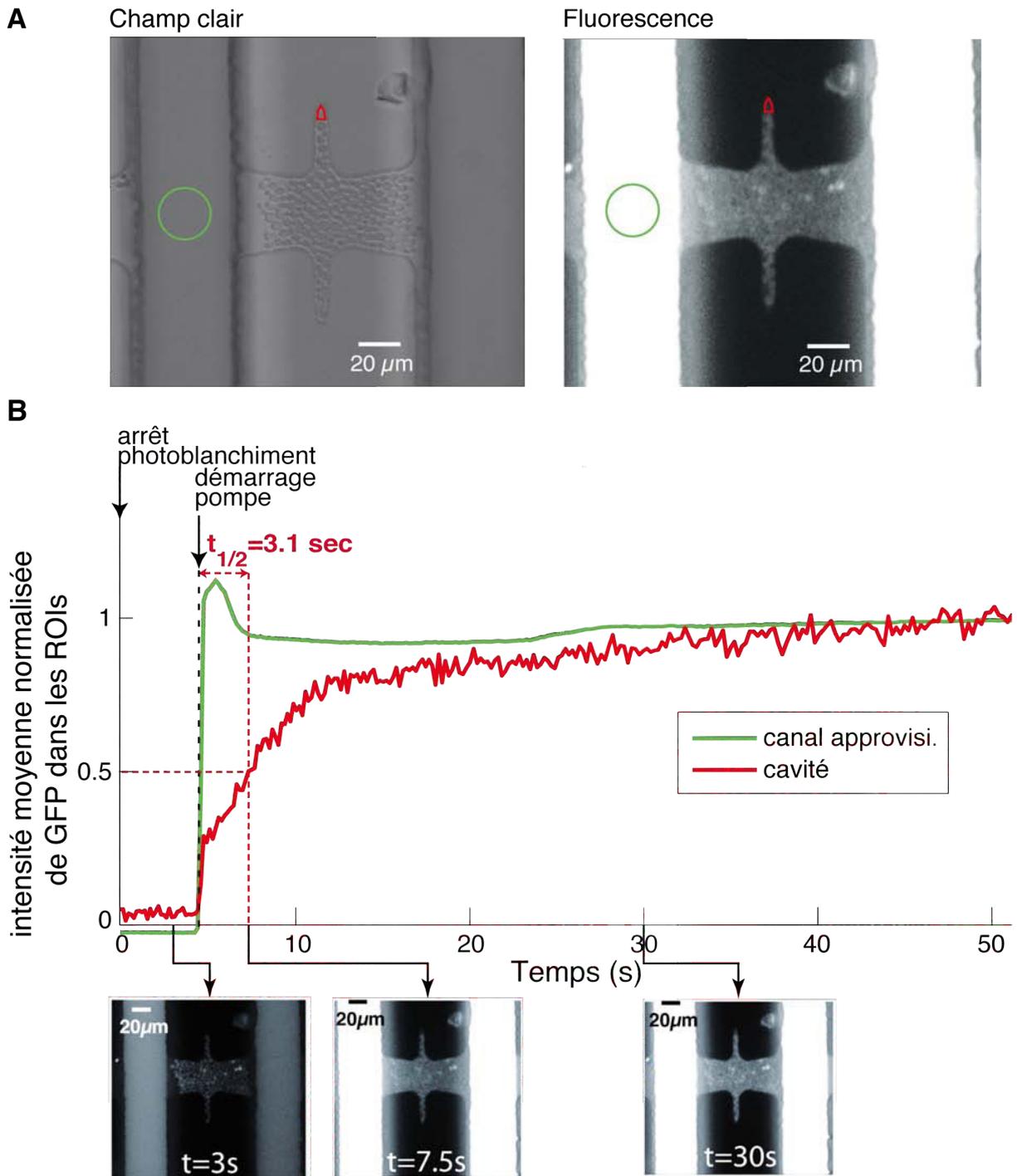


FIGURE 53 – Mesure des propriétés de diffusion/convection au sein du dispositif CLiC. A) Images en fond clair et en fluorescence de la chambre d’immobilisation remplie de cellules. Les contours colorés indiquent les régions d’intérêt (ROI) quantifiées au cours de l’expérience de FRAP dans le canal d’approvisionnement (vert) et la cavité (rouge). B) Évolution de l’intensité de fluorescence moyenne renormalisée (par la valeur de plateau) au sein des ROI au cours du temps. Images de fluorescence typiques aux points de temps indiqués.

$\Delta t = 90$ minutes, la masse de glucose consommée dans la chambre par unité de temps est de $m_{\Delta t} = m_c \times N/\Delta t = 6.6.10^{-10}$ g/min. À une concentration de glucose de $c = 20$ g/L, le flux minimum requis à travers la chambre est donc de $\Phi_{min} = m_{\Delta t}/c = 3.10^{-5}$ $\mu\text{L}/\text{min}$. En comparaison, le volume de la chambre ($V = 90 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m} \times 3.3 \mu\text{m} = 9.10^{-6}$ μL) est rempli en $\delta t = 3.1$ s. Le flux mesuré expérimentalement est donc de $\Phi = V/\delta t = 2.10^{-4}$ $\mu\text{L}/\text{min}$, ce qui est un ordre de grandeur au-dessus du flux minimal requis pour assurer un apport suffisant en nutriment.

L'idée originale de l'architecture du dispositif a été proposée par Gilles Charvin après la publication d'une méthode comparable pour piéger des bactéries [255]. Le moule a été créé par Steffen Fehrmann, chercheur post-doctorant du laboratoire. Les courbes de survie présentées en figure 52 C (microfluidique et micro-dissection) et validant le principe du système ont été générées et analysées conjointement par Steffen Fehrmann et moi-même. La mesure des propriétés de diffusion/convection au sein du dispositif a été effectuée par mes soins.

Dans la section suivante, je présenterai deux exemples d'études de vieillissement réalisées avec la puce CLiC.

4.2 Intérêts multiples du dispositif CLiC

4.2.1 Étude du vieillissement répliatif de cellules mères

Obtention rapide de courbes de survie

Bien que la puce ait tout d'abord été développée dans le but d'étudier quantitativement l'entrée en sénescence chez la levure à l'échelle d'une cellule unique, elle permet également, à un niveau très fondamental, d'obtenir des courbes de survie (figure 52 C) de manière beaucoup moins fastidieuse (temps moyen alloué par l'expérimentateur <10 h pour une durée totale d'expérimentation de 7 jours, temps d'analyse d'environ 2 jours) que par une expérience de micro-dissection manuelle (suivi manuel des cellules toutes les 90 minutes sur 7 jours minimum).

En outre, l'identification et donc le comptage des cellules filles est plus facile dans un système de microfluidique grâce à la meilleure résolution temporelle (10 minutes au lieu de 90). Les erreurs dans les RLS sont donc minimisées. L'utilisation d'un système microfluidique permet aussi d'assurer un contrôle précis des conditions environnementales (température et apport en nutriment constants dans un système correctement calibré).

Suivi dynamique de la physiologie cellulaire et de marqueurs fluorescents de la naissance à la mort

L'utilisation de notre puce microfluidique permet également d'imager une même cellule à intervalles de temps réguliers en contraste de phase et en fluorescence tout au long de sa vie, ce qui était impossible auparavant avec les méthodes de micro-dissection manuelle. On peut alors suivre chez cette cellule l'évolution de l'état physiologique (e.g. taux de croissance) et de divers marqueurs fluorescents.

Grâce au couplage de l'observation en temps réel de la physiologie de la cellule et de marqueurs fluorescents, nous pouvons accéder à "l'histoire" de la cellule et établir des liens causaux entre la modification des fonctions cellulaires et l'entrée en sénescence. Une telle étude a par exemple été menée au sein du laboratoire et a décrit l'entrée en sénescence à l'échelle de la cellule unique [278].

Étude de l'entrée en sénescence à l'échelle de la cellule unique

En autorisant la mesure des temps de division de cellules uniques de la naissance jusqu'à la

mort, la puce nous a permis de prouver que l'entrée en sénescence ne résultait pas d'un déclin progressif des fonctions physiologiques mais au contraire d'une transition abrupte d'un état de division "normal" vers un état de division lente (*cf.* [278] - figure 2 - article présentée en annexe A). Cela n'avait pu être observé précédemment car l'entrée brutale en sénescence n'intervient pas de manière synchrone dans toutes les cellules. Elle est donc masquée lorsque l'on mesure des temps de division moyens et ne peut être mise en évidence que lors de mesures quantitatives sur des cellules uniques, auparavant techniquement impossible. En effet, la technique de microdissection manuelle ne permet pas d'obtenir d'information sur la physiologie de la cellule ou de suivre des marqueurs du vieillissement tandis que les méthodes de tri cellulaire [3] [8] [429] et d'enrichissement en cellules mères [7] [284] [430] le permettent, mais uniquement à des points de temps donnés, et non tout au long de la vie d'une cellule. Cette observation souligne l'importance de réaliser des mesures quantitatives sur des cellules uniques afin de comprendre les causes du vieillissement.

De plus, le suivi du potentiel de membrane des mitochondries $\Delta\Psi$ a mis en évidence que seule une fraction des cellules perdaient ce potentiel pour devenir *petites* (*cf.* annexe A - figure 3) et que ce déclin n'était pas à l'origine de l'entrée en sénescence, comme cela avait été proposé par Veatch *et al.* [291]. La perte de $\Delta\Psi$ est en effet un processus indépendant de l'âge et héréditaire (*cf.* annexe A - figure 4), conduisant à une sénescence clonale (*cf.* annexe A - figure 5). Elle est donc découplée du processus de vieillissement et incompatible avec le phénomène de rajeunissement décrit précédemment [3].

Enfin, nous avons observé des oscillations corrélées avec le cycle cellulaire des états fusionné et fissionné des mitochondries après l'entrée en sénescence des cellules (*cf.* annexe A - figure 6). Ces oscillations pourraient jouer un rôle dans la ségrégation mère/fille des mitochondries, comme cela a été proposé auparavant [6].

En tirant profit de l'observation conjointe de l'état physiologique et des mitochondries de cellules uniques, notre système a donc permis d'infirmer le lien de cause à effet entre la perte du potentiel de membrane des mitochondries et l'entrée en sénescence proposé par Veatch *et al.* [291], mais également de remettre en question l'idée communément acceptée d'un vieillissement cellulaire progressif. L'utilisation de cette puce ouvre ainsi de nouvelles perspectives. Tout d'abord, elle pourrait permettre de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans le ralentissement du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence. Ensuite, nous pourrions revisiter différentes questions soulevées par l'observation de mutants de longévités et évaluer l'influence de ces mutations sur la transition abrupte vers un état de sénescence que nous avons décrite.

Cependant, le spectre d'application du dispositif CLiC ne se limite pas à l'étude du vieillissement d'une cellule mère au cours du temps. Ce dispositif permet également d'étudier la sénescence répliquative induite par le raccourcissement des télomères au sein d'une lignée de cellules filles.

4.2.2 Étude de la sénescence induite par un raccourcissement des télomères

Induction de la sénescence par un raccourcissement des télomères

Chez les cellules eucaryotes, l'ADN est stocké dans des chromosomes linéaires, ce qui induit la perte des derniers nucléotides lors de chaque réplication [187] et donc de potentielles instabilités génétiques. Les extrémités des chromosomes sont protégées par les télomères, régions hautement répétitives et non-codantes, afin d'assurer la stabilité du génome [431]. Lorsque les télomères ne sont pas maintenus, il a été montré que leur érosion progressive peut conduire à un processus de sénescence répliquative prévenant la prolifération cellulaire incontrôlée [188] [432]. Cependant, les mécanismes à l'origine de la variabilité et de la dynamique de ce processus n'ont pas encore été

caractérisés à l'échelle de la cellule unique.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'activité enzymatique de la télomérase permet normalement d'allonger les télomères et donc de maintenir l'intégrité du génome [433]. En revanche, chez les mutants n'exprimant pas la télomérase, un raccourcissement des télomères suivi d'un état de sénescence répllicative a été observé [434]. Curieusement, certaines cellules sortent de cet état sénescence, par réactivation de la télomérase ou par des mécanismes de recombinaisons [435] [436]. Chez les mammifères, de tels variants sont précurseurs de cellules cancéreuses [437]. Ainsi, la compréhension des mécanismes à l'origine du processus de sénescence induite par le raccourcissement des télomères chez la levure pourrait permettre d'expliquer la relation entre le dysfonctionnement des télomères et la carcinogénèse.

Étude de l'entrée en sénescence par raccourcissement des télomères à l'échelle de la cellule unique

Dans l'article présenté en annexe B, Xu *et al.* ont étudié la sénescence répllicative induite par le raccourcissement des télomères après inactivation de la télomérase dans des lignées uniques grâce au dispositif CLiC. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la division est asymétrique et une cellule mère produit un nombre limité de filles avant de mourir. Ce phénomène se produit sans inactivation de la télomérase [1]. Le but étant ici d'étudier le vieillissement réplcatif dépendant des télomères, pour éviter toute interférence entre les deux phénomènes, il est préférable d'observer l'effet de l'inactivation de la télomérase dans une lignée a priori immortelle, *i.e.* une lignée de cellules filles (figure 54 A). Lorsque le gène codant pour la protéine Bud4 (homologue de l'anilline se liant aux protéines du cytosquelette [438]) est muté, le pattern de bourgeonnement axial décrit en figure 51 C est modifié [439]. Il devient alors aléatoire, s'approchant d'un pattern alterné, et permet ainsi de suivre les filles successives d'une lignée au sein du CLiC (figure 54 B & C).

Dans la plupart des lignées, il existe une transition abrupte et irréversible d'un état de réplication à un état où la division est stoppée (*cf.* annexe B - figure 2), contrastant avec l'idée d'une transition progressive. Cependant, dans certaines lignées, peu après l'inactivation de la télomérase, on observe des arrêts réversibles du cycle cellulaire dus au point de contrôle des dommages de l'ADN, après lesquels le cycle reprend grâce à une réparation par recombinaison homologue (*cf.* annexe B - figure 5 c & d). L'hétérogénéité intrinsèque de l'entrée en sénescence semble principalement découler de dommages aléatoires des télomères qui nécessitent l'expression de la télomérase ou un mécanisme de recombinaison homologue pour être réparés.

Cette première étude s'est limitée à la quantification des temps de division dans des cellules sauvages et mutantes pour la réparation des dommages de l'ADN, en présence et en absence de télomérase. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la transition abrupte vers un état de sénescence clonale, des études complémentaires impliquant la quantification de marqueurs fluorescents seraient nécessaires. Le suivi des protéines Rad52-GFP (recombinase impliquée dans la réparation des cassures double-brin) et Sml1-GFP (inhibiteur de la réductase des ribonucléotides impliqué dans la régulation de la production de dNTP), marqueurs du point de contrôle des dommages de l'ADN, pourraient par exemple être informatif.

Ma contribution personnelle pour l'obtention de ces résultats s'est limitée à assister Zhou Xu dans la duplication du dispositif expérimental développé au sein de notre laboratoire.

Bien que le dispositif présenté permette en l'état d'étudier l'entrée en sénescence à l'échelle de la cellule unique, certaines améliorations y ont été apportées, notamment en ce qui concerne la quantité de cellules suivies au cours d'une expérience.

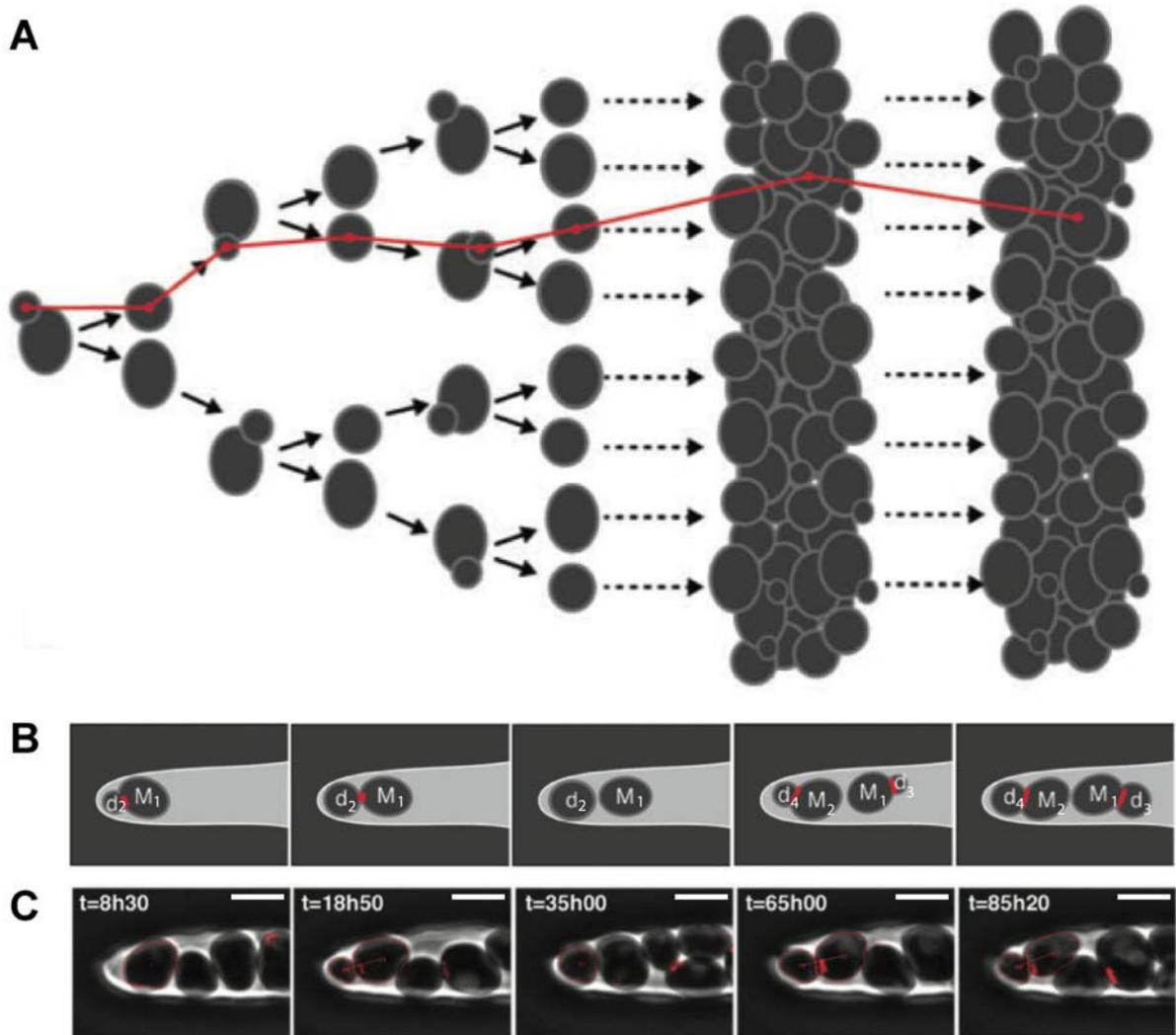


FIGURE 54 – Analyse de lignée unique grâce à la puce CLiC. A) Schéma d'une lignée (en rouge). Partant d'une cellule unique, une lignée a priori immortelle est suivie grâce à l'observation des filles successives (ou jeunes mères) à chaque division. B) Schéma montrant le comportement de la cellule en fond de cavité. Le bourgeon est le plus souvent dirigé vers le fond permettant de suivre la cellule fille (d) et non sa mère (M). Le marqueur Cdc10-mCherry représenté en rouge permet de suivre la progression dans le cycle cellulaire et de déterminer les relations mères/filles. C) Séquence d'images d'une lignée exprimant la télomérase. Superposition des images de contraste de phase et de fluorescence Cdc10-mCherry (rouge). Barre d'échelle : 5 μm .

4.3 Améliorations du dispositif et perspectives

Améliorations apportées au dispositif

Nous avons cherché à maximiser le nombre de cellules suivies au cours d'une expérience tout en conservant les cavités de 6 μm de large du dispositif précédent. La vitesse de déplacement des platines de microscope et le temps nécessaire à l'acquisition des images limitent le nombre de champs de vue que l'on peut acquérir. Pour augmenter le nombre de cellules suivies au cours d'une même expérience, il est donc crucial de maximiser la densité de cavités au sein d'un champ

de vue. Dans ce but, les zones de piégeages perpendiculaires aux canaux d'approvisionnement (figure 55 A - gauche) ont été remplacées par des zones de piégeages parallèles à ces canaux (figure 55 B - gauche). Ceci a permis d'augmenter la densité des cavités de 2 à 26 par champ de vue (pour un grossissement 60X et une caméra ORCA-Flash4.0 - Hamamatsu) sans pour autant limiter l'apport en nutriment aux cellules (figure 55 - flèches vertes).

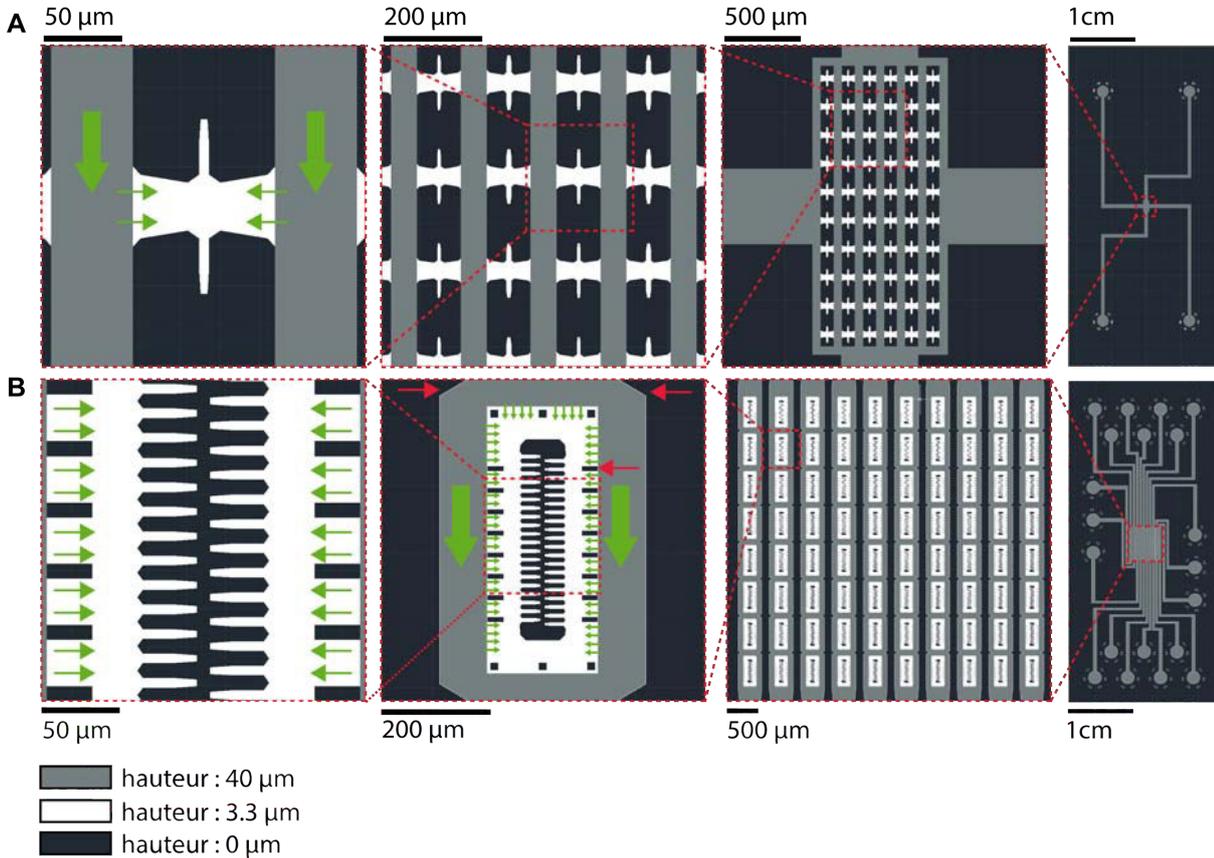


FIGURE 55 – Comparaison du dispositif original et du dispositif amélioré. A) Dispositif CLiC original à différentes échelles. Gauche : zoom sur une zone de piégeage et ses 2 cavités. Taille correspondant à un champ de vue (grossissement 60X). Apport de milieu et élimination des cellules par les canaux verticaux (flèches vertes épaisses) et par diffusion/convection (flèches vertes fines). Centre gauche : grille de zones de piégeage connectées par des canaux d'approvisionnement perpendiculaires à ces zones. Centre droit : Canaux d'approvisionnement et de chargement à la perpendiculaire. Droite : Vue de l'intégralité de la puce. B) Dispositif amélioré aux échelles correspondantes à A. Gauche : zoom sur un champ de vue (grossissement 60X) permettant d'imager 26 cavités. Flèches vertes : apport de milieu par diffusion/convection. Centre gauche : bloc de cavités avec zones de piégeage parallèles aux canaux d'approvisionnement. Flèches vertes épaisses : apport de milieu et élimination des cellules. Augmentation du piégeage par déviation des canaux d'approvisionnement en amont du bloc et présence de déflecteur (flèches rouges). Centre droit : 10 séries indépendantes de 8 blocs permettant de suivre 10 × 200 cellules au cours d'une même expérience. Canaux d'approvisionnement et de chargement confondus. Droite : Vue de l'intégralité de la puce permettant de réaliser 10 conditions différentes au cours d'une même expérience.

L'organisation en 8 blocs en série (figure 55 B - centre droit - séries verticales) avec une

déviations des canaux d’approvisionnement en amont et en aval de chaque bloc ainsi que l’ajout de déflecteurs dans les zones de piégeage (figure 55 B - centre gauche - flèches rouges) permet d’optimiser le chargement des cellules qui colonisent l’intégralité des cavités en 12 à 24h. De plus, 10 séries indépendantes de 8 blocs permettent de tester 10 conditions expérimentales différentes (souches ou milieu différents) au cours d’une même expérience (figure 55 B - centre droit).

Avec ce nouveau dispositif, on peut désormais suivre le vieillissement d’environ 2000 cellules en 7 jours, avec la possibilité de créer 10 groupes indépendants de 200 cellules, alors que la puce précédente permettait uniquement de suivre 60 cellules pour une condition donnée sur la même période.

Le développement de cette version améliorée du CLiC a été initié par Steffen Fehrmann et moi-même (création de puces test et simulations réalisées avec le logiciel commercial COMSOL Multiphysics® montrant l’intérêt des déflecteurs pour le chargement). L’optimisation des dimensions des zones de piégeages, l’idée de créer des blocs en série et le développement du dispositif final (fabrication, tests...) ont été réalisés par Sandrine Morlot, chercheuse post-doctorante du laboratoire.

Perspectives

L’amélioration du rendement du dispositif d’un facteur 30 permet de suivre jusqu’à 2000 cellules uniques de la naissance jusqu’à la mort. Pour étudier quantitativement le vieillissement, le prochain défi consiste à développer une analyse automatisée des images réalisées. Nous souhaitons par exemple être capable, à partir des données brutes, de générer automatiquement des courbes de RLS ou mesurer systématiquement les temps de division pour détecter l’entrée en sénescence. De telles méthodes d’analyse, tirant profit du marqueur nucléaire Htb2p, sont actuellement en cours de développement.

Troisième partie

Article : Establishment of asymmetrical
distribution of protein aggregates
during stress and aging in *S.Cerevisiae*

Establishment of asymmetrical distribution of protein aggregates during stress and aging in budding yeast

Camille Paoletti, Sandrine Morlot and Gilles Charvin*

Affiliation:

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch Cedex

*: corresponding author : charvin@igbmc.fr

Abstract

Budding yeast cells have a limited replicative life span: a mother cell can produce a limited number of daughter cells before it slows down its division and dies. It has been proposed that the progressive accumulation of aggregates of damaged proteins within mother cells drives cellular entry into senescence. The retention of such damages by mothers is thought to permit the rejuvenation of the daughter lineage. Yet the mechanism of their asymmetrical segregation is still controversial, in part because of difficulties inherent to the tracking of the dynamics and fate of protein aggregates *in vivo*. In this context, we have developed a single cell methodology to track the formation of protein aggregates upon heat shock in unperturbed dividing cells. In combination with a simple computational model of protein aggregation, our data reveal that the establishment of an asymmetrical repartition of protein aggregates upon division can be explained quantitatively by the polarized growth of the bud. In addition, replicative aging experiments performed in a microfluidic device suggest that the accumulation and retention of protein aggregates in mothers may be responsible for cell death, but only under particular proteotoxic stress. Therefore, this study sheds new light on the mechanism of inheritance of protein aggregates and its contribution to replicative aging in budding yeast.

Introduction

Protein aggregation is a hallmark of many age-related degenerative diseases (Lindner and Demarez, 2009). The accumulation of misfolded proteins into large clusters is thought to impair with normal cellular physiology. Protein aggregation is also thought to play an important role in the aging process of unicellular organisms (Aguilaniu et al., 2003; Lindner et al., 2008; Winkler et al., 2010).

In budding yeast, which divides asymmetrically, mother cells generate buds that eventually become daughter cells after division. It has long been observed that a mother cell can produce a limited number of daughter cells, roughly 20-30, before it enters replicative senescence and ultimately dies (Mortimer and Johnston, 1959), daughters of aging mothers are born with full replicative potential (Kennedy et al., 1994) and recover a normal physiology (Egilmez and Jazwinski, 1989), which implies an unknown rejuvenation process. Therefore, it was postulated that senescence might arise as a consequence of the progressive accumulation in mothers of deleterious factor(s), which are not

transmitted to their progeny. More recently, it was shown that aging cells undergo a sharp transition to a slow replicative state - the senescence entry point (SEP) -, which suggests a threshold effect of the cellular response with respect to the accumulation of damages (Fehrmann et al., 2013).

Over the last fifteen years, several potential aging factors were identified, including extra-chromosomal rDNA circles (Sinclair and Guarente, 1997) and dysfunctioning mitochondria (Hughes and Gottschling, 2012; McFaline-Figueroa et al., 2011; Veatch et al., 2009). In addition, it was shown that carbonylated proteins tend to accumulate within mother cells (Aguilaniu et al., 2003). These proteins form large amorphous aggregates, the asymmetrical mother/daughter segregation of which is directly controlled by chaperones expression level and the pleiotropic longevity regulatory gene *SIR2* (Erjavec et al., 2007).

Recently, important mechanistic insights were discovered about the process of aggregates segregation, which has been thoroughly debated and refined in a subsequent series of cellular biology studies: first, protein aggregates present in the bud following heat shock were shown to undergo a retrograde transport to the mother cell through polarized actin cables (Liu et al., 2010a). These results lead to propose the existence of an active spatial protein quality control mechanism, which helps maintain daughters aggregates-free upon mitosis, and might be involved in the rejuvenation process observed in the progeny of aging mothers (Liu et al., 2011).

This scenario was later challenged by Zhou et al, who did not observe any bias in the transport of aggregates through the bud neck (Zhou et al., 2011). In addition, based on quantitative measurements of the diffusion of aggregates, the authors showed that their retention within mother cells can be explained by physical arguments, *i.e.* the slow and anomalous diffusive properties of these large structures in a confined environment, which makes their transport through the bud neck very unlikely on cell cycle timescales (Zhou et al., 2011). This conclusion was further supported by a recent theoretical study investigating the transport properties of cellular materials in various cell biology contexts (Kinkhabwala et al., 2014) and experiments in bacteria which lead to similar explanations (Coquel et al., 2013; Winkler et al., 2010).

However, it has been previously shown that amorphous aggregates are not freely diffusing within the cytosol, but are rather targeted to peri-nuclear or peri-vacuolar compartments called JUNQ and IPOD respectively (Kaganovich et al., 2008). Such a tethering of aggregates to these large structures was proposed to explain the origin of their limited diffusive properties and, most importantly, to drive their asymmetrical inheritance in yeast (Spokoini et al., 2012). Interestingly, a subsequent study further supported the idea that aggregates retention is mediated by their localization to subcellular organelles (Zhou et al., 2014). However, instead of a peri-vacuolar localization, it revealed that protein aggregates formed upon various proteotoxic stresses are associated either with the endoplasmic reticulum (ER), mitochondria or at the interface of these two structures. In this model, the

asymmetrical segregation of mitochondria-bound aggregates would be achieved thanks to the biased splitting of mitochondrial clusters between the mother and its bud, that remains to be understood.

Therefore, the picture that emerges about the mechanism of segregation of protein aggregates remains blurry. This situation may originate from several independent factors: despite the use of co-localization assays using high resolution imaging techniques, the complex aggregation kinetics of misfolded proteins, which involves the recruitment of a large number chaperones proteins, is superposed with the active dynamics of cellular organelles (such as mitochondria). It is still unclear whether aggregates are generated directly on their target organelles, as proposed recently (Zhou et al., 2014), or, alternatively, if the generation and fusion of small aggregates occurs before the recruitment to specific compartments (Spokoini et al., 2012). This distinction may have strong consequences regarding their ability to segregate between mother and bud.

Previous studies used one or several proteotoxic stress to destabilize protein conformation or the protein quality control machinery and to trigger the formation of aggregates. The dynamics or localization of aggregates was then assessed following a recovery period (typically 30min). Importantly, although it is essential to mark the difference between the establishment and the maintenance of the biased localization of aggregates, this distinction is generally – except in (Hill et al., 2014) - precluded by the fact that the budding state of the cells is unknown at the time of heat-shock when using classical techniques. Notably, the model of cytoskeleton-driven transport of aggregates proposes an active mechanism of segregation between the two compartments (*i.e.* it addresses the *establishment* problem) (Liu et al., 2010a), while any other study focused on the retention of pre-existing aggregates within mothers (*i.e.* they explain the *maintenance* issue) (Zhou et al., 2011). In addition, such static snapshots of the aggregation pattern assayed after cell recovery does not let one distinguish the resolution/clearance versus the segregation of PAs. Therefore, a specific methodology is needed to monitor cell fate during as well as after the stress in order to disentangle the respective contributions of establishment, maintenance and clearance of a biased PAs repartition.

Another concern is related to the use of experimental strategies to mimic the formation of aggregates that may be formed naturally during aging. Despite the resemblance in the behavior of aggregates induced by heat stress and aging (Zhou et al., 2011), it is striking that their co-localization to mitochondria is lost in aged mothers, possibly because of altered mitochondrial dynamics (Mogk and Bukau, 2014). Another study emphasized the distinction between the very motile stress foci induced by proteotoxic stress and aggregates that are targeted to specific subcellular compartments (Spokoini et al., 2012). Solving this conundrum requires to monitor the emergence and the inheritance of aggregates in single cells during aging. In addition, direct evidence that PAs is causally related to cell death remains to be established in order to confirm the accumulation of PAs as a valid paradigm for replicative aging in budding yeast. Notably, in other organisms, several studies investigated these

questions by measuring the impact of the accumulation of aggregates on cellular fitness (Lindner et al., 2008; Winkler et al., 2010).

To overcome technical limitations and to address the subsequent controversies described above, we have developed a biophysical assay to trigger and to monitor the kinetics of formation of protein aggregates in real-time with single cell resolution under the microscope. Combined with a computational model of protein aggregation, our data clearly reveal that the establishment of Mother/Daughter bias in aggregates concentration arises from the polarized growth of the bud during the S/G2 phase of the cell cycle and is maintained throughout the cell cycle due to the kinetic limitations associated with the transport of large protein clusters through the bud neck. In addition, we have used a microfluidic device to track the formation of aggregates during the lifespan of individual mother cells. These experiments reveal that protein aggregation, which is observed sporadically, does not follow the model of progressive kinetics of accumulation in physiological conditions at 30°C. However, destabilizing the proteome using mild heat shock at 37°C induces premature aging that can be linked to the formation of PAs and suggests a specific route to cell death.

Results

Unequal accumulation of PAs in mother and buds following heat-shock

To overcome the technical limitations associated with the assessment of the mother/bud aggregates segregation bias described above, we have developed a new strategy to track the dynamics of protein aggregates in real-time with single cell resolution. Using the classical Hsp104-GFP marker to stain protein aggregates (PAs), we monitored the formation of fluorescent foci upon fast switching to a mild temperature stress (38°C) in cells growing in a microfluidic device (Fig 1A, S1 and suppl.) (Uhlendorf et al., 2012). Unlike the severe 42°C heat shock which induces a complete growth stall and requires a recovery period before observation ((Liu et al., 2010a; Zhou et al., 2011) and data not shown), a fast switch to 38°C was found to induce a noticeable but short and transient cell growth arrest (Fig S2), and yet was sufficient to induce the massive formation of PAs (Fig. 1B and movie M1). Therefore, as the division process was not significantly affected during this procedure, we could investigate the establishment of a segregation bias in budded cells upon heat shock.

We quantified both the number of foci and the fluorescence level in foci over time using a custom MATLAB-based image processing pipeline (Fig. 1C, S3 and suppl.). Notably, we found that number of foci, which peaked on average at 2.6 ± 0.1 (N=265 cells) 10 minutes after heat shock, declined to about one focus after 30 minutes (1.2 ± 0.05), thus revealing the kinetics of fusion of small PAs into larger ones. This process was concomitant with the progressive increase in total fluorescence in foci (after subtraction of cytoplasmic level - Fig. 1C).

Using Cdc10-mCherry as a marker of budding and division (Fig 1B), we measured the cellular concentration of aggregated proteins [PA] in every mother/bud (M/B) pairs that was already present

upon heat shock (HS) at several subsequent timings (see Fig. 2A and 2B). First, right after HS, we found that [PA] (Fig. 2B, left panel) in buds ($[PA]_B$) and in mothers ($[PA]_M$) were not significantly different (Wilcoxon test, p -value= 0.29) with a median ratio $[PA]_B/[PA]_M$ of 1.2 (Fig. 2C). Importantly, this allowed us to rule out the hypothesis that foci would be preferentially formed in mothers. Yet, although the fluorescence increased in both compartments upon division (p -value= 3.10^{-9} Fig. 2B), the $[PA]_B/[PA]_M$ median ratio upon cell division dropped to a significantly lower value of 0.5 (p -value=0.002). This result clearly indicated that an asymmetrical repartition of PAs is established during the budded phase of the cell cycle following heat shock.

However, since cells were unsynchronized, we reasoned that the extent of asymmetrical distribution of aggregates might be strongly dependent on the initial phase of the cell cycle upon heat-shock. Indeed, plotting the $[PA]_B/[PA]_M$ ratio as a function of bud size upon heat-shock revealed that small-budded cells experienced a much larger segregation bias than large-budded ones (Fig. 2D and 2E). Interestingly, this observation was consistent with the active transport model that proposed that PAs transport from B to M occurs preferentially in small-budded cells, due to the presence of numerous actin cables during the polarized growth in S phase (Liu et al., 2010a). Yet, we noticed that the HS-to-division interval displayed a strong negative correlation with initial bud size, most likely because large budded-cells upon HS were close to division (Fig. 2F). Therefore, no matter the mechanism of establishment of unequal PAs concentrations between M and B, the absence of asymmetrical segregation upon division could alternatively reflect the short timing allowed for this process to occur.

To solve this conundrum, since our temporal resolution did not allow us to precisely measure the transport of PAs through the budneck, we further quantified the establishment of unequal repartition of aggregates after grouping cells by initial bud size, in order to average out fluctuations (Fig. 2G-H). We noticed that division timings of originally small-budded cells was not only delayed (compared to large-budded ones) because of the growth requirements associated with cell cycle completion, but also because these cells specifically experienced an unexpected size-dependent transient growth arrest following heat-shock (Fig. 2G and 2F inset). Most importantly, the concentration of PAs was strongly reduced in initially small buds and somewhat proportional to its size upon HS (Fig. 2I), unlike the mother compartments that displayed consistent accumulation of PAs (Fig. 2J). Similarly, the average number of foci following heat shock in buds was strongly dependent on its initial size (Fig. 2K) and strikingly different from their mothers (Fig. 2L). These data suggested that bud growth during the budded period of the cell cycle could be the major determinant of PAs asymmetry upon division.

Polarized growth drives PAs asymmetrical repartition upon division

To test this hypothesis, we turned to a computational model integrating both the formation and the fusion of PAs and the dynamics of cell growth following heat shock. Importantly, whereas physical arguments based on limited diffusion in a crowded environment (Coquel et al., 2013; Kinkhabwala et al., 2014; Winkler et al., 2010) or because of tethering to specific organelles (Kaganovich et al., 2008;

Spokoini et al., 2012; Zhou et al., 2014) can successfully describe the maintenance of unequal concentrations of PAs across the budneck, none of them can explain how a difference in PAs concentration can emerge during the budding process.

Therefore, we simulated the formation and fusion of protein aggregates within a cell using the framework developed by (Laurenzi et al., 2002), which was recently used to model the distribution of protein aggregates in fission yeast cells (Coelho et al., 2014). The aggregation of misfolded proteins was represented by an “aggregation kernel” which describes the frequency of fusion of particles of different sizes (see suppl. mat. for extended details). A major interest of this strategy is that it bypasses the spatial description of aggregates diffusion, which is cumbersome and computationally intensive. Using the Gillespie algorithm, we computed the stochastic kinetics of accumulation of PAs in cellular compartments, assuming that their size evolved according to Fig. 2G-H. We purposely decided to neglect the diffusion of particles through the bud neck, knowing that its kinetic rate is low enough to largely prohibit transport across compartments (Kinkhabwala et al., 2014). This hypothesis was also motivated by the observation that increasing the size of the bud neck by knocking out *BNI1* did not affect the ratios of PAs concentrations between mother and buds (data not shown).

In agreement with experiments, we also introduced a particle visibility threshold such that small PAs would be considered as invisible until they reach a specific size (the assignment of parameters value is explained in suppl. mat.). Last, we modeled the formation of individual misfolded proteins as a first order process, the rate of which declines with time following HS.

Strikingly, we observed that such a simple framework (with only 4 parameters related to protein aggregation) was sufficient to describe both the evolution of the number of aggregates and the concentration of aggregated proteins as a function of time in small and large buds, as well as in mother cells (Fig. 3A-C). In particular, it successfully captured the very low concentration of fluorescence in PAs in initially small buds, which leads to a strong asymmetrical repartition of aggregates between mother and buds upon division.

To evaluate the importance of cell growth on the dynamics of PAs accumulation, we set the growth rate to 0 in the simulation. Under these conditions, we observed that the difference in PAs concentration between mother and buds was completely abolished (Fig 3D-F). To check this prediction experimentally, we run the same HS experiment at 40°C. Under these conditions, bud and mother growth were almost completely arrested (Fig. 3G-H), and the difference in PAs fluorescence concentration between mother and bud was indeed greatly reduced (Fig. 3I-J). In addition, we reasoned that the sharp switch from strongly polarized to non-polarized bud growth by the end of S phase should strongly impact the dynamics of accumulation of PAs. In line with this, by synchronizing the temporal traces with respect to cell division, we saw that emergence of PAs in buds that were initially small was strictly concomitant with the switch to slow growth (Fig. 3K-L). In contrast, initially larger buds in which the drop in growth rate was small did not display any significant change in PAs

accumulation rate. Interestingly, this dilution effect during polarized growth also provides a simple explanation to the observation that foci are apparently nucleated in the bud late in the cell cycle for mother cells that were initially unbudded upon HS (data not shown). Altogether, these results demonstrate that the bias in PAs accumulation is driven by the strong polarized growth during the budded period of the cell cycle, and is maintained by the limited transport of PAs across the bud neck.

Dynamics of accumulation of protein aggregates in aging mother cells

Most experiments describing the segregation and the accumulation of protein aggregates in yeast are based on static snapshots of a population of stressed or aged mother cells (Hughes and Gottschling, 2012; Liu et al., 2010a; McFaline-Figueroa et al., 2011; McMurray, 2003; Veatch et al., 2009; Zhou et al., 2014). In order to get direct insights into the dynamics of protein aggregation over long timescales and its consequences on cell fate, we monitored the successive divisions of individual mother cells trapped in small cavities within a microfluidic chip. Compared to a previous design of this setup, which allowed us to track up to 60 cells in parallel (Fehrmann et al., 2013), we scaled the number of cavities up to 3200, thus considerably increasing the throughput of data acquisition (Fig. S4). Cells were loaded in the “trapping area” (Fig. S4E) of the device and progressively (within ~24h) entered the cavities. Phase contrast and fluorescence image acquisition of Hsp104-GFP cells was performed every 10 minutes during 150 hours.

By tracking the contours of mother cells at the tip of the cavity and after quantification of the fluorescence signal and division timings, we first observed that cells could be split in two subpopulations with very different levels of cytoplasmic Hsp104-GFP (Fig. 4A-B). A few cells (about ~30%, n=12/38) experienced a large upregulation of Hsp104 that was concomitant with cell cycle slow down towards the end of the lifespan, whereas the vast majority (~ 70%, n=26/38) of cells displayed much milder expression (Fig. 4C). Still, in both cases, Hsp104-GFP cytoplasmic level was larger towards the end of the lifespan (Fig. 4A-B), as previously described (Zhang et al., 2012).

We hypothesized that the heterogeneity in Hsp104-GFP level across the population could be due to the presence of *petite* cells (Fehrmann et al., 2013), which are frequent in the BY4741 strain background (Dimitrov et al., 2009) and may have a specific stress response phenotype. Indeed, by using the import of the preCox4-mCherry marker within mitochondria as a readout for mitochondrial membrane potential (Veatch et al., 2009), we noticed that the loss in mitochondrial localization of preCox4-mCherry that occurred sporadically in some aging mothers was systematically accompanied by a sharp rise of Hsp104-GFP level (data not shown) and both signals displayed an overall negative correlation (data not shown). We concluded that cells with high cytoplasmic Hsp104-GFP were *petite* cells and we decided not to focus on this particular population in the remaining of our study.

