



HAL
open science

La SAGA TOR au secours des levures carencées en nutriments

Thomas Laboucarié, Dominique Helmlinger

► **To cite this version:**

Thomas Laboucarié, Dominique Helmlinger. La SAGA TOR au secours des levures carencées en nutriments. *Médecine/Sciences*, 2018, 34 (8-9), pp.645-648. 10.1051/medsci/20183408005 . hal-02371969

HAL Id: hal-02371969

<https://hal.science/hal-02371969>

Submitted on 17 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



souche déficiente pour *pbp1a*. Néanmoins, MacP non-phosphorylable est toujours capable d'interagir avec PBP2a, indiquant que la phosphorylation de MacP n'est pas nécessaire à la formation du complexe PBP2a/MacP. Toutefois, cette phosphorylation pourrait influencer la fonction de PBP2a au sein du complexe d'assemblage et de réticulation du peptidoglycane.

Dans le futur, il faudra comprendre non seulement le mécanisme moléculaire d'activation de la fonction de PBP2a par MacP, mais également comment ce mécanisme est régulé par phosphorylation et coordonné à la fonction des autres protéines de division, elles-mêmes substrats de StkP. Il a été montré que cette kinase influence également, par interaction directe, la fonction de PBP2x, une PBP essentielle du pneumocoque [8]. Il a récemment été démontré que la protéine régulatrice CozE agit négativement sur PBP1a, dont la suractivité s'avère létale [12]. Dans ce contexte, on ne peut pas exclure que la fonction des trois autres PBP (PBP1b, PBP2b et PBP3) du pneumocoque puisse également dépendre

de protéines régulatrices. Répondre à l'ensemble de ces questions permettra de comprendre les rouages de la division cellulaire et de la morphogenèse du pneumocoque et d'autres bactéries à Gram-positif. Cette connaissance fondamentale devrait ouvrir la voie à des travaux de recherche plus appliqués pour développer de nouvelles molécules altérant l'assemblage du peptidoglycane. ♦

MacP, a regulator of the cell wall assembly in the human bacterial pathogen *Streptococcus pneumoniae*

REMERCIEMENTS

Nous remercions le CNRS, l'université de Lyon, la Fondation pour la recherche médicale ainsi que la Fondation Bettencourt Schueller pour le financement de nos travaux de recherche.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Egan AJ, Cleverley RM, Peters K, et al. Regulation of bacterial cell wall growth. *Febs J* 2017 ; 284 : 851-67.
- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010 ; 2 : a000414.
- Cho H, Wivagg CN, Kapoor M, et al. Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously. *Nat Microbiol* 2016 : 16172.
- Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? *Yale J Biol Med* 2017 ; 90 : 135-45.
- Paradis-Bleau C, Markovski M, Uehara T, et al. Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell* 2010 ; 143 : 1110-20.
- Fenton AK, Manuse S, Flores-Kim J, et al. Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018 ; 115 : 2812-7.
- Léophonte P, Garraffo R. Impact écologique des antibiotiques : l'exemple de la pneumonie à pneumocoque. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 (suppl 3) : 7-12.
- Linares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 2010 ; 16 : 402-10.
- Grangeasse C. Rewiring the pneumococcal cell cycle with serine/threonine- and tyrosine-kinases. *Trends Microbiol* 2016 ; 24 : 713-24.
- Stamsas GA, Straume D, Ruud Winther A, et al. Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 2017 ; 105 : 954-67.
- Zucchini L, Mercy C, Garcia PS, et al. PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Microbiol* 2018 ; 3 : 197-209.
- Fenton AK, Mortaji LE, Lau DT, et al. CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Microbiol* 2016 ; 2 : 16237.

