

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA RÉGULATION À LA BAISSÉ DU GÈNE ESSENTIEL LST8, CODANT UN  
COMPOSANT DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE TOR1, DÉCLENCHÉ  
UNE RÉSISTANCE AUX POLYAMINES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MÉLODIE TEKOHUOTETUA

AOÛT 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Les premières personnes que j'aimerai remercier sont mes directeurs et co-directeurs de recherche, Dr Dindial Ramotar et François Dragon, qui m'ont permis de réaliser ce projet de maîtrise. Je tiens aussi à remercier l'étudiant au doctorat, Nicolas Brosseau, pour toutes les idées échangées et l'aide qu'il m'a apporté lors de mes expériences. Je remercie aussi Taramatti Harihar, notre technicienne de laboratoire pour son aide précieuse et sans qui, je n'aurai pas trouvé tout le matériel dont j'avais besoin pour la réalisation de mes expériences. Aux membres du laboratoire du Dr François Dragon, Jessica et Sophie, merci pour votre aide. Merci au jury d'évaluation pour la correction de mon travail. Merci à Garance pour son amitié durant les quelques mois que nous avons passés ensemble. Un grand merci à Marina pour son amitié, son soutien et ses encouragements tout au long de ces mois, pour toutes les idées échangées et sa présence au quotidien. J'aimerai remercier les membres de ma famille, mes grands-parents, oncles, tantes, cousins et cousines qui m'ont encouragé. Enfin, j'aimerai remercier ma sœur Hereiti, mes parents et mon conjoint pour leur soutien moral et financier indéfectible.

## DÉDICACE

Je dédicace ce mémoire :

À mes parents, j'espère qu'à travers ce modeste travail, je vous rends fiers. Les mots pour vous exprimer ma reconnaissance n'ont pas encore été inventés, je me contenterai donc d'un MERCI.

À mon cher conjoint, jamais ce projet n'aura abouti sans ton soutien infailible.  
MERCII.

À ma petite perle du Pacifique, ma petite fille chérie. Ton arrivée dans nos vies a tout chamboulé.

*« La science n'a jamais tout à fait raison, mais elle a rarement tout à fait tort, et, en général, elle a plus de chance d'avoir raison que les théories non scientifiques. Il est donc rationnel de l'accepter à titre d'hypothèse ».*

*Bertrand Russell*



1.7.1 Biosynthèse des polyamines .....	22
1.7.1.1 Putrescine, spermidine et spermine .....	23
1.7.1.2 NaD1 .....	25
1.7.2 Transport des polyamines .....	25
1.7.2.1 AGP2 .....	26
1.7.2.2 Sam3 .....	27
1.7.2.3 Dur3 .....	28
1.7.3 Les polyamines et le cancer .....	28
1.8 Hypothèses et objectifs .....	29
CHAPITRE II Matériel et Méthodes .....	32
2.1 Souche et plasmides .....	32
2.2 Extraction de l'ADN génomique des levures .....	33
2.3 PCR et mutagenèse dirigée .....	34
2.4 Ligation, transformation des bactéries chimio-compétentes .....	35
2.5 Purification de l'ADN plasmidique .....	36
2.6 Séquençage des clones .....	36
2.7 Clonage moléculaire .....	37
2.8 Test en gouttes .....	37
2.9 Analyse de l'expression protéique .....	37
2.9.1 Séparation des protéines sur un gel SDS PAGE et <i>Western blot</i> .....	37
2.9.2 Coloration des gels de polyacrylamide au nitrate d'argent .....	38
CHAPITRE III Résultats .....	40
3.1 Comparaison de la résistance de BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>pol30-DAmP</i> à la spermine. ....	40
3.2 Comparaison de la résistance de BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>tor1Δ</i> à la spermine et à l'arsénite de sodium .....	44
CHAPITRE IV Discussion des résultats .....	52
4.1 La souche <i>lst8-DAmP</i> est résistante à la spermine .....	52
4.2 Les effets de la spermine chez <i>S. cerevisiae</i> .....	54
4.3 Lst8 est essentielle dans la formation du complexe TORC1 .....	56

4.4 Impact des mutations générées dans LST8 sur les fonctions biologiques de la levure .....	57
CONCLUSION et perspectives .....	60
ANNEXE A .....	61
ANNEXE B.....	62
ANNEXE C.....	64
ANNEXE I.....	65
BIBLIOGRAPHIE .....	66

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Estimation des cas et de la mortalité liée au cancer au Canada en 2019 .....	2
1.2 Organisation des complexes mTORC1 et mTORC2.....	9
1.3 Activation de mTORC1 par les acides aminés et les facteurs de croissance...	13
1.4 Activation du complexe mTORC1 par les acides aminés.....	16
1.5 Régulation de la formation du complexe eIF4F par 4E-BP .....	18
1.6 Voie de signalisation mTOR/S6K.....	21
1.7 Voie de synthèse des polyamines.....	25
3.1 Test de résistance des souches BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>pol30-DAmP</i> à la spermine.....	42
3.2 Test de complémentation du gène <i>LST8</i> dans les souches BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>pol30-DAmP</i> .....	45
3.3 Détection de protéines des souches BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>pol30-DAmP</i> contenant le plasmide YEplac181 vide ou <i>lst8-Myc</i> par une coloration au nitrate d'argent.....	47
3.4 Test de résistance des souches BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>tor1Δ</i> à la spermine .....	49
3.5 Test de résistance des souches BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>tor1Δ</i> à l'arsénite de sodium.....	50

3.6	Détection de protéines des souches BY4741 et <i>lst8-DAmP</i> par une coloration au nitrate d'argent après un traitement à la spermine.....	52
3.7	Immunobuvardage des protéines extraites des souches BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>tor1</i> $\Delta$ non traitées .....	53
3.8	Immunobuvardage des protéines extraites des souches BY4741, <i>lst8-DAmP</i> et <i>tor1</i> $\Delta$ traitées à la spermine et l'arsénite de sodium.....	54

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Oligonucléotides utilisés pour le clonage du gène <i>LST8</i> et la mutagenèse dirigée .....	35

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

DAmP : Diminution de l'abondance par perturbation de l'ARNm / Decreased Abundance by mRNA Perturbation

DSB : Double Strand Break / Bris double brin

LST8: Lethal with Sec13 protein 8

MMR : MisMatch repair

PUT: Putrescine

ROS: Reactive oxygen species / Espèces réactives à l'oxygène

Site AP: Site apurinique/apyrimidique

SMOX: Spermine oxidase

SPR: Spermine

SPD : Spermidine

UV : Ultra-violet

YPD : Yeast extract – Peptone – Dextrose (Milieu de culture)

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

h : Heure

min : minutes

mL : millilitres

mM : millimolaire

## RÉSUMÉ

Les polyamines comme la spermine remplissent de multiples fonctions dans les cellules, notamment la régulation de la transcription et la stabilisation de l'ADN et de l'ARN. À des concentrations élevées, les polyamines sont toxiques, car les processus cataboliques par l'intermédiaire des oxydases de polyamines produisent du peroxyde d'hydrogène ainsi que des aldéhydes réactifs, y compris de l'acroléine qui peut endommager les protéines, l'ADN et d'autres composants cellulaires. Des efforts ont été concentrés sur l'absorption de polyamines afin d'identifier des cibles qui peuvent transporter des analogues de polyamines pour détruire les cellules cancéreuses. Le criblage à haut débit utilisant la collection de mutants haploïdes de levure a révélé que des composants de la membrane plasmique, y compris des transporteurs impliqués dans l'absorption et aussi des effecteurs du gradient de proton, sont impliqués dans la régulation de la toxicité des polyamines. Le laboratoire a utilisé une collection d'allèles hypomorphes des gènes essentiels préalablement déréglés par la stratégie de diminution de l'abondance par perturbation de l'ARNm (DAmP), pour rechercher des souches avec des gènes régulés à la baisse qui montrent une résistance aux polyamines. Des recherches antérieures, menées par le laboratoire, ont démontrées 115 souches de levures qui montraient une hyper-résistance à la spermine. Nous présenterons des données montrant que l'expression diminuée du gène *Lst8*, et par conséquent de la protéine LST8, une composante de la voie de signalisation mTOR, cause une extrême résistance des cellules à la spermine, tout en les sensibilisant à l'arsénite. Les résultats ont aussi montré que l'absence totale de TORC1 ne permet pas aux cellules de vivre très longtemps, surtout lors de traitement. Des efforts sont en cours pour explorer le rôle de *Lst8* sur les fonctions des transporteurs.

Mots-clés : Polyamines, *Lst8*, TORC1

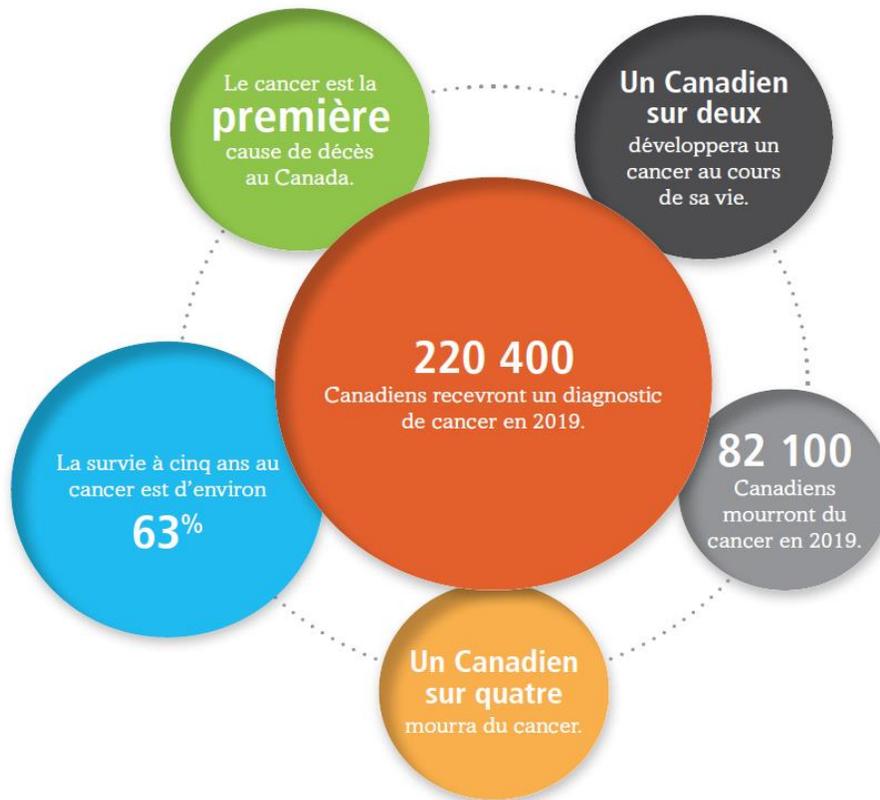


## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le cancer et les caractéristiques d'une cellule cancéreuse

En 2019, plus de 80 000 décès ont été associés aux tumeurs malignes. Ça en fait la première cause de mortalité au Canada, avec 30% de tous les décès, soit 10 % de plus que les décès liés aux maladies cardiovasculaires (Cancer, 2019) (Figure 1.1). Les cancers qui touchent le plus les femmes sont le cancer du sein, c'est aussi le plus meurtrier. Le cancer du poumon se retrouve en seconde position suivi du cancer colorectal et enfin celui des ovaires. Chez les hommes, c'est le cancer de la prostate qui arrive en première place en termes de diagnostic, ensuite vient celui du poumon et enfin le cancer colorectal. Cependant le cancer du poumon est le plus meurtrier (Cancer, 2019). Les cellules cancéreuses ont certaines caractéristiques qui leur sont propres. Étant des cellules qui ont perdu leur fonction de régulation, elles doivent être capables de se diviser et de croître sans l'aide des signaux de croissance externes. Pour cela, elles peuvent en produire elles-mêmes de façon autocrine/paracrine et produire des récepteurs de facteur de croissance en grande quantité (Gu, 2012). La cellule cancéreuse doit aussi être capable d'échapper à l'apoptose. De plus toutes les cellules ont un nombre de division limité et il n'est pas le même pour toutes. Par exemple, un fibroblaste se divise environ soixante fois alors que les neurones n'en sont pas capables (Jégo, 2004; Wolpert et al., 2015).



**Figure 1.1 : Estimation des cas et de la mortalité liée au cancer au Canada en 2019.** Environ 220 000 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués en 2019. Avec environ 30% de la mortalité au Canada, le cancer est la première cause de mortalité au pays. Ces chiffres démontent l'importance de cette maladie et l'urgence d'en remédier. Figure prise de la Société Canadienne du cancer (Cancer, 2019).

Normalement, après chaque division cellulaire, une partie des extrémités des chromosomes, appelée télomère, est perdue. Les télomères, répétition du même motif d'acides nucléiques (TTAGGG), permet d'éviter la perte de l'information génétique durant la division cellulaire. Cependant ceux-ci sont limités et la cellule meurt après un certain nombre de divisions (Soussi, 2000). Dans les cellules cancéreuses, la télomérase, l'enzyme responsable de la synthèse des télomères, est souvent réactivée. Par conséquent, la synthèse de télomères reprend et la division cellulaire devient alors

illimitée. L'acquisition de l'immortalité est une des caractéristiques les plus importantes dans une cellule cancéreuse. Elle peut se faire par une mutation des proto-oncogènes ou dans les gènes suppresseurs de tumeurs comme p53. Cela entraîne une production excessive de protéines stimulant entre autres la prolifération cellulaire, conduisant éventuellement à la formation d'une tumeur. L'expansion d'une tumeur entraîne un éloignement des cellules par rapports aux vaisseaux sanguins et se forme ainsi un micro-environnement hypoxique et acide (Robert & Thévenin, 2009). Or, toutes cellules doivent recevoir la quantité nécessaire de nutriments et d'oxygène pour fonctionner. Pour répondre à cette demande, certains facteurs de transcriptions comme les *hypoxia inducible factors* (HIF) sont produits afin d'activer l'angiogenèse. Cette dernière permet la fabrication de nouveaux vaisseaux sanguins grâce aux facteurs pro-angiogènes comme le *vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Robert & Thévenin, 2009).

## 1.2 Les différentes mutations et l'oncogénèse

L'oncogénèse regroupe l'ensemble des facteurs et des mécanismes à l'origine des cancers ou des tumeurs malignes. Toutes les caractéristiques citées précédemment sont acquises via plusieurs altérations génétiques accumulées. La façon la plus susceptible d'induire des altérations est l'apparition de lésions dans l'ADN lui-même. En effet à chaque division cellulaire, des lésions sont susceptibles d'apparaître. Il existe deux types de lésions spontanées, la désamination qui est la perte d'un groupement amine subit par l'adénine, la cytosine ou la guanine, et la dépurination (perte d'une base purinique) causé par la scission de la liaison d'une base purinique au désoxyribose, entraînant la formation d'un site apurinique (site AP) (Lucifora *et al.*, 2014). Il y a aussi des mésappariements causés par l'ADN polymérase lors de la réplication. La plupart du temps, cet enzyme ne fait pas d'erreur et les bonnes paires de bases sont associées ensemble. Cependant, la vitesse de réplication est tellement rapide que des erreurs peuvent apparaître. D'autres lésions peuvent aussi survenir en s'exposant à différentes

radiations environnementales comme les rayons ultra-violet (UV) ou des agents toxiques comme les éléments traces métalliques ou des agents alkylants (Lucifora *et al.*, 2014). L'exposition aux rayons UV du soleil sont à l'origine de presque tous les cancers cutanés chez l'Homme (Cancer, 2019).

De toutes les lésions que peut subir l'ADN d'une cellule, les bris double brin (DSB) sont les plus nocifs. Les DSB sont souvent causés par des molécules ionisées comme les formes réactives de l'oxygène (ROS) présentes en grande quantité dans l'organisme dû au métabolisme aérobie des systèmes biologiques. Les ROS peuvent oxyder des bases créant ainsi des sites AP (apurinique/aprimidique) ou carrément le bris des brins d'ADN. C'est l'effet recherché lors des radiothérapies du cancer, avec l'utilisation des rayons gammas. Ces cassures provoquent l'instabilité génomique entraînant la mort des cellules lorsqu'elles ne sont pas réparées.

### 1.3 Réparation de l'ADN et cancer

Malgré tous les systèmes de réparation de l'ADN, il arrive qu'ils ne soient pas suffisants et que les mutations s'accumulent, transformant la cellule saine en cellule cancéreuse. De plus les gènes codant pour les protéines de réparations de l'ADN peuvent subir des mutations et être inactivés, ce qui augmente l'instabilité génomique de la cellule et favorise l'oncogenèse. Mais si les défaillances des mécanismes de réparation de l'ADN représentent un facteur contribuant au développement d'un cancer, elles sont aussi un point faible pour la cellule, car en dehors des chirurgies, la méthode fréquemment utilisée lors de traitements des cancers est l'utilisation d'agents génotoxiques, comme les radiations ou encore la chimiothérapie. Les cellules cancéreuses répliquent leur ADN plus fréquemment que les autres cellules et plusieurs agents de chimiothérapies ciblent l'étape de réplication pour induire des lésions à l'ADN. Cette caractéristique permet à ces agents de mieux cibler les cellules

cancéreuses plutôt que les cellules saines. Les lésions provoquées à l'ADN sont un bon moyen de lutter contre les cellules cancéreuses car ces dernières y sont plus sensibles et qu'elles ont plus de difficultés à les réparer, de ce fait les cellules cancéreuses auront tendances à rentrer en apoptose. Mais cela signifie également que les cellules cancéreuses ayant gardés un bon système de réparation de l'ADN seront plus résistantes aux traitements (Jackson & Bartek, 2009).

#### 1.4 Voie de signalisation régulant la traduction des ARNm

La cellule est capable d'intégrer les signaux intra et extracellulaires afin de s'y adapter et de contrôler la synthèse protéique. Cette dernière étant le processus cellulaire le plus coûteux en énergie, il est important qu'il soit bien régulé. Ce contrôle est exercé par plusieurs voies de signalisation qui ciblent en grande partie l'initiation de la traduction. En condition favorable de croissance, l'assemblage du complexe protéique eIF4F, composé de plusieurs facteurs d'initiation dont eIF4E, eIF4G, eIF4A ou encore eIF4B, est stimulé et la synthèse protéique est enclenchée. Les protéines Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) se regroupent en trois classes (I, II et III). Cependant seule la kinase de classe I est capable de générer du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), indispensable à l'activation des voies de signalisation PI3K/mTOR et *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) (Falasca & Maffucci, 2012). Ces voies sont spécifiquement activées par les mitogènes, les facteurs de croissance, l'insuline ou encore les nutriments. Elles interviennent principalement dans la phase G1 du cycle cellulaire afin de permettre à la cellule de doubler son ADN génomique avant la mitose. En revanche, lorsque les nutriments et l'énergie manquent ou en condition de stress, ces voies sont bloquées et la synthèse protéique globale est inhibée afin d'assurer la survie de la cellule. Cette inhibition est possible en bloquant la formation du complexe ternaire composé de la sous-unité 60S du ribosome, de l'ARNm et d'un ARN transfert (Dreyer, Raymond, & Faivre, 2009).