Whereas the cytoplasmic level of Hsp104-GFP displayed limited yet visible modulations during the lifespan of aging mothers (Fig. 4A), the quantification of fluorescence in Hsp104-GFP foci revealed

that none of the 20 cells analyzed experienced any age-dependent accumulation of protein aggregates (see 5 trajectories displayed on Fig. 4D). However, the sporadic emergence of foci (Fig. 4A) clearly indicated that the absence of foci was not due to a fluorescence sensitivity issue. Interestingly, this observation stood in striking contradiction with a number of studies in which the systematic presence of protein aggregates was reported in 10 generations-old mothers and beyond (Erjavec et al., 2007; Unal et al., 2011; Zhou et al., 2011; 2014). Since protein aggregation in aging mother cells is assayed using a cohort of sorted cells, it might lead to different results than when using direct live cell imaging and microfluidics. Similarly indeed, a recent study investigating the effect of caloric restriction on longevity using a microfluidic device challenged the view that any lifespan extension is observed under these conditions (Huberts et al., 2014).

Therefore, in order to evaluate the effect of accumulation of protein aggregates on long-term physiology and longevity, we shifted the temperature to 37°C in order to induce a slight destabilization of the proteome. Under these conditions, the presence of aggregates in aging mothers was clear from the first divisions on (Fig. 4E-F), and single cell trajectories revealed a clear yet variable accumulation of fluorescence in PAs throughout the lifespan (Fig. 4F). Averaging over all trajectories further revealed a linear accumulation during most of the lifespan (Fig. 4G). Interestingly, whereas the cell cycle duration underwent only a mild increase upon the shift to 37°C (Fig. 4H – Wilcoxon test, p -value= 2.10^{-9}), cell fate was greatly affected: first, cells died prematurely (RLS=18.0 at 37°C vs 32.5 at 30°C, $n=28$ and 30 , see Fig. 4I). In addition, they did not experience any entry into a slowly replicative state before death – no SEP (Fig. 4J – Chi2 test, p -value= 6.10^{-3} , and the vast majority of them (100%) died in G1 (compared to about 53% at 30°C - Chi2 test, p -value= 6.10^{-4}), see Fig. 4K. However, the cells did not seem to die following stochastic failures: indeed, a random cell death model would predict an exponential decay of survival with age, unlike the experimental data (Fig. 4I). Altogether, these results suggested that, under specific conditions in which the proteome is destabilized by mild temperature stress, the accumulation of protein aggregates may be the factor that limits longevity. Yet, in this case, the path leading to senescence seems to be very different from the one observed at lower temperature, at which barely any aggregate is visible.

Inheritance of PAs by daughters of aging mothers

A striking feature of the daughters of aging mother is their ability to recover a full replicative lifespan, *i.e.* undergo a rejuvenation process. This property implies that any relevant aging factor be not inherited by the daughter cell upon division. We investigated the segregation of PAs in aging cells growing at 37°C in order to quantify a potential biased repartition. Our observations were very consistent with the short-term heat-shock experiments presented above: large PAs were systematically retained by mother cells (rate of leakage to daughter < 6% over the whole lifespan, Fig 5A), whereas small ones eventually leaked into the daughter cells (rate of at least one event of leakage to daughters ~ 44%). In addition, spontaneous nucleation of small PAs occurred in daughters at the end of the cell cycle (Fig. 5B), in a similar manner as described in Fig 3. Therefore, following the

direct observation of the PAs inheritance, we concluded that, under specific conditions in which the proteome is destabilized, the accumulation of PAs is in good agreement with the yeast replicative aging paradigm.

Discussion

In this work, we combined live cell imaging with microfluidics to address the question of asymmetrical segregation of PAs between mother and daughter in budding yeast. Unlike previous studies which are based on a static analysis of the spatial repartition of aggregates and their interactions with subcellular organelles (Liu et al., 2010b; Mogk and Bukau, 2014; Spokoini et al., 2012; Zhou et al., 2014), we focused specifically on the real-time kinetics of accumulation of PAs on both short (*i.e.* cell cycle) and long (*i.e.* lifespan) timescales. Therefore, we could directly investigate contradicting models of establishment and maintenance of the segregation bias, as well as its consequences on cellular longevity.

Previous works clearly demonstrated that slow and anomalous diffusion of PAs within cellular compartments prevents them from being passively transported to the bud on cell cycle timescales (Kinkhabwala et al., 2014). In that framework, while the maintenance of an asymmetrical segregation derives from the limited diffusion of these large inclusion bodies and geometric constraints, the question of its establishment using physical arguments has never been considered. Our methodology, which allowed us to investigate this issue by monitoring the formation and the fusion of PAs in unperturbed dividing cells, clearly underlines that it is necessary and sufficient to take bud growth into account in order to explain the difference in PAs concentration in mother and bud upon division. In fission yeast, the fusion of aggregates into one unique structure was shown to promote the asymmetrical segregation into one of the two sibling cells, whereas the other was born free of aggregates (Coelho et al., 2014). In our study, while the fusion of aggregates is essential in order to slow down the diffusion of aggregates and limit the transport through the budneck, the main mechanism that generates the asymmetry in concentration is the polarized growth of the cell.

Following up on initial studies proposing that PAs are recruited to various subcellular compartments (Kaganovich et al., 2008) there is a growing body of evidence showing that PAs may be associated with mitochondria (Zhou et al., 2014) and the ER (Song et al., 2014). Yet, our data indicate that the aggregation process following heat shock seems to be accurately described by a coalescence model based on free particle diffusion. This apparent contradiction can be solved knowing that mitochondria undergo very dynamic fusion/fission events, so that the apparent dynamics of PAs resembles the one of diffusing particles. However, further quantitative studies would be necessary to precisely determine whether the kinetics of fusion of aggregates is limited by crowded diffusion of particles or by the intrinsic dynamics of clusters of mitochondria.

Our study provides the first direct test of the protein aggregates model as a cause of replicative aging in yeast. Unexpectedly, we were unable to observe neither the formation nor the progressive accumulation of PAs in aging mothers at 30°C, despite the numerous studies that reported it as a hallmark of aging. Interestingly, while previous work reporting microfluidics-based life span assays used Hsp104-GFP as marker of stress, the presence of aggregation foci was not mentioned (Zhang et al., 2012). We hypothesize that the treatment used to sort aged mothers (which include a cold shock and a re-suspension in PBS) may induce a proteome stress that may be exacerbated in old cells, thus leading to the durable appearance of PAs. Indeed, a shift to a higher temperature in the microfluidics device allowed us to recapitulate the accumulation and the retention of aggregates within mothers during the lifespan, therefore causing premature aging of the cells. Interestingly, the death of cells, which occurred predominantly in G1 with no prior cell cycle slow down, did not resemble the classical route to senescence observed at 30°C. Therefore, these results suggest that the accumulation and retention of PAs in mothers may be responsible for cell death only under particular proteotoxic stress (Coelho et al., 2013).

Materials and Methods

Strains and plasmids

All strains used in this study are, unless specified, congenic to S288C. The strain carrying a Hsp104-GFP fusion was purchased from Invitrogen and the *bni1* deletion mutant from Euroscarf. The CDC10-mCherry fusion is a gift from the Jeremy Thorner lab (Berkeley University, USA) and the HTB2-mCherry fusion from the Pascal Hersen lab (Paris Descartes University, France). The preCox4-mCherry marker was generously provided by Dan Gottschling (FHCRC, USA). The SEY6210 strain carrying a VPH1-mCherry fusion protein was provided by Scott Emr (Cornell University, USA). Other strains were generated by crossing and scored by tetrad dissection according to standard techniques.

Microfabrication

The H microfluidic master was made using reactive ion etching (Bosch process) whereas the aging microfluidic master was made using standard soft lithography techniques using SU-8 photoresist and custom polymer masks (Selba, Switzerland). Prototypic moulds were replicated in epoxy as previously described (Burgoyne 2009). The corresponding microchannels were casted by curing PDMS (Sylgard 184,10:1 mixing ratio) and then covalently bound to a 24x50mm coverslip using plasma surface activation (Diener, Germany).

Time-Lapse Microscopy

Freshly unfrozen cells were grown overnight at different dilutions. In the morning, log phase cells (OD~0.2 to 0.5) were transferred in the microfluidic device.

Heat-shock experiments were started 4 to 6 hours later. We used constant media perfusion (synthetic complete with 2% of glucose, SCD) of the device using a peristaltic pump (Ismatec, flow rate: 25

microliters/min) during the course of the experiments. Cells were imaged using an inverted Zeiss Axioobserver Z1 microscope. Constant focus was maintained using an homemade focus stabilization software to approximately find the right position combined to a commercial focus stabilization hardware (Definite Focus) to find the accurate focus. Fluorescence illumination was achieved using LED light (precisExcite, CoolLed), and light was collected using a 100x N.A. 1.4 objective and an EM-CCD Luca-R camera (Andor). The camera was triggered on the precisExcite module using a TTL signal. We used an automated stage in order to follow up to 5 positions in parallel over the course of the experiments. We built a custom sample holder with thermoelectric modules and an objective heater with heating resistors to precisely control the temperature in the chip and perform heat-shocks during the course of the experiments (see suppl. information). Image acquisition was performed every 3 minutes, to be able to follow aggregates. Cells were followed over up to 240 frames, which represents 12 hours of continuous image acquisition.

Aging experiments were started 8 hours after cell loading. We used the same media perfusion process than described above with a lower flow rate (12 microliters/min). Cells were images using an inverted Nikon Eclipse Ti microscope. Constant focus was maintained using a commercial focus stabilization hardware (Perfect Focus). Fluorescence illumination was achieved using a continuous spectrum (Lumencor) and light was collected using a 60x N.A. 1.4 objective and a CMOS ORCA-Flash camera (Hamamatsu). We used an automated stage in order to follow up 20 positions in parallel over the course of the experiments, which represent 540 aging cavities at once. As for the heat-shock experiment, we built a custom stage holder and an objective heater to maintain the chip at 30°C. Image acquisition was performed every 10 minutes, in order to minimize fluorescence illumination. Cells were followed over up to 1000 frames, which represents 7 days of continuous image acquisition.

Image Analysis

Raw images were processed using custom software called phylocell using Matlab and the image processing toolbox (Fehrmann et al., 2013). Phylocell was designed to segment cell contours based on phase contrast images, localize specific organelles (such as nucleus, mitochondria or vacuole) and aggregates based on fluorescence images, track cells over time and retrieve the fluorescence within the cells. A complete graphical user interface (GUI) assists the user with segmentation/tracking error corrections. This software is freely available upon request.

Mathematical model for establishment of asymmetry by cell growth

See the Supplemental Experimental Procedures for the detailed model used to explain establishment of PAs asymmetry.

Acknowledgments

Figure Legends

Figure 1 – Monitoring the induction of heat-induced protein aggregates in real-time

(A) Sketch of the setup. Cells are grown in chambers on a microfluidic chip and fed by diffusion using media perfusion channels (Kinkhabwala et al., 2014; Uhlendorf et al., 2012). *In situ* heat-shocks are performed with custom heating stage and objective heater. (B) Sequence of phase contrast and fluorescence (Hsp104-GFP and Cdc10-mCherry) images obtained at indicated timings during a heat-shock from 30°C to 38°C. Yellow contours represent cell contours on fluorescence images and red line highlight the position of protein aggregates. Scale bar: 5 micrometers. (C) Quantification of the kinetics of protein induction. Upper panel: actual stage temperature. Middle panel: 2D-histogram of the distribution of foci number per cell as a function of time. White line indicates the mean number of foci per cell. Lower panel: 2D-histogram of the distribution of total fluorescence intensity in foci as a function of time. White line indicates the mean fluorescence intensity.

Figure 2 – Establishment of unequal distribution of protein aggregates following heat-shock

Sketch of the heat shock assay and specific time-points used for analysis of concentration of protein aggregates (PAs): right (12 min) after heat shock and upon division (B) Boxplots of the concentration of fluorescence in foci (fluorophore in foci/cell volume) in mothers ($[PA]_M$) and buds ($[PA]_B$) at the time-points described in (A). Red central mark: median. Edges of the box: 25th and 75th percentiles. Notches: 5% confidence interval. Whiskers: most extreme data points not considered outliers. (C) Boxplot (see B) of the ratio of fluorescence concentration in foci in bud versus mother $[PA]_B/[PA]_M$ at the same time-points. (D) Typical fluorescence images (green: Hsp104-GFP; red: Cdc10-mCh) of small-budded and large-budded cells upon division, and corresponding images of the same cells upon division. Scale bar: 5 μm . (E) Median ratio $[PA]_B/[PA]_M$ as a function of bud size upon heat shock. Black dots represent individual cells and blue circles with error bars display the same data after size binning. Red dots correspond to cells shown in (D). (F) Time from heat shock to cell division for individual (black dots) and after binning (blue symbols); Inset: growth arrest as a function of bud size upon heat shock; (G-L) Evolution of bud (left), resp. mother (right), cell size (G-H), fluorescence concentration (I-J), number of aggregates per cell (K-L) over time after grouping individual time traces according to initial bud size (Total number of cells = 78 cells). Colored dashed lines indicate the average division timing for each group of cells.

Figure 3 – Computational model: results, predictions, and experimental validation

(A-C) Stochastic simulation of protein aggregation (all curves represent averages over 30 runs). Parameters value : $k_0=3$; $\alpha=0.02$; $T=100$; $k=0.1$ (A) Cell volume as a function of time (Cell growth is deterministic, and parameters for cell growth are set by corresponding experimental curves in Fig 2). Each colored line correspond to a specific initial bud or mother size; (B) Concentration of misfolded proteins in PAs as a function of time. Same color coding as in (A); (C) Evolution of number of

aggregates with time. Same color coding as in (A); (D-F) same as (A-C), but growth rate set to 0. (G-H) Evolution of bud (G) and mother (M) cell size with time following a heat shock at 40°C; Colored lines indicates averages over single cell trajectories grouped by cell size (I-J) Evolution of fluorescence concentration in PAs with time following a heat shock at 40°C; Color coding as in (G-H); (K-L) Evolution of bud size (K) and (L) fluo concentration in PAs after synchronization with respect to cell division (indicated by a black line). Blue and red lines correspond to initially small and large buds respectively. The dashed lines indicate the switch from polarized to non-polarized growth for the initially small buds.

Figure 4 – Dynamics of protein aggregates in aging cells

(A-B) Dynamics of Hsp104-GFP of two particular aging mothers at 30°C. Top : Sequence of Hsp104-GFP fluorescence images at indicated time points. Yellow contours indicate cell contours. Middle: temporal trajectory of division timing for the particular mother cell in the top panel; Black arrow indicates the senescence entry point (SEP). Color coding (green-red) represents cell cycle duration. Bottom: temporal trajectory of the mean cytoplasmic level. (C) Fraction of mothers that display a high cytoplasmic level throughout the lifespan. (D) Temporal trajectories of the evolution of Hsp104-GFP fluorescence in aggregates in 5 typical *grande* aging mothers. (E) Dynamics of Hsp104-GFP of one particular aging mother at 37°C. Top: Sequence of Hsp104-GFP fluorescence images at indicated time points. Yellow contours indicate cell contours; Middle: temporal trajectory of division timing for the particular mother cell in the top panel; Bottom: temporal trajectory of the fluorescence concentration in aggregates for the cell in the top panel. (F) Temporal trajectories of the evolution of Hsp104-GFP fluorescence in aggregates in 5 typical aging mothers. (G) Average trajectory of the evolution of Hsp104-GFP fluorescence after pooling up all individual cells (n=20). (H) Average division timing before senescence. (I) Replicative lifespan assay at 30°C versus 37°C. (J) Fraction of the cells that undergo an abrupt transition to replicative senescence (SEP) at 30°C versus 37°C. (K) Fraction of the cells that die in G1 at 30°C versus 37°C. (L) Fraction of the cells that display large foci upon cell death at 30°C versus 37°C.

Figure 5 – Inheritance and clearance of protein aggregates in daughters of aging mothers

(A) Fraction of mother to bud leakage of small and big aggregates. The two fractions are significantly different (p-value chi2 test: 0.01) showing that big aggregates are preferentially retained in the mother. (B) Sequence of phase contrast and Hsp104-GFP (green) images at the indicated time points. Yellow arrow: big aggregate kept in the mother. Red arrow: small aggregate that leaks to the bud. Scale bar: 5µm. (C) Sequence of phase contrast and Hsp104-GFP (green) images at the indicated time points for the same mother cell (M – yellow arrow) as in (B) earlier in life. A small aggregate (white arrow) is spontaneously nucleated in the bud (B – red arrow) just before cell division. Image squared by red-dotted line: zoom on the bud when nucleation is observed

Figures

Figure 1

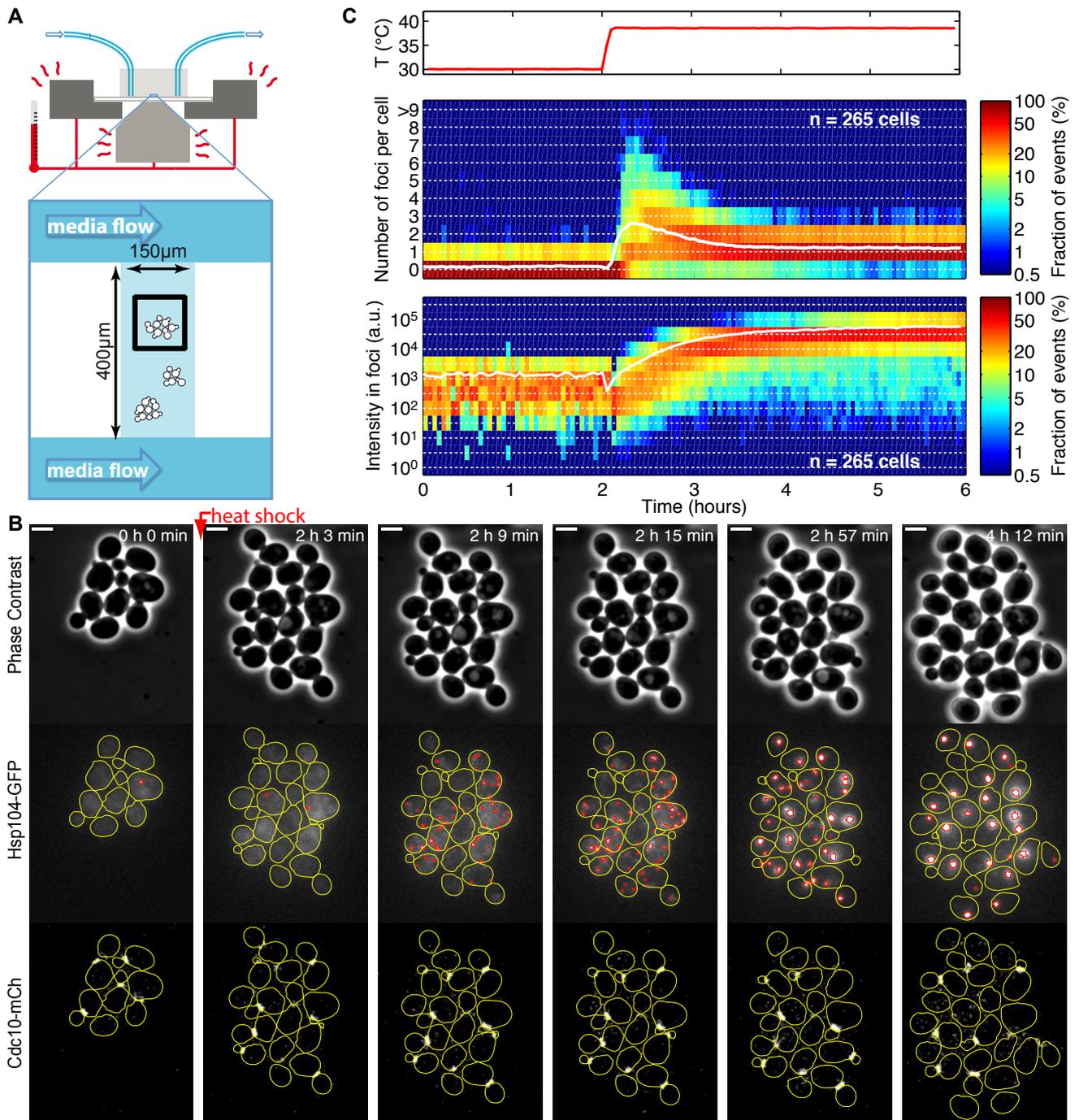


Figure 2

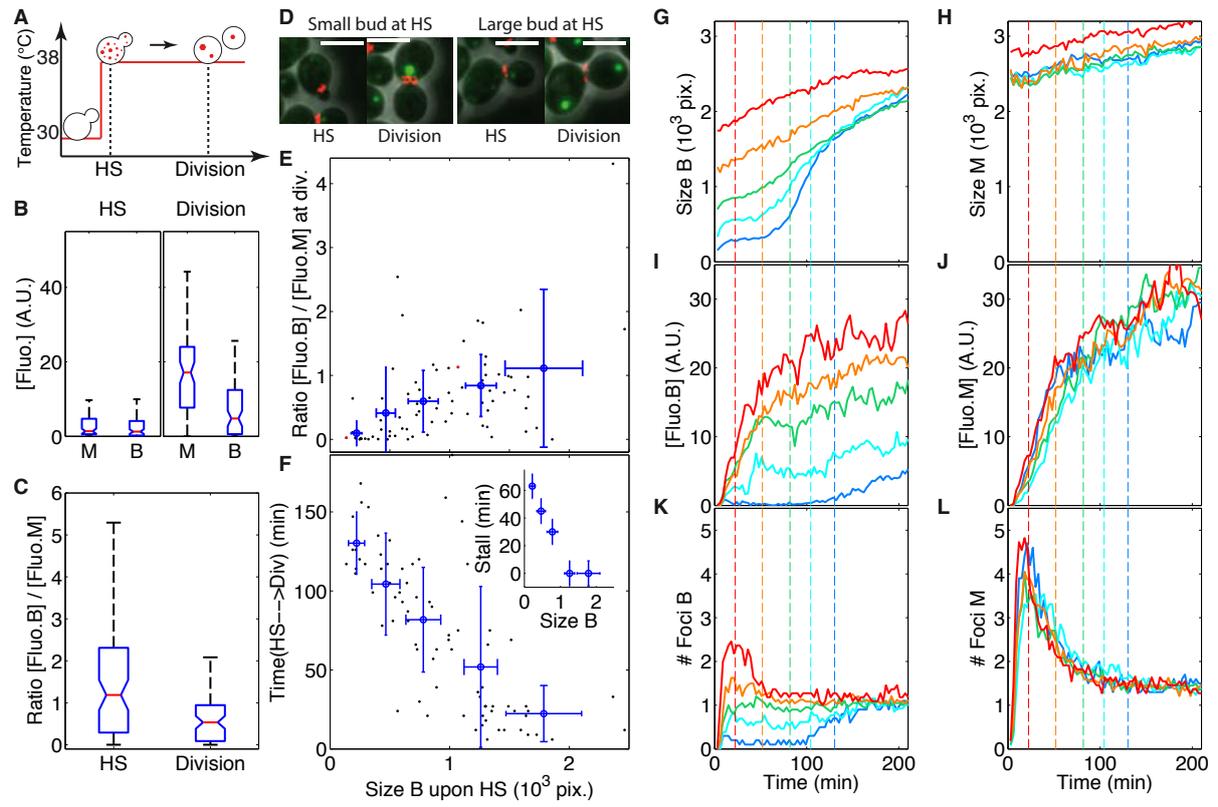


Figure 3

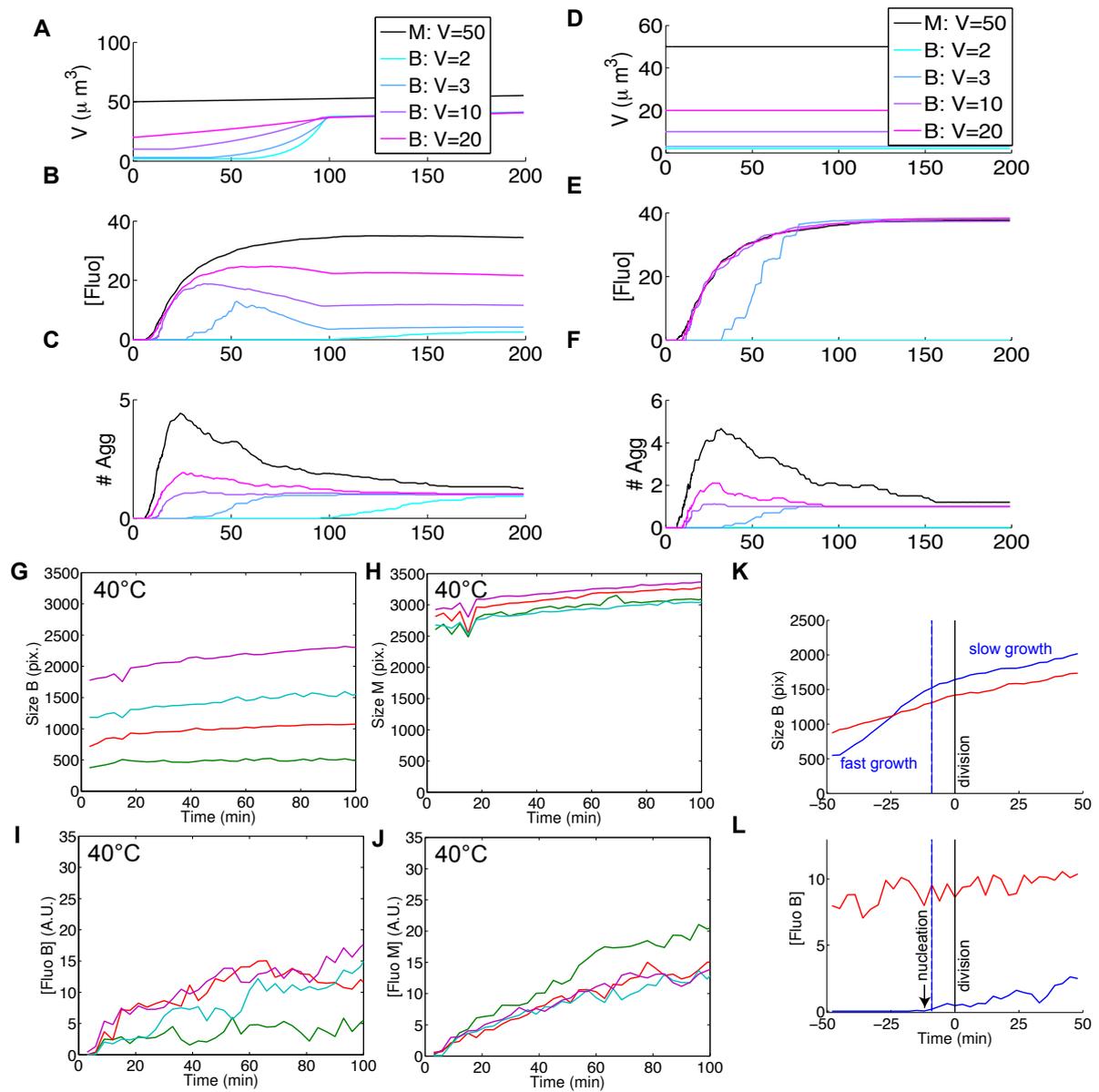


Figure 4

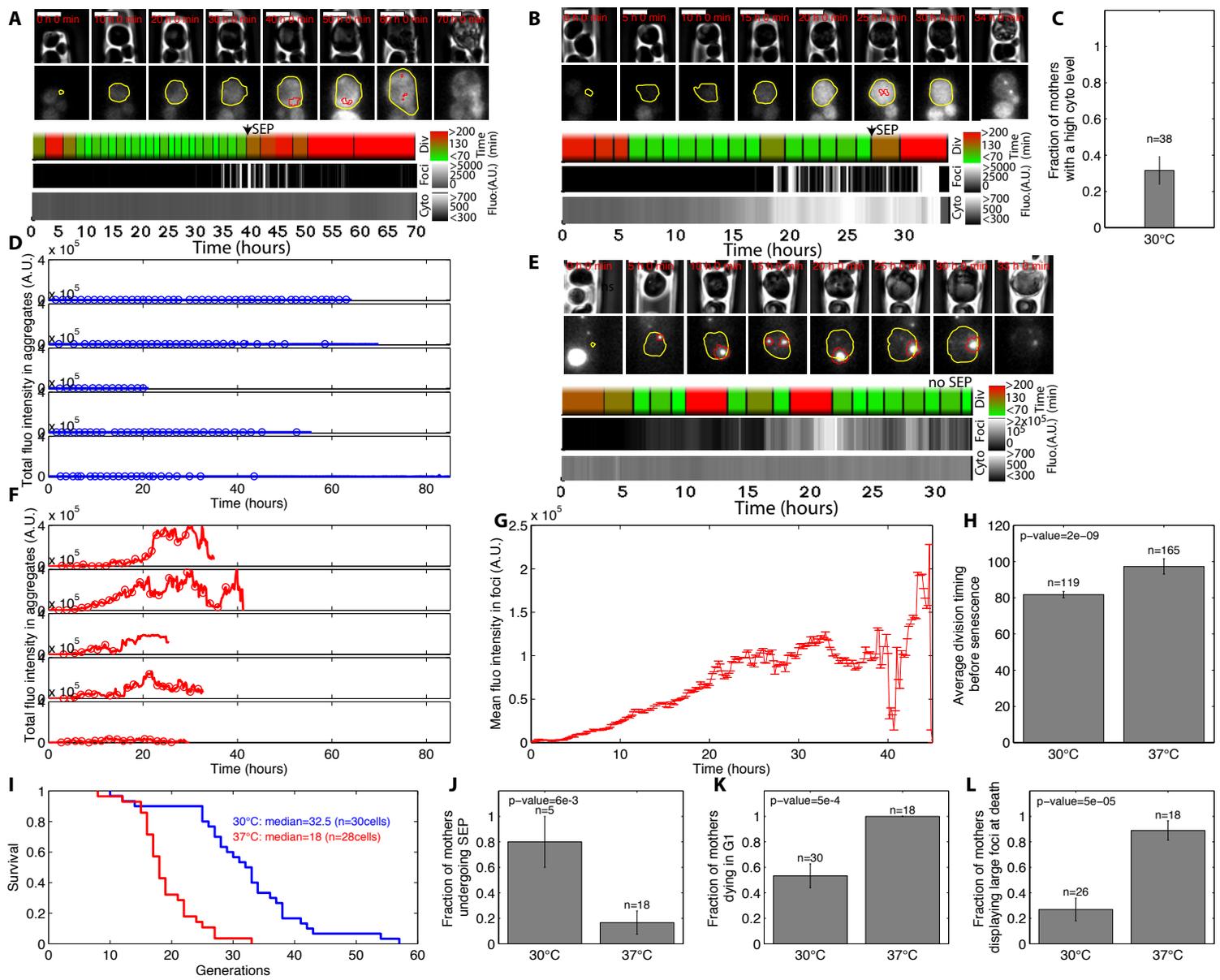
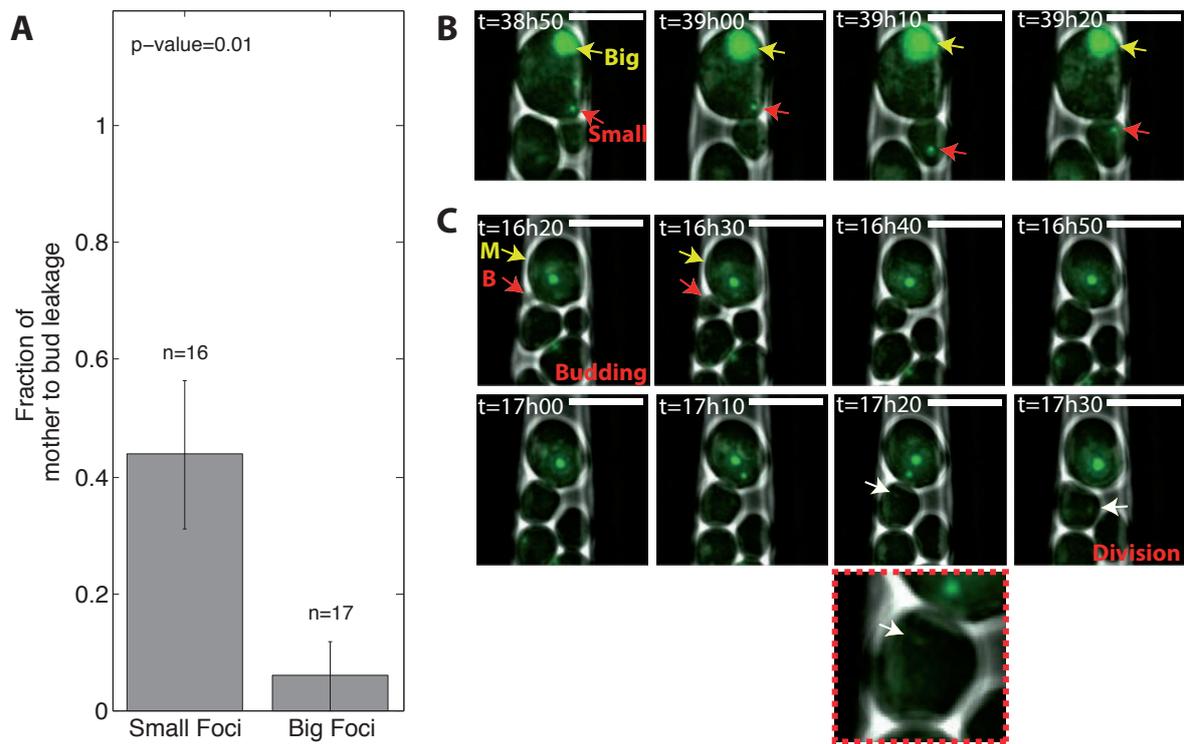


Figure 5



Bibliography

Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nyström, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299, 1751–1753.

Coelho, M., Dereli, A., Haese, A., Kühn, S., and Malinovska, L. (2013). Fission Yeast Does Not Age under Favorable Conditions, but Does So after Stress. *Current Biology*.

Coelho, M., Lade, S.J., Alberti, S., Gross, T., and Tolić, I.M. (2014). Fusion of protein aggregates facilitates asymmetric damage segregation. *PLoS Biol* 12, e1001886.

Coquel, A.-S., Jacob, J.-P., Primet, M., Demarez, A., Dimiccoli, M., Julou, T., Moisan, L., Lindner, A.B., and Berry, H. (2013). Localization of Protein Aggregation in *Escherichia coli* Is Governed by Diffusion and Nucleoid Macromolecular Crowding Effect. *PLoS Comput Biol* 9, e1003038.

Dimitrov, L.N., Brem, R.B., Kruglyak, L., and Gottschling, D.E. (2009). Polymorphisms in Multiple Genes Contribute to the Spontaneous Mitochondrial Genome Instability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C Strains. *Genetics* 183, 365–383.

Egilmez, N.K., and Jazwinski, S.M. (1989). Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171, 37–42.

Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., and Nyström, 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.

Fehrmann, S., Paoletti, C., Goulev, Y., Ungureanu, A., Aguilaniu, H., and Charvin, G. (2013). Aging yeast cells undergo a sharp entry into senescence unrelated to the loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Rep* *5*, 1589–1599.

Hill, S.M., Hao, X., Liu, B., and Nyström, T. (2014). Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *344*, 1389–1392.

Huberts, D.H.E.W., González, J., Lee, S.S., Litsios, A., Hubmann, G., Wit, E.C., and Heinemann, M. (2014). Calorie restriction does not elicit a robust extension of replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *P Natl Acad Sci Usa* *111*, 11727–11731.

Hughes, A.L., and Gottschling, D.E. (2012). An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* *492*, 261–265.

Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* *454*, 1088–1095.

Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., and Guarente, L. (1994). Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J Cell Biol* *127*, 1985–1993.

Kinkhabwala, A., Khmelinskii, A., and Knop, M. (2014). Analytical model for macromolecular partitioning during yeast cell division. 1–10.

Laurenzi, I.J., Bartels, J.D., and Diamond, S.L. (2002). A General Algorithm for Exact Simulation of Multicomponent Aggregation Processes. *Journal of Computational Physics* *177*, 418–449.

Lindner, A.B., and Demarez, A. (2009). Protein aggregation as a paradigm of aging. *Biochim Biophys Acta* *1790*, 980–996.

Lindner, A.B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E.J., and Taddei, F. (2008). Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 3076–3081.

Liu, B., Larsson, L., Caballero, A., Hao, X., Oling, D., Grantham, J., and Nyström, T. (2010a). The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. *Cell* *140*, 257–267.

Liu, B., Larsson, L., Franssens, V., Hao, X., Hill, S.M., Andersson, V., Höglund, D., Song, J., Yang, X., Oling, D., et al. (2011). Segregation of protein aggregates involves actin and the polarity machinery. *Cell* *147*, 959–961.

Liu, L., Louterback, K., Liao, D., Yeater, D., Lambert, G., Estévez-Torres, A., Sturm, J.C., Getzenberg, R.H., and Austin, R.H. (2010b). A microfluidic device for continuous cancer cell culture and passage with hydrodynamic forces. *Lab Chip* *10*, 1807–1813.

McFaline-Figueroa, J.R., Vevea, J., Swayne, T.C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2011). Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* *10*, 885–895.

McMurray, M.A. (2003). An Age-Induced Switch to a Hyper-Recombinational State. *Science* *301*, 1908–1911.

Mogk, A., and Bukau, B. (2014). Mitochondria Tether Protein Trash to Rejuvenate Cellular Environments. *Cell* *159*, 471–472.

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

Sinclair, D.A., and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* *91*, 1033–1042.

Song, J., Yang, Q., Yang, J., Larsson, L., Hao, X., Zhu, X., Malmgren-Hill, S., Cvijovic, M., Fernandez-Rodriguez, J., Grantham, J., et al. (2014). Essential genetic interactors of SIR2 required for spatial sequestration and asymmetrical inheritance of protein aggregates. *PLoS Genet* *10*, e1004539.

Spokoini, R., Moldavski, O., Nahmias, Y., England, J.L., Schuldiner, M., and Kaganovich, D. (2012). Confinement to organelle-associated inclusion structures mediates asymmetric inheritance of aggregated protein in budding yeast. *Cell Rep* *2*, 738–747.

Uhlendorf, J., Miermont, A., Delaveau, T., Charvin, G., Fages, F., Bottani, S., Batt, G., and Hersen, P. (2012). Long-term model predictive control of gene expression at the population and single-cell levels. *P Natl Acad Sci Usa* *109*, 14271–14276.

Unal, E., Kinde, B., and Amon, A. (2011). Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast. *Science* *332*, 1554–1557.

Veatch, J.R., McMurray, M.A., Nelson, Z.W., and Gottschling, D.E. (2009). Mitochondrial Dysfunction Leads to Nuclear Genome Instability via an Iron-Sulfur Cluster Defect. *Cell* *137*, 1247–1258.

Winkler, J., Seybert, A., nig, L.K.O., Pruggnaller, S., Haselmann, U., Sourjik, V., Weiss, M., Frangakis, A.S., Mogk, A., and Bukau, B. (2010). Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *Embo J* *29*, 910–923.

Zhang, Y., Luo, C., Zou, K., Xie, Z., Brandman, O., Ouyang, Q., and Li, H. (2012). Single Cell Analysis of Yeast Replicative Aging Using a New Generation of Microfluidic Device. *PLoS ONE* *7*, e48275.

Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Eldakak, A., Rubinstein, B., and Li, R. (2011). Motility and Segregation of Hsp104-Associated Protein Aggregates in Budding Yeast. *Cell* *147*, 1186–1196.

Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Guo, F., Yu, Z., Mickey, K., Narkar, A., Ross, R.T., McClain, M., and Li, R. (2014). Organelle-Based Aggregation and Retention of Damaged Proteins in Asymmetrically Dividing Cells. *Cell* *159*, 530–542.

Supplementary information

Establishment of asymmetrical distribution of protein aggregates during stress and aging in *S.Cerevisiae*

Supplemental figures legends:

Figure S1 – Calibration of sample temperature

(A) Sketch of the setup developed to control the temperature of the sample. A custom sample holder (blue) with thermoelectric modules and an homemade objective heater (green) with heating resistors were built to precisely control the temperature of the sample and perform heat-shocks during the course of the experiments. A micrometric temperature probe was integrated in the chip to measure the actual temperature that the cells sensed, referred as the sample temperature (red). (B) Temperature calibration curves. The stage (blue) and objective (green) temperatures follow the set temperature (black). With (red) or without (orange) media pumping, temperature experienced by cells is 0.5°C below the set temperature. (C) Temperature evolution and focus drift (orange) through a 30°C to 38°C heat shock. Curves represent a mean over 5 different experiments. (D) Comparison of different heating methods for a 30°C to 38°C heat shock. Heating both stage and objective is necessary to process such a heat shock (objective behaves as a thermal sink).

Figure S2 – Automated image analysis pipeline

Cells (phase contrast channel), budneck (mCherry channel) and foci (GFP channel) are automatically segmented and mapped by a homemade routine, allowing to quantitatively measure cells and foci features (size, number, fluorescence level...), to score division and to follow individual cells upon time.

Figure S3 – Comparison of foci induction and growth at 30°C and 38°C

(A) Actual temperature of the stage. (B) Growth rate of the cell cluster. Growth rate is constant at 30°C (left) whereas it is impaired right after heat shock and then recovers 2h after heat shock (right). (C) 2D histogram of the evolution of number of foci per cell upon time. White line: mean value. At 30°C, very few foci are detected with a constant mean number of 0.2 focus per cell (left): conditions of illumination do not imply artificial foci formation. On the other hand, the heat shock quickly triggers the formation of a mean of 3 foci per cell (right - 30 min after heat shock). These foci merge in 2 hours to get a final state of about 1.3 foci per cell. (D) 2D histogram of the evolution of foci radius upon time. White line: mean value. Contrary to foci induced by heat shock (right), foci detected at 30°C do not grow over the course of the experiment (left).

Figure S4 – Microfluidic device for replicative aging experiments

New design of the CLiC allowing to follow the successive divisions of 3200 yeast cells from birth to death within cavities. (A) Zoom on trapping areas (sides) and cavities (central part). The size of the image corresponds to the field of view of the camera with a 60X magnification objective, showing that

we are able to follow at least 26 cavities per position followed instead of 1 in the previous device. Green arrows: media replenishment through diffusion/convection. (B) Block of 40 cavities with supply channels (grey) parallel to trapping area (white). Media replenishment and cells loading/removal occurs through vertical channels (large green arrows). Cell trapping is improved by supply channels diversion ahead of the bloc and presence of deflectors (red arrows). (C) 10 independent series of 8 blocs allow to follow 3200 cells within a unique experiment. (D) View of the whole chip allowing to perform 10 different experiments at the same time. (E) Typical series of phase contrast images showing the process of cell loading. Cells are trapped in the vertical trapping area and progressively enter the horizontal cavities (within ~24h). Scale bar: 50 μm .