NOUVELLE

La SAGA TOR au secours des levures carencées en nutriments

Thomas Laboucaré, Dominique Helmlinger

CRBM, CNRS UMR5237, université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France.
dhelmlinger@crbm.cnrs.fr

► Comment une cellule répond-elle et s'adapte-t-elle aux fluctuations de son environnement, par exemple, à la disponibilité en nutriments, est une question d'importance fondamentale. Plusieurs voies de signalisation, dont celles impliquant la kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), TORC1 (*mTOR complex 1*) et TORC2, renseignent les cellules

sur la quantité et la qualité des sucres, des acides aminés et des composés azotés disponibles. Ces voies contrôlent le taux de croissance et l'induction de programmes développementaux *via* différents effecteurs, qui modulent les profils transcriptionnels, traductionnels, post-traductionnels et métaboliques des cellules [1, 2].

La régulation de l'expression des gènes joue un rôle fondamental dans ce processus et peut s'effectuer à plusieurs étapes [3]. Une étape critique est l'initiation de la transcription, qui requiert le recrutement séquentiel de nombreux facteurs, dont des complexes co-activateurs. Des études ont caractérisé leur composition et leurs activités, cepen-

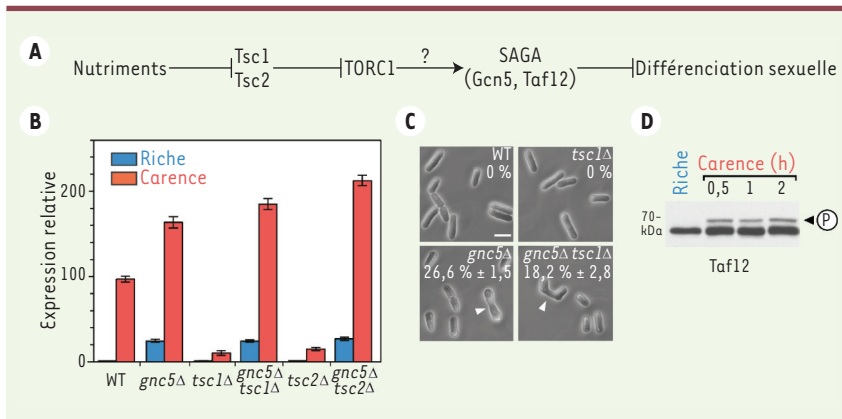


Figure 1. Le co-activateur transcriptionnel SAGA fonctionne en aval de TORC1. Le co-activateur transcriptionnel SAGA (*Spt-ada-gcn5-acetyl-transferase*) régule l'expression des gènes de différenciation en aval de TORC1 (*target of rapamycin complex 1*) et est phosphorylé en réponse aux nutriments. **A.** Schéma simplifié de la voie de signalisation TORC1 chez *Schizosaccharomyces pombe*. En conditions riches en nutriments, la voie TORC1 est active et contribue à l'inhibition de la différenciation. SAGA, via la sous-unité acétyltransférase Gcn5, réprime l'expression des gènes de différenciation, suggérant que TORC1 et SAGA pourraient agir dans la même voie. **B, C.** Analyse d'épistasie entre Tsc1 (*tuberous sclerosis complex 1*) /Tsc2 (TORC1) et Gcn5 (SAGA). **B.** L'expression d'un gène de différenciation est quantifiée par RT-qPCR (*reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*) à partir d'ARN extraits de souches de différents génotypes, qui ont été cultivées soit en conditions riches (en bleu), ou carencées en nutriments pendant 4 heures (en rouge). **C.** Le nombre de cellules différenciées dans ces mêmes souches est compté au microscope. Les flèches blanches indiquent des levures en état de différenciation sexuelle. **D.** Analyse du profil de migration de la sous-unité architecturale Taf12 de SAGA par électrophorèse et immuno-détection d'extraits protéiques de levures cultivées dans les conditions indiquées. La flèche indique l'isoforme phosphorylée de Taf12, dont la migration est retardée.

dant, comment les co-activateurs interprètent-ils les signaux provenant des voies de signalisation reste peu étudié [4].