### 1.4.1 La voie PI3K/mTor

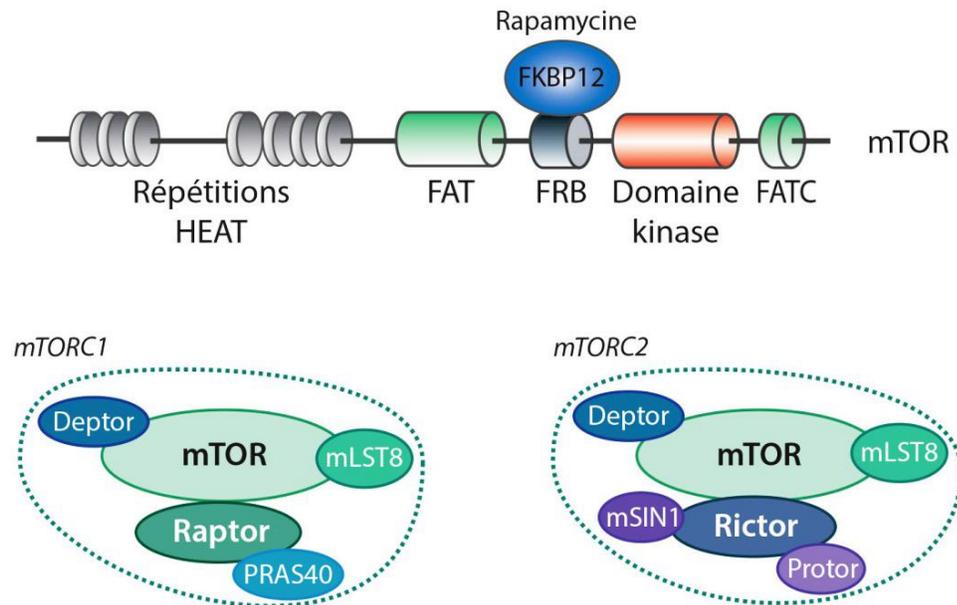
La protéine mTor est une protéine sérine/thréonine kinase de 290 kDa très conservée chez les eucaryotes et aucunes mutations génétiques ne sont connues à ce jour. Cette protéine appartient à la famille des *Phosphatidylinositol 3-Kinase-related Kinases* (PIKK). Elle a été découverte comme étant une cible de la rapamycine, une molécule aux propriétés antibiotiques produites par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina, Kudelski, & Sehgal, 1975). La rapamycine se lie au *FK506-Binding Protein of 12 kDa* (FKBP12), qui à son tour interagit avec le domaine *FKBP12-Rapamycin Binding* (FRB) de mTor afin de l'inhiber (Brown *et al.*, 1994). Par son action, la rapamycine inhibe tous les mécanismes cellulaires qui impliquent mTor, notamment la progression du cycle cellulaire, la prolifération et la survie cellulaire, l'angiogénèse ou encore la synthèse de protéines et de lipides. La protéine mTor est composée, en N-terminal des répétitions *Huntington, Elongation factor 3, protein phosphatase 2A, Tor1* (HEAT) impliquées dans les interactions protéines-protéines. Ces répétitions sont suivies d'un domaine *Focal Adhesion Targeting* (FAT) qui stabilise la conformation du site actif. A proximité du site FAT, se présente en premier le domaine FRB sur lequel vient se lier le complexe FKBP12-Rapamycine, vient ensuite le domaine catalytique sérine/thréonine kinase et un dernier domaine *FAT Carboxyl-terminal* (FATC) (Figure 1.2).

Les complexes protéiques TORC1 et TORC2 sont différents l'un de l'autre de par leur composition, leur fonction et aussi par leur mécanisme d'activation. Cependant ils partagent certaines similitudes; comme par exemple, ils possèdent le même domaine catalytique, mTor; et les mêmes protéines Deptor et Lst8. Le complexe protéique TORC1 étant responsable de la synthèse protéique, ses composants, ses mécanismes d'activation ainsi que ses fonctions sont décrits plus en détails dans les sections subséquentes.

#### 1.4.1.1 Composition du complexe mTORC1

Le complexe protéique TOR1 (TORC1) est composée du domaine kinase mTor, d'une protéine d'échafaudage, *Regulatory-Associated Protein of mTor* (Raptor), de *mammalian Lethal with SEC13 protein 8* (mLst8), de *Proline-rich AKT substrate 40 kDa* (PRAS40) et de *DEP-domain-containing mTor-interacting protein* (Deptor). Quant au complexe protéique TOR2, il est composé de *Rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor), *Protein Observed With Rictor* (Protor), *mammalian Stress-activated protein kinase interacting protein 1* (mSin1) (Yip, Murata, Walz, Sabatini, & Kang, 2010). Le complexe TOR2 (TORC2) contient également mLST8 et Deptor. Contrairement à mTORC2, mTORC1 est connu pour jouer des rôles critiques dans la croissance cellulaire en réponse aux nutriments. mTORC1 est aussi connu pour sa sensibilité à la rapamycine, ce qui n'est pas le cas pour mTORC2. Cependant plusieurs études montrent des résultats controversés quant à cette certitude. En effet, certaines fonctions de mTORC1 ne sont pas affectées par la rapamycine alors que mTORC2 serait sensible à un traitement prolongé à la rapamycine (Sarbasov *et al.*, 2006).

Raptor est une protéine de 150 kDa contenant plusieurs répétitions HEAT et des WD-40 qui sont impliqués dans les interactions protéines-protéines. Raptor se lie sur les répétitions HEAT situées dans la partie N-terminale de mTor. Raptor permet le recrutement de plusieurs substrats de mTORC1 dont le facteur d'initiation *4E Binding protein 1* (4EBP1) ou encore p70 S6 kinase grâce au motif *TOR-Signaling* (TOS) que contient ces substrats. Raptor est également impliquée dans le ciblage de mTORC1 aux lysosomes (Sarbasov *et al.*, 2006).



**Figure 1.2 : Organisation des complexes mTORC1 et mTORC2.** La partie N-terminale de la protéine mTor est composée de répétitions HEAT impliquées dans les interactions protéines-protéines. Les domaines FAT / FATC et FRB (ce dernier est reconnu par le complexe rapamycine/FKBP12) entourent le domaine kinase. mTor compose les deux complexes mTORC1 et mTORC2, respectivement définis par la présence de Raptor et Rictor. Figure adaptée de (Cargnello, 2014; Ma & Blenis, 2009).

mLst8 est une petite protéine d'environ 37 kDa associée au complexe mTOR. Elle contient sept répétitions du domaine WD-40 assurant les interactions protéines-protéines. Sa fonction au sein du complexe est encore floue mais certaines études utilisant des ARN interférents démontrent l'importance de mLst8 dans l'activation de mTORC1 alors que l'inactivation génétique par « Knock-out » n'affecterait pas les fonctions de mTORC1 *in vivo*. Cependant, d'après la structure cristalline de mTor-mLst8, mLst8 stabiliserait le domaine kinase mTor dans une position active (Yang *et al.*, 2013).

Pras40 est une protéine de 28 kDa uniquement présente dans mTORC1. Elle interagit avec Raptor en absence d'insuline ou de nutriments et permet la régulation négative de mTORC1. Pras40 est un substrat de la kinase Akt (connu aussi sous le terme PKB : Protein Kinase B) ; sa phosphorylation par Akt conduit à l'inhibition et à la dissociation de Pras40 de mTORC1, ce qui conduit à l'activation de ce dernier (Ma et Blenis, 2009).

Deptor est une protéine de 48 kDa présente dans les deux complexes. C'est un inhibiteur naturel de l'activité kinase de mTORC1, ce qui l'implique dans toutes les fonctions importantes dont mTORC1 est responsable. Mais Deptor n'est pas seulement un composé de mTORC1 et mTORC2 ; il a récemment été identifié comme étant associé à la chromatine mais aussi comme régulateur transcriptionnel sur l'activité du réticulum endoplasmique (Catena & Fanciulli, 2017).

#### 1.4.1.2 Mécanisme de régulation de mTORC1

De nombreux signaux cellulaires agissent sur le complexe mTORC1 comme les nutriments, l'oxygène, les facteurs de croissance ou encore les hormones. Ces signaux peuvent aller dans le même sens ou au contraire être opposés, ce qui permet la fine régulation de mTORC1. Par conséquent, la présence de suffisamment d'équivalents énergétiques dans la cellule stimule l'activité mTORC1, qui favorise ensuite la croissance cellulaire. En revanche, les facteurs inhibiteurs devraient signaler les informations contraires pendant le jeûne ou le stress cellulaire, à savoir le manque de ressources suffisantes nécessaires pour la croissance et la prolifération cellulaire, entraînant un blocage de l'activité de mTORC1. Trois voies de régulation de mTORC1 se distinguent ; celle des facteurs de croissances, celle des acides aminés et enfin celle des niveaux d'énergie et du stress cellulaire (Cargnello, 2014; (Yang et al., 2013).

##### 1.4.1.2.1 Régulation de mTORC1 par les facteurs de croissance

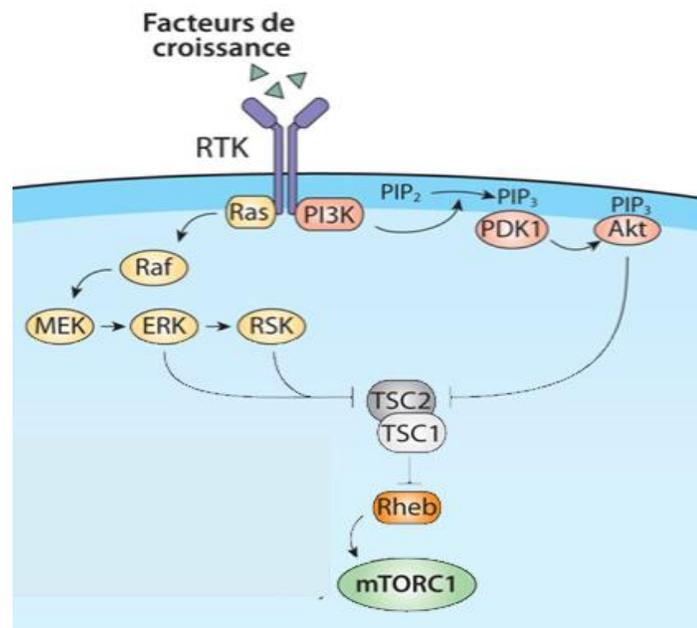
#### 1.4.1.2.1.1 PI3K/Akt

Les facteurs de croissances comme l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF) ou l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) sont des ligands qui se lient aux récepteurs à tyrosine-kinase, les RTK. Ces RTK sont des protéines transmembranaires et sont, par exemple, capable de lier une molécule dans le milieu extracellulaire et d'induire une réaction dans la cellule via leurs domaines intracellulaire (Dreyer *et al.*, 2009). La fixation d'un ligand sur un RTK permet le rapprochement d'un autre RTK, puis leur dimérisation survient. Cette dimérisation permet le recrutement de la protéine PI3K ainsi que son activation. PI3K phosphoryle le Phosphatidylinositol-(4,5) -biphosphate (PIP2) pour former le Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) ; cette réaction peut être bloquée par l'activité phosphatase du suppresseur de tumeur, la *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN). PIP3 participe au recrutement de la sérine/thréonine kinase Akt au niveau de la membrane où elle est phosphorylée par la *Phosphatidylinositol 3-Dependent Kinase 1* (PDK1) (Malek *et al.*, 2017).

Akt régule mTORC1 par deux mécanismes différents : par phosphorylation de la protéine Pras40 afin de réduire son interaction avec mTORC1 ou bien en phosphorylant la sous-unité TSC2 du complexe TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 1/2) (Dreyer *et al.*, 2009; Nascimento & Ouwens, 2009). Ce dernier est composé de la protéine d'échafaudage TSC1, appelée aussi harmatine, et de la protéine à activité GTPase-Activating Protein (GAP) TSC2, appelé aussi tubérine.

Ce complexe est un régulateur négatif de mTORC1, qui grâce à son activité GAP, bloque l'activité de la GTPase *Ras homolog enriched in brain* (Rheb) en hydrolysant le GTP, couplé à cette dernière, en GDP, le rendant inactif et par la même occasion mTORC1.

En présence d'une forte concentration de facteurs de croissance, le complexe TSC1/TSC2 est inhibé et Rheb, toujours couplé au GTP, interagit directement avec mTORC1 et l'active (Figure 1.3) (Nascimento & Ouwens, 2009).



**Figure 1.3 : Activation de mTORC1 par les acides aminés et les facteurs de croissance.** Les facteurs de croissance exercent leur contrôle positif sur mTORC1 en activant les voies PI3K/AKT et MAPK/RSK via la dimérisation des RTK. Plusieurs intervenants sont phosphorylés, comme PIP2 ou encore PDK1, ce qui permet l'inactivation du complexe TSC1/TSC2 qui ne peut plus exercer son contrôle négatif sur Rheb. Libre de toute inhibition, Rheb, la GTPase activatrice de mTORC1 stimule l'activité de mTORC1 (Cargnello, 2014; M. Cargnello, 2014; Laplante & Sabatini, 2012).

#### 1.4.1.2.1.2 Ras/MAPK

Les facteurs de croissance ont aussi la capacité d'activer la voie Ras/MAPK afin de stimuler l'activité de mTORC1. L'inactivation du gène suppresseur de tumeur, Neurofibromatosis-related protein 1 (NF1), est associée à une hyperactivité des

protéines Ras qui entraîne l'hyperactivation du complexe mTORC1 et participe à l'augmentation de la tumorigénèse (Johannessen *et al.*, 2008). Les protéines Ras activent plusieurs voies de signalisation comme celle de MAPK, qui consiste en l'activation en cascades des kinases Raf, MEK et aussi ERK (Figure 1.3) (Laplante & Sabatini, 2012). Les mécanismes de régulation de mTORC1 par la voie Ras/MAPK ne sont pas bien connus, cependant il est établi que les protéines ERK ainsi que RSK (p90 Ribosomal S6-Kinase), qui est, elle même activée par ERK, sont impliquée dans le contrôle de l'activité de mTORC1. Ces kinases phosphorylent TSC2 ce qui mène à l'inhibition du complexe TSC1/TSC2 et ainsi à l'activation de mTORC1. ERK et RSK régulent aussi l'activité de mTORC1 via la phosphorylation de Raptor. Enfin RSK1 phosphoryle Deptor qui sera reconnu par l'ubiquitine ligase E3  $\beta$ -Transducin repeat-Containing Protein ( $\beta$ TrCP) et dégradé par le protéasome. Cette dégradation a pour conséquence l'augmentation de l'activité de mTORC1 (Roux & Topisirovic, 2012).

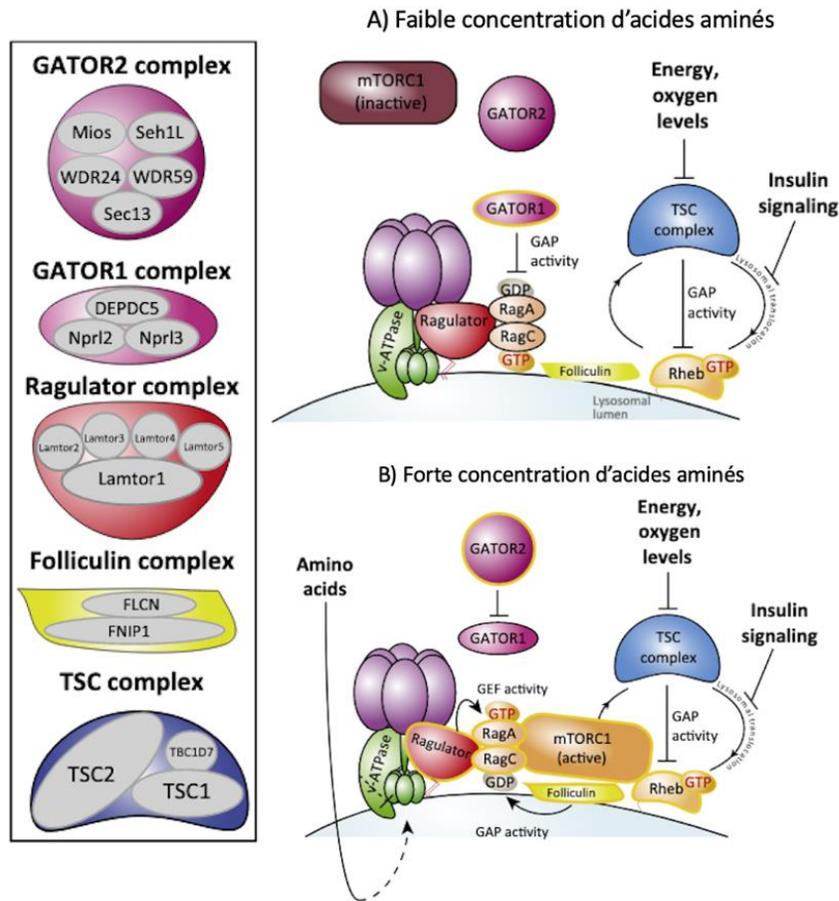
#### 1.4.1.2.2 Régulation de mTORC1 par les acides aminés

Les acides aminés, et plus spécifiquement ceux contenant une chaîne latérale ramifiée comme la leucine mais aussi l'arginine, sont essentiels dans l'activation de mTORC1 (Hara *et al.*, 1998; Nicklin *et al.*, 2009). Les mécanismes de détection et d'activation par mTORC1 ne sont pas tous connus. Cependant, certaines études montrent que la présence d'acides aminés dans une cellule entraîne la translocation de mTORC1 au niveau de la membrane du lysosome. Cette translocation de mTORC1 se fait grâce à plusieurs petites Rag GTPases (Ras-related GTP-binding protein) ; les Rag A, B, C et D (Bar-Peled & Sabatini, 2014). Ces protéines Rag agissent en complexe d'hétérodimère obligatoire, RagA/RagB interagissant avec RagC/RagD qui est très similaires, ce qui suggère que quatre paires indépendantes d'hétérodimères peuvent se former. Sous forme active (RagA/RagB<sup>GTP</sup> / RagC/RagD<sup>GDP</sup>) interagissent avec Ragulator et induisent le recrutement de mTORC1 à la surface du lysosome. Le but des

acides aminés dans cette voie est donc d'induire la translocation de mTORC1 au niveau de la membrane lysosomale où mTORC1 interagit avec la GTPase Rheb, étant donné qu'elle s'y trouve déjà (Figure 1.4) (Bar-Peled & Sabatini, 2014).

Chez la levure, TORC1 est localisée à la vacuole et la façon dont les acides aminés activent TORC1 reste encore très peu connue. Cependant il est connu qu'il y a seulement deux homologues de Rag, GTR1 l'équivalent de RagA/RagB lié au GTR2, l'équivalent de RagC/RagD. L'homologue fonctionnel de Ragulator chez la levure est sûrement le complexe hétérodimérique EGO3 qui se trouve à la surface de la vacuole (Saxton & Sabatini, 2017).

L'activité des protéines Rag est contrôlée par Ragulator et Gator, deux complexes protéiques qui ont respectivement, une activité *Guanine Exchange Factor* (GEF) et une activité GAP envers les Rag. En présence d'acides aminés, le complexe Ragulator active les protéines Rag via son activité GEF, transformant ainsi le GDP en GTP. Ragulator interviendrait aussi dans la détection des acides aminés dans la lumière lysosomale (Figure 1.4). De plus, la protéine d'échafaudage p62 est capable d'interagir avec Raptor, du complexe mTORC1, et les protéines Rag, ce qui contribue à la translocation de mTORC1 à la membrane lysosomale (Duran *et al.*, 2011). Enfin l'absence ou l'épuisement d'acides aminés, entraîne l'inactivation de mTORC1 grâce au recrutement du complexe TSC1/TSC2 à la membrane lysosomale par les protéines Rag. La présence du complexe TSC1/TSC2 conduit à l'inhibition de Rheb et par la suite celle de mTORC1 (Bar-Peled & Sabatini, 2014).



**Figure 1.4 : Activation du complexe mTORC1 par les acides aminés.** Lorsque la concentration d'acides aminés est faible, le Ragulator est dans un état d'inhibition lié à la v-ATPase. GATOR1 exerce son activité Gap sur RagA gardant cette GTPase lié au GDP et donc inactive. La signalisation de l'insuline empêche le complexe TSC de se rendre au lysosome pour inhiber Rheb, qui reste donc inhibée. En présence d'une forte concentration d'acides aminés, GATOR2 inhibe GATOR1, le Ragulator ainsi que la v-ATPase change de conformation afin que l'activité GEF du Ragulator puisse s'exercer sur RagA. En même temps, le complexe de folliculine favorise l'hydrolyse du GTP de RagC. L'hétérodimère RagA/RagC maintenant actif est capable de recruter mTORC1 à la surface du lysosome, où il est activé par Rheb (Bar-Peled & Sabatini, 2014).

#### 1.4.1.2.3 Régulation de mTORC1 par le stress cellulaire et les niveaux d'énergie

En plus des acides aminés et des facteurs de croissances, l'activité du complexe mTORC1 est influencée par les niveaux de glucose et d'oxygène dans la cellule. Une baisse en énergie (hypoglycémie ou hyperactivité menant à un excès de consommation d'énergie) ou en oxygène (hypoxie) entraîne l'activation de la kinase *AMP-activated protein kinase* (AMPK), véritable capteur du statut énergétique de la cellule. En réponse à la baisse énergétique, l'AMPK phosphoryle TSC2 conduisant à son activation et donc à l'inhibition de Rheb par la même occasion, ce qui réduit l'activité de mTORC1. De plus l'AMPK peut réduire l'activité de mTORC1 en phosphorylant directement Raptor (Laplante & Sabatini, 2009). En réponse à une légère baisse d'oxygène, entraînant ainsi une baisse des niveaux d'ATP, l'AMPK active de TSC1/TSC2 et réduit l'activité de mTORC1 comme décrit précédemment. L'hypoxie peut aussi activer TSC1/TSC2 par un mécanisme faisant intervenir la protéine *Regulated in Development and DNA Damage response 1* (REDD1). En effet, la régulation transcriptionnelle de REDD1 augmente, ce qui va lui permettre de se lier aux protéines 14-3-3 qui ne peuvent plus interagir avec TSC2. Toutes ces données placent les voies mTORC1/AMPK au cœur de la régulation énergétique intracellulaire et du contrôle de la prolifération des cellules.