Supplemental figures

Figure S1

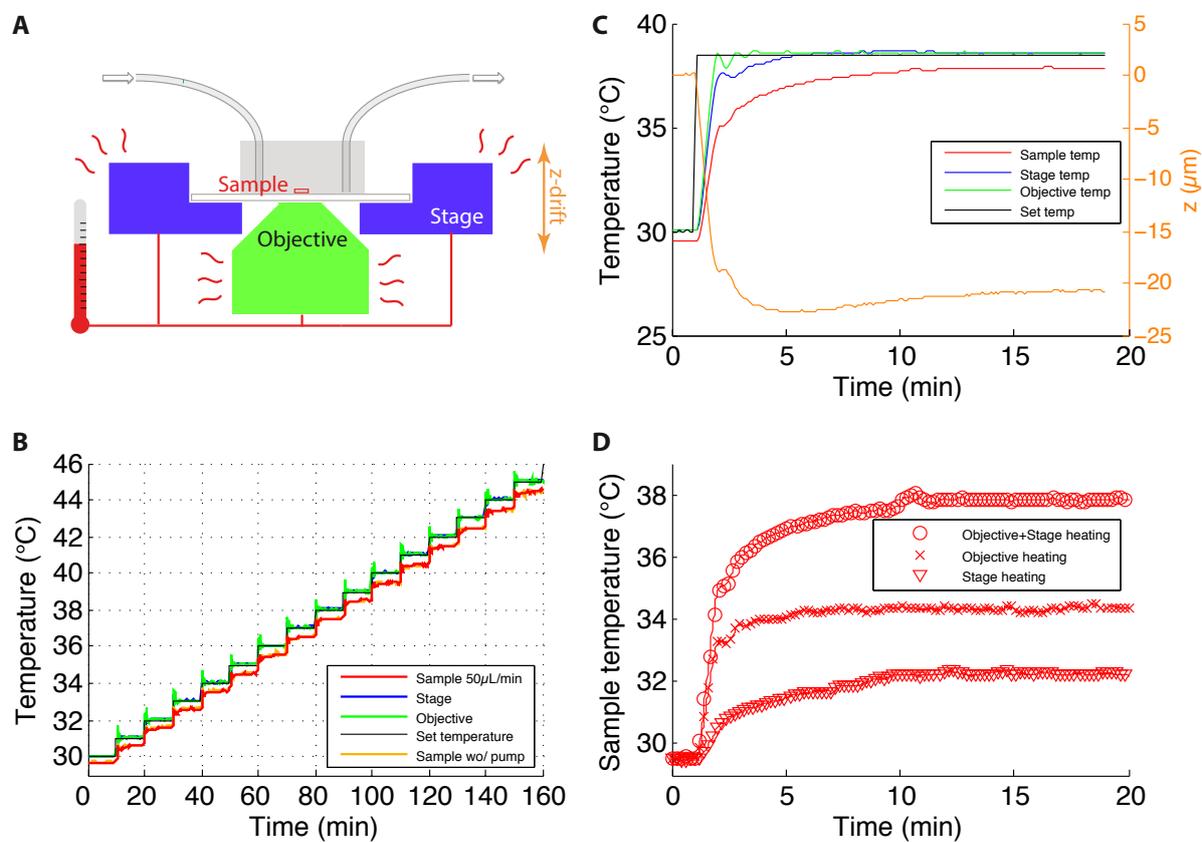


Figure S2

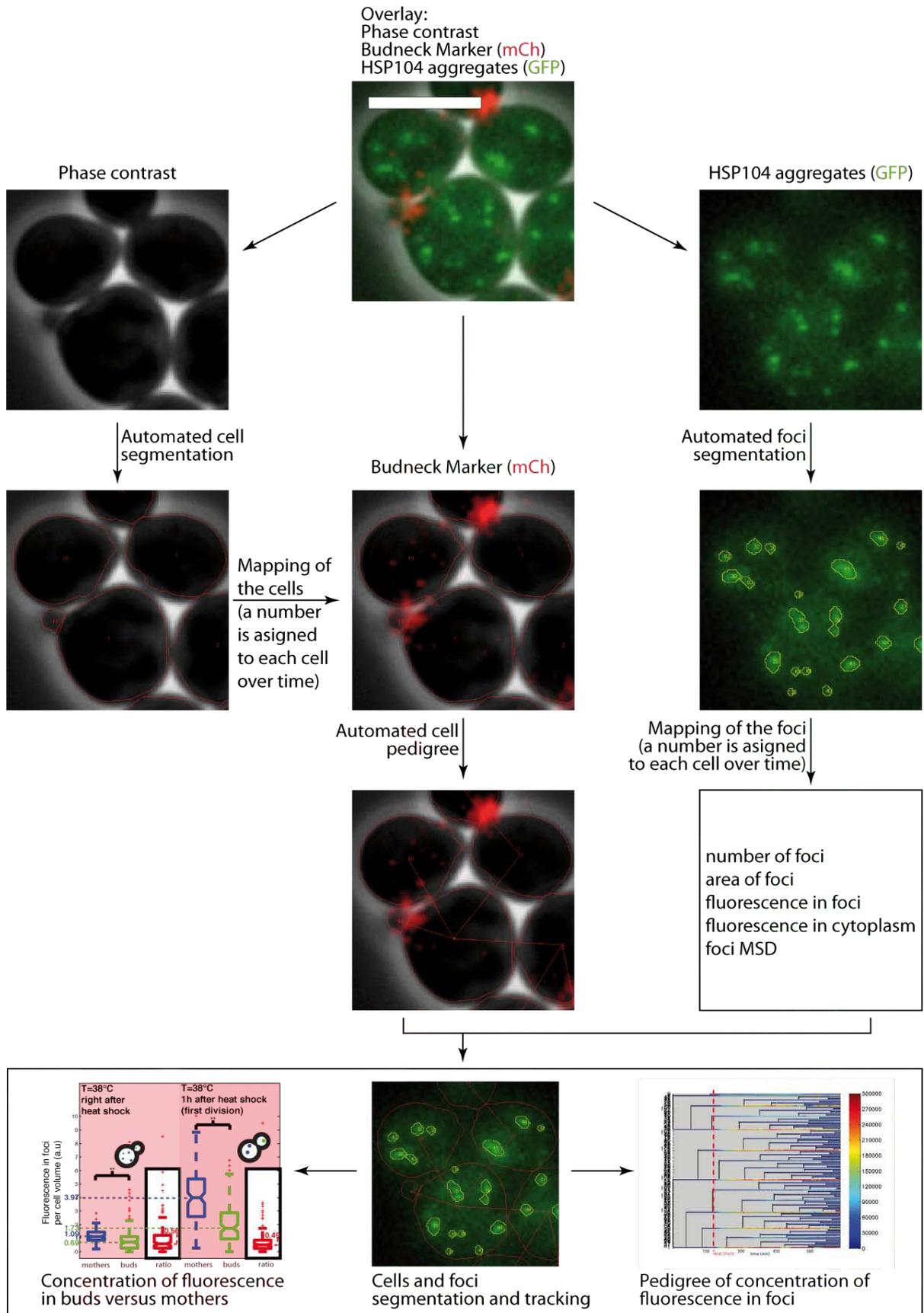


Figure S3

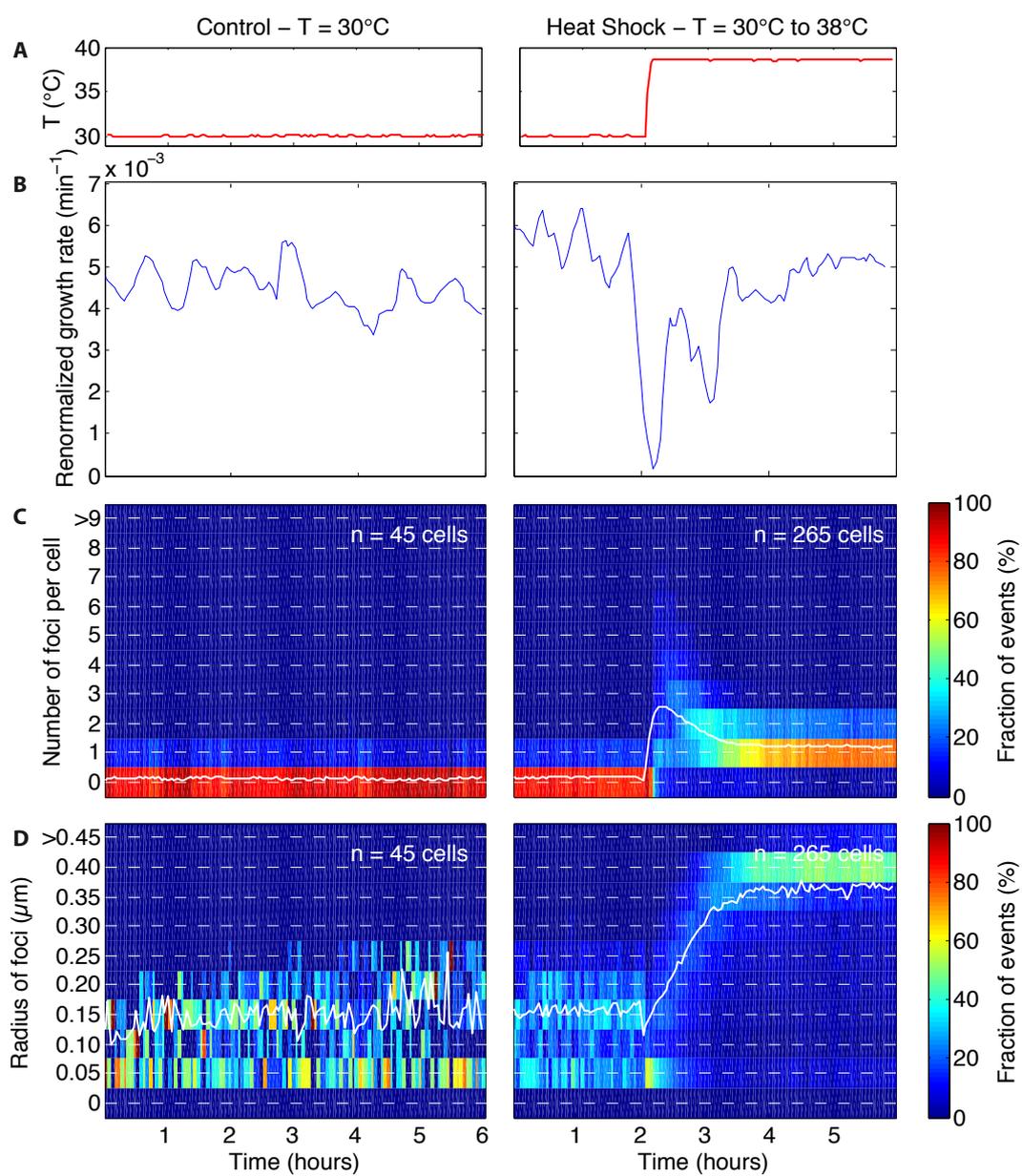
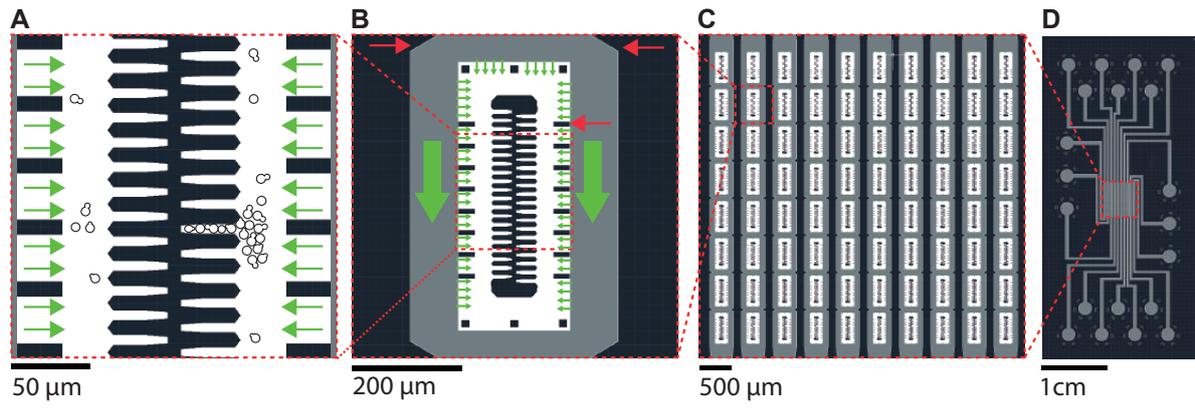
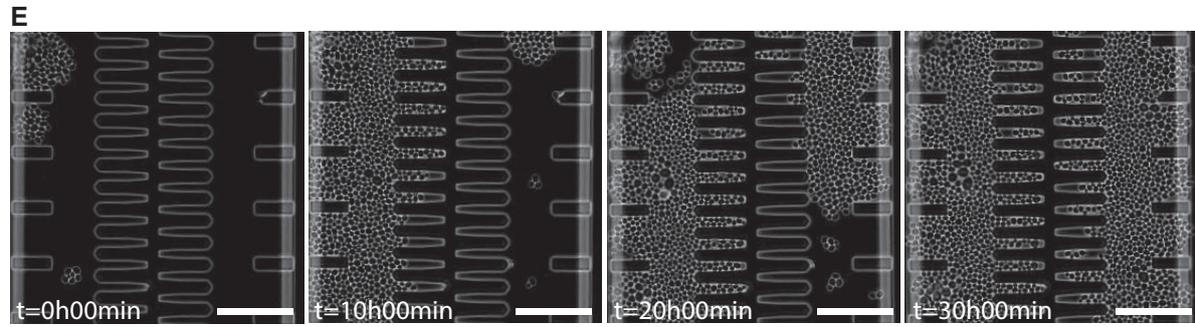


Figure S4



■ height : 40 μm
■ height : 3.3 μm
■ height : 0 μm



Supplemental tables:

Supplemental movie legends:

Movie S1: Typical 30 to 38°C HS processed within the H microfluidic device at t=2h00. Overlay of phase contrast and Hsp104-GFP (green) images. Many little aggregates are formed upon heat shock. They then merge to form one bigger aggregate in each cell. Scale bar: 5µm.

Movie S2: Mother cell trapped in a cavity from birth (t=71h00) to death (t=140h50) with a constant temperature of 30°C. Overlay of phase contrast, Hsp104-GFP (green) and Cdc10-mCherry (red) images. Scale bar: 5µm. This *grande* cell corresponds to the one shown in figure 4-A in the main text.

Movie S3: Mother cell trapped in a cavity from birth (t=05h05) to death (t=39h40) with a constant temperature of 30°C. Overlay of phase contrast, Hsp104-GFP (green) and Cdc10-mCherry (red) images. Scale bar: 5µm. This *petite* cell corresponds to the one shown in figure 4-B in the main text.

Movie S4: Mother cell trapped in a cavity from birth (t=33h50) to death (t=62h20) with a constant temperature of 37°C. Overlay of phase contrast, Hsp104-GFP (green) and Cdc10-mCherry (red) images. Scale bar: 5µm. This *grande* cell corresponds to the one shown in figure 4-E in the main text.

Extended Experimental Procedures:

Strain List

Name	MAT	Background	Genotype	Origin
YCP03-1	a	S288C	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HSP104-GFP-HIS3MX6 CDC10-mCherry-kanMX4</i>	This study
YCP09-1	a	S288C	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HSP104-GFP-HIS3MX6 CDC10-mCherry-kanMX4 bni1Δ-KanMX4</i>	This study
YCP21-7D	a	S288C	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HSP104-GFP-HIS3MX6 HTB2-mCherry-kanMX4</i>	This study
YCP19-8D	a	Mix S288C / SEY6210	<i>HSP104-GFP-MX6 VPH1-mCherry-TRP1</i>	This study
YCP30	a	S288C	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 met15Δ HSP104-GFP-HIS3MX6 chrIV(446393-446394)::PTDH3-preCOX4-Cherry-hphMX</i>	This study

Focus maintenance during heat-shock experiments

All microscope parts, as well as the sample holder, experience specific dilatation as the temperature is changed. This phenomenon has important implications regarding the maintenance of focus when inducing fast changes in temperature. By using a definite focus (Zeiss) system to keep the distance

constant between the objective and the chip constant, we indeed observed a drift by up to 23 microns of the focal plane when a sudden temperature step was made (Fig. S1C). A reliable control of the focus was thus mandatory to keep monitoring the cells during heat shock.

Unfortunately, the definite focus system by itself

We used the combination of a hardware definite focus (Zeiss) system and a home made MATLAB software to keep the distance constant between the objective and the chip. Briefly,

Computational model of protein aggregation in dividing cells

The purpose of the computational model is to investigate whether the establishment of asymmetry in PAs concentration during the budded period of the cell cycle can be explained using a limited set of physical arguments. Therefore, hypotheses are included in the model in a sequential manner in order to understand the role of each ingredient and set of parameters. An extensive search in parameters values is done in order to evaluate the importance of each unknown parameter.

Principle of the model

To model the aggregation of misfolded proteins into large protein clusters, we used the numerical framework described by (Laurenzi et al., 2002) and later used by (Coelho et al., 2014) to evaluate the distribution of PAs in fission yeast. In short, the simulation is based on an exact stochastic simulation that derives from the Gillespie algorithm and that models all possible reactions between the different species (*i.e.* aggregates of different sizes). To this end, it uses a Brownian aggregation Kernel $K(x,y)$ that quantifies the frequency of collision that arise between aggregates of volume x and y (which diffuse according to a Brownian motion):

$$\text{Frequency of aggregation} = K(x,y) N_x N_y$$

With N_x and N_y the number of aggregates of volume x and y respectively;

$K(x,y) = 2 kT (x^{1/3} + y^{1/3})(x^{-1/3} + y^{-1/3}) / (3 V \mu)$ (Hidy and Block, 1972), where k is the Planck constant, T is the temperature, V is the volume of the compartment and μ is the viscosity of the medium (Smoluchovski equation).

By making the assumption that the diffusion of aggregates follows the Stokes-Einstein equation, the previous equation can be rewritten as:

$$K(x,y) = k (x^{1/3} + y^{1/3})(x^{-1/3} + y^{-1/3})$$

With $k = 16 \pi R D / V$, where D is the diffusion coefficient of an aggregate of size R and V is the cell

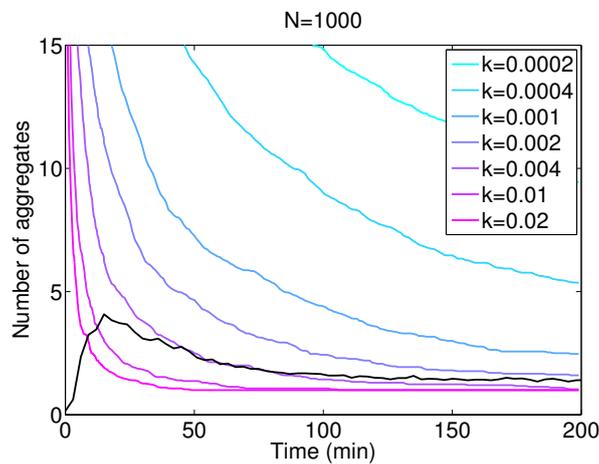
volume.

A major interest of this framework is to bypass the need to simulate the spatial diffusion and collision of aggregates, which is computationally intensive because these processes spans very different timescales for particles of varying sizes.

Aggregation frequency

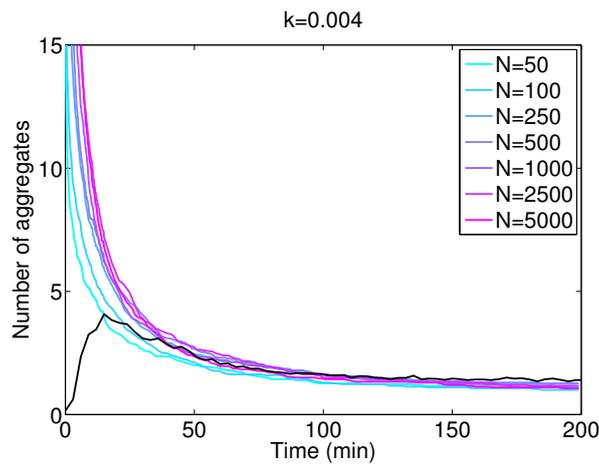
Using $D= 0.001 \text{ m}^2/\text{s}$, $R=0.5 \text{ m}$ (determined experimentally by calculating the mean square displacement, not shown) and $V = 50 \text{ m}^3$, the frequency of collision of two particles of identical sizes is 0.02 min^{-1} .

The next figure shows the evolution of the number of aggregates versus time using the simulation described above (the curve displayed represents an average over 30 simulations in order to filter out statistical fluctuations), starting with a number $N = 1000$ initial particles. Each colored line corresponds to a specific value of k (min^{-1}), while the black line displays the experimentally observed kinetics of aggregation in mother cells. As expected, this plot reveals that the kinetics greatly depends on the value of k (at $t=30\text{min}$, increasing k by 2 orders of magnitudes leads to a 50-fold increase in the remaining number of aggregates). In addition, it shows that the approximate best fit ($k=0.004 \text{ min}^{-1}$) to experimental data (black line) is obtained for values about 5-fold lower than predicted by the Smoluchowski equation (*i.e.* $k=0.02 \text{ min}^{-1}$). It is likely that the discrepancy originates from the simplistic hypothesis that aggregates diffusion follows the Stokes Einstein equation.



Initial number of particles

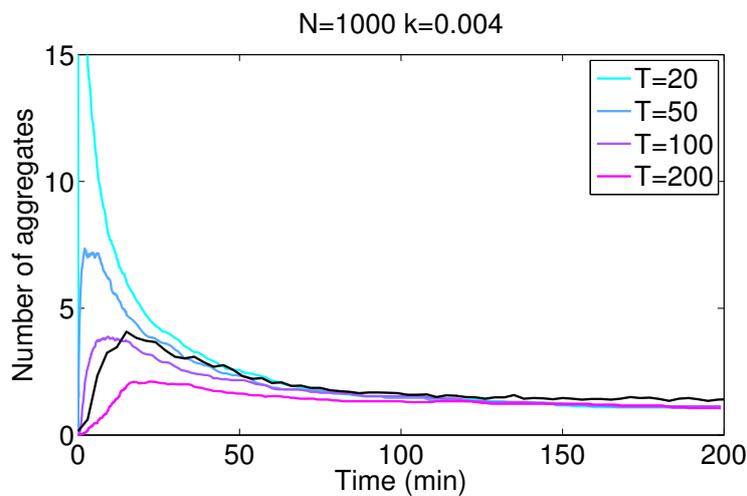
Then, to test the influence of the initial number of particles N on aggregation kinetics, we run the simulation with N varying from 50 to 5000. Interestingly, at $t=30\text{min}$, increasing N by two orders of magnitudes leads to a moderate 50% increase in the number of aggregates. Therefore, the precise determination of this parameter is not strictly essential to capture the dynamics of aggregation that is observed experimentally (black line).



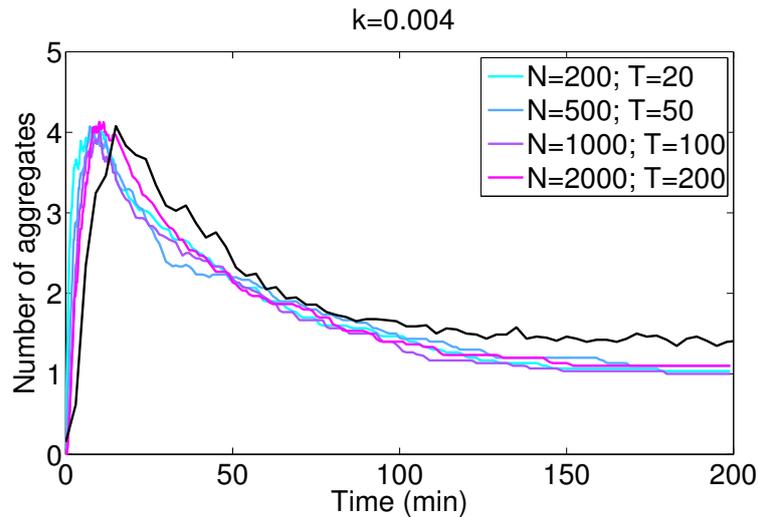
Aggregates visibility threshold

A major discrepancy between the current version of the model and the experimental results is that the number of aggregates right after heat shock sharply increases, in the contrary to what is observed in the simulations. Indeed, the model does not capture the fact that small aggregates may be too dim and/or diffuse too fast to be observed under the microscope. In addition, the spatial resolution of the microscope precludes from distinguishing particles that are less distant than the diffraction limit.

To address this problem, we introduced a visibility threshold T (in units of monomer size) such that any aggregate of size $x < T$ is invisible (Coelho et al. 2014). The next plots assess the effect of introducing this parameter on the kinetics of aggregation. As expected, using a non-zero T introduces a maximum in the curve showing the number of aggregates as a function of time, see next figure. The position and the height of this maximum clearly depend on T (experimental data, black line).

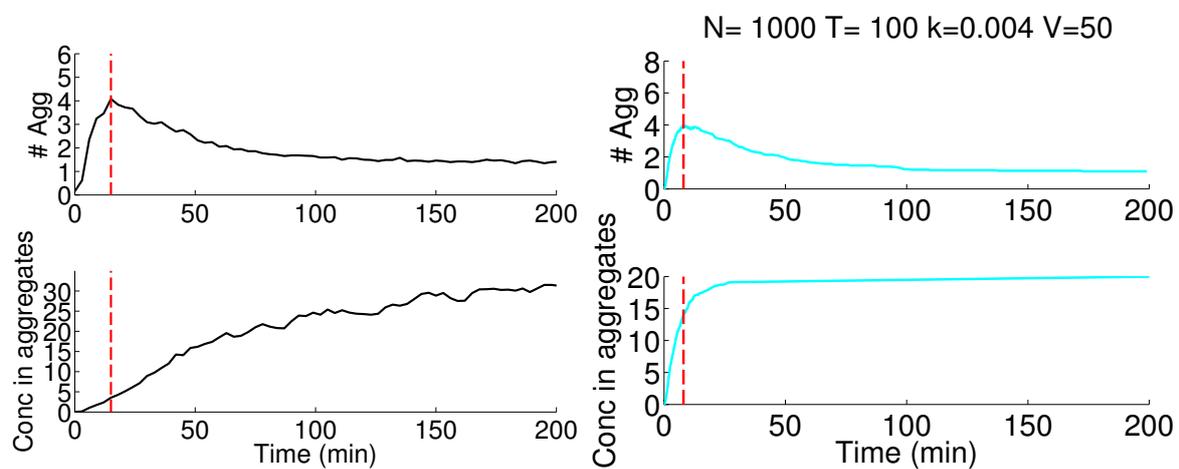


Interestingly, however, we noticed that the aggregation kinetics was quite independent of the N / T ratio. This revealed an unexpected degeneracy in the parameters (experimental data, black line).



Kinetics of formation of misfolded proteins

The exploration of parameters values for T revealed that $N/T=10$ provides a decent fit to the experimental $N_{agg} = f(t)$ curve. However, we observed that the kinetics of accumulation of fluorescence concentration in aggregates was very different from the one observed in the simulation: by the time the maximum number of foci was reached (red dashed line on next figure), more than 75% of the final aggregates fluorescence concentration was obtained in the simulation (right panel), but less than 10% in the experimental data (left panel).



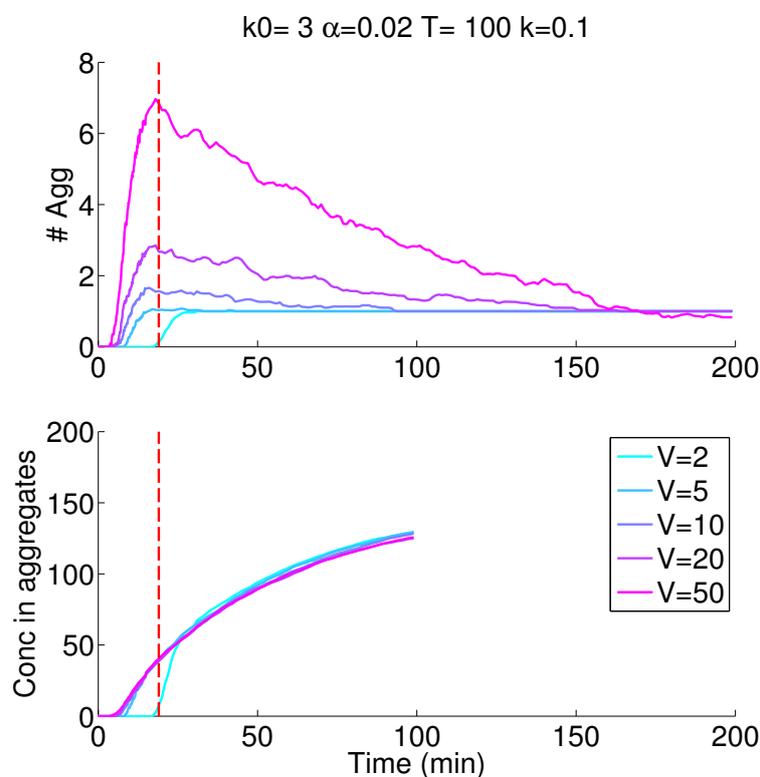
This delay in the accumulation of fluorescence could not be attributed to the maturation time of GFP, since Hsp104-GFP proteins were already present upon HS. We hypothesized that it results from the kinetics of protein misfolding itself. So far, we considered that misfolded proteins were suddenly generated at $t=0$ (time of HS), and we simulated the aggregation of these particles. In the following, however, we assumed that the rate of formation of misfolded proteins per unit of volume k_m varies with time as follows:

$$k_m = k_0 \exp(-\alpha t)$$

where k_0 is the initial rate of formation, and α is the rate constant associated with the decay in misfolded protein formation. A much more progressive increase in fluorescence concentration was observed when setting $k_0 = 3 \text{ m}^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $\alpha = 0.02 \text{ min}^{-1}$, in better agreement with experimental results (yet at the cost of one additional parameter).

Effect of cell size/ growth on aggregation kinetics

So far, the approximate fitting of parameters was investigated by using the mother data as a reference. We wondered how the existing set of parameter would predict the kinetics of aggregation in buds, which have smaller volumes. The following figure displays the results obtained for $V = 5 - 50 \text{ m}^3$.



Interestingly, whereas the evolution of the number of aggregates is in decent agreement with the experiment, the concentration of fluorescence in the bud appeared to be independent of the size of the compartment, in contradiction with experiments. However, bud size was considered constant in all

these simulations. Therefore, we modelled bud growth according to the kinetics observed for cell growth, which is quantified on Fig. 2 in the main text. Strikingly, the dilution exerted by the sharp bud growth lead to a strong decrease in PAs concentration, thus explaining the origin of the establishment of a segregation bias during the budded part of the cell cycle (see Fig. 3 in the main text).

Additional Bibliography

Coelho, M., Lade, S.J., Alberti, S., Gross, T., and Tolić, I.M. (2014). Fusion of protein aggregates facilitates asymmetric damage segregation. *PLoS Biol* *12*, e1001886.

Laurenzi, I.J., Bartels, J.D., and Diamond, S.L. (2002). A General Algorithm for Exact Simulation of Multicomponent Aggregation Processes. *Journal of Computational Physics* *177*, 418–449.

Conclusion et perspectives

Au cours de cette thèse, j'ai mis au point deux dispositifs, alliant la microfluidique et l'imagerie *in vivo*, permettant de suivre sur différentes échelles de temps la dynamique de formation des agrégats protéiques liés au chaperon Hsp104 chez *Saccharomyces cerevisiae*. J'ai ainsi pu étudier dynamiquement les mécanismes de ségrégation asymétrique des agrégats dans des cellules uniques, tout d'abord sur des temps courts (quelques divisions cellulaires), puis tout au long de la vie d'une cellule.

Le premier dispositif a permis de mieux comprendre les mécanismes d'établissement et de maintien de la ségrégation asymétrique en observant continûment, avant, pendant et après l'induction d'agrégats par un choc thermique, une population de cellules uniques dont la croissance n'a pas été arrêtée.

Grâce à la quantification fine et en temps réel de la dynamique des agrégats, de la division et de la croissance cellulaire, nous avons mis en évidence le rôle de cette dernière dans le processus d'établissement de l'asymétrie. Tandis que les études précédentes ont montré que la diffusion lente et limitée des agrégats protéiques suffit à empêcher leur transport passif de la mère vers le bourgeon/fille, sur l'échelle de temps d'un cycle cellulaire [12] [440], notre méthodologie a prouvé la nécessité de considérer la croissance du bourgeon pour expliquer la dilution des agrégats observée au cours de la phase bourgeonnante. L'établissement de la différence de concentration en agrégats protéiques au sein des mères et des filles peut alors être expliqué quantitativement uniquement à l'aide de paramètres géométriques et physiques.

Comme chez la levure à fission *S. pombe*, la fusion des multiples agrégats formés au cours d'un choc thermique permet de créer une large structure dont la vitesse de diffusion faible assure une distribution asymétrique des agrégats [258]. Cependant, alors que cette structure est héritée de façon équiprobable au sein de l'une ou l'autre des cellules résultant de la division symétrique de *S. pombe* [258], la croissance polarisée de *S. cerevisiae* génère une asymétrie de concentration biaisée envers les mères. En utilisant un modèle de coalescence basé sur la diffusion libre de particules, nous avons montré que le processus de fusion observé après un choc thermique peut être expliqué par ce phénomène purement physique.

Cependant, les études récentes de Zhou et al. [8] et de Song et al. [321] tendent à établir l'association des agrégats protéiques avec le réticulum endoplasmique (ER) puis les mitochondries. En effet, les agrégats protéiques semblent être transitoirement accrochés à l'ER puis durablement aux mitochondries [8]. De plus, différentes protéines associées à l'ER induisent des défauts de ségrégation des agrégats lorsqu'elles sont mutées. On peut en outre supposer que les interacteurs de *SIR2* impliqués dans la mise en place de la polarité cellulaire et qui induisent eux aussi des défauts de ségrégation [321] peuvent jouer un rôle dans la ségrégation asymétrique des organelles, et des mitochondries en particulier. Cette association aux mitochondries peut sembler contredire nos observations et en particulier la modélisation de la fusion des agrégats par coalescence de particules diffusant librement. Néanmoins, ceci pourrait s'expliquer par la dynamique de fu-

sion/fission des mitochondries. Il serait intéressant de questionner cette hypothèse plus en détails à l'aide de notre dispositif, permettant de suivre *in vivo* la dynamique d'un tel phénomène.

Le second dispositif, nommé CLiC, a permis de décrire la dynamique de formation des agrégats protéiques marqués par Hsp104-GFP au sein de cellules vieillissantes, de vérifier si les observations faites dans le cadre de chocs thermiques sont bien transposables dans le contexte du vieillissement et de s'interroger sur la causalité entre la présence d'agrégats et le phénomène de sénescence.

Il faut tout d'abord noter que cette étude constitue la première vérification dynamique du modèle d'accumulation progressive d'agrégats protéiques au sein de cellules vieillissantes. De manière inattendue, nous n'avons observé que peu d'agrégats dans les cellules mères cultivées au sein de notre dispositif microfluidique en conditions classiques (30°C). De plus, les agrégats présents ne semblent pas s'accumuler progressivement au sein des mères, alors qu'ils sont communément admis comme étant des marqueurs du vieillissement. Zhang et al., qui ont suivi l'expression du niveau cytoplasmique de Hsp104-GFP dans un dispositif microfluidique comparable n'ont pas rapporté non plus l'existence de foci. Cette différence majeure avec les études précédentes pourrait s'expliquer par le fait que, dans celles-ci, les cellules vieilles sont obtenus par un processus de tri cellulaire comprenant une succession de chocs thermiques et de re-suspension dans du milieu neutre (PBS). Ces différentes étapes pourraient déstabiliser le protéome, et ce de manière plus importante dans les cellules vieilles, qui verrait alors la formation pérenne d'agrégats en leur sein.

Lorsque les cellules sont cultivées à une température inhabituellement haute (37°C), nous avons en effet observé la présence d'agrégats, leur accumulation progressive et leur rétention au sein des mères tout au long de la vie. La durée de vie est alors réduite. De plus, la mort des cellules, qui se produit principalement en phase G1 et sans ralentissement notable du cycle cellulaire, semble différente de celle classiquement observée en conditions normales de laboratoire (30°C). Lorsque le protéome est déstabilisé, l'accumulation progressive et la rétention asymétrique d'agrégats pourraient donc induire la mort cellulaire, de même que cela a été observé chez la bactérie [258].

De manière intéressante, Zhou et al. ont montré que les agrégats existant dans de vieilles mères obtenues par tri cellulaire ne colocalisent plus avec les mitochondries [8]. Il serait intéressant de valider cette observation dans notre dispositif CLiC pour, dans un premier temps, vérifier qu'elle ne dépend pas du processus d'obtention des vieilles mères, puis, dans un second temps, étudier la dynamique d'accrochage des agrégats aux mitochondries au cours du vieillissement. Si cette observation est validée, on peut supposer une augmentation de la transmission mère-fille d'agrégats lorsque la mort de la cellule approche. Ceci pourrait expliquer l'observation de Kennedy et al. d'une diminution de la durée de vie des filles dont les mères étaient vieilles à leur naissance [3].

En outre, en réalisant des chocs thermiques de courte durée au sein du CLiC et à l'aide de nos méthodes d'analyse quantitative de données, notre dispositif pourrait permettre de déterminer plus précisément l'impact des agrégats ou du niveau cytoplasmique élevé du chaperon Hsp104 sur la physiologie et la longévité des cellules ainsi que d'étudier les mécanismes de désagrégation.

Annexes

Annexe A

Fehrmann *et al.*, *Cell Reports* (2013)

Aging Yeast Cells Undergo a Sharp Entry into Senescence Unrelated to the Loss of Mitochondrial Membrane Potential

Steffen Fehrmann,¹ Camille Paoletti,¹ Youlian Goulev,¹ Andrei Ungureanu,³ Hugo Aguilaniu,² and Gilles Charvin^{1,*}

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 Rue Laurent Fries, 67400 Illkirch Cedex, France

²LBMC, ENS Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

³LJC, ENS Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

*Correspondence: charvin@igbmc.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.013>

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

SUMMARY

In budding yeast, a mother cell can produce a finite number of daughter cells before it stops dividing and dies. Such entry into senescence is thought to result from a progressive decline in physiological function, including a loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$). Here, we developed a microfluidic device to monitor the dynamics of cell division and $\Delta\Psi$ in real time at single-cell resolution. We show that cells do not enter senescence gradually but rather undergo an abrupt transition to a slowly dividing state. Moreover, we demonstrate that the decline in $\Delta\Psi$, which is observed only in a fraction of cells, is not responsible for entry into senescence. Rather, the loss of $\Delta\Psi$ is an age-independent and heritable process that leads to clonal senescence and is therefore incompatible with daughter cell rejuvenation. These results emphasize the importance of quantitative single-cell measurements to decipher the causes of cellular aging.

INTRODUCTION

Budding yeast cells divide asymmetrically, with each mother cell producing a limited number (~25) of smaller daughter cells before it enters senescence and eventually dies (Mortimer and Johnston, 1959). Remarkably, daughters of aged mother cells recover a full replicative lifespan (RLS; total number of cell divisions), which implies that a rejuvenation mechanism exists to avert clonal senescence (Kennedy et al., 1994). Although a large number of mutations are known to modulate RLS, the precise causes of senescence and rejuvenation, and thus their heritability, are poorly understood.

Several theories of replicative senescence based on the retention of potentially deleterious cellular components by mother cells have been proposed. Aging mothers accumulate extrachromosomal ribosomal DNA circles (ERCs) in their nucleoli, which

are thought to interfere with the regulation of gene expression (Sinclair and Guarente, 1997). However, the mechanism by which ERCs are asymmetrically segregated is still under debate (Shcheprova et al., 2008; Gehlen et al., 2011; Khmelinskii et al., 2011), and it is not clear how ERCs are toxic to mother cells. Carbonylated proteins have also been shown to accumulate in aging cells and form aggregates that are asymmetrically inherited by the mother cells upon division (Aguilaniu et al., 2003; Erjavec et al., 2007), but direct evidence that carbonylated proteins cause replicative senescence is still missing. In addition, the putative mechanism of aggregates retention by mothers is still controversial (Zhou et al., 2011; Spokoini et al., 2012; Liu et al., 2010).

A third model proposes that aging is tightly associated with mitochondrial dysfunction in yeast (Guarente, 2008) and in higher eukaryotes (Wallace, 2005; Houtkooper et al., 2013). Various events have been linked to the age-dependent loss of mitochondrial function, including changes in the maintenance of mtDNA integrity, mitochondrial dynamics and recycling, and the production of reactive oxygen species (Seo et al., 2010). In yeast, for instance, it was shown that a reduction in mitochondrial fission increases longevity (Scheckhuber et al., 2007). Recent studies also showed that damaged oxidized mitochondria are preferentially retained by mother cells, suggesting a role for these organelles in daughter cell rejuvenation (McFauline-Figueroa et al., 2011).

A decline in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$), which is required for respiration competence, has also been associated with age-dependent mitochondrial dysfunction (Lai et al., 2002). More recently, Veatch et al. (2009) showed that the vast majority of old mother cells generate *petite* daughters, which are slow-growing cells with a respiration defect due to mutations or the complete loss of mtDNA. The authors suggested that an age-dependent loss in $\Delta\Psi$ in mothers leads to a progressive decline in growth rate and ultimately triggers genomic instability via a defect in the biogenesis of iron-sulfur-cluster-containing proteins, which may be directly involved in genome maintenance (Veatch et al., 2009). Further work proposed that the loss of $\Delta\Psi$ results from an early (up to the fourth cell division) loss of vacuolar acidity (Hughes and Gottschling, 2012), which hampers pH-dependent transport of neutral amino acids and disrupts $\Delta\Psi$

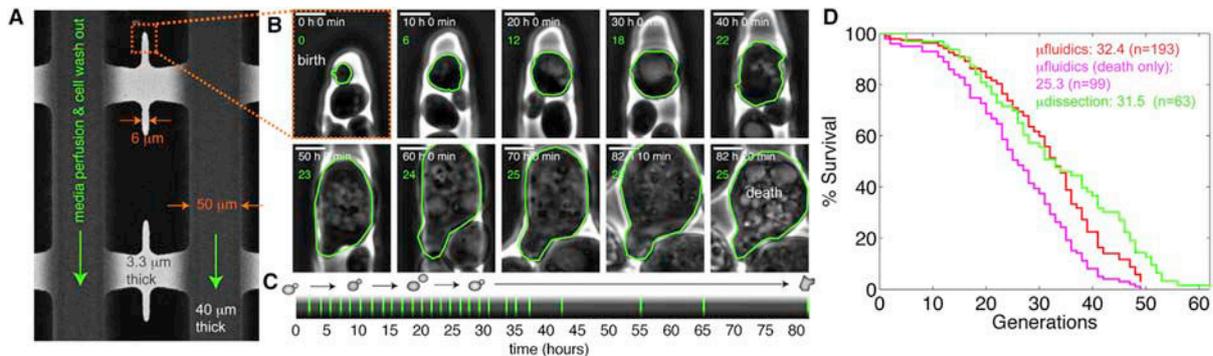


Figure 1. Principle of the Microfluidic Device and Tracking of Mother Cells

(A) Image of the CLiC microfluidic device.

(B) Sequence of phase contrast images taken at the indicated time points over the cell lifespan. The green contours highlight the cell of interest, and the green numbers indicate the replicative age. The scale bar represents 4 μm .

(C) Graphical representation of the lifespan of the cell shown in (B). The green vertical lines indicate the times at which budding occurred.

(D) Survival probability curves of cells growing in the microfluidic device (Kaplan-Meier estimator with [red curve] or without [magenta curve] censored events) or cells analyzed in a standard microdissection experiment (green curve).

See also [Figures S1–S4](#) and [Movie S1](#).

by an unknown mechanism. Interestingly, vacuole acidity is restored in young daughter cells (Hughes and Gottschling, 2012), providing an attractive potential connection between loss of $\Delta\Psi$, entry into senescence, and daughter rejuvenation.

One of the major barriers to understanding the mechanisms that drive cells into senescence is the difficulty in tracking the fate of single aging cells in real time. For instance, the most common method of measuring RLS, physical microdissection of cells, provides no information on cell physiology and is not suitable for monitoring molecular markers in aging cells. Cell sorting (Kennedy et al., 1994; Aguilaniu et al., 2003; Unal et al., 2011) and “mother enrichment” techniques (Lindstrom and Gottschling, 2009; Afonso et al., 2010) have been used successfully to examine the physiology of aging cells (Hughes and Gottschling, 2012). However, these techniques provide static snapshots of a cell population that may mask the complex dynamic behavior of individual cells. Very recently, several biophysical strategies have been developed that reveal the potential of microfluidics technology for aging studies in bacteria (Wang et al., 2010) and yeast (Lee et al., 2012; Xie et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Here, we report the development of a microfluidic device and quantitative image analysis platform that allows microscopic monitoring of successive divisions of single cells over their entire lifespan with high temporal resolution. Combining this technique with a computational approach, we revisit and challenge two important concepts established in recent yeast-aging studies. First, in contrast to the notion that cells undergo a progressive decline in proliferation, we show that cellular senescence follows a very abrupt transition to a slow growth regime, which we named the senescence entry point (SEP). Second, we demonstrate that the SEP is unrelated to a loss of $\Delta\Psi$ and/or to the formation of *petite* cells. Indeed, we show that the decline in $\Delta\Psi$ observed in some cells is an age-independent process that leads to clonal senescence and is thus incompatible with daughter cell rejuvenation. Finally, we report a phenomenon of

cell-cycle-dependent oscillations in mitochondrial fusion and fission that may play a role in the mother/daughter segregation of mitochondria, as suggested by a previous study (McFaline-Figueroa et al., 2011).

RESULTS

A Device for Tracking Cell Fate from Birth to Death

One of the limitations inherent to classical aging studies in yeast is the inability to track cells in real time over their lifespan. To overcome this, we developed a custom microfluidic device that allows microscopic visualization of successive divisions of single yeast cells from birth to death. The device was designed to monitor a single mother cell loaded into a cavity and is therefore termed CLiC. Cells in exponential growth phase are loaded into an array of “trapping areas” (length \times width \times height, $90 \times 40 \times 3.3 \mu\text{m}$; [Figures 1A](#) and [S1A](#)) and allowed to proliferate for the duration of the experiment (typically 120 hr). The trapping areas are connected to supply channels that ensure continuous media replenishment and allow excess cells to be flushed out of the device.

Cell proliferation within the trapping area leads to colonization of the small cavities ($6 \mu\text{m}$ wide) by a few cells ([Figure S1B](#)). Due to the axial budding pattern of haploid cells, a cell that reaches the enclosed tip of the cavity (referred to as a CLiC cell) tends to bud toward the cavity exit ([Figures S1C](#) and [S1D](#)), allowing successive divisions to be monitored over time ([Figure 1B](#) and [Movie S1](#)). However, it is possible that the CLiC cell could eventually leave the cavity due to occasional polarity switches and random cell rotation. Despite this limitation, we found the probability of losing a cell during its lifespan was $<35\%$, which outperforms a previous microfluidic device that reported 50% cell loss within the first 10 hr and more than 70% in total (Lee et al., 2012). Up to 60 cavities in the CLiC device can be imaged (phase contrast and fluorescence) in parallel during the

time-lapse interval of 10 min. Thus, by monitoring the budding events of individual CLiC cells, we are able to follow the dynamics of division (Figure 1C) and determine the RLS of each cell.

Using this methodology, we observed a reproducible median RLS of 32.4 ± 1.4 generations for the BY4741 strain in synthetic complete dextrose (SCD) medium (based on Kaplan-Meier estimator; $n = 191$ cells; Figure 1D). This value was not significantly different (log rank test; $p = 0.3$) from the RLS obtained using a standard microdissection technique (31.5 ± 1 ; $n = 63$; Figure 1D) but was slightly higher than RLS values reported for earlier versions of microfluidic devices (21 divisions in SCD [Lee et al., 2012] and <20 in yeast extract peptone dextrose [YPD] [Xie et al., 2012]). The Kaplan-Meier estimator used to measure the RLS allows one to take into account cells that leave the trapping area before death (such events are known as “right-censored” in standard survival analysis). Therefore, this method provides an unbiased estimation of the mean RLS in the microfluidics device, which can be compared to microdissection experiments. For the remainder of the study, however, only cells dying within the trapping area were included in the analyses, for which the median RLS was 25.3 ± 1 ($n = 125$; Figure 1D).

Although the similarity of the results obtained with the microdissection and microfluidics methodologies suggested that the CLiC device did not affect cell survival, CLiC cells at the tip of the cavity are relatively confined. Therefore, we measured the kinetics of medium diffusion/convection through a trapping area fully loaded with cells and verified that the medium flow was indeed sufficient to ensure adequate nutrient supply to the cavity tips (Figure S2; Supplemental Information). In addition, the mean division time of young mother cells in the CLiC device ($T_{div} = 78.3 \pm 0.5$ min) was similar to that in other microfluidic devices (Charvin et al., 2008).