Schizosaccharomyces pombe est une levure fissipare, unicellulaire, qui prolifère à l'état haploïde en présence de nutriments dans le milieu extérieur. En réponse à une carence, plus particulièrement d'une source d'azote, *S. pombe* entre soit en quiescence, soit en différenciation sexuelle si un partenaire est présent. *S. pombe* représente donc un excellent modèle expérimental pour étudier les mécanismes de décision de prolifération en réponse aux nutriments. Contrairement à *Saccharomyces cerevisiae*, une autre levure modèle, les voies de signalisation mTOR sont parfaitement conservées entre *S. pombe* et les mammifères (Figure 1A).

Plusieurs études ont établi que, chez *S. pombe*, les voies TORC1 et TORC2 ont des rôles opposés dans le contrôle de l'équilibre entre prolifération et différenciation sexuelle [5]. TORC1 stimule la croissance et inhibe la différenciation sexuelle en conditions riches, alors que TORC2 induit l'entrée en différenciation en réponse à une carence. De la même manière, des travaux de notre laboratoire ont montré que le complexe co-activateur transcriptionnel SAGA (*Spt-ada-gcn5-acetyl-transferase*) est capable soit de réprimer soit d'induire l'expression des gènes de différenciation sexuelle, en fonction de la disponibilité en nutriments [6].

Ces observations soulevaient deux questions. Tout d'abord, quel mécanisme explique-t-il les fonctions antagonistes de TORC1 et TORC2 sur l'équilibre entre

prolifération et différenciation ? Et comment un co-activateur transcriptionnel comme SAGA peut-il détecter un changement du niveau de nutriment et ainsi réprimer ou activer la transcription de gènes cibles ? Nous avons combiné des approches de génétique, de biochimie et de protéomique quantitative pour répondre à ces questions. Nos travaux montrent que les voies de signalisation TORC1 et TORC2 modulent le niveau de phosphorylation de la sous-unité Taf12 (*TATA-Box-binding protein-associated factor 12*) du complexe SAGA, afin de coordonner l'entrée en différenciation sexuelle avec la disponibilité en nutriments [7].

Interactions génétiques entre TORC1, TORC2 et SAGA

Nous avons tout d'abord réalisé des analyses d'interactions génétiques chez *S. pombe*. En conditions de prolifération, riches en nutriments, TORC1 et la sous-unité acétyltransférase de SAGA, Gcn5, inhibent l'expression des gènes de différenciation. Ainsi, lorsque la voie TORC1 est suractivée, par exemple en activant la GTPase Rheb (*GTP-binding protein, Ras homolog enriched in brain*) dans les mutants *tsc1Δ*¹ ou *tsc2Δ*, *S. pombe* est incapable d'induire la différenciation en réponse à une carence (Figure 1 B-C). Les mutants *gcn5Δ* présentent, eux, le phénotype opposé et entrent en différenciation même en présence de nutriments (Figure 1 B-C). Les doubles mutants (*gcn5Δ tsc1Δ* et *gcn5Δ tsc2Δ*) ont un phénotype identique aux simples mutants *gcn5Δ*, c'est-à-dire une différenciation sexuelle constitutive (Figure 1 B-C). La mutation *gcn5Δ* est épistatique² sur des mutations ponctuelles qui augmentent directement l'activité catalytique de TORC1. L'absence de Gcn5 supprime donc le phénotype causé par la suractivation de TORC1, démontrant que

¹ Le complexe TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex*) agit comme un régulateur de Rheb. Les mutants *tsc1Δ* n'expriment pas le gène *tsc1*, Δ indique une délétion.

² L'épistasie désigne l'interaction entre deux ou plusieurs gènes.