#### 1.4.2 mTORC1 contrôle la traduction des ARNm

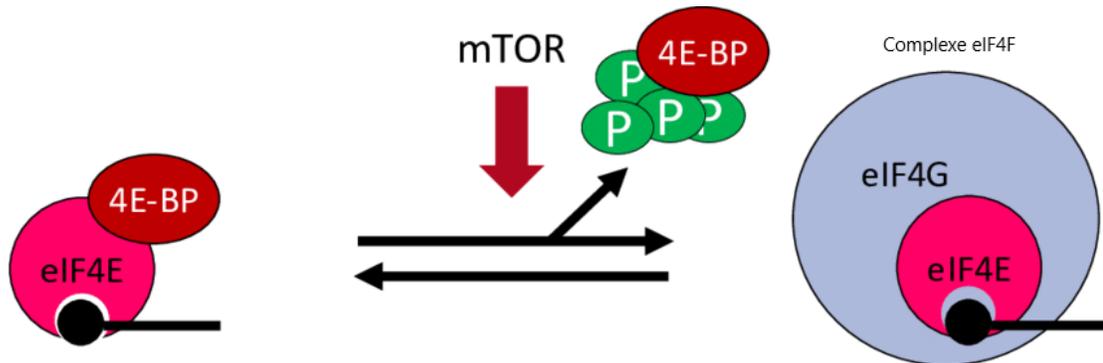
Grâce aux signaux produits par les nutriments, les facteurs de croissances mais aussi d'autres molécules qui entrent dans la cellule, mTORC1 contrôle la synthèse protéique et plus particulièrement l'étape d'initiation de la traduction. Ce contrôle s'exerce par des phosphorylations et déphosphorylations directes ou non des composantes de la machinerie traductionnelle. Les deux substrats les mieux caractérisés et les plus ciblés sont les protéines *eIF4E-Binding Protein* (4E-BP) et les sérine/thréonine kinases S6K (Ma & Blenis, 2009; Roux & Topisirovic, 2012).

#### 1.4.2.1 Les 4E-BP

La traduction, étape incontournable dans la production des protéines, est régulée par eIF4E, un facteur d'initiation de la traduction, recruté au niveau de la coiffe des ARNm, qui est directement assuré par mTORC1. Les protéines 4E-BP (4E-BP1, 2 et 3) sont des protéines de faible poids moléculaire, qui ont pour fonction d'inhiber la traduction en empêchant l'assemblage du complexe eIF4F à la coiffe des ARNm (Qin, Jiang, & Zhang, 2016). Les 4E-BP hypophosphorylés s'associent avec une forte affinité à eIF4E, bloquant son interaction avec eIF4G et par la même occasion, la formation du complexe eIF4F (Figure 1.5).

Sept sites de phosphorylations de 4E-BP1 par mTORC1 ont été identifiés chez l'Homme ; Thr37, Thr46, Ser65, Thr70, Ser83, Ser101 et Ser112. Chez la levure et chez toutes les autres espèces, les cinq premiers résidus sont conservés phylogénétiquement. mTORC1 commence par la phosphorylation des résidus Thr37 et Thr46, suivit de Thr70 et enfin, vient la phosphorylation de Ser65. La phosphorylation de ces quatre sites mène à la dissociation d'eIF4E des 4E-BP, où il peut intervenir dans la formation du complexe eIF4F et dans le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S afin d'initier la traduction (Qin, Jiang, & Zhang, 2016). En régulant l'activité traductionnelle d'eIF4E, les 4E-BP contrôlent l'expression des protéines impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire (Petroulakis *et al.*, 2009).

Ainsi, il a été proposé que mTORC1 stimule la prolifération cellulaire via l'inactivation des 4E-BP tandis que le contrôle de la croissance cellulaire est effectué par les S6K (Dowling *et al.*, 2010). Les 4E-BP sont donc les effecteurs principaux de mTORC1 dans le contrôle de la traduction des ARNm (Figure 1.5).



**Figure 1.5 : Régulation de la formation du complexe eIF4F par 4E-BP.** Le facteur d'initiation eIF4E est lié à 4E-BP ce qui l'empêche de s'associer à eIF4G. La voie mTOR permet la phosphorylation de 4E-BP et la libération de eIF4E qui est alors libre de s'associer à eIF4G et ainsi former le complexe eIF4F (Chassé, 2015).

#### 1.4.2.2 Les S6K

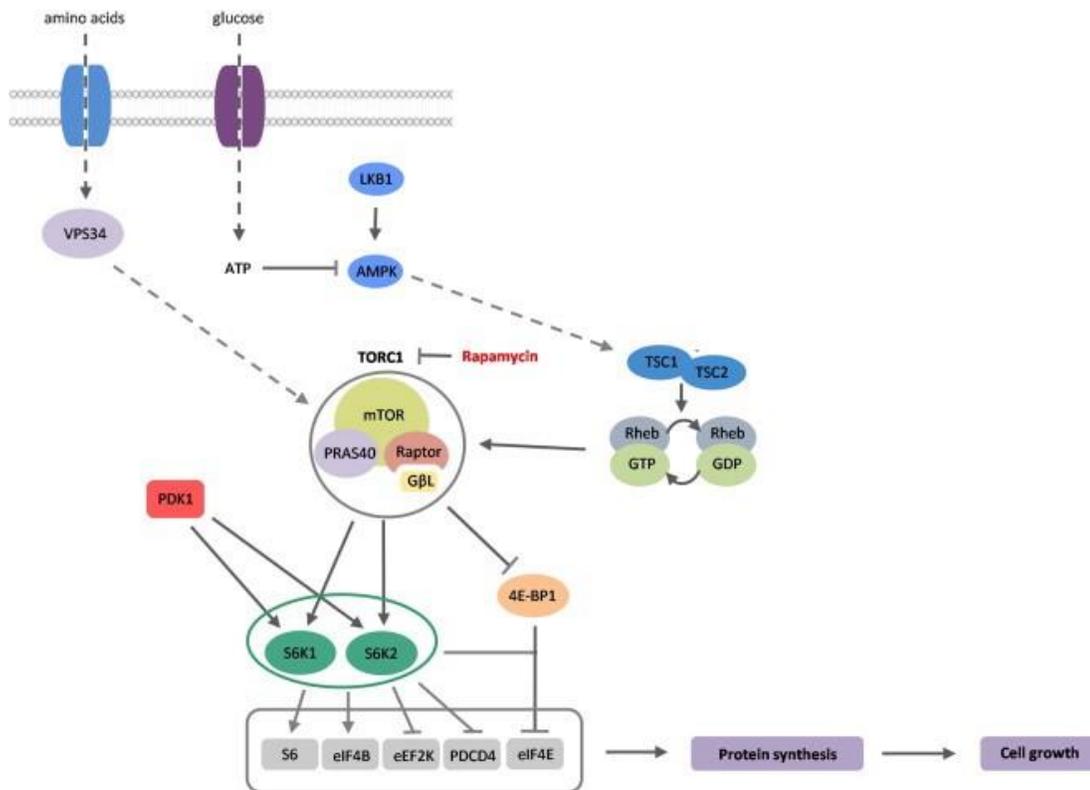
En plus des 4E-BP, mTORC1 active les protéines S6K, au nombre de deux chez les mammifères (S6K1, S6K2), impliquées elles aussi dans la traduction des ARNm (Figure 1.6) (Ma & Blenis, 2009). Les S6K sont des protéines de la famille des kinases AGC et sont activées par PDK1 et mTORC1. Ces derniers phosphorylent, respectivement, dans la boucle d'activation le résidu Thr329, et dans le motif hydrophobique le résidu Thr389 pour la protéine p70S6K1 chez l'Homme (Magnuson, Ekim, & Fingar, 2012).

De nombreux substrats de S6K ont été identifiés dont la protéine ribosomique S6 de la sous-unité 40S du ribosome (BANERJEE et al., 1990), le facteur d'initiation eIF4B, la protéine *Programmed Cell Death 4* (PDCD4), la protéine *S6K Aly/Ref-like substrate* (SKAR) (Ma & Blenis, 2009) et enfin la kinase *Eukaryotic elongation Factor-2 kinase* (eEF2K) (Figure 1.6). Ces substrats de S6K sont impliqués dans l'étape d'initiation de la traduction ainsi que dans d'autres processus cellulaires comme la transcription ou encore la synthèse protéique/lipidique. Ces mêmes substrats participent aussi l'homéostasie du glucose, la sensibilité à l'insuline, suggérant que l'axe de

signalisation mTORC1/S6K est important mais peut être aussi une cible thérapeutique pour le traitement de plusieurs pathologies (Magnuson *et al.*, 2012).

Les protéines S6K régulent de deux façons la traduction via leur influence sur l'activité de l'hélicase eIF4A ; la première en inhibant la protéine PDCD4 et ensuite en stimulant l'activité d'eIF4B. PDCD4 est un suppresseur de tumeur qui se lie à eIF4A, ce qui bloque la formation du complexe eIF4F. Les protéines S6K phosphorylent le résidu Ser67 de PDCD4 et entraîne sa dégradation par le protéasome et à l'activation d'eIF4A. eIF4B est le cofacteur d'eIF4A et sa fonction est d'augmenter l'affinité d'eIF4A avec l'ATP. Étant une ARN hélicase, eIF4A favorise le déroulement des structures secondaire au niveau de la région 5'UTR des ARNm, pendant l'initiation de la traduction. Les protéines S6K phosphorylent le résidu Ser422 d'eIF4B et induisent son recrutement au complexe d'initiation où il stimule eIF4A (Dorrello *et al.*, 2006).

La kinase eEF2K est responsable de la phosphorylation et l'inactivation du facteur d'élongation eEF2. S6K phosphoryle eEF2K la rendant inactive. Le facteur d'élongation eEF2, maintenant libre et donc actif, catalyse la translocation des ARNm et ARNt lors de la traduction (Wang *et al.*, 2001). S6K influence aussi SKAR, un autre substrat impliqué dans la régulation de la traduction. En effet SKAR se trouve spécifiquement aux jonctions exon/exon des ARNm nouvellement formés et permet le recrutement de S6K1 et de mTORC1 sur ces nouveaux ARNm. S6K phosphoryle les résidus Ser 383 et 385 de SKAR, stimulant ainsi le début de la traduction des ARNm (Ma, Yoon, Richardson, Julich, & Blenis, 2008). Enfin S6K phosphoryle la protéine ribosomique S6 sur les résidus Ser 235, 236, 240 et 241, (Bandi, Ferrari, Krieg, Meyer, & Thomas, 1993) cependant toute les conséquences de toutes ces phosphorylations sur la fonction de S6 ainsi que sur la traduction ne sont pas bien définies (O. Meyuhas, 2008; Oded Meyuhas & Drazzen, 2009).



**Figure 1.6 : Voie de signalisation mTOR/S6K.** L'entrée des acides aminés dans la cellule active TORC1 via la protéine VPS34. Le métabolisme du glucose entraîne l'augmentation de l'ATP qui inhibe l'AMPK et active aussi TORC1. PDK1 et TORC1 active à leurs tours S6K1 et S6K2. Ces derniers peuvent alors activer S6 et eIF4B et inhiber eEF2K, PDC4 et eIF4E qui vont induire la synthèse protéique et de la croissance cellulaire (Tavares et al., 2015).

## 1.5 mTOR : Cible thérapeutique dans le traitement de cancers

### 1.5.1 Activation de mTORC1 dans les cancers

Étant donné l'importance que joue le complexe mTORC1 dans la croissance et la prolifération cellulaire, mTORC1 est souvent la cible thérapeutique dans le traitement des cancers (Dreyer *et al.*, 2009). Toutes les cellules cancéreuses ont tendances à déconnecter la perception des différents signaux prolifératifs par la cellule. Cette déconnection, dû à plusieurs mutations dans le génome, mène souvent à l'activation

inadéquate de mTORC1. Il se trouve en aval des voies Ras/ERK et PI3K/Akt qui sont toutes les deux des voies pro-prolifératrice (Dreyer *et al.*, 2009). L'activation oncogénique est assurée par des mutations activatrices d'oncogènes (Ras, Raf, Akt, PI3K) ainsi que par celles inhibitrices des gènes suppresseurs de tumeurs (PTEN, TSC). Ces mutations sont présentes dans la plupart des cancers (Menon & Manning, 2008). Donc indépendamment des signaux et facteurs de croissances que les cellules captent, toutes ces mutations conduisent à l'hyperactivation du complexe mTORC1, entraînant la stimulation des processus anaboliques nécessaires à la croissance et à la prolifération des cellules cancéreuses. L'importance de mTORC1 dans le développement des cellules cancéreuses est aujourd'hui bien reconnue et de nombreuses recherches sont effectuées afin de mieux comprendre ses différentes fonctions et ainsi développer de nouvelles méthodes thérapeutiques ciblant ce complexe.

### 1.5.2 La rapamycine et ces analogues

Comme vu précédemment, mTORC1 se retrouve hyperactivé dans beaucoup de cancers et participe donc à la prolifération des cellules cancéreuses. Pour contrer cette hyperactivité, des molécules ciblant spécifiquement mTORC1 comme la rapamycine, sont utilisées pour freiner la progression tumorale et représentent des thérapies anticancéreuses. Étant donné que la solubilité et la cinétique de la rapamycine ne sont pas optimales, des analogues de celle-ci, appelés rapalogues, ont été développés. Deux d'entre eux, le temsirolimus et l'everolimus ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement du carcinome rénal métastatique. Plusieurs autres rapalogues sont testés dans d'autres cancers comme l'ostéosarcome, le cancer de l'estomac ou encore le cancer colorectal (Wander, Hennessy, & Slingerland, 2011). Cependant les rapalogues ont des effets modestes dans les tumeurs du fait de leur effet cytostatique plutôt que cytotoxique. Ces effets modestes peuvent s'expliquer par le fait que les rapalogues n'inhibent pas complètement l'activité de mTORC1. En effet, la

synthèse protéique par les 4E-BP, impliqués dans la tumorigénèse, n'est pas affectée (Wander *et al.*, 2011). De plus, les nombreux rétrocontrôles négatifs que mTORC1 contrôle, inhibent RTK (Receptor Tyrosine Kinase) en aval des voies PI3K/Akt et Ras/ERK expliquent pourquoi les rapalogues ne sont pas aussi efficaces. Enfin les rapalogues, en se fixant sur leur récepteur FKBP12 n'inhibent pas mTORC2, ce qui contribue à l'activation de la kinase Akt et donc au développement des tumeurs (Wander *et al.*, 2011).

Pour contrecarrer ces limitations, des méthodes alternatives ont été développées ces dernières années et ont abouties à la mise au point de nouveaux inhibiteurs de mTORC1, qui ciblent principalement le domaine kinase, ce qui bloquent mTORC1 et surtout mTORC2. De plus, ces inhibiteurs compétitifs de l'ATP, appelés aussi les TOR-KI, sont capables d'inhiber PI3K étant donné la relative similarité des domaines kinases de mTORC1 et PI3K. Ces molécules ont la capacité d'inhiber mTORC2 mais ils bloquent mTORC1, plus précisément la phosphorylation des 4E-BP, avec une plus grande efficacité que les rapalogues (Benjamin, Colombi, Moroni, & Hall, 2011; Thoreen *et al.*, 2009; Wander *et al.*, 2011). Des données précliniques indiquent que ces inhibiteurs catalytiques de mTOR préviennent la croissance et la prolifération cellulaire *in vitro* et le développement des tumeurs *in vivo* avec une efficacité significative par rapport à la rapamycine et ces analogues (Falcon *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2010). Plusieurs protocoles d'essais cliniques sont en cours en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents anti-tumoraux pour plusieurs types de cancers dont le cancer du sein, de l'endomètre et des tumeurs solides ayant un stade avancé (García-Martínez *et al.*, 2009). L'efficacité de ces inhibiteurs n'est pas encore établie cependant ces inhibiteurs de mTOR ont des bénéfices plus importants que les rapalogues et ont un réel potentiel dans les traitements futurs du cancer (Benjamin *et al.*, 2011).

## 1.6 Modèle d'étude : *Saccharomyces cerevisiae*

La levure est un modèle d'étude fréquemment utilisé dans les laboratoires de recherche car elle est facile à cultiver, elle croît sur des géloses et en milieu liquide et sa culture est peu coûteuse. De plus c'est un micro-organisme non pathogène et son temps de duplication est rapide. C'est aussi un micro-organisme dont le génome est entièrement séquencé, facilement modifiable et de petite taille. Plusieurs protéines dont des transporteurs ont déjà été caractérisées. Par exemple, il a récemment été démontré que l'accumulation du peptide NaD1 (*Nicotiana glauca* Defensin 1), connu pour permettre la perméabilité de la membrane cytoplasmique et la production de ROS, était contrôlé par la protéine membranaire AGP2 (General amino acid permease) et l'ajout de la spermidine (SPD) dans le milieu de culture (Bleackley *et al.*, 2014).

## 1.7 Les polyamines

Les polyamines ont été découvertes au XVII<sup>ème</sup> siècle dans le liquide séminal humain, mais ce n'est qu'autour des années 1920 que leurs structures ont été établies (Minois *et al.*, 2011). Ce sont des molécules chargées positivement présentes chez tous les eucaryotes et beaucoup de procaryotes. Du fait de leur charge positive, elles peuvent interagir avec des molécules chargées négativement comme l'ADN, l'ARN et les protéines. Les polyamines sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires, par exemple dans la modulation de la chromatine, la transcription des gènes, la stabilisation de l'ADN, la croissance, la survie ou encore la prolifération cellulaire (Casero, Murray Stewart, & Pegg, 2018; Minois, Carmona-Gutierrez, & Madeo, 2011).

### 1.7.1 Biosynthèse des polyamines

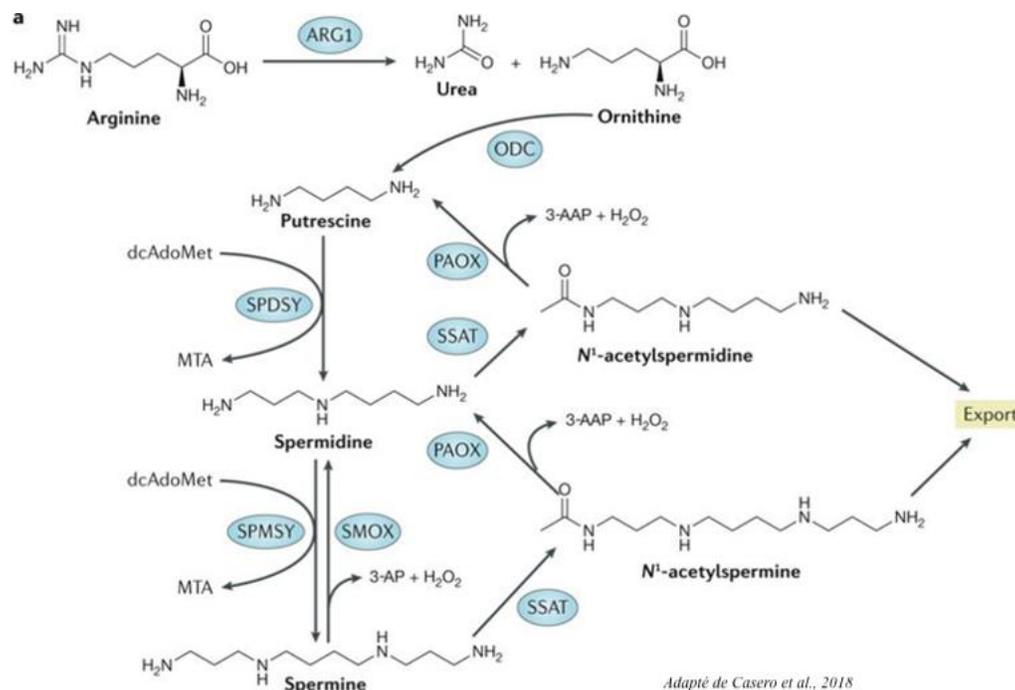
Les polyamines les plus connues sont la putrescine, la spermidine et la spermine. Elles sont toutes formées à partir de l'arginine et une fois présentes dans les cellules,

chacune des polyamines peut être un précurseur dans la synthèse des autres polyamines (Figure 1.7) (Minois *et al.*, 2011). En effet, à partir de l'arginine, la putrescine est d'abord formée. Celle-ci devient un précurseur pour la formation de la spermidine puis de la spermine grâce à l'intervention des enzymes spermidine/spermine synthétase. L'inverse de cette réaction se fait grâce aux polyamines oxydases (PAOX) et à la spermidine-spermine acétyltransférase (SSAT) afin de reformer de la putrescine. Les concentrations des polyamines sont extrêmement bien régulées et une perturbation dans leur régulation, comme un arrêt de production ou une absence de polyamines, amène la cellule à un état cytotatique, l'empêchant de se diviser. À l'inverse, une augmentation de leur production, comme c'est le cas dans la plupart des cellules cancéreuses, incite à la prolifération (Casero *et al.*, 2018).

#### 1.7.1.1 Putrescine, spermidine et spermine

La putrescine est issue de deux molécules; l'agmatine et l'ornithine. Cette polyamine a été identifiée à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. C'est la première polyamine à être produite par la cellule. Elle devient donc le précurseur pour la formation de la spermidine.

La spermidine est produite à partir de la putrescine grâce à l'action de la spermidine synthase. Elle a la capacité de se lier à l'ADN, aux ARN et à certaines protéines membranaires, faisant d'elle un régulateur de transcription et de l'activité de certaines kinases et canaux ioniques. Elle partage ces fonctions avec les autres polyamines mais elle reste la seule qui permet la production de l'hypusine, une modification post-traductionnelle du facteur d'élongation eIF5A nécessaire pour qu'eIF5A puisse fonctionner convenablement dans la synthèse protéique (Pegg, 2014). La spermidine est essentielle au développement embryonnaire de la souris et contribue à la protection des cellules en captant les radicaux libres (Pendeville *et al.*, 2001).



**Figure 1.7 : Voie de synthèse des polyamines.** L'ornithine est produite à partir de l'arginine grâce à l'action de l'arginase 1 (ARG1). L'ornithine décarboxylase (ODC) produit à son tour de la putrescine; c'est une étape limitante dans la biosynthèse des polyamines. La S- adénosylméthionine décarboxylée (dcAdoMet) donne d'aminopropyle à la spermidine synthase (SPDSY) et à la spermine synthase (SPMSY) pour la synthèse de la spermidine et la spermine. La spermidine peut être reformée à partir de la spermine grâce à la spermine oxydase (SMOX). En parallèle, la spermidine/spermine N-acétyltransférase 1 (SSAT) et la polyamine oxydase (PAOX) permettent elles aussi la production de la spermidine/putrescine à partir de la spermine/spermidine (Casero *et al.*, 2018).

La spermine a été découverte en 1678 dans le sperme et d'autres fluides corporels. C'est dans les années 1960 que ces fonctions biochimiques ont été caractérisées. Comme vu précédemment, elle est produite à partir de la spermidine (Wallace, 2009). C'est la polyamine la plus abondante dans la prostate de l'homme. Une diminution de spermine dans les cellules, du fait de la mutation du gène codant pour la spermine synthase, n'affecte pas la croissance ou la morphologie des cellules mais elle les rend plus sensibles aux inhibiteurs produisant la putrescine et la spermidine, aux agents

antiprolifératifs ainsi qu'aux UV. La spermine étant la polyamine ayant une plus grande affinité pour l'ADN, elle lui sert d'agent de protection (Korhonen et al., 2001; Simoneau, Gerner, Phung, McLaren, & Meyskens, 2001). Les souris présentant une délétion de la spermine synthase ont une faible masse corporelle, sont stériles et ont plus de risques de mort subite. Chez l'homme, l'absence de cette enzyme entraîne le syndrome de Snyder-Robinson, une maladie présentant des symptômes graves dont le retard mental, une faible masse musculaire, l'ostéoporose et une asymétrie faciale (Peron *et al.*, 2013).

#### 1.7.1.2 NaD1

La défensine végétale antifongique, NaD1, produite par la fleur de la plante de tabac d'ornement appelée *Nicotiana glauca*, joue un rôle important dans la protection de la plante contre les dommages causés par les champignons (Lay *et al.*, 2012). Cette défensine a été utilisée pour traiter des cellules tumorales et les résultats démontrent la capacité de ce peptide à induire leur mort cellulaire. Sous sa forme de monomère, NaD1 ne montre qu'une très faible activité antifongique mais en solution, ce peptide forme un dimère qui constitue sa forme active (Lay *et al.*, 2012). NaD1 est une molécule chargée positivement et son mode d'action sur les cellules tumorales se fait via son interaction avec PIP2 au niveau de la membrane plasmique, ce qui perturbe cette dernière et entraîne sa lyse (Baxter, Poon, & Hulett, 2017). Il a aussi été démontré, chez *S. cerevisiae*, que l'accumulation de NaD1 pouvait être contrée par la délétion de la protéine membranaire AGP2, mais aussi en ajoutant de la spermidine (SPD) dans le milieu (Bleackley *et al.*, 2014).

#### 1.7.2 Transport des polyamines

Si les cellules peuvent produire les polyamines dont elles ont besoin, elles peuvent aussi en avoir du milieu extérieur, impliquant des transporteurs membranaires. Dans les cellules mammifères, les gènes de la famille des *Solute Carrier Transporter* (SLC22) codant pour les *Organic Cation Transporters* (OCT) sont impliqués dans le transport

de polyamines (Abdulhussein & Wallace, 2014). Chez les bactéries, trois systèmes de transports de polyamines sont caractérisés, avec un système d'absorption spécifique à la putrescine, la polyamine qu'elle importe le plus, et un autre préférentiel à la spermidine, tous deux dépendant de l'ATP pour fonctionner (Kazuei Igarashi & Kashiwagi, 1999). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Sam3 et Dur3 sont les principaux transporteurs de polyamines. Cependant il a été démontré que Sam3 et Dur3 sont contrôlés par la protéine Agp2 (Kazuei Igarashi & Kashiwagi, 1999). L'excès de polyamine est exporté de la cellule par les *Polyamine transporter* (TPO). Les TPO 1 à 4 sont situées dans la membrane plasmique et dans la vacuole. Les TPO 2 et 3 sont spécifiques au transport de la spermine alors que les TPO1 et TPO4 ne semblent faire aucune exception dans le transport des trois principales polyamines (Uemura, Tachihara, Tomitori, Kashiwagi, & Igarashi, 2005).

#### 1.7.2.1 AGP2

Agp2 est une protéine de la membrane plasmique faisant partie de la famille des perméases d'acides aminés de la levure (*YAP : Yeast Amino acid Permeases*). Le point commun entre les polyamines et NaD1 est qu'elles sont toutes chargées positivement. Un groupe d'environ 20 gènes codent pour les protéines YAP. Ce sont des protéines contenant 12 domaines transmembranaires dont Agp1, Gap1, Gln1, Put4, Bap2, Tat2 qui ont toutes des affinités et caractéristiques variables (Schreve & Garrett, 2004). Certaines de ces protéines transportent un seul acide aminé alors que d'autres en transportent plusieurs, chargés ou pas (Andre, 1995; Regenber, Düring-Olsen, Kielland-Brandt, & Holmberg, 1999).

En rapport avec l'activation de mTORC1, Gap1 est une protéine qui agit comme transporteur d'acides aminés en plus d'être un senseur d'acides aminés dans le milieu extracellulaire, qui permet la régulation de la PKA (Donaton *et al.*, 2003). Agp2 est également régulée par une autre protéine membranaire, Sho1, en réponse à

l'augmentation de l'osmolarité. En plus de son implication dans le transport d'acide aminé, la protéine Agp2, d'une taille d'environ 67,2 kDa, est responsable de l'absorption de la carnitine, impliqué dans le métabolisme de l'acétyl-CoA. Agp2 est importante dans le transport des polyamines, de NaD1 et d'agents anti-cancéreux comme la bléomycine. Toutefois, Agp2 est un transporteur de faible affinité et est faiblement exprimé (Schreve & Garrett, 2004). Donc il existe d'autres transporteurs de haute affinité pour les acides aminés. L'absence du gène *AGP2* dans les levures (souche délété de *AGP2*) entraîne la résistance de celles-ci à NaD1 dû à la diminution de son absorption. La résistance des souches *agp2Δ*, à NaD1 et à d'autres peptides antifongiques cationiques, est due à l'augmentation des charges positives des molécules chargées positivement, à la surface de la membrane cellulaire (Bleackley *et al.*, 2014). Ces charges positives repoussent les peptides antifongiques cationiques et s'accompagnent d'une diminution de NaD1. De plus, des études menées avec une délétion du gène *AGP2* démontrent que plusieurs gènes, dont la plupart codent pour des transporteurs membranaires, sont régulés à la baisse. Le mutant *agp2Δ* présente plusieurs transporteurs sous exprimés dont Sam3 et Dur3. Leur suppression simultanée entraîne une résistance aux polyamines et à la bléomycine. La détection de polyamines ou bléomycine par Agp2 induirait l'expression de Sam3 et Dur3, responsable de leur absorption (Uemura, Kashiwagi, & Igarashi, 2007).

#### 1.7.2.2 Sam3

La protéine responsable de l'absorption S-adénosylméthionine (AdoMet), Sam3, a été identifiée vers la fin du 20<sup>e</sup> siècle grâce aux souches mutantes de levures incapables d'absorber l'AdoMet. Sam3 est une protéine de la famille des YAP contenant 12 domaines transmembranaires (Spence, 1971). Comme vu précédemment, l'AdoMet est un précurseur impliqué dans la synthèse de la spermidine et de la spermine. Sam3 ne transporte pas seulement l'AdoMet mais aussi la putrescine ainsi que la spermidine, faisant d'elle une protéine importante dans la quantité disponible de polyamines (K. Igarashi & Kashiwagi, 2010; Uemura *et al.*, 2007). De plus, Sam3 serait le transporteur

préférentiel des polyamines car certains acides aminés sont capables de perturber ce transport. Même si Agp2 ne présente qu'une affinité moindre pour le transport des polyamines, l'absorption de ces dernières dépend du bon fonctionnement d'Agp2 sans quoi Sam3 ne serait même pas exprimé (Aouida, Rubio-Teixeira, Thevelein, Poulin, & Ramotar, 2013; Uemura et al., 2007).

### 1.7.2.3 Dur3

Tout comme Sam3, Dur3 est une autre YAP qui possède non pas 12, mais 16 domaines transmembranaires. C'est une protéine d'environ 80 kDa impliquée dans le transport de l'urée et des polyamines chez la levure (Elberry, Majumdar, Cunningham, Sumrada, & Cooper, 1993) Ces homologues dans les autres espèces, comme CsNIP2 chez *Cucumis sativus* (concombre) ou encore chez *A. thaliana*, jouent également le même rôle de transporteur de l'urée comme source d'azote (Crespo-Sempere, Estiarte, Marín, Sanchis, & Ramos, 2015; Zhang, Yan, Vatamaniuk, & Du, 2016). Sam3 et Dur3 représentent la principale voie d'absorption des polyamines mais contrairement à Sam3, Dur3 n'est pas inhibée par la présence d'acides aminés, ce qui suggère une plus grande spécificité de Dur3 pour les polyamines. Mais Dur3 est aussi dépendante d'Agp2. En plus de son rôle de transporteur de polyamines, Dur3 est aussi impliquée dans le transport de bore dans les levures (Nozawa, Takano, Kobayashi, von Wirén, & Fujiwara, 2006).

### 1.7.3 Les polyamines et le cancer

Comme vu précédemment, les polyamines occupent une place importante dans la croissance et le développement des cellules. Leur capacité à se lier à diverses macromolécules comme l'ADN, les ARN et les protéines font des polyamines des cations essentiels. Dans des conditions physiologiques normales, les polyamines sont régulées de manière assidue par diverses enzymes et protéines faisant partie d'un transport encore mal caractérisé. Il est fréquemment observé que le métabolisme des

polyamines est dérégulé dans les tumeurs. Une augmentation du niveau de polyamines a été associée à plusieurs cancers dont le cancer du sein, du côlon, du poumon ou encore de la prostate. La voie des polyamines constitue donc une cible potentielle pour la chimiothérapie (Nowotarski, Woster, & Casero, 2013).

Il est connu que l'ornithine décarboxylase (ODC), première enzyme dans la voie de synthèse des polyamines, est la cible de la difluorométhylornithine (DFMO) qui l'inhibe complètement de manière irréversible. Cependant, cette inhibition entraîne une induction de l'AdoMet et une accumulation de dcAdoMet (S-adénosylméthionine décarboxylée). Dans ces conditions, la production de spermine continue. De plus, grâce à la spermine présente dans le milieu extracellulaire, les pools de putrescine et spermidine peuvent être reformés via la rétro-conversion oxydative des polyamines (Seiler & Moulinoux, 1996). Dans les cancers, il se trouve que l'ODC est fortement surexprimée, augmentant ainsi les taux de polyamines dans les cellules cancéreuses.

Plusieurs enzymes cataboliques de polyamines ont été liées à la cancérogénèse. C'est le cas de la spermine oxydase (SMOX) qui a une expression accrue dans les cancers avec inflammation, comme dans le cancer de l'estomac causé par la bactérie *Helicobacter pylori*. Il a été démontré que les cellules épithéliales infectées par *H. pylori* ont une augmentation de l'expression de SMOX qui en résulte d'une augmentation des dommages à l'ADN et de l'apoptose. À l'inverse, une éradication de *H. pylori* corrèle avec une diminution de l'expression de SMOX (Nowotarski *et al.*, 2013).

## 1.8 Hypothèses et objectifs

Comme nous venons de le voir, la régulation des polyamines est cruciale dans la croissance et le développement cellulaire. La plupart des articles font mention d'une augmentation des polyamines dans plusieurs cancers et ces mêmes articles mentionnent

aussi qu'une diminution de l'apport de polyamines dans l'alimentation des patients pourrait diminuer la cancérogénèse. Cependant à des concentrations élevées, les polyamines sont toxiques, car les processus cataboliques par l'intermédiaire des oxydases de polyamines produisent des ROS dont le peroxyde d'hydrogène ainsi que des aldéhydes réactifs, y compris de l'acroléine qui peuvent endommager les protéines, l'ADN et d'autres composants cellulaires. Grâce au criblage à haut débit, préalablement effectué par Dr Ramotar et Dr Aouida, (Aouida & Ramotar, 2018) des composants de la membrane plasmique ont été découverts et reconnus comme impliqués dans la régulation de la toxicité des polyamines. Les membres du laboratoire ont ensuite utilisé une collection d'allèles hypomorphes des gènes essentiels déréglés par la stratégie de diminution de l'abondance par perturbation de l'ARNm (DAmP) et ont découvert 115 souches de levure qui étaient résistantes à la spermine. Ces souches ont toutes des gènes régulés à la baisse qui codent pour des protéines impliquées dans la régulation de la transcription de l'ADN ou l'ARN. Nous nous sommes intéressés à la souche *lst8-DAmP*, qui possède le gène LST8 régulé à la baisse, car c'est un composant essentiel de la voie de signalisation de TORC1.

À partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse qu'une concentration élevée de polyamines ou d'analogues de polyamines et aussi d'arsénite de sodium, qui s'avère être toxique pour les cellules, pouvait être utilisée sur les différentes souches de levures dont nous disposons et de relever les différences de croissance entre elles. Nous avons aussi voulu voir si la réintroduction du gène LST8 dans la souche *lst8-DamP* menait cette souche à avoir le même profil que la souche sauvage BY4741. Enfin nous avons voulu surexprimer LST8 afin d'en observer les conséquences sur la prolifération des différentes souches de levure en présence ou pas de polyamines.

Étant donné l'importance que joue TORC1 dans les cellules cancéreuses, ce complexe est souvent la cible des différents traitements qui existent à base de rapalogues.

L'objectif de ce travail est d'observer les effets des polyamines sur les différentes souches de levures dont nous disposons afin de permettre par la suite d'identifier de nouveaux facteurs qui peuvent être modulés pour sensibiliser les différentes souches, et surtout celles qui sont résistantes, aux analogues de polyamines.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Souche et plasmides

La souche sauvage BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que ces mutants isogéniques *tor1Δ* et *lst8-DamP* ont été utilisés pour cette étude. Ces souches ont été cultivées soit dans le milieu riche (YPD : extrait de levure 1%, peptone 2%, dextrose 2%) ou soit en milieu synthétique (Yeast Nitrogen Base 0.17%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, 0,13% de Yeast Dropout Mix selon la sélection requise, dextrose 2%). Les géloses contiennent en plus 2% d'agar.

La stratégie de la méthode DAmP (*Decreased Abundance by mRNA Perturbation*) est basée sur la perturbation via l'introduction d'une cassette de résistance à la kanamycine dans l'ADN génomique de la levure, au niveau de la région correspondant à la partie 3'UTR de l'ADN. Cette méthode permet de déstabiliser la transcription correspondante aux gènes perturbés (ici LST8) et peut réduire les niveaux d'ARNm de 4 à 10 fois.

La souche bactérienne utilisée pour le clonage et la réplique des plasmides est *Escherichia coli* DH10B (F<sup>-</sup> *mcrAΔ* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ* (*ara-leu*) 7697 *galU galK λ- rpsL* (Str<sup>R</sup>) *nupG*). Les bactéries chimio-compétentes ont été préparées selon le protocole de Hanahan (Hanahan, 1983). Les bactéries ont été maintenues dans un milieu LB (Bacto-Tryptone 1%, extrait de

levure 0.5%, NaCl 0.5%) contenant ou pas de l'ampicilline à une concentration finale de 200 µg/mL. Les milieux gélosés contiennent en plus 2% d'agar.

Le plasmide pBlueScript II SK (pBSII SK) couramment utilisé en biologie moléculaire est choisi comme vecteur de clonage pour le gène LST8 ainsi que tous les mutants construits.

Le plasmide YEplac181 est un vecteur navette entre les bactéries *E. coli* et les levures *S. cerevisiae* qui possède un marqueur de sélection bactérien Amp<sup>r</sup> (gène de résistance à l'ampicilline), un marqueur de sélection pour levure LEU2 et une origine de réplication 2micron (2µ) permettant de maintenir plusieurs copies du plasmide dans la cellule. Pour la transformation des clones YEplac181-LST8-Myc, le milieu synthétique SC-Leu a été utilisé.

Le plasmide YCplac111 est un autre vecteur navette entre les bactéries *E. coli* et les levures *S. cerevisiae* qui possède un marqueur de sélection bactérien Amp<sup>r</sup> (gène de résistance à l'ampicilline), un marqueur de sélection pour levure LEU2 et une origine de réplication de CEN/ARS qui permet le maintien d'une seule copie de gène dans la cellule. Pour la transformation des clones YCplac111-LST8-Myc, le milieu synthétique SC-Leu a été utilisé.

## 2.2 Extraction de l'ADN génomique des levures

La souche BY4741 a été inoculée dans 10 mL de milieu YPD pendant toute une nuit dans un tube en verre stérile. Une sous-culture a été effectuée le lendemain afin d'obtenir une densité optique comprise entre 0.4 et 0.7 (DO = 0.4 à 0.7) puis une centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min a été réalisée. Le culot de cellule a été resuspendu dans 500 µL d'eau stérile et transféré dans un microtube. Après une

centrifugation à 14000 rpm pendant 1 min, le culot a été resuspendu dans du tampon de lyse (Triton-X100 2%, SDS 1% (v/v), NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8). Puis 200 µL de billes de verres de 0.3 mm ont été ajoutés ainsi que 400 µL de phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1). Le mélange a été vortexé 3 min, centrifugé à 14000 rpm pendant 5 min et la phase aqueuse a été transférée dans un microtube propre où 1 mL d'éthanol 100% a été ajouté avant d'avoir été centrifugé à 14000 rpm pendant 3 min. Le culot a été resuspendu dans 400 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8), puis de la RNase A (0.75 mg/ml) a été ajouté pour 5 min à 37°C. Après une centrifugation à 14000 rpm pendant 3 min, le surnageant a été retiré et le culot a été séché à l'air libre puis resuspendu dans 200 µL de TE. L'ADN extrait est conservé à -20°C.

### 2.3 PCR et mutagenèse dirigée

Le promoteur endogène de LST8 ainsi que le gène lui-même furent insérés dans le plasmide pBSII KS au niveau du site de restriction de BamHI. Cette construction, pBS-LST8-myc a été utilisée pour les différentes mutations ciblées dans le gène LST8. Ces mutations ont été induites selon le protocole « QuikChange Site-Directed Mutagenesis » de Agilent. Les produits PCR obtenus par la méthode QuikChange ont été digérés par l'enzyme DnpI (1U/µL), transformés dans des bactéries chimio-compétentes puis étalés sur des géloses LB contenant de l'ampicilline (200 µg/mL). Les oligonucléotides utilisés durant cette étude ont été listés dans le Tableau 2.1. De plus plusieurs paramètres ont été modifiés dépendamment des mutations effectuées. Les positions des mutations ont été listées dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 Oligonucléotides utilisés pour le clonage du gène LST8 et la mutagenèse dirigée

Oligonucléotides	Séquence
LST8-BamHI-F	5'-CGC GGA TCC GCC AGG CAT ACC TCC CAT GC-3'
LST8-BamHI-R.2	5'-CGC GGA TCC CTA TAC ATC GTT TAA TGC GAC ACA TAC AGC-3'
LST8tag-BamHI-R.2	5'-CGC GGA TCC TAA AGA TCT TCT TCG CTA ATC AAT TTT TGT TCA CCT CCA CCT ACA TCG TTT AAT GCG ACA CAT ACA GC-3'
LST8-3UTR-BamHI-R	5'-CGC GGA TCC TGG ATA CCC CAT AGA AGA TGC AAG GT-3'
LST8-S33A-F	5'-AGC ATT CCG ACG CAC AGG TTA ATC-3'
LST8-S33A-R	5'-GAT TAA CCT GTG CGT CGG AAT GCT-3'
LST8-G181D-For	5'-GCA GCA AAT ACT AAA GAT AAT TGT TAC GTA TGG-3'
LST8-G181D-Rev	5'-CCA TAC GTA ACA ATT ATC TTT AGT ATT TGC TGC-3'
LST8-T201D-For	5'-CAT CTA AAA CCG GTA GAT AAA TTC AGA GCG C-3'
LST8-T201D-R	5'-GCG CTC TGA ATT TAT CTA CCG GTT TTA GAT G-3'

#### 2.4 Ligation, transformation des bactéries chimio-compétentes

Après la PCR, les vecteurs et les inserts ont été digérés avec BamHI (20 U/ml) pendant 2 heures et traités à la CIP (Alcaline Phosphatase, Calf Intestinal) pendant 30 minutes. La trousse de purification de QIAGEN a été utilisée pour la purification des vecteurs et inserts. La ligation a été effectuée avec 300 ng de l'insert désiré, 100 ng de vecteur

(pBSII KS), de la T4 DNA ligase (0.5 U/ $\mu$ L) et du tampon de ligation dans un volume final de 20  $\mu$ L; le mélange a été incubé à 16°C toute la nuit.

Chaque produit de ligation a été transformé dans 100  $\mu$ L de bactéries chimio-compétentes et ce mélange a été maintenu dans de la glace pour une durée de 30 minutes. Les microtubes ont été incubés dans un bain-marie à 42°C et placés dans la glace pendant 5 minutes avant d'y ajouter 1 mL du milieu LB. Les microtubes ont été incubés à 37°C pendant 1 heure avant que 100  $\mu$ L de chaque mélange soient étalés sur des géloses LB-Amp à 37°C pendant toute la nuit. Trois à quatre colonies par transformations furent inoculées dans 3 mL de LB-Amp à 37°C et sous agitation à 200 rpm pendant la nuit.

## 2.5 Purification de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique bactérien a été extrait en utilisant la trousse de purification de plasmide de QIAGEN. L'ADN a été élué dans 50  $\mu$ L de tampon d'éluion.

## 2.6 Séquençage des clones

Les échantillons d'ADN ont été acheminés au Centre Innovation Génome Québec de l'Université McGill pour un séquençage par la méthode de Sanger. Les séquences obtenues ont été comparées à la séquence originale de *LST8* à partir de la base de données de *S. cerevisiae* sur SGD.

Les gènes sauvages ainsi que les mutants ayant été introduits dans le vecteur pBSII KS, ont été extraits grâce aux digestions des enzymes BamHI et PvuI à leur site respectif. Les échantillons ont été soumis à une électrophorèse à 100 V pendant 30 minutes et les bandes d'intérêts correspondants au gène LST8 ou aux mutants (~ 2000 pb) ont été

excisés et l'ADN a été purifié en suivant les instructions de la trousse d'extraction de QIAGEN.

## 2.7 Clonage moléculaire

Une fois les inserts d'intérêts extraits, chacun d'entre eux ont été introduits dans les plasmides YCplac111 et YEplac181, en suivant les mêmes étapes que les ligations précédentes. Les plasmides ont été introduits dans des bactéries compétentes *E.coli*, puis extraits et transformés dans les souches de levures BY4741 et *lst8-DAmP* en utilisant le protocole de transformation au PEG-lithium acétate (Gietz, St Jean, Woods, & Schiestl, 1992). Ces mêmes souches ont aussi été transformées avec les plasmides vides. Les constructions générées sont listées dans l'annexe I.

## 2.8 Test en gouttes

Les souches de levures sont inoculées une nuit à 30°C dans du milieu YPD ou minimum sans leucine (-Leu) selon les expériences menées. Une sous culture de chaque souche a été effectuée afin d'obtenir une densité optique d'environ 0.6 (DO = 0.6), puis des dilutions en cascades de plusieurs concentrations (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 et 1/100000) ont été faites. Des concentrations finales de spermine allant de 0.5 mM à 2 mM et d'arsénite de sodium allant de 0.25 mM à 2 mM ont été ajoutées dans les géloses de YPD. Les géloses ont été incubées à 30°C pendant toute une nuit.

## 2.9 Analyse de l'expression protéique

### 2.9.1 Séparation des protéines sur un gel SDS PAGE et *Western blot*

A partir d'une culture cellulaire inoculée une nuit entière à 30°C dans du milieu minimum ou YPD, 10 mL ont été centrifugé et resuspendu dans 200 µL d'un tampon

d'extraction (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, glycérol 5%, 1 caplet d'inhibiteur de protéase Pierce pour 50 mL de tampon) et 200  $\mu$ L de billes de verres de 0.3 mm. Les microtubes ont été vortexés pendant 2 min 5 à 6 fois à 4°C. L'extrait protéique fut centrifugé à 3000 rpm pendant 3 min avec une micro-centrifugeuse et le surnageant contenant les protéines a été récupéré. Les protéines ont été quantifiées par la méthode de Bradford (Ernst & Zor, 2010). Des quantités égales de chaque extrait sont mélangées avec du tampon de chargement (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, bleu de bromophénol 0.1% et 2- $\beta$ mercaptoethanol 2% (v/v)) et chargées sur un gel de 6, 8 ou 10% de polyacrylamide dénaturant contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS). La migration est faite pendant 2 h à 100V. Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF pendant 1 h à 100V. Après 1 h de blocage dans 5% de lait dilué dans du TBST (Tris 25 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0.1% ajusté à pH 7.4), la membrane est lavée avec du TBST et incubée à 4°C toute une nuit avec le premier anticorps,  $\alpha$ -TOR1 (Abmart) dilué à 1:1500 dans 20 à 30 mL du lait-TBST 5%. Le lendemain l'anticorps secondaire, anti-IgG de lapin (Thermofisher) a été dilué 1:10000 dans lait-TBST 5% puis ajouté à la membrane pendant 1 h à température pièce. Après plusieurs lavages, la membrane a été mise en contact avec une solution de luminol/péroxyde (Immobilon) pendant 5 minutes pour la détection de Tor1. Les bandes de protéines sont visualisées avec ImageQuant Las 4000 (GE Healthcare).

### 2.9.2 Coloration des gels de polyacrylamide au nitrate d'argent

A l'issue de la migration sur un gel de polyacrylamide SDS de 6 ou 8%, le gel a été transféré dans une solution de fixation méthanol : acide acétique : eau (40:10:50) pendant 30 à 40 minutes. Le gel a été lavé avec une solution de lavage (éthanol 30%) puis les protéines ont été réduites dans une solution de thiosulfate à 0.2 mg/mL pendant une minute. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, la solution d'argent (nitrate d'argent 2 mg/mL) a été ajoutée au gel pendant 30 minutes. Après un second lavage à l'eau distillée, une solution de développement (carbonate de sodium 0.03 g/mL;

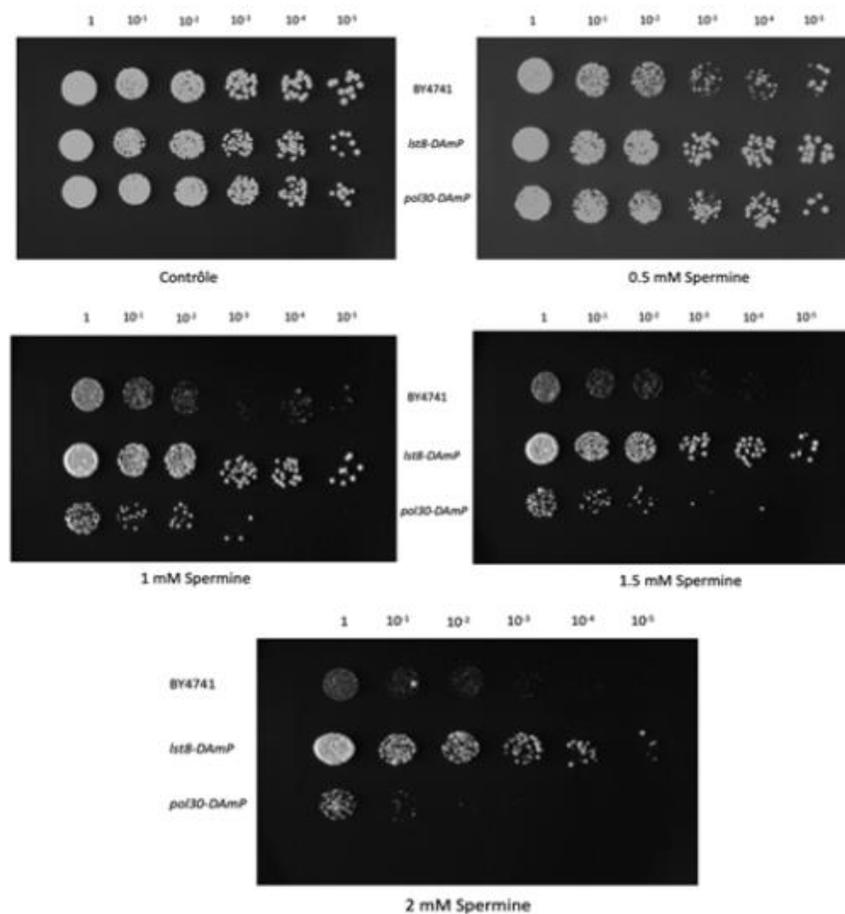
thiosulfate 5  $\mu\text{g/mL}$ ; formaldéhyde 0.5  $\mu\text{L/mL}$ ) fut ajoutée jusqu'à l'apparition des bandes de protéines. La réaction a été arrêtée avec l'ajout de la solution d'arrêt (acide acétique 5%).

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 Comparaison de la résistance de BY4741, *lst8-DAmP* et *pol30-DAmP* à la spermine.

Des mutations par la méthode DAmP (Decreased Abundance by mRNA Perturbation) permet de réduire de 4 à 10 fois la quantité d'ARNm. Plusieurs gènes ont subi ces mutations et plusieurs souches de levures mutées s'avéraient acquérir une résistance envers les polyamines dont la souche *lst8-DAmP* (Aouida & Ramotar, 2018). La souche *pol30-DAmP*, ayant une réduction de *Pol30*, un gène qui code pour la protéine PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) qui fonctionne comme une pince de réplication pour les polymérase de l'ADN. Cette protéine peut aussi servir de point d'ancrage pour d'autres enzymes impliquées dans la réplication ou la réparation de l'ADN. D'après les premiers résultats obtenus par Aouida et Ramotar, la souche Pol30 est utilisée ici comme contrôle de croissance lors des différents traitements que les levures subiront (Aouida & Ramotar, 2018).



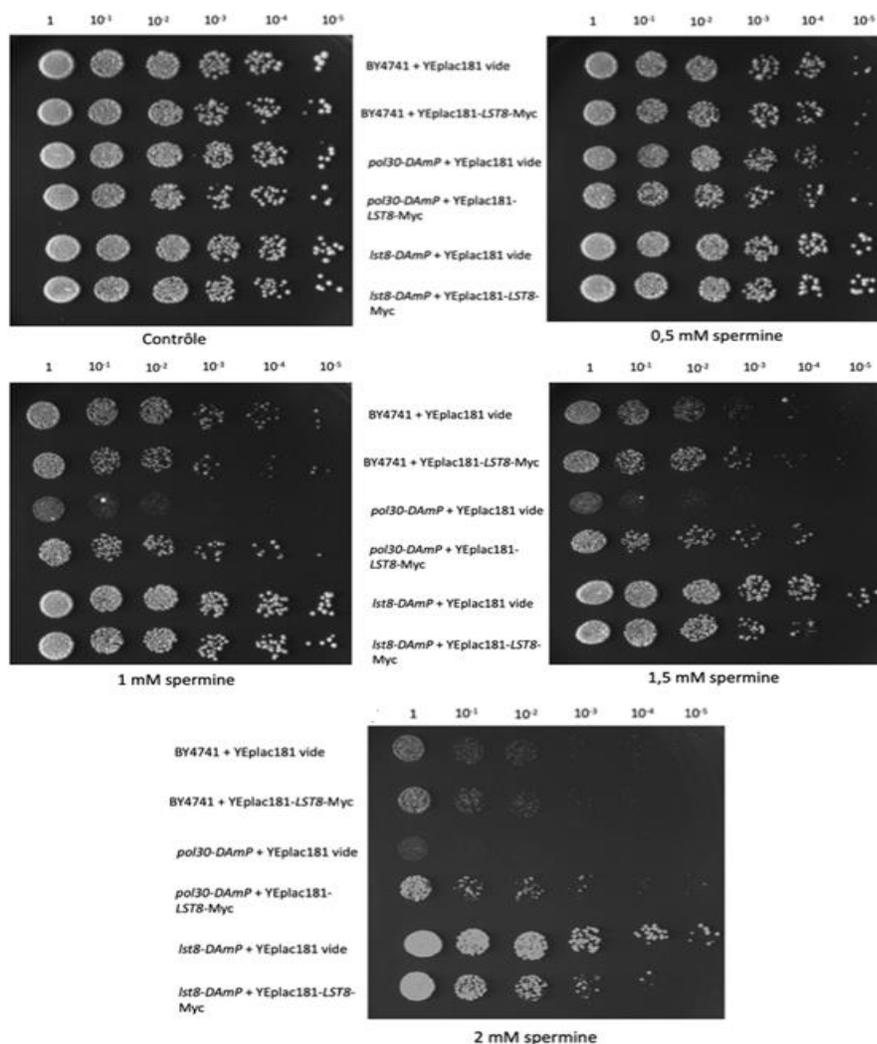
**Figure 3.1 : Test de résistance des souches BY4741, *lst8-DAmP* et *pol30-DAmP* à la spermine.** Les souches BY4741, *lst8-DAmP* et *pol30-DAmP* ont été inoculées dans du milieu riche YPD pendant toute une nuit à 30°C. Une culture a été faite le lendemain afin d'obtenir une densité optique de cellules d'environ 0.6 ( $A_{600} = 0.6$ ). Des géloses YPD ont été préparées le jour même en y ajoutant différentes concentrations de spermine. Des dilutions en série des souches ont été réalisées puis 4  $\mu$ L des dilutions ont été déposés sur les géloses et celles-ci ont été incubées à 30°C pendant toute une nuit. Cette expérience a été réalisée trois fois (N=3).

Les résultats suivants confirment la résistance de la souche *lst8-DAmP* à la spermine, et cela même à une concentration élevée de 2 mM, alors que la souche sauvage BY4741 et *pol30-DAmP* sont toutes les deux sensibles (Figure 3.1).

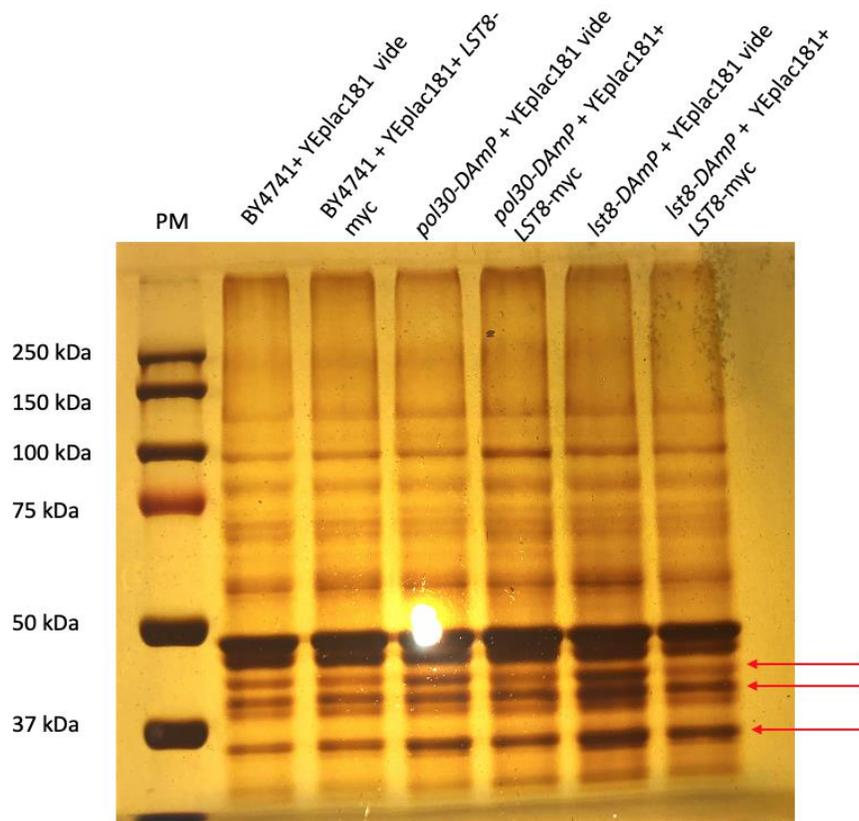
Ensuite nous avons voulu voir la compensation qu'apportait le gène *LST8* introduit dans le plasmide YEplac181 à la souche *lst8-DAmP*. YEplac181 est un plasmide multicopie (2 microns), les résultats démontrent qu'une « surproduction » de la protéine Lst8 n'affecte pas la sensibilité de souche BY4741 à la spermine. On observe une légère augmentation de la résistance de *pol30-DAmP* + YEplac181-LST8-myc à la spermine jusqu'à une concentration de 2 mM. Quant à la souche *lst8-DAmP* + YEplac181-LST8-myc, une légère baisse de résistance est observable pour les concentrations 1.5 mM et 2 mM comparativement à la souche *lst8-DAmP* contenant le plasmide vide. Cependant, cette baisse de résistance n'a rien de comparable à la sensibilité de la souche BY4741 (Figure 3.2).

Enfin nous avons voulu voir ce qu'il se passait au niveau des protéines. Le gel de polyacrylamide coloré au nitrate d'argent ne révèle aucune différence observable en ce qui concerne les souches BY4741 et *pol30-DAmP* avec YEplac181 vide ou contenant le gène *LST8*. Cependant une augmentation de la quantité de plusieurs protéines d'environ 35, 40 et 45 kDa dans la souche *lst8-DAmP* contenant YEplac181 vide est observable. De plus la souche *lst8-DAmP* contenant le plasmide YEplac181-LST8-myc présente un rétablissement de la quantité de ces protéines au même niveau que celle de la souche sauvage BY4741 (Figure 3.3).

Ces premiers résultats confirment la résistance de la souche *lst8-DAmP* à la spermine et la sensibilité de BY4741 et *pol30-DAmP* à celle-ci. Cependant, le plasmide contenant LST8 ne présente pas les résultats attendus lorsqu'il est introduit dans la souche *lst8-DAmP*, à savoir une sensibilité comparable à celle de BY4741. En effet, ayant rétabli le gène LST8 nous nous attendions à un profil similaire à celui de la souche sauvage.



**Figure 3.2 : Test de complémentation du gène *LST8* dans les souches BY4741, *lst8-DAmP* et *pol30-DAmP*.** Les souches BY4741, *lst8-DAmP* et *pol30-DAmP* contenant le plasmide YEplac181 sans insert (vide) ou YEplac181-LST8-Myc ont été inoculées dans du milieu synthétique dépourvu de leucine (-Leu) pendant toute une nuit à 30°C. Une culture a été faite le lendemain afin d'obtenir une densité optique de cellules d'environ 0.6 ( $A_{600} = 0.6$ ). Des géloses YPD ont été préparées le jour même en y ajoutant différentes concentrations de spermine. Des dilutions en série des souches ont été réalisées puis 4  $\mu$ L des dilutions ont été déposés sur les géloses et celles-ci ont été incubées à 30°C pendant toute une nuit. Cette expérience a été réalisée trois fois (N=3).



**Figure 3.3 : Détection de protéines des souches BY4741, *lst8-DAmP* et *pol30-DAmP* contenant le plasmide YEplac181 vide ou le gène *lst8-Myc* par une coloration au nitrate d'argent.** Les souches BY4741, *lst8-DAmP* et *pol30-DAmP* contenant le plasmide YEplac181 et YEplac181-LST8-Myc ont été inoculées dans du milieu synthétique sans leucine (-Leu) pendant toute une nuit à 30°C. Leurs protéines ont été extraites et 50 µg de protéines ont été chargées et séparées par migration sur un gel de polyacrylamide de 10%. Le gel a été coloré au nitrate d'argent. Cette expérience a été réalisée une fois (N=1).

### 3.2 Comparaison de la résistance de BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1Δ* à la spermine et à l'arsénite de sodium.

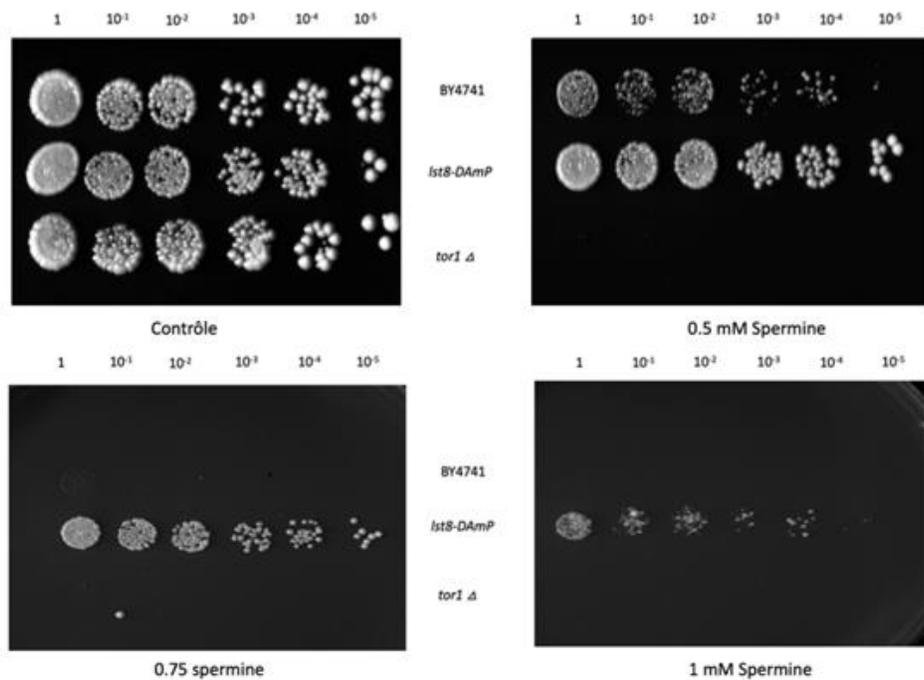
Puisque *LST8* est un composant essentiel dans la formation et le fonctionnement du TORC1, il est intéressant de voir la sensibilité ou la résistance de la souche *tor1Δ* par rapport à celle de BY4741 ou *lst8-DAmP* en présence de spermine ou d'arsénite de

sodium. Ce dernier a été choisi car il est utilisé comme fongicide, antibactérien ou encore herbicide (National Center for Biotechnology).

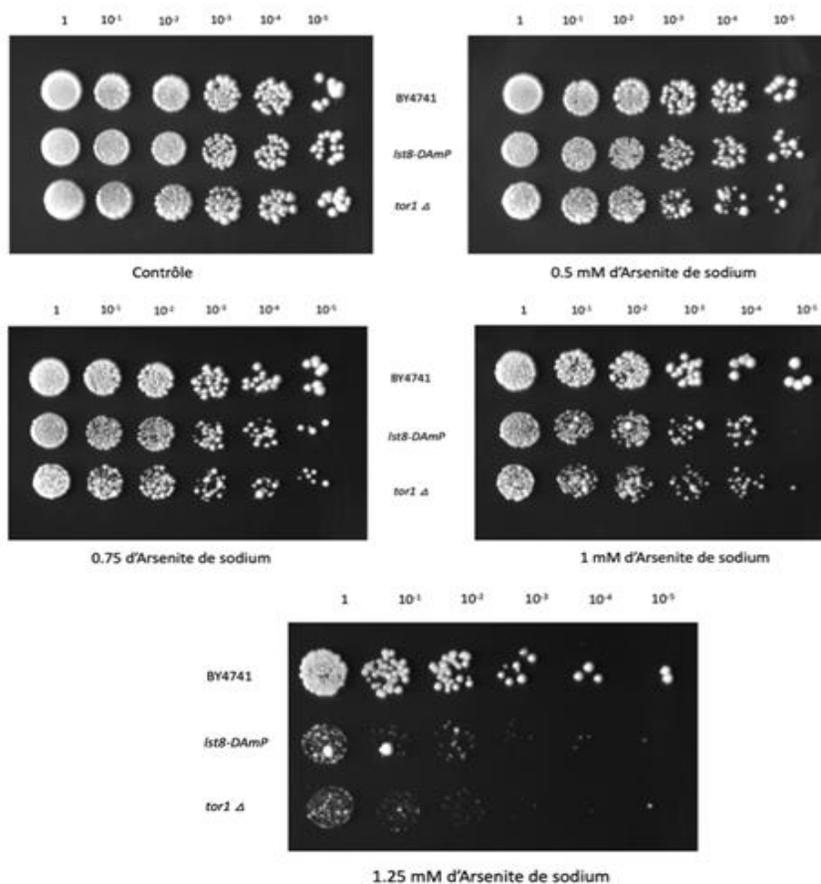
Les résultats montrent toujours une résistance à la spermine de la souche *lst8-DAmP*, cependant une hyper-sensibilité (voir même une létalité) de la souche *tor1Δ* est constatée, lorsque celle-ci est exposée à de la spermine, même pour la plus petite concentration de 0.5 mM (Figure 3.4).

Les résultats montrent aussi que la souche BY4741 est résistante à un traitement à l'arsénite de sodium. Quant aux souches *lst8-DAmP* et *tor1Δ*, elles sont toutes les deux sensibles à l'arsénite de sodium. Cette sensibilité est observable à la taille des colonies qui sont plus petites et moins nombreuses à une concentration de 0.5 mM. Cette sensibilité est accentuée au fur et à mesure que les concentrations augmentent (Figure 3.5).

Les figures 3.4 et 3.5 confirment la résistance à la spermine de la souche *lst8-DAmP* et sa sensibilité à l'arsénite de sodium. Et à l'inverse, la souche BY4741 est sensible à la spermine alors qu'elle est résistante à l'arsénite de sodium. Enfin la souche *tor1Δ* est encore plus sensible à la spermine et moins résistante à l'arsénite de sodium que BY4741.



**Figure 3.4 : Test de résistance des souches BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1Δ* à la spermine.** Les souches BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1Δ* ont été inoculées dans du milieu riche YPD pendant toute une nuit à 30°C. Une culture a été faite le lendemain afin d'obtenir une densité optique de cellules d'environ 0.6 ( $A_{600} = 0.6$ ). Des géloses YPD ont été préparées le jour même en y ajoutant différentes concentrations de spermine. Des dilutions en cascade des souches ont été réalisées puis 4  $\mu$ L des dilutions ont été déposés sur les géloses et celles-ci ont été incubées à 30°C pendant toute une nuit. Cette expérience a été réalisée trois fois (N=3).



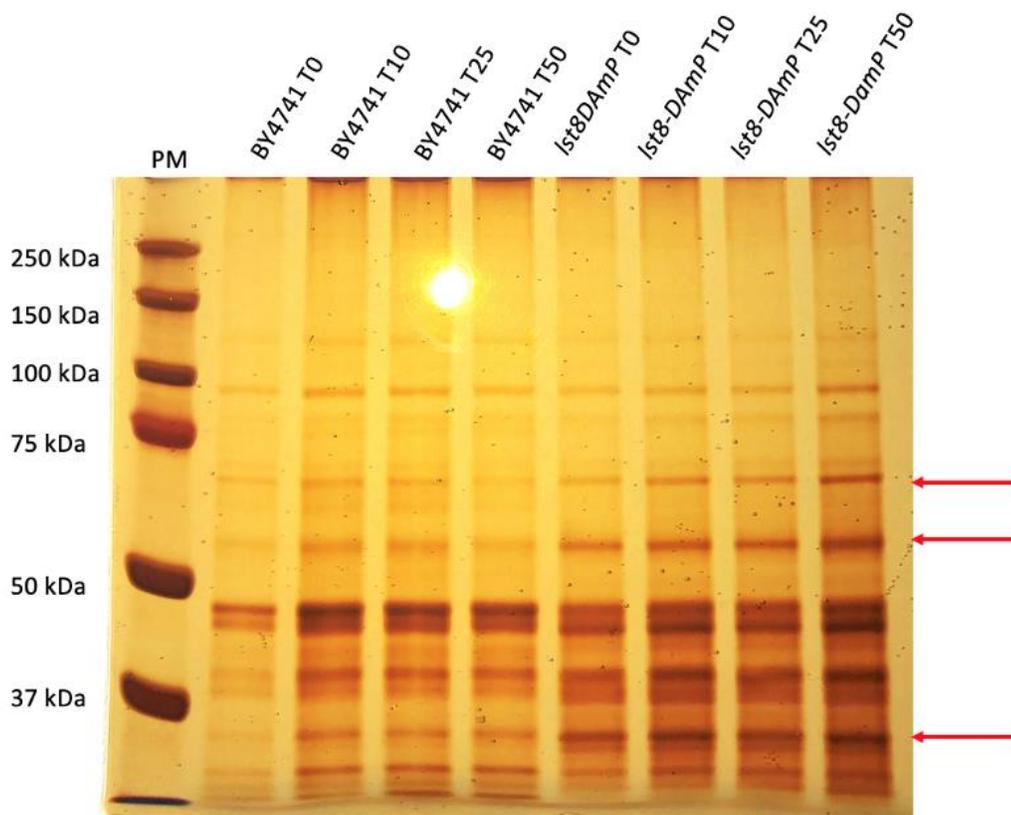
**Figure 3.5 : Test de résistance des souches BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1Δ* à l'arsénite de sodium.** Les souches BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1Δ* ont été inoculées dans du milieu riche YPD pendant toute une nuit à 30°C. Une culture a été faite le lendemain afin d'obtenir une densité optique de cellules d'environ 0.6 ( $A_{600} = 0.6$ ). Des géloses YPD ont été préparées le jour même en y ajoutant différentes concentrations d'arsénite de sodium. Des dilutions en cascade des souches ont été réalisées puis 4  $\mu$ L des dilutions ont été déposés sur les géloses et celles-ci ont été incubées à 30°C pendant toute une nuit. Cette expérience a été réalisée trois fois (N=3).

De même que précédemment, nous avons voulu voir si les niveaux protéiques avaient changé avec les différents traitements effectués. Étant donné la faible croissance de la souche *tor1Δ* lors d'un traitement à la spermine, nous n'avons pas pu avoir de résultats

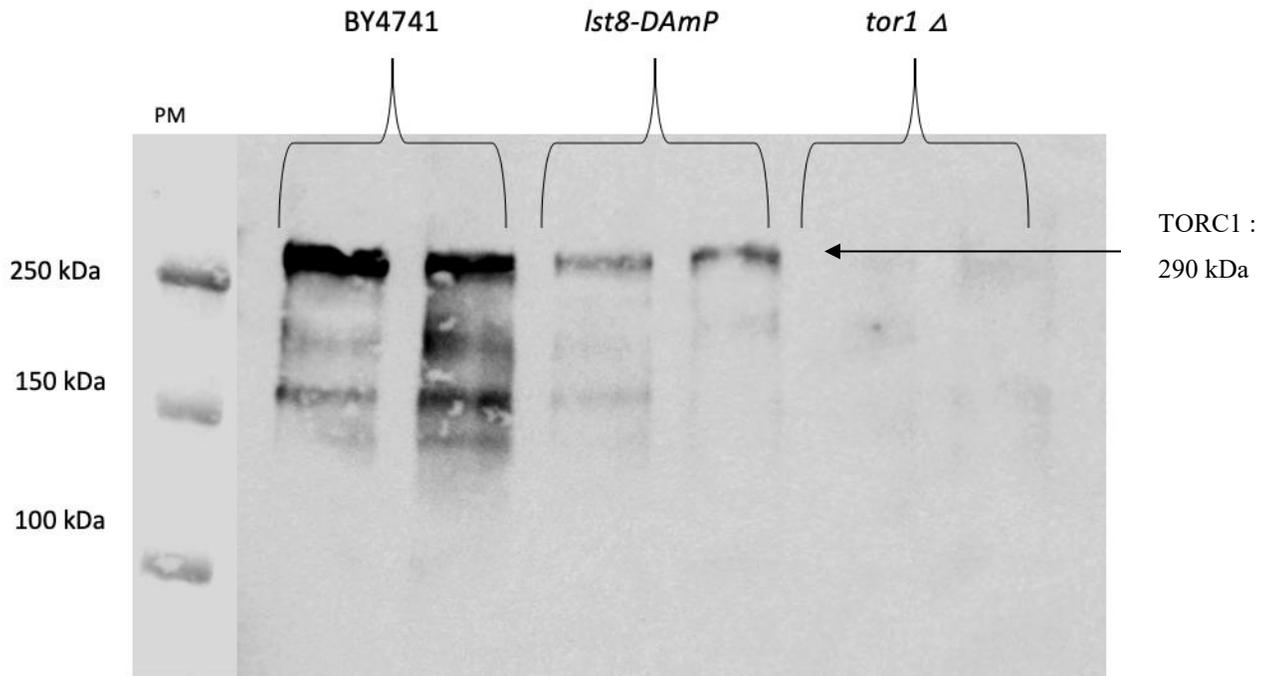
concluant pour une coloration au nitrate d'argent. Cependant, il aurait été judicieux de présenter les niveaux de protéines de la souche *tor1Δ*, même si elle n'avait pas subi de traitement. Néanmoins, les souches BY4741 et *lst8-DAmP* ne contenant aucun plasmide, ont subi toutes les deux un traitement à la spermine. On peut constater qu'il n'y a pas vraiment de changement dans les quantités de protéines de la souche BY4741 si ce n'est qu'elles sont moindres par rapport à celles de la souche *lst8-DAmP*. En ce qui concerne cette dernière, il est intéressant de voir l'augmentation de certaines de ses protéines de 35, 60 et 70 kDa (indiquées par des flèches rouges sur la figure 3.6) au fur et à mesure que la durée du traitement à la spermine est long. Ces protéines n'ont pas été identifiées mais il serait intéressant de le faire à l'avenir.

Pour pousser l'analyse protéique encore plus loin, nous avons réalisé des immuno-détections en utilisant un anticorps anti-TORC1. La figure 3.7 présente le transfert des protéines des souches BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1Δ* qui n'ont subi aucun traitement. Deux concentrations de chaque souche ont été chargées sur gel, soit 100 µg et 200 µg de protéines. On peut voir que la quantité de Tor1 est très forte dans la souche sauvage BY4741, alors qu'une diminution significative est observable pour la souche *lst8-DAmP*. La souche *tor1Δ* étant dépourvue de Tor1, il est normal de n'observer aucune bande.

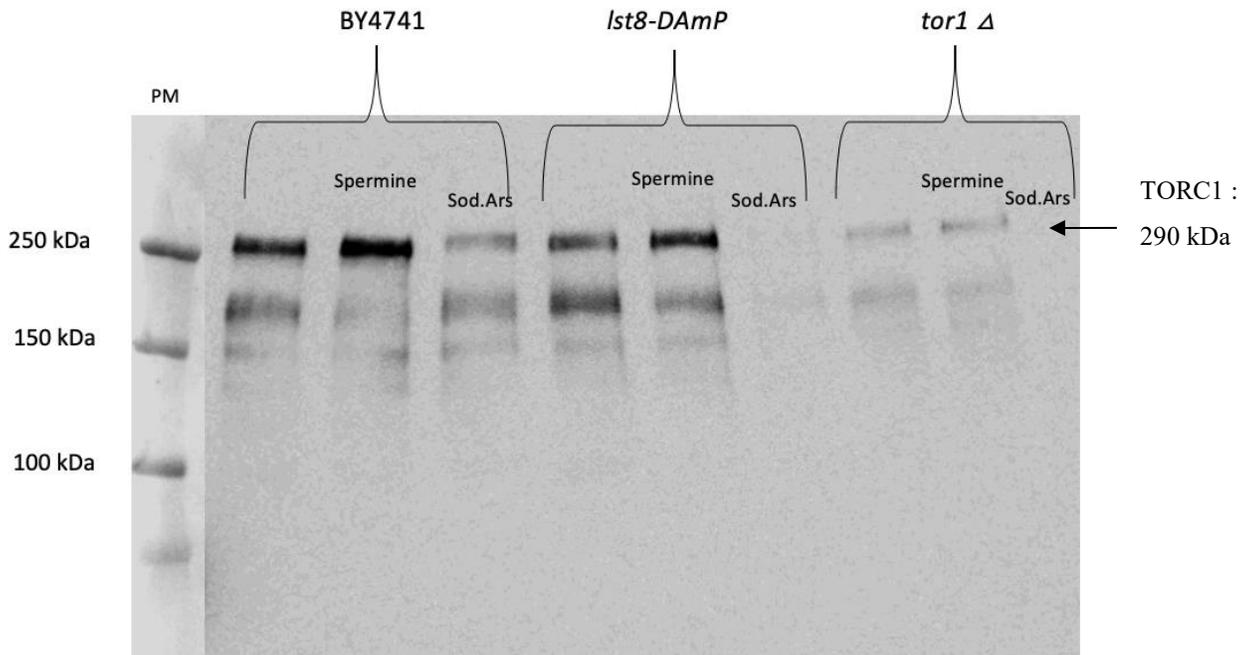
Ces mêmes souches ont subi par la suite des traitements à la spermine et à l'arsénite de sodium. Les résultats démontrent une assez grande concentration de Tor1 dans la souche BY4741, qui augmente quand elle est traitée à la spermine et diminue lors dans traitement à l'arsénite de sodium. De même que dans la souche *lst8-DAmP* non traitée, la quantité de Tor1 est assez élevée puis elle augmente en présence de spermine et elle est faible, voire inexistante, lors d'un traitement à l'arsénite de sodium. Étant donné que la souche *tor1Δ* ne devrait pas de présenter de bandes, alors une contamination liée à une erreur de manipulation pourrait expliquer les faibles bandes visibles (Figure 3.8).



**Figure 3.6 : Détection de protéines des souches BY4741 et *Ist8-DAmP* par une coloration au nitrate d'argent après un traitement à la spermine.** Les souches BY4741 et *Ist8-DAmP* ont été inoculées dans du milieu riche YPD pendant toute une nuit à 30°C. Une sous culture a été faite le lendemain afin d'avoir une densité optique de 0.6 ( $A_{600} = 0.6$ ) puis 1 mM de spermine est ajouté. Leurs protéines ont été extraites au bout de 10, 25 et 50 minutes, puis dosées par la méthode de BCA et 30  $\mu$ g de protéines ont été chargées et séparées par migration sur un gel de polyacrylamide de 8%. Le gel a subi les différentes étapes du protocole de la coloration au nitrate d'argent. Cette expérience a été réalisée trois fois (N=3).



**Figure 3.7 : Immunobuvardage des protéines extraites des souches BY4741, *Ist8-DAmP* et *tor1*Δ non traitées.** Les protéines ont été extraites des souches BY4741, *Ist8-DAmP* et *tor1*Δ préalablement mis en culture toute une nuit dans du milieu synthétique contenant tous les acides aminés. Les protéines ont ensuite été dosées par la méthode de BCA puis 100 et 200 µg de protéines de chaque souche ont été chargées sur un gel de polyacrylamide de 6%. L'anticorps primaire utilisé est un anti-Tor1 (1 :1500) et le second, Goat Anti-Rabbit (1 :10000). Cette expérience a été réalisée trois fois (N=3).



**Figure 3.8 : Immunobuvardage des protéines totales extraites des souches BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1*Δ traitées à la spermine et à l'arsénite de sodium.** Les souches BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1*Δ ont été mis en culture toute une nuit dans du milieu synthétique contenant tous les acides aminés. Le lendemain, une sous culture des souches a été faite afin d'obtenir une densité optique de cellules de 0.6 ( $A_{600} = 0.6$ ), puis 1 mM de spermine ou d'arsénite de sodium a été ajouté aux cellules pour une durée de 30 minutes. Les protéines ont été extraites et dosées par la méthode de BCA et 200  $\mu$ g de protéines de chaque souche ont été chargées sur un gel de polyacrylamide de 6%. L'anticorps primaire utilisé est un anti-Tor1 (1 :1500) et le second, GoatAnti-Rabbit (1:10000). Cette expérience a été réalisée trois fois (N=3).

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION DES RÉSULTATS

#### 4.1 La souche *lst8-DAmP* est résistante à la spermine

Les polyamines sont des molécules chargées positivement, essentielles pour le fonctionnement adéquat de la cellule. Leurs fonctions sont très variées et spécifiques à chaque polyamine. Étant chargées positivement, elles auront un attrait particulier pour les molécules chargées négativement comme l'ADN ou les protéines. Il est connu que la spermine peut se lier à l'ADN, l'ARN et à certaines protéines membranaires. La spermine, grâce à la charge, la longueur et la flexibilité de sa chaîne, joue un rôle spécifique dans l'organisation structurale de la chromatine. Elle peut aussi protéger l'ADN de l'action des endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN (Casero *et al.*, 2018). Un dérèglement dans le métabolisme des polyamines est souvent observé dans différentes tumeurs. En effet, une augmentation des polyamines, dont la spermine, est associée à plusieurs cancers comme celui du sein ou du côlon. Par conséquent, plusieurs traitements contre le cancer s'accompagnent aussi d'une diète à faible teneur en polyamines pour certains patients. La carence en polyamine permettrait un meilleur effet anti-tumoral et une meilleure efficacité de la chimiothérapie.

Cependant à très haute concentration, les polyamines peuvent devenir toxiques par la production de peroxyde d'hydrogène et d'aldéhydes réactifs qui endommagent les protéines, l'ADN et les autres composants cellulaires. Notre étude est basée sur cette

dernière information afin de comprendre comment Lst8 contrôle la réponse à la spermine dans la levure.

Nous nous sommes intéressés à la protéine Lst8, codée par le gène LST8, composante essentielle du complexe Tor1 (TORC1). L'intérêt porté à cette petite protéine provient d'une étude préalablement menée par Dr Aouida et Dr Ramotar (Aouida & Ramotar, 2018). Ils ont découvert des souches de levure, dont le génome a été modifié par la méthode DAmP, présentant une hyper-résistance à la spermine. Parmi ces souches modifiées, il y avait celle où le gène LST8 était diminué. Je me suis donc intéressée plus particulièrement à cette souche car, comme mentionnée précédemment, la protéine Lst8 est une composante essentielle dans le complexe TORC1. Nous nous sommes intéressés aux souches résistantes aux polyamines et plus particulièrement à la souche *lst8-DAmP*, car la compréhension de son fonctionnement permettra par la suite d'identifier d'autres facteurs qui pourront être moduler et rendre cette souche plus sensible aux analogues de polyamines. En utilisant différents plasmides insérés dans différentes souches de levure, j'ai pu observer différents profils de résistance et de sensibilité de ces souches lors des traitements à la spermine et à l'arsénite de sodium. J'ai aussi pu observer des différences dans la quantité de protéines dans les souches de levure utilisées.

Comme vu dans les résultats, la souche *lst8-DAmP* est résistante aux plus fortes concentrations de spermine utilisées lors des expériences menées. En plus d'une croissance sur gélose contenant de la spermine, la résistance de la souche *lst8-DAmP* se caractérise aussi par des profils protéiques très différents comparativement à la souche sauvage BY4741. Si nous faisons abstraction du fait qu'il n'y a pas de contrôle de chargement, aussi bien les Western blot que les gels de polyacrylamide traités au nitrate d'argent, démontrent une augmentation de la production de protéines dans la souche *lst8-DAmP* par rapport à la souche sauvage. Les gels de Western blot nous

informe en plus que TORC1 est une des protéines produit en grande quantité dans la souche *lst8-DAmP*, surtout lorsque celle-ci subit un traitement à la spermine.

#### 4.2 Les effets de la spermine chez *S. cerevisiae*

Dans cette étude, les résultats démontrent que la souche sauvage BY4741 ainsi que la souche *pol30-DAmP* sont capables d'absorber la spermine et d'en être sensible, contrairement à la souche *lst8-DAmP* qui est résistante. L'inverse de ces profils est aussi observable lors d'un traitement à l'arsénite de sodium, soit une sensibilité de *lst8-DAmP* et une résistance des souches BY4741 et *pol30-DAmP* (résultat non présenté). En ce qui concerne la souche *tor1Δ*, l'absence de complexe TORC1 dans celle-ci, la rend extrêmement sensible à la spermine et résistante à l'arsénite de sodium lorsqu'il est de faible concentration puis à de plus fortes concentrations, la souche devient sensible. L'absence du gène TOR1 mais aussi de protéine TORC1 sont sûrement à l'origine de cette hyper-sensibilité. Pour une exposition à l'arsénite de sodium, le même profil de sensibilité est observé pour *lst8-DAmP* et *tor1Δ*. Il serait intéressant d'approfondir et de savoir pourquoi nous avons ces résultats pour *lst8-DAmP*, étant donné que le gène LST8 est seulement diminué dans la souche *lst8-DAmP*. La faible quantité de Lst8 et donc de TORC1 dans cette souche, pourrait être pallier par d'autres systèmes protéiques, ce qui expliquerait l'augmentation de certaines protéines lors de la coloration aux nitrates d'argent des gels de polyacrylamide.

La spermine pourrait aussi exacerber la transcription du peu de gène *LST8* qu'il y a dans la souche *lst8-DAmP*, étant donné que les polyamines sont impliquées dans la réplication de l'ADN. Cette augmentation, de la quantité de Lst8 lors d'un traitement à la spermine, expliquerait une plus grande quantité de complexe Tor1 (*lst8-DAmP* traité à la spermine). Le traitement de *lst8-DAmP* à l'arsénite de sodium, ne révèle

qu'une faible quantité de complexe Tor1 formé, ce qui coïncide avec les résultats obtenus lors des tests de résistance qui révèlent une faible croissance sur gélose.

Il est connu que Sam3 et Dur3 sont tous les deux impliqués dans le transport des polyamines comme la spermine (Aouida *et al.*, 2013; Uemura *et al.*, 2007).

La souche sauvage BY4741 devrait avoir tous ces transporteurs dont Sam3 et Dur3, fonctionnels et son profil sensible à la spermine nous le confirme. La souche *pol30-DAmP* a une réduction de POL30, un gène qui code pour la protéine PCNA qui est impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN. La souche *pol30-DAmP* a le même profil de croissance que BY4741 et étant donné que PCNA n'est, à priori, pas impliqué dans le transport des polyamines, on pourrait aussi penser que la souche *pol30-DAmP*, a ces transporteurs de polyamines intact. Cependant cela reste à confirmer.

La souche *lst8-DAmP* est résistante à la spermine mais puisque la taille de ces colonies diminue quand même au fur et à mesure que la concentration en spermine augmente, on peut confirmer que la spermine peut entrer dans la cellule. Cependant nous ne pouvons pas affirmer si le transport de la spermine se fait via les transporteurs Sam3 et Dur3.

En ce qui concerne la sensibilité de la souche *tor1Δ* envers la spermine, les résultats présentés ne permettent pas de tirer une quelconque conclusion en ce qui concerne le bon fonctionnement des transporteurs. Cependant, l'absence de protéines Tor1 dans cette souche semble exacerber sa sensibilité envers les produits de traitement et diminuer sa durée de vie comparativement à la souche BY4741 (Liu, Liu, Wu, Bi, & Meng, 2015). Puisque TORC1 a besoin, entre autre, de nutriments pour ces différentes fonctions, il est normal d'observer une faible croissance dans la souche *tor1Δ*.

### 4.3 Lst8 est essentielle dans la formation du complexe TORC1

Il est connu que la protéine Lst8 est essentielle pour la structure et le bon fonctionnement de TORC1 dans les cellules mammifères (Yang et al., 2013). Les résultats démontrent que la souche *lst8-DAmP* contient moins de complexe Tor1 comparativement à la souche sauvage BY4741 lors de la culture des souches en milieu neutre (sans traitement). Ceci démontre bien que Lst8 est une protéine indispensable dans la formation du complexe Tor1 dans la levure.

Les résultats montrent aussi une totale absence de Tor1 dans la souche mutée *tor1Δ*. Un traitement à la spermine augmente la quantité de Tor1 dans la souche *lst8-DAmP* et à l'inverse, un traitement à l'arsénite de sodium diminue les taux de Tor1. Ceci pourrait expliquer respectivement la résistance ainsi que la sensibilité de *lst8-DAmP* à la spermine et à l'arsénite de sodium. Encore une fois il n'y a aucun contrôle de chargement nous permettant d'être certains de ces résultats. De plus, les faibles bandes visibles pour la souche *tor1Δ* nous porte à croire qu'une erreur de manipulation a été commise lors de la réalisation de cet immunobuvardage d'où l'importance du contrôle de chargement lors de la répétition de cette expérience.

Étant donné que le plasmide YEplac181 contient le gène *Lst8* marqué d'une étiquette Myc, il serait intéressant d'observer la co-immunoprécipitation des protéines Lst8-Myc et Tor. Cette technique est couramment utilisée en recherche. La co-immunoprécipitation permet la précipitation d'un antigène (protéine ou complexe protéique) et un anticorps (anti-Myc) qui agglutine une protéine de manière spécifique. Cette technique permet d'isoler la protéine en question lorsqu'elle se retrouve dans un lysat. Le complexe immun formé peut ensuite être isolé par chromatographie et la protéine d'intérêt analysée sur un gel SDS-PAGE.

Une autre expérience à considérer serait de compenser la souche *tor1Δ* avec un plasmide contenant le gène *TOR*. Cette compensation ne devrait pas affecter le comportement sensible de la souche envers la spermine puisque celle-ci aurait le même profil que la souche sauvage qui est-elle même sensible à la spermine. Étant donné que, dans la plupart des cancers le complexe TORC1 est régulé à la hausse, il serait tout aussi intéressant d'induire excessivement via un plasmide 2 $\mu$  contenant le gène *TOR* et qu'on introduirait dans la souche sauvage de levure BY4741, afin d'observer sa réaction envers la spermine et l'arsénite de sodium. Une surexpression de TORC1 entraînerait une résistance et une prolifération de la souche BY4741 à des concentrations de spermine élevées.

#### 4.4 Impact des mutations générées dans LST8 sur les fonctions biologiques de la levure

Enfin pour les mutants générés, c'est-à-dire, YCplac111-LST8-S33A-Myc, YCplac111-LST8-G181D-Myc et YCplac111-LST8-T201D-Myc ainsi que YEplac181-LST8-S33A-Myc, YEplac181-LST8-G181D-Myc et YEplac181-LST8-T201D-Myc (présenté en annexe) on veut voir le profil qu'ils présentent lors de leurs expositions à la spermine et à l'arsénite de sodium.

La mutation de la sérine 33 en alanine (S33A) est une mutation d'un acide aminé polaire neutre (sérine) en un acide aminé non-polaire (alanine). Si cette sérine s'avère être un site de phosphorylation pour le bon fonctionnement ou repliement de Lst8, celle-ci ne pourra pas se faire avec l'alanine puisqu'elle ne contient aucun groupement hydroxyle pouvant être phosphorylé. Cette mutation pourrait entraîner un dysfonctionnement de Lst8.

Tout comme la mutation S33A, la mutation de la thréonine 201 en de l'acide aspartique (T201D), soit un acide aminé polaire neutre (thréonine) par un acide aminé polaire

chargé négativement (acide aspartique), peut potentiellement être un site de phosphorylation qui sera altéré. A titre de comparaison, une mutation de T201A entraînerait une mimique de phosphorylation, qui donnerait une apparence de phosphorylation perpétuelle de cet acide aminé. Donc les mutations T201D et T201A devraient avoir des résultats opposés. Il serait intéressant de réaliser ces deux mutations et de comparer les profils qu'on obtiendra.

Enfin la mutation de la glycine 181 en acide aspartique (G181D), soit un acide aminé neutre par un acide aminé polaire chargé négativement (D) et surtout qui n'ont pas la même longueur de chaîne latérale, pourrait affecter la structure de Lst8. Nous avons choisi d'effectuer cette mutation car la mutation G181E a déjà été réalisé dont la conséquence est une perturbation de la production des protéines GTR1 et GTR3 (Zhengchang Liu, Sekito, B.Epstein, & A.Butow). Nous avons donc voulu voir si la mutation G181D que nous avons choisi de faire aller avoir le même impact.

La charge négative de l'acide aspartique dans les mutations T201D et G181D peut affecter la conformation de la structure secondaire et aussi la tertiaire de Lst8. Il serait donc intéressant d'observer les conséquences de ces mutations sur Lst8 et TORC1. Plusieurs expériences, y compris les précédentes sont à envisager; en effet, des tests en gouttes pour la résistance seront à réaliser avec les mutants puis comparer aux souches BY4741, *lst8-DAmP* et *tor1Δ*. Ensuite, en utilisant différents temps, plus ou moins longs allant de quelques minutes à des heures, des traitements à la spermine, l'arsénite de sodium et la spermidine seront envisagés. Les protéines et ARNm des souches ayant subi les traitements préalables seront extraits et utilisés pour les *Western blot* sur gel SDS-PAGE, les *Northern blot*, une co-immunoprécipitation et des immunobuvardages pour une révélation au nitrate d'argent. Des tests de survies seraient aussi intéressant à effectuer, avec une prise de densité optique ( $A_{600}$ ) toutes les 2 ou 3 h pendant 24 h, encore une fois pour voir les effets que peuvent avoir les mutations générées sur la

cellule. Enfin, étant donné que le plasmide YCplac111 à un centromère monomérique comparativement à celui de YEplac181 (2 microns) des différences dans les résultats sont attendues.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

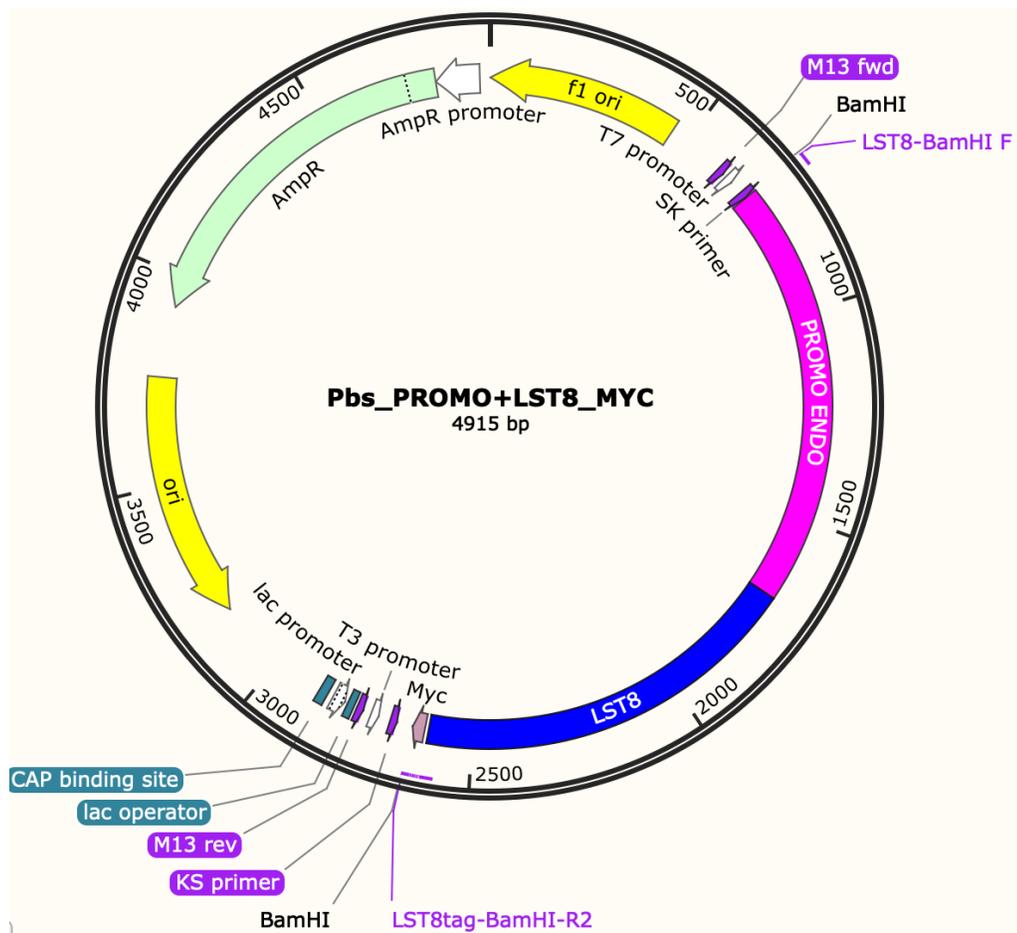
Plusieurs expériences complémentaires sont à envisager afin d'observer les effets des concentrations élevées des polyamines sur les différentes souches de levures utilisées. En effet, bien qu'il n'y ait pas de contrôle de chargement, le gel traité au nitrate d'argent présente une augmentation de certaines protéines de la souche *lst8-DAmP* au fur et à mesure que le traitement à la spermine s'étend dans le temps. Ceci expliquerait l'hypothèse émise précédemment, quant à la possibilité que d'autres systèmes protéiques prenaient le relais lorsque la quantité de Lst8 n'est pas suffisante. Un renouvellement de cette expérience avec un contrôle de chargement serait impératif afin de confirmer nos résultats. De plus, s'il s'avère que l'augmentation des protéines dans la souche *lst8-DAmP* est vraiment due au traitement à la spermine, il serait intéressant d'identifier certaines de ces protéines par spectrométrie de masse car elles seraient peut-être à l'origine de la résistance de la souche *lst8-DAmP* à la spermine.

Il serait aussi intéressant d'observer le comportement d'une souche *lst8-DAmP-sam3Δ dur3Δ* versus nos souches mutantes actuelles, *lst8-DAmP* et *tor1Δ*, afin de voir si la faible quantité de Lst8 et de TORC1 influencent ou pas, les transporteurs Sam3 et Dur3. Une quantification des ARNm et des protéines Sam3 et Dur3 dans les différentes souches utilisées nous renseignerait dans quelles souches le transport des polyamines est altéré. Une quantification des ARNm totaux des différentes souches et mutants serait aussi une expérience à envisager afin de comparer et de voir les différences qu'il peut y avoir dans les niveaux d'ARN de chaque souche, des PCR en temps réel (qPCR) et des *Northern Blot* sont donc à prévoir pour la suite de ce projet de recherche. Enfin, il faudrait aussi envisager de reproduire les expériences réalisées et celles mentionnées précédemment, en utilisant d'autres polyamines comme la putrescine et la spermidine,

des analogues de polyamines ou encore des rapalogues pour les traitements des différentes souches de levures. Des traitements des cellules à des concentrations plus élevées, peut être jusqu'à 5 mM, de spermine et d'arsénite de sodium sont à prévoir. Les traitements pourront aussi être prolongés jusqu'à 2h étant donné que les souches BY4741 et les mutants utilisés doublent leur quantité environ toutes les 90 min.

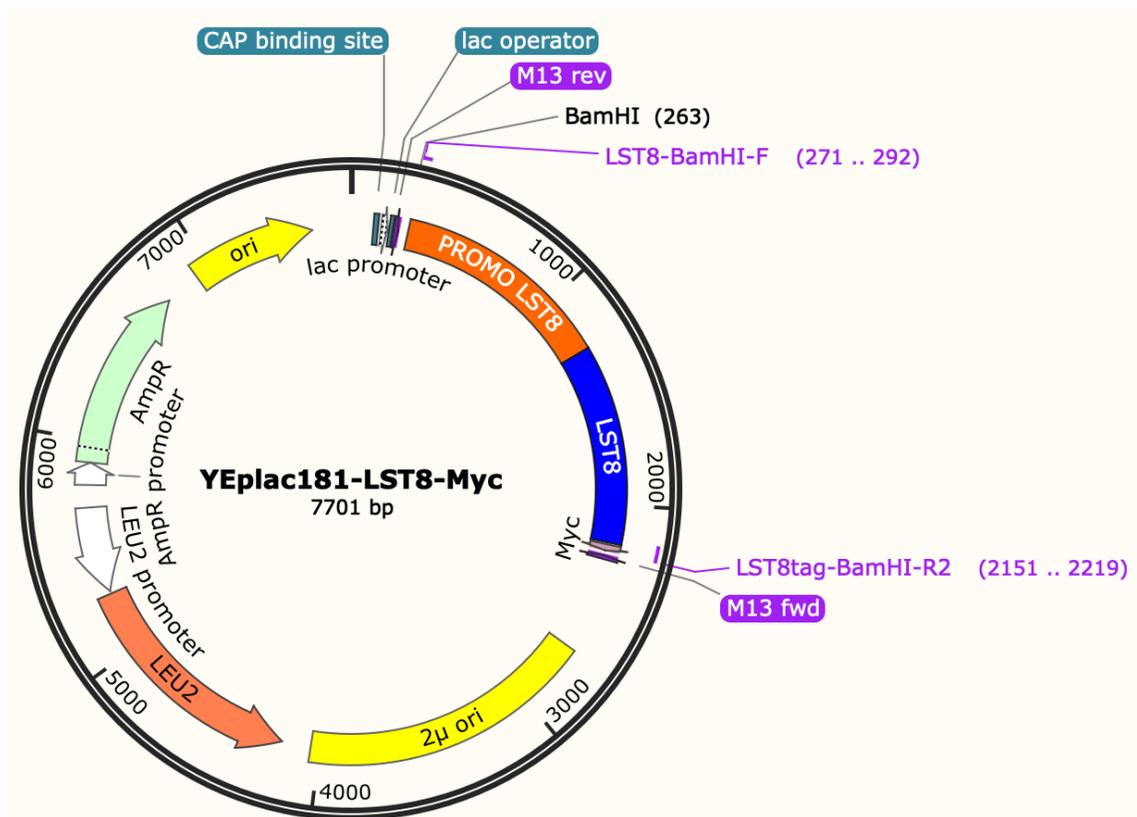
En conclusion, cette étude nous a permis d'avoir un aperçu des effets qu'avait l'utilisation de la spermine et de l'arsénite de sodium, sur la croissance de BY4741 ainsi que des mutants utilisés. Les polyamines jouent un rôle très important au sein des cellules et leur régulation est souvent altérée dans différents cancers. Alors il est intéressant d'observer les effets des autres polyamines sur ces souches de levures. Il est connu que le transport de la spermine est assuré par les transporteurs Sam3 et Dur3 mais il reste encore à être défini dans la souche *lst8-DAmP* étant donné sa résistance à de fortes concentrations de spermine, on pourrait penser que le transport est altéré dans cette souche. De manière générale, les transporteurs sont essentiels à la bonne absorption, l'efficacité et la bonne élimination des médicaments. Toute altération des transporteurs impliqués dans le transport transmembranaire d'un médicament impactera la réponse d'une cellule à celui-ci. Cela démontre l'importance que l'étude des transporteurs peut avoir. Les différentes complémentaires à réaliser devraient nous en apprendre plus au sujet du transport des polyamines dans les différentes souches étudiées.

Carte du plasmide pBS II KS dans lequel le promoteur endogène et le gène *LST8* comportant une étiquette Myc ont été introduit



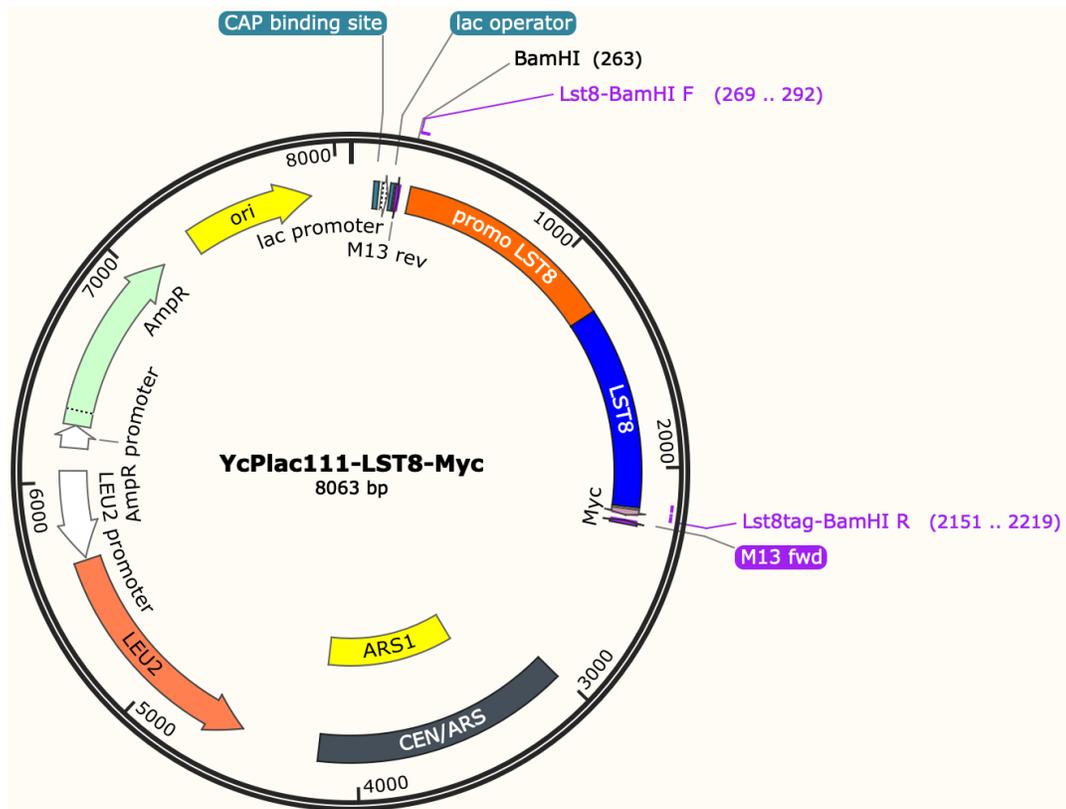
ANNEXE B

Carte du plasmide YEplac181 dans lequel le promoteur endogène et le gène *LST8* comportant une étiquette Myc ont été introduit



## ANNEXE C

CARTE DU PLASMIDE YCPLAC111 DANS LEQUEL LE PROMOTEUR ENDOGÈNE ET LE GÈNE LST8 COMPORTANT UNE ÉTIQUETTE MYC ONT ÉTÉ INTRODUIT



## ANNEXE I

Les constructions générées sont nommées : pBS-LST8; pBS-LST8-myc; pBS-LST8-3'UTR; pBS-LST8-S33A-myc, pBS-LST8-G181-myc; pBS-LST8-T201D-myc; YCplac111-LST8; YCplac111-LST8-myc; YCplac111-LST8-3'UTR; YCplac111-LST8-S33A-myc; YCplac111-LST8-G181D-myc; YCplac111-LST8-T201D-myc;

## BIBLIOGRAPHIE

- Abdulhussein, A. A., & Wallace, H. M. (2014). Polyamines and membrane transporters. *Amino Acids*, *Vol 46* : 655-660. doi:10.1007/s00726-013-1553-6
- Andre, B. (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *Vol 11* : 1575-1611. doi:10.1002/yea.320111605
- Aouida, M., & Ramotar, D. (2018). Identification of essential yeast genes involved in polyamine resistance. *Gene*, *Vol 677*: 361-369. doi:10.1016/j.gene.2018.08.066
- Aouida, M., Rubio-Teixeira, M., Thevelein, J. M., Poulin, R., & Ramotar, D. (2013). Agp2, a member of the yeast amino acid permease family, positively regulates polyamine transport at the transcriptional level. *PLoS One*, *Vol 8*: e65717. doi:10.1371/journal.pone.0065717
- Bandi, H. R., Ferrari, S., Krieg, J., Meyer, H. E., & Thomas, G. (1993). Identification of 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites in swiss mouse 3T3 fibroblasts stimulated with serum. *The Journal of Biological Chemistry*, *Vol 268*: 4530-4533.
- Banerjee, P., Ahmad, M. F., Grove, J. R., Kozlosky, C., Price, D. J., & Avruch, J. (1990). Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated70-kDa S6 protein kinase. *Biochemistry*, *Vol 87*: 8550-8554.
- Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in Cell Biology*, *Vol 24*: 400-406. doi:10.1016/j.tcb.2014.03.003
- Baxter, A. A., Poon, I. K. H., & Hulett, M. D. (2017). The plant defensin NaD1 induces tumor cell death via a non-apoptotic, membranolytic process. *Cell Death Discovery*, *Vol 3*: 16102. doi:10.1038/cddiscovery.2016.102

Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., & Hall, M. N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery*, *Vol 10*(11): 868-880. doi:10.1038/nrd3531. (Accession No. 22037041)

Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Perrine-Walker, F., Vasa, S., Burns, R. L., van der Weerden, N. L., & Anderson, M. A. (2014). Agp2p, the plasma membrane transregulator of polyamine uptake, regulates the antifungal activities of the plant defensin NaD1 and other cationic peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *Vol 58*(5): 2688-2698. doi:10.1128/AAC.02087-13

Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, *Vol 369*(6483): 756-758. doi:10.1038/369756a0

Cancer, C. c. d. s. c. s. l. (2019). Statistiques canadiennes sur le cancer 2019. Retrieved from <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/canadian-cancer-statistics/past-editions-canadian-cancer-statistics/?region=qc>

Cargnello, M. (2014). *Régulation du métabolisme des ARNm par les voies de signalisation MAPK et mTOR*. (PhD). Université de Montréal, Retrieved from <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/11767>

Casero, R. A., Jr., Murray Stewart, T., & Pegg, A. E. (2018). Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, *Vol 18*(11): 681-695. doi:10.1038/s41568-018-0050-3

Catena, V., & Fanciulli, M. (2017). Deptor: not only a mTOR inhibitor. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *Vol 36*(1): 12. doi:10.1186/s13046-016-0484-y

Chasse, H. (2015). Régulation traductionnelles de l'embryon précoce d'oursin; recrutement des ARNm dans les polysomes à la fécondation. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. NNT: 2015PA066503

Crespo-Sempere, A., Estiarte, N., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2015). Targeting *Fusarium graminearum* control via polyamine enzyme inhibitors and

polyamine analogs. *Food Microbiology*, Vol 49: 95-103.  
doi:10.1016/j.fm.2015.01.020

Donaton, M. C., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Zeebroeck, G., Crauwels, M., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, Vol 50(3): 911-929.  
doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03732.x

Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E., & Pagano, M. (2006). S6K1-and  $\beta$ TRCP-Mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, Vol 314: 467-471

Dowling, R. J. O., Topisirovic, I., Alain, T., Bidinosti, M., Fonseca, B. D., Petroulakis, E., Sonenberg, N. (2010). mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science (New York, N.Y.)*, Vol 328 (5982): 1172-1176. doi:10.1126/science.1187532

Dreyer, C., Raymond, E., & Faivre, S. (2009). La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. *Cancéro digest*, Vol 1(3). doi:10.4267/2042/28434

Duran, A., Amanchy, R., Linares, J. F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Diaz-Meco, M. T. (2011). p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Molecular Cell*, Vol 44(1): 134-146. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.038

ElBerry, H. M., Majumdar, M. L., Cunningham, T. S., Sumrada, R. A., & Cooper, T. G. (1993). Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, Vol 175(15): 4688-4698.  
doi:10.1128/jb.175.15.4688-4698.1993

Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*, (38): 1918. doi:10.3791/1918

Falasca, M., & Maffucci, T. (2012). Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochemical Journal*, Vol 443(3): 587-601. doi:10.1042/BJ20120008

Falcon, B.L., Barr, S., Gokhale, P.C., Chou, J., Fogarty, J., Depeille, P., Miglarese, M., Epstein, D.M., McDonald, D.M., 2011. Reduced VEGF Production, Angiogenesis, and Vascular Regrowth Contribute to the Antitumor Properties of Dual mTORC1/mTORC2 Inhibitors. *Cancer Research*, Vol 71: 1573–1583. doi:10.1158/0008-5472.can-10-3126

García-Martínez, J. M., Moran, J., Clarke, R. G., Gray, A., Cosulich, S. C., Chresta, C. M., & Alessi, D. R. (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochemical Journal*, Vol 421(1): 29-42. doi:10.1042/bj20090489

Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, Vol 20(6): 1425. doi:10.1093/nar/20.6.1425

Gu, J. (2012). *Primary Liver Cancer: Challenges and Perspectives* (G. Jianren Ed. Springer ed.).

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, Vol 166(4): 557-580. doi:10.1016/s0022-2836(83)80284-8

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.-P., Kozlowski, M. T., Belham, C., & Avruch, J. (1998). Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, Vol 273(23): 14484-14494. doi:10.1074/jbc.273.23.14484

Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (1999). Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochemical Journal*, Vol 344: 633-642.

Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol 48(7): 506-512. doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.017

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *Vol 461*(7267): 1071-1078. doi:10.1038/nature08467

Johannessen, C. M., Johnson, B. W., Williams, S. M., Chan, A. W., Reczek, E. E., Lynch, R. C., Cichowski, K. (2008). TORC1 is essential for NF1-associated malignancies. *Current Biology*, *Vol 18*(1): 56-62. doi:10.1016/j.cub.2007.11.066

Korhonen VP, Niiranen K, Halmekytö M, Pietilä M, Diegelman P, Parkkinen JJ, Eloranta T, Porter CW, Alhonen L, Jänne J. Spermine deficiency resulting from targeted disruption of the spermine synthase gene in embryonic stem cells leads to enhanced sensitivity to antiproliferative drugs. *Molecular Pharmacology*. 2001 Feb; vol 59(2): 231-8. doi: 10.1124/mol.59.2.231. PMID: 11160858.

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, *Vol 122*(Pt 20): 3589-3594. doi:10.1242/jcs.051011

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, *Vol 149*(2): 274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017

Lay, F. T., Mills, G. D., Poon, I. K., Cowieson, N. P., Kirby, N., Baxter, A. A., Hulett, M. D. (2012). Dimerization of plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity. *Journal of Biology Chemistry*, *Vol 287*(24): 19961-19972. doi:10.1074/jbc.M111.331009

Liu, Y., Liu, N., Wu, D., Bi, Q., & Meng, S. (2015). The longevity of tor1Delta, sch9Delta, and ras2Delta mutants depends on actin dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell and Bioscience*, *Vol 5*: 18. doi:10.1186/s13578-015-0008-z

Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Stadler, D., Heikenwalder, M., & Protzer, U. (2014). [Specific degradation of nuclear hepatitis B virus covalently closed circular DNA]. *Medecine Sciences (Paris)*, *Vol 30*(8-9): 724-726. doi:10.1051/medsci/20143008003

- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol 10(5): 307-318. doi:10.1038/nrm2672
- Ma, X. M., Yoon, S. O., Richardson, C. J., Julich, K., & Blenis, J. (2008). SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*, Vol 133(2): 303-313. doi:10.1016/j.cell.2008.02.031
- Magnuson, B., Ekim, B., & Fingar, D. C. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochemical Journal*, Vol 441(1): 1-21. doi:10.1042/BJ20110892
- Malek, M., Kielkowska, A., Chessa, T., Anderson, K. E., Barneda, D., Pir, P., Stephens, L. R. (2017). PTEN Regulates PI(3,4)P2 Signaling Downstream of Class I PI3K. *Molecular Cell*, Vol 68(3): 566-580 e510. doi:10.1016/j.molcel.2017.09.024
- Menon, S., & Manning, B. D. (2008). Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, Vol 27 Suppl 2 : S43-51. doi:10.1038/onc.2009.352
- Meyuhas, O. (2008). Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 268: 1-37. doi:10.1016/s1937-6448(08)00801-0
- Meyuhas, O., & Dreazen, A. (2009). Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol 90: 109-153. doi:10.1016/s1877-1173(09)90003-5
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., 2011. Polyamines in aging and disease. *Aging*, Vol 3 (8): 716–732.. doi:10.18632/aging.100361
- Nascimento, E. B., & Ouwens, D. M. (2009). PRAS40: target or modulator of mTORC1 signalling and insulin action? *Archives of Physiology and Biochemistry*, Vol 115(4): 163-175. doi:10.1080/13813450902988580

National Center for Biotechnology. Sodium arsenite, CID=443495. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-arsenite>

Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Murphy, L. O. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, Vol 136(3): 521-534. doi:10.1016/j.cell.2008.11.044

Nowotarski, S. L., Woster, P. M., & Casero, R. A., Jr. (2013). Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Vol 15: e3. doi:10.1017/erm.2013.3

Nozawa, A., Takano, J., Kobayashi, M., von Wirén, N., & Fujiwara, T. (2006). Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol 262(2): 216-222. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00395.x

Pegg, A. E. (2014). The function of spermine. *IUBMB Life*, Vol 66(1): 8-18. doi:10.1002/iub.1237

Pendeville, H., Carpino, N., Marine, J. C., Takahashi, Y., Muller, M., Martial, J. A., & Cleveland, J. L. (2001). The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Molecular and Cell Biology*, Vol 21(19): 6549-6558. doi:10.1128/mcb.21.19.6549-6558.2001

Peron, A., Spaccini, L., Norris, J., Bova, S. M., Selicorni, A., Weber, G., Mastrangelo, M. (2013). Snyder-Robinson syndrome: a novel nonsense mutation in spermine synthase and expansion of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*, Vol 161A(9): 2316-2320. doi:10.1002/ajmg.a.36116

Petroulakis, E., Parsyan, A., Dowling, R. J., LeBacquer, O., Martineau, Y., Bidinosti, M., Sonenberg, N. (2009). p53-dependent translational control of senescence and transformation via 4E-BPs. *Cancer Cell*, Vol 16(5): 439-446. doi:10.1016/j.ccr.2009.09.025

- Qin, X., Jiang, B., & Zhang, Y. (2016). 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*, Vol 15(6): 781-786. doi:10.1080/15384101.2016.1151581
- Regenberg, B., Düring-Olsen, L., Kielland-Brandt, M. C., & Holmberg, S. (1999). Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, Vol 36: 317-328.
- Robert, J., & Thévenin, M. (2009). *L'angiogenèse* (E. J. L. E. Montrouge France; Surrey Ed.); p 35
- Roux, P. P., & Topisirovic, I. (2012). Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol 4(11) . doi:10.1101/cshperspect.a012252
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, Vol 22(2): 159-168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, Vol 168(6): 960-976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004
- Schreve, J. L., & Garrett, J. M. (2004). Yeast Agp2p and Agp3p function as amino acid permeases in poor nutrient conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol 313(3): 745-751. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.172
- Seiler, N., & Moulinoux, J.-P. (1996). Les polyamines présentent-elles un intérêt dans le traitement du cancer ? *Médecine/Sciences*, Vol 12: 745-755.
- Simoneau, A. R., Gerner, E. W., Phung, M., McLaren, C. E., & Meyskens, F. L., Jr. (2001).  $\alpha$ -Difluoromethylornithine and Polyamine Levels in the Human Prostate: Results of a Phase IIa Trial. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Vol 93(1): 57-59. doi:10.1093/jnci/93.1.57

- Soussi, T. (2000). Cycle cellulaire et apoptose : le gène suppresseur de tumeur p53. *Médecine/Sciences, Vol 16*: 469-472.
- Spence, K. D. (1971). Mutation of *Saccharomyces cerevisiae* preventing uptake of S-adenosylmethionine. *Journal of Bacteriology, Vol 106*(2): 325-330.
- Tavares, M. R., Pavan, I. C., Amaral, C. L., Meneguello, L., Luchessi, A. D., & Simabuco, F. M. (2015). The S6K protein family in health and disease. *Life Sciences, Vol 131*: 1-10. doi:10.1016/j.lfs.2015.03.001
- Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Gray, N. S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *Journal of Biological Chemistry, Vol 284*(12): 8023-8032. doi:10.1074/jbc.M900301200
- Uemura, T., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2007). Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry, Vol 282*(10): 7733-7741. doi:10.1074/jbc.M611105200
- Uemura, T., Tachihara, K., Tomitori, H., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2005). Characteristics of the polyamine transporter TPO1 and regulation of its activity and cellular localization by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry, Vol 280*(10): 9646-9652. doi:10.1074/jbc.M410274200
- Vezina, C., Kudelski, A., & Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics, Vol 28* (10): 721-726.
- Wallace, H. M. (2009). The polyamines: past, present and future. *Essays in Biochemistry, Vol 46*: 1-9. doi:10.1042/bse0460001
- Wander, S. A., Hennessy, B. T., & Slingerland, J. M. (2011). Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *Journal of Clinical Investigation, Vol 121*(4): 1231-1241. doi:10.1172/JCI44145

Wang, X., Wei, L., Michayla, W., Naohiro, T., Dario, R. A., & G, P. C. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase. *The EMBO Journal*, Vol 20: 4370-4379.

Wolpert, L., Tickle, C., Arias, A. M., Lawrence, P., Lumsden, A., Robertson, E., & Smith, J. (2015). *Biologie du développement : les grands principes*. (F. Jean, Trans. Dunod Ed. 5e édition.

Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., & Pavletich, N. P. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, Vol 497(7448): 217-223. doi:10.1038/nature12122

Yip, C. K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D. M., & Kang, S. A. (2010). Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular Cell*, Vol 38(5): 768-774. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.017

Yu, K., Shi, C., Toral-Barza, L., Lucas, J., Shor, B., Kim, J. E., Gibbons, J. J. (2010). Beyond rapalog therapy: preclinical pharmacology and antitumor activity of WYE-125132, an ATP-competitive and specific inhibitor of mTORC1 and mTORC2. *Cancer Research*, Vol 70(2): 621-631. doi:10.1158/0008-5472.Can-09-2340

Zhang, L., Yan, J., Vatamaniuk, O. K., & Du, X. (2016). CsNIP2;1 is a Plasma Membrane Transporter from *Cucumis sativus* that Facilitates Urea Uptake When Expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, Vol 57(3): 616-629. doi:10.1093/pcp/pcw018

Zhengchang Liu, Sekito, T., B.Epstein, C., & A.Butow, R. RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *The EMBO Journal*, Vol 20: 7209-7219.