The Senescence Entry Point Marks the Sharp Transition to a Slowly Replicating State

Early studies used standard microdissection techniques to investigate the RLS of individual yeast cells (Egilmez and Jazwinski, 1989; Kennedy et al., 1994; Bitterman et al., 2003) and showed that the average division time increased with generation number. This key observation suggested that mother cells undergo a progressive age-associated decline in cellular function and eventually reach a state of replicative senescence.

To investigate the dynamics of cell division in aging yeast cells, we measured the division times of individual CLiC cells (using custom MATLAB software phyloCell; Supplemental Information). Analysis of division frequency as a function of generation number unexpectedly revealed that most cells underwent a sharp transition from a fast to a rapidly declining division rate (Figure 2A). We developed a routine to analyze the dynamics of division of individual cells and align all the traces to the point of entry into the slow division mode, which allowed us to separate the lifespan into healthy and senescent phases and to cluster the data according to the number of generations after entry into senescence (Figure 2B). When the division times of the aligned trajectories were averaged, we calculated that the cells transitioned from $T_{div} = 78.3 \pm 0.5$ min ($n = 1,172$) to $T_{div} = 238 \pm 11$ min ($n = 188$) in less than three divisions (Figures 2C and

S3). We termed this abrupt transition the senescence entry point, or SEP.

These results are in striking contrast to the classical view that cellular aging is associated with a gradual decrease in replicative potential. The switch-like transition would not have been detected in studies in which division times were quantified by averaging the cell trajectories from birth (Kennedy et al., 1994), which results in pooling of the division events of short- and long-lived cells (Figures S4A and S4B). Recent work attempted to eliminate this artifact by synchronizing cell trajectories from death (Lee et al., 2012; Xie et al., 2012; Figures S4C and S4D). However, when we synchronized our data from birth, death, and SEP (Figure S4), the coefficients of variation (CV) of the division timings indicated that our *in silico* synchronization procedure more successfully limited intersample variability and therefore provided a more appropriate way to group the individual trajectories (see Figures S4E and F). Last, we also observed an abrupt transition to senescence using the microdissection assay, in which dissection timing records allowed us to estimate cell-cycle durations (see Figures S4G and S4H).

Strikingly, the two distinct physiological phases followed different statistics. Before the SEP, cells underwent an average of 19.2 ± 1.0 generations (CV = 0.42) according to a roughly Gaussian distribution (Figure 2D); in contrast, the number of generations in the post-SEP senescent state (mean 5.4 ± 0.6 generations; CV = 0.92) was exponentially distributed (Figure 2E). The number of cell divisions in the healthy and senescent phases of the lifespan did not correlate (correlation coefficient <0.1 ; data not shown), emphasizing the clear demarcation of the physiological states. Finally, the large increase in the CV of division times before and after the SEP (<0.2 and >0.6 , respectively; Figure 2C) suggests that loss of control of the cell cycle is an important hallmark of the onset of senescence.

The SEP Is Not Linked to a Decline in $\Delta\Psi$

Veatch et al. (2009) recently proposed that aging mother cells, which eventually produce *petite* daughters, undergo a mitochondrial crisis leading to growth defects and increased genomic instability. This model was further supported by direct evidence that aging mothers experience a decline in mitochondrial membrane potential (Hughes and Gottschling, 2012). We therefore reasoned that the SEP and consequent growth slowdown observed here should fit this model of senescence-associated mitochondrial dysfunction.

To test this, we used a strain carrying two fluorescent mitochondrial markers, Tom70-GFP (green) and preCox4-mCherry (red), developed by Veatch et al. (2009), for real-time monitoring of the onset of mitochondrial dysfunction in aging mothers. Tom70 is a component of the nuclear-encoded protein import complex located at the outer mitochondrial membrane and thus serves as a mitochondrial marker, whereas preCox4 is the inner mitochondrial membrane targeting presequence of Cox4. Cox4 is a protein that requires $\Delta\Psi$ for mitochondrial import. It was shown previously that the decrease in preCox4-mCherry mitochondrial localization coincides with a decline in the $\Delta\Psi$ -dependent DiOC₆ mitochondrial staining in ethidium-bromide-treated cells (Veatch et al., 2009) as well as in aging cells (Hughes and Gottschling, 2012). We confirmed that the

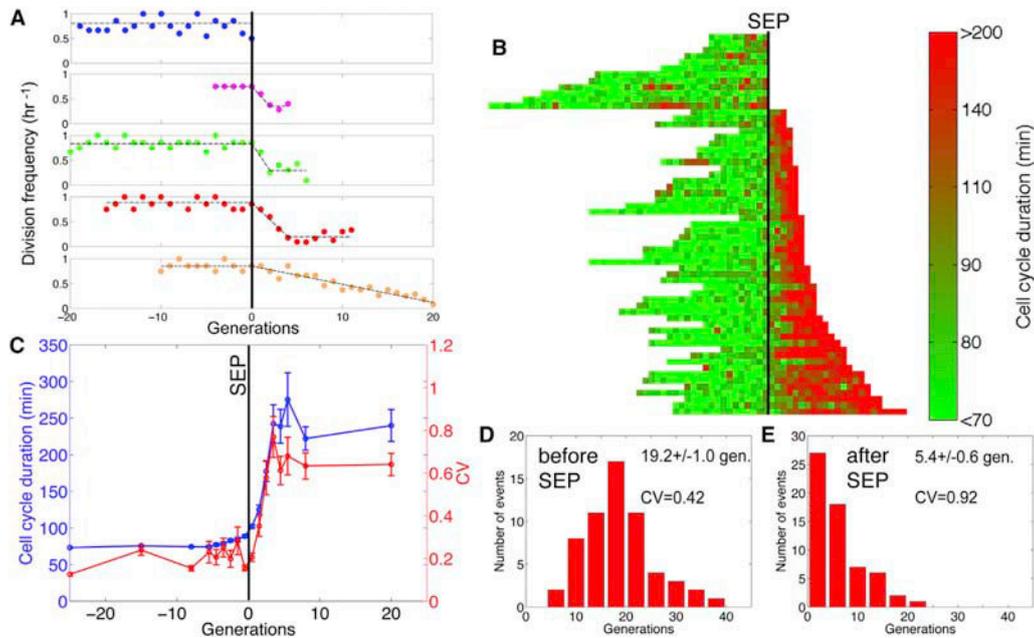


Figure 2. Yeast Cells Undergo a Sharp Transition to Senescence

(A) Frequency of cell division as a function of generation number for four representative cells (colored points). The black dashed line is the best fit to a piecewise function that assumes a constant division rate before senescence, a decay regime upon entry into senescence, and a constant division rate in the senescent state. All traces are synchronized to the senescence entry point (SEP).

(B) Clustered display of cell division trajectories resulting from the synchronization based on division frequency (as described in [A]). Each horizontal line ($n = 61$) represents a single mother cell, and each segment corresponds to one cell division. The lines are clustered vertically according to the duration of post-SEP survival from short (top) to long (bottom). Color coding represents cell-cycle duration.

(C) Mean cell-cycle duration (blue curve) and CV (red curve) for the data shown in (B).

(D and E) Distribution of number of generations undergone by mother cells before (D) and after (E) the SEP ($n = 61$).

level of preCox4-mCherry mitochondrial fluorescence was tightly correlated to the DiOC₆ signal in a population of exponentially growing cells (Figure S5). Therefore, this fluorescent marker serves as a relevant proxy for $\Delta\Psi$. We used our custom software phyloCell to delineate the contours of mitochondrial structures using the Tom70-GFP signal (Figures 3A and 3B) and then quantified the mean mitochondrial fluorescence levels of Tom70-GFP and preCox4-mCherry in individual cells (Figures 3C and 3D).

Strikingly, we observed that, in some cells, the preCox4-mCherry fluorescence within the mitochondria eventually vanished (Figures 3A and 3C) but in other cells was maintained at consistently high levels throughout their lifespan (Figures 3B and 3D; see also Figure S6 and Movie S3). The loss of mitochondrial preCox4-mCherry fluorescence was consistent with experiments in which cells were treated with ethidium bromide to induce mtDNA mutation (Figure S7), as described previously (Veatch et al., 2009). We used a piecewise linear model (Figure 3C) to quantify the decline in mitochondrial fluorescence, which clearly distinguished between the subpopulations of cells that did and did not undergo a loss of $\Delta\Psi$ over their lifespan (referred to as $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$, respectively). The fraction of $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ cells was $30\% \pm 10\%$ and $58\% \pm 10\%$, respectively ($n = 77$; Figure 3E). In the remaining 12% of cells, we were

unable to clearly interpret the evolution of the preCox4-mCherry signal.

Analysis of the mean mitochondrial fluorescence at cell birth, SEP, and death indicated that the loss of $\Delta\Psi$ had already occurred in $\Delta\Psi^-$ cells by the SEP (Figure 3F). Indeed, averaging all of the $\Delta\Psi^-$ cell data to precisely time and order the events demonstrated that the decline in $\Delta\Psi$ began at 5.6 ± 1.3 hr after cell birth and reached baseline 10.1 ± 0.9 hr later (Figure 3G). Intriguingly, the SEP occurred only 3 ± 1.9 hr after $\Delta\Psi$ had reached zero, strongly suggesting a causal link between these two events. The timing of these events is compatible with the typical 15 hr decay in growth rate observed in ethidium-bromide-treated young cells (Veatch et al., 2009).

Overall, the behavior of $\Delta\Psi^-$ cells appeared to be in good agreement, both qualitatively and quantitatively, with the findings of Veatch et al. However, we observed that the SEP occurred even in cells that did not display a decline in $\Delta\Psi$ (Figure 3D), arguing against a role for $\Delta\Psi$ in the transition to senescence. To further examine the differences between $\Delta\Psi^+$ and $\Delta\Psi^-$ cells, we measured the time from SEP to death and from birth to SEP in the two populations. The post-SEP survival time for $\Delta\Psi^-$ cells was much longer than that of the $\Delta\Psi^+$ cells (36.8 ± 4 hr versus 19.3 ± 3 hr, respectively; $p = 10^{-5}$; Figures 3H and S8), which suggested that the $\Delta\Psi^-$ cells were in a

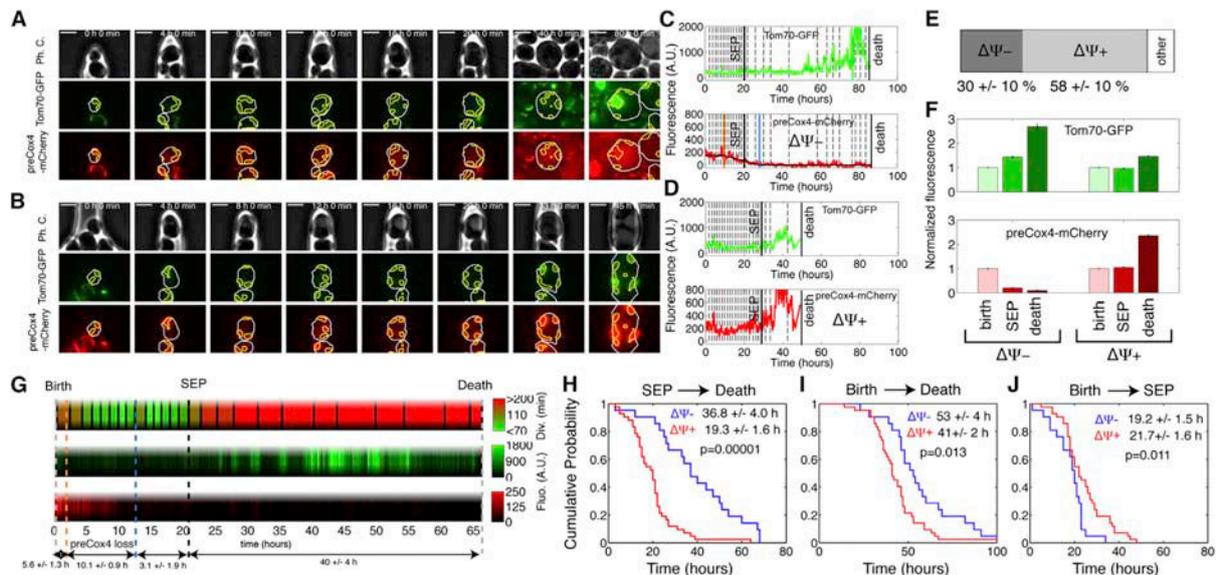


Figure 3. Decline in Mitochondrial Membrane Potential in Individual Mother Cells

(A and B) Time-lapse sequence of phase contrast and fluorescence (Tom70-GFP and preCox4-mCherry) images showing the successive divisions of individual cells with (A) and without (B) a decline in mitochondrial membrane potential. The white and yellow lines indicate the cell and mitochondrial contours, respectively. The scale bar represents 4 μ m.

(C and D) Quantification of mitochondrial markers over time for the cells displayed in (A) and (B), respectively. Vertical dashed lines indicate budding events, and solid vertical lines indicate the SEP and cell death. The preCox4-mCherry signal was fitted to a piecewise model to quantify the change in mitochondrial membrane potential. Vertical orange and blue lines in (C) indicate the onset and end of fluorescence decay, respectively. $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ indicate cells in which a decline in mitochondrial preCox4-mCherry fluorescence was or was not detected, respectively. a.u., arbitrary units.

(E) Fraction of aging mother cells with or without a decline in mitochondrial function ($n = 77$).

(F) Average level of Tom70-GFP and preCox4-mCherry fluorescence in a population of cells at cell birth, SEP, and death. Measurements are normalized to the levels at cell birth.

(G) Representative trajectory of an individual cell illustrating the typical order of events in the lifespan of $\Delta\Psi^-$ cells (top, cell-cycle duration; middle, Tom70-GFP level; bottom, preCox4-mCherry level). The average duration between the indicated events are shown at the bottom and are the mean \pm SE of all $\Delta\Psi^-$ cells processed in this analysis ($n = 23$).

(H–J) Cumulative probability histograms of interval duration from SEP to death (H), birth to death (I), and birth to SEP (J). The numbers indicate the median time associated with the distribution for $\Delta\Psi^-$ (blue lines) and $\Delta\Psi^+$ (red lines).

physiological state that conferred metabolic longevity, probably linked to the loss of respiration. In keeping with this, $\Delta\Psi^-$ cells also had longer overall lifespans than $\Delta\Psi^+$ cells (53 ± 4 hr versus 41 ± 2 hr; $p = 0.013$; Figure 3I). Interestingly, there was no significant difference in the RLS of $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ cells ($p = 0.3$; Figure S9), in agreement with previous findings (Kaeberlein and Kennedy, 2005; Heeren et al., 2009). The SEP occurred slightly yet significantly earlier in $\Delta\Psi^-$ cells than in $\Delta\Psi^+$ cells (19.2 ± 1.5 hr versus 21.7 ± 1.6 hr after birth, respectively; $p = 0.011$; Figure 3J). Collectively, these data suggest that the shift to a slow replicative rate by $\Delta\Psi^-$ cells reflects a transition between two metabolic states rather than entry into senescence.

The Decline in $\Delta\Psi$ Is Age-Independent

The hypothesis that $\Delta\Psi$ is linked to the transition to senescence assumes that loss of $\Delta\Psi$ is an age-dependent process. This derives from the observations that old (but not young) mothers generate a high proportion of *petite* daughters (Veatch et al., 2009) and that aging mothers show reduced mitochondrial membrane potential (Hughes and Gottschling, 2012). However,

we noted that the time between the onset of loss of $\Delta\Psi$ and the appearance of the slow-growth phenotype was on average larger than 13 hr (see Figure 3G). Thus, the physiological consequences of the decline in $\Delta\Psi$ were not detected until long after its onset, which could have resulted in the interpretation that loss of $\Delta\Psi$ occurs only in old mother cells. Therefore, we sought to determine whether the onset of loss of $\Delta\Psi$ was age-dependent or occurred in a spontaneous and age-independent manner.

For this, we used a computational analysis to compare the experimental distribution of the time at which $\Delta\Psi$ began to decline in the population of mother cells with two models in which the loss of $\Delta\Psi$ is hypothesized to be age-independent or age-dependent. We assumed that the probability of cell death per generation for a cell of replicative age n , referred to as $q(n)$, increased quadratically with n : $q(n) = q_0 \times n^2$ (where q_0 is a constant; Figure 4A), as proposed previously (Gillespie et al., 2004). Because the RLS of $\Delta\Psi^+$ and $\Delta\Psi^-$ cells were identical (Figure S8), we used the same value of q_0 for both cell types. We implemented a stochastic simulation of a lifespan assay according to this set of rules in MATLAB (Supplemental Experimental

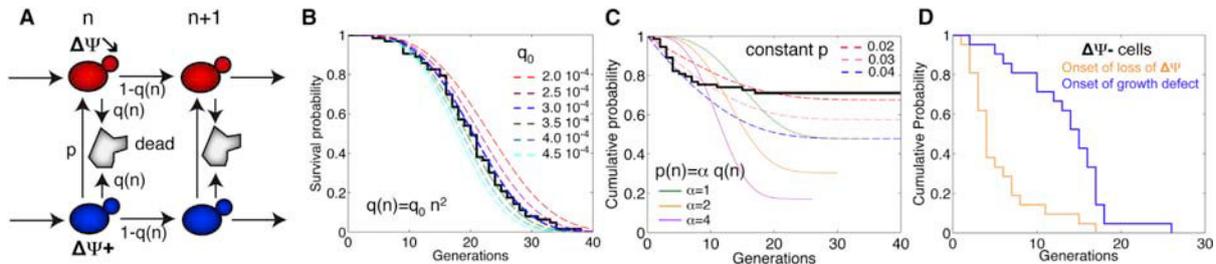


Figure 4. Age-Independent Decline in Mitochondrial Membrane Function in Aging Mother Cells

(A) Model for the transition from the $\Delta\Psi^+$ state (blue cells) to a state in which $\Delta\Psi$ starts declining (red cells) in cells of replicative age n . The probability of dying (gray cells) at each generation n is set by $q(n)$. We define p as the probability of undergoing the transition to the onset of loss of $\Delta\Psi$. (B) Numerical simulation of the RLS of mother cells, assuming a quadratic increase of q with n : $q = q_0 n^2$. Each dashed colored line corresponds to the value of q_0 as shown. The black line represents the experimentally obtained data. (C) Cumulative probability of loss of $\Delta\Psi$ from numerical simulations corresponding to the model described in (A) (colored lines) compared with the experimentally determined timing of the onset of $\Delta\Psi$ decline (solid black line). Dashed colored lines correspond to the indicated p values (assuming p is constant), and the solid colored lines correspond to a model in which p is age-dependent (i.e., p is proportional to q). (D) Experimental cumulative probability of onset of $\Delta\Psi$ decline (orange line) and onset of the growth defect (blue line).

Procedures) and found that the quadratic model for cell mortality fitted the experimental RLS curve very accurately, yielding a best fit for q_0 of 3×10^{-4} (Figure 4B).

For the age-independent model, we assumed that the onset of loss of $\Delta\Psi$ occurred randomly according to a constant probability per generation p . Using values of p from 0.02 to 0.04, we obtained a reasonable agreement between the simulation and the cumulative probability of maintaining high $\Delta\Psi$ as a function of age (Figure 4C, dashed lines). The experimental distribution was obtained by measuring the timing of the onset of loss of $\Delta\Psi$ using the fitting procedure described in Figure 3C. In particular, it is striking that this model could semiquantitatively explain both the timescale associated with the loss of $\Delta\Psi$ (experimentally determined to be 5.6 ± 1.3 hr, corresponding to approximately four generations; in the simulation, $\sim 50\%$ of the cells that ultimately became $\Delta\Psi^-$ have done so after six generations) and the fraction of $\Delta\Psi^-$ cells in the population of aging mothers (experimentally determined to be $30\% \pm 10\%$; in the simulation, $\sim 40\%$ using $p = 0.03$) using a single free parameter.

For the age-dependent model, we assumed that the probability p of switching to a state in which $\Delta\Psi$ declines was proportional to $q(n)$: $p(n) = \alpha q(n)$, where α is a constant. This model appeared to be incompatible with the observations, regardless of the value of α : indeed, the model could not accommodate either the short timescale decay of the experimental data or the high fraction of $\Delta\Psi^+$ cells that remained in the population at the end of the lifespan (Figure 4C, solid lines).

The finding that the onset of loss of $\Delta\Psi$ appeared to follow Poisson statistics was not inconsistent with the late occurrence of *petite* daughters observed in old mothers (Veatch et al., 2009). Indeed, because the decline of $\Delta\Psi$ occurs over ~ 10 hr (Figure 3G), the growth defect (used to assess *petiteness*) appeared long after the onset of the decline in $\Delta\Psi$ (Figure 4D).

This quantitative analysis therefore suggested that the $\Delta\Psi^-$ phenotype appears stochastically in the population of aging mothers, with a constant age-independent probability $p \sim 0.03$ per generation. To probe this further, we compared this p value with the probability of spontaneous formation of *petite* colonies

in bulk cultures. We performed standard plating assays to measure the fraction R of *petite* colonies in the same strain as used in the microfluidics assay. The probability of *petite* formation can be deduced from R and the specific growth rates of wild-type and *petite* cells (see the Supplemental Information), which we measured using standard turbidity measurements. The fraction R measured ($33.5\% \pm 1\%$; Table S1) gave $p = 0.051 \pm 0.001$, which is clearly in the same range as the value obtained in the microfluidics lifespan assay. We conclude that the loss of $\Delta\Psi$ in a fraction of aging mothers is very likely to originate from the spontaneous loss or mutation of mtDNA and is therefore not a hallmark of aging.

The Decline in $\Delta\Psi$ Is Incompatible with Daughter Cell Rejuvenation

An essential feature of yeast aging is the ability of daughters of aged mothers to recover a full lifespan potential, that is, to undergo rejuvenation. This striking property was first characterized by measuring the mean generation time of daughters born from mothers of varying ages (Egilmmez and Jazwinski, 1989). We investigated the inheritance of the $\Delta\Psi^-$ phenotype in daughters of aging mothers and directly monitored the rejuvenation process using the CLiC device, which allowed us to track the fate of daughters in the trapping area over approximately two to three generations.

Importantly, we found that the decline in preCox4-mCherry fluorescence in $\Delta\Psi^-$ mothers was transmitted to their successive buds (Figures 5A and 5B), suggesting that the loss of respiration was fully inherited by the daughters. We also measured the cell cycle duration of the individual progeny and found that the entire progeny of slowly dividing $\Delta\Psi^-$ mother cells displayed a slow-growth phenotype (monitored over >40 hr; Figure 5C; Movie S4). This observation is reminiscent of the “clonal senescence” described earlier in yeast (Lai et al., 2002). In striking contrast, daughters of post-SEP $\Delta\Psi^+$ mothers eventually gave rise to progeny with rapid cell division, indicating that rejuvenation of this lineage occurred even after the SEP (Figure 5D; Movie S5).

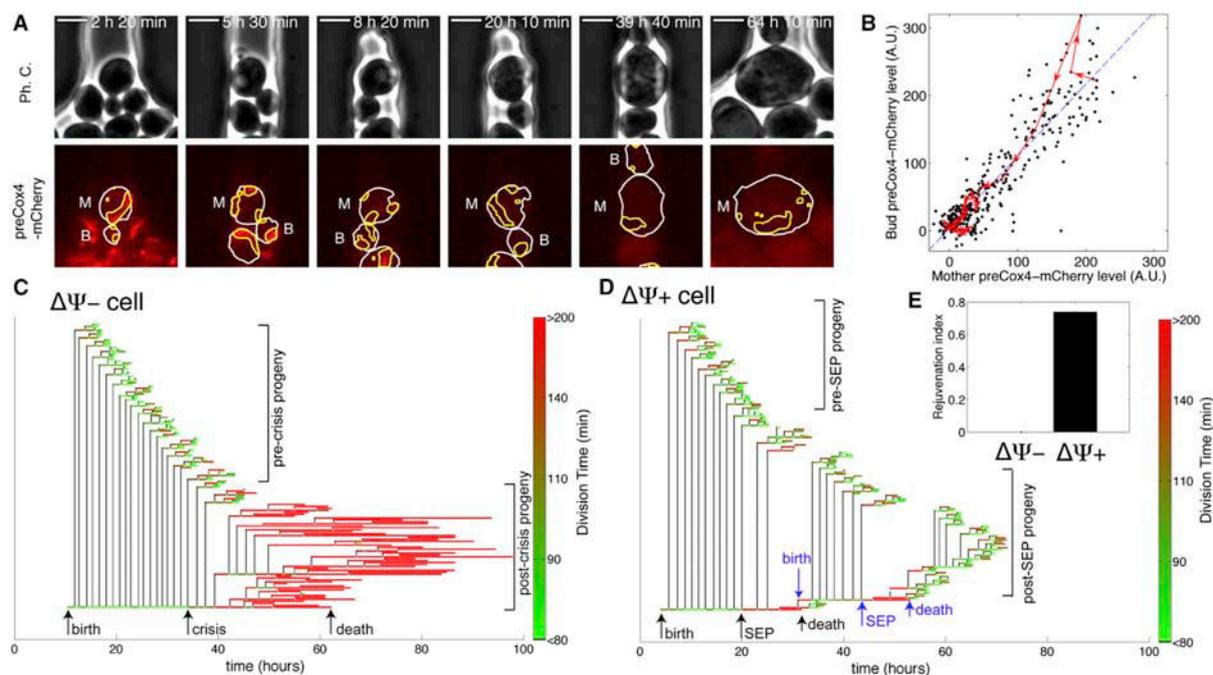


Figure 5. Inheritance of Mitochondrial Markers and Daughter Cell Rejuvenation

(A) Time-lapse sequence of phase contrast and fluorescence images showing the decay of the mitochondrial preCox4-mCherry signal in mother (M) and its successive bud (B). The white and yellow lines indicate the cell and mitochondrial contours, respectively. The scale bar represents 4 μ m.

(B) preCox4-mCherry signals in bud versus mother upon cell division. The scatter plot (black dots) pools all the data obtained from $\Delta\Psi^-$ cells ($n = 365$ division events). The red line shows the decrease in preCox4-mCherry fluorescence for one specific mother cell. The blue dashed line is a fit to the scatter plot ($B = 1.06 [\pm 0.05] M + 3.6 [\pm 4]$), showing equal distribution of fluorescence between the mother and bud.

(C and D) Sample pedigrees of single $\Delta\Psi^-$ (C) and $\Delta\Psi^+$ (D) cells, showing the successive divisions of its progeny. Color coding represents the division time.

(E) Rejuvenation index based on the behavior of daughters of post-SEP $\Delta\Psi^+$ and $\Delta\Psi^-$ mother cells.

We defined a rejuvenation index as the fraction of post-SEP $\Delta\Psi^+$ or postcrisis $\Delta\Psi^-$ mothers that generated a progeny with normal cell-cycle durations. Using this definition, the rejuvenation index of $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ cells was measured to be 0 and 0.74, respectively ($n = 77$; Figure 5E). This quantification thus confirmed that the loss of $\Delta\Psi$ led to an irreversible phenotype that was inconsistent with daughter cell rejuvenation. Therefore, these results further suggested that $\Delta\Psi$ loss should not be regarded as part of the mechanism leading to the entry into cellular senescence, as proposed earlier (Veatch et al., 2009; Hughes and Gottschling, 2012).

Interestingly, our analysis revealed that scoring the clonal replicative slowdown of the progeny of an aging mother was a reliable method of determining whether this cell had transitioned to the $\Delta\Psi^-$ state, regardless of preCox4-mCherry marker measurements. We used this tight correlation to assess the fraction of $\Delta\Psi^-$ cells in other strain backgrounds. S288C-related strains have been shown to display a very high (yet variable) level of *petite* cells compared with W303 or natural strains (Dimitrov et al., 2009). Indeed, in replicative aging assays, we found that only 9% of W303 cells were $\Delta\Psi^-$ cells, which is much lower than in a S288C background and in good agreement with plating assays (Table S1). Thus, the large fraction of cells that undergo a

transition to a $\Delta\Psi^-$ phenotype during their lifespan is somewhat specific to the S288C background.

Budding Is Accompanied by Dynamic Mitochondrial Fusion in Aging Mothers

Our finding that the loss of $\Delta\Psi$ is age-independent does not preclude the involvement of mitochondrial dysfunction in the aging process. Indeed, it has been proposed that asymmetrical segregation of damaged mitochondria could be a mechanism for the rejuvenation of daughter cells (Seo et al., 2010; McFauline-Figueroa et al., 2011). During our mitochondrial marker experiments, we noted that Tom70-GFP fluorescence was dramatically increased in post-SEP mothers (Figure 3); therefore, we asked whether this high fluorescence level was transmitted to the progeny. Whereas the fluorescence level was identical in pre-SEP mothers and their buds, it remained much higher in post-SEP mothers than in their buds (Figure 6A). This phenomenon was observed in both $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ cells, demonstrating that it was independent of $\Delta\Psi$.

Analysis of single-cell images revealed that small-budded cells contained very bright clusters of mitochondria that disappeared upon cell division (Figure 6B; Movie S6). Indeed, quantification of the mean mitochondrial Tom70-GFP signal revealed

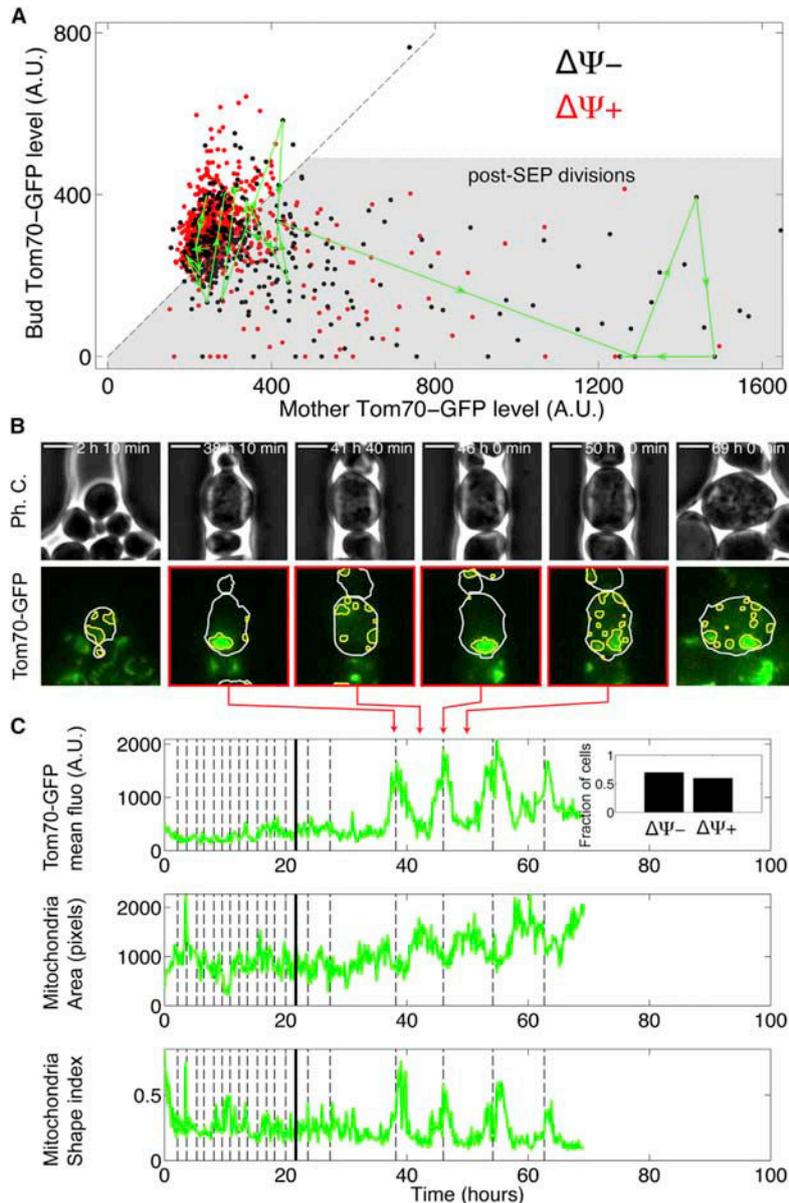


Figure 6. Inheritance of Mitochondrial Markers and Rejuvenation in $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ Cells

(A) Mitochondrial Tom70-GFP signal in bud versus mother upon cell division. The scatter plots pool all the data obtained from $\Delta\Psi^-$ (black) and $\Delta\Psi^+$ (red) cells. The green line shows the signal trajectory for a specific cell. The dashed line indicates the diagonal, and the shaded area roughly indicates the data corresponding to post-SEP mother cells.

(B) Time-lapse sequence of phase contrast and Tom70-GFP fluorescence images at the indicated times, highlighting the oscillations in the mitochondrial Tom70-GFP level in a post-SEP mother cell. The scale bar represents 4 μm .

(C) Quantification of mitochondrial Tom70-GFP level, mitochondrial area, and the overall shape index (defined as the area divided by the square of the perimeter) for the cell displayed in (B). Inset shows the fraction of cells displaying oscillatory behavior in mitochondrial fusion/fission.

DISCUSSION

Quantitative Real-Time Imaging of Single Yeast Cells Reveals an Unexpectedly Abrupt Entry into Senescence

In this study, we described a microfluidic device that allowed us to quantitatively assess both the transition to senescence and the decline in $\Delta\Psi$ in individual yeast cells. The device design allowed us to start our assays with unstressed virgin cells and to monitor cellular processes with an unmatched temporal resolution (Lee et al., 2012; Xie et al., 2012; Zhang et al., 2012). Using this methodology, we discovered that aging yeast cells undergo a sharp transition from fast to slow growth that occurs within three division cycles. It seems likely that this remarkably abrupt entry into senescence could not be detected in experiments in which single-cell data were pooled (Egilmez and Jazwinski, 1989) or in which variability in cell fate was not fully taken into account (Lee et al., 2012; Xie et al., 2012; Zhang et al., 2012). Indeed, we confirmed that

pooling of the data masks the distinct replicative characteristics of pre-SEP and post-SEP cells, thus artificially smoothing the transition to senescence.

Our quantitative analysis of pre- and post-SEP cell division sheds light on the replicative senescence state. First, we found that post-SEP cells exhibit a loss of cell-cycle control, as illustrated by the large increase in CV of cell-cycle duration following the SEP. This is a clear hallmark of senescence, although further studies will be necessary to identify the molecular mechanisms leading to the loss of cell-cycle control and ultimately to division

that this phenomenon occurred in phase with the cell cycle (Figure 6C) and was in part due to the decrease in total mitochondrial area and overall rounding of its shape. We found that ~60% of cells exhibited this unexpected cycling behavior of mitochondria fusion/fission after the SEP. These results thus revealed an unexpected feature of mitochondrial dynamics triggered by the SEP. We speculate that the transient formation of mitochondrial clusters upon budding might impair their transmission and thus protect the daughter cells from importing damaged mitochondria, as previously described (McFaline-Figueroa et al., 2011).

that this phenomenon occurred in phase with the cell cycle (Figure 6C) and was in part due to the decrease in total mitochondrial area and overall rounding of its shape. We found that ~60% of cells exhibited this unexpected cycling behavior of mitochondria fusion/fission after the SEP. These results thus revealed an unexpected feature of mitochondrial dynamics triggered by the SEP. We speculate that the transient formation of mitochondrial clusters upon budding might impair their transmission and thus protect the daughter cells from importing damaged mitochondria, as previously described (McFaline-Figueroa et al., 2011).

arrest (Delaney et al., 2013). Second, the apparent switch-like transition in cellular physiology challenges the widely accepted idea that cellular aging is a gradual process. However, a sharp SEP does not preclude the involvement of progressively accumulated damaged cellular components, as proposed long ago (Egilmez and Jazwinski, 1989). Indeed, it is possible that the SEP is triggered once deleterious factors reach a critical level; if so, the sharp entry into a slow replicative mode would actually highlight the remarkable buffering capabilities of the cell-cycle machinery against cellular damage.

Loss of $\Delta\Psi$ Is Age-Independent and Is Incompatible with Daughter Cell Rejuvenation

The possible role of age-dependent mitochondrial dysfunction in the transition to replicative senescence was observed in a study of aging mother cells that gave rise to slow-growing *petite* daughters (Veatch et al., 2009) and was supported by further work showing direct evidence for the loss of $\Delta\Psi$ in aging mothers (Hughes and Gottschling, 2012). Consistent with these findings, we identified a fraction of cells (~30%) that showed a progressive loss in $\Delta\Psi$ during the transition to senescence. However, the vast majority of cells maintained normal $\Delta\Psi$ throughout their lifespan and both $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ cells apparently passed through the SEP. Further statistical analysis of the onset of loss of $\Delta\Psi$ in aging mothers supported a model in which the transition to a nonrespiring state was a spontaneous and age-independent event and was incompatible with an age-dependent model, as assumed by Veatch et al. This result was reinforced by the fact that the probability per generation of randomly transitioning to a nonrespiring state, as deduced from our single-cell experiments, was comparable to the probability measured from *petite* formation assays in bulk.

Our quantitation of mother-daughter inheritance of the $\Delta\Psi^-$ phenotype in individual cells allowed us to establish a direct link between the observed loss of $\Delta\Psi$ in aging mothers (Hughes and Gottschling, 2012) and the high frequency of the *petite* phenotype in daughters of old mothers (Veatch et al., 2009). We found that the decline in $\Delta\Psi$ was both irreversible and heritable and resulted in a clonal lengthening of the cell cycle in the entire progeny of individual $\Delta\Psi^-$ mothers (Lai et al., 2002). This phenomenon could be interpreted as the mother cells reaching a point of no return, beyond which rejuvenation is impaired. However, this view is challenged by corresponding measurements showing that the vast majority of aging $\Delta\Psi^+$ mothers give birth to a rejuvenated lineage, even after they have passed the SEP. Interestingly, this latter observation suggests that the putative asymmetrical segregation of deleterious factors is not completely abolished in post-SEP mothers. Therefore, whereas the SEP is an irreversible hallmark of aging for mother cells, further investigation will be necessary to decipher the rules that limit the recovery of replicative potential in daughters of very old mothers.

Two factors in particular may explain the divergent conclusions of our study and that of Veatch et al. (2009) regarding the association between loss of $\Delta\Psi$ and senescence. One is the large variability in the incidence of the *petite* phenotype across the different yeast strains. Other studies in the same laboratory reported proportions of nonrespiring cells ranging from ~30%

(Lindstrom et al., 2011) to ~95% (Veatch et al., 2009; Hughes and Gottschling, 2012) in the S288C background, which was proposed to originate from variations in genes controlling the maintenance of mtDNA (Dimitrov et al., 2009; Hess et al., 2009; Lindstrom et al., 2011). We confirmed that the S288C background has an unusually high (and variable, see Table S2) incidence of *petite* cells compared with other lab (W303) or natural (RM11) strain backgrounds (Dimitrov et al., 2009; Hess et al., 2009). This suggests that the association between loss of $\Delta\Psi$ and replicative aging proposed by Veatch et al. may be tied to the unusually high *petite* formation rate in the strain used.

Interestingly, two recent studies showed an unexplained bimodality in the morphology and expression of stress markers of aging mother cells in microfluidics-based RLS assays using S288C strains (Lee et al., 2012; Xie et al., 2012). We hypothesize that this observation could reflect a heterogeneous mixture of respiring and nonrespiring cells. In addition, even though both cell types display the same lifespan in a wild-type strain (Kaeberlein and Kennedy, 2005; Heeren et al., 2009), one should pay attention to how much of the extension of lifespan observed in some longevity mutants is due to the presence of *petite* cells when using the widely studied S288C background (i.e., potentially misleading genetic interactions).

Second, our results highlight the fact that an age-independent event (i.e., that follows Poisson statistics) may be perceived as age-dependent if the time between the event and readout is protracted. For instance, statistical analysis of cell-cycle duration revealed that the growth defect occurs only in old mothers and thus appears to be age-dependent, but the putative triggering event—the onset of the decline in $\Delta\Psi^-$ —occurs at a constant rate per generation (Figure 4D). This nonintuitive and misleading kinetic effect presumably underlies the assumption that the occurrence of *petite* daughters is age-dependent in Veatch et al. (2009).

Interestingly, this argument has unexpected implications for deciphering the causality of events during the transition to senescence. In theory, one cannot exclude that cellular aging originates from spontaneously arising events, the frequency of which is not enhanced by cellular age, but which initiate a temporally controlled cascade of events leading to cell death. The large cell-to-cell variability in the lifespan (CV = 0.45; data not shown) is likely to reflect the role played by these stochastic processes in the control of longevity (Elowitz et al., 2002; Gandhi et al., 2011).

The Relationship between Mitochondrial Function, Senescence, and Daughter Cell Rejuvenation

Although our results argue against a role for loss of $\Delta\Psi$ in the entry into senescence, they do not contradict the link between loss of $\Delta\Psi$ and increased loss of heterozygosity (LOH) (Veatch et al., 2009). LOH has been reported to occur through a different mechanism in respiring aging cells (Lindstrom et al., 2011), which, in the light of our results, appears to confirm that increased genomic instability is a hallmark of aging in yeast (McMurray and Gottschling, 2003), independently of the respiratory status.

Recently, Hughes and Gottschling (2012) found that overexpression of genes that promote vacuolar acidity delayed the

onset of loss of $\Delta\Psi$ and extended longevity. Because these genes were known regulators of mitochondrial function (Dimmer et al., 2002), it is likely that their overexpression in a strain with a high frequency of nonrespiring cells may have reduced the rate of *petite* formation, a scenario that is compatible with our model.

Our study reveals insights into mitochondrial dynamics in aging cells. We found that mitochondrial markers increased significantly in post-SEP cells and that large mitochondrial clusters (Scheckhuber et al., 2007) present in post-SEP small-budded cells disappeared at cell division. As a consequence, daughters of post-SEP mother cells inherited fewer mitochondria. Mitochondrial clustering was manifest in both respiring and nonrespiring post-SEP cells, suggesting that the event is unrelated to the loss of $\Delta\Psi$ (Seo et al., 2010). Notably, the mitochondrial clusters were not observed in pre-SEP mothers, indicating that it is a consequence rather than a cause of the transition to senescence. We speculate that the transient formation of mitochondrial clusters upon budding might impair their transmission and thus protect the daughter cells from importing damaged mitochondria, as previously described (McFaline-Figueroa et al., 2011, Dalton and Carroll, 2013).

CONCLUSION

Our study introduces a microscopy-based methodology to track the fate of single yeast cells from birth to death. Our results emphasize the unique ability of single-cell analysis to monitor and decipher the complex biological processes associated with replicative aging. We characterized in detail the dynamics of the transition to cellular senescence and challenged a well-established model in which the loss of membrane potential appeared to be a key aspect of the transition to senescence. Our analysis also raises several fundamental questions: what are the mechanisms leading to cell-cycle slowdown and the SEP? How is the scenario proposed here influenced by specific longevity mutations? Further work combining our methodology with classical genetic studies will undoubtedly help to answer these questions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and Plasmids

All strains used in this study are congenic to S288C, unless specified. Additional details can be found in the [Supplemental Experimental Procedures](#).

Microfluidics

The microfluidic master was made using standard soft lithography techniques with SU-8 photoresist and custom polymer masks (Selba). Microchannels were cast by curing polydimethylsiloxane (PDMS) (Sylgard 184) and covalently binding the PDMS to a coverslip with a plasma cleaner (Diener). See the [Supplemental Experimental Procedures](#) for the detailed protocol.

Time-Lapse Microscopy

Cells were grown overnight, transferred to fresh medium the next morning, and allowed to grow to log phase until transfer to the microfluidic device in the afternoon. During the experiments, synthetic complete medium with 2% glucose (SCD) was continuously perfused through the device using a peristaltic pump (Ismatec; flow rate: 25 $\mu\text{l}/\text{min}$). Images were acquired every 10 min using a wide-field motorized epifluorescence microscope. See the [Supplemental Experimental Procedures](#) for the detailed protocol.

Image Analysis

Raw images were processed using custom software, termed phyloCell, using MATLAB and the image-processing toolbox. This software is freely available upon request. See the [Supplemental Experimental Procedures](#) for a detailed description of the image processing and quantification pipeline.

Petite Colony-Plating Assay

Cells were grown overnight in liquid YPD media and the next morning were plated on yeast extract peptone ethanol containing 2% glycerol and 0.1% glucose to monitor the formation of *petite* colonies, according to standard techniques. After 2 days of growth, the fraction of *petites* was scored by counting 200 cells from a triplicate experiment. The probability of *petite* formation per generation was calculated as described in the [Supplemental Experimental Procedures](#).

Mathematical Model for Petite Formation in Aging Cells

See the [Supplemental Experimental Procedures](#) for the detailed model used to fit the experimental distribution of *petite* emergence in aging cells.

Replicative Aging Assay with Microdissection

RLS assays were performed on plates as previously described (Kennedy et al., 1994), using a solid synthetic medium to match the conditions used in the microfluidics experiments.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, nine figures, two tables, and six movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.013>.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Dan Gottschling for providing mitochondrial markers used throughout this study. We acknowledge fruitful discussions regarding microfabrication with André Estevez-Torres, Christian Rick, and Hicham Majjad. We are grateful to Daniel Riveline for giving us the opportunity to use the Institut de Sciences et d'Ingénierie Supramoléculaire cleanroom. We also thank David Stillmann and Joseph Schacherer for providing yeast strains and Bertrand Séraphin for sharing his tetrad dissection microscope. We thank Zhou Xu, Teresa Teixeira, Michael Knop, Michel Toledano, and Poonam Bheda for insightful discussion and for a critical reading of the manuscript. We thank Marc Koch for imaging the microfabricated master wafer. This work was supported by the French Agence Nationale Pour la Recherche (ANR PCVI-2008-003) and the ATIP-AVENIR program.