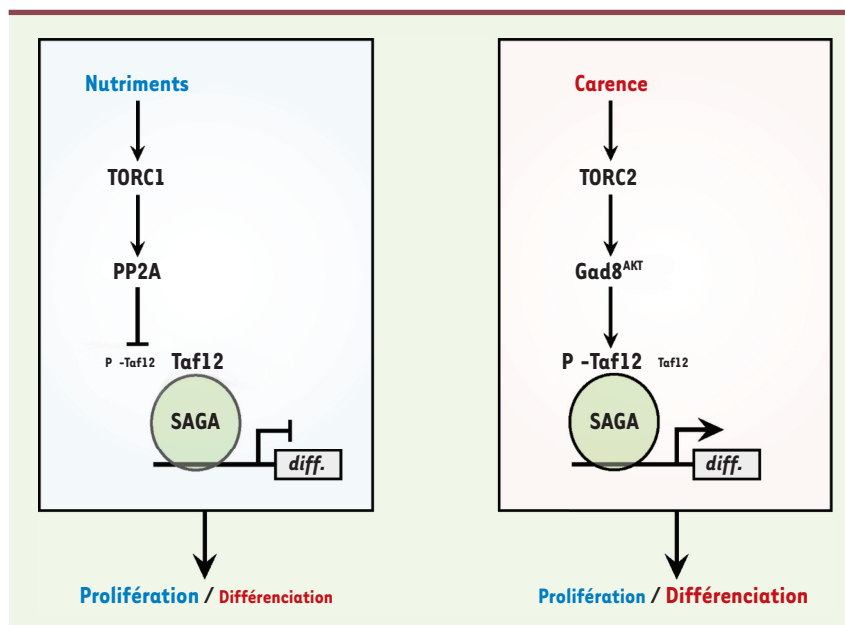


Figure 2. Rôle du co-activateur SAGA sur l'équilibre entre prolifération et différenciation sexuelle. Le co-activateur SAGA (*Spt-ada-gcn5-acetyl-transferase*) contrôle l'équilibre entre prolifération et différenciation sexuelle en aval des voies TORC1 (*target of rapamycin complex 1*) et TORC2, via la phosphorylation de sa sous-unité architecturale Taf12. En présence de nutriments, TORC1 active la phosphatase PP2A, qui dé-phosphoryle Taf12. Sans nutriments, la voie TORC1-PP2A est inhibée alors que la voie TORC2-Gad8^{AKT} est activée. La kinase Gad8^{AKT} phosphoryle alors Taf12 et induit l'entrée en différenciation (*diff*) sexuelle.

Gcn5 régule l'expression des gènes de différenciation en aval de TORC1.

En utilisant la même stratégie d'analyse du phénotype des doubles mutants, nous avons observé que SAGA contrôle la différenciation sexuelle en aval de la voie TORC2. Ces interactions génétiques sont spécifiques des voies TORC1 et TORC2. En effet, nous n'avons détecté aucune interaction fonctionnelle entre SAGA et les kinases Pka1^{PKA}, Sty1^{P38} (*mitogenic-activated protein kinase-P38*) ou Ssp2^{AMPK} (AMPK α) qui, chez *S. pombe*, contribuent également au contrôle de l'équilibre entre prolifération et différenciation en réponse aux nutriments.

Identification et caractérisation d'une phosphorylation de SAGA

Des approches de biochimie et de phospho-protéomique ont par la suite permis de comprendre comment TORC1 et TORC2 contrôlaient SAGA. Pour cela, nous avons analysé le complexe SAGA par spectrométrie de masse quantitative,

grâce au marquage métabolique de *S. pombe* par des isotopes lourds d'acides aminés (SILAC). L'analyse de ses sous-unités a indiqué que la composition de SAGA est identique dans les cellules en prolifération ou en différenciation. En revanche, l'analyse des peptides phosphorylés a révélé des différences. En effet, une sous-unité architecturale de SAGA, Taf12, est plus fortement phosphorylée au sein de complexes SAGA purifiés à partir de cellules carencées, en comparaison aux conditions riches. Nous avons constaté que Gcn5 n'est pas différenciellement phosphorylée dans ces conditions.