Received: July 18, 2013

Revised: October 23, 2013

Accepted: November 7, 2013

Published: December 12, 2013

REFERENCES

- Afonso, B., Silver, P.A., and Ajo-Franklin, C.M. (2010). A synthetic circuit for selectively arresting daughter cells to create aging populations. *Nucleic Acids Res.* 38, 2727–2735.
- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nyström, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299, 1751–1753.
- Bitterman, K.J., Medvedik, O., and Sinclair, D.A. (2003). Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 376–399.
- Charvin, G., Cross, F.R., and Siggia, E.D. (2008). A microfluidic device for temporally controlled gene expression and long-term fluorescent imaging in unperturbed dividing yeast cells. *PLoS ONE* 3, e1468.
- Dalton, C.M., and Carroll, J. (2013). Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J. Cell Sci.* 126, 2955–2964.

- Delaney, J.R., Chou, A., Olsen, B., Carr, D., Murakami, C., Ahmed, U., Sim, S., An, E.H., Castanza, A.S., Fletcher, M., et al. (2013). End-of-life cell cycle arrest contributes to stochasticity of yeast replicative aging. *FEMS Yeast Res.* **13**, 267–276.
- Dimitrov, L.N., Brem, R.B., Kruglyak, L., and Gottschling, D.E. (2009). Polymorphisms in multiple genes contribute to the spontaneous mitochondrial genome instability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C strains. *Genetics* **183**, 365–383.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., and Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 847–853.
- Egilmez, N.K., and Jazwinski, S.M. (1989). Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **171**, 37–42.
- Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., and Swain, P.S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **297**, 1183–1186.
- Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., and Nyström, 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.
- Gandhi, S.J., Zenklusen, D., Lionnet, T., and Singer, R.H. (2011). Transcription of functionally related constitutive genes is not coordinated. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 27–34.
- Gehlen, L.R., Nagai, S., Shimada, K., Meister, P., Taddei, A., and Gasser, S.M. (2011). Nuclear geometry and rapid mitosis ensure asymmetric episome segregation in yeast. *Curr. Biol.* **21**, 25–33.
- Gillespie, C.S., Proctor, C.J., Boys, R.J., Shanley, D.P., Wilkinson, D.J., and Kirkwood, T.B.L. (2004). A mathematical model of ageing in yeast. *J. Theor. Biol.* **229**, 189–196.
- Guarente, L. (2008). Mitochondria—a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* **132**, 171–176.
- Heeren, G., Rinnerthaler, M., Laun, P., von Seyerl, P., Kössler, S., Klinger, H., Hager, M., Bogengruber, E., Jarolim, S., Simon-Nobbe, B., et al. (2009). The mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, Afo1p, determines cellular longevity through mitochondrial back-signaling via TOR1. *Aging (Albany, N.Y. Online)* **1**, 622–636.
- Hess, D.C., Myers, C.L., Huttenhower, C., Hibbs, M.A., Hayes, A.P., Paw, J., Clore, J.J., Mendoza, R.M., Luis, B.S., Nislow, C., et al. (2009). Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet.* **5**, e1000407.
- Houtkooper, R.H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moullan, N., Katsyuba, E., Knott, G., Williams, R.W., and Auwerx, J. (2013). Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* **497**, 451–457.
- Hughes, A.L., and Gottschling, D.E. (2012). An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* **492**, 261–265.
- Kaeberlein, M., and Kennedy, B.K. (2005). Large-scale identification in yeast of conserved ageing genes. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 17–21.
- 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.
- Khmelniskii, A., Meurer, M., Knop, M., and Schiebel, E. (2011). Artificial tethering to nuclear pores promotes partitioning of extrachromosomal DNA during yeast asymmetric cell division. *Curr. Biol.* **21**, R17–R18.
- Lai, C.-Y., Jaruga, E., Borghouts, C., and Jazwinski, S.M. (2002). A mutation in the ATP2 gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**, 73–87.
- Lee, S.S., Avalos Vizcarra, I., Huberts, D.H.E.W., Lee, L.P., and Heinemann, M. (2012). Whole lifespan microscopic observation of budding yeast aging through a microfluidic dissection platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 4916–4920.
- Lindstrom, D.L., and Gottschling, D.E. (2009). The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **183**, 413–422.
- Lindstrom, D.L., Leverich, C.K., Henderson, K.A., and Gottschling, D.E. (2011). Replicative age induces mitotic recombination in the ribosomal RNA gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **7**, e1002015.
- Liu, B., Larsson, L., Caballero, A., Hao, X., Oling, D., Grantham, J., and Nyström, T. (2010). The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. *Cell* **140**, 257–267.
- McFaline-Figueroa, J.R., Vevea, J., Swayne, T.C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2011). Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* **10**, 885–895.
- McMurray, M.A., and Gottschling, D.E. (2003). An age-induced switch to a hyper-recombinational state. *Science* **301**, 1908–1911.
- Mortimer, R.K., and Johnston, J.R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* **183**, 1751–1752.
- Scheckhuber, C.Q., Erjavec, N., Tinazli, A., Hamann, A., Nyström, T., and Osiewacz, H.D. (2007). Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat. Cell Biol.* **9**, 99–105.
- Seo, A.Y., Joseph, A.M., Dutta, D., Hwang, J.C., Aris, J.P., and Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J. Cell Sci.* **123**, 2533–2542.
- Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S.B., Gonnet, G., and Barral, Y. (2008). A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* **454**, 728–734.
- Sinclair, D.A., and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast. *Cell* **91**, 1033–1042.
- Spokoini, R., Moldavski, O., Nahmias, Y., England, J.L., Schuldiner, M., and Kaganovich, D. (2012). Confinement to organelle-associated inclusion structures mediates asymmetric inheritance of aggregated protein in budding yeast. *Cell Rep* **2**, 738–747.
- Unal, E., Kinde, B., and Amon, A. (2011). Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast. *Science* **332**, 1554–1557.
- Veatch, J.R., McMurray, M.A., Nelson, Z.W., and Gottschling, D.E. (2009). Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell* **137**, 1247–1258.
- Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 359–407.
- Wang, P., Robert, L., Pelletier, J., Dang, W.L., Taddei, F., Wright, A., and Jun, S. (2010). Robust growth of *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* **20**, 1099–1103.
- Xie, Z., Zhang, Y., Zou, K., Brandman, O., Luo, C., Ouyang, Q., and Li, H. (2012). Molecular phenotyping of aging in single yeast cells using a novel microfluidic device. *Aging Cell* **11**, 599–606.
- Zhang, Y., Luo, C., Zou, K., Xie, Z., Brandman, O., Ouyang, Q., and Li, H. (2012). Single cell analysis of yeast replicative aging using a new generation of microfluidic device. *PLoS ONE* **7**, e48275.
- Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Eldakak, A., Rubinstein, B., and Li, R. (2011). Motility and segregation of Hsp104-associated protein aggregates in budding yeast. *Cell* **147**, 1186–1196.

Supplemental information

**Aging Yeast Cells Undergo a Sharp Entry Into Senescence Unrelated to the Loss of
Mitochondrial Membrane Potential**

Steffen Fehrmann, Camille Paoletti, Youlian Goulev, Andrei Ungureanu, Hugo Aguilaniu, and Gilles Charvin

Supplemental figures:

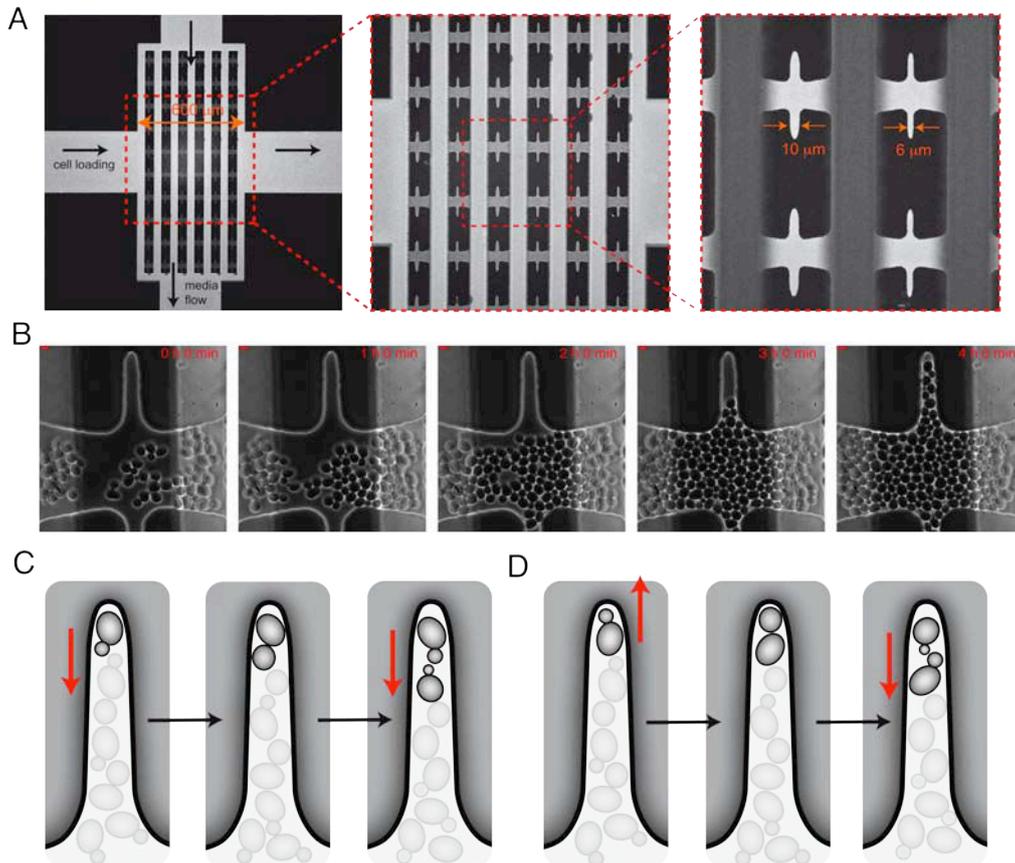


Figure S1. Principle of the CLiC device; Related to Figure 1

(A) Microfluidic device at different scales. Images taken with a confocal microscope showing the silicon wafer patterned with SU-8 photoresist. Left panel: the inlet/outlet for cell loading is perpendicular to the inlet/outlet for media perfusion. Middle panel: array of cell trapping areas connected by media flow channels. Right panel: Trapping areas and cavities. Cavities with different widths (6 and 10 μm) were designed to investigate potential deleterious effects of the cavity geometry on cell survival.

(B) Colonization of the CLiC device by proliferating cells. Time-lapse sequence of phase-contrast images acquired at the indicated time points showing cells immediately after loading and as they proliferate to fill the cavity. Cells present at $t = 0$ were loaded via the device loading channels. Scale bar = 4 μm .

(C-D) Diagram of the orientation of cells in the CLiC device. When the mother cell starts budding towards the cavity exit (red arrow, C), the axial budding pattern of haploid cells ensures that successive buds are produced in the direction of the cavity exit. If the initial bud orients towards the cavity tip (D), a newborn cell will bud adjacent to its birth scar and hence towards the cavity exit.

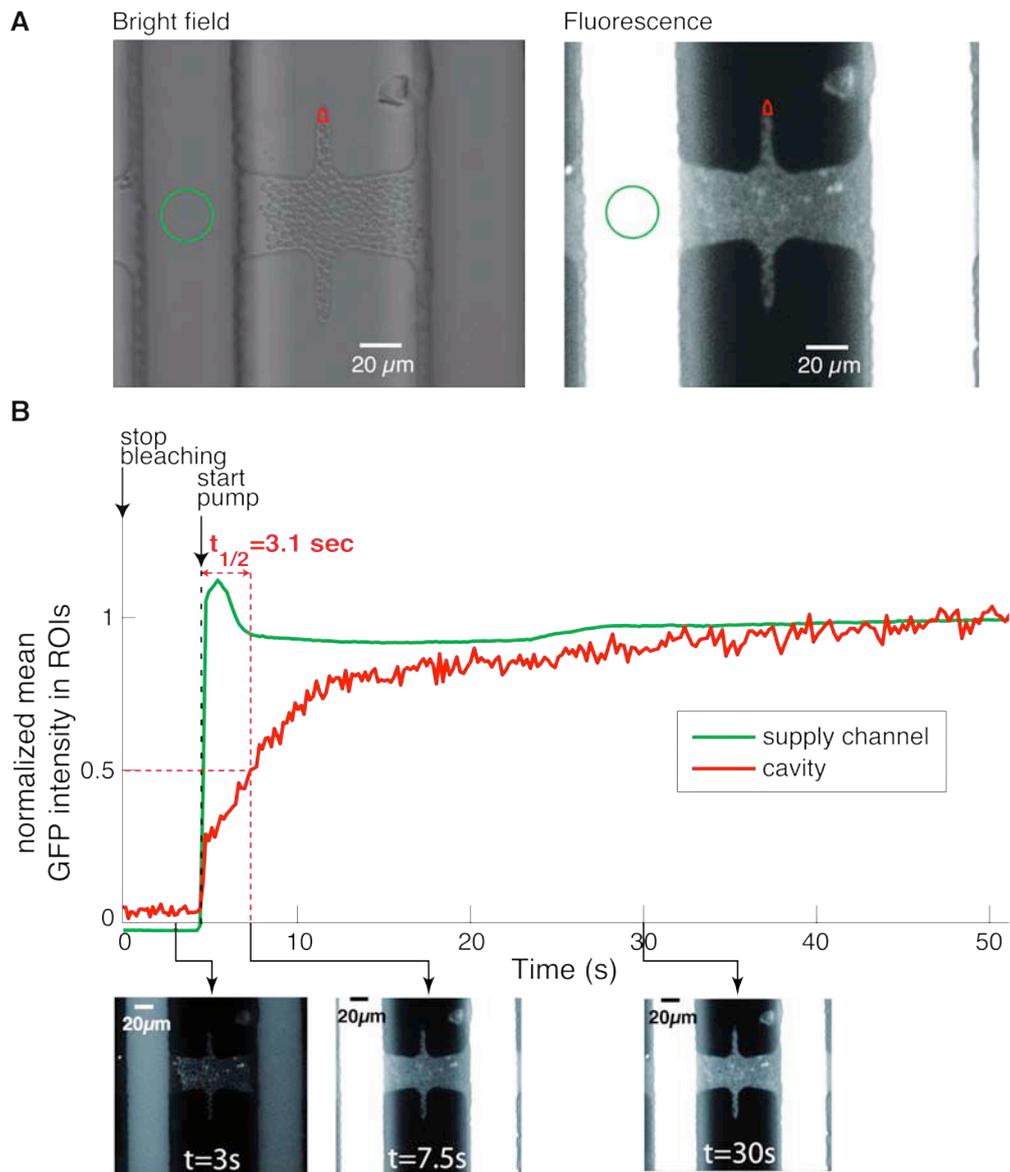


Figure S2. Measurement of the medium diffusive properties in the CLiC device; Related to Figure 1

(A) Bright field and fluorescence images of a trapping area loaded with cells. The colored outlines indicate the regions of interest (ROI) in the supply channel (green) and cavity (red) monitored during the FRAP experiment. (B) Trace shows the mean normalized fluorescence intensities in the ROIs as a function of time. Fluorescence images were taken at the indicated time points.

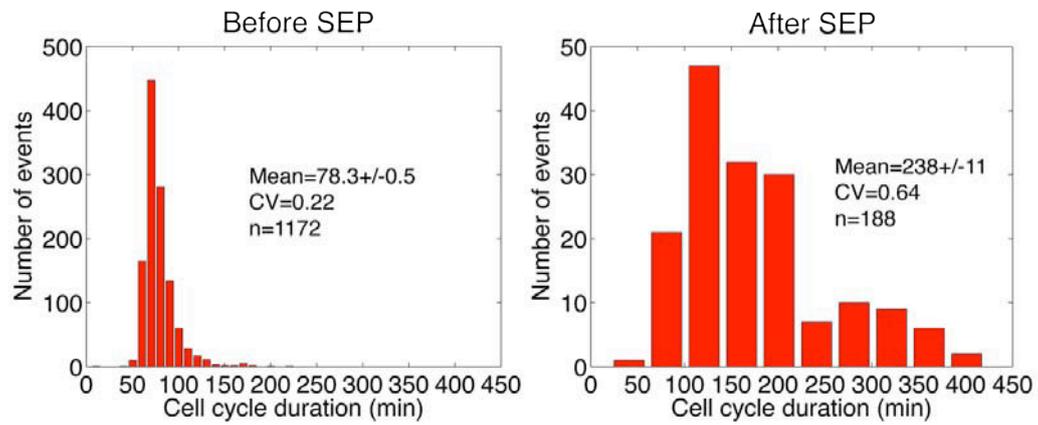


Figure S3. Distribution of cell cycle duration; Related to Figure 2

Mean \pm SE of the cell cycle duration before (left) and after (right) the SEP. The coefficient of variation (CV) and the number of measured cell cycles (n) are indicated.

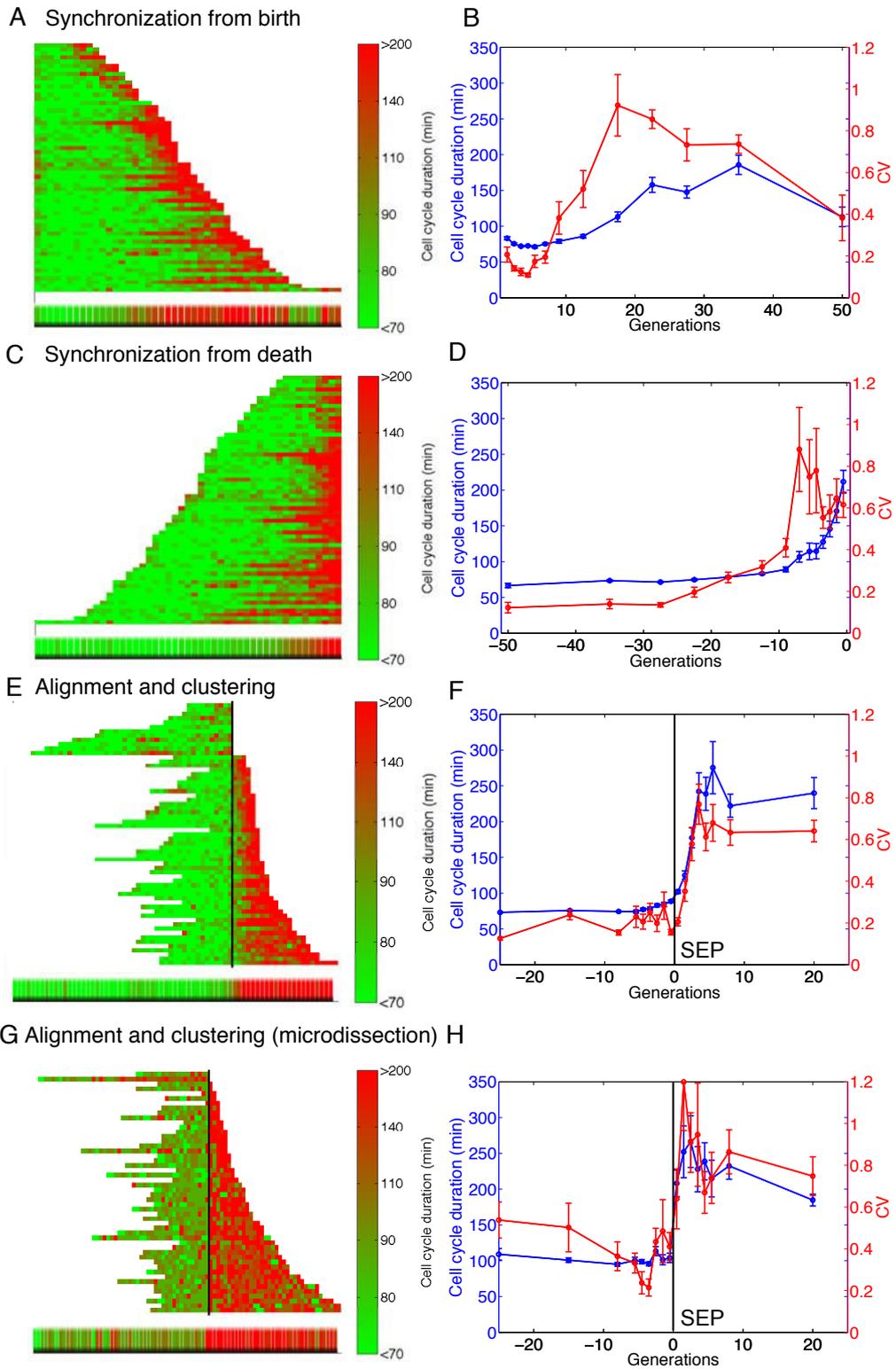


Figure S4. Comparison of methods for synchronization of single-cell trajectories; Related to Figure 2

(A) Graphical display of cell trajectories after alignment from cell birth. Each horizontal line corresponds to a single mother cell, and each segment along the line indicates one cell cycle. The color-coding shows the duration of the cell cycle. The bottom row displays the average trajectory when all the single-cell data for each segment are pooled (i.e., the vertical line). (B) Mean cell cycle duration and coefficient of variation (CV) when the trajectories are synchronized with birth; (C) Same as (A), except the cell trajectories are aligned from death, as reported earlier (Xie et al., 2012). (D) Same as (B), but with synchronization with death; (E) Cell cycle trajectories aligned with respect to the cell cycle crisis (SEP; vertical black bar), as proposed in this study. (F) Same as (B), but with synchronization with respect to the SEP; (G) and (H) Same as (E) and (F), but using microdissection instead of microfluidics data.

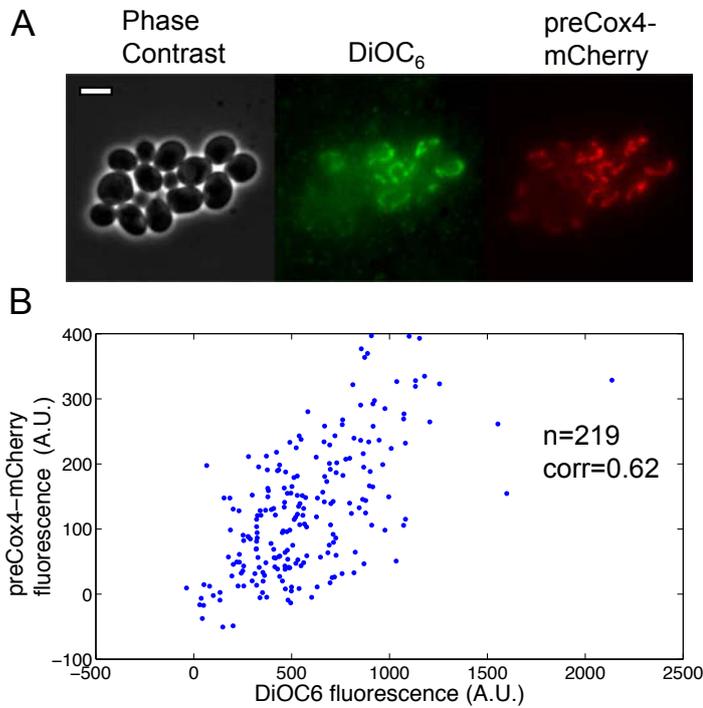


Figure S5. Correlation between preCox4-mCherry and DiOC6 fluorescence; Related to Figure 3

(A) Sample picture showing phase contrast (left), DiOC6 (middle) and preCox4-mCherry fluorescence in a population of exponentially growing cells. Cells carrying a preCox4-mCherry marker were grown in synthetic medium then were transferred to a glass coverslip with a 2% agar pad containing 200nM DiOC6 and allowed to grow for 2-3 generation before snapshots were taken (7 z-stacks were shot with 0.6 micron-spacing; Quantification was made after maximum projection). Scale bar = 4 microns; (B) Correlation between mean fluorescence levels of DiOC6 and preCox4-mCherry. Each dot corresponds to a single cell (n=219). Coefficient of correlation was found to be 0.62.

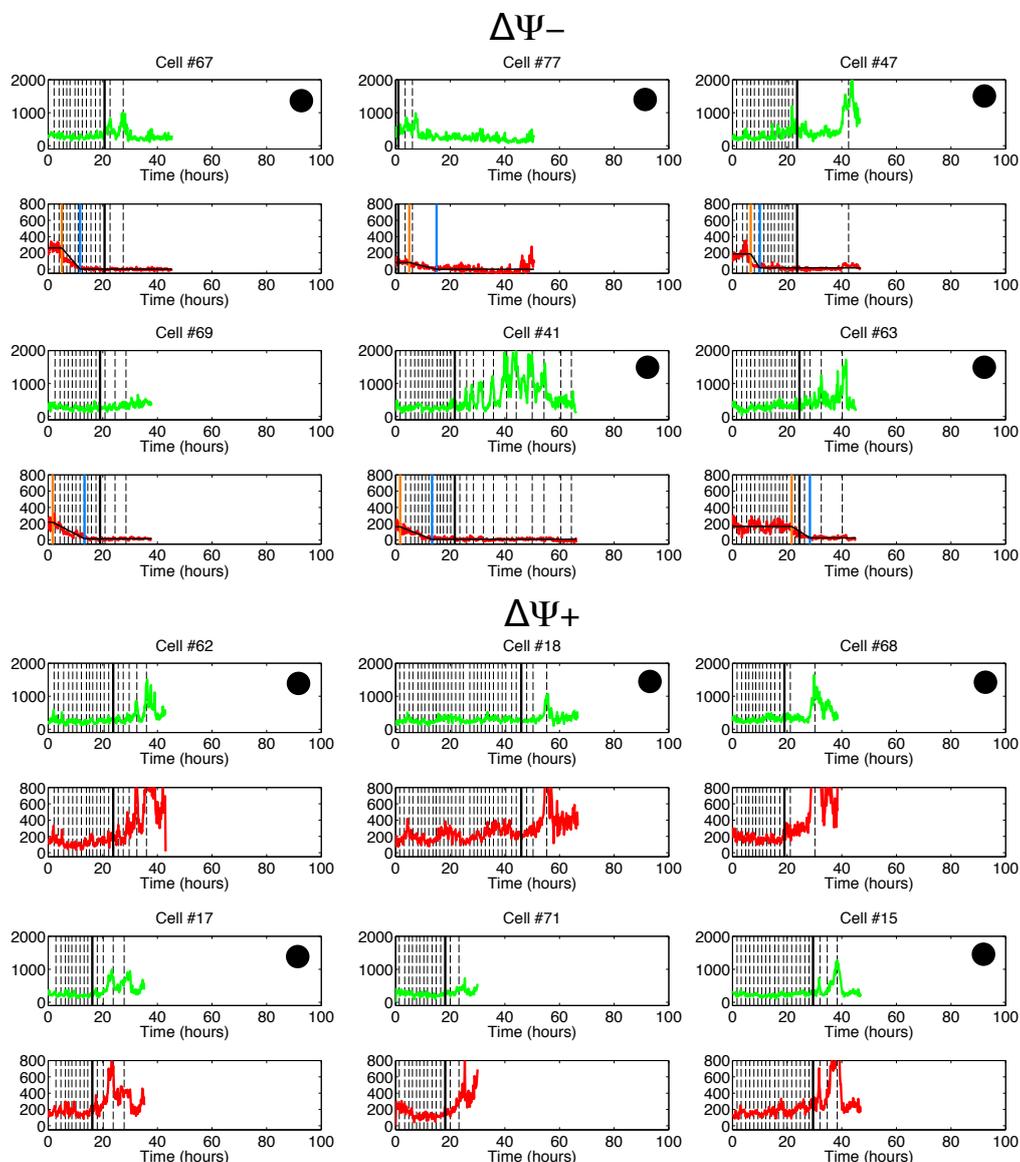


Figure S6. Tom7-GFP and preCox4-mCherry fluorescence over the lifespan of $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ cells; Related to Figure 3

Representative temporal traces of Tom70-GFP (upper panel) and preCox4-mCherry (lower panel) fluorescence (arbitrary unit) in sample cells that did ($\Delta\Psi^-$) or did not ($\Delta\Psi^+$) undergo a loss of $\Delta\Psi$ over their lifespan. Vertical dashed lines indicate budding events, and solid vertical lines indicate the SEP and cell death. Vertical orange and blue lines indicate the onset and end of preCox4-mCherry fluorescence decay, respectively. The black dots indicate traces in which the oscillatory behavior of the Tom70-GFP fluorescence was noticeable (as described in Figure 6).

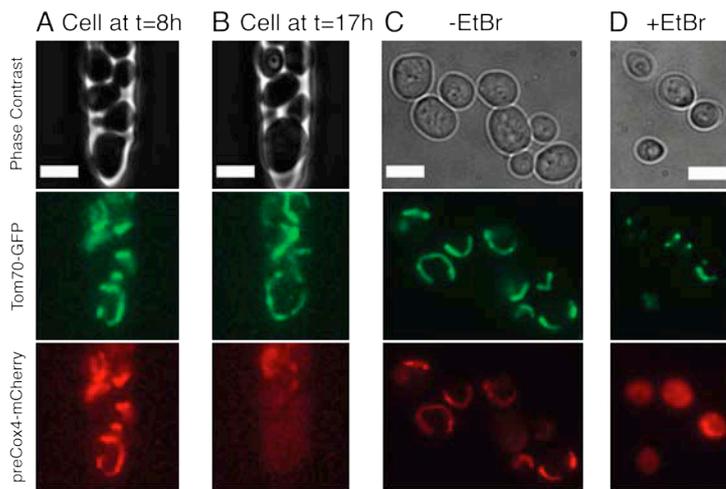


Figure S7. Comparison of loss of preCox4-mCherry mitochondrial fluorescence in the CLiC device and in standard liquid cultures; Related to Figure 3

(A) Mother cell in the CLiC device with clear mitochondrial localization of the preCox4-mCherry marker. (B) The same cell after the preCox4-mCherry marker has become cytoplasmic. (C) Cells grown in a test tube, with images taken in log phase. (D) Cells exposed to ethidium bromide in liquid culture and analyzed after 15 h, as described (Veatch et al., 2009). Scale bar=4 microns.

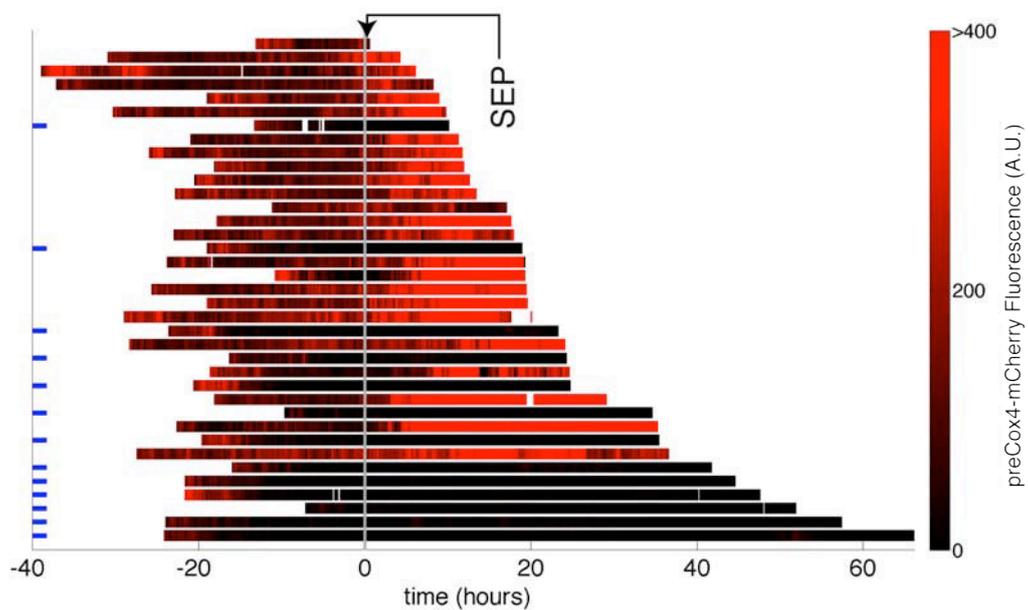


Figure S8. Graphical representation of single-cell trajectories according to the mean mitochondrial preCox4-mCherry signal; Related to Figure 3

Blue marks to the left indicate the rows of $\Delta\Psi^-$ cells. Traces were synchronized using the method described for Figure 2, and trajectories are sorted according to post-SEP survival time. The data reveal that the post-SEP survival time is significantly longer for $\Delta\Psi^-$ cells.

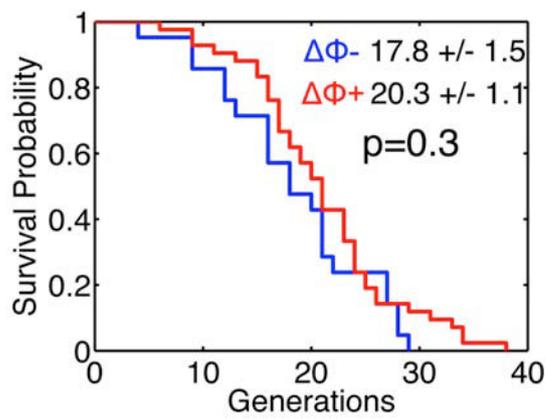


Figure S9. Replicative lifespan of $\Delta\Psi^-$ and $\Delta\Psi^+$ cells; Related to Figure 3

Numbers indicate the median \pm SE of the corresponding distributions. Statistical differences were tested using a standard logrank test (p value is indicated).

Supplemental tables:

Strain name	Background	<i>Grande growth rate</i> (<i>min</i> -1) (+/- standard error)	<i>Petite growth rate</i> (<i>min</i> -1) (+/- standard error)	Fraction of petite cells (+/- standard error)	Probability of petite formation per generation p (+/- standard error)
YSF120-9D	BY4741	0.0071+/-0.0001	0.0055+/-0.0002	33.5%+/-1.1%	0.051+/-0.001
DY6604	W303	0.0072+/-0.0001	0.0057+/-0.0002	5.5%+/-0.4%	0.0079+/-0.0006
YJS8	RM11-1a	0.0067+/-0.0001	0.0049+/-0.0002	4.0%+/-0.4%	0.0069+/-0.0006

Table S1. Frequency of *petite* colony formation measured using plating assays in different strain backgrounds. Related to Figure 4

# Spore	Fraction of <i>petite</i> cells	Probability of <i>petite</i> formation per generation (%)
1	0,00	0,00
2	20,00	3,12
3	24,48	3,80
4 (YSF120-9D)	33,45	5,16
5	34,23	5,27
6	36,87	5,67
7	37,36	5,74
8	38,06	5,85
9	38,69	5,94
10	40,17	6,16
11	40,71	6,24
12	40,80	6,25
13	41,06	6,29
14	41,37	6,34
15	41,46	6,35
16	41,51	6,36
17	43,03	6,58
18	43,70	6,68
19	43,81	6,70
20	44,82	6,85
21	45,08	6,89
22	45,64	6,97
23	46,99	7,17
24	47,12	7,19
25	49,16	7,49
26	50,21	7,64
27	51,70	7,86
28	54,04	8,20
29	54,10	8,21
30	56,12	8,50
31	68,97	10,34

Table S2. Frequency of *petite* colony formation in segregants of the diploid strain UCC3992. Related to Figure 4

Supplemental movie legends:

Movie S1. Successive divisions of a single CLiC cell in the microfluidic device (cell displayed in Figure 1B).

Movie S2. Example of a mother cell that experiences a decline in $\Delta\Psi$ (cell displayed in Figure 3A).

Movie S3. Example of a mother cell with no decline in $\Delta\Psi$ (cell displayed in Figure 3B).

Movie S4. Clonal senescence following loss of $\Delta\Psi$ in mother cell (cell used in Figure 5C).

Movie S5. Rejuvenation of the lineage generated by a mother cell with no loss of $\Delta\Psi$ (cell displayed in Figure 5D).

Movie S6. Oscillations in the mean mitochondrial level of Tom70-GFP in a post-SEP mother (cell displayed in Figure 6B).

Extended Experimental Procedures

Strain List

Name	MAT	Background	Genotype	Origin
BY4741	a	S288C	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
UCC3992	a/α	BY4741	<i>his3Δ1/his3Δ1 ura3Δ0/ura3Δ0 ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG lys2Δ0/lys2Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ::ADE2/met15Δ::LYS2 chrIV(1515634- 1515738)::SpHIS5/chrIV(1515634-1515738)::MET15 TOM70::TOM70-eGFP-CaURA3 / + chrIV(446393-446394)::PTDH3-preCOX4-Cherry-hphMX / +</i>	Dan Gottschling (Veatch et al., 2009)
YSF120-9D	a	BY4741	(UCC3992) <i>TOM70::TOM70-eGFP-CaURA3 chrIV(446393-446394)::PTDH3-preCOX4-Cherry-hphMX</i>	This study
YSF120-1D	a	BY4741	(UCC3992) <i>met15Δ::ADE2 chrIV(446393- 446394)::PTDH3-preCOX4-Cherry-hphMX</i>	This study
DY6604	a	W303	<i>BUD4 ade2 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i>	David Stillman (Voth et al., 2005)
YJS8	a	RM11	<i>leu2Δ0 ura3Δ0</i>	Joseph Schacherer

Design and use of the microfluidic device

Microfabrication and chip fabrication

The microfluidic mold used to make PDMS chips was generated using standard contact lithography techniques. The CAD file used to make the mold is available upon request. The design was converted into a mask on a polymer substrate using high-resolution (50,000 dpi) printing (Selba, Switzerland). To create a negative mold, the pattern was transferred onto a 7.5cm silicon wafer in two steps. A 3.3- μ m-thick layer of SU-8 2005 photoresist (Laurell Technologies Corp, USA) was spun using a spin coater, with UV exposure, baking, and development according to the manufacturer's

recommendations. Then a 40- μm -thick layer was overlaid using SU-8 2025 photoresist to create the supply channels. Alignment of the different layers of SU-8 was performed using a mask aligner (Karl Süss, Germany). To make the chip, the PDMS and curing agent were mixed in a 10:1 ratio, degassed in a vacuum pump for 15 min, and poured into a glass Petri dish containing the wafer. The PDMS was cured according to the manufacturer's recommendations, allowed to cool, and carefully peeled from the mold using a scalpel. Holes were punched in the chip using a biopsy puncher (1.5 mm, Harris Unicore, USA) and then the chip was sealed on a 24 \times 50 mm #1 glass coverslip using plasma cleaner surface activation (Diener Electronic, Germany).

Principle of the CLiC device and cell loading procedure

The central imaging area containing the cell traps is connected to supply channels parallel to the traps and perpendicular loading channels to force flow through the traps (Figure S1). Medium was filtered immediately before the experiment using standard 0.22- μm syringe filters to exclude dust and to air-saturate the medium, and the device was primed with this medium. An aliquot of 2.5 ml of cell suspension (OD_{600} of 0.5) was drawn into a 5 ml syringe, and cells were loaded into the device by applying very gentle pressure to the syringe. This procedure ensured minimal mechanical stress and avoided the preferential selection of abnormally large cells that might become trapped at high pressures. A minimum of five cells was loaded into each trapping area to minimize potential founder cell effects. After loading, the loading channels were rinsed for 1 h at the same flow rate used for subsequent operation of the device (25 $\mu\text{l}/\text{min}$) and then sealed. During the initial growth phase, the cells populated the trapping area will push one cell to the tip of the cavity. Occasionally, we observed either a switch in the budding pattern or a rotation of the mother cell of interest, which caused the mother cell to be pushed out of the cavity by its successive daughters. Therefore, we managed to track the full lifespan of more than 65% of all cells initially present in the cavity, and even cells that left the cavity could be observed for a substantial part of their life. Additionally, this phenomenon enabled us to monitor the long-term fate of the successive daughters of an aging mother that had left the cavity (see Figure 5). By definition, the cell of interest (CLiC cell) is born in the trapping area, which is an advantage over the previously published techniques (Lee et al., 2012; Xie et al., 2012). By starting the experiment with a population of virgin daughters, we eliminated an unwanted source of cell-to-cell variability. Cavities with different widths (6 and 10 μm) were designed to investigate the effects of

cavity geometry on cell survival. No differences were observed (not shown).

Media diffusion through the CLiC device

Cells in the CLiC device had normal cell cycle durations and replicative lifespans, indicating that the device did not affect cell physiology. To confirm that media diffusion through the CLiC device was sufficient to ensure optimal growth conditions at the tip of the cavity, we performed fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments to measure the kinetics of diffusion of small molecules in the CLiC chambers (Figure S4).

For this, a solution containing fluorescein (Sigma) was flushed through the CLiC microfluidic device, the flow was stopped, and the whole field of view that contained the cells in the trapping area was bleached by continuous fluorescence illumination for ~2–3 min. Fluorescence image acquisition was started as soon as bleaching was stopped ($t = 0$ s). The fluorescence level was quantified as a function of time for two specific regions of interest (ROIs, in the supply channel and at the tip of the cavity) as indicated on Figures S4A and S4B. The flow of fluorescein-containing medium was resumed at $t = 4.4$ s at 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. As expected, fluorescence in the supply channels recovered instantaneously to a stationary level (see normalized fluorescence on Figure S4B; green line). In contrast, the $t_{1/2}$ for fluorescence recovery at the tip of the cavity was 3.1s (Figure S4B, red line). We interpreted this as the time required to replace the volume of medium within the trapping area.

To test whether this rate of medium exchange was sufficient to supply nutrients to all cells in the trapping area, we compared it to the glucose intake rate for a population of cells growing in a test tube under standard conditions. This calculation was made as follows: 1 ml of a saturated culture of yeast cells in SCD contains $\sim 5 \times 10^7$ cells. If the starting medium contains 20 g/l of glucose, a 1 ml culture initially contains 2×10^{-2} g of glucose. Therefore, the amount of glucose required to make a new cell is typically 4×10^{-10} g. Since the population of 150 cells in the chamber doubles every 90 min, the mass of glucose consumed in the chamber per unit of time is $(4 \times 10^{-10} \times [150/90]) = 6.6 \times 10^{-10}$ g/min. Thus, at a glucose concentration of 20 g/L, the minimal glucose flow rate required through one chamber is $\sim 3 \times 10^{-5}$ l/min. In comparison, since the volume of the CLiC chamber ($90 \text{ m} \times 30 \text{ m} \times 3.3 \text{ m} = 9 \times 10^{-6}$ l) is replenished within 3.1 s, the actual flow rate within the

chamber is $\sim 2 \times 10^{-4}$ l/min, which is an order of magnitude higher than the minimal flow rate to ensure adequate cell feeding.

Replicative lifespan assays (microdissection)

RLS assays were conducted as previously described (Kennedy et al., 1994). Frozen cells were thawed on YPD agar plates at 30°C. Two days before the experiment, the cells were transferred to SC agar plates and colonies were allowed to grow overnight at 30°C. The following morning, the plate was transferred to room temperature, and a few cells were streaked onto fresh SC agar plates. The plates were sealed with Parafilm and kept at room temperature overnight. The next morning, single cells were isolated from the growing colony using a dissection microscope (Singer MSM 400). Each cell was then allowed to divide, and the mother cell was removed to follow the lifespan of virgin daughter cells. Cells were monitored for division every 90 min and the daughter cells counted. Between time points, the plates were re-sealed and maintained at 30°C during the day or placed at 4°C overnight.

Time-lapse imaging protocol

Cells were imaged using an inverted microscope (Zeiss Axio Observer Z1, Germany), with constant focus maintained using commercial focus stabilization hardware (Definite focus). Wide-field epifluorescence illumination was achieved using an LED light source (precisExcite, CoolLed), and light was collected using a 100× N.A. 1.4 objective and an EM-CCD Luca-R camera (Andor). The camera was triggered on the precisExcite module using a TTL signal. We used an automated stage that allowed us to follow up to 60 positions in parallel over the course of the experiment. We built a custom sample holder with thermoelectric modules and an objective heater to maintain the chip at 30°C during the experiments (Charvin et al., 2008).

To minimize fluorescence illumination, images were acquired every 10 min. Custom Matlab software was used to drive the hardware used in the acquisition process (pump, microscope, heater, camera, illuminator). Cells were monitored for up to 800 frames, which represents 130 h of continuous image acquisition.

Mathematical model for *petite* formation in aging cells

We designed a simple numerical model to simulate the emergence of the *petite* phenotype within a population of aging cells. The model assumes a population of 1000 cells is followed over successive divisions, starting with newborn cells. The probability density, q , of dying between division n and $n + 1$ increases quadratically with replicative age: $q = q_0 \times n^2$, where q_0 is a constant (Gillespie et al., 2004). At each generation, some cells are randomly selected within the population according to this probability and set as dead. The process is repeated until all cells are dead. Fitting the numerical distribution of survival according to this model agrees well with the experimental data when $q_0 = 3 \times 10^{-4}$ (Figure 4B).

Next, we formed two models for the emergence of the *petite* phenotype. In the first, we hypothesized that cells randomly become *petite* according to Poisson statistics, with p being the probability of such an event per generation. The value of p not only sets the timescale for the emergence of the *petite* phenotype in the population, but also the repartition of the population of *petite* and *grande* cells at the end of the lifespan. For instance, with $p = 0.03$, only ~40% of the total cell population become *petite* during their lifespan (of those, ~50% become *petite* after six generations) (Figure 4C). This is because a large fraction of cells die before the *petite* phenotype emerges.

In the second model, we hypothesized that the emergence of the *petite* phenotype is age-dependent. Therefore, we assumed that the probability density, $p(n)$, of becoming *petite* between division n and $n + 1$ is proportional to q : $p(n) = \alpha q(n)$, where α is a constant.

Calculation of the probability of *petite* formation from plating assays

Scoring the fraction of *petite* colonies on a plate is a straightforward assay that provides information about the spontaneous loss of mitochondrial DNA (mtDNA) and/or function (Dimitrov et al., 2009). We performed a calculation to estimate the probability of mtDNA loss per generation from experimental measurements of the fraction of *petite* colonies in a specific strain and the specific growth rate of cells of the *petite* and *grande* phenotypes.

To this end, we assumed that the growth of *grande* and *petite* cells (G and P, respectively) is exponential with growth rates of μ_G and μ_P , respectively. Assuming a first order process, k is the kinetic constant associated with the switch to *petite*. The dynamics of emergence of the two populations of cells is therefore as follows:

$$\begin{aligned}\frac{dG}{dt} &= \mu_G G - kG \\ \frac{dP}{dt} &= \mu_P P + kG\end{aligned}$$

Integration of this system of linear ordinary differential equations yields:

$$\begin{aligned}G(t) &= G_0 e^{(\mu_G - k)t} \\ P(t) &= \frac{kG_0}{\mu_G - k - \mu_P} e^{(\mu_G - k)t} + \left(P_0 - \frac{kG_0}{\mu_G - k - \mu_P} \right) e^{\mu_P t}\end{aligned}$$

where G_0 and P_0 are the initial concentration of *grande* and *petite* cells, respectively. Assuming that the cells are allowed to grow over a period much longer than their doubling time (i.e., if $t \gg \ln(2)/(\mu_G - k)$, $\ln(2)/\mu_P$), and hypothesizing that $\mu_G - k > \mu_P$ (which is necessary to prevent overgrowth of the *grande* cell population by *petite* cells), the fraction of *petite* cells R is given by:

$$R = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{P(t)}{P(t) + G(t)} = \frac{k}{\mu_G - \mu_P}$$

Therefore, the probability p of switching to the *petite* phenotype per generation is given by:

$$p = \int_0^{\ln(2)/\mu_G} k e^{-kt} dt = 1 - 2^{-\frac{k}{\mu_G}} = 1 - 2^{-R \left(1 - \frac{\mu_P}{\mu_G} \right)}$$

Table S1 summarizes the results obtained for p based on the measurements of R, μ_G , and μ_P for different strains.

Analysis software: phyloCell

phyloCell is a software program written in Matlab by Andrei Ungureanu and Gilles Charvin that allows quantitative analysis of time-lapse sequences of images of the successive divisions of yeast cells. The software (graphical user interface [GUI] and source code) and scripts used to process single-cell data and to display the results (e.g., single-cell trajectories) are available upon request.

The following sections provide a brief description of the image processing steps used to analyze the data in this study.

Time-lapse image processing

The GUI allows the display of sequences of images acquired at multiple times with several imaging methods (e.g., phase-contrast and several fluorescence channels). Viewing modes are fully customizable. The GUI also displays contours of cells and/or organelles detected using any segmentation engine (see below). Thus, the user can visually control the segmentation and tracking routines and can efficiently perform manual corrections if necessary.

Cell segmentation algorithm

Cell contours were segmented using a modification of the watershed algorithm. In brief, the raw image was thresholded to provide a binary image. This was used to compute the 'distance transform', which generates the topographic basins required for the watershed algorithm. Cell contours could easily be delineated from the cell masks returned by the watershed program.

Cell tracking

Cell contours obtained at frame n were mapped to contours of frame $n + 1$ by optimizing the global costs associated with the change in contour position and cell size using the Hungarian method for assignment. As a result, a specific number was assigned to each cell that appeared during the time-lapse sequence.

Determination of cell parentage

To facilitate the mother/bud assignment, we developed a routine that determines the parentage of newborn cells. This routine exploited the information provided by budneck markers, which significantly improved the success of parentage determination.

Mitochondrial contour segmentation

Mitochondrial contours were based on Tom70-GFP fluorescence after thresholding the signal. Although a single focal plane image does not allow the complex 3D architecture of the mitochondrial network to be reconstructed, it is sufficient to score the mean level of fluorescence of mitochondrial markers.

Supplemental References

Voth, W.P., Olsen, A.E., Sbia, M., Freedman, K.H., and Stillman, D.J. (2005). ACE2, CBK1, and BUD4 in budding and cell separation. *Eukaryot. Cell* 4, 1018–1028.

Annexe B

Xu et al., en préparation

Title: Replicative senescence in telomerase-negative cells is often preceded by reversible DNA damage events

Authors: Zhou Xu^{1,2}, Emilie Fallet^{1,2}, Camille Paoletti³, Steffen Fehrmann³, Gilles Charvin³, and Maria Teresa Teixeira^{1,2*}

Affiliations:

¹ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8226, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France;

² Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR8226, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France;

³ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries 67400 Illkirch Cedex, France.

* Correspondence to: teresa.teixeira@ibpc.fr.

Summary:

In eukaryotes, telomeres cap the ends of chromosomes to maintain genome stability. Failure to maintain telomeres leads to their progressive erosion at each cell division. This process is extremely heterogeneous but eventually triggers replicative senescence, a pathway shown to protect from unlimited cell proliferation. However, the mechanisms underlying its variability and its dynamics are not characterized at the single-cell level. Here, we used a microfluidics-based live-cell imaging assay to investigate replicative senescence in individual *Saccharomyces cerevisiae* cell lineages following telomerase inactivation. We show that most lineages experience an abrupt and irreversible transition from a replicative to an arrested state, contrasting with the idea of a progressive transition. However, many lineages also undergo frequent

reversible DNA damage checkpoint cell-cycle arrests, beginning soon after telomerase inactivation and recover from them by homologous recombination. These data reveal a cryptic route to senescence and suggest that the intrinsic heterogeneity of senescence onset mostly results from stochastic telomere damage that requires telomerase or homologous recombination for repair.

Text:

The reverse transcriptase telomerase counteracts telomere sequence loss during eukaryotic DNA replication. In human somatic cells, which generally lack telomerase, telomere shortening eventually causes replicative senescence and thus serves as a mechanism to limit cell division and prevent uncontrolled proliferation, as, for example, in cancer^{1,2}. Current models suggest that when one or several chromosome ends reach a critical length, they lose the protective cap and expose naked DNA, thereby activating a DNA damage checkpoint pathway that results in cell-cycle arrest^{3,4}. In mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking telomerase, gradual telomere shortening eventually leads to a similar replicative senescent state⁵. Some rare cells may overcome senescence by elongating telomeres, through either reactivation of telomerase or alternative recombination-based mechanisms^{6,7}. In mammals, such variants are precursors of cancer cells. Therefore, elucidating the mechanisms underlying the establishment of senescence may shed light on the relationship between telomere dysfunction and carcinogenesis⁸.

Replicative senescence is an intrinsically heterogeneous process. In *S. cerevisiae*, cell-to-cell variations in cell-cycle duration and generation number are influenced by many factors, including the initial telomere length distribution (more precisely, the initial length of the shortest

telomere⁹), the stochasticity of the telomere-shortening mechanism¹⁰, and other less characterized events^{11,12}. Given this heterogeneity, methods that allow for the precise analysis of individual cell lineages over multiple generations would be preferable to the current use of population-averaged bulk assays and would undoubtedly provide a more accurate understanding of the molecular events controlling senescence.

A microfluidics-based approach for tracking senescent cell lineages. To this end, we have developed a single-cell imaging methodology based on a microfluidic device that allows individual cell lineages to be tracked with high spatial and temporal resolution (Fig. 1a, b)¹³. In this system, yeast cells are loaded into a small chamber where they divide and invade microcavities (Fig. 1c, d and Supplementary Video S1). The cell reaching the tip of the microcavity is then monitored by phase contrast and fluorescence microscopy. In *S. cerevisiae*, cell division is asymmetric and mother cells can produce only a limited number of daughters, a phenomenon, termed *mother cell aging*, that does not depend on telomerase inactivation^{13,14}. We do not focus on this phenomenon but instead study telomerase-dependent replicative senescence. To avoid the interference of these two phenomena, we thus aimed to examine telomerase inactivation in the potentially immortal cell lineage, i.e. the daughter cell lineage (Fig. 1a). In practice, thanks to the use of the randomly budding haploid W303 strain, we never analyze old mother cells and essentially track newborn daughter cells or young mother cells at the tip of the microcavity (Extended Data Fig. 1a). When this cell divides, we still keep track of the cell at the tip, which can be either the same cell (now a mother) or the new daughter cell (Fig. 1c), more frequently the daughter (Extended Data Fig. 1a). The lineage thus defined is tracked through multiple generations until senescence and death. With this setup, we were able to monitor single-

cell lineages for >70 divisions under physiological conditions (Fig. 1e, Extended Data Fig. 1b and Supplementary Video S1).

To ensure complete temporal control over telomerase inactivation, we used a doxycycline-repressible *TLC1* gene encoding telomerase template RNA (TetO2-*TLC1*). In the absence of doxycycline, lineages with active telomerase showed no sign of mortality (Fig. 1d, e). However, after telomerase repression by the addition of doxycycline, TetO2-*TLC1* cells underwent only 37 ± 12 (median \pm SD) divisions before cell lysis, revealing considerable heterogeneity (coefficient of variation [CV] = 0.32; Fig. 2a-c and Supplementary Videos S2 and S3). To determine whether the initial telomere length distribution contributed to this variability, we analyzed clonal populations (i.e., each starting with a unique telomere length distribution in the initial cell) of a telomerase-inactive strain (see below). This strain displayed significantly smaller variations in division number before lysis (CV = 0.11 and 0.15 for two clones; Extended Data Fig. 2a, b), suggesting that the heterogeneous response to telomerase loss observed with TetO2-*TLC1* cells was predominantly due to interclonal variations in the initial telomere length distribution.

The relatively limited proliferative capacity of individual TetO2-*TLC1* cell lineages observed here stands in contrast to findings with bulk populations of telomerase-negative cells, which undergo 40–80 population doublings depending on the strain background and initial mean telomere length^{5,10,15}. We hypothesized that this apparent discrepancy may be due to competition and selection bias intrinsic to bulk cultures (i.e., fitter cells outgrow slow-growing or arrested cells), which is absent in our single-cell analyses. To test this, we performed an *in silico* competitive growth assay based on the probability of death and cell-cycle duration extracted

from all single-lineage data (Extended Data Fig. 3a, b). This simulation quantitatively recapitulated the growth curves observed experimentally in batch cultures (Extended Data Fig. 3c)¹⁰, confirming that the larger number of doublings before senescence observed in population growth assays was a consequence of the selection of fit cells.

Distinct phenotypes of telomerase-negative lineages. The single-cell imaging technology allowed us to precisely determine the cell-cycle durations of individual lineages, information that cannot be obtained from population studies. We found that nearly all TetO2-*TLC1* lineages displayed one or more particularly long cell cycle leading up to cell death (indicated in red in Fig. 2c), at which point up to 70% of the cells were arrested in G2/M (Fig. 2b lower row, t = 85 h), consistent with previous observations of senescence arrest¹². Strikingly, a significant fraction of lineages showed a distinct phenotype, with successive long cell cycles occurring well before entry into terminal senescence (Fig. 2c). To quantify this, we defined a significantly long cell cycle as a duration greater than the mean + 3 SD of wild-type cell cycles and then clustered the lineages according to the absence (type A, 60% of the lineages) or presence (type B, 40% of the lineages) of at least two long cell cycles before the terminal successive arrests (Fig. 3a). To evaluate the robustness of this threshold-based clustering, we performed two other independent clusterings based on Gaussian distribution mixture models and found nearly identical type A and type B groups (Extended Data Fig. 4). To assess the relative competitive potential of type A and B lineages, we simulated their growth in a mixed bulk culture and found that type A lineages would rapidly outgrow type B lineages because of their shorter division times (Fig. 3b), whereas type B cells had greater median chronological longevity than type A cells (135 [99;+∞] and 74 [66;77] h [95% confidence interval], respectively, Kaplan–Meier estimator with censoring;

[Extended Data Fig. 5](#)). These data suggest that type B lineages represent a cryptic phenotype of telomerase inactivation that can only be revealed in single-cell analyses that eliminate competition bias; conversely, type A lineages correspond to the commonly studied “senescent cells.”

Type A lineages displayed up to 40 cell cycles of 1.5 ± 0.3 h (mean \pm SD) before undergoing a sharp transition to one or more long cycles (12 ± 11 h; [Fig. 3c](#) and [Extended Data Fig. 6](#)). This abrupt change suggests that a single event and/or a threshold effect triggers an irreversible senescence arrest, which contrasts with the view that senescence involves a gradual decrease in growth rate, as proposed before based on studies that averaged individual lineages^{5,12}. Moreover, the transition to slower division and arrest is irreversible in type A lineages, indicating that any attempt at telomere repair fails to reverse the senescence signaling state. In contrast, the cell-cycle arrest observed with type B lineages is reversible, as indicated by the resumption of normal cycling following one or more precocious long cycles ([Fig. 3a](#)). To determine whether type B cells are simply type A cells that have escaped arrest, we compared the time of onset of the first significantly long cell cycle in both cell types and found a significantly earlier onset for type B cells than for type A cells (17.5 ± 13.4 and 30 ± 9.8 divisions, respectively; median \pm SD, $p = 0.03$, unpaired t -test). Moreover, the first long cell cycle was clearly a harbinger of death for type A cells but not type B cells, as indicated by the number of divisions between the first and last long cell cycles (3.5 ± 1.4 and 23 ± 7.8 divisions for type A and B cells, respectively). In addition, fewer of the cell-cycle arrests experienced by type B cells occurred in G2/M (48% compared with 70%). Collectively, these data suggest that the type A and B phenotypes represent fundamentally distinct mechanistic responses to telomerase inactivation.

Control of replicative senescence by initial telomere length distribution. We next asked whether the early cell-cycle arrests observed in type B cells were caused by the loss of a noncanonical telomerase function¹⁶. For this, we analyzed the *est2-D670A* mutant strain, in which only the reverse transcriptase motif of Est2, the catalytic subunit of telomerase, is mutated¹⁷. In the two *est2-D670A* clones analyzed, type A and type B lineages were detected in ratios similar to those of the TetO2-*TLC1* strain (Extended Data Fig. 2a, b). These data confirm that the long cell cycles observed in type B cells are due to a telomerase elongation defect and not to the loss of a noncanonical function. Furthermore, because the experiments involving the *est2-D670A* mutant started with a single cell, we found that commitment to the type B pathway is not determined in the initial cell but rather occurs stochastically. As a consequence, we predict that a TetO2-*TLC1* strain with longer initial telomeres in an otherwise isogenic background (Extended Data Fig. 7a lane 3 and 4) would produce relatively more type B lineages. This is because there would be an extended time window for type B long cycles to occur, as type A senescence would be delayed. Indeed, we observed a much increased proportion of type B lineages when the initial telomeres were longer (Extended Data Fig. 7a) compared to the strain with normal telomere length (~82% compared to 40%; Extended Data Fig. 8), supporting the idea that type B cells arise stochastically in a telomere length-independent manner.

Symmetry and memory of the cell-cycle arrests. To investigate how an arrested cycle arises, we compared the cell-cycle durations of pairs of sister cells born from a single mitotic event. Type A cells produced correlated cell-cycle durations in the pairs (Fig. 4a, correlation coefficient [95% confidence interval] $r = 0.97 [0.96;0.98]$), even in the long cycles ($r = 0.98 [0.93;0.99]$).

These findings are consistent with senescence being signaled by a critically short telomere transmitted through mitosis to both cells^{9,18}. In contrast, a much weaker correlation was observed for cell-cycle durations in type B pairs (Fig. 4b, $r = 0.73$ [0.64;0.80]), particularly for the long cycles ($r = 0.61$ [0.40;0.77]), further arguing that these cycles occur stochastically. We next asked whether the first precocious long cell cycle dictates the duration of subsequent ones by keeping a “memory” of the initial duration. For this, we calculated the autocorrelation function of cell-cycle duration in the lineages¹⁹. Whereas wild-type cells had an autocorrelation function showing no memory of cell-cycle duration over divisions (timescale $\tau = 0.6$ [0.5;0.7] divisions), telomerase-negative lineages had a specific cellular memory ($\tau = 1.5$ [1.2;2.0] divisions; Fig. 4c). Furthermore, only type B lineages contributed to this autocorrelation ($\tau = 3.2$ [2.5;4.5] divisions), whereas type A lineages were more comparable to wild-type cells and exhibited no significant memory ($\tau = 1.0$ [0.9;1.3] division). Thus, type B cells are fundamentally imbued with a long-term memory of previous cell-cycle durations. Taken together, our results suggest the transmission through mitosis of a marker that is generated stochastically in the absence of telomerase, signals arrest and increases the probability of additional long cell cycles in type B but not type A lineages.

Contribution of signaling and repair. To determine whether this marker is related to DNA damage, we deleted the major DNA damage checkpoint kinase, Mec1/ATR, which is also involved in signaling short telomere in the absence of telomerase in budding yeast¹⁸. Indeed, *MEC1* deletion abolished senescence-specific “memory”, as indicated by the autocorrelation function of doxycycline-treated TetO2-*TLC1 mec1Δ sml1Δ* cells ($\tau = 0.9$ [0.6;1.4] divisions, Fig. 4c). Moreover, loss of Mec1 reduced the frequency of both precocious and terminal consecutive

long cell cycles (Fig. 5a and Extended Data Fig. 9a, b), indicating that senescence signaling in type B cells does indeed stem from DNA damage, presumably at telomeres.

That type B cells are able to resume normal cell cycles after periodic slower divisions suggests that following DNA damage checkpoint activation, the cells may undergo adaptation²⁰ or initiate repair mechanisms, such as homologous recombination. To evaluate the contribution of homologous recombination to senescent cell viability^{6,18,21,22}, we used mutants deficient in the recombinase *RAD51*. Loss of Rad51 dramatically increased the rate of spontaneous cell death, even in cells expressing active telomerase (compare Extended Data Fig. 9c with Fig. 1e). The survival curve of *rad51Δ* cells with active telomerase decays exponentially, indicating that they are subject to stochastic death events with a constant mortality rate of ~5% per division (Fig. 5b and Extended Data Fig. 9d). This is probably due to genomic instability²³ and, notably, results in only slightly decreased overall growth in bulk liquid culture (Extended Data Fig. 3c). Although Rad51 associates with the shortest telomeres^{18,22,24}, population assays have been unable to detect its contribution to cell viability early after telomerase inactivation, distinct from its genome-wide effect in the presence of telomerase. Here, our single-lineage analyses show that upon telomerase inactivation, most *rad51Δ* lineages died within 10 divisions, at which time telomeres had shortened by only ~30 bp (Fig. 5c, d, Extended Data Fig. 7b and Supplementary Video S4). Inactivation of telomerase in the *rad51Δ* mutant increased mortality to ~11% per division compared to ~5% in telomerase-positive *rad51Δ* lineages (Fig. 5b, d and Extended Data Fig. 9d), whereas telomerase inactivation in Rad51-positive cells had no effect on mortality during the first 10 divisions (Fig. 5c). Thus, this increase in mortality reveals a synergy between Rad51 and telomerase in the protection of telomeres. Furthermore, the exponential decay in the survival curve indicates that, in cells lacking both Rad51 and telomerase, death is a stochastic and age-

independent process. We propose that ongoing repair of stochastic telomeric damage by homologous recombination is essential for cell survival well before the onset of replicative senescence (Fig. 5b).

Discussion. Our single-lineage analysis has uncovered distinct routes to senescence that could not have been identified using conventional population studies, which average individual events. Canonical transition into senescence is not progressive but abrupt (type A). In addition, we identified cryptic lineages (type B) that undergo stochastic reversible DNA damage events. We propose that these events are spontaneous telomere breaks related to replication stress, generating a tremendously heterogeneous cell population. Type A lineages avoid such telomere insults but undergo gradual telomere shortening and eventually enter the canonical route to senescence. In contrast, cryptic lineages display an erratic pattern of cell-cycle arrest and, as they persist at a low frequency in populations, may lead to the emergence of genomic variants and survivors.

References and Notes

- 1 Hayflick, L. The Limited In Vitro Lifetime Of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636 (1965).
- 2 Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460 (1990).
- 3 d'Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198 (2003).
- 4 Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729-740 (2007).
- 5 Lundblad, V. & Szostak, J. W. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**, 633-643 (1989).
- 6 Lundblad, V. & Blackburn, E. H. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1-senescence. *Cell* **73**, 347-360 (1993).
- 7 Shay, J. W., Reddel, R. R. & Wright, W. E. Cancer. Cancer and telomeres--an ALternative to telomerase. *Science* **336**, 1388-1390 (2012).

- 8 Gunes, C. & Rudolph, K. L. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* **152**, 390-393 (2013).
- 9 Xu, Z., Duc, K. D., Holcman, D. & Teixeira, M. T. The length of the shortest telomere as the major determinant of the onset of replicative senescence. *Genetics* **194**, 847-857 (2013).
- 10 Soudet, J., Jolivet, P. & Teixeira, Maria T. Elucidation of the DNA End-Replication Problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* **53**, 954-964 (2014).
- 11 Smith, J. R. & Whitney, R. G. Intraclonal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging. *Science* **207**, 82-84 (1980).
- 12 Enomoto, S., Glowczewski, L. & Berman, J. MEC3, MEC1, and DDC2 Are Essential Components of a Telomere Checkpoint Pathway Required for Cell Cycle Arrest during Senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 2626-2638 (2002).
- 13 Fehrmann, S. *et al.* Aging yeast cells undergo a sharp entry into senescence unrelated to the loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Rep* **5**, 1589-1599 (2013).
- 14 Mortimer, R. K. & Johnston, J. R. Life span of individual yeast cells. *Nature* **183**, 1751-1752 (1959).
- 15 Lebel, C. *et al.* Telomere maintenance and survival in *saccharomyces cerevisiae* in the absence of telomerase and RAD52. *Genetics* **182**, 671-684 (2009).
- 16 Low, K. C. & Tergaonkar, V. Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends Biochem Sci* (2013).
- 17 Lingner, J. *et al.* Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**, 561-567 (1997).
- 18 Abdallah, P. *et al.* A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nat Cell Biol* **11**, 988-993 (2009).
- 19 Box, G. E. P., Jenkins, G. M. & Reinsel, G. C. *Time Series Analysis: Forecasting and Control.* (Wiley, 2008).
- 20 Toczyski, D. P., Galgoczy, D. J. & Hartwell, L. H. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* **90**, 1097-1106 (1997).
- 21 Teixeira, M. T. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model to Study Replicative Senescence Triggered by Telomere Shortening. *Front Oncol* **3**, 101 (2013).
- 22 Fallet, E. *et al.* Length-dependent processing of telomeres in the absence of telomerase. *Nucleic acids research* (2014).
- 23 Kolodner, R. D., Putnam, C. D. & Myung, K. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**, 552-557 (2002).
- 24 Khadaroo, B. *et al.* The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex. *Nat Cell Biol* **11**, 980-987 (2009).
- 25 Romano, G. H. *et al.* Environmental stresses disrupt telomere length homeostasis. *PLoS Genet* **9**, e1003721 (2013).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgments:

We thank David Shore and Victoria Lundblad for yeast strains and plasmids; Miguel Godinho Ferreira and Claus Azzalin for discussions; and Stéphane Lemaire, Gaël Yvert, Tom Cech, Jim Haber and Joachim Lingner for critical reading of the manuscript. We also thank all members of the UMR8226 for technical support. This work was supported by the European Research Council (ERC-2010-StG 260906—D-END), the Mairie de Paris (Programme Emergences), and the “Initiative d’Excellence” program from the French State (Grant “DYNAMO,” ANR-11-LABX-0011-01).

Author Contributions:

Z.X. and M.T.T. designed the project. M.T.T. oversaw the project. Z.X. performed all of the experiments, analyzed the microfluidics-based time-lapse data, and performed the computational and statistical analyses. Z.X., E.F., G.C., and M.T.T. interpreted and discussed the results. C.P., S.F., and G.C. developed the microfluidics-based approach and the analysis software. E.F. performed the initial experiments. Z.X., G.C., and M.T.T. wrote the paper with input from all of the authors.

Author Information:

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.T.T. (teresa.teixeira@ibpc.fr).

Figure Legends

Figure 1. A microfluidics-based approach to the analysis of single lineages. **a**, Scheme of a lineage (in red). Starting from a single cell, we follow a potentially immortal lineage by tracking after each division the daughter cell (most often) or the young mother cell. **b**, Image of the microfluidics chip showing the design of the chambers and microcavities. Scale bars: 5 mm (black) and 5 μm (white). **c**, Scheme showing the dynamic behavior of the cell at the tip. Most often it buds toward the tip and its daughter cell is tracked. M: mother, d: daughter. The Cdc10-mCherry marker at the bud neck is depicted in red, allowing the determination of cell-cycle progression and the mother-daughter relationship. **d**, Overlays of sequential phase contrast and fluorescence images of a telomerase-positive cell lineage. **e**, Display of independent wild-type lineages (yT538, $n = 12$). Each horizontal line represents a single lineage, and each segment is a cell cycle. Cell-cycle duration is indicated by the color bar.

Figure 2. Telomerase inactivation–induced replicative senescence in single lineages. **a**, Experimental scheme as in Fig. 1a for monitoring senescence in the TetO2-*TLCl* strain. **b**, Same as Fig. 1d with a TetO2-*TLCl* cell lineage. The lineage becomes telomerase negative once doxycycline is added. **c**, Display of TetO2-*TLCl* lineages (yT528, $n = 40$). Cells were grown in microfluidic chambers for several generations before the addition of doxycycline (30 $\mu\text{g/ml}$ in the flowing medium) to inactivate telomerase at generation 0. An ellipsis (...) indicates that the cell was alive at the end of the experiment and X indicates cell death. A gray segment indicates that the cell cycle was not complete at the end of the experiment.

Figure 3. Identification of two routes to senescence. **a**, The senescent lineages shown in Fig. 2c were clustered according to the absence (type A) or presence (type B) of at least two long cell

cycles (exceeding the mean + 3SD duration of wild-type cell cycles) before terminal arrest. **b**, Simulation of the competition between type A and type B lineages in a virtual bulk culture. The simulation over ~35 population doublings was not performed because of a lack of experimental data over this point in type A lineages. **c**, Type A lineages synchronized *in silico* at the point of transition to replicative senescence, indicated by 0 generation on the x-axis.

Figure 4. Transmission of the cell-cycle arrest signal at the mitosis and lineage scale. a–b, Scatter plots of cell-cycle duration in pairs of sister cells (mother cell and new daughter) in TetO2-*TLCl* (a) type A lineages ($n = 141$ pairs) and (b) type B lineages ($n = 131$ pairs). Correlation coefficients [95% CI] between the pairs are (a) $r = 0.97$ [0.96;0.98] and (b) $r = 0.73$ [0.64;0.80]. **c**, Autocorrelation functions of cell-cycle duration in the indicated strains treated with or without doxycycline. Telomerase-deficient lineages, particularly type B cells, show stronger autocorrelation than wild-type, telomerase-positive cells. Mec1 deficiency suppresses memory.

Figure 5. DNA damage checkpoint and homologous recombination shape senescence dynamics. a, Analysis of telomerase-negative *mec1Δ sml1Δ* lineages (yT598, $n = 22$). **b**, Mortality rate per division of *RAD51* mutants with or without telomerase activity (\pm doxycycline). See [Extended Data Fig. 9d](#) for calculation of mortality rates. Error bars represent 95% CI. **c**, Survival curves of the indicated telomerase-inactive strains. **d**, Analysis of telomerase-inactivated *rad51Δ* lineages (yT641, $n = 22$).

Extended Data Figure Legends

Extended Data Figure 1. Physiological cell division in the microcavities, without interference from the mother cell aging/replicative life span phenomenon. **a**, Frequency of the residency time of a mother cell in a microcavity. The exponential distribution indicates that the budding pattern in the haploid W303 background is random. **b**, Boxplot of cell-cycle durations of the non-senescent strains used in this study. The central mark in each box is the median, the edges are the 25th and 75th percentiles, and the whiskers are the 95th percentiles. WT-dox, wild-type cells (yT538, $n = 792$); WT+dox, wild-type cells with added doxycycline (30 $\mu\text{g/ml}$; $n = 174$); TetO2-*TLCl*, cells expressing the TetO2-*TLCl* construct (yT528, $n = 239$); TetO2-*TLCl sml1* Δ , TetO2-*TLCl* cells with a deletion of *SML1* (yT599, $n = 208$); TetO2-*TLCl mec1* Δ *sml1* Δ , TetO2-*TLCl* cells with deletions of both *mec1* Δ and *sml1* Δ (yT598, $n = 107$). The mean cell-cycle durations are indicated at the top in minutes.

Extended Data Figure 2. Single-lineage analysis of the telomerase-mutant *est2-D670A* strain (yT639). **a–b**, The *est2-D670A* strain, complemented with a plasmid expressing a functional *EST2* gene (pVL291), was treated with ethanol to elongate the telomeres ([Extended Data Fig. 7a, lane 6](#)). Two clones were then selected in YPD medium for spontaneous loss of the complementing plasmid. After clonal expansion (~ 40 and ~ 30 population doublings for [a] and [b], respectively), the cells were injected into the microfluidic device, and single lineages were tracked ($n = 44$ and $n = 42$ for [a] and [b], respectively). The proportion of type A and B cells in both clones is indicated.

Extended Data Figure 3. Simulation of competitive growth using competition-free lineage

data. a, Simulation of the competitive growth of all lineages shown in [Fig. 2c](#). The black and gray lines indicate telomerase-positive and telomerase-negative virtual cultures, respectively. **b,** 2D histogram of cell-cycle durations as a function of generation number. Over generations, the fraction of rapidly dividing cells (blue) decreases as that of slowly dividing cells (red) increases. **c,** Growth of experimental liquid cultures of the TetO2-*TLC1* strain (yT528) with (gray line) or without (black line) doxycycline (30 $\mu\text{g/ml}$) and of the TetO2-*TLC1 rad51 Δ strain (yT641) with (pink line) or without (purple line) doxycycline (30 $\mu\text{g/ml}$).*

Extended Data Figure 4. Two independent cluster analyses of the telomerase-negative lineages shown in Fig. 2c. a, Clustering using the number of long cell cycle per lineage as a criterion. (Plot on the left) These numbers are plotted for all lineages and their clustering into type A and B based on a Gaussian mixture distribution model is shown. (Right) Display of the corresponding type A and B lineages. **b,** Same as (a) but using the number of transitions per lineage as a criterion. Note that these two cluster analyses result in nearly identical type A and B groups compared to [Fig. 3a](#).

Extended Data Figure 5. Chronological representation of type A and type B lineages, using time as the x-axis. The duration of each cell cycle (each segment) is indicated by both the color and the length of the segment. The median chronological longevity with 95% confidence interval of type A and B lineages can be calculated using the Kaplan-Meier estimator with censoring: 74 [66;77] and 135 [99;+ ∞] h, respectively.

Extended Data Figure 6. Quantification of cell-cycle duration of *in silico* synchronized type A lineages. The mean (blue) and CV (red) of cell-cycle durations for all synchronized lineages are shown. The CV increases in parallel with the cell-cycle duration at the transition to senescence (0 on the x-axis), indicating the loss of cell-cycle regulation.

Extended Data Figure 7. *Xho* I terminal restriction fragment Southern blot analyses of Y' telomeres. a, Telomere lengths of TetO2-*TLC1* (yT528) and *est2-D670A* (yT639) strains. Lanes 1 and 5: untreated strains. Lanes 2, 3, and 6: strains treated with ethanol for ~80, 160, and 80 population doublings, respectively. Lane 4: sample from the experiment shown in [Extended Data Fig. 8](#). Lanes 7 and 8: samples from experiments shown in [Extended Data Fig. 2a, b](#). The mean lengths of the telomeric repeats are indicated below the lanes. Results for multiple ($n \geq 3$) independent experiments are shown as the mean \pm SD. **b,** Telomere lengths of telomerase-negative (doxycycline-treated) TetO2-*TLC1 RAD51* and TetO2-*TLC1 rad51* Δ cells (yT528 and yT641, respectively) at 0 and 10 population doublings (PD).

Extended Data Figure 8. Single-lineage analysis of the TetO2-*TLC1* strain (yT528) with elongated telomeres. The TetO2-*TLC1* strain was treated with ethanol to elongate the telomeres and allowed to recover in YPD for ~40 generations ([Extended Data Fig. 7a, lanes 2 and 3](#)). The cells were then injected into the microfluidic device for the analysis of individual lineages ($n = 22$, doxycycline addition at generation 0). In parallel, a sample of these cells was grown for 12 h and was subjected to terminal restriction fragment Southern blotting to measure the average telomere length at the start of the single-lineage analysis ([Extended Data Fig. 7a, lane 4](#)).

Number of divisions undergone after doxycycline addition: 69 ± 19 (median \pm SD). The lineages were clustered into type A and type B lineages and their respective proportion is indicated.

Extended Data Figure 9. Loss of Mec1 reduces consecutive cell-cycle arrests. **a**, The cell-cycle duration and generation number of telomerase-negative *sml1* Δ lineages (yT599, $n = 23$) are similar to those of telomerase-negative *SML1* lineages. **b**, Distribution of consecutive long cell cycles (defined as greater than the mean +3SD of wild-type cell-cycle duration) in the indicated strains. Counts are normalized to the number of generations evaluated and are shown as counts per 1,000 generations. Consecutive long cycles are virtually absent from Mec1-deficient lineages. **c**, Telomerase-positive *rad51* Δ lineages (yT641, $n = 24$) have a high spontaneous rate of cell death. **d**, Fit of the survival curves for TetO2-*TLC1 rad51* Δ mutants (yT641) cultured with or without doxycycline. The curves were fitted with a decreasing exponential function $y = ae^{-bx}$, with a and b fitting parameters. b defines the mortality rate per division. When telomerase is active (black line), $a = 1.3$, $b = 0.054$, and $R^2 = 0.99$. When telomerase is inactivated (purple line), $a = 1.0$, $b = 0.11$, and $R^2 = 0.97$.

Extended Data Table 1. List of strains used.

Methods:

List of strains

All of the strains used in this study had a W303 background and were corrected for the *rad5-535* mutation, which is naturally present in the W303 strain. [See Extended Data Table 1.](#)

Growth assay

To measure the proliferation potential of telomere-positive and telomere-negative cells, we diluted a log-phase culture of TetO2-*TLC1 RAD51* (yT528) or TetO2-*TLC1 rad51Δ* (yT641) strains to $OD_{600nm} = 2.3 \times 10^{-5}$ in YPD medium and grew it at 30°C for 24 h until OD_{600nm} reached 1.5. The cultures were then divided and grown with or without 30 µg/ml doxycycline to repress *TLC1*, and the same procedure was applied except that the dilution ratio was adjusted each day in the telomerase-inactivated cultures to reach $0.6 < OD_{600nm} < 2$, after 24 h, to account for the loss of proliferation potential.

Terminal restriction fragment Southern blot

Genomic DNA was extracted from exponential growth cultures using a standard phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1) purification procedure and ethanol precipitation. Then 1 µg of genomic DNA was digested with *Xho* I and the products were ethanol precipitated, resuspended in loading buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 0.04% xylene cyanol FF), and resolved on a 1.2% agarose gel for 14 h at 60 V. The gel was then soaked in a denaturation bath (0.4 M NaOH, 1 M NaCl) for 30 min and transferred by capillarity action to a charged nylon membrane (Hybond XL, GE Healthcare). The telomere-specific oligonucleotide probe (5'-GGGTGTGGGTGTGTGTGGTGGG-3') was ³²P-labeled at the 5' terminus with ATP (γ -³²P) and T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs). The membrane was hybridized using the Rapid-hyb buffer protocol (GE Healthcare). In brief, the membrane was prehybridized at 42°C in Rapid-hyb buffer for 1 h, then the radioactive probe (20 pmol) was added, and the incubation was continued for 1 h. The membrane was washed consecutively with 2× SSC, 0.5% SDS (42°C for 10 min); 2× SSC, 0.1% SDS (42°C for 20 min); and 0.1× SSC, 0.1% SDS (20°C for 30 min). The membrane was then imaged with a Typhoon FLA 9500 scanner (GE Healthcare).

Telomere elongation

In some experiments (Extended Data Fig. 2 and 8), the telomeres were elongated before cells were placed in the device, either to replenish telomere repeats subsequently lost during preculture and sample preparation (Extended Data Fig. 2) or to study the effect of longer telomeres (Extended Data Fig. 8). To reversibly elongate telomeres, we grew cells in rich medium (YPD) containing 5% ethanol for ~80 or ~160 generations, serially diluting every 3 days²⁵. The cells were then transferred to YPD agar plates without ethanol, and at this point the mean telomere length was measured by Southern blot, as described above and shown in Extended Data Fig. 7a. To ensure recovery of cells from ethanol treatment, we grew cells for at least 40 divisions in medium without ethanol before placing them in the microfluidic device.

Microfluidic device

The microfluidic mold was fabricated using standard soft lithography techniques as described¹³. To make the chip, we mixed polydimethylsiloxane (PDMS; Sylgard 184) and curing agent in a 10:1 ratio, degassed it with a vacuum pump for 30 min, and poured it into the mold. The PDMS was cured by baking at 70°C for 5 h and then carefully removed from the mold. A biopsy puncher (1.5 mm, Harris Unicore) was used to create holes for medium flow. The surfaces of PDMS and a glass coverslip (24 × 50 mm) were surface activated using a plasma cleaner (Diener Electronic, Germany) to covalently bond the two elements.

For injection of cells into the device, synthetic complete medium containing 2% glucose (SD) was filtered using a 0.22- μ m polyethersulfone filter (Corning) and loaded into the device using a peristaltic pump (IPCN, Ismatec). Cells from a log-phase culture (0.5 OD₆₀₀) were gently injected into the device using a 1-ml syringe. A constant medium flow (28 μ l/min) was maintained throughout the experiment. Control experiments validating the flow rate, medium

diffusion into the cavities, nutrient uptake, and physiological cell growth were performed as previously described¹³. For experiments with strains expressing the TetO2-*TLCl* construct, cells were allowed to divide and invade the cavities for 12–24 h before the medium was switched to SD containing 30 µg/ml doxycycline.

For experiments with the *est2-D670A* mutant strain (yT639), a clone without the plasmid complementing *EST2* deficiency (pVL291 encoding *EST2* with a *URA3* marker) was selected. Because selection required 20–30 cell divisions, the telomeres were elongated by ethanol treatment before the experiments (see above, Extended Data Fig. 2 and 7a). For cloning, cells were plated on YPD for 24 h and individual colonies were picked and grown on selecting medium (SD-uracil) to verify plasmid loss (the frequency of spontaneous loss was 5–8%). After an additional 24 h, a colony without plasmid was precultured overnight in SD medium and injected into the microfluidic device as described above. An aliquot of the same culture was analyzed by Southern blot to measure telomere length (Extended Data Fig. 7a).

Time-lapse microscopy

Cells in the microfluidic device were imaged using a fully motorized Axio Observer Z1 inverted microscope (Zeiss), with constant focus maintained with focus stabilization hardware (Definite focus, Zeiss). To minimize phototoxicity, we used LED light sources for both phase contrast and fluorescence images (Colibri 2, Zeiss). The temperature was maintained at 30°C with a controlled heating unit and an incubation chamber that held the entire microscope base, including the stage and the objectives.

Images were acquired every 10 min using AxioVision 4 (Zeiss). All aspects of image acquisition were fully automated and controlled, including temperature, focus, stage position, and time-lapse

imaging. Images were acquired for >120 h in standard experiments and up to 240 h in the experiment using telomere-elongated cells.

Image analysis and single-cell lineage tracking

Custom software written in Matlab, phyloCell 2.1, was used to segment and track cells and to assign mother-daughter links¹³. Time-lapse images were exported as high-resolution TIF files and analyzed directly with the graphical user interface of phyloCell. So that we could follow cell-cycle progression and determine the mother-daughter relationship, cells expressed a fluorescent Cdc10-mCherry fusion protein that localized to the septin ring from bud formation to cytokinesis. For details about the routines and algorithms implemented in phyloCell, see¹³. In contrast to¹³, the cell at the tip of the cavity would frequently be replaced by its daughter cell, which was intended in our approach. To efficiently track such lineages, in which we frequently switched focus from a given cell to its daughter cell, the time-lapse images were analyzed backward starting from the last image.

Computational and statistical analyses

All computational and statistical analyses were performed in Matlab. The functions developed in this study are available on request.

For cluster analysis of telomerase-negative lineages, two independent criteria were used: the number of long cell cycles (greater than the mean + 3 SD of wild-type cell cycle) per lineage and the number of transitions per lineage. A transition was defined as two consecutive cycles with a difference in their duration greater than a threshold S . The number of transitions per lineage was calculated for $S = 60, 70, 80, 90$ and 100 min and averaged over these values for each lineage. For each of these two criteria, we created a mixture model with univariate Gaussian distributions and performed a cluster analysis of this mixture, which defined clusters as data points belonging

most probably to the same distribution. The *gmdistribution* class and related methods of the statistical toolbox of Matlab were used for this analysis.

Autocorrelation function

The normalized autocorrelation function $A(k)$ for lag k was calculated according to ¹⁹:

$$A(k) = \left\langle \frac{E_n[(Y_n - \bar{Y})(Y_{n+k} - \bar{Y})]}{E_n[(Y_n - \bar{Y})^2]} \right\rangle,$$

where Y_n denotes the cell-cycle duration at division n normalized over the wild-type mean for mother or newborn daughter cell accordingly; \bar{Y} denotes the mean of Y over all time points and cells; $E_n[\]$ denotes the expected value operator over divisions; and $\langle \ \rangle$ denotes the average over all cells. The function was fitted with an exponential function $t \rightarrow e^{-t/\tau}$ to obtain an estimate of the autocorrelation timescale τ of the process.

Simulation of competitive culture

To compare cell growth in the microfluidic chip and conventional bulk culture, we numerically simulated a virtual culture in which the analyzed lineages would be in competition. From the single-lineage data (Fig. 2c), we extracted the probability of death and the cell-cycle duration landscape (Extended Data Fig. 3b) and used them as input to simulate competitive growth (i.e., the total number of cells in the virtual culture as a function of time).

The simulation of a telomerase-negative culture was performed with a custom automaton developed in Matlab. All parameters were directly derived from the independent lineage data (Extended Data Fig. 3b), and no arbitrary external parameters were used.

First, for each generation n after telomerase loss, a probability of death $P(n) = \frac{dS(n)}{dn}$, where S is the survival curve, was derived from the fraction of total lineages that ended at this generation. Given the discrete nature of the data, P was fitted with a Gaussian function. Second, we

calculated a matrix $M(n, p)$ containing the probability that a cell at generation n will divide in p units of time (i.e., 10 min, which is the temporal resolution of the time-lapse experiments). The number of rows in M is restricted to the maximum number of generations undergone by a lineage. M is calculated by normalizing the experimental frequency 2D histogram of cells dividing at generation n in p units of time, shown in [Extended Data Fig. 3b](#).

The simulation included dilution steps to mimic those required in experimental senescing cultures. The dilution ratio and the number of cells picked to continue the virtual culture had no detectable effect on the result (data not shown).

The automaton starts with 1,000 cells, each of which is randomly assigned a cell-cycle duration chosen from $M(1, [1, max])$; that is, the first row of M . For each time point, we determine whether a cell has completed its cycle and then test whether this cell, which is at generation n , will die, given $P(n)$. If it dies, that cell is removed from the array. If not, it divides into two cells (a new cell is created in the automaton), each of which is assigned a new cell-cycle duration corresponding to the generation $n + 1$, chosen from $M(n + 1, [1, max])$. To smooth the discrete data, we pick p from M and account for the variability of biological processes by adding noise according to the coefficient of variation experimentally observed. This simulation is performed over 60 time points, corresponding to 10 h. The total number of cells is recorded. Then, 1,000 cells are randomly picked from this virtual culture and are run in a second round of simulation (dilution). After 13 rounds, all data are collected and converted into a plot, as shown in [Extended Data Fig. 3a](#).

For estimation of the fraction of type A and type B cells in a bulk culture ([Fig. 3b](#)), two cell-cycle duration matrices M_A and M_B were derived from the two lineages. The automaton was slightly modified slightly to accommodate the simultaneous use of both matrices. The automaton

starts with 1,000 cells, as for the standard simulation, but a tag is added to each cell to indicate its type. The initial ratio was 60%:40% of type A:type B cells (Fig. 3b). When a cell divides, its type is inherited and the next cell-cycle duration is extracted from either M_A or M_B . The number of type A or type B cells is recorded at each round of simulation. The simulation is not performed over more than ~35 population doublings because of the lack of experimental data over this point in type A matrix M_A .

Figure 1: A microfluidics-based approach to the analysis of single lineages

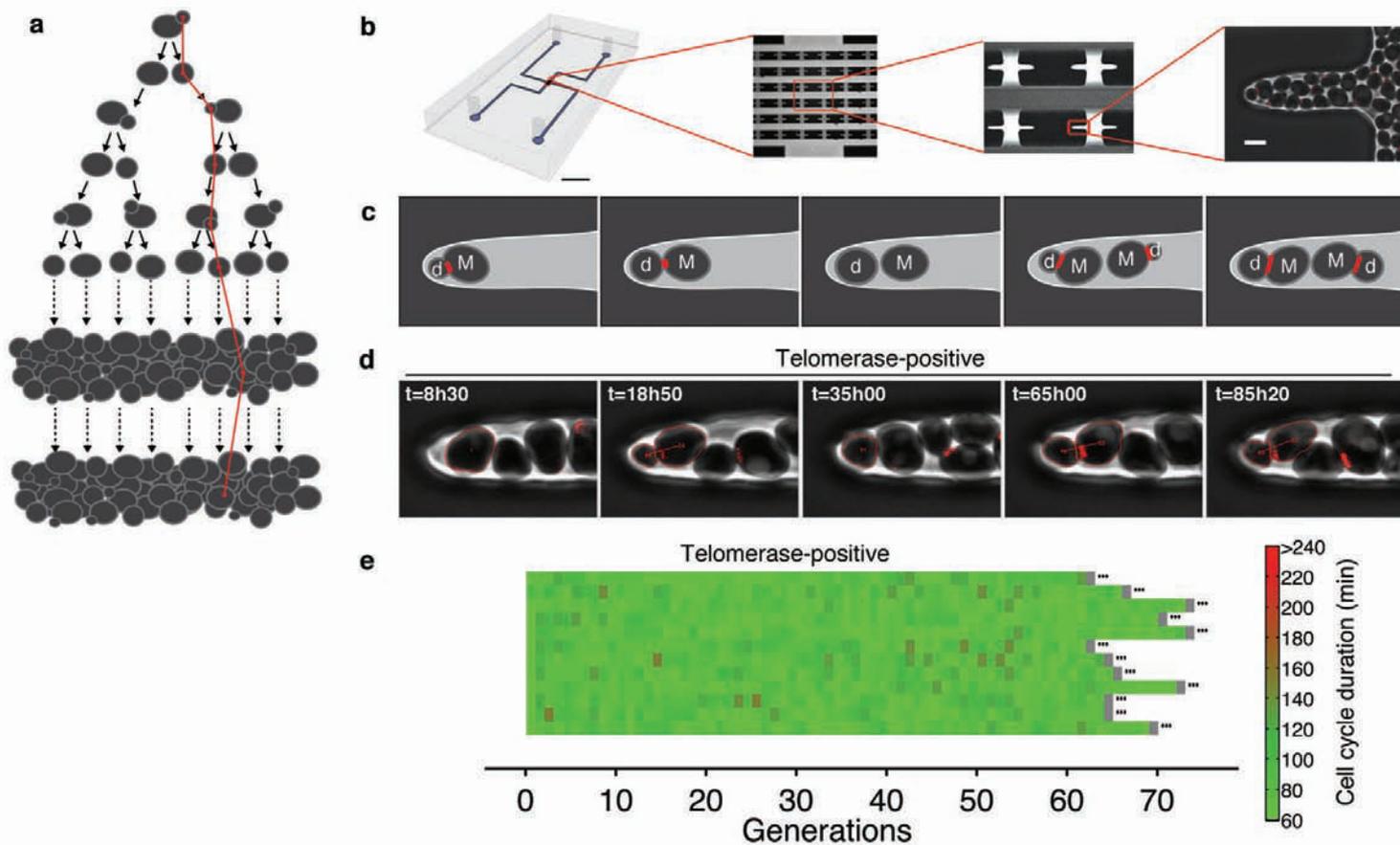


Figure 2: Telomerase inactivation induced replicative senescence in single lineages

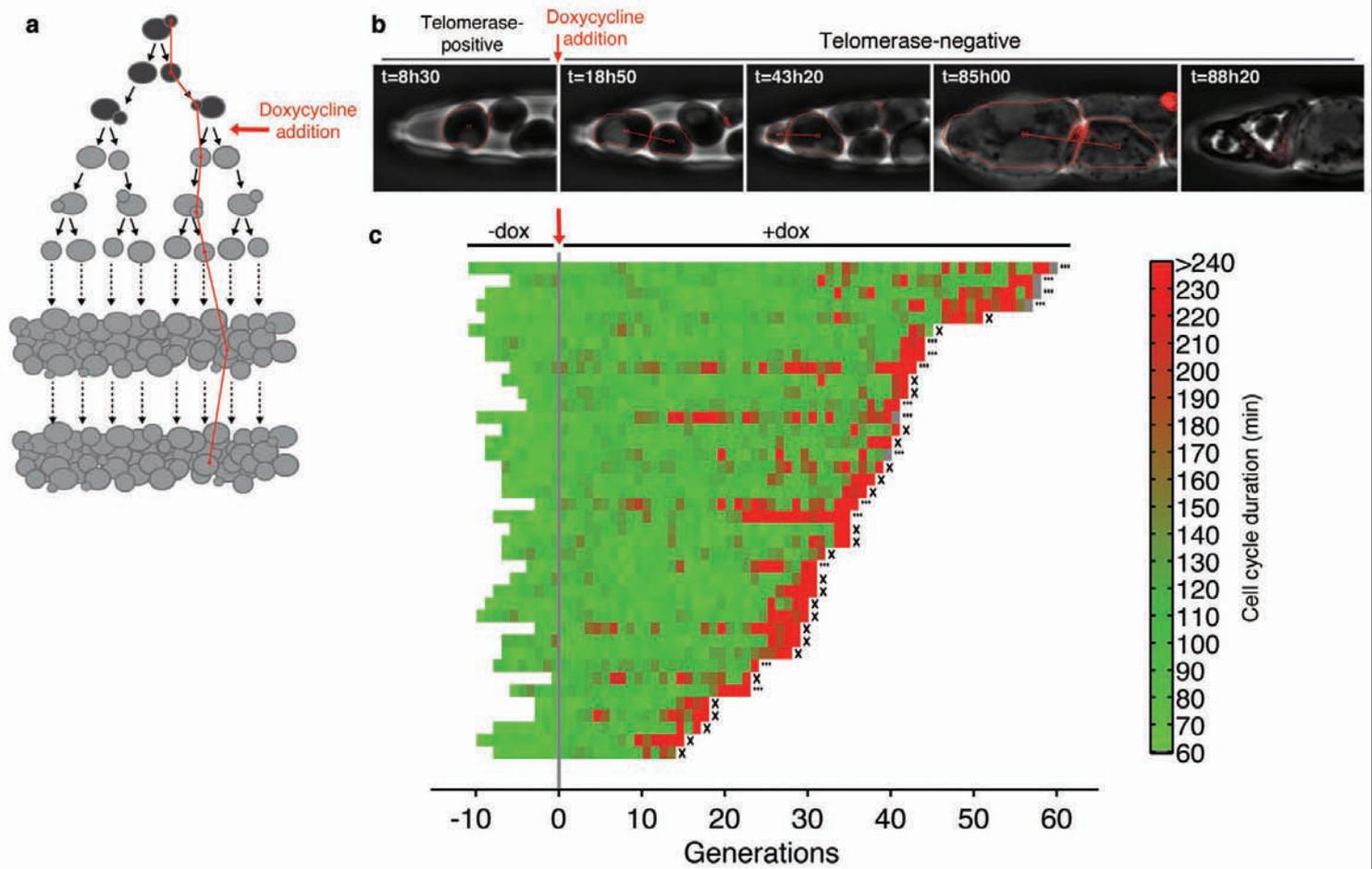


Figure 3: Identification of two routes to senescence

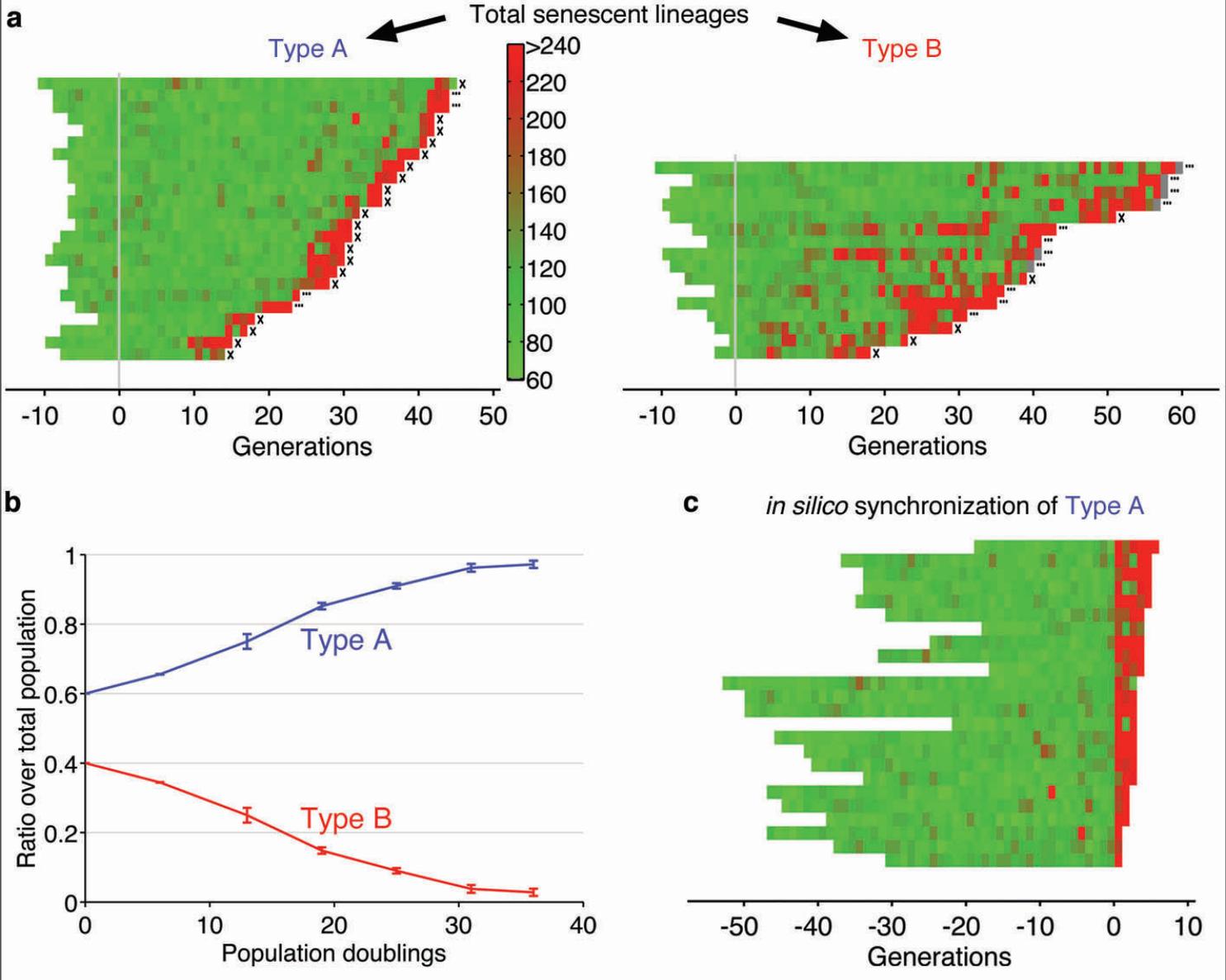


Figure 4: Transmission of the cell-cycle arrest signal at the mitosis and lineage scale

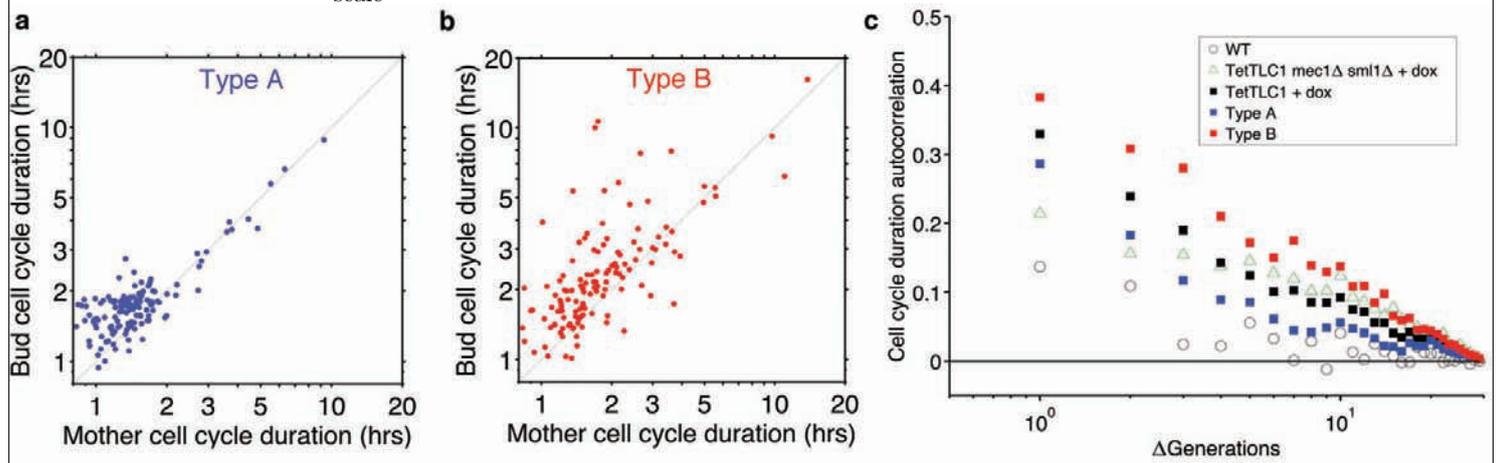
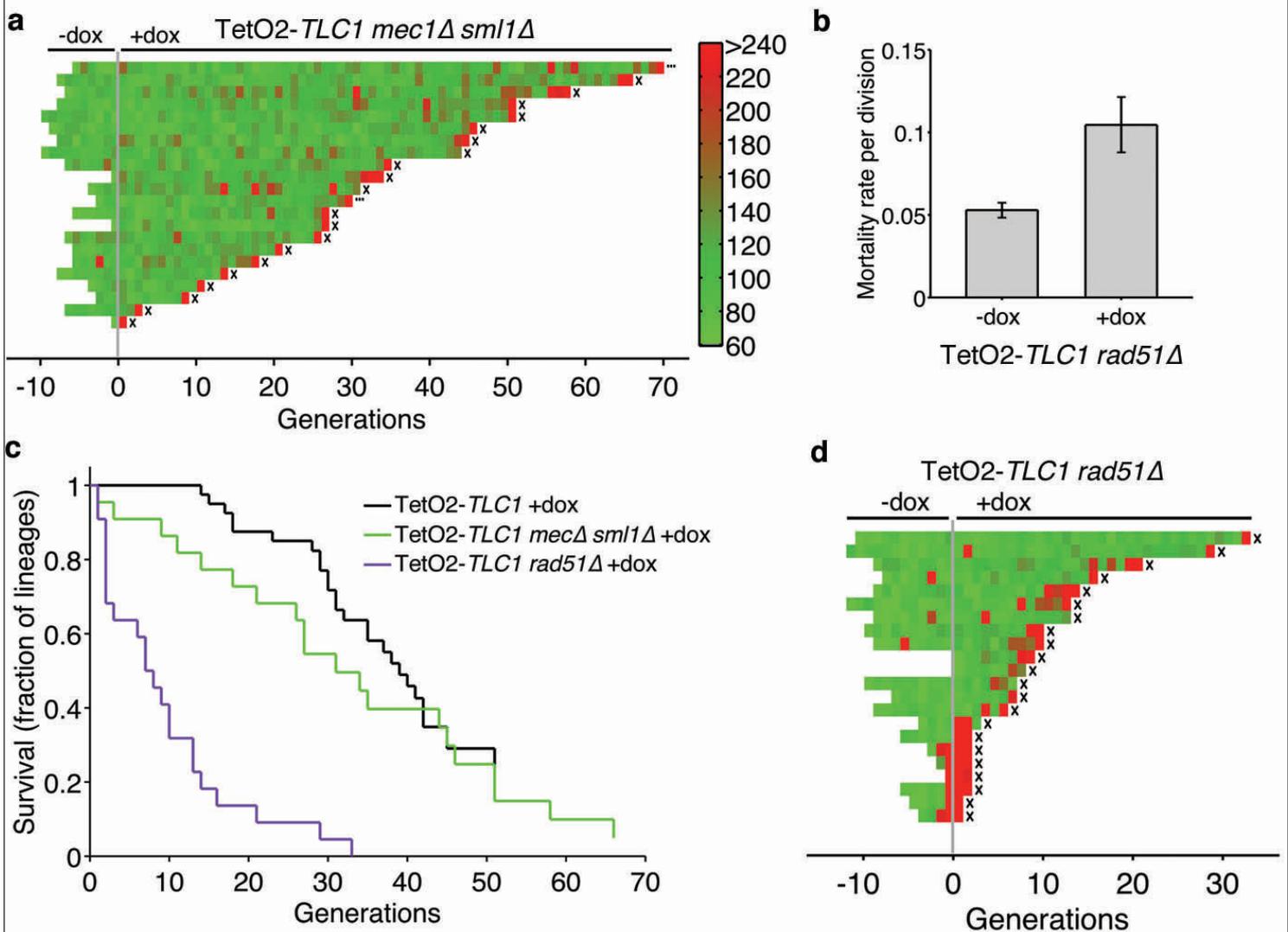
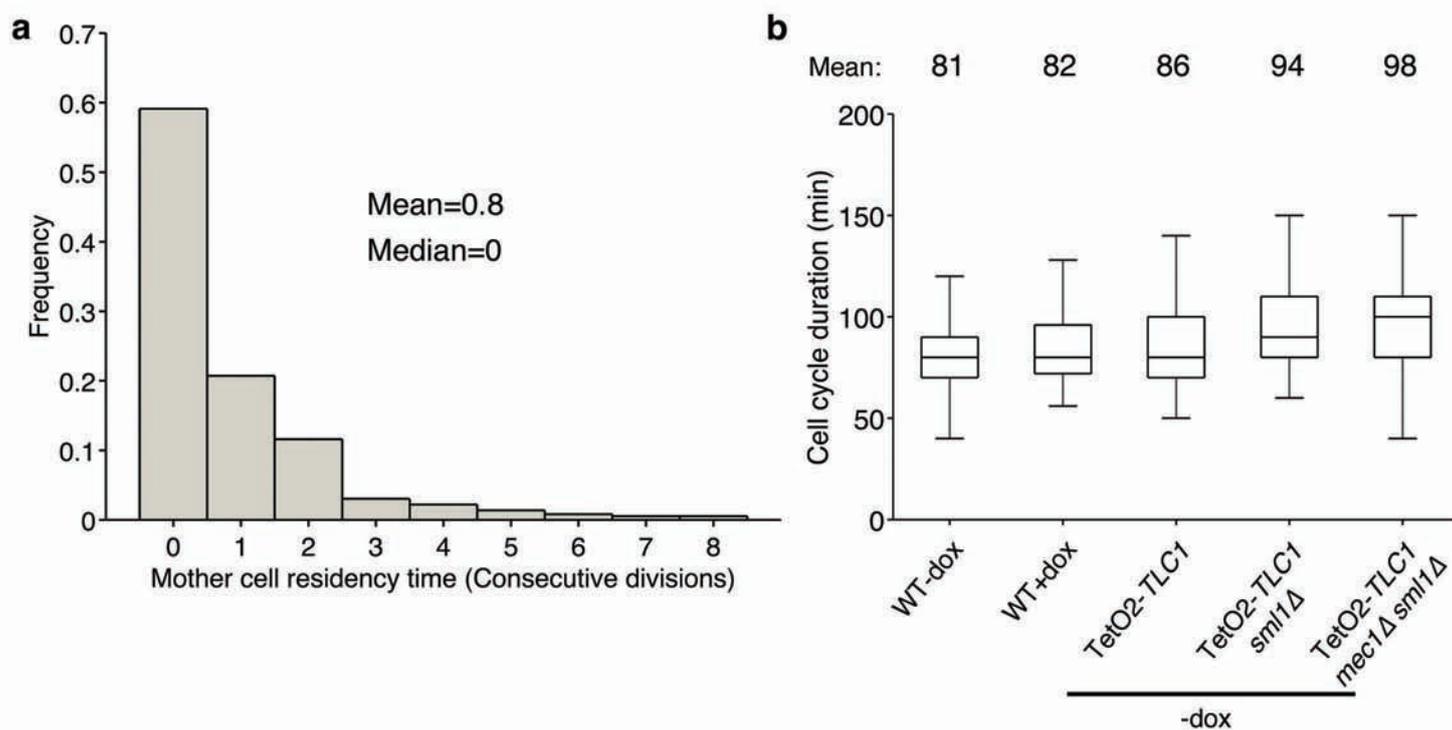


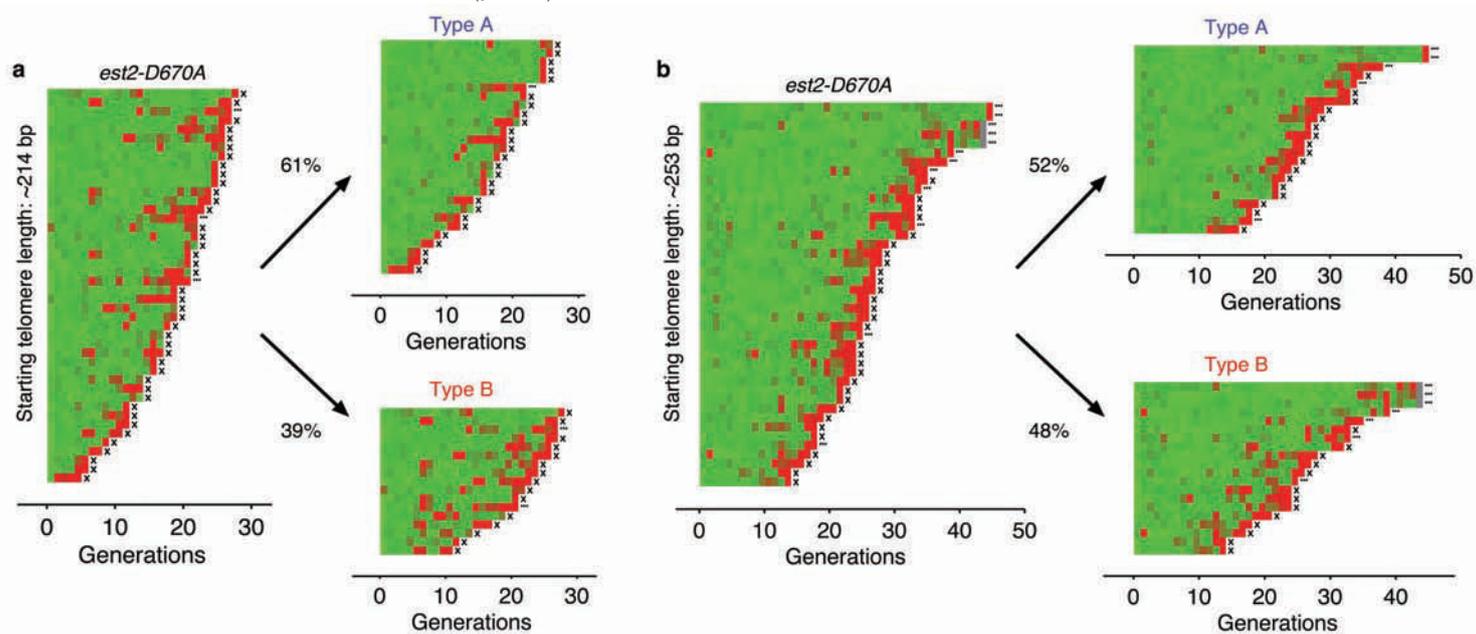
Figure 5: DNA damage checkpoint and homologous recombination shape senescence dynamics



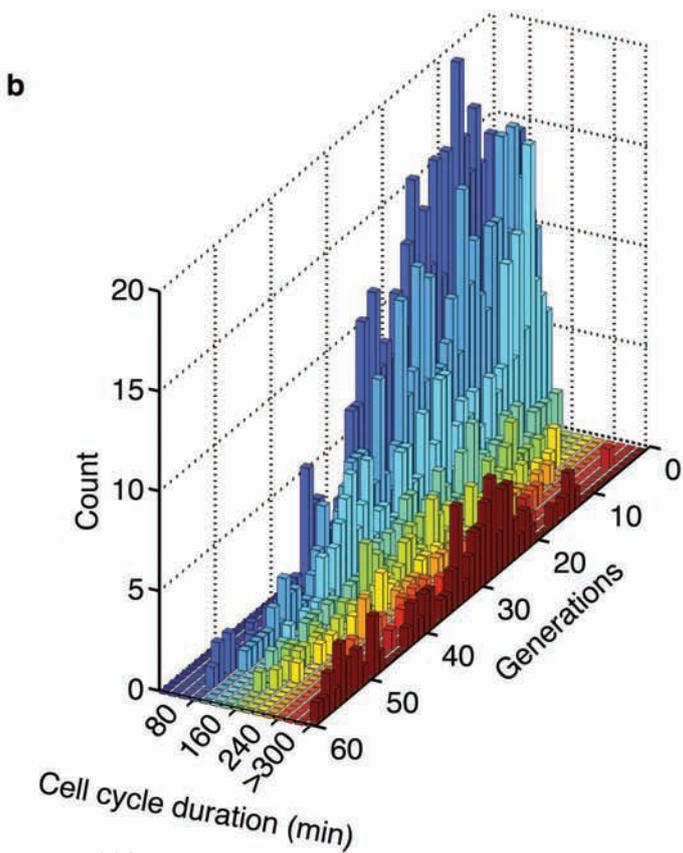
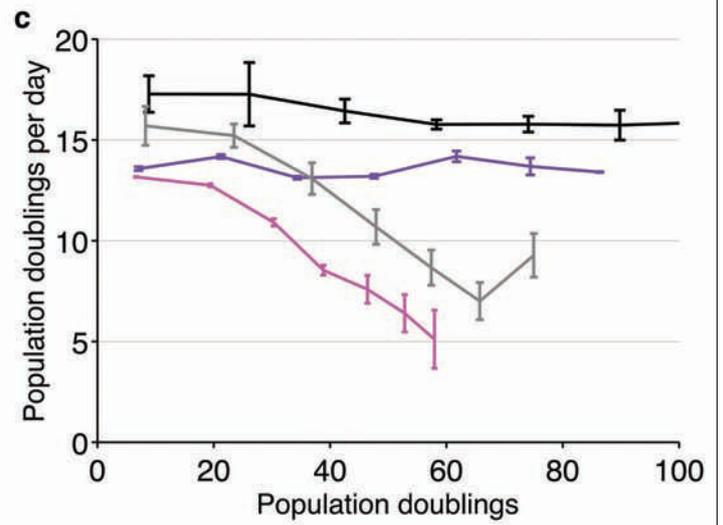
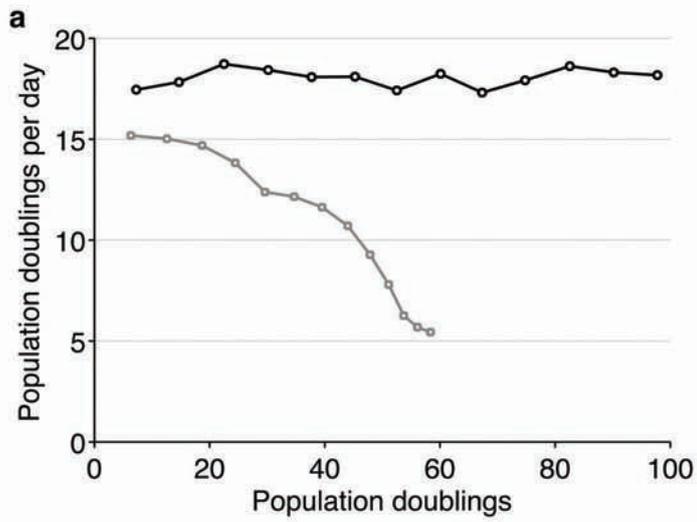
Extended Data Figure 1: Physiological cell division in the microcavities, without interference from the mother cell aging/replicative life span phenomenon



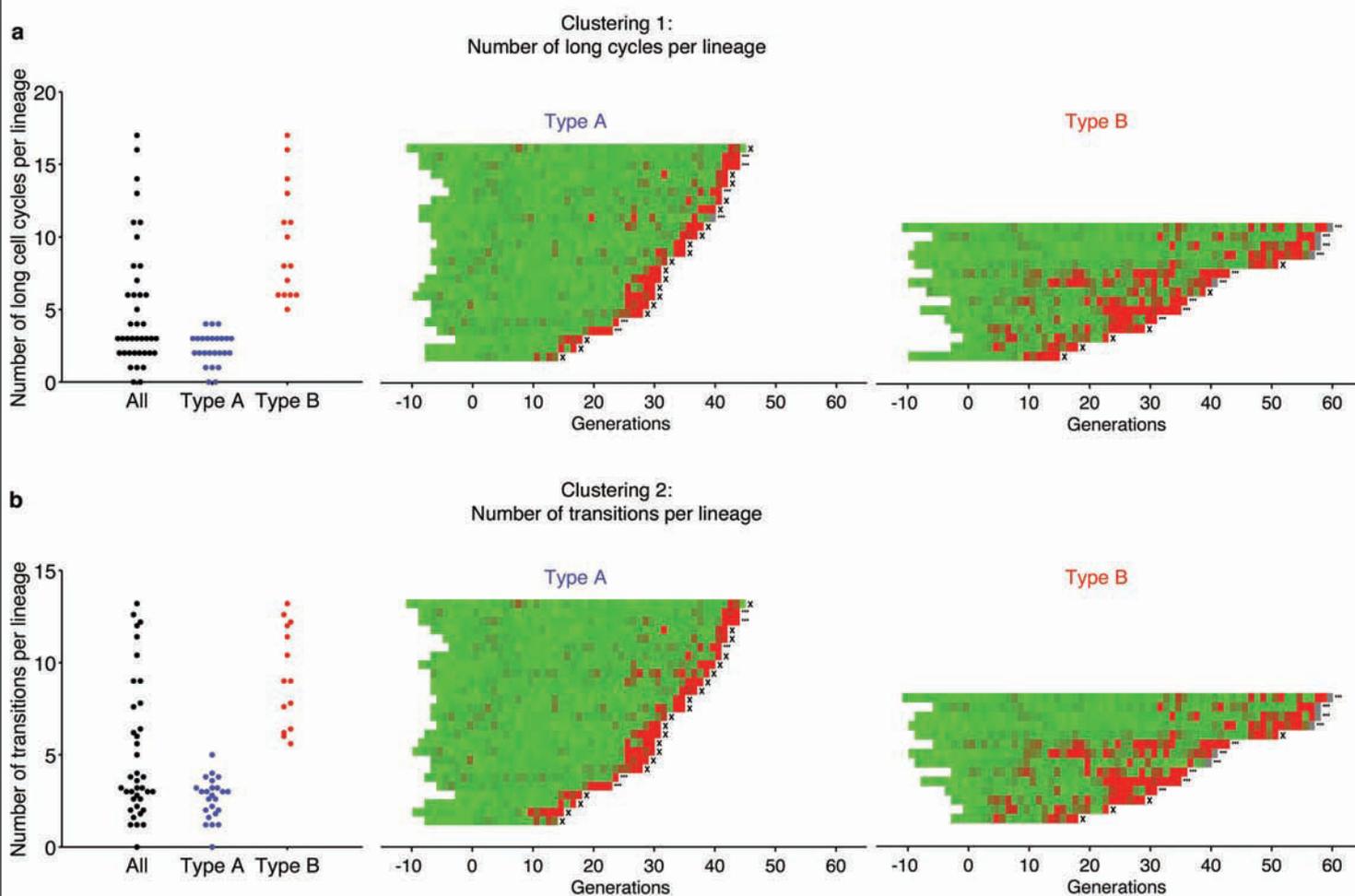
Extended Data Figure 2: Single-lineage analysis of the telomerase-mutant *est2-D670A* strain (yT639)



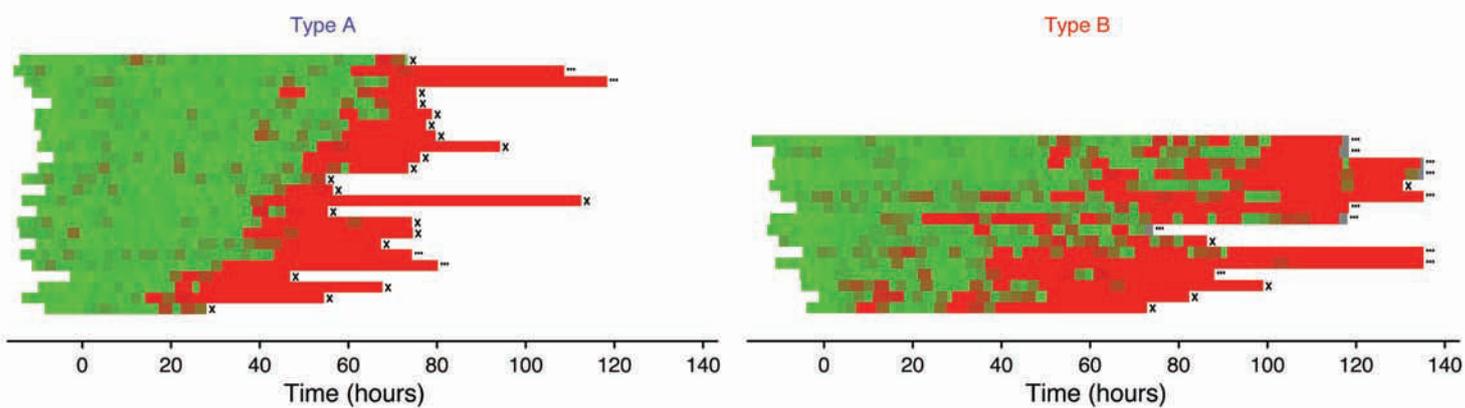
Extended Data Figure 3: Simulation of competitive growth using competition-free lineage data



Extended Data Figure 4: Two independent cluster analyses of the telomerase-negative lineages shown in Fig. 2c



Extended Data Figure 5: Chronological representation of type A and type B lineages, using time as the x-axis



Annexe C

Protocole de création par lithographie UV du moule décrit en section II-1.3.3

Réalisation de la première couche

Une couche uniforme de résine (SU8-2002) de $3.3 \mu m$ est étalée sur un wafer de silicium (wafer 3 pouces - épaisseur $525 \mu m$, Siltronix, France) à l'aide d'un spin-coater (WS-650-23NPP, Laurell Technologies, USA - 2 minutes à 600 tours par minute). Le wafer est ensuite placé 1 minute à $65^{\circ}C$ puis 2 minutes à $95^{\circ}C$ pour solidifier la résine. Après refroidissement, il est installé en contact avec le premier masque sur un aligneur permettant l'illumination UV (MJB3, Karl Süss, Allemagne - 20 secondes à $8 mW.cm^{-2}$). Une seconde cuisson de 2 minutes à $65^{\circ}C$ puis 3 minutes à $95^{\circ}C$ permet ensuite de terminer la polymérisation de la résine exposée au UV. La résine non exposée est finalement détachée du wafer par deux bains successifs de 1 minute dans du développeur (1-méthoxy-2-propyl acétate), puis le wafer est lavé à l'isopropanol. Une dernière cuisson de 10 minutes à $200^{\circ}C$ permet de figer le motif révélé.

Réalisation de la seconde couche

Une seconde couche uniforme de résine SU-8 de $100 \mu m$ est superposée au motif révélé en spin-cotant de la résine SU-2025 30 secondes à 2000 tours par minute. Elle est ensuite solidifiée 2 minutes à $65^{\circ}C$ puis 5 minutes à $95^{\circ}C$. Le wafer et le second masque sont alignés sur l'aligneur sus-cité et on procède à une illumination de 50 secondes à $8 mW.cm^{-2}$, à une seconde cuisson de 1 minute à $65^{\circ}C$ puis 4 minutes à $95^{\circ}C$, à un développement de deux fois 2 minutes, à une cuisson finale de 10 minutes à $200^{\circ}C$ et enfin à une vérification de la topographie à l'aide d'un profilomètre à contact (Dektak 6M, Veeco, USA).

Index

- Agrégation protéique, 11
 - Cinétique d'induction de l', 95
- Analyse quantitative, 76
- Cellules uniques, 57
- Diffusion, 46
- Microfluidique
 - Origine de la, 56
 - Puce, 57, 65
- Organelles, 47
- Organismes unicellulaires, 29
- Paradoxe de Levinthal, 9
- Paysage énergétique, 10
- Protéine, 8
 - chaperon de choc thermique Hsp104, 16
 - Fonction d'une, 8
 - structure primaire, 8
 - structure quaternaire, 8
 - structure secondaire, 8
 - structure tertiaire, 8
 - Système de contrôle qualité des, 12
- Ségrégation asymétrique, 42
- Stress thermique, 20
- Transport actif, 46
- Vieillessement, 24
 - Étude du, 106
 - Facteurs de, 38
 - Paradigme du, 37
 - réplicatif chez *Saccharomyces cerevisiae*, 34

Bibliographie

- [1] Mortimer RK, Johnston JR (1959) Life span of individual yeast cells. *Nature*.
- [2] Egilmez NK, Jazwinski SM (1989) Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 171 :37–42.
- [3] Kennedy BK, Austriaco NR, Guarente L (1994) Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *The Journal of cell biology* 127 :1985–1993.
- [4] Sinclair DA, Guarente L (1997) Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast. *Cell* 91 :1033–1042.
- [5] Lai CY, Jaruga E, Borghouts C, Jazwinski SM (2002) A mutation in the *ATP2* gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162 :73–87.
- [6] McFaline-Figueroa JR, et al. (2011) Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother–daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging cell* 10 :885–895.
- [7] Hughes AL, Gottschling DE (2012) An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* 492 :261–265.
- [8] Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nyström T (2003) Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299 :1751–1753.
- [9] Erjavec N, Larsson L, Grantham J, Nyström 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 & development* 21 :2410–2421.
- [10] Liu B, et al. (2010) The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. *Cell* 140 :257–267.
- [11] Liu B, et al. (2011) Segregation of protein aggregates involves actin and the polarity machinery. *Cell* 147 :959–961.
- [12] Zhou C, et al. (2011) Motility and segregation of Hsp104-associated protein aggregates in budding yeast. *Cell* 147 :1186–1196.
- [13] Kaganovich D, Kopito R, Frydman J (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454 :1088–1095.
- [14] Spokoini R, et al. (2012) Confinement to organelle-associated inclusion structures mediates asymmetric inheritance of aggregated protein in budding yeast. *Cell reports* 2 :738–747.
- [15] Zhou C, et al. (2014) Organelle-Based Aggregation and Retention of Damaged Proteins in Asymmetrically Dividing Cells. *Cell* 159 :530–542.
- [16] Alberts B, et al. (2013) *Essential cell biology* (Garland Science).

- [17] Mulder G (1839) Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen. *Journal für praktische Chemie* 16 :129–152.
- [18] Morimoto RI, Selkoe DJ, Kelly JW (2011) *Protein Homeostasis : A Subject Collection from Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [19] Marchler-Bauer A, et al. (2012) CDD : conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic acids research* p gks1243.
- [20] Chan HS, Dill KA (1993) The protein folding problem. *Physics today* 46 :24–32.
- [21] Hartl FU, Hayer-Hartl M (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature structural & molecular biology* 16 :574–581.
- [22] Consortium EP, et al. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489 :57–74.
- [23] Kumar A, et al. (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes & development* 16 :707–719.
- [24] Ghaemmaghami S, et al. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425 :737–741.
- [25] Schulz GE, Schirmer RH, et al. (1979) *Principles of protein structure*. (Springer-Verlag KG.).
- [26] Ramachandran G (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in protein chemistry* 23 :283.
- [27] Baker E, Hubbard R (1984) Hydrogen bonding in globular proteins. *Progress in biophysics and molecular biology* 44 :97–179.
- [28] Weil JH, Bonnet J (2009) *Biochimie générale, 11^{me} édition* (Dunod).
- [29] Anfinsen CB, et al. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181 :223–230.
- [30] Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry* 82 :323–355.
- [31] Levinthal C (1968) Are there pathways for protein folding. *J. Chim. phys* 65 :44–45.
- [32] Zwanzig R, Szabo A, Bagchi B (1992) Levinthal's paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 :20–22.
- [33] Kubelka J, Hofrichter J, Eaton WA (2004) The protein folding 'speed limit'. *Current opinion in structural biology* 14 :76–88.
- [34] Wolynes PG, Onuchic JN, Thirumalai D (1995) Navigating the folding routes. *Science* 267 :1619–1620.
- [35] Dobson CM, Šali A, Karplus M (1998) Protein folding : a perspective from theory and experiment. *Angewandte Chemie International Edition* 37 :868–893.
- [36] Sridevi K, Lakshmikanth G, Krishnamoorthy G, Udgaonkar JB (2004) Increasing stability reduces conformational heterogeneity in a protein folding intermediate ensemble. *Journal of molecular biology* 337 :699–711.
- [37] Jahn TR, Radford SE (2005) The Yin and Yang of protein folding. *Febs Journal* 272 :5962–5970.
- [38] Chan HS, Dill KA (1990) Origins of structure in globular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 :6388–6392.

-
- [39] Daggett V, Fersht AR (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends in biochemical sciences* 28 :18–25.
- [40] Fersht AR (2000) Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms : contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 :1525–1529.
- [41] Chiti F, Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75 :333–366.
- [42] Eichner T, Radford SE (2011) A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold. *Molecular cell* 43 :8–18.
- [43] Kerner MJ, et al. (2005) Proteome-wide Analysis of Chaperonin-Dependent Protein Folding in *Escherichia coli*. *Cell* 122 :209–220.
- [44] Dill KA, Chan HS (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology* 4 :10–19.
- [45] Khurana R, et al. (2001) Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* 40 :3525–3535.
- [46] Prouty W, Karnovsky M, Goldberg A (1975) Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs. *Journal of Biological Chemistry* 250 :1112–1122.
- [47] Williams DC, Van Frank RM, Muth WL, Burnett JP (1982) Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* 215 :687–689.
- [48] Ritter C, et al. (2005) Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* 435 :844–848.
- [49] Lindner AB, Demarez A (2009) Protein aggregation as a paradigm of aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1790 :980–996.
- [50] Kahn S, Andrikopoulos S, Verchere C (1999) Islet amyloid : a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 48 :241–253.
- [51] Wetzel R (2006) Kinetics and thermodynamics of amyloid fibril assembly. *Accounts of chemical research* 39 :671–679.
- [52] Lomakin A, Teplow DB, Kirschner DA, Benedek GB (1997) Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 :7942–7947.
- [53] Makin OS, Atkins E, Sikorski P, Johansson J, Serpell LC (2005) Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 :315–320.
- [54] Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475 :324–332.
- [55] Sakono M, Zako T (2010) Amyloid oligomers : formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS journal* 277 :1348–1358.
- [56] Fändrich M (2012) Oligomeric intermediates in amyloid formation : structure determination and mechanisms of toxicity. *Journal of molecular biology* 421 :427–440.
- [57] Ignatova Z, Gierasch LM (2004) Monitoring protein stability and aggregation in vivo by real-time fluorescent labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 :523–528.

- [58] Zimmerman SB, Trach SO (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 222 :599–620.
- [59] Minton AP (1983) The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins : some biochemical consequences. *Molecular and cellular biochemistry* 55 :119–140.
- [60] Rivas G, Fernandez JA, Minton AP (1999) Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium : theory, experiment, and biological significance. *Biochemistry* 38 :9379–9388.
- [61] Ellis RJ, Minton AP (2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biological chemistry* 387 :485–497.
- [62] Liberek K, Lewandowska A, Ziętkiewicz S (2008) Chaperones in control of protein disaggregation. *The EMBO journal* 27 :328–335.
- [63] Lu J, Deutsch C (2005) Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nature structural & molecular biology* 12 :1123–1129.
- [64] Wilson DN, Beckmann R (2011) The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling. *Current opinion in structural biology* 21 :274–282.
- [65] Zhang G, Ignatova Z (2011) Folding at the birth of the nascent chain : coordinating translation with co-translational folding. *Current opinion in structural biology* 21 :25–31.
- [66] Bartlett AI, Radford SE (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature structural & molecular biology* 16 :582–588.
- [67] O'Brien EP, Vendruscolo M, Dobson CM (2012) Prediction of variable translation rate effects on cotranslational protein folding. *Nature communications* 3 :868.
- [68] Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S (1999) Posttranslational quality control : folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286 :1888–1893.
- [69] Schubert U, et al. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404 :770–774.
- [70] Gottesman S, et al. (1997) Protein quality control : triage by chaperones and proteases 815. *Genes & Development* 11 :815–823.
- [71] Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319 :916–919.
- [72] Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding.
- [73] Ellis J (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328 :378.
- [74] Ferbitz L, et al. (2004) Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* 431 :590–596.
- [75] Preissler S, Deuerling E (2012) Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends in biochemical sciences* 37 :274–283.
- [76] Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol : from nascent chain to folded protein. *Science* 295 :1852–1858.
- [77] Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery : J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 :579–592.

-
- [78] Calloni G, et al. (2012) DnaK Functions as a Central Hub in the *E. coli* Chaperone Network. *Cell reports* 1 :251–264.
- [79] Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92 :351–366.
- [80] Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101 :119–122.
- [81] Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins in vivo : the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry* 70 :603–647.
- [82] Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis : emerging mechanistic insights. *Nature reviews Molecular cell biology* 11 :515–528.
- [83] Young JC, Moarefi I, Hartl FU (2001) Hsp90 : a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of cell biology* 154 :267.
- [84] John Ellis R (1994) Molecular chaperones : opening and closing the Anfinsen cage. *Current Biology* 4 :633–635.
- [85] Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW (2007) Two families of chaperonin : physiology and mechanism. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23 :115–145.
- [86] Cuéllar J, et al. (2008) The structure of CCT–Hsc70NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin. *Nature structural & molecular biology* 15 :858–864.
- [87] Etchells SA, et al. (2005) The cotranslational contacts between ribosome-bound nascent polypeptides and the subunits of the hetero-oligomeric chaperonin TRiC probed by photocross-linking. *Journal of Biological Chemistry* 280 :28118–28126.
- [88] Shorter J (2011) The mammalian disaggregase machinery : Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS One* 6 :e26319.
- [89] Vale R (2000) AAA Proteins. Lords of the ring. *The Journal of Cell Biology* 150 :F13–F19.
- [90] Grimminger-Marquardt V, Lashuel HA (2010) Structure and function of the molecular chaperone Hsp104 from yeast. *Biopolymers* 93 :252–276.
- [91] Zolkiewski M (2006) A camel passes through the eye of a needle : protein unfolding activity of Clp ATPases. *Molecular microbiology* 61 :1094–1100.
- [92] Parsell DA, Kowal AS, Lindquist S (1994) *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *Journal of Biological Chemistry* 269 :4480–4487.
- [93] Weibezahn J, et al. (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* 119 :653–665.
- [94] Lum R, Tkach JM, Vierling E, Glover JR (2004) Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. *Journal of Biological Chemistry* 279 :29139–29146.
- [95] Zietkiewicz S, Krzewska J, Liberek K (2004) Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *Journal of Biological Chemistry* 279 :44376–44383.
- [96] Lee J, et al. (2013) Heat shock protein (Hsp) 70 is an activator of the Hsp104 motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 :8513–8518.
- [97] Schaupp A, Marcinowski M, Grimminger V, Bösl B, Walter S (2007) Processing of proteins by the molecular chaperone Hsp104. *Journal of molecular biology* 370 :674–686.

- [98] Glover JR, Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40 : a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94 :73–82.
- [99] Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 268 :1517–1520.
- [100] Welsh MJ, Gaestel M (1998) Small Heat-Shock Protein Family : Function in Health and Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851 :28–35.
- [101] Basha E, et al. (2004) The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *Journal of biological chemistry* 279 :7566–7575.
- [102] Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J (2005) Some like it hot : the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature structural & molecular biology* 12 :842–846.
- [103] Franzmann TM, Wühr M, Richter K, Walter S, Buchner J (2005) The activation mechanism of Hsp26 does not require dissociation of the oligomer. *Journal of molecular biology* 350 :1083–1093.
- [104] Lee GJ, Vierling E (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology* 122 :189–198.
- [105] Mogk A, et al. (2003) Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *Journal of Biological Chemistry* 278 :31033–31042.
- [106] Garrido C, Paul C, Seigneuric R, Kampinga H (2012) The small heat shock proteins family : the long forgotten chaperones. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 :1588–1592.
- [107] Haslbeck M, et al. (1999) Hsp26 : a temperature-regulated chaperone. *The EMBO journal* 18 :6744–6751.
- [108] Haslbeck M, et al. (2004) Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 23 :638–649.
- [109] Hershko A (2005) The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death & Differentiation* 12 :1191–1197.
- [110] Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426 :895–899.
- [111] Finley D (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry* 78 :477.
- [112] Arias E, Cuervo AM (2011) Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current opinion in cell biology* 23 :184–189.
- [113] Arndt V, Rogon C, Höhfeld J (2007) To be, or not to be—molecular chaperones in protein degradation. *Cellular and molecular life sciences* 64 :2525–2541.
- [114] Massey AC, Zhang C, Cuervo AM (2006) Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Current topics in developmental biology* 73 :205–235.
- [115] Hershko A (1998) *The ubiquitin system* (Springer).
- [116] Prakash S, Tian L, Ratliff KS, Lehotzky RE, Matouschek A (2004) An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nature structural & molecular biology* 11 :830–837.

-
- [117] McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J (2005) Protein quality control : chaperones culling corrupt conformations. *Nature cell biology* 7 :736–741.
- [118] Ketterer N, Dreisidler M, Tawo R, Höhfeld J (2010) Chaperone-assisted degradation : multiple paths to destruction. *Biological chemistry* 391 :481–489.
- [119] Paul S (2008) Dysfunction of the ubiquitin–proteasome system in multiple disease conditions : therapeutic approaches. *Bioessays* 30 :1172–1184.
- [120] Min JN, et al. (2008) CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Molecular and cellular biology* 28 :4018–4025.
- [121] Friguet B, BULTEAU AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I (2000) Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 908 :143–154.
- [122] Orłowski M, Wilk S (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Archives of biochemistry and biophysics* 415 :1–5.
- [123] Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B (2002) Impairment of proteasome structure and function in aging. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34 :1461–1474.
- [124] Vembar SS, Brodsky JL (2008) One step at a time : endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 :944–957.
- [125] Mizushima N (2007) Autophagy : process and function. *Genes & development* 21 :2861–2873.
- [126] Kundu M, Thompson CB (2008) Autophagy : basic principles and relevance to disease. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.* 3 :427–455.
- [127] Cuervo AM, Dice J (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *Journal of molecular medicine* 76 :6–12.
- [128] Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G (2011) Autophagy and aging. *Cell* 146 :682–695.
- [129] Li SC, Kane PM (2009) The yeast lysosome-like vacuole : endpoint and crossroads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1793 :650–663.
- [130] Ahlberg J, Marzella L, Glaumann H (1982) Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis. *Laboratory investigation ; a journal of technical methods and pathology* 47 :523–532.
- [131] Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy : morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* 20 :460–473.
- [132] Pankiv S, et al. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 282 :24131–24145.
- [133] Gamerdinger M, et al. (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO Journal* 28 :889–901.
- [134] Hicke L, Riezman H (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84 :277–287.
- [135] Galan JM, Moreau V, Andre B, Volland C, Haguenaer-Tsapis R (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *Journal of Biological Chemistry* 271 :10946–10952.

- [136] Horák J (2003) The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins : insights from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1614 :139–155.
- [137] Lamark T, Johansen T (2012) Aggrephagy : selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *International journal of cell biology* 2012.
- [138] Komatsu M, et al. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441 :880–884.
- [139] Ravikumar B, et al. (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 90 :1383–1435.
- [140] Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G (2010) Can autophagy promote longevity? *nature cell biology* 12 :842–846.
- [141] Ma J, Yee A, Brewer HB, Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments.
- [142] Scherzinger E, et al. (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90 :549–558.
- [143] Conway KA, Harper JD, Lansbury PT (2000) Fibrils formed in vitro from α -synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39 :2552–2563.
- [144] Adam J, Crow T, Duchon L, Scaravilli F, Spokes E (1982) Familial cerebral amyloidosis and spongiform encephalopathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 45 :37–45.
- [145] Askanas V, Engel WK, Alvarez RB (1992) Light and electron microscopic localization of beta-amyloid protein in muscle biopsies of patients with inclusion-body myositis. *The American journal of pathology* 141 :31.
- [146] Chew C, Ziady GM, Raphael MJ, Oakley CM (1975) The functional defect in amyloid heart disease : the “stiff heart” syndrome. *The American journal of cardiology* 36 :438–444.
- [147] Meehan S, et al. (2004) Amyloid fibril formation by lens crystallin proteins and its implications for cataract formation. *Journal of Biological Chemistry* 279 :3413–3419.
- [148] Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216 :136–144.
- [149] Krishnan R, Lindquist SL (2005) Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature* 435 :765–772.
- [150] Estruch F (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS microbiology reviews* 24 :469–486.
- [151] Rangel DE (2011) Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 :1281–1296.
- [152] Martinez-Pastor M, et al. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO journal* 15 :2227.
- [153] Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190 :1157–1195.
- [154] Anckar J, Sistonen L (2011) Regulation of HSF1 function in the heat stress response : implications in aging and disease. *Annual review of biochemistry* 80 :1089–1115.

-
- [155] McAlister L, Finkelstein DB (1980) Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochemical and biophysical research communications* 93 :819–824.
- [156] Sanchez Y, Lindquist SL (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248 :1112–1115.
- [157] Li GC, Werb Z (1982) Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 :3218–3222.
- [158] Sanchez Y, Taulien J, Borkovich K, Lindquist S (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO journal* 11 :2357.
- [159] Kitagawa M, Wada C, Yoshioka S, Yura T (1991) Expression of ClpB, an analog of the ATP-dependent protease regulatory subunit in *Escherichia coli*, is controlled by a heat shock sigma factor (sigma 32). *Journal of bacteriology* 173 :4247–4253.
- [160] Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S (2000) Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 12 :479–492.
- [161] Mogk A, et al. (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins : prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *The EMBO Journal* 18 :6934–6949.
- [162] Tkach JM, Glover JR (2008) Nucleocytoplasmic Trafficking of the Molecular Chaperone Hsp104 in Unstressed and Heat-Shocked Cells. *Traffic* 9 :39–56.
- [163] Macario AJ, de Macario EC (2005) Sick chaperones, cellular stress, and disease. *New England Journal of Medicine* 353 :1489–1501.
- [164] Morimoto RI (2006) Stress, aging, and neurodegenerative disease. *New England Journal of Medicine* 355 :2254.
- [165] Rose MR (1991) *Evolutionary biology of aging* (Oxford University Press).
- [166] Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25 :585–621.
- [167] Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 :7915–7922.
- [168] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153 :1194–1217.
- [169] Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11 :398–411.
- [170] Medawar PB (1952) *An unsolved problem of biology : An Inaugural Lecture Delivered at University College of London* (H.K. Lewis and Company).
- [171] Dillin A, Gottschling DE, Nyström T (2014) The good and the bad of being connected : the integrons of aging. *Current opinion in cell biology* 26 :107–112.
- [172] Gompertz B (1825) On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* pp 513–583.
- [173] Finch CE, Pike MC, Witten M (1990) Slow mortality rate accelerations during aging in some animals approximate that of humans. *Science* 249 :902–905.
- [174] Mair W, Goymer P, Pletcher SD, Partridge L (2003) Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science* 301 :1731–1733.

- [175] Brooks A, Lithgow GJ, Johnson TE (1994) Mortality rates in a genetically heterogeneous population of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 263 :668–671.
- [176] Qin H, Lu M (2006) Natural variation in replicative and chronological life spans of *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental gerontology* 41 :448–456.
- [177] Makeham WM (1860) On the law of mortality and the construction of annuity tables. *The Assurance Magazine, and Journal of the Institute of Actuaries* pp 301–310.
- [178] Gavrilov LA, Gavrilova NS (2001) The reliability theory of aging and longevity. *Journal of theoretical Biology* 213 :527–545.
- [179] Martinez DE (1998) Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Experimental gerontology* 33 :217–225.
- [180] Turner FB, Berry KH, Randall D, White G (1984) Population ecology of the desert tortoise at Goffs, California. *Report to Southern California Edison Company*.
- [181] Vaupel JW, Baudisch A, Dölling M, A Roach D, Gampe J (2004) The case for negative senescence. *Theoretical population biology* 65 :339–351.
- [182] Weismann A (1882) *Ueber die Dauer des Lebens* (G. Fischer).
- [183] Weismann A (1889) The significance of sexual reproduction in the theory of natural selection. *Essays upon heredity and kindred biological problems* 1 :255–332.
- [184] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26 :239.
- [185] Prinzinger R (2005) Programmed ageing : the theory of maximal metabolic scope. *EMBO reports* 6 :S14–S19.
- [186] Harley CB (1991) Telomere loss : mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Research/DNAging* 256 :271–282.
- [187] Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy : the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology* 41 :181–190.
- [188] Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.
- [189] Ye J, Renault VM, Jamet K, Gilson E (2014) Transcriptional outcome of telomere signaling. *Nature Reviews Genetics*.
- [190] Elmore S (2007) Apoptosis : a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35 :495–516.
- [191] Skulachev VP (2002) Programmed death in yeast as adaptation? *FEBS letters* 528 :23–26.
- [192] Raff M (1998) Cell suicide for beginners. *Nature* 396 :119–119.
- [193] Pozniakovsky AI, et al. (2005) Role of mitochondria in the pheromone-and amiodarone-induced programmed death of yeast. *The Journal of cell biology* 168 :257–269.
- [194] Atwood CS, Bowen RL (2011) The reproductive-cell cycle theory of aging : an update. *Experimental gerontology* 46 :100–107.
- [195] Kirkwood TB (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 120 :437–447.
- [196] Comfort A (1956) The biology of senescence.
- [197] Orgel LE (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 49 :517.

-
- [198] Harman D, et al. (1955) *Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry* (University of California Radiation Laboratory Berkeley, CA).
- [199] Harman D (1992) Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging* 275 :257–266.
- [200] Bernstein C, Bernstein H (1991) *Aging and Sex, DNA Repair in* (Wiley Online Library).
- [201] Garinis GA, Van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH (2008) DNA damage and ageing : new-age ideas for an age-old problem. *Nature cell biology* 10 :1241–1247.
- [202] Kirkwood TB, Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408 :233–238.
- [203] Charlesworth B (2000) Fisher, Medawar, Hamilton and the evolution of aging. *Genetics* 156 :927–931.
- [204] Hamilton WD (1966) The moulding of senescence by natural selection. *Journal of theoretical biology* 12 :12–45.
- [205] Medawar PB (1946) Old age and natural death. *Modern Quarterly* 1 :56.
- [206] Fisher RA (1930) *The genetical theory of natural selection* (Oxford University Press).
- [207] Kirkwood TB (1977) Evolution of ageing. *Nature* 270 :301–304.
- [208] Kirkwood TB, Holliday R (1979) The evolution of ageing and longevity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 205 :531–546.
- [209] Cervantes RB, Stringer JR, Shao C, Tischfield JA, Stambrook PJ (2002) Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 :3586–3590.
- [210] Saretzki G, Armstrong L, Leake A, Lako M, von Zglinicki T (2004) Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells* 22 :962–971.
- [211] Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Hsueh A (1997) Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biology of reproduction* 56 :1120–1125.
- [212] Thomson JA, et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science* 282 :1145–1147.
- [213] Günes C, Rudolph KL (2013) The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 152 :390–393.
- [214] Goyns MH, Lavery WL (2000) Telomerase and mammalian ageing : a critical appraisal. *Mechanisms of ageing and development* 114 :69–77.
- [215] Rubin H (2002) The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nature biotechnology* 20 :675–681.
- [216] Skulachev VP (2011) Aging as a particular case of phenoptosis, the programmed death of an organism (a response to Kirkwood and Melov “On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history”). *Ageing (Albany NY)* 3 :1120.
- [217] Parkes TL, et al. (1998) Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nature genetics* 19 :171–174.
- [218] Melov S, et al. (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289 :1567–1569.
- [219] Pérez VI, et al. (2009) The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Ageing cell* 8 :73–75.

- [220] Nestelbacher R, et al. (2000) The influence of oxygen toxicity on yeast mother cell-specific aging. *Experimental gerontology* 35 :63–70.
- [221] Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging : good citizens, bad neighbors. *Cell* 120 :513–522.
- [222] Campisi J (1997) The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer* 33 :703–709.
- [223] Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM (2006) Cellular senescence in aging primates. *Science* 311 :1257–1257.
- [224] Mathon NF, Malcolm DS, Harrisingh MC, Cheng L, Lloyd AC (2001) Lack of replicative senescence in normal rodent glia. *Science* 291 :872–875.
- [225] Campisi J, di Fagagna Fd (2007) Cellular senescence : when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology* 8 :729–740.
- [226] Johnson TE (2008) *Caenorhabditis elegans* 2007 : The premier model for the study of aging. *Experimental gerontology* 43 :1–4.
- [227] Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS, Ruvkun G (2000) Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* 290 :147–150.
- [228] Lakowski B, Hekimi S (1996) Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *science* 272 :1010–1013.
- [229] Fire A, et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature* 391 :806–811.
- [230] Helfand SL, Rogina B (2003) Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics* 37 :329–348.
- [231] Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D (1986) The retardation of aging in mice by dietary restriction : longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 116 :641–54.
- [232] Rudolph KL, et al. (1999) Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96 :701–712.
- [233] Bartke A, et al. (2001) Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. *Experimental gerontology* 36 :21–28.
- [234] Guarente L, Kenyon C (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408 :255–262.
- [235] Bartke A (2011) Single-gene mutations and healthy ageing in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* 366 :28–34.
- [236] Kenyon C (2001) A conserved regulatory system for aging. *Cell* 105 :165–168.
- [237] Kennedy B, Steffen K, Kaeberlein M (2007) Ruminations on dietary restriction and aging. *Cellular and molecular life sciences* 64 :1323–1328.
- [238] Jiang JC, Jaruga E, Repnevskaya MV, Jazwinski SM (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *The FASEB Journal* 14 :2135–2137.
- [239] Ingram DK, et al. (2004) Development of calorie restriction mimetics as a longevity strategy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1019 :412–423.
- [240] Greer EL, Brunet A (2009) Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging cell* 8 :113–127.

-
- [241] Weindruch R, Walford RL (1982) Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age : effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215 :1415–1418.
- [242] McCay C, Crowell MF, Maynard L (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J nutr* 10 :63–79.
- [243] Pearl R (1928) *The rate of living : being an account of some experimental studies on the biology of life duration* (Knopf New York).
- [244] Guarente L, Picard F (2005) Calorie Restriction—the *SIR2* Connection. *Cell* 120 :473–482.
- [245] Smith ED, et al. (2008) Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species. *Genome research* 18 :564–570.
- [246] Schneider EL, Mitsui Y (1976) The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73 :3584–3588.
- [247] Trueba F, Woldringh C (1980) Changes in cell diameter during the division cycle of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 142 :869–878.
- [248] Tyson CB, Lord PG, Wheals AE (1979) Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate. *Journal of bacteriology* 138 :92–98.
- [249] Fabrizio P, Longo VD (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging cell* 2 :73–81.
- [250] Overbeek R, et al. (2005) The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic acids research* 33 :5691–5702.
- [251] Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423 :241–254.
- [252] Vaquero A (2009) The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *International Journal of Developmental Biology* 53 :303.
- [253] Kirkwood TB (2005) Asymmetry and the origins of ageing. *Mech Ageing Dev* 126 :533–534.
- [254] Stewart EJ, Madden R, Paul G, Taddei F (2005) Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS biology* 3 :e45.
- [255] Wang P, et al. (2010) Robust Growth of *Escherichia coli*. *Current biology* 20 :1099–1103.
- [256] Rang CU, Peng AY, Chao L (2011) Temporal dynamics of bacterial aging and rejuvenation. *Current Biology* 21 :1813–1816.
- [257] Barker M, Walmsley R (1999) Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 15 :1511–1518.
- [258] Coelho M, et al. (2013) Fission yeast does not age under favorable conditions, but does so after stress. *Current Biology* 23 :1844–1852.
- [259] Breitenbach M, Jazwinski SM, Laun P (2011) *Aging research in yeast* (Springer) Vol. 57.
- [260] Ackermann M, Stearns SC, Jenal U (2003) Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science* 300 :1920–1920.
- [261] Jazwinski SM (1999) Molecular mechanisms of yeast longevity. *Trends in microbiology* 7 :247–252.
- [262] Hartwell LH, Unger MW (1977) Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *The Journal of cell biology* 75 :422–435.
- [263] Laun P, Rinnerthaler M, Bogengruber E, Heeren G, Breitenbach M (2006) Yeast as a model for chronological and reproductive aging – A comparison. *Experimental Gerontology* 41 :1208–1212.

- [264] Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 271 :12275–12280.
- [265] Matecic M, et al. (2010) A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS genetics* 6 :e1000921.
- [266] 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.
- [267] Smith Jr DL, 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.
- [268] Crauwels M, et al. (1997) The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology* 143 :2627–2637.
- [269] Powers RW, Kaerberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes & development* 20 :174–184.
- [270] Lee SS, Vizcarra IA, Huberts DH, Lee LP, Heinemann M (2012) Whole lifespan microscopic observation of budding yeast aging through a microfluidic dissection platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 :4916–4920.
- [271] Kaerberlein M, et al. (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310 :1193–1196.
- [272] Nyström T, Liu B (2014) The mystery of aging and rejuvenation—a budding topic. *Current opinion in microbiology* 18 :61–67.
- [273] Steffen KK, Kennedy BK, Kaerberlein M (2009) Measuring replicative life span in the budding yeast. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- [274] Xie Z, et al. (2012) Molecular phenotyping of aging in single yeast cells using a novel microfluidic device. *Aging cell* 11 :599–606.
- [275] Ryley J, Pereira-Smith OM (2006) Microfluidics device for single cell gene expression analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23 :1065–1073.
- [276] Crane MM, Clark IB, Bakker E, Smith S, Swain PS (2014) A Microfluidic System for Studying Ageing and Dynamic Single-Cell Responses in Budding Yeast. *PloS one* 9 :e100042.
- [277] Zhang Y, et al. (2012) Single cell analysis of yeast replicative aging using a new generation of microfluidic device. *PloS one* 7 :e48275.
- [278] Fehrmann S, et al. (2013) Aging Yeast Cells Undergo a Sharp Entry into Senescence Unrelated to the Loss of Mitochondrial Membrane Potential. *Cell reports* 5 :1589–1599.
- [279] Müller I (1985) Parental age and the life-span of zygotes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51 :1–10.
- [280] McMurray MA, Gottschling DE (2003) An age-induced switch to a hyper-recombinational state. *Science* 301 :1908–1911.
- [281] Laun P, et al. (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Molecular microbiology* 39 :1166–1173.
- [282] Johnston J (1966) Reproductive capacity and mode of death of yeast cells. *Antonie Van Leeuwenhoek* 32 :94–98.

-
- [283] Steinkraus K, Kaeberlein M, Kennedy B (2008) Replicative aging in yeast : the means to the end. *Annual review of cell and developmental biology* 24 :29.
- [284] Lindstrom DL, Gottschling DE (2009) The mother enrichment program : a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 183 :413–422.
- [285] Smeal T, Claus J, Kennedy B, Cole F, Guarente L (1996) Loss of transcriptional silencing causes sterility in old mother cells of *S. cerevisiae*. *Cell* 84 :633–642.
- [286] Shcheprova Z, Baldi S, Frei SB, Gonnet G, Barral Y (2008) A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* 454 :728–734.
- [287] Khmelinskii A, Keller PJ, Lorenz H, Schiebel E, Knop M (2010) Segregation of yeast nuclear pores. *Nature* 466 :E1–E1.
- [288] Khmelinskii A, Meurer M, Knop M, Schiebel E (2011) Artificial tethering to nuclear pores promotes partitioning of extrachromosomal DNA during yeast asymmetric cell division. *Current Biology* 21 :R17–R18.
- [289] Gehlen LR, et al. (2011) Nuclear geometry and rapid mitosis ensure asymmetric episome segregation in yeast. *Current Biology* 21 :25–33.
- [290] Scheckhuber C, et al. (2006) Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nature cell biology* 9 :99–105.
- [291] Veatch JR, McMurray MA, Nelson ZW, Gottschling DE (2009) Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell* 137 :1247–1258.
- [292] Erjavec N, et al. (2013) Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome. *Free Radical Biology and Medicine* 56 :9–16.
- [293] Bulteau AL, Szweda LI, Friguet B (2006) Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Experimental gerontology* 41 :653–657.
- [294] Klinger H, et al. (2010) Quantitation of (a)symmetric inheritance of functional and of oxidatively damaged mitochondrial aconitase in the cell division of old yeast mother cells. *Experimental gerontology* 45 :533–542.
- [295] Higuchi R, et al. (2013) Actin dynamics affect mitochondrial quality control and aging in budding yeast. *Current Biology* 23 :2417–2422.
- [296] Henderson KA, Hughes AL, Gottschling DE (2014) Mother-daughter asymmetry of pH underlies aging and rejuvenation in yeast. *eLife* 3 :e03504.
- [297] Toyama BH, Hetzer MW (2012) Protein homeostasis : live long, won't prosper. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 :55–61.
- [298] Thayer NH, et al. (2014) Identification of long-lived proteins retained in cells undergoing repeated asymmetric divisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 :14019–14026.
- [299] Eldakak A, et al. (2010) Asymmetrically inherited multidrug resistance transporters are recessive determinants in cellular replicative ageing. *Nature cell biology* 12 :799–805.
- [300] Wawryn J, Krzepiński A, Myszka A, Biliński T (1998) Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochimica Polonica* 46 :249–253.
- [301] Barker MG, Brimage LJ, Smart KA (1999) Effect of Cu, Zn superoxide dismutase disruption mutation on replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters* 177 :199–204.

- [302] Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Genetic analysis of ageing : role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature genetics* 13 :25–34.
- [303] Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257 :1220–1224.
- [304] Erjavec N, Cvijovic M, Klipp E, Nyström 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.
- [305] Lindner AB, Madden R, Demarez A, Stewart EJ, Taddei F (2008) Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 :3076–3081.
- [306] Winkler J, et al. (2010) Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *The EMBO journal* 29 :910–923.
- [307] Bufalino MR, DeVeale B, van der Kooy D (2013) The asymmetric segregation of damaged proteins is stem cell-type dependent. *The Journal of cell biology* 201 :523–530.
- [308] Rujano MA, et al. (2006) Polarised asymmetric inheritance of accumulated protein damage in higher eukaryotes. *PLoS biology* 4 :e417.
- [309] Taylor RC, Dillin A (2011) Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 :a004440.
- [310] Fujita K, Kawai R, Iwahashi H, Komatsu Y (1998) Hsp104 Responds to Heat and Oxidative Stress with Different Intracellular Localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* 248 :542–547.
- [311] Coelho M, Lade SJ, Alberti S, Gross T, Tolić IM (2014) Fusion of Protein Aggregates Facilitates Asymmetric Damage Segregation. *PLoS biology* 12 :e1001886.
- [312] Lynch MD (2005) Replicative Aging in *E. coli*. *Rejuvenation research* 8 :79–81.
- [313] Watve M, Parab S, Jogdand P, Keni S (2006) Aging may be a conditional strategic choice and not an inevitable outcome for bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 :14831–14835.
- [314] Evans SN, Steinsaltz D (2007) Damage segregation at fissioning may increase growth rates : A superprocess model. *Theoretical population biology* 71 :473–490.
- [315] Ackermann M, Chao L, Bergstrom CT, Doebeli M (2007) On the evolutionary origin of aging. *Aging cell* 6 :235–244.
- [316] Chao L (2010) A model for damage load and its implications for the evolution of bacterial aging. *PLoS genetics* 6 :e1001076.
- [317] Unruh JR, Slaughter BD, Li R (2013) Quality Control : Putting Protein Aggregates in a Bind. *Current Biology* 23 :R74–R76.
- [318] Tessarz P, Schwarz M, Mogk A, Bukau B (2009) The yeast AAA+ chaperone Hsp104 is part of a network that links the actin cytoskeleton with the inheritance of damaged proteins. *Molecular and cellular biology* 29 :3738–3745.
- [319] Guarente L (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes & development* 14 :1021–1026.
- [320] Kaerberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The *SIR2/3/4* complex and *SIR2* alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development* 13 :2570–2580.

-
- [321] Song J, et al. (2014) Essential genetic interactors of *SIR2* required for spatial sequestration and asymmetrical inheritance of protein aggregates. *PLoS genetics* 10 :e1004539.
- [322] Coquel AS, et al. (2013) Localization of protein aggregation in *Escherichia coli* is governed by diffusion and nucleoid macromolecular crowding effect. *PLoS computational biology* 9 :e1003038.
- [323] Weisberg SJ, et al. (2012) Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 :15811–15816.
- [324] Ogrodnik M, et al. (2014) Dynamic JUNQ inclusion bodies are asymmetrically inherited in mammalian cell lines through the asymmetric partitioning of vimentin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 :8049–8054.
- [325] Escusa-Toret S, Vonk WI, Frydman J (2013) Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nature cell biology* 15 :1231–1243.
- [326] Whitesides GM (2006) The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442 :368–373.
- [327] Barber RW, Emerson DR (2008) Optimal design of microfluidic networks using biologically inspired principles. *Microfluidics and Nanofluidics* 4 :179–191.
- [328] Terry SC, Jerman JH, Angell JB (1979) A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *Electron Devices, IEEE Transactions on* 26 :1880–1886.
- [329] Bustillo JM, Howe RT, Muller RS (1998) Surface micromachining for microelectromechanical systems. *Proceedings of the IEEE* 86 :1552–1574.
- [330] Petersen KE (1982) Silicon as a mechanical material. *Proceedings of the IEEE* 70 :420–457.
- [331] Judy JW (2001) Microelectromechanical systems (MEMS) : fabrication, design and applications. *Smart materials and Structures* 10 :1115.
- [332] Grayson AR, et al. (2004) A BioMEMS review : MEMS technology for physiologically integrated devices. *Proceedings of the IEEE* 92 :6–21.
- [333] Duffy DC, Schueller OJ, Brittain ST, Whitesides GM (1999) Rapid prototyping of microfluidic switches in poly (dimethyl siloxane) and their actuation by electro-osmotic flow. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 9 :211.
- [334] Xia Y, Whitesides GM (1998) Soft lithography. *Annual review of materials science* 28 :153–184.
- [335] Landers JP (2003) Molecular diagnostics on electrophoretic microchips. *Analytical chemistry* 75 :2919–2927.
- [336] Nge PN, Rogers CI, Woolley AT (2013) Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. *Chemical reviews* 113 :2550–2583.
- [337] Fiorini GS, Chiu DT (2005) Disposable microfluidic devices : fabrication, function, and application. *BioTechniques* 38 :429–446.
- [338] Velve-Casquillas G, Le Berre M, Piel M, Tran PT (2010) Microfluidic tools for cell biological research. *Nano Today* 5 :28–47.
- [339] Zhou H, Ning Z, Wang F, Seebun D, Figeys D (2011) Proteomic reactors and their applications in biology. *FEBS Journal* 278 :3796–3806.
- [340] Lindström S, Andersson-Svahn H (2011) Miniaturization of biological assays—Overview on microwell devices for single-cell analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1810 :308–316.

- [341] McDonald JC, Whitesides GM (2002) Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of chemical research* 35 :491–499.
- [342] Piruska A, et al. (2005) The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation. *Lab on a Chip* 5 :1348–1354.
- [343] Bélanger MC, Marois Y (2001) Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane : A review. *Journal of biomedical materials research* 58 :467–477.
- [344] Hua F, et al. (2004) Polymer imprint lithography with molecular-scale resolution. *Nano letters* 4 :2467–2471.
- [345] Rines DR, Thomann D, Dorn JF, Goodwin P, Sorger PK (2011) Live cell imaging of yeast. *Cold Spring Harb Protoc* 6 :1026–1041.
- [346] Cookson S, Ostroff N, Pang WL, Volfson D, Hasty J (2005) Monitoring dynamics of single-cell gene expression over multiple cell cycles. *Molecular systems biology* 1.
- [347] Balagaddé FK, You L, Hansen CL, Arnold FH, Quake SR (2005) Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science* 309 :137–140.
- [348] Tourovskaia A, Figueroa-Masot X, Folch A (2005) Differentiation-on-a-chip : a microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab on a Chip* 5 :14–19.
- [349] Spudich JL, Koshland Jr D, et al. (1976) Non-genetic individuality : chance in the single cell. *Nature* 262 :467–471.
- [350] Cluzel P, Surette M, Leibler S (2000) An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science* 287 :1652–1655.
- [351] Raser JM, O’Shea EK (2005) Noise in gene expression : origins, consequences, and control. *Science* 309 :2010–2013.
- [352] Raj A, van Oudenaarden A (2008) Nature, nurture, or chance : stochastic gene expression and its consequences. *Cell* 135 :216–226.
- [353] Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297 :1183–1186.
- [354] Blake WJ, Kærn M, Cantor CR, Collins JJ (2003) Noise in eukaryotic gene expression. *Nature* 422 :633–637.
- [355] Chubb JR, Trcek T, Shenoy SM, Singer RH (2006) Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Current biology* 16 :1018–1025.
- [356] Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S (2006) Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS biology* 4 :e309.
- [357] Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305 :1622–1625.
- [358] Alberghina L, Porro D (1993) Quantitative flow cytometry : Analysis of protein distributions in budding yeast. A mini-review. *Yeast* 9 :815–823.
- [359] Nebe-von Caron G, Stephens P, Hewitt C, Powell J, Badley R (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of microbiological methods* 42 :97–114.
- [360] Thompson DM, et al. (2004) Dynamic gene expression profiling using a microfabricated living cell array. *Analytical chemistry* 76 :4098–4103.

-
- [361] Morel M, Bartolo D, Galas JC, Dahan M, Studer V (2009) Microfluidic stickers for cell-and tissue-based assays in microchannels. *Lab on a Chip* 9 :1011–1013.
- [362] Cheng SY, et al. (2007) A hydrogel-based microfluidic device for the studies of directed cell migration. *Lab on a Chip* 7 :763–769.
- [363] Jeon NL, et al. (2002) Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nature biotechnology* 20 :826–830.
- [364] Charvin G, Cross FR, Siggia ED (2008) A microfluidic device for temporally controlled gene expression and long-term fluorescent imaging in unperturbed dividing yeast cells. *Plos one* 3 :e1468.
- [365] Lee PJ, Helman NC, Lim WA, Hung PJ (2008) A microfluidic system for dynamic yeast cell imaging. *Biotechniques* 44 :91–95.
- [366] Uhlendorf J, et al. (2012) Long-term model predictive control of gene expression at the population and single-cell levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 :14271–14276.
- [367] Di Carlo D, Wu LY, Lee LP (2006) Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip* 6 :1445–1449.
- [368] Unger MA, Chou HP, Thorsen T, Scherer A, Quake SR (2000) Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science* 288 :113–116.
- [369] Marcy Y, et al. (2007) Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. *PLoS genetics* 3 :e155.
- [370] Hong JW, Studer V, Hang G, Anderson WF, Quake SR (2004) A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture. *Nature biotechnology* 22 :435–439.
- [371] Zhong JF, et al. (2008) A microfluidic processor for gene expression profiling of single human embryonic stem cells. *Lab on a Chip* 8 :68–74.
- [372] Melin J, Quake SR (2007) Microfluidic large-scale integration : the evolution of design rules for biological automation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 :213–231.
- [373] Köster S, et al. (2008) Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab on a Chip* 8 :1110–1115.
- [374] Schmitz CH, Rowat AC, Köster S, Weitz DA (2009) Dropspots : a picoliter array in a microfluidic device. *Lab on a Chip* 9 :44–49.
- [375] Chabert M, Viovy JL (2008) Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 :3191–3196.
- [376] Voldman J (2006) Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8 :425–454.
- [377] Groisman A, et al. (2005) A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells. *Nature methods* 2 :685–689.
- [378] Wheeler AR, et al. (2003) Microfluidic device for single-cell analysis. *Analytical chemistry* 75 :3581–3586.
- [379] Lucchetta EM, Lee JH, Fu LA, Patel NH, Ismagilov RF (2005) Dynamics of *Drosophila* embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics. *Nature* 434 :1134–1138.

- [380] Bennett MR, et al. (2008) Metabolic gene regulation in a dynamically changing environment. *Nature* 454 :1119–1122.
- [381] Hersen P, McClean MN, Mahadevan L, Ramanathan S (2008) Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 :7165–7170.
- [382] Casquillas GV, et al. (2011) Fast microfluidic temperature control for high resolution live cell imaging. *Lab on a Chip* 11 :484–489.
- [383] Bennett MR, Hasty J (2009) Microfluidic devices for measuring gene network dynamics in single cells. *Nature Reviews Genetics* 10 :628–638.
- [384] Keenan TM, Folch A (2008) Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab on a Chip* 8 :34–57.
- [385] Paliwal S, et al. (2007) MAPK-mediated bimodal gene expression and adaptive gradient sensing in yeast. *Nature* 446 :46–51.
- [386] Maerkl SJ (2009) Integration column : Microfluidic high-throughput screening. *Integrative Biology* 1 :19–29.
- [387] Tehranirokh M, Kouzani AZ, Francis PS, Kanwar JR (2013) Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. *Biomicrofluidics* 7 :051502.
- [388] Yamada M, Hirano T, Yasuda M, Seki M (2006) A microfluidic flow distributor generating stepwise concentrations for high-throughput biochemical processing. *Lab on a Chip* 6 :179–184.
- [389] Cooksey GA, Sip CG, Folch A (2009) A multi-purpose microfluidic perfusion system with combinatorial choice of inputs, mixtures, gradient patterns, and flow rates. *Lab on a Chip* 9 :417–426.
- [390] Thorsen T, Maerkl SJ, Quake SR (2002) Microfluidic large-scale integration. *Science* 298 :580–584.
- [391] Gómez-Sjöberg R, Leyrat AA, Pirone DM, Chen CS, Quake SR (2007) Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system. *Analytical chemistry* 79 :8557–8563.
- [392] Hung PJ, Lee PJ, Sabounchi P, Lin R, Lee LP (2005) Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnology and bioengineering* 89 :1–8.
- [393] Taylor R, et al. (2009) Dynamic analysis of MAPK signaling using a high-throughput microfluidic single-cell imaging platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 :3758–3763.
- [394] Déneraud N, et al. (2013) A chemostat array enables the spatio-temporal analysis of the yeast proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 :15842–15847.
- [395] Nobs JB, Maerkl SJ (2014) Long-Term Single Cell Analysis of *S. pombe* on a Microfluidic Microchemostat Array. *PloS one* 9 :e93466.
- [396] Ferry M, Razinkov I, Hasty J (2011) Microfluidics for synthetic biology from design to execution. *Methods in Enzymology* 497 :295–372.
- [397] Delamarche E, et al. (1998) Transport mechanisms of alkanethiols during microcontact printing on gold. *The Journal of Physical Chemistry B* 102 :3324–3334.
- [398] Hui C, Jagota A, Lin Y, Kramer E (2002) Constraints on microcontact printing imposed by stamp deformation. *Langmuir* 18 :1394–1407.

-
- [399] Yang R, Wang W (2005) A numerical and experimental study on gap compensation and wavelength selection in UV-lithography of ultra-high aspect ratio SU-8 microstructures. *Sensors and Actuators B : Chemical* 110 :279–288.
- [400] Del Campo A, Greiner C (2007) SU-8 : a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 :R81.
- [401] Rowat AC, Bird JC, Agresti JJ, Rando OJ, Weitz DA (2009) Tracking lineages of single cells in lines using a microfluidic device. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 :18149–18154.
- [402] McDonald JC, et al. (2000) Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Electrophoresis* 21 :27–40.
- [403] Qin D, Xia Y, Whitesides GM (1996) Rapid prototyping of complex structures with feature sizes larger than 20 μm . *Advanced Materials* 8 :917–919.
- [404] Rogers JA, Paul KE, Jackman RJ, Whitesides GM (1997) Using an elastomeric phase mask for sub-100 nm photolithography in the optical near field. *Applied Physics Letters* 70 :2658–2660.
- [405] Kang WJ, Rabe E, Kopetz S, Neyer A (2006) Novel exposure methods based on reflection and refraction effects in the field of SU-8 lithography. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16 :821.
- [406] Ong BH, Yuan X, Tao S, Tjin SC (2006) Photothermally enabled lithography for refractive-index modulation in SU-8 photoresist. *Optics letters* 31 :1367–1369.
- [407] Barber R, et al. (2005) Optimisation of SU-8 processing parameters for deep X-ray lithography. *Microsystem technologies* 11 :303–310.
- [408] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 :802–805.
- [409] Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 67 :509–544.
- [410] Shaner NC, et al. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 22 :1567–1572.
- [411] Shaner NC (2014) Development of new colors from coral fluorescent proteins. *The Fluorescent Protein Revolution* pp 71–94.
- [412] Stephens DJ, Allan VJ (2003) Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300 :82–86.
- [413] Huang B, Babcock H, Zhuang X (2010) Breaking the diffraction barrier : super-resolution imaging of cells. *Cell* 143 :1047–1058.
- [414] Lippincott-Schwartz J (2011) Emerging in vivo analyses of cell function using fluorescence imaging. *Annual review of biochemistry* 80 :327.
- [415] Mogilner A, Wollman R, Marshall WF (2006) Quantitative modeling in cell biology : what is it good for ? *Developmental cell* 11 :279–287.
- [416] Oates AC, Gorfinkiel N, González-Gaitán M, Heisenberg CP (2009) Quantitative approaches in developmental biology. *Nature Reviews Genetics* 10 :517–530.
- [417] Miermont A, et al. (2013) Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 :5725–5730.
- [418] Zernike F (1955) How I discovered phase contrast. *Science* 121 :345–349.

- [419] Beucher S, Lantuéjoul C (1979) *Use of watersheds in contour detection*.
- [420] Otsu N (1975) A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica* 11 :23–27.
- [421] Canny J (1986) A computational approach to edge detection. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on* pp 679–698.
- [422] Meyer F (1977) *Contrast features extraction* pp 374–380.
- [423] Serra J (1982) *Image analysis and mathematical morphology, v. 1* (Academic press).
- [424] Kimori Y, Baba N, Morone N (2010) Extended morphological processing : a practical method for automatic spot detection of biological markers from microscopic images. *BMC bioinformatics* 11 :373.
- [425] Chenouard N, et al. (2014) Objective comparison of particle tracking methods. *Nature methods*.
- [426] Kuhn HW (1955) The Hungarian method for the assignment problem. *Naval research logistics quarterly* 2 :83–97.
- [427] Edmonds J, Karp RM (1972) Theoretical improvements in algorithmic efficiency for network flow problems. *Journal of the ACM (JACM)* 19 :248–264.
- [428] Munkres J (1957) Algorithms for the assignment and transportation problems. *Journal of the Society for Industrial & Applied Mathematics* 5 :32–38.
- [429] Ünal E, Kinde B, Amon A (2011) Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast. *Science* 332 :1554–1557.
- [430] Afonso B, Silver PA, Ajo-Franklin CM (2010) A synthetic circuit for selectively arresting daughter cells to create aging populations. *Nucleic acids research* pp 1–9.
- [431] Blackburn E, Szostak J (1984) The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annual review of biochemistry* 53 :163–194.
- [432] Hayflick L (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 37 :614–636.
- [433] Cohn M, Blackburn EH (1995) Telomerase in yeast. *Science* 269 :396–400.
- [434] Lundblad V, Szostak JW (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57 :633–643.
- [435] Lundblad V, Blackburn EH (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues *est1-* senescence. *Cell* 73 :347–360.
- [436] Shay JW, Reddel RR, Wright WE (2012) Cancer and telomeres—an ALTERNative to telomerase. *Science* 336 :1388–1390.
- [437] Kim NW, et al. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266 :2011–2015.
- [438] Zhang L, Maddox AS (2010) Anillin. *Current Biology* 20 :R135–R136.
- [439] Chant J, Herskowitz I (1991) Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* 65 :1203–1212.
- [440] Kinkhabwala A, Khmelinskii A, Knop M (2014) Analytical model for macromolecular partitioning during yeast cell division. *BMC Biophysics* 7 :10.

Publications

- [1] Halina Anton, Sebastien Harlepp, Caroline Ramspacher, Dave Wu, Fabien Monduc, Sandeep Bhat, Michael Liebling, **Camille Paoletti**, Gilles Charvin, Jonathan B Freund, et al. Pulse propagation by a capacitive mechanism drives embryonic blood flow. *Development*, 140(21) :4426–4434, 2013.
- [2] Pierre-Luc Bardet, Boris Guirao, **Camille Paoletti**, Fanny Serman, Valentine Léopold, Floris Bosveld, Yûki Goya, Vincent Mirouse, François Graner, and Yohanns Bellaïche. Pten controls junction lengthening and stability during cell rearrangement in epithelial tissue. *Developmental cell*, 25, 2013.
- [3] Gilles Charvin, Steffen Fehrmann, **Camille Paoletti**, Youlian Goulev, Andrei Ungureanu, and Hugo Aguilaniu. Single cell dynamics of the transition to replicative senescence. In *Yeast*, volume 30, pages 28–28. Wiley, 2013.
- [4] Steffen Fehrmann, **Camille Paoletti**, Youlian Goulev, Andrei Ungureanu, Hugo Aguilaniu, and Gilles Charvin. Aging yeast cells undergo a sharp entry into senescence unrelated to the loss of mitochondrial membrane potential. *Cell reports*, 5(6) :1589–1599, 2013.
- [5] Shih-Hsin Hsu, **Camille Paoletti**, Moacir Torres, Raymond J Ritchie, Anthony WD Larkum, and Christian Grillet. Light transmission of the marine diatom *coscinodiscus wailesii*. In *SPIE Smart Structures and Materials+ Nondestructive Evaluation and Health Monitoring*, pages 83390F–83390F. International Society for Optics and Photonics, 2012.
- [6] **Camille Paoletti** and Gilles Charvin. Mechanism of asymmetrical segregation of Hsp104 protein aggregates in budding yeast. In *Yeast*, volume 30, pages 94–94. Wiley, 2013.
- [7] **Camille Paoletti**, Sandrine Morlot, and Gilles Charvin. Establishment of asymmetrical distribution of protein aggregates during stress and aging in *S. Cerevisiae*. En préparation.
- [8] Zhou Xu, Emilie Fallet, **Camille Paoletti**, Gilles Fehrmann, Steffen ans Charvin, and Maria Teresa Teixeira. Real-time dynamics of telomerase-negative cell divisions reveals two routes to senescence. En préparation.

Mécanismes de ségrégation asymétrique des agrégats protéiques liés à Hsp104 chez *Saccharomyces cerevisiae*

Résumé

La levure du boulanger a une durée de vie répliquative limitée : chaque cellule mère produit un nombre fini de filles avant que sa division ne ralentisse puis qu'elle meure. Cette entrée en sénescence est supposée notamment résulter de l'accumulation d'agrégats de protéines endommagées au sein de la cellule mère. La rétention des agrégats au sein des mères permettrait de produire des filles rajeunies. Cependant, ce mécanisme de ségrégation asymétrique reste controversé, en partie car il est complexe de suivre la dynamique des agrégats protéiques *in vivo*. Nous avons développé une méthodologie pour suivre la formation des agrégats protéiques au cours d'un choc thermique au sein de cellules uniques se divisant. Associées à un modèle simple d'agrégation protéique, nos données montrent que l'établissement de la répartition asymétrique des agrégats protéiques au cours de la division peut être expliquée quantitativement par la croissance polarisée du bourgeon. De plus, des expériences de vieillissement répliquatif réalisées au sein d'une puce microfluidique suggèrent que l'accumulation d'agrégats protéiques dans les mères pourrait induire la mort, mais seulement lorsque les cellules subissent un stress protéotoxique. Cette étude apporte donc un éclairage nouveau sur les mécanismes d'héritabilité des agrégats protéiques et leur contribution au vieillissement répliquatif chez la levure du boulanger.

Mots-clefs : agrégation, vieillissement, ségrégation asymétrique, microfluidique, levure

Résumé en anglais

Budding yeast cells have a limited replicative life span: a mother cell can produce a limited number of daughter cells before it slows down its division and dies. It has been proposed that the progressive accumulation of aggregates of damaged proteins within mother cells drives entry into senescence. The retention of such damages by mothers is thought to permit the daughter lineage rejuvenation. Yet the mechanism of their asymmetrical segregation is still controversial, in part because of difficulties inherent to the tracking of the dynamics of protein aggregates *in vivo*. In this context, we have developed a single cell methodology to track the formation of protein aggregates upon heat shock in unperturbed dividing cells. In combination with a simple computational model of protein aggregation, our data reveal that the establishment of an asymmetrical repartition of protein aggregates upon division can be explained quantitatively by the polarized growth of the bud. In addition, replicative aging experiments performed in a microfluidic device suggest that the accumulation and retention of protein aggregates in mothers may be responsible for cell death, but only under particular proteotoxic stress. Therefore, this study sheds new light on the mechanism of inheritance of protein aggregates and its contribution to replicative aging in budding yeast.

Keywords: aggregation, aging, asymmetrical segregation, microfluidics, yeast