Plusieurs expériences ont confirmé que Taf12 est phosphorylée à la suite d'une carence nutritionnelle. Tout d'abord, nous pouvons détecter une isoforme de Taf12 spécifiquement dans des extraits protéiques de cellules carencées (Figure 1D). Des tests supplémentaires ont confirmé que cet isoforme correspond à des phosphorylations de Taf12,

sur plusieurs résidus. De plus, Taf12 est très rapidement phosphorylée, environ trente minutes après la disparition des nutriments du milieu, comme la déplétion d'une source d'azote (Figure 1D). Cette modification est dynamique, car Taf12 est rapidement dé-phosphorylée si on rajoute des nutriments à des cellules carencées. Enfin, la substitution des acides aminés correspondants en résidus soit non phosphorylables, soit mimant la charge négative de la phosphorylation, perturbe l'entrée en différenciation sexuelle. En conclusion, la cinétique, la réversibilité et l'importance physiologique de la phosphorylation de Taf12 suggèrent que des voies de signalisation qui répondent à la disponibilité en azote contrôlent directement cette modification.

TORC1 et TORC2 modulent la phosphorylation de Taf12 via des effecteurs distincts

Nos résultats de génétique et de biochimie étaient cependant contradictoires. En effet, la génétique démontrait que TORC1 régulaient SAGA, directement ou indirectement. Pourtant, lorsque *S. pombe* était carencée, l'activité de TORC1 diminuait rapidement [8,9], alors que la phosphorylation de SAGA augmentait concomitamment (Figure 1D).

Pour résoudre ce paradoxe apparent, nous avons formulé l'hypothèse que TORC1 active une phosphatase qui dé-phosphoryle la sous-unité Taf12 de SAGA. En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine phosphatase PP2A est un effecteur connu de TORC1. Des approches génétiques ont démontré que, chez *S. pombe*, TORC1 active la phosphatase PP2A et que celle-ci fonctionne en amont de SAGA. Des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* ont permis d'établir que PP2A est directement responsable de la déphosphorylation de Taf12 en conditions riches en nutriments. Nous avons aussi montré que TORC1 régule PP2A indirectement, en inhibant la kinase Ppk18^{Greatwall}. En réponse à une carence, l'activité de TORC1 diminue, permettant

l'activation de Ppk18^{Greatwall}, qui phosphoryle l'endosulfine Igo1³. La forme phosphorylée d'Igo1 inhibe alors l'activité phosphatase du complexe PP2A et empêche la déphosphorylation de Taf12. Nous n'avons cependant pas pu déterminer par quel mécanisme TORC1 inhibe la kinase Ppk18^{Greatwall} en conditions de prolifération.

Le niveau de phosphorylation de Taf12 est la résultante de l'action de la phosphatase PP2A et d'une kinase. Nous avons donc testé le rôle de toutes les kinases impliquées dans la signalisation en réponse à une carence nutritionnelle chez *S. pombe*. Cette approche candidate a permis l'identification de TORC2 et de sa cible canonique, la kinase Gad8^{AKT}. La voie TORC2-Gad8^{AKT} contribue en effet à la phosphorylation de Taf12 *in vitro* et *in vivo*, en accord avec l'interaction génétique que nous avons observée entre TORC2 et SAGA.

Conclusions et perspectives

En conclusion, la sous-unité Taf12 du complexe SAGA subit une phosphorylation rapide et dynamique en réponse à la disponibilité en nutriments, qui résulte des activités antagonistes de deux voies de signalisation. En présence de nutriments, TORC1 active la phosphatase PP2A, qui

dé-phosphoryle Taf12. Une carence nutritionnelle inhibe inversement TORC1 et PP2A, via la kinase Ppk18^{Greatwall}. En parallèle, la voie TORC2-Gad8^{AKT} activée contribue à la phosphorylation de Taf12, et module la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation sexuelle (Figure 2).

Les activités régulatrices de SAGA sur les gènes inductibles sont bien caractérisées. Par contre, comment SAGA répond aux fluctuations de l'environnement et aux voies de signalisation restait une question ouverte, à laquelle nos travaux apportent un élément de réponse. Chez *S. pombe*, SAGA est en effet une cible directe de voies de signalisation qui répondent à la disponibilité en nutriments. SAGA est donc un nouvel effecteur de ces kinases dans la régulation de l'expression des gènes contrôlant l'équilibre entre prolifération et différenciation. De plus, ces résultats révèlent un mécanisme nouveau de contrôle de la transcription par les voies de signalisation TORC1 et TORC2, qui convergent vers un effecteur commun. En perspective, il sera important d'étudier l'effet de la phosphorylation de Taf12 sur les fonctions du complexe SAGA, et notamment de Gcn5, afin d'identifier le mécanisme complet de la réponse de SAGA aux voies de signalisation sensibles aux nutriments. ♦

The TOR SAGA to the rescue of starved yeast cells

REMERCIEMENTS

Thomas Laboucarie a bénéficié des financements suivants : Labex EpiGenMed, Investissements d'avenir (ANR-10-LABX-12-01) et Fondation ARC pour la recherche contre le cancer. Dominique Helmlinger est financé via un programme ATIP-Avenir du CNRS, FP7 Marie Curie Actions (FP7-PEOPLE-2012-CIG/COACTIVATOR), la fondation ARC (PJA-20131200471), l'agence nationale de la recherche (ANR-15-CE12-0009-01).

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Loewith R, Hall MN. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 2011 ; 189 : 1177-201.
- Broach JR. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* 2012 ; 192 : 73-105.
- Nadal E de, Ammerer G, Posas F. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet* 2011 ; 12 : 833-45.
- Spedale G, Timmers HT, Pijnappel WW. ATAC-king the complexity of SAGA during evolution. *Genes Dev* 2012 ; 26 : 527-41.
- Otsubo Y, Yamamoto M. Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. *J Cell Sci* 2012 ; 125 : 2789-93.
- Helmlinger D, Marguerat S, Villén J, et al. The *S. pombe* SAGA complex controls the switch from proliferation to sexual differentiation through the opposing roles of its subunits Gcn5 and Spt8. *Genes Dev* 2008 ; 22 : 3184-95.
- Laboucarie T, Detilleux D, Rodriguez-Mias RA, et al. TORC1 and TORC2 converge to regulate the SAGA co-activator in response to nutrient availability. *EMBO Rep* 2017 ; 16 : 202-12.
- Nakashima A, Otsubo Y, Yamashita A, et al. Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. *J Cell Sci* 2012 ; 125 : 5840-9.
- Nakashima A, Sato T, Tamanoi F. Fission yeast TORC1 regulates phosphorylation of ribosomal S6 proteins in response to nutrients and its activity is inhibited by rapamycin. *J Cell Sci* 2010 ; 123 : 777-86.

³ Dans divers organismes, il a été reporté que les endosulfites Igo 1 et 2 se liaient à la sous-unité B55 de PP2A quand ils étaient phosphorylés par Greatwall.

Bon de commande

À retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC** offre exceptionnelle réservée aux abonnés à m/s jusqu'au 31 décembre 2010

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

Par carte bancaire :

Visa

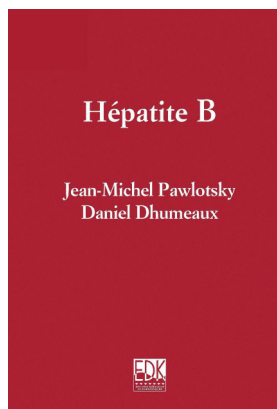
Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | |

Signature :



ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages