

Université de Montréal

**L'exploitation d'un modèle de levure présentant une déficience de
l'absorption des anthracyclines révèle qu'une protéine de
Caenorhabditis elegans, OCT-1, est un transporteur fonctionnel
d'anthracyclines**

Par

Nicolas Brosseau

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté de Médecine

En vue de l'obtention du grade de maîtrise en Sciences biomédicales

Option générale

© Nicolas Brosseau, 2016

Résumé

Les anthracyclines, comme la doxorubicine (DOX) ou la daunorubicine (DNR), sont utilisées dans le traitement d'une grande variété de cancers allant des lymphomes, au cancer du sein, en passant par certaines leucémies. Encore aujourd'hui, beaucoup pensent que les anthracyclines entrent dans les cellules par diffusion passive, toutefois, la plupart de ces mêmes personnes sont d'accord pour dire que la p-glycoprotéine est responsable d'exporter ces molécules hors de la cellule. Mais pourquoi une molécule aurait besoin d'un transporteur pour sortir de la cellule, et pas pour y entrer ? Qu'est-ce qui ferait que la diffusion passive fonctionnerait dans un sens, mais pas dans l'autre, d'autant que l'entrée des anthracyclines dans les cellules est très rapide ? Nous pensons qu'il existe bel et bien un transporteur responsable de faire passer les anthracyclines du milieu extracellulaire au cytoplasme, et nous voulons développer un modèle de levure qui permettrait de déterminer si une protéine, un transporteur, issue d'un autre organisme eucaryote est en mesure de transporter la DOX à l'intérieur de la cellule. Pour ce faire, nous avons rassemblé un groupe de mutants présentant une déficience dans l'absorption d'autres molécules chargées positivement telles que la bléomycine ou le NaD1 et avons déterminé le taux d'absorption de DOX de chacun de ces mutants. Les simples mutants *sam3Δ* ou *dur3Δ* n'ont montré qu'une faible réduction de l'absorption de DOX, voire, aucune, par rapport à la souche parentale. Si le double mutant *sam3Δdur3Δ* a montré une réduction relativement importante de l'absorption de DOX, c'est le mutant *agp2Δ* qui présentait la plus grande réduction d'absorption de DOX, ainsi qu'une résistance notable à son effet létal. Nous avons utilisé, par la suite, ce mutant pour exprimer, à l'aide d'un vecteur d'expression, une protéine du ver *Caenorhabditis elegans*, OCT-1 (CeOCT-1). Les résultats ont montré que cette protéine était en mesure de restaurer l'absorption de DOX,

compromise chez le mutant *agp2Δ* ainsi que d'augmenter la sensibilité de la souche parentale à son effet létal, lorsqu'exprimée chez celle-ci. Cela suggère que CeOCT-1 est un transporteur fonctionnel de DOX et contredit également le dogme selon lequel les anthracyclines entrent dans les cellules par diffusion passive.

Mots clés : Levure, *Caenorhabditis elegans*, Traitement contre le cancer, Doxorubicine, Transporteurs, OCT-1, Uptake

Abstract

Anthracyclines such as doxorubicin (DOX) or daunorubicin (DNR) are used for treatment of a wide variety of cancers from lymphomas to breast cancer going through some leukemia. Still today, several people think that anthracyclines enter cells through passive diffusion, but these same people believe that the p-glycoprotein is involved in efflux of anthracyclines. We think that there is a transporter responsible for uptake of anthracyclines by cells and we want to develop a yeast model that would allow us to determine if protein from another eukaryote organism could be able to transport DOX into yeast cells. In order to do that, we gathered a group of mutants that are already known to be resistant to other positively charged molecules such as bleomycin and NaD1 and determined their ability to take up DOX. The simple mutants *sam3Δ* or *dur3Δ* showed no or slight decrease of DOX compared to parent. If the double mutant *sam3Δdur3Δ* showed rather significant uptake decrease, it is the *agp2Δ* that showed the greater decrease in DOX uptake as a resistance to its lethal effect. We used that mutant to express a protein from the worm *Caenorhabditis elegans*, OCT-1 (CeOCT-1). The results showed that this protein was able restore back the uptake of DOX that was compromised in *agp2Δ* and was also able to increase the sensitivity of the parent to its lethal effect. This leads us to believe that CeOCT-1 is functional transporter for DOX and goes against the dogma wherein anthracyclines enter the cells through passive diffusion.

Key Words: Yeast, *Caenorhabditis elegans*, Doxorubicine, Transporter, OCT-1, Uptake

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	Erreur ! Signet non défini.
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
CHAPITRE 1.....	1
1. Revue de la littérature.....	2
1.1 Le cancer et les caractéristiques d'une cellule cancéreuse.....	2
1.2 Mutations et oncogène.....	3
1.3 Réparation de l'ADN.....	4
1.3.1 Bris double brin (DSB).....	5
1.3.1.1 Recombinaison homologue (HR).....	7
1.3.1.2 Jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ).....	8
1.4 Réparation de l'ADN et cancer.....	9
1.5 Cancers et pronostics.....	10
1.5.1 Acute Myeloid Leukemia (AML).....	11
1.6 Les anthracyclines.....	12
1.6.1 Utilisation.....	13
1.6.2 Cinétique.....	13
1.6.3 Mode d'action.....	14
1.6.3.1 Les Topoisomérases (TOP).....	15
1.6.4 Résistance.....	16
1.6.5 Absorption.....	17
1.7 Les transporteurs.....	18
1.7.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> un modèle d'étude.....	19
1.7.1.1 NaD1.....	20

1.7.1.2	Polyamines	20
1.7.1.2.1	Putrescine	22
1.7.1.2.2	Spermidine (SPD).....	22
1.7.1.2.3	Spermine (SPM).....	23
1.7.1.3	Bleomycin (BLM)	23
1.7.1.4	Agp2.....	25
1.7.1.4.1	Hnm1	27
1.7.1.4.2	Sam3	28
1.7.1.4.3	Dur3.....	29
2.	Hypothèses et objectifs	30
2.1.	Hypothèse	30
2.2.	Objectifs.....	30
2.2.1.	Déterminer de bonnes conditions pour effectuer les tests d'absorption de DOX chez <i>S. cerevisiae</i>	30
2.2.2.	Évaluer l'absorption de DOX chez différents mutants de <i>S. cerevisiae</i> présentant des délétions pour des gènes impliqués dans l'absorption des polyamines (Fig 3).	31
2.2.3.	Exprimer un transporteur de <i>C. elegans</i> qui permettra de restaurer l'absorption de DOX chez <i>S. cerevisiae</i> dans un mutant présentant une déficience importante de l'absorption de DOX.	32
CHAPITRE 2.	33
Abstract	Erreur ! Signet non défini.
1.	Introduction	37
2.	Material and Methods	41
2.1.	Yeast strains, media and chemicals	41
2.2.	Doxorubicin uptake assay	41
2.3.	Cytometry analysis.....	42
2.4.	Epifluorescent microscopy.....	42
2.5.	DeltaVision microscopy.....	43
2.6.	RT-PCR analysis	43
2.7.	Construction of the pCeOCT-1 expression plasmid	43
2.8.	Site-Directed mutagenesis	44
2.9.	Western blot	45

2.10.	Survival assay.....	46
3.	Results.....	47
3.1.	YPD and not minimal media facilitates DOX uptake into yeast cells.....	47
3.2.	Divalent metal ions in the minimal media inhibit DOX uptake.....	50
3.3.	Yeast mutants defective in polyamine uptake are also defective in DOX uptake.....	51
3.4.	Expression of either Dur3 or Sam3 rescues DOX uptake in the <i>sam3Δdur3Δ</i> double mutant.....	54
3.5.	Expression of <i>C. elegans</i> OCT-1 rescues DOX uptake in the <i>agp2Δ</i> mutant.....	56
3.7	Expression of CeOCT-1 sensitizes the WT strain to the genotoxic effects of DOX.....	60
4.	Discussion.....	61
5.	Supporting Information.....	65
6.	Acknowledgments.....	67
7.	Author Contributions.....	67
8.	References (De l'article I).....	68
CHAPITRE 3.	72
1.	Retour sur les résultats.....	73
1.1	La DOX chez <i>S. cerevisiae</i>	73
1.2	Agp2 contrôle l'absorption de la DOX chez <i>S. cerevisiae</i>	74
1.3	L'expression de OCT-1 de <i>C. elegans</i> restaure l'absorption de la DOX chez le mutant <i>agp2Δ</i> . 76	
1.4	Faiblesses de l'étude.....	77
1.5	Forces de l'étude.....	78
2	Importance de l'étude des transporteurs.....	80
2.1	Les OCTs.....	80
2.1.1	OCT1 (SLC22A1).....	81
3	Conclusion.....	83
Références	84

Liste des figures

Figures du chapitre I

- Figure 1 Structure des anthracyclines Doxorubicine et Daunorubicine (Modifiée de *Minotti et al 2004* [1])
- Figure 2 Voie de synthèse des polyamines. (Modifiée de *Gardiner et al 2010* [2])
- Figure 3 Modèle de Agp2 régulant l'absorption des polyamines (Modifiée de *Aouida et al 2013* [3])

Figures du chapitre II

- Figure 1 Relative DOX uptake into yeast cells in rich and minimal media, and localization of the drug to the nucleus
- Figure 2 Divalent metal ions present in yeast nitrogen base inhibit DOX uptake into the cells
- Figure 3 Mutants lacking Agp2 are deficient in DOX uptake and display resistance to the drug
- Figure 4 A multicopy plasmid carrying either the entire SAM3 or DUR3 gene rescues DOX uptake in the *sam3Δdur3Δ* double mutant but not in the *agp2Δ* single mutant
- Figure 5 Expression of the native CeOCT-1, but not the variants, rescues DOX uptake in the *agp2Δ* mutant

Figures supplémentaires du chapitre II

- S Figure 1 Doxorubicin compromises DAPI staining.
- S Figure 2 Comparison of the similarities and differences amongst three organic cation transporters, *S. cerevisiae* Sam3, *C. elegans* OCT-1 and human OCT1

Liste des tableaux

Tableaux du chapitre II

Tableau 1 Oligonucleotide primers used in this study

Liste des abréviations

6-4PP	6-4 pyrimidine-pyrimidine photoproducts
Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AdoMet	S-adenosylmethionine
AINS	Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien
AGP1	high-Affinity Glutamine Permease 1
AGP2	high-Affinity Glutamine Permease 2
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AML	Acute myeloid leukemia
AP site	Apurinic/apryrimidic site
Ape1	AP endonuclease
ARN	Acide Ribonucléique
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BLM	Bléomycine
CeOCT-1	<i>Cearnorhabditis elegans</i> Organic Cation Transporter 1
COX-2	Cyclo-oxygénase 2
CPD	Cyclobutane-pyrimidine dimers
CPT	Camptothecine
DSB	Double Strand Break
DDR	DNA damage response
DNA/ADN	Acide désoxyribonucléique
DNR	Daunorubicine
DOX	Doxorubicine/Adriamycine
DUR3	Degradation of URea
eIF5A	Eukaryotic translation initiation factor A5
GST	Gène Suppresseur de Tumeur
hCT2	SLC22A16 (solute carrier family 22 member 16)
HNM1	Hyper-resistance to Nitrogen Mustard
hOCT	Human organic cation transporter
HR	Homologous recombination
MPP+	N-methyl-4-phenylpyridinium

MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1 Complex
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Non-Homologous End Joining
OAT	Organic Anion Transporter
OCT	Organic Cation Transporter
PKA	Protéine Kinase A
P-gp	Permeability glycoprotein
PTM	Passages transmembranaires
RI	Radiations Ionisantes
ROC1	Ring-box protein 1
ROS	Espèces réactives d'oxygène/Reactive oxygen species
RPA	Replication Protein A
SAM3	S-AdenosylMethionine metabolism
SLC22	Solute Carrier family 22
SPD	Spermidine
SPM	Spermine
TOP	Topoisomerase
TPO	Polyamine transporter
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wilde Type
YAP	Yeast Amino acid Permease
YPD	Yeast extract – Peptone – Dextrose yeast culture media

Remerciements

La première personne que je tiens à remercier est mon directeur de recherche, le Dr Dindial Ramotar pour son soutien et sa confiance. Je tiens également à remercier tous les membres de son laboratoire. Je veux remercier tout particulièrement Emil Andreev pour toute l'aide qu'il m'a apportée dans la conception des expériences ainsi que toutes ces idées que nous avons pu échanger au cours des mois. Je remercie aussi Arturo Papaluca pour son aide avec le microscope DeltaVision... auquel je ne comprends toujours strictement rien. Je veux aussi remercier Martine Dupuis pour son aide et son enseignement dans l'utilisation de la cytométrie en flux et Tara Harihar, notre technicienne de laboratoire, sans qui je n'aurais jamais pu trouver tout le matériel dont j'avais besoin pour réaliser toutes ces expériences.

CHAPITRE 1

Introduction

1. Revue de la littérature

1.1 Le cancer et les caractéristiques d'une cellule cancéreuse

En 2011, 72 476 décès au Canada ont été attribués au cancer. Cela en fait la principale cause de décès avec 29,9% de tous les décès, soit 10% de plus que les décès attribuables aux maladies du cœur [4]. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par certaines propriétés qui leur sont propres et qui constituent leur signature. D'abord, elles doivent acquérir la capacité de croître indépendamment des signaux de croissance. Elles peuvent le faire, soit en les produisant elles-mêmes et en induisant une stimulation autocrine/paracrine, soit en produisant un récepteur de facteurs de croissance qui est activé de façon constitutive [5]. Elles doivent également être en mesure d'échapper à l'apoptose, ce qui peut se faire, à titre d'exemple, par l'inactivation de la protéine p53, chose que l'on observe dans 50% des cancers [5, 6]. Ces deux caractéristiques impliquent que la cellule cancéreuse aura un taux de division cellulaire élevé. Normalement, à chaque division, une partie de l'extrémité des chromosomes est perdue. La présence des télomères, des répétitions d'un même motif d'acides nucléiques (TTAGGG), permet d'éviter la perte d'informations génétiques. Toutefois, ceux-ci sont limités, et la cellule meurt normalement après un certain nombre de division, mais la réactivation de la télomérase, responsable de la synthèse des télomères, dans les cellules cancéreuses, permet d'immortaliser la cellule qui peut alors se diviser sans aucune limite [5]. Cela mène à l'accumulation d'un grand nombre de cellules qui formeront éventuellement une tumeur. Or, toute cellule doit recevoir des nutriments et de l'oxygène et doit être en mesure d'évacuer ses déchets. Cela se fait par le biais de la circulation sanguine.

Dans une tumeur, le nombre croissant de cellules implique que plus de sang doit leur parvenir. Ainsi, la stimulation de l'angiogenèse, par la production de VEGF (vascular endothelial growth factor), devient importante pour les cellules cancéreuses. La dernière caractéristique faisant d'une cellule une cellule cancéreuse est sa capacité à envahir les tissus adjacents et à produire des métastases [5, 6].

1.2 Mutations et oncogenèse

L'acquisition de toutes ces caractéristiques se fait par le biais d'altérations génétiques. Le moyen le plus évident d'induire des altérations génétiques est de causer des lésions à l'ADN lui-même. Certaines lésions peuvent être induites par des processus physiologiques. Des mésappariements peuvent être introduits par l'ADN polymérase. Des bris dans les brins d'ADN peuvent survenir suite à une interruption de l'activité des topoisomérases I ou II (TOP I ou II). Mais des lésions peuvent aussi survenir lors d'exposition à certains agents, comme les métaux lourds, les ultraviolets ou les radiations ionisantes, auxquelles on peut être exposé en respirant du radon, par exemple [7]. L'inflammation chronique représente également une autre source possible de lésions. Lors d'une réaction inflammatoire, plusieurs substances sont produites par différentes cellules, au site d'inflammation, comme des cytokines, qui attirent plus de cellules inflammatoires, ou des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui vont combattre un éventuel agent pathogène, mais aussi induire des lésions sur l'ADN des cellules. Aussi, la production de prostaglandines par la COX-2 inhibe l'apoptose et stimule l'angiogenèse, la capacité

d'invasion et l'inflammation. Ainsi, les ROS augmentent les chances de mutation de l'ADN et les prostaglandines permettent aux cellules, qui devraient normalement mourir en raison des mutations qu'elles ont subies, de survivre et d'évoluer vers l'état de cellules cancéreuses. L'inhibition de la COX-2, par des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), a montré une diminution des risques de cancer en cas d'inflammation chronique [8, 9]. Toutefois, les mutations constituent des modifications dans la séquence d'acides nucléiques, mais il existe d'autres modifications qui altèrent le bon fonctionnement des gènes et qui contribuent à l'oncogenèse. Par exemple, la cellule peut perdre une de ses deux copies d'un chromosome. Si ce chromosome contient un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur (GST), qui empêchent normalement la cellule d'évoluer vers l'état de cellule cancéreuse, les risques d'apparition d'un cancer augmentent. Les GST peuvent aussi être inactivés par l'hyperméthylation de leur promoteur [5]. On peut également observer une instabilité chromosomique durant laquelle certaines parties d'un chromosome peuvent être transférées dans un autre chromosome. Cela survient entre autres lorsque les télomères de la cellule précancéreuse deviennent particulièrement courts [7].

1.3 Réparation de l'ADN

Une cellule, en temps normal, subit plusieurs dizaines de milliers de lésions de l'ADN par jour sans pourtant évoluer en cancer, et ce, parce qu'il existe un ensemble de mécanismes qui permettent de réparer ces lésions qu'on appelle : réponse aux dommages à l'ADN ou « DNA damage response » (DDR). Il existe plusieurs types de lésions possibles, les lésions

engendrées par un agent étant différentes de celles infligées par un autre. Par exemple, les UV vont engendrer des dimères cyclobutane-pyrimidine (CPDs) ou des photoproduits 6-4 pyrimidine-pyrimidine (6-4PPs) [10] alors que l'ADN polymérase II engendrera plutôt des mésappariements, en autres [7]. En raison de ce grand nombre de lésions possibles, la cellule possède plusieurs mécanismes pour les réparer, chacun ayant une affinité particulière pour un type de lésion. Ainsi, pour réparer les mésappariements, la cellule utilise la voie de la réparation des mésappariements ou « mismatch repair » et pour les bris double brin, elle utilise la DDR médiée par ATM ou « ATM-mediated DDR signaling ». Mais la voie qui permet la réparation du plus grand nombre de lésions est probablement la réparation par excision de nucléotides ou « nucleotide excision repair pathway » (NER) qui répare toutes les lésions qui distordent l'hélice d'ADN [7].

1.3.1 Bris double brin (DSB)

De toutes les lésions que l'ADN peut subir, les bris double brin sont parmi les plus dangereux pour la cellule [11]. Il s'agit du type de lésion contribuant à l'instabilité génomique observée dans les cellules cancéreuses [12, 13]. Mais les DSB sont aussi impliqués dans le vieillissement. L'induction de DSB par l'irradiation gamma ou certains agents de chimiothérapie induit une sénescence des cellules et un vieillissement prématuré. De même, des mutations sur des gènes impliqués dans la réparation des DSB induisent un vieillissement prématuré. D'un autre côté, on observe une diminution des mécanismes de réparation des DSB avec l'âge [14-19]. Toutefois, si ces lésions représentent les dommages les plus toxiques qu'une cellule peut subir, les DSB sont également essentiels à la méiose et

participent à la diversité génétique des organismes à reproduction sexuée en permettant d'échanger des fragments de séquence entre les chromatines sœurs [20, 21]. Les DSB jouent également un rôle primordial dans le développement des lymphocytes en favorisant la diversité des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T [11]. Ces lésions sont reconnues par la cellule grâce au complexe MRN, composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1 (Xrs2 chez la levure), dont le recrutement est la première étape dans la réparation de ces lésions, et induit le point de contrôle durant lequel la cellule cesse de progresser dans le cycle cellulaire, le temps de réparer les lésions [13, 22-24]. Plusieurs choses peuvent causer des DSB, comme les anthracyclines [25], ou les radiations ionisantes (RI). En temps normal, un être humain est constamment exposé aux RI, que ce soit dans le domaine médical (rayons X) ou industriel. Même le sol dégage des RI sous forme de radon [26]. La dangerosité des DSB et l'impossibilité d'éviter les sources de DSB accroissent la nécessité d'une voie de réparation de ces lésions. Les principales voies de réparation sont : la recombinaison homologue (HR) et la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) [13, 27]. Dans les deux cas, c'est le complexe MRN qui agit comme senseur des DSB. S'en suivent le recrutement et l'activation de ATM [28] qui va phosphoryler Chk2, H2AX et d'autres protéines. Plusieurs autres protéines sont impliquées comme 53BP1 et Artémis dont le recrutement, la nécessité et la fonction dépendent de la phase du cycle cellulaire et de la région (euchromatine vs hétérochromatine), mais l'on observe trois effets principalement : le recrutement des protéines impliquées dans le processus de réparation, le remodelage de la chromatine pour rendre le site accessible et l'induction du point de contrôle [11, 23, 24, 29-37].

1.3.1.1 Recombinaison homologue (HR)

La HR est le mode de réparation des DSB qui permet d'éviter d'introduire des mutations dans le génome et de réparer les DSB le plus fidèlement possible. C'est ce processus qui est impliqué dans le partage de séquences d'ADN entre les chromosomes homologues, lors de la méiose [20]. La HR est un processus lent qui n'est utilisé, chez les mammifères, que pour réparer 15% des DSB [24, 38], particulièrement en phase S/G2 du cycle cellulaire [39]. Les levures, toutefois, utilisent presque exclusivement cette voie pour réparer les DSB [23]. La HR commence par la dégradation 5'→3' de l'un des deux brins sur les deux extrémités du DSB par des endonucléases, comme le complexe MRN associé à CtIP chez l'humain (MRX associé à Sae2 chez la levure), Exo1 ou Dna2. La production d'ADN simple brin, qui empêche alors la lésion d'être réparée par la NHEJ [20], induit le recrutement de RPA. Rad 52 remplace alors RPA par Rad51 [25, 40, 41]. Ce processus de remplacement est lent, probablement en raison de l'interférence causée par RPA [42]. Rad51 forme des filaments nucléoprotéiques sur l'extrémité 3' libre qui envahissent l'ADN homologue (le plus souvent, il s'agit de la chromatine sœur) pour former une D-loop. Rad54 retire alors Rad51 de l'ADN une fois l'alignement avec l'ADN homologue effectuée [42]. S'en suit alors une synthèse d'ADN en utilisant l'extrémité 3' comme amorce et l'ADN homologue comme modèle. Il se forme alors des jonctions de Holliday caractérisées par la formation d'une structure à quatre brins d'ADN [20, 40]. Ces jonctions sont alors défaites par des résolvases dont l'orientation et la nature décideront s'il y a échange ou non de brin d'ADN entre les chromatines sœurs. La D-loop peut aussi être dissoute avant la fin de la synthèse d'ADN évitant ainsi la formation de jonctions Holliday [20, 41].

1.3.1.2 Jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)

La NHEJ représente la voie de réparation des DSB la plus active chez les mammifères [29], mais elle induit souvent des erreurs dans la séquence d'ADN et a donc parfois un effet mutagène. Les mutations induites par le NHEJ sont multiples et variées en raison des caractéristiques propres à chaque DSB, mais surtout en raison du grand nombre d'actions possibles des nucléases, des polymérases et des ligases impliquées dans cette voie. Le tout commence par le recrutement de Ku [43]. Cette protéine sert au recrutement de différentes autres protéines nécessaires à la réparation du DSB. Toutefois, l'identité et l'ordre de recrutement des protéines peuvent varier. Trois types de protéines peuvent être recrutés : les endonucléases, les polymérases et les ligases [39]. Différentes nucléases peuvent être recrutées en fonction de l'état de la lésion. Par exemple, Fen-1 est requise lorsqu'il y a des « 5' flap » ou des extrémités 5' simple brin [23]. En cas de formation de structure en épingle à cheveux, Artémis est la protéine qui vient retirer cette structure [44]. C'est ce qu'on appelle le « nettoyage » de la lésion. Les cas mentionnés ne sont que des exemples. Une fois le nettoyage terminé, si nécessaire, différentes polymérases peuvent être recrutées, chacune ayant une façon bien à elle d'insérer les nucléotides. Les polymérases λ , β et μ peuvent remplir un espace dans un espace simple brin qui peut être créé, par exemple, si la ligation a lieu avant cette étape. Les polymérases λ et μ peuvent remplir des espaces sur deux brins opposés s'il se trouve au moins une paire de bases complémentaires entre les deux espaces. D'autres polymérases peuvent aussi ajouter des nucléotides sur les extrémités libres des DSB avec l'aide de Loop1 et H329 [45]. En ce qui a trait aux ligases, la ligase XRCC4 : DNA ligase IV est la principale ligase de la NHEJ. Cette ligase démontre une grande

polyvalence. En considérant, par exemple, que les extrémités 3' des deux côtés de la DSB soient simple brin et que, lorsque superposées, elles présentent deux paires de nucléotides complémentaires, la XRCC4 : DNA ligase IV peut induire la ligation indépendamment de l'état des extrémités 5' [39, 43]. Cette grande variabilité représente un atout dans la production des immunoglobulines et des TCR des lymphocytes, par exemple [39]. C'est, en effet, la NHEJ qui est responsable de réparer les DSB produits lors du réassemblage des séquences génétiques qui coderont pour les immunoglobulines et les TCR spécifiques à chaque lymphocyte [46]. La voie utilisant Ku et la XRCC4 : DNA ligase IV est la voie rapide du NHEJ alors que la voie lente utilise ATM, Artémis le complexe MRN, 53PB1 et plusieurs autres [47].

1.4 Réparation de l'ADN et cancer

Malgré tous ces systèmes de réparation de l'ADN, il arrive que cela ne soit pas suffisant et que les mutations s'accumulent malgré tout, transformant la cellule en cellule cancéreuse. Toutefois, les gènes codant pour les protéines de réparation de l'ADN peuvent également subir des mutations et être inactivés. Cela augmentera l'instabilité du génome et favorisera l'oncogenèse [48]. Ainsi, les protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN constituent des GST. [7, 10, 49]. Mais, si les déficiences des mécanismes de réparation de l'ADN constituent l'un des facteurs contribuant au développement du cancer, elles constituent également leur faiblesse. En effet, en dehors des

chirurgies, l'utilisation d'agents génotoxiques, comme les radiations ou les chimiothérapies, constitue la méthode la plus répandue pour traiter les cancers. Les cellules cancéreuses répliquent leur ADN plus fréquemment et plusieurs agents de chimiothérapie s'en prennent directement à la fourche de réplication pour induire des lésions sur l'ADN ce qui permet à ces agents de mieux cibler les cellules cancéreuses plutôt que les cellules saines. Ainsi, l'induction de lésions sur l'ADN représente un bon moyen de lutter contre les cellules cancéreuses puisqu'elles y sont plus sensibles et qu'elles ont plus de difficulté à les réparer. Cela signifie également que les cellules cancéreuses ayant conservé un bon système de réparation de l'ADN seront plus résistantes à la radiothérapie et aux chimiothérapies [7].

1.5 Cancers et pronostics

Si l'apparition d'un cancer passe toujours par l'accumulation de mutations dans une cellule, tous les cancers ne sont pas identiques. De fait, les traitements et les pronostics varient d'un cancer à l'autre. Par exemple, le lymphome de Hodgkin se soigne avec un traitement combiné d'adriamycine, de bléomycine, de vinblastine et de dacarbazine avec un taux de rémission se situant à plus de 85% [50, 51]. D'un autre côté, les patients souffrant d'un cancer du poumon voient leur pronostic descendre jusqu'à 10%. Toutefois, pour le même traitement combinant la cisplatine et la pemetrexed on observe une réponse bien différente en fonction du type de cellules composant la tumeur pulmonaire [52].

1.5.1 Acute Myeloid Leukemia (AML)

L'AML est la forme de leucémie aiguë la plus commune [53], et le second cancer hématopoïétique le plus fréquent [53, 54]. Il s'agit d'une anomalie des cellules souches myéloïdes qui prolifèrent sans être capables de poursuivre leur différenciation, rendant impossible la production de cellules hématopoïétiques [55]. Ces cellules non différenciées s'accumulent dans la moelle osseuse et se retrouvent, éventuellement, dans la circulation sanguine sans être en mesure d'accomplir les fonctions d'une cellule pleinement différenciée [56]. Il en résulte des hémorragies sévères en raison du manque de cellules impliquées dans la coagulation, ainsi que de graves infections par manque de leucocytes [55]. Aujourd'hui encore, le principal traitement de l'AML est une combinaison d'anthracyclines et de cytarabine, un analogue de nucléotide [53, 57]. Deux composantes majeures viennent compromettre l'efficacité du traitement. On observe d'abord de fréquentes rechutes, mais également, une résistance des cellules cancéreuses au traitement [58, 59]. En tout et pour tout, seuls 50% des patients atteints d'AML montreront une rémission complète, mais seulement 10% chez les patients âgés de plus de 65 ans. Cela est d'autant plus significatif que l'AML apparaît plus chez les 65 ans et plus [56].

1.6 Les anthracyclines

Les anthracyclines constituent un large groupe de molécules dont les deux principales sont la doxorubicine (adriamycine) (DOX) et la daunorubicine (DNR) [60, 61] (Fig. 1). Elles ont la propriété d'être fluorescentes avec une émission à environ 600 nm [62, 63]. Les anthracyclines ont été caractérisées en 1963 comme antibiotique dérivé de *Streptomyces*

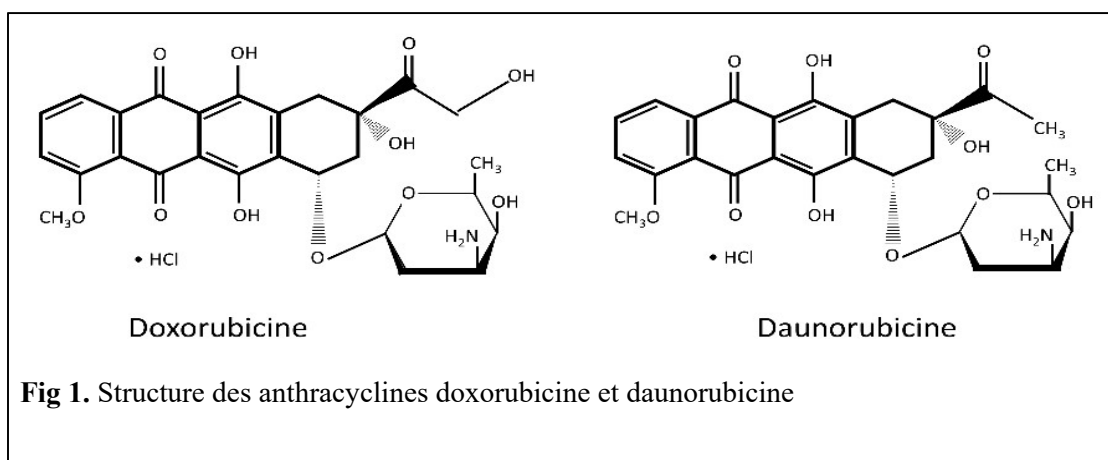


Fig 1. Structure des anthracyclines doxorubicine et daunorubicine

peucetius var. *caesius* [64]. Ces molécules chargées positivement [65] sont aujourd'hui utilisées comme thérapie anti-cancer. Les anthracyclines présentent toutefois des risques liés à leur toxicité. La principale toxicité des anthracyclines est une toxicité cardiaque [61, 66, 67], mais on leur attribue également une toxicité hépatique et rénale [68]. On produit aujourd'hui plusieurs anthracyclines synthétiques dont certaines sont des conjugaisons avec des complexes, des nanoparticules et des radio-marqueurs, de manière à diminuer leur toxicité ou à augmenter l'absorption de la molécule par les cellules cancéreuses. Elles peuvent aussi viser à améliorer la livraison de la molécule aux cellules cancéreuses ou servir à suivre la distribution des anthracyclines à l'intérieur de l'organisme [60, 63, 65, 67, 69-75]. On peut également trouver des anthracyclines synthétiques telles l'idarubicine, un dérivé de la daunorubicine [76], ou l'amrubicine [77].

1.6.1 Utilisation

Ces molécules servent au traitement de nombreux cancers. Comme il a été mentionné précédemment, les anthracyclines peuvent servir au traitement du lymphome de Hodgkin et de l'AML, mais elles peuvent aussi servir dans le traitement de certains cancers du sein [78, 79]. On peut également utiliser les anthracyclines dans le traitement du cancer du poumon [80, 81], dans les cancers ovariens [82, 83] et dans un grand nombre d'autres tumeurs allant du cancer du pancréas au sarcome de Kaposi en passant par l'ostéosarcome [67]. Habituellement, les patients sont traités avec des doses de DOX ou de DNR de 45 à 50 mg/m² [84].

1.6.2 Cinétique

Suite à une infusion de 50 à 75 mg/m² de DOX pendant 5 à 15 minutes, la concentration initiale de DOX dans le plasma sanguin atteint un peu plus de 3 µg/ml, soit, plus ou moins 5 µM et diminue rapidement pour passer sous la barre des 50 ng/ml en moins de 5 h [85, 86]. Suite à cette première phase d'absorption, on retrouve la DOX principalement dans le foie et les reins, qui sont ses principaux sites d'élimination, mais on en retrouve aussi dans les poumons, le cœur et la rate [70, 72]. La concentration plasmatique de DOX reste alors plus ou moins constante pendant plusieurs jours [85, 86]. Suite à l'infusion de DOX, on observe une rapide production de son métabolite, le doxorubicinol, dont la concentration plasmatique ne dépasse pas les 60 ng/ml [85]. Le doxorubicinol est

produit à partir de la DOX par plusieurs enzymes NADPH-dépendantes et son activité anticancer est moins élevée que celle de la DOX, en plus de causer une plus grande toxicité cardiaque [69, 87]. On observe une excrétion significative de la DOX par les voies urinaires [72].

1.6.3 Mode d'action

La DOX s'intercale entre les paires de bases de l'ADN par des liens covalents [1, 72]. Plusieurs hypothèses ont alors été avancées sur la façon dont pouvaient agir les anthracyclines. Elles étaient alors décrites comme des inhibiteurs de la TOP II [1, 88] qui inhibaient la synthèse de l'ADN et de l'ARN et induisaient la production de ROS, conduisant à l'apoptose [1, 60, 68]. Toutefois, l'action principale retenue de la DOX est l'induction de dommages à l'ADN [79]. Plus précisément, la DOX induit des DSB. Elle est d'ailleurs utilisée, en laboratoire, comme agent pour étudier les DSB [25, 89]. Toutefois, l'effet cytotoxique de la DOX passe principalement par son effet sur la TOP II. Un fait important à ce sujet, et qui démontre l'importance de l'interaction entre la DOX et la TOP II, est que la délétion et/ou la déplétion, par le dexrazoxane, de la TOP II induit une résistance à la DOX. Ainsi, le terme inhibiteur de la TOP II n'est pas adéquat pour décrire son effet sur la TOP II, car cette protéine est essentielle à l'effet cytotoxique de la DOX. Par conséquent, il est plus juste de dire que la DOX empoisonne la TOP II, lui permettant d'agir, mais de manière erronée. C'est donc la TOP II qui est responsable des bris double brin induit par la DOX [90].

1.6.3.1 Les Topoisomérases (TOP)

Les TOPs sont impliquées dans la régulation de la topographie de l'ADN. Elles ont comme fonction de réduire le super-enroulement de l'ADN généré lors de la réplication et de la transcription de l'ADN. On leur attribue également un rôle dans la compaction et la décompaction de l'ADN nécessaire, entre autres, pour permettre aux protéines d'accéder à certaines régions du génome. Elles sont aussi impliquées dans la ségrégation des chromosomes. Elles agissent en produisant un lien phosphodiester transitoire qui permet de créer un pivot permettant d'éliminer le surenroulement de l'ADN. Les TOPs constituent un groupe de protéines essentielles chez la plupart des types cellulaires, allant des archéobactéries aux cellules humaines, en passant par les levures. Il existe plusieurs familles de TOPs classées selon le type de bris transitoire induit et le lien formé avec l'ADN. Les TOPs de type I induisent des bris simple brin alors que les TOP II induisent des bris double brin. On trouve aussi la famille des TOP III. Ces trois familles de TOPs sont présentes autant chez l'humain que chez la levure [91-93]. Les TOPs I se lient à l'ADN et induisent un bris simple brin. Par la suite, la religation de l'ADN se fait lorsque l'enzyme est relâchée de l'ADN. Toutefois, la présence de certaines molécules comme les camptothécines (CPT) stabilise le lien entre la TOP I et l'ADN, qui devient alors irréversible, rendant impossible la religation. Ainsi, lorsque la machinerie de réplication entre en collision avec le complexe, TOP I-ADN, elle induit un bris double brin [94]. Toutefois, la cible de la DOX est la TOP II. Elle agit de la même façon que la CPT en rendant le complexe TOP II-ADN irréversible. Il

existe deux isoformes de la TOP II : α and β [75]. La TOP II β est exprimée dans tous les tissus, alors que la TOP II α est principalement retrouvée dans les tissus présentant une grande activité de réplication, comme les cellules cancéreuses. Cela a mené à l'hypothèse que l'effet sur la TOP II α était responsable de l'activité antitumorale de la DOX, alors que son effet sur la TOP II β serait responsable de sa toxicité cardiaque [75, 79]. Toutefois, si l'expression de la TOP II α coïncide avec une grande activité de réplication, c'est l'expression de la TOP II β qui donne une véritable indication du pronostic, suggérant que c'est la TOP II β qui est la principale voie d'action anti-cancer de la DOX [95].

1.6.4 Résistance

Bien que la toxicité de la DOX soit l'un des principaux obstacles aux traitements incluant des anthracyclines, la résistance des cellules cancéreuses au traitement constitue un autre problème [87, 96, 97]. Il existe plusieurs mécanismes possibles pouvant induire une résistance à la DOX. Comme mentionné précédemment, une déplétion ou une altération de la réponse de la TOP II induira une résistance chez la cellule. Une activation importante de la P-glycoprotéine (P-gp) est également un facteur pouvant rendre une cellule résistante à la DOX [98]. Il a toutefois été démontré que l'inhibition de la P-gp par la valspodar ne sensibilisait pas nécessairement les cellules résistantes à la DOX [99]. Cela tend à suggérer que la résistance à la DOX est multifactorielle. Un autre mécanisme pouvant induire une résistance est l'incapacité de la cellule à absorber la molécule [100-104].

1.6.5 Absorption

On connaît peu de choses sur la façon dont la DOX entre dans les cellules. Encore aujourd'hui, plusieurs pensent que la DOX entre dans les cellules par diffusion passive [60]. D'un autre côté, on sait que la P-gp est impliquée dans l'exclusion cellulaire de la DOX et dans la résistance à son effet cytotoxique [98, 105-108]. Ainsi, si cela s'avérait véridique, cela impliquerait que la DOX serait capable de diffuser à travers la membrane cytoplasmique pour entrer dans la cellule, mais serait incapable d'en ressortir par diffusion passive et aurait besoin d'un transporteur. La diffusion passive ne fonctionnerait que dans un sens. Certains pourraient argumenter en disant que la présence de la p-glycoprotéine ne fait qu'augmenter la vitesse de sortie de la DOX. Toutefois, l'entrée de la DOX dans les cellules est extrêmement rapide, faisant passer la concentration plasmatique de 3 µg/ml à 100 ng/ml en moins de 30 minutes [85, 86]. Aussi, si la DOX entrait dans les cellules par diffusion passive, la répartition de la molécule dans les tissus devrait être plus ou moins uniforme alors que la DOX s'accumule préférentiellement dans le foie [70]. Tous ces faits, accumulation de la molécule dans des tissus spécifiques, vitesse d'entrée dans les tissus très élevée, pointent plutôt en faveur de la présence d'un transporteur qui serait exprimé de façon plus ou moins ubiquitaire, mais à différents niveaux en fonction du tissu. Okabe a publié un article concluant que hCT2 était le transporteur de la DOX [109]. Trois ans plus tard, il publie un nouvel article dans lequel il conclut qu'OCTN1 est un transporteur de la DOX [110]. Bien que cela corrobore l'hypothèse selon laquelle la DOX entrerait dans les cellules via un transport actif, cela ne nous dit pas lequel est le transporteur principal. Ces deux articles

pointent vers l'implication d'un membre de la famille des *Solute Carriers family 22* (SLC22), mais les membres de cette famille partagent souvent certaines affinités pour certains substrats [111-113].

1.7 Les transporteurs

Les transporteurs constituent une grande famille de protéines présentes dans tous les organes des mammifères [114]. Ils sont grandement impliqués dans l'influx et l'efflux, à travers la membrane cytoplasmique, de diverses molécules endogènes et exogènes, dont plusieurs médicaments [112, 115]. Pour transporter un substrat à travers la membrane de la cellule de l'extérieur vers l'intérieur, le transporteur commence par exposer son site de liaison au milieu extracellulaire. Lorsque le substrat interagit avec la protéine, cela induit un changement de conformation. Le transporteur entre en état occlus, avant de progresser vers une nouvelle conformation où il expose son site de liaison au cytoplasme. Le substrat est alors relâché à l'intérieur de la cellule [116, 117]. C'est la structure du site de liaison qui donne la spécificité et l'affinité du transporteur pour différents substrats, et des mutations des acides aminés composant ce site liaison peuvent augmenter ou diminuer l'affinité du transporteur pour un substrat donné [118]. De plus, on observe une différence d'affinité du site liaison faisant face à l'extérieur versus celui faisant face à l'intérieur, et certaines mutations n'auront d'influence que sur le site interne, par exemple [119]. Le potentiel membranaire peut également influencer l'affinité des deux sites de liaison et influencer la direction que prendra un substrat donné, puisque les transporteurs peuvent fonctionner dans

les deux sens. De façon générale, ils fonctionneront à contresens du gradient grâce à un co-transport avec d'autres ions comme le H^+ ou en utilisant de l'ATP [120-122]. Une autre façon d'empêcher le transport d'une molécule par un transporteur est d'empêcher le changement de conformation, qui est critique pour la protéine. De fait, le changement de conformation implique le mouvement des passages transmembranaires (PTM) et certaines mutations rendront la protéine rigide et l'empêcheront de changer de conformation [123, 124]. Il existe différentes méthodes pour étudier un transporteur. La majorité d'entre elles consistent à exprimer le transporteur d'intérêt dans des cellules modèles comme HEK293T ou des oocytes. Par la suite, on peut simplement évaluer la capacité de notre molécule d'intérêt à inhiber l'absorption de molécules modèles radio-marquée comme le MPP⁺ ou le TEA [125-138]. En utilisant ces mêmes systèmes de sur-expression, on peut aussi évaluer directement le flux de notre composé, si celui-ci est radio-marqué, ou en effectuant une chromatographie [139-148].

1.7.1 *Saccharomyces cerevisiae*, un modèle d'étude

Les études faites chez les cellules humaines en culture sont relativement coûteuses et il est impossible de savoir à l'avance s'il existe bel et bien un transporteur de DOX. Cela rend ces études plus délicates. Pour ces raisons, il est envisageable d'utiliser un autre modèle, la levure, dont la culture est moins onéreuse et chez laquelle on peut facilement modifier le génome. Nous savons que la DOX est chargée positivement et le transport de plusieurs molécules chargées positivement a déjà été caractérisée chez *Saccharomyces cerevisiae*.

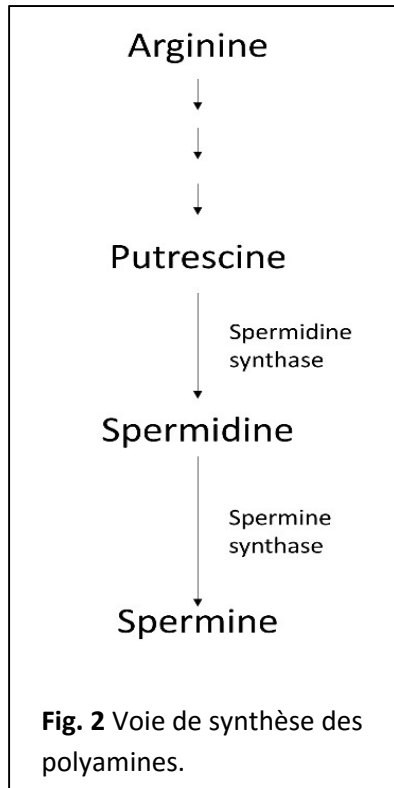
1.7.1.1 NaD1

Le NaD1 est un antifongique, une défensine de classe II, produit par la fleur d'une variété ornementale de la plante de tabac appelée *Nicotiana glauca* [149]. Ce peptide semble être impliqué dans la protection des organes reproducteurs de la plante contre les dommages causés par les champignons puisque ce peptide se retrouve en grande concentration dans les tissus qui entourent ses organes reproducteurs. En solution, ce peptide forme un dimère qui constitue sa forme active. Sous sa forme de monomère, le NaD1 ne montre qu'une très faible activité antifongique [150]. Le NaD1 est une molécule chargée positivement [151] qui se lie à la paroi cellulaire des cellules fongiques [152]. Son mode d'action demeure un peu nébuleux, mais il est connu que ce peptide provoque une perméabilisation de la membrane cytoplasmique [151] et la production de ROS [153]. Récemment, il a été démontré, chez *S. cerevisiae*, que l'accumulation du peptide pouvait être contrée par la délétion de la protéine membranaire Agp2, mais aussi en ajoutant de la spermidine (SPD) dans le milieu [154].

1.7.1.2 Polyamines

Les polyamines constituent une famille de molécules chargées positivement [155, 156] grandement impliquées dans la croissance cellulaire [155, 156] et la différenciation cellulaire [156]. On retrouve les polyamines dans pratiquement tous les organismes, en

partant des bactéries jusqu'aux mammifères, en passant par les levures [155]. Elles constituent des composantes essentielles d'une cellule et l'absence de celles-ci rend la cellule non viable [155]. Elles sont également impliquées dans la réponse au stress [2]. Les trois principaux membres de cette famille sont la putrescine, la SPD et la spermine (SPM). Chaque membre de la famille des polyamines constitue un maillon dans la chaîne de



synthèse des polyamines issue d'acides aminés (Fig. 2) [2, 155, 156]. Mais, si les cellules peuvent synthétiser les polyamines dont elles ont besoin, elles peuvent également les importer du milieu extérieur. Les bactéries possèdent quatre voies caractérisées pour importer des polyamines, dont un système spécifique pour l'absorption de la putrescine, la polyamine qu'elle importe en plus grande quantité, et un autre système préférentiel pour la SPD. Tous deux sont ATP-dépendants [157, 158]. Chez les mammifères, des transporteurs de la famille SLC22 seraient impliqués dans l'absorption de polyamines, les

OCTs [159]. Chez la levure, Sam3 et Dur3 constituent les deux principaux transporteurs de polyamines [160]. Toutefois, il a été démontré que l'activité de Sam3 et de Dur3 est dépendante de la protéine Agp2 [3]. L'exclusion des polyamines du cytoplasme se fait par un groupe de transporteurs de polyamine, les TPOs. Les TPO 1 à 4 sont localisées sur la membrane cytoplasmique alors que la TPO5 est localisée sur le Golgi [161, 162]. Les TPO 2 et 3 sont spécifiques à la SPM alors que les TPO 1 et 4 sont susceptibles d'utiliser n'importe laquelle des principales polyamines comme substrat [160].

1.7.1.2.1 Putrescine

Deux molécules peuvent être converties en putrescine : l'ornithine et l'agmatine [2]. La putrescine a été identifiée à la fin du 19^e siècle [155]. Elle est le précurseur de la SPD [2, 155]. Elle est la principale polyamine exportée par les cellules qui comportent habituellement au moins deux systèmes de transport spécifiques à cette molécule [163].

1.7.1.2.2 Spermidine (SPD)

La SPD est le produit de conversion de la putrescine par la spermidine synthase qui y ajoute un groupement aminopropyl provenant du S-adenosylmethioninamide décarboxylé [164]. Elle peut ensuite être convertie en SPM par la spermine synthase [2, 163]. Elle a la capacité à lier l'ADN et l'ARN, ainsi que certaines protéines membranaires, lui permettant de réguler la transcription et l'activité de certains canaux ioniques et certaines kinases. Bien qu'elle partage plusieurs de ses fonctions avec les autres polyamines, elle est la seule à pouvoir être utilisée pour produire l'hypusine essentielle à la protéine eIF5A [165]. La SPD est essentielle au développement embryonnaire chez la souris [166, 167] et contribue à protéger la cellule contre le stress oxydatif en agissant comme capteur de radicaux libres [168].

1.7.1.2.3 Spermine (SPM)

La SPM a été découverte dans le sperme en 1678, mais ne fut caractérisée que bien plus tard, au 20^e siècle [163]. Elle est produite à partir de la SPD par la spermine synthase qui y ajoute un groupement aminopropyl supplémentaire provenant du S-adenosylmethioninamide [164]. Elle constitue la polyamine la plus abondante dans la prostate humaine [169]. Bien que sa déplétion, entre autres par délétion du gène de la spermine synthase, n'affecte pas la croissance ou la morphologie cellulaire, elle rend la cellule plus sensible aux inhibiteurs des enzymes qui produisent la putrescine ou la SPD. Ces cellules sont également plus sensibles à certains agents antinéoplasiques [170] et aux UV, la spermine ayant une plus grande affinité pour l'ADN, qui lui permettrait d'agir comme agent protecteur [168]. Les souris présentant une délétion de la spermine synthase démontrent une masse corporelle significativement plus faible, elles sont stériles et sourdes et présentent un risque accru de mort subite [171, 172]. Chez l'humain, la déficience en spermine synthase induit une maladie portant le nom de syndrome de Snyder-Robinson qui présente plusieurs caractéristiques, dont un retard mental, une faible masse musculaire, le développement d'ostéoporose, une asymétrie faciale et plus encore [173-175].

1.7.1.3 Bléomycine (BLM)

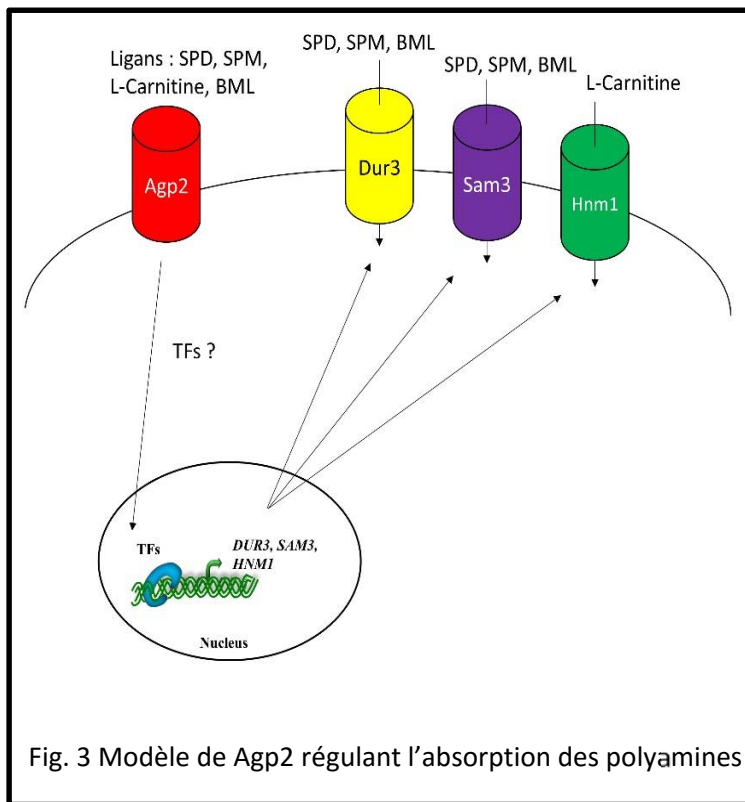
La BLM a été isolée pour la première fois en 1966 par Umezawa de la bactérie *Streptomyces verticillus* [176-178]. Il en existe douze formes se déclinant de A1 à A6 et de B1 à B6 [179]. Il s'agit d'un peptide glycosylé, soluble dans l'eau, d'environ 1 500 Da [176]. La BLM est un antibiotique grandement utilisé pour ses propriétés antitumorales [177]. On l'utilise, en combinaison avec d'autres agents antitumoraux, dans le traitement de nombreux cancers, dont le sarcome de Kaposi, les carcinomes à cellules squameuses, le lymphome de Hodgkin et le cancer du testicule [177, 180, 181]. On l'utilise également dans le traitement des malformations lymphatiques chez l'enfant [182]. La BLM lie l'ADN [183] et forme un complexe avec un atome de fer et deux atomes d'oxygène qui lui permet d'agir comme les radicaux libres [178]. En plus d'induire des bris simple brin et double brin, la BLM produit des apurinic/apyrimidic (AP) site. Chez les mammifères, la réparation de ces lésions implique Ape1, une endonucléase, et sa sur-expression confère, aux cellules, une résistance à la BML [184]. Chez les bactéries, ce sont les endonucléases III et IV qui, une fois supprimées rendent les cellules particulièrement sensibles à la BML et les protéines Apn1, Apn2 et Tpp1 tiennent ce même rôle chez la levure [178]. Une enzyme, dans les cellules, est responsable de la détoxification de la BML, la bléomycine reductase, qui transforme la BML en une version dont la capacité à lier l'ADN est grandement réduite [183]. Lorsque cette enzyme est inhibée par le E64, les cellules démontrent une sensibilité accrue à la BML. À l'inverse, la sur-expression de cette enzyme ou de son homologue chez la levure, Ycp1, diminue la sensibilité des cellules humaines à la BLM bien que des études contradictoires existent à ce sujet [178, 185, 186]. Chez l'humain, le transporteur issu du gène SLC22A16, OCT6, aussi nommé hCT2, est responsable de l'absorption de la BLM-A5 [187]. Cette forme, A5, de la BLM, comporte un motif comparable à la SPD, lui conférant une charge positive [188]. Chez la levure, c'est la protéine Agp2 qui est responsable de l'absorption de

la BLM-A5 et sa délétion rend les cellules extrêmement résistantes à son effet létal [189, 190]. Il a toutefois été démontré que Sam3 et Dur3 étaient essentiels à l'absorption de la BLM-A5 [3].

1.7.1.4 Agp2

Le point commun entre le NaD1, les polyamines et la BLM est que toutes ces molécules dépendent de la même protéine membranaire, Agp2, pour entrer dans les cellules, et son absence induit inévitablement une incapacité de la levure à absorber ces molécules. Agp2 est une protéine membranaire faisant partie des perméases d'acides aminés de la levure ou « yeast amino acid permeases » (YAP). Ce groupe comprend environ 20 gènes qui synthétisent des protéines de plus ou moins 600 acides aminés et comportant 12 PTM [191]. Parmi cette famille, on retrouve les protéines Agp1, Gap1, Gln1, Put4, Bap2, Bap3, Tat2 qui présentent des spécificités variables. Certaines ne transportent que des acides aminés chargés, d'autres, seulement un acide aminé particulier [192, 193]. Certaines de ces protéines sont sous le contrôle d'autres protéines membranaires qui régulent leur expression. À titre d'exemple, Ssy1 agit comme senseur qui détecte la présence d'acides aminés, dans le milieu extracellulaire, et qui induit alors l'expression de Agp1, ainsi que d'autres YAP [194, 195]. Gap1 est un autre exemple, car, cette protéine, en plus d'agir comme transporteur d'acides aminés, agit comme senseur et régule l'activation de la PKA en fonction de la quantité d'acides aminés présents dans le milieu extracellulaire [196] Agp2 est également régulée par une protéine membranaire agissant comme senseur, Sho1. Cette protéine active

la réponse osmotique et réprime l'expression de Agp2 en cas de grande osmolarité (1 M) [197]. Le gène AGP2 (ou YBR132c) [191] code pour une protéine de 67,2 kDa [3]. Cette protéine, en plus d'être impliquée dans l'absorption d'acides aminés [193] est aussi responsable de l'absorption de la carnitine, nécessaire au métabolisme de l'acétyl-CoA [198, 199]. Elle est essentielle à l'absorption des polyamines [158, 200], de la défensine NaD1 [154] et de certains agents anti-cancer comme la BLM-A5 [190] et l'edelfosine [201].



Toutefois, si Agp2 est le plus souvent considérée comme un transporteur de haute affinité pour les acides aminés, il a été démontré que Agp2 était, en fait, un transporteur de faible affinité. De plus, cette protéine, même dans des conditions d'expression optimales, n'est que faiblement exprimée [191]. Le

fait est donc qu'il existe plusieurs transporteurs de haute affinité pour les acides aminés. Dès lors, quelle est la pertinence d'exprimer faiblement un transporteur ne possédant qu'une faible affinité pour ces acides aminés et pourquoi l'absorption de plusieurs substances est-elle à ce point compromise par l'absence d'Agp2? Une étude de puce à ADN ou « microarray » a été effectuée sur un mutant présentant une délétion d'Agp2, révélant qu'une multitude de gènes étaient affectés. Si certains se voient régulés de façon positive, la plupart

sont réprimés par l'absence d'AGP2. Ces gènes réprimés remplissent plusieurs fonctions, mais la catégorie de gènes la plus réprimée est celle des transporteurs transmembranaires [3]. Ainsi, Agp2 agirait, non pas comme transporteur, mais comme senseur, tout comme le gène SSY1, qui code pour une protéine de la famille des YAP, mais qui démontre une structure particulière. Ssy1 est également un senseur qui détecte la présence de plusieurs acides aminés et induit l'expression d'AGP1 [195]. Gap1, un autre membre des YAP, peut, en plus d'agir comme transporteur, également agir comment senseur d'acides aminés et induire l'activation de la PKA [196]. On observe ce genre de phénomène aussi dans le transport d'autres molécules, comme le glucose. Les transporteurs de haute affinité pour le glucose Snf3 et Rgt2 agissent comme senseurs et induisent l'expression d'autres transporteurs de glucose [202]. Dans un mutant *agp2Δ*, plusieurs transporteurs sont sous-exprimés et, parmi ceux-ci, on trouve Hnm1, Sam3 et Dur3. Or, la suppression simultanée de Sam3 et de Dur3 induit une résistance aux polyamines et à la BLM-A5. Cela a donné lieu à un modèle (Fig. 3) selon lequel Agp2 détecterait la présence de ligands comme la SPD, la SPM ou la BLM et induirait l'expression de Sam3 et de Dur3, qui sont responsables de l'absorption de ces molécules. L'activité de transport de Agp2 serait alors négligeable [3].

1.7.1.4.1 Hnm1

Le gène HNM1, aussi appelé CTR1, code pour une protéine membranaire dont l'expression est régulée par Agp2 [3]. Il s'agit d'un transporteur de haute affinité pour la choline qui constitue le précurseur nécessaire à la synthèse de la phosphatidylcholine [203,

204], le phospholipide le plus abondant chez les cellules eucaryotes [205, 206]. Hnm1 est une protéine de 563 acides aminés avec une masse moléculaire de 62 kDa [207], la seule capable de transporter la choline [208]. Elle peut transporter, en plus de la choline, des substances comme le N-méthylethanolamine, ou la β -methylcholine [209]. Hnm1 est également un transporteur de L-carnitine [3] et de la mechloréthamine [210].

1.7.1.4.2 Sam3

C'est au début des années 70 que les premiers mutants de levures incapables d'absorber le S-adenosylmethionine (AdoMet) ont été identifiés [211], mais ce n'est qu'à la fin du 20^e siècle que la protéine responsable de l'absorption de l'AdoMet a été identifiée. Il s'agit d'un membre des YAP comprenant 12 PTM : Sam3. Cette protéine est le seul transporteur d'AdoMet et de son analogue, le sinefungi, [212-214]. Fait intéressant, l'AdoMet est le précurseur du S-adenosylmethioninamide impliqué dans la synthèse de la spermidine et de la spermine [2]. Mais Sam3 ne se contente pas de transporter l'un des précurseurs de la spermidine. Il transporte également la putrescine et la spermidine elle-même, faisant de cette protéine une composante importante de la biodisponibilité des polyamines. Sam3 serait un transporteur préférentiel pour les polyamines puisque le transport des polyamines par Sam3 peut être inhibé par certains acides aminés [158, 162]. Toutefois, même si Agp2 ne présente qu'une faible affinité pour les polyamines, leur absorption par Sam3 dépend de cette protéine sans laquelle Sam3 n'est tout simplement pas exprimée [3].

1.7.1.4.3 Dur3

Dur3 est une autre YAP, mais il possède 16 PTM contrairement à la majorité des YAP [158, 191, 192]. Le gène a été identifié en 1993 sur le chromosome VIII comme codant pour une protéine de 735 acides aminés impliquée dans le transport de l'urée [215, 216]. Cette protéine possède plusieurs homologues chez d'autres organismes également responsables de l'absorption de l'urée comme source d'azote [217-220]. Dur3 a également été caractérisé comme un transporteur de boron, un micronutriment essentiel à la croissance des levures [221]. Mais, avec Sam3, Dur3 constitue la principale voie d'absorption des polyamines [217]. Contrairement à Sam3, son activité de transport des polyamines ne peut être inhibée par la présence d'acides aminés, suggérant que Dur3 est plus spécifique aux polyamines que Sam3 [162], mais, tout comme cette dernière, l'activité de Dur3 est dépendante de Agp2 [3].

2. Hypothèses et objectifs

2.1. Hypothèse

En dehors d'Agp2, le point commun entre le NaD1, les polyamines et la BLM est que ces molécules sont toutes chargées positivement. Et c'est une caractéristique que partage également la DOX. Nous pensons que la DOX entre dans *S. cerevisiae* grâce à Agp2 et l'une, ou plusieurs, des protéines produites par les gènes contrôlés par cette protéine membranaire. Notre hypothèse est donc que des mutants, présentant des délétions des gènes impliqués dans la voie d'absorption des polyamines, présenteront une déficience dans leur capacité à absorber la DOX. Pour être plus précis, nous pensons qu'en supprimant Agp2 nous parviendrons à réduire l'accumulation de DOX dans la cellule.

2.2. Objectifs

2.2.1. Déterminer de bonnes conditions pour effectuer les tests d'absorption de DOX chez *S. cerevisiae*.

Chez la levure, la présence de différents composés dans le milieu peut affecter l'activité des différents transporteurs. Ainsi, il devient primordial de trouver un milieu dans lequel nous pourrions effectuer les tests d'absorption qui permettra d'uniformiser les expériences et de permettre de

comparer les différentes souches de levure. Comme nous devons utiliser différents milieux de culture pour cultiver nos levures, nous ne pouvons pas effectuer les tests d'absorption de DOX dans le milieu d'origine et nous devons donc les transférer dans un autre milieu avant de mettre les cellules en contact avec la molécule. Nous utiliserons, pour ce faire, une souche ne présentant aucune modification (WT). Ces cellules seront cultivées dans un milieu standard (YPD) et transférées dans différents milieux. Ces milieux seront dérivés des milieux de culture, que ce soit le YPD, ou le milieu minimal ou « minimal media », où différentes composantes seront retirées de manière à pouvoir déterminer l'effet de chacune d'entre elles sur l'accumulation de DOX dans la cellule. Nous pourrions ainsi constituer un milieu qui n'interférera pas avec l'absorption de la DOX.

2.2.2. Évaluer l'absorption de DOX chez différents mutants de *S. cerevisiae* présentant des délétions pour des gènes impliqués dans l'absorption des polyamines (Fig 3).

Notre laboratoire a déjà effectué plusieurs recherches sur Agp2 et les gènes sous son contrôle. Ainsi, nous possédons déjà toutes les souches dont nous avons besoin. Ces différents mutants seront cultivés dans le milieu approprié pour chacun d'entre eux, puis seront transférés dans le milieu d'expérimentation élaboré précédemment. L'accumulation de DOX dans les cellules pourra être déterminée par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence. L'effet létal de la DOX sur les levures pourra également être déterminé par des tests de survie.

2.2.3. Exprimer un transporteur de *C. elegans* qui permettra de restaurer l'absorption de DOX chez *S. cerevisiae* dans un mutant présentant une déficience importante de l'absorption de DOX.

Une fois que nous aurons identifié une souche dont l'accumulation intracellulaire de DOX est significativement compromise, nous y surexprimerons un transporteur de *C. elegans* de manière à démontrer que la levure peut être utilisée pour étudier des transporteurs d'autres organismes eucaryotes. Nous avons choisi un transporteur de *C. elegans* pour différentes raisons. D'abord, notre laboratoire a déjà conduit ce genre d'expériences avec *C. elegans*. Ensuite, il est beaucoup plus difficile de surexprimer des gènes dans *C. elegans* ou d'introduire des mutations dans un gène directement dans l'animal. Finalement, très peu de choses sont connues à propos de ce transporteur. À ce jour, seuls deux articles ont été publiés sur cette protéine. Pour ce faire, puisque nous soupçonnons que le mutant Agp2 sera le modèle utilisé, nous placerons ce gène d'intérêt dans un plasmide sous le contrôle du promoteur ADH de manière à éviter toute interférence avec l'effet de la délétion de Agp2 sur l'expression du gène. Nous inclurons un MYC-tag sur la partie C-terminal de la protéine de manière à pouvoir confirmer l'expression de notre protéine exogène. L'accumulation de DOX dans la cellule sera comparée à celle obtenue chez ce même mutant transformé avec un plasmide ne contenant aucun transgène de façon à éliminer toute possibilité d'interférence du plasmide. Nous induirons également des mutations ponctuelles sur notre transgène et évaluerons l'effet de ces mutations sur l'accumulation de DOX intracellulaire pour confirmer l'implication du transgène.

CHAPITRE 2

Article 1

Complementation of the Yeast Model System Reveals that *Caenorhabditis elegans* OCT-1 Is a Functional Transporter of Anthracyclines

Brosseau N, Andreev E, Ramotar D

(2015) PLoS ONE

10(7) : e0133182. doi:10.1371/journal.pone.0133182

Abstract

The yeast plasma membrane protein Agp2 belongs to the family of amino acid transporters. It acts as a regulator that controls the expression of several uptake transporter genes such as DUR3 and SAM3 encoding two high-affinity polyamine permeases. *agp2*Δ mutants display extreme resistance to several cationic compounds including polyamines, the anticancer agent bleomycin, and cationic antifungal peptides. We propose that Agp2 might be involved in regulating the uptake of other cationic anticancer drugs. To date, an uptake transporter has not been reported for anthracyclines, a family of chemotherapeutic agents that are used for treating adult patients with acute myeloid leukemia. Herein, we develop assay conditions to monitor the uptake of the anthracycline doxorubicin into yeast cells and demonstrate for the first time that Agp2 is required for the drug uptake. Deletion of both the DUR3 and SAM3 genes reduced doxorubicin uptake, but not the deletion of either gene alone, while the *agp2*Δ mutant was severely compromised, suggesting that Agp2 controls the drug uptake via Dur3 and Sam3 and at least one additional transporter. Overexpression of DUR3 or SAM3 from the endogenous promoter rescued doxorubicin uptake into the *sam3*Δ*dur3*Δ double mutant, consistent with a role for these transporters in the uptake of anthracyclines. We further show by cross-species complementation analysis that expression of the *Caenorhabditis elegans* oct-1 gene encoding an organic cation transporter restored full doxorubicin uptake in the *agp2*Δ mutant. Four separate variants of CeOCT-1 derived by substituting the amino acid residues Gln15, Cys31, Gln109 and Lys300 with alanine were stably expressed, but did not mediate doxorubicin uptake into the *agp2*Δ mutant. Moreover,

we show that overexpression of CeOCT-1 sensitized parent yeast cells to doxorubicin, suggesting that CeOCT-1 related members might be key transporters to facilitate entry of anthracyclines into human cells.

Citation: Brosseau N, Andreev E, Ramotar D (2015) Complementation of the Yeast Model System Reveals that *Caenorhabditis elegans* OCT-1 Is a Functional Transporter of Anthracyclines. PLoS ONE 10(7): e0133182. doi:10.1371/journal.pone.0133182

Editor: Raymund J. Wellinger, Université de Sherbrooke, Medicine, CANADA Received: March 14, 2015; Accepted: June 23, 2015; Published: July 15, 2015

Copyright: © 2015 Brosseau et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Data Availability: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by research grants (MOP-93573 and RGPIN/2024322012) to D. R. from the Canadian Institute of Health Research and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

1. Introduction

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane protein, Agp2, was initially identified as a transporter for L-carnitine, which serves as a carrier for acetyl-CoA from the peroxisomes to the mitochondria [1]. We subsequently re-isolated the AGP2 gene by screening the collection of yeast haploid mutants, each deleted for a single gene, and demonstrated that *agp2* Δ mutant is extremely resistant to the anticancer drug bleomycin that acts by damaging the cellular DNA [2]. *agp2* Δ mutants are completely defective in the uptake of a fluorescently labeled form of bleomycin and displayed extremely low levels of bleomycin-induced damage to the DNA [2]. In contrast, overexpression of Agp2 stimulated bleomycin uptake and caused severe damage to the genomic DNA, suggesting that Agp2 indeed functions to allow uptake of bleomycin into the cells [2]. The bleomycin used in these studies contains a polyamine moiety, which raised the possibility that bleomycin entry into the cells might occur because of the polyamine group and that Agp2 would be involved in polyamine uptake. Indeed, we have shown that *agp2* Δ mutants are strikingly resistant to polyamines and completely blocked for the uptake of very low concentrations of spermine and spermidine [3]. While these earlier studies strongly suggest that Agp2 might function as a high affinity transporter for L-carnitine, bleomycin and polyamines, subsequent findings dismissed this notion. These include (i) L-carnitine, even at high concentrations, did not block the uptake of labeled spermidine into the cells or protected parent cells from the cytotoxic effects of polyamines, and (ii) a study by Uemura et al documented the existence of two high affinity polyamine transporters, Dur3 and Sam3, which exist on the

plasma membrane of yeast cells, although the link to Agp2 was not investigated [4, 5]. More recently, we showed that Agp2 acts as a regulator that prominently controls the expression of the SR kinase gene SKY1, as well as several transporter genes including DUR3, SAM3 and HNM1 that encodes a L-carnitine transporter [5]. Deletion of either the DUR3 or SAM3 gene resulted in mutants that exhibit parental level of resistance to polyamines [5]. However, deletion of both genes resulted in double mutants that were resistant to polyamines [5]. The exact nature by which Agp2 regulates these transporter genes remains unclear, although we believe that it acts as a sensor of various cationic compounds in the media and transmits a signal to maintain the expression of many genes including the transporter genes [5]. Consistent with this notion, an independent study revealed that Agp2 is also involved in the uptake of the antifungal drug NaD1, but it is not known which of the transporters regulated by Agp2 is involved in NaD1 uptake [6].

To date, the mode of entry of a number of highly active hydrophilic anticancer drugs into cells is not known [7, 8]. One family of these drugs is the anthracyclines that are cationic in nature and include doxorubicin and daunorubicin (DNR), which must be transported into the cells where they act by intercalating with the DNA and block, e.g., the function of DNA topoisomerase leading to cell death [9]. Anthracyclines are used for treating adult patients with acute myeloid leukemia (AML)[10]. This disease is characterized by the rapid expansion of immature blood cells and is the major cause of mortality from hematological malignancies in adults [10]. Importantly, a significant fraction (> 50%) of older AML patients (> 60 yrs) are resistant to chemotherapy with anthracyclines [11–13]. A characteristic mechanism associated with drug resistance is the elevated levels of plasma membrane ABC transporters [14–16]. These include the multidrug resistant efflux pump,

MDR1/ABCB1, and the multidrug resistant-associated protein, MRP1, which are known to increase efflux of chemotherapeutic agents thereby allowing tumor (and normal) cells to evade drug-induced cytotoxicity [14, 15]. In fact, drug efflux transporters are known to be upregulated in some AML patients and there is evidence suggesting that one of these efflux pumps ABCB1 can expel anthracyclines from the cells [17]. However, inhibition of ABCB1 with valsopodar was rigorously tested and found to provide no improvement for the drug-resistant AML patients [17]. Thus, there must be other mechanisms that when defective would cause resistance to anthracyclines. One such mechanism might involve defects in the entry of DNR into leukemia cells via uptake transporter(s). So far, an uptake transporter system for anthracyclines has not been previously described although in human cells one study claimed that it is the organic cation transporter hCT2, but this transporter has not been further characterized [18].

Since Agp2 regulates the uptake of several positively charged molecules, we tested if it would be involved in the transport of anthracyclines due to its cationic properties. In this study, we defined the conditions necessary to monitor doxorubicin uptake into yeast cells, using both FACS analysis and microscope, and demonstrated for the first time that Agp2 is required for the drug uptake. The results show that doxorubicin uptake is partly dependent upon both the Dur3 and Sam3 transporters and that at least one additional permease exists in yeast cells to mediate the drug uptake. We took advantage of this model system and established that the *C. elegans* organic cation transporter OCT-1 has the ability to rescue doxorubicin uptake in the *agp2* Δ mutant to nearly the parental level. We created four separate amino acid substitutions within the OCT-1 protein and showed that neither one of these mutants was capable of mediating doxorubicin into the *agp2* Δ mutant. Overexpression

of OCT-1 sensitized parent cells to doxorubicin, suggesting that OCT-1 is indeed a transporter of anthracyclines in higher eukaryotic cells.

2. Material and Methods

2.1. Yeast strains, media and chemicals

The *S. cerevisiae* wild-type strain BY4741 and its isogenic single, double and triple mutants *dur3Δ*, *sam3Δ*, *agp2Δ*, *sam3Δdur3Δ*, and *sam3Δdur3Δ agp2Δ* were used in this study [5]. The strains were grown in either rich media, i.e., yeast peptone dextrose (YPD, 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) or minimal media (0.65% yeast nitrogen base w/o amino acid (YNB), 0.17% omission mix, and 2% dextrose). Solid media contained 2% of agar. Doxorubicin-HCl was provided by our clinical department (Maisonneuve-Rosemont Hospital (HMR), Montreal, Canada). Mouse anti-MYC antibody was a gift from Dr. Hugo Wurtele (HMR). The goat anti-mouse antibody was purchased from Enzo Life Sciences (Cat. ADI-SAB-101-J).

2.2. Doxorubicin uptake assay

Cells were grown overnight at 30°C in either YPD or minimal media as required, the next day the cells were placed in fresh media and allowed to grow for an extra 1 h. The cultures were washed once with low YNB (i.e., minimal media with 0.065% YNB, instead of 0.65%), and 1 ml of cells of OD600 with absorbance of ~1.0 was centrifuged and the cell pellet was resuspended in 50 µl of the low YNB media. To this, 14.3 µl of doxorubicinHCl (stock solution 2 mg/ml) was added to a final concentration of 800 µM. The uptake reaction was incubated for 30 min at 30°C, cells were quickly spun in an eppendorf centrifuge (10,000 rpm for 15 sec), the supernatant discarded into a biosafety container, followed by the

addition of 100 μ l of phosphate buffer with formaldehyde (0.367% of K_2HPO_4 , 1.25% of KH_2PO_4 , 3.7% of formaldehyde) to the cell pellets for 10 min at room temperature to stop the uptake reaction. Cells were briefly spun, the buffer was removed, cell pellets were resuspended in 100 μ l of PBS and processed for FACS or epifluorescent microscopy (see below). For kinetic studies, cells were incubated with 0 to 1.0 mM of doxorubicin for 10 mins and processed as above.

2.3. Cytometry analysis

Cells from the doxorubicin uptake assay were diluted in 1 ml of PBS in 5-ml polystyrene round bottom tubes and then passed through a FACS Calibur (BD Science, excitation 488 nm FL2 detector at 585/42 nm as previously described [19]). A threshold was set with a blank (i.e., cells that were not incubated with doxorubicin) and the values below this threshold were considered as zero.

2.4. Epifluorescent microscopy

Cells (1 μ l) from the doxorubicin uptake assay were placed into the wells of multitest slide 15 (MP Biomedicals) that were pre-coated with 1 mg/ml concanavalin A (MP Biomedicals). The slides were air dried completely and 1 μ l of mounting medium with DAPI (UltraCruz) was added to each well. A cover glass was sealed onto the slide, images were taken with an epifluorescent microscope (Olympus B53 upright epifluorescent microscope equipped with an Olympus XM10 camera at 63X with Texas red filter to detect DOX or with the Zeiss

Imager Z2 microscope equipped with Zeiss AxioCam MRC camera) and processed with Image J.

2.5. DeltaVision microscopy

Cells (WT) were grown in YPD overnight and the next day washed, transferred into low YNB followed by treatment with 100 μ M DOX for 30 min. Cells were fixed with formaldehyde as above and then attached onto concanavalin A pre-coated slides (UltiDent frosted microscope slides 170-7107A). Imaging was made with an Olympus IX71 DeltaVision Elite microscope from Applied Precision Inc. at 100x. For DOX excitation and emission, the FITC filter and mCherry were used. Images were taken with a Front Illuminated sCMOS camera and processed with ImageJ.

2.6. RT-PCR analysis

This analysis was conducted as previously described [5].

2.7. Construction of the pCeOCT-1 expression plasmid

The cDNA of the *C. elegans* oct-1 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with Platinumpfx DNA Polymerase (Invitrogen) using the primers listed in Table 1, and a template plasmid pCeOCT1 carrying a full length cDNA that is 1826 bp long (bearing a 1707 bp long open reading frame with the termination codon) and provided by Dr. Vadivel

Ganapathy (Augusta, GA, USA). The amplified PCR product was gap-repaired into the plasmid pTW438 as previously described [5]. The cDNA within the resulting plasmid pCeOCT-1 was sequenced and the plasmid was transformed into the indicated yeast strains using the lithium acetate method [20].

2.8. Site-Directed mutagenesis

The QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit from Agilent Technologies (#200521) was used according to the manufacturer's Instruction manual Revision E.01 in order to create the amino acid substitution mutations with the primers listed in Table 1.

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Primers	Purpose	Sequence
pTW438-CeOCT-1-MYC-F	Gap repair into the expression plasmid pTW438	5'-CTGCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATACAATAAGCTTATGTCTGCAACTAAACCTCCA
pTW438-CeOCT-1-MYC-R	Gap repair into the expression plasmid pTW438	5'-GGTTACCGCAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCGGACGCCATGGTGAGCTAAATATTCATAAGTCGACTACT
Q15A-F	Site-directed mutagenesis	5'-AGATTTTGATTTCGTTCTAGAAAGCGGTTGGCAACTATGGTACTTA TCAGA
Q15A-R	Site-directed mutagenesis	5'-TCTGATAAGTACCATAGTTGCCAACCGCTTCTAGAACGAAATCA AAATCT
C31A-F	Site-directed mutagenesis	5'-ATTGTTTTCTTCTTTATAATTGCCCTTCCAAGTACTTTACCATCAG CATT
C31A-R	Site-directed mutagenesis	5'-AATGCTGATGGTAAACTAGTTGGAAGGGCAATTATAAAGAAGAA AACAAT
Q109A-F	Site-directed mutagenesis	5'-CGAATAAGTTTAGTGCCGTGCGCAAATGGATGGGATTATGATAA CTCTAC
Q109A-R	Site-directed mutagenesis	5'-GTAGAGTTATCATAATCCCATCCATTTGCGCACGGCACTAAACTT ATTCTG
K300A-F	Site-directed mutagenesis	5'-CATCAACATCAACATTTGACGCTCCATTCATCTTTGCAATTTTCTT AAGC
K300A-R	Site-directed mutagenesis	5'-AAGAAAATTGCAAAGATGAATGGAGCGTCAAATGTTGATGTTG ATGAATT

2.9. Western blot

Cell pellets from 10 ml of overnight grown cells were resuspended in 200 μ l of extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5% glycerol, and containing the protease inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche) using 1 protease inhibitor tablet per 50 ml of extraction buffer), followed by the addition of 200 μ l of glass beads 0.5 mm. Total extract was prepared by vortexing the samples for 20 min at 4°C. The extract was centrifuged 3 min at 3,000 rpm in an eppendorf centrifuge and the supernatant was recovered. The protein concentration in the extract was quantified using the Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate. Equal amounts of protein extract were mixed with loading buffer (50 mM TrisHCl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 2% (v/v) 2-mercaptoethanol) and loaded onto a 8% polyacrylamide SDS gel followed by electrophoresis for 1.5 h at 100 V. Proteins were transferred onto a PVDF membrane 0.2 μ m for 1 h at 100 V. After 1 h of blocking in Tris-buffer saline with Tween (TBST) (25 mM Trisbase, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20 pH adjusted to 7.4) in 5% milk powder, the membrane was washed in TBST and then incubated overnight at 4°C in the TBST 1% BSA, 1 mM sodium azide and 1:1.000 mouse anti-MYC antibody. Next morning the membrane was washed 2 times, 5 min each in TBST, then incubated 1 h at room temperature in TBST 5% milk with 1:1000 goat anti-mouse secondary antibody. The membrane was washed 3 times, 15 min each wash with TBST. The membrane was developed using ECL by mixing solutions A and B. Solution A (0.5 ml) (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.4 mM Coumaric acid dissolved in DMSO and 2.5 mM Luminol dissolved in DMSO) and solution B (0.5 ml) (100 mM TrisHCl pH 8.5, 0.018% H₂O₂). The polypeptide bands were detected by ImageQuant Las 4000.

2.10. Survival assay

Cells were prepared as for the doxorubicin uptake assay described above and samples withdrawn, diluted 10,000 fold in sterile distilled water and 100 μ l plated onto minimal selective media plates for cells carrying a plasmid or onto YPD media to score for survivors, as previously described [2].

3. Results

3.1. YPD and not minimal media facilitates DOX uptake into yeast cells

Assay conditions for monitoring the uptake of anthracyclines into yeast cells have not been previously described. To study doxorubicin (DOX) uptake, we defined the optimal uptake conditions by first testing whether intracellular accumulation of the drug could occur in the yeast growth media. We added increasing concentrations of DOX directly to yeast cultures that were in fresh yeast peptone dextrose (YPD) growth media. The DOX treatment was stopped after 10 min of incubation to assess for the drug uptake into the cells using flow cytometry (see Materials and Methods). DOX uptake into the parent strain BY4741 (WT) was readily detected in the YPD media (Fig 1A). Uptake was linear when DOX concentration was within 200 to 600 μM (Fig 1A) and only reached saturation when the extracellular concentration of the drug was approaching 1 mM. For subsequent assays, DOX was used at 800 μM and the uptake was terminated after 30 min when the drug accumulation was maximal. Since no detectable uptake was observed in the 10 μM range of DOX (Fig 1A), a concentration that is considered optimal for high affinity transporters [3], it would appear that under these conditions (800 μM for 30 min) the drug uptake is mediated by a low affinity permease.

We next conducted similar uptake analysis, but in minimal growth media. Surprisingly, when DOX was added to this media, uptake of the drug was sharply reduced (Fig 1B), even after increasing the concentration of the drug to 1.5 mM and extending the incubation period to 60 min. A simple interpretation of this observation is that the minimal media may contain

constituents that block DOX uptake. The minimal media is composed of a mixture of amino acids, dextrose, and yeast nitrogen base (YNB) that includes vitamins and divalent metal ions. We examined whether elimination of the amino acids and or dextrose from the minimal media would allow DOX uptake into the cells. Removal of either the amino acids or dextrose or both simultaneously and keeping only the YNB (0.65% YNB) did not permit uptake of DOX into the cells, eliminating the possibility that the amino acids and dextrose act to block DOX uptake (Fig 1B). However, when DOX uptake was monitored in the minimal media where the composition of only YNB was reduced by 10-fold (0.065% YNB referred to as low YNB), drug uptake was strikingly rescued and leading to nearly 2fold stimulated uptake as compared to YPD (Fig 1B). Similarly, removal of the amino acids and dextrose from the low YNB did not alter the level of DOX uptake, suggesting that uptake could be inhibited by one or more components present in the standard concentration of YNB. As such, we used only the low YNB media as the standard assay conditions to monitor DOX uptake.

We examined whether the uptake of DOX would lead to the accumulation of the drug in the nucleus. Indeed, epifluorescent microscopy revealed that following DOX uptake (low YNB with 100 μ M DOX) the drug, which has a known property of autofluorescing at 640 nm, accumulated in the nucleus since staining of the nuclear DNA with DAPI coincided with the staining for DOX as shown by the resulting merged image (Fig 1C, showing a single cell). This observation is consistent with the mechanism of action of DOX on DNA. It is noteworthy that when DOX uptake was performed at concentrations > 100 μ M, the

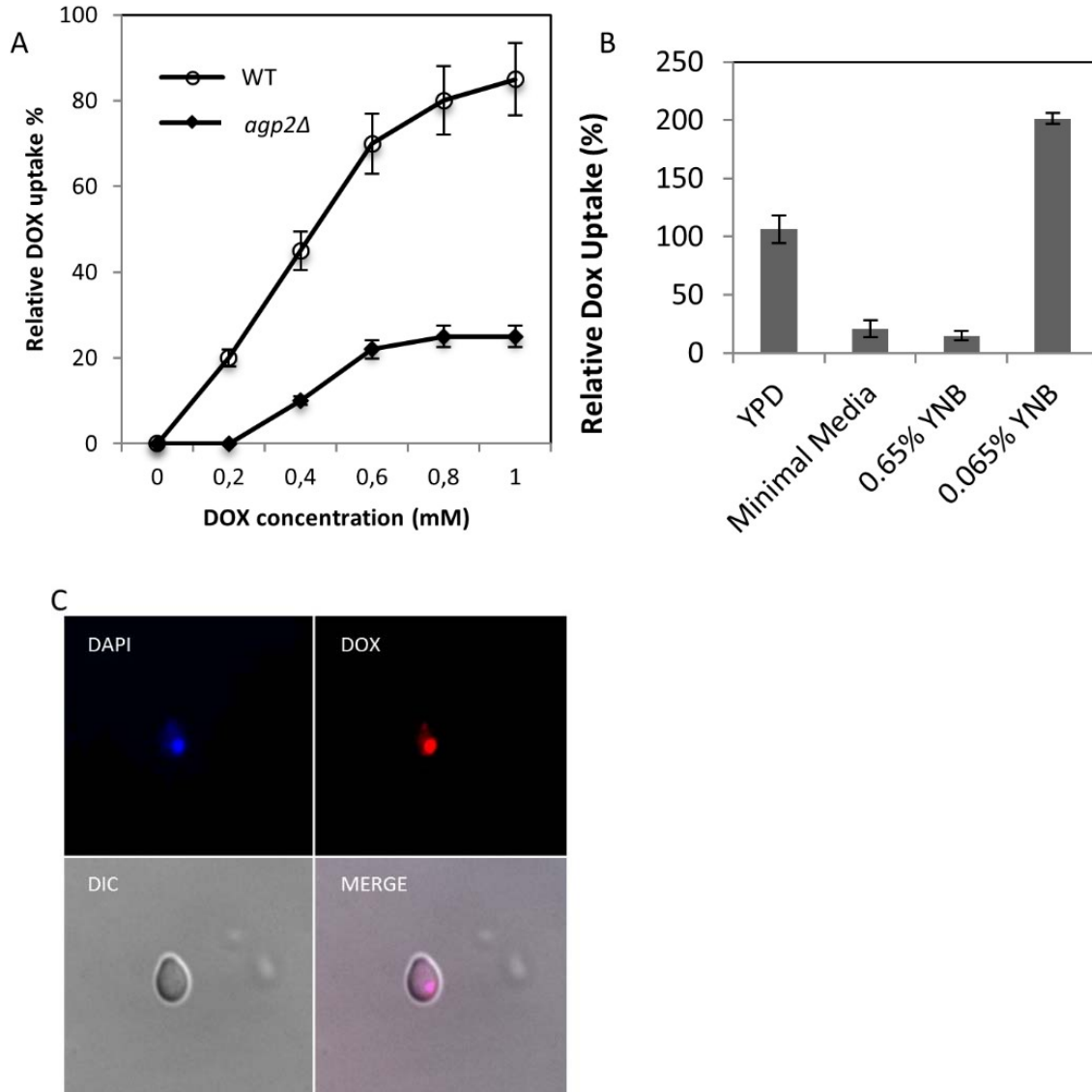


Fig 1. Relative DOX uptake into yeast cells in rich and minimal media, and localization of the drug to the nucleus. (A) Concentration dependent uptake of DOX into the wild type (WT) strain BY4741. Cells were grown in YPD media overnight and subcultured into the same media for 1 h followed by the addition of increasing concentration of DOX and uptake was stopped after 10 min. The intracellular accumulation of DOX was monitored using FACS analysis. The *agp2Δ* mutant defective in DOX uptake is described below. (B) Comparison of DOX uptake in YPD, minimal media, and media containing normal amount (0.65%) of yeast nitrogen base (YNB) and 10-fold less YNB (0.065%). The WT strain was incubated in the indicated media with 800 μ M of DOX for 30 min, and the intracellular accumulation of the drug was measured by FACS analysis. For panels A and B, the results were the averages of three independent analyses. (C) Epifluorescent microscopy showing intracellular colocalization of DAPI and DOX in the WT strain. The WT cells grown in YPD were transferred to low YNB followed by the uptake of DOX (100 μ M) for 30 min. The fixed cells were processed for microscopy using mounting medium containing DAPI to detect the nuclear DNA. Images were captured with a DeltaVision (see material and methods). DIC, differential interference contrast; Merge, colocalization of DAPI stained nucleus with DOX.

drug severely compromised staining of the nuclear DNA with DAPI (data in S1 Fig). We suggest that intercalation of DOX with the DNA interferes with DAPI binding.

3.2. Divalent metal ions in the minimal media inhibit DOX uptake

The YNB contains various vitamins, as well as monovalent and divalent salts, namely NaCl, CaCl₂, MgSO₄, K₂HPO₄ and KH₂PO₄, although the exact concentration of these components are not revealed by the manufacturer. We assessed whether addition of increasing concentrations of these salts would interfere with the uptake of DOX in the low YNB. Addition of NaCl, K₂HPO₄ or KH₂PO₄ to the low YNB did not block the uptake

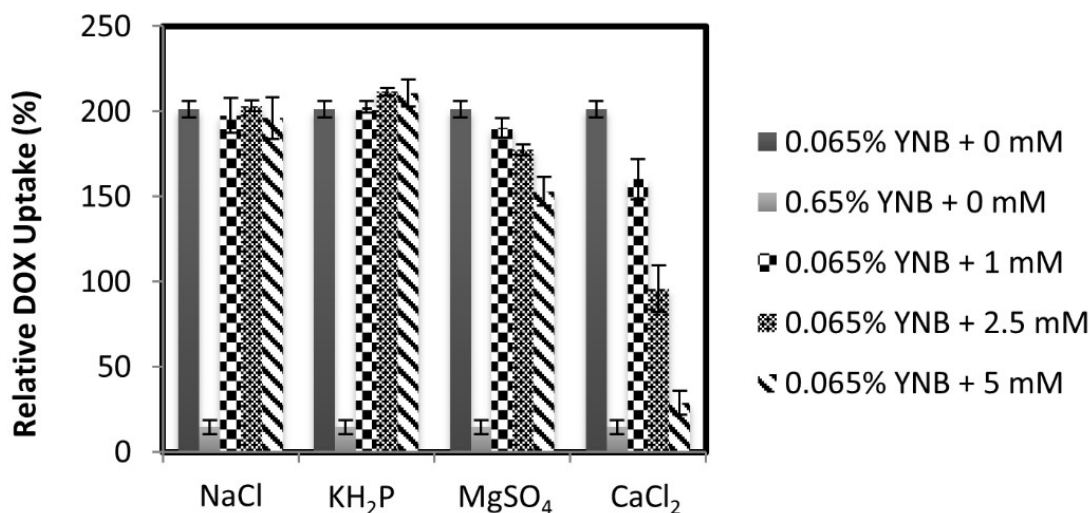


Fig 2. Divalent metal ions present in yeast nitrogen base inhibit DOX uptake into the cells.

The WT strain grown in YPD was washed, resuspended in either low YNB or standard YNB. Uptake assay was started by the addition of 800 μ M of DOX and, at the same time, without and with increasing concentrations of the indicated salts (0 to 5 mM) to the cells in low YNB. Uptake reaction was stopped after 30 min and the intracellular accumulation of DOX was measured by FACS analysis. The results were the averages of three independent experiments.

of DOX into the yeast cells (Fig 2). Interestingly, CaCl₂ at 5 mM potently inhibited the uptake of DOX into the cells, while MgSO₄ was less effective at the same concentration (Fig 2). Other divalent metal ions such as Zn²⁺ and Mn²⁺ also inhibited DOX uptake, but this occurred at substantially higher concentrations unlikely to be present in the minimal media. As such, we strongly suggest that the high concentration of divalent cations such as Ca²⁺ in the minimal media is suppressing the uptake of DOX into the cells (see discussion). However, addition of CaCl₂ alone to YPD media did not block DOX uptake (data not shown), suggesting that CaCl₂ acts together with additional factors and contribute to the inhibition of DOX uptake in minimal media.

3.3. Yeast mutants defective in polyamine uptake are also defective in DOX uptake

We previously documented that Agp2 is a regulator that controls the expression of several plasma membrane transporters [5]. Cells devoid of Agp2 showed resistance to several cationic compounds such as polyamine, bleomycin, and NaD1 [2, 3, 6]. Since DOX is a cationic drug, we examined if *agp2*Δ mutant would be defective in its uptake. While the WT cells efficiently took up DOX in the low YNB media, the *agp2*Δ mutant was defective in the drug uptake (Fig 3A, see also Fig 1A in YPD), consistent with the notion that DOX uptake is dependent upon an active influx transporter regulated by Agp2. The *agp2*Δ mutant was defective in DOX uptake at all concentrations tested (see Fig 1A), but not completely as compared to the WT (Figs 1A and 3A), raising the possibility that a redundant transporter for DOX remains functional in the *agp2*Δ mutant. Using epifluorescent microscopy, we examined whether the uptake of the drug into the WT and the *agp2*Δ mutant

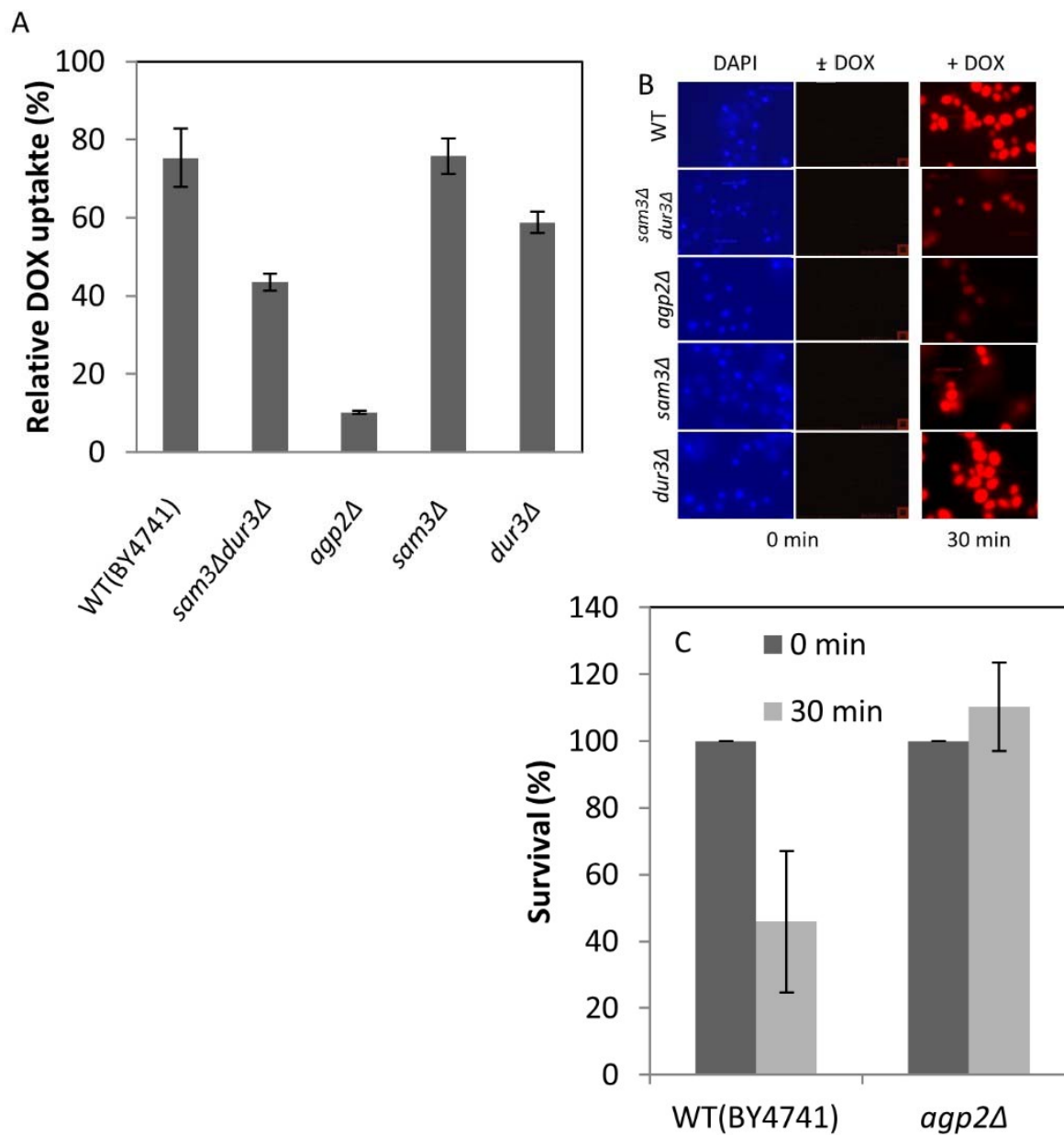


Fig 3. Mutants lacking Agp2 are deficient in DOX uptake and display resistance to the drug. (A) FACS analysis of DOX uptake levels in the WT and the isogenic mutant strains. Cells were incubated in low YNB in the presence of DOX (800 μ M) for 30 min and processed for FACS analysis to quantify the level of drug uptake. The background uptake detected in the presence of normal amount of YNB, which vary between 10 to 20% was subtracted from each analysis to provide the real intracellular uptake of DOX. (B) Epifluorescent microscopy showing the relative accumulation of DOX in the WT and the isogenic mutants. Uptake of DOX (800 μ M) for 30 min was performed in low YNB and the cells processed for epifluorescent microscopy. Images were captured with an Olympus epifluorescent microscope equipped with a camera (see materials and methods). (C) Comparison of the surviving fractions of the WT and *agp2Δ* mutant following exposure to DOX. Uptake was conducted as in panel A, cells diluted and plated for survivors on solid YPD. The results were the averages of two independent experiments.

would correlate with the FACS analysis. As shown in Fig 3B, DOX accumulation in the WT cells was significantly more intense than the *agp2Δ* mutant consistent with the FACS data. As mentioned above, and under these conditions DOX uptake severely compromised staining of the nuclear DNA with DAPI, perhaps a result of DOX intercalating with the DNA that prevented DAPI binding (data in S1 Fig.). Of importance, not all the cells from the *agp2Δ* mutant were defective in DOX uptake, as in any given field there is a fraction that take up the drug (Fig 3C). We suggest this could be the result of another transporter (see discussion).

The increased influx of DOX into the cells is expected to damage the genome and lead to cell death. We examined the surviving fraction of the WT and the *agp2Δ* mutant cells following exposure to DOX. Briefly, exponentially growing cultures in YPD were washed twice in low YNB and incubated with DOX (800 μM) for 30 min followed by plating of the diluted cells to score for the fraction of the cells that survived the treatment. At least 45% of the WT cells did not survive exposure to the DOX treatment, while all the cells of the *agp2Δ* mutant survived (Fig 3C). We conclude from these data that the genotoxic effects of DOX depend on Agp2 for the efficient uptake of the drug into the cells. We next tested if the known polyamine transporters Dur3 and Sam3 that are regulated by Agp2 are involved in the uptake of DOX. The *sam3Δ* mutant was as proficient as the WT in DOX uptake, while *dur3Δ* mutant showed slight decrease in the drug uptake as monitored by FACS analysis (Fig 3A). However, uptake was reduced by nearly 35 to 40% in the *sam3Δdur3Δ* double mutant where both the SAM3 and DUR3 genes were deleted (Fig 3A), suggesting that these transporters play a role in the uptake of DOX. The fact that DOX uptake was not completely

diminished by the *sam3Δdur3Δ* double mutant is in agreement with the existence of additional permease(s) involved in the transport of this drug. It is noteworthy that the uptake of DOX by the *sam3Δdur3Δ* double and the *sam3Δ* and *dur3Δ* single mutants correlated with the level of accumulation of the drug in the cells as observed by epifluorescent microscopy (Fig 3B).

3.4. Expression of either Dur3 or Sam3 rescues DOX uptake in the *sam3Δdur3Δ* double mutant

To further test if Sam3 and Dur3 are involved in DOX uptake, we examined whether expression of these transporters from their endogenous promoter and carried by a multicopy plasmid, pSAM3 and pDUR3, would rescue drug uptake in the *sam3Δdur3Δ* double mutant. RT-PCR analysis revealed that the SAM3 and DUR3 genes were expressed in the *sam3Δdur3Δ* double mutant when compared to the vector control (Fig 4A). Expression of pSAM3 restored DOX uptake in the double mutant to the WT level, while pDUR3 caused a modest stimulation in the uptake as monitored by both FACS and epifluorescent analyses (Fig 4B and 4C, respectively). These data provide further evidence that both Sam3 and Dur3 possess the ability to transport DOX into yeast cells. It is noteworthy that introduction of either pSAM3 or pDUR3 into the *agp2Δ* mutant did not rescue DOX uptake (Fig 4B and 4C), even though DUR3 was expressed at comparable level when introduced into the *sam3Δdur3Δ* double mutant (Fig 4A and 4B). While we have shown previously that Agp2 is required to maintain expression of the endogenous genes, SAM3 and DUR3, and which apparently could be bypassed by a multicopy plasmid as in the case for DUR3 (Fig 4A),

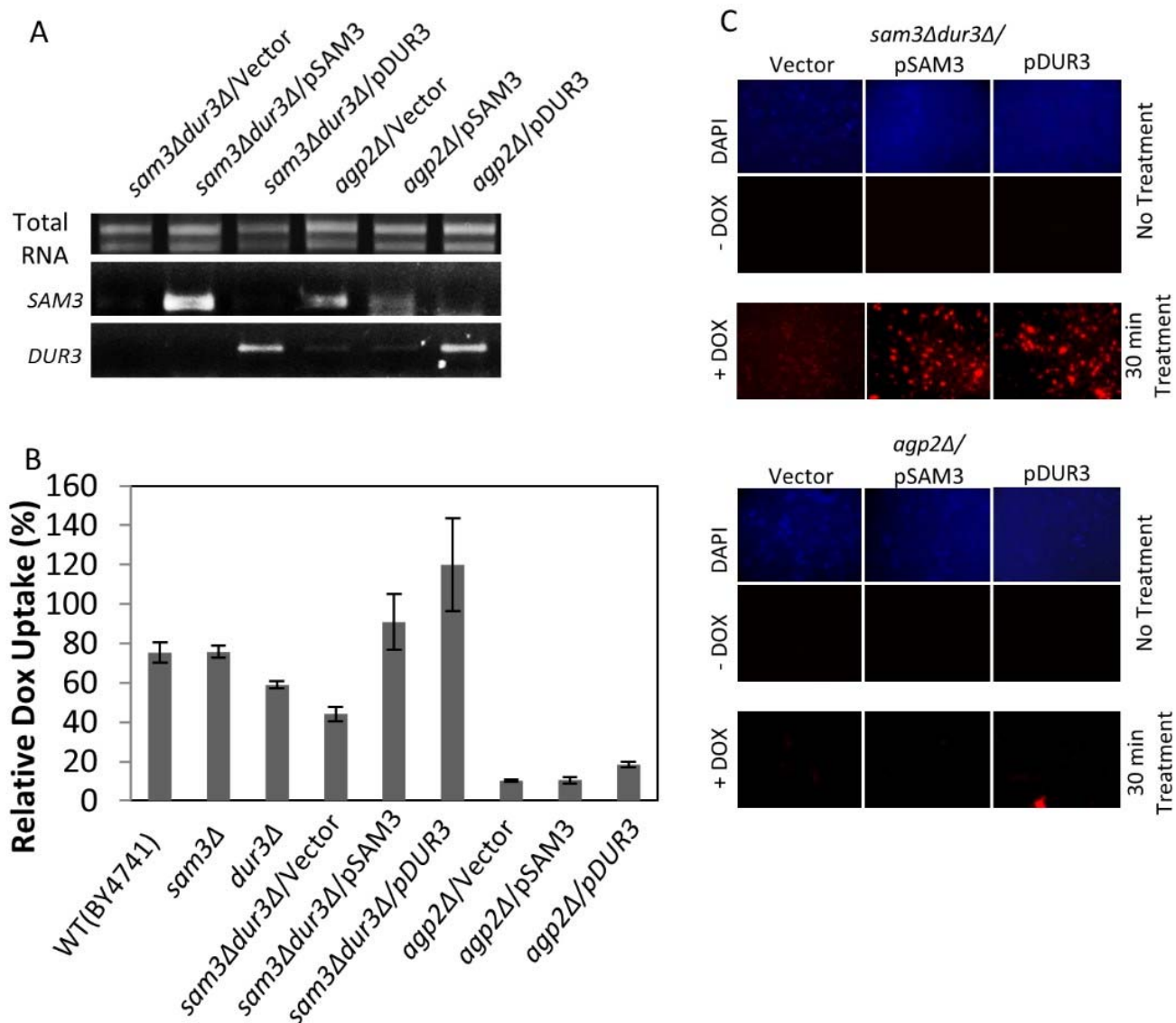


Fig 4. A multicopy plasmid carrying either the entire SAM3 or DUR3 gene rescues DOX uptake in the *sam3Δdur3Δ* double mutant but not in the *agp2Δ* single mutant. (A) RT-PCR analysis showing the expression level of SAM3 and DUR3 in the *sam3Δdur3Δ* and the *agp2Δ* mutants with the indicated plasmids. Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed and the expression level of either SAM3 or DUR3 was assessed from the resulting cDNA using gene specific primers [5]. (B) DOX uptake is mediated by the Sam3 and Dur3 transporters and depends on Agp2 function. The multicopy plasmid pSAM3 or pDUR3 carrying the entire SAM3 or DUR3 gene, respectively, with the endogenous promoter was introduced into either the *sam3Δdur3Δ* double mutant or the *agp2Δ* single mutant and the resulting transformants monitored for DOX uptake in low YNB using FACS analysis. (C) Epifluorescent microscopy showing that either pSAM3 or pDUR3 restores DOX uptake to the *sam3Δdur3Δ* double mutant, but not to the *agp2Δ* mutant. Microscopy was conducted as in Fig 3B.

there is no evidence whether Agp2 is also involved in the post-transcriptional or-translational regulation of these transporters [5].

3.5. Expression of *C. elegans* OCT-1 rescues DOX uptake in the *agp2* Δ mutant

Our next objective was to determine whether higher eukaryotic cells carry genes that will permit uptake of DOX into yeast cells. Since Sam3 and Dur3 can transport a variety of cationic compounds, in particular, the prototypical substrate tetraethylammonium (TEA) used for classifying transporters into organic cation transporter family, we decided to search the literature for higher eukaryotic transporters with the ability to transport [¹⁴C]labeled TEA [21]. The search revealed the *C. elegans* OCT-1 (CeOCT-1) protein identified as a transporter for TEA and more recently as a transporter for ergothioneine [21, 22]. Analysis from the wormbase sequence data revealed that there are two isoforms, OCT-1a and OCT-1b, with OCT-1a possessing an extra 17 amino acid residues at the N-terminus (MSFQAMETFAEISQEIL) as compared to OCT-1b (data in S2 Fig). Deletion of the *oct1* gene in *C. elegans* has been shown to shorten the lifespan of the animal, which may be related to oxidative stress caused by a defect in the import of the antioxidant ergothioneine [22]. Comparison between CeOCT-1 and Sam3 or Dur3 revealed no significant identity as determined by the CLUSTALW program, but CeOCT-1 shared 31.1% identity with the human OCT1 (data in S2 Fig). We obtained a cDNA clone, which upon DNA sequencing corresponded to the F52F12.1 gene locus of chromosome 1 encoding the CeOCT-1b isoform

[21]. We engineered a construct pCeOCT-1 to express CeOCT-1b in the yeast *agp2Δ* mutant using gap repair such that the expression was driven by the yeast constitutive ADH promoter and carrying a C-terminal MYC tag. As shown in Fig 5A, the CeOCT-1-MYC fusion protein was expressed in the *agp2Δ* mutant as monitored by Western blot analysis probed with anti-MYC monoclonal antibody. The expected size of CeOCT-1 is approximately 62 kDa and with the MYC tag the predicted size is estimated to be 64 kDa. However, expression of CeOCT-1 in yeast generated a protein that was substantially higher in molecular weight, suggesting that the protein is likely modified in yeast cells causing a significant shift in its mobility. In fact, CeOCT-1 is predicted to have three potential N-glycosylation sites Asn-70, Asn-81, and Asn-116 [21].

We next examined whether CeOCT-1 expression would stimulate DOX uptake in yeast cells. The expression of CeOCT-1 in *agp2Δ* mutant stimulated DOX uptake by 6-fold when compared to the mutant carrying the empty vector, which was assessed by both FACS and epifluorescent analyses (Fig 5B and 5C). The level of DOX uptake stimulated by CeOCT-1 expression in the *agp2Δ* mutant was nearly comparable to the level of drug uptake observed in the WT strain (Fig 5B). This suggests that expression of CeOCT-1 can function to take up DOX into yeast cells, but it is unable to further stimulate uptake beyond the level observed in the WT cells. We note that the ADH promoter driving the expression of CeOCT-1 is independent of Agp2 function [5].

3.6. The *C. elegans* OCT-1 variants Q15A, C31A, Q109A and K300A are expressed, but defective in rescuing DOX uptake in the *agp2Δ* mutant

To confirm that CeOCT-1 is indeed responsible for DOX uptake in the *agp2Δ* mutant, we examined the effect of four separate amino acid substitutions Q15A, C31A, Q109A and K300A within the transporter. We created these CeOCT-1 variants as the substituted amino acid residues are conserved in the human OCT1 transporter (data in S2 Fig). In addition, we wanted to test whether changing the amino charge in different regions that include the N-terminal, transmembrane, extracellular and intracellular domains would interfere with the protein function [21]. The CeOCT-1 variants were expressed under the same expression system as the native CeOCT-1. All four CeOCT-1 variants, CeOCT-1-Q15A, CeOCT-1-C31A, CeOCT-1-Q109A, and CeOCT-1-K300A were expressed at similar level and with the same high molecular weight forms as the native CeOCT-1 protein when monitored by Western blot probed with anti-MYC (Fig 5A). These four variants were all defective in DOX uptake into the *agp2Δ* mutant, as compared to the native CeOCT-1 protein (Fig 5B and 5C). Since single mutations blocked the transport function of CeOCT-1, it appears that CeOCT-1 acts directly, and not via an interaction with another yeast transporter, to trigger the influx of DOX into the cells.

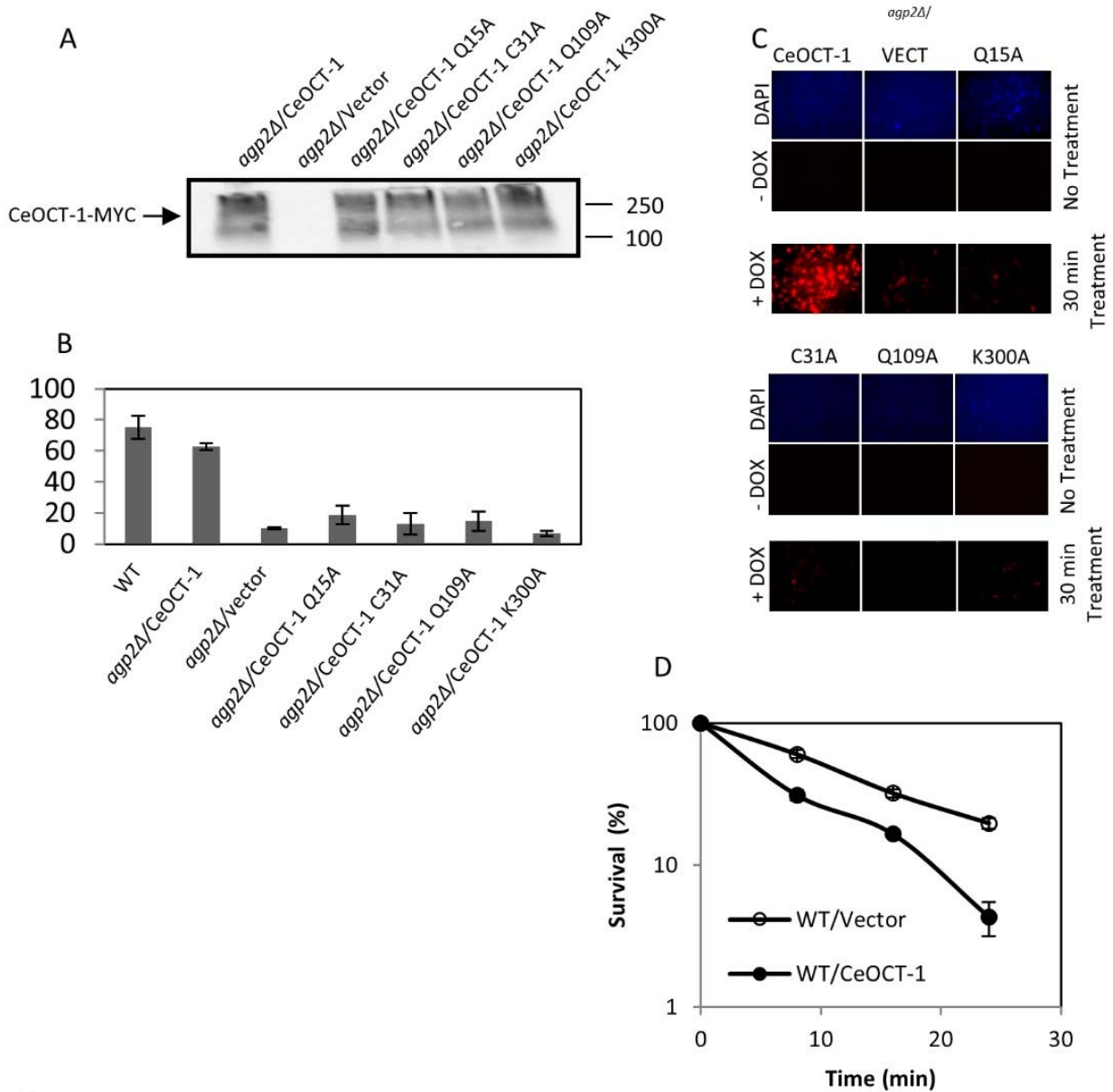


Fig 5. Expression of the native CeOCT -1, but not the variants, rescues DOX uptake in the *agp2Δ* mutant. Briefly, the *C. elegans* oct -1 gene was cloned next to the ADH promoter and placed in frame with a C-terminal MYC epitope tag in the vector pTW438 to produce the plasmid CeOCT-1. The four variants were derived from pCeOCT-1 by site-directed mutagenesis. (A) Western blot analysis showing expression of CeOCT-1-MYC and its variants in the *agp2Δ* mutant. Equal amounts of total protein extracts (50 μ g) were probed with anti-MYC antibodies and the molecular size markers are indicated in kD. (B) FACS analysis showing that pCeOCT-1, but not the variants, stimulates DOX uptake to nearly WT level in the *agp2Δ* mutant. DOX uptake was monitored using FACS analysis. (C) Epifluorescent microscopy showing that pCeOCT-1, but not the variants, causes the accumulation of DOX in the *agp2Δ* mutant. The cells used for this analysis were the same as for the FACS analysis in panel B. (D) Expression of CeOCT-1 sensitizes the WT cells to the killing effects of DOX. Exponentially growing cells in selective minimal media were washed twice with the low YNB uptake buffer, adjusted to OD600 of \sim 1.0 then incubated in the same buffer with 800 μ M DOX in a final volume of 100 μ l. Samples 20 μ l were taken at 0, 8, 16, and 24 mins, diluted 10,000 fold and 100 μ l plated onto solid selective minimal media to score for the surviving fractions, expressed as a percentage of the zero time point set at 100%.

3.7 Expression of CeOCT-1 sensitizes the WT strain to the genotoxic effects of DOX

Since CeOCT-1 mediated the transport and accumulation of DOX into the yeast cells, we reasoned that the expression of this transporter would enhance the sensitivity of cells to the drug. In order to verify this hypothesis, the vector and the pCeOCT-1 plasmid were separately introduced into the WT cells and the resulting transformants were tested for DOX sensitivity by scoring for survivors. Briefly, exponentially growing cultures in minimal media were washed twice in low YNB and incubated with DOX (800 μ M) followed by plating the cells to score for the survivors. When the WT cells expressing CeOCT-1 were challenged with DOX there was a time-dependent decreased in cell survival with only 5% of the cells surviving after 24 min (Fig 5D). In contrast, substantially more cells, ~ 35 to 40%, that carried only the empty vector survived the treatment for 24 min (Fig 5D). Collectively, our data suggest that transporters exist in eukaryotic cells that can regulate cellular response to anthracyclines.

4. Discussion

In this study, we show for the first time the yeast plasma membrane transporters Sam3 and Dur3, as well as their regulator Agp2, are involved in mediating the uptake of anthracyclines into the cells. These findings negate earlier claims that anthracyclines enter cells by simply diffusion across the plasma membrane (see in review [23]). Both Sam3 and Dur3 are not specific for anthracyclines as they serve to transport other substrates including polyamines into the cells [4, 5]. Our data suggest that the Agp2-regulated transporters operate with low affinity, mediating uptake when the drug concentration is high, that is, in excess of 100 μM . However, we cannot rule out the possibility that the assay conditions developed herein might be suboptimal and therefore it might not accurately assess the uptake affinities for these transporters. Many organisms including yeast have both low and high affinity transporters for various substrates such as polyamines, potassium, calcium, and amino acids, indicating that there might also be a high affinity DOX transporter in yeast [3, 5, 24]. We did not observe uptake at low DOX concentrations (10 μM) and perhaps the assay conditions might not be suitable to detect the existence of a high affinity transporter for DOX. Our observations that deletion of both DUR3 and SAM3 did not completely block DOX uptake and that the deletion of AGP2 only further reduced the uptake, raise the possibility that at least one additional transporter exists to take up DOX into the cells. In fact, a *dur3 Δ sam3 Δ agp2 Δ* triple mutant showed the same low level of DOX uptake as the *agp2 Δ* single mutant (data not shown), excluding the possibility that Dur3 and/or Sam3 could be the redundant transporter in the *agp2 Δ* mutant. It is therefore possible that the existence of redundant DOX transporters might have prevented their detection in previous studies that applied genome-wide screens [9, 25]. It is noteworthy that in the case of the *agp2 Δ* mutant

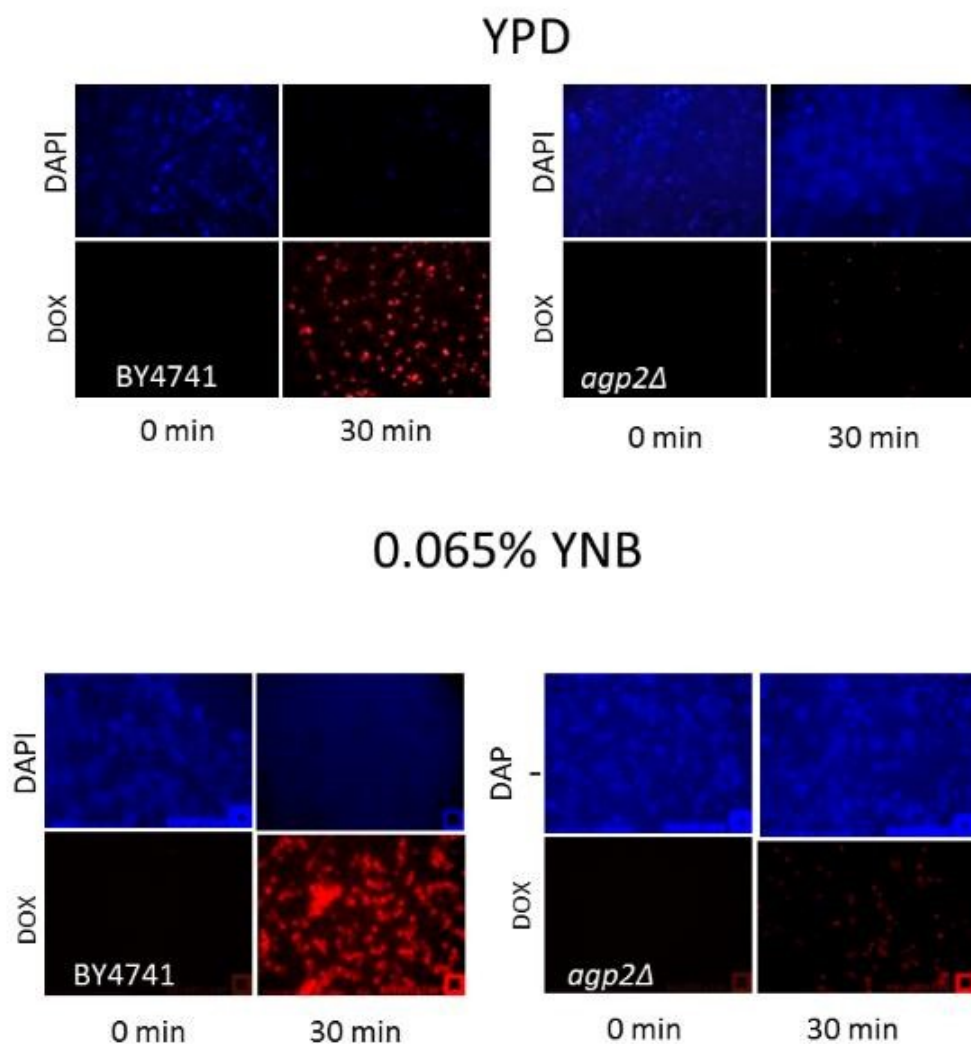
there are isolated cells in the population that showed significant DOX staining by epifluorescent microscopy as if these cells efficiently took up the drug (data in S1 Fig.). These brightly stained cells showed normal morphology and do not appear to be dead cells by FACS analysis, which would give a specific FSC/SSC location. As such, we speculate that these cells could be a reflection of a subpopulation expressing a redundant transporter. We have not attempted to synchronize the *agp2Δ* mutant and measure DOX uptake at the different phases of the cell cycle to test if the subpopulation exists in a particular phase. Nonetheless, we predict that deletion of this putative transporter in the *agp2Δ* mutant should completely abolish the drug uptake. Herein, we found that CaCl₂ is a potent inhibitor blocking DOX uptake into yeast cells when the assay was conducted in minimal, but not in YPD, media. It is unlikely that Ca²⁺ binds to DOX to form a complex that impedes the drug uptake, as addition of CaCl₂ to the uptake assay system for anthracyclines into mammalian cells did not prevent the drug entry (E.M., N.B., and D.R., in preparation). It is also unlikely that CaCl₂ shut down the synthesis of Dur3, Sam3 and other transporters responsible for DOX uptake, as these transporters have not been implicated in preventing Ca²⁺ toxicity and the *agp2Δ* mutant is no more resistant to CaCl₂ than the parent [2, 5]. Moreover, we further exclude the possibility that CaCl₂ stimulates rapid efflux of DOX from the cells, as cells pre-incubated with DOX for 30 min followed by the addition of CaCl₂ did not interfere with the intracellular level of the accumulated DOX. A reasonable explanation for the DOX uptake inhibition by the elevated level CaCl₂ is that Ca²⁺ may signal a stress response that either inactivates the function of the transporters or activates the cell wall integrity pathway such that it alters the composition of the cell wall to prevent passage of the drug when cells are incubated in the minimal media [26]. In yeast, elevated concentrations of Ca²⁺ is sensed

by the Ca^{2+} sensor protein calmodulin, which binds and activates the protein phosphatase calcineurin [27, 28]. Calcineurin can act to dephosphorylate the transcription factor Crz1, which then translocates from the cytosol to the nucleus where it binds to promoters with calcineurin-independent response element to activate expression of nearly 160 genes some of which encode proteins that are involved in cell wall integrity [27–29]. Thus, in the presence of high Ca^{2+} , diffusion of DOX across the cell wall might be blocked and preventing it from reaching the plasma membrane. Alternatively, since Dur3 is phosphorylated, and possibly Sam3, by the Ptk2 kinase [4], it seems possible that the Ca^{2+} activated calcineurin phosphatase could dephosphorylate these transporters and inactivate the uptake functions. Testing these possibilities would require extensive genetic studies that disrupt components of the Ca^{2+} signaling and the cell wall integrity pathways. The restoration of DOX uptake into the *agp2* Δ mutant by expression of the *C. elegans* OCT-1 transporter strongly suggests that the transporters, as well as the substrate specificities, are conserved across species. However, we could not test directly whether CeOCT-1 functions as a DOX transporter in *C. elegans*, since uptake measurements are complicated by endogenous autofluorescent molecules with the same emission spectrum as DOX. Nonetheless, our data suggest that the yeast model system is useful to search for similar uptake permease(s) in mammalian cells. Preliminary uptake studies revealed that DOX can be actively transported into several human cell lines (E.M., N.B., and D.R., in preparation), although the nature and identity of the transporter await further studies. It is noteworthy that an earlier study by Okabe et al., claimed that the organic cation transporter hCT2 is an uptake transporter for DOX [18]. We have expressed hCT2 in our yeast system, but unable to detect hCT2-mediated DOX uptake. There are at least five other organic cation transporters OCTN1, OCTN2, OCT1, OCT2 and

OCT3, that have been characterized for functional roles in the uptake of various substrates that include L-carnitine, choline, ergothioneine, and the diabetes and anticancer drugs, metformin and imatinib, respectively [30, 31][32–34]. The *C.elegans* OCT-1 shares varying homology and distinct differences with each of these human organic cation transporters, for example, CeOCT-1 shares nearly 31% identity in a stretch of 440 amino acid residues with the human OCT1 (data in S2 Fig.), and thus it is possible that more than one of these human transporters could be involved in DOX uptake. Finding a DOX transporter(s) would be of great advantage as it might help to determine whether patients who are resistant to DOX treatment possess a defect in the drug uptake and thus would benefit from alternative therapy, as opposed to performing induction therapy without the knowledge whether the drug can enter or not into the cancer cells.

In short, we have documented that yeast cells contain plasma membrane transporters that mediated the uptake of an important family of anticancer drugs, anthracyclines. Identifying and characterizing these transporters in human cells are likely to provide helpful hints to explain why a significant fraction of older patients with acute myeloid leukemia is resistant to anthracyclines possibly due to defects in the drug uptake.

5. Supporting Information



S1 Fig. Doxorubicin compromises DAPI staining.

Cells were grown in YPD media and uptake was carried out for 30 min with 800 μ M DOX in either the same media or transfer to low YNB. Cells without DOX or after uptake were staining with DAPI before microscopy. In all experiments, DOX uptake severely compromised staining of the nuclear DNA with DAPI, which is likely due to the binding of DOX onto the DNA prevents DAPI binding.

6. Acknowledgments

We thank Arturo Papaluca for his microscopy expertise and providing the images for Fig 1C. This work was supported by research grants (MOP-93573 and RGPIN/202432-2012) to D. R. from the Canadian Institute of Health Research and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada.

7. Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NB EA DR. Performed the experiments: NB DR.

Analyzed the data: NB EA DR. Contributed reagents/materials/analysis tools: NB EA DR.

Wrote the paper: NB DR.

8. References (De l'article I)

1. van Roermund CW, Hetteema EH, van den Berg M, Tabak HF, Wanders RJ. Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *Embo J.* 1999;18(21):5843–52. pmid:10545096 doi : 10.1093/emboj/18.21.5843
2. Aouida M, Page N, Leduc A, Peter M, Ramotar D. A Genome-Wide Screen in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Altered Transport As a Mechanism of Resistance to the Anticancer Drug Bleomycin. *Cancer Res.* 2004;64(3):1102–9. pmid:14871844 doi: 10.1158/0008-5472.can-03-2729
3. Aouida M, Leduc A, Poulin R, Ramotar D. AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2005;280(25):24267–76. pmid:15855155. doi: 10.1074/jbc.m503071200
4. Uemura T, Kashiwagi K, Igarashi K. Polyamine Uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7733–41. pmid:17218313. doi: 10.1074/jbc.m611105200
5. Aouida M, Rubio-Teixeira M, Thevelein JM, Poulin R, Ramotar D. Agp2, a member of the yeast amino acid permease family, positively regulates polyamine transport at the transcriptional level. *PLoS One.* 2013;8(6):e65717. Epub 2013/06/12. doi : 10.1371/journal.pone.0065717PONE-D-13-12069 [pii]. pmid:23755272; PubMed Central PMCID : PMC3670898.
6. Bleackley MR, Wiltshire JL, Perrine-Walker F, Vasa S, Burns RL, van der Weerden NL, et al. Agp2p, the plasma membrane transregulator of polyamine uptake, regulates the antifungal activities of the plant defensin NaD1 and other cationic peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2688–98. Epub 2014/02/26. AAC.02087-13 [pii] doi : 10.1128/AAC.02087-13 pmid:24566173; PubMed Central PMCID : PMC3993230.
7. Hillgren KM, Keppler D, Zur AA, Giacomini KM, Stieger B, Cass CE, et al. Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(1):52–63. Epub 2013/04/17. clpt201374 [pii] doi: 10.1038/clpt.2013.74 pmid:23588305.
8. Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(1):29– 44. Epub 2014/12/06. nrd4461 [pii] doi : 10.1038/nrd4461 pmid:25475361.

9. Westmoreland TJ, Wickramasekara SM, Guo AY, Selim AL, Winsor TS, Greenleaf AL, et al. Comparative genome-wide screening identifies a conserved doxorubicin repair network that is diploid specific in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 2009;4(6):e5830. Epub 2009/06/09. doi : 10.1371/journal.pone.0005830 pmid:19503795; PubMed Central PMCID : PMC2688081.
10. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453–74. Epub 2009/11/03. blood-2009-07-235358 [pii] doi: 10.1182/blood2009-07-235358 pmid:19880497.
11. Chauncey TR. Drug resistance mechanisms in acute leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2001;13(1):21–6. Epub 2001/01/10. pmid:11148681. doi : 10.1097/00001622-20010100000005
12. Marie JP. Drug resistance in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol*. 2001;13(6):463–9. Epub 2001/10/24. pmid:11673686. doi: 10.1097/00001622200111000-00008
13. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100(13):4325–36. Epub 2002/10/24. doi: 10.1182/blood-2002-03-0772 2002-03-0772 [pii]. pmid:12393746.
14. Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet*. 1995;29:607–49. pmid:8825488 doi : 10.1146/annurev.ge.29.120195.003135
15. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 2001;42(7):1007–17. pmid:11441126 doi : 10.1101/gr.gr-1649r
16. Chen G, Jaffrezou JP, Fleming WH, Duran GE, Sikic BI. Prevalence of multidrug resistance related to activation of the *mdr1* gene in human sarcoma mutants derived by single-step doxorubicin selection. *Cancer Res*. 1994;54(18):4980–7. pmid:7915196
17. Kolitz JE, George SL, Marcucci G, Vij R, Powell BL, Allen SL, et al. P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. *Blood*. 2010;116(9):1413–21. Epub 2010/06/05. blood-2009-07-229492 [pii] doi: 10.1182/blood-2009-07-229492 pmid:20522709; PubMed Central PMCID :

18. Okabe M, Unno M, Harigae H, Kaku M, Okitsu Y, Sasaki T, et al. Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(3):754–62. pmid:15963465. doi : 10.1016/j.bbrc.2005.05.174
19. Swietach P, Hulikova A, Patiar S, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Importance of intracellular pH in determining the uptake and efficacy of the weakly basic chemotherapeutic drug, doxorubicin. *PLoS One.* 2012;7(4):e35949. Epub 2012/05/09. doi: 10.1371/journal.pone.0035949 PONE-D-12-06979 [pii]. pmid:22563426; PubMed Central PMCID : PMC3338554.
20. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* 1995;11(4):355–60. pmid:7785336 doi: 10.1002/yea.320110408
21. Wu X, Fei YJ, Huang W, Chancy C, Leibach FH, Ganapathy V. Identity of the F52F12.1 gene product in *Caenorhabditis elegans* as an organic cation transporter. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1418(1):239–44. Epub 1999/04/21. S0005-2736(99)00020-6 [pii]. pmid:10209228. doi : 10.1016/s0005-2736(99)00020-6
22. Cheah IK, Ong RL, Gruber J, Yew TS, Ng LF, Chen CB, et al. Knockout of a putative ergothioneine transporter in *Caenorhabditis elegans* decreases lifespan and increases susceptibility to oxidative damage. *Free Radic Res.* 2013;47(12):1036–45. Epub 2013/10/01. doi : 10.3109/10715762.2013.848354 pmid:24074059.
23. Nikitovic D, Juranek I, Wilks MF, Tzardi M, Tsatsakis A, Tzanakakis GN. Anthracycline-dependent cardiotoxicity and extracellular matrix remodeling. *Chest.* 2014;146(4):1123–30. Epub 2014/10/08. 1912454 [pii] doi : 10.1378/chest.14-0460 pmid:25288002.
24. Stefan CP, Zhang N, Sokabe T, Rivetta A, Slayman CL, Montell C, et al. Activation of an essential calcium signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by Kch1 and Kch2, putative low-affinity potassium transporters. *Eukaryot Cell.* 2013;12(2):204–14. Epub 2012/12/04. EC.00299-12 [pii] doi: 10.1128/EC.00299-12 pmid:23204190; PubMed Central PMCID: PMC3571297.
25. Xia L, Jaafar L, Cashikar A, Flores-Rozas H. Identification of genes required for protection from doxorubicin by a genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* 2007;67(23):11411–8. Epub 2007/12/07. 67/23/11411 [pii] doi : 10.1158/00085472.CAN-07-2399 pmid:18056469; PubMed Central PMCID : PMC3635107.
26. Lavina WA, Hermansyah , Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S. Functionally redundant protein phosphatase genes PTP2 and MSG5 co-regulate the calcium signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to high extracellular calcium concentration. *J Biosci Bioeng.* 2013;115(2):138–46. Epub

2012/10/16. S1389-1723(12)00365-9 [pii] doi : 10.1016/j.jbiosc.2012.08.022
pmid:23063697.

27. Cyert MS. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* : how yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(4):1143–50. Epub 2003/11/19 .S0006291X03015523 [pii] .pmid:14623300. doi : 10.1016/s0006291x(03)01552-3
28. Cunningham KW. Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Calcium.* 2011;50(2):129–38. Epub 2011/03/08. S0143-4160(11)00021-2 [pii] doi : 10.1016/j.ceca.2011.01.010 pmid:21377728; PubMed Central PMCID : PMC3137693.
29. Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, et al. Genomewide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2002;277(34):31079–88. Epub 2002/06/12. doi: 10.1074/jbc.M202718200 M202718200 [pii]. pmid:12058033.
30. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Hughes TP. OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1. *Leukemia.* 2010;24(11):1962–5. Epub 2010/09/03. leu2010188 [pii] doi : 10.1038/leu.2010.188 pmid:20811406.
31. Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes mellitus. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(4):242–7. Epub 2009/04/22. tpj200915 [pii] doi : 10.1038/tpj.2009.15 pmid:19381165.
32. Sinclair CJ, Chi KD, Subramanian V, Ward KL, Green RM. Functional expression of a high affinity mammalian hepatic choline/organic cation transporter. *J Lipid Res.* 2000;41(11):1841–8. Epub 2000/11/04. pmid:11060354.
33. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, et al. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem.* 1998;273(32):20378–82. pmid:9685390 doi: 10.1074/jbc.273.32.20378
34. Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2–3):413–35. Epub 2013/03/20. S00982997(12)00124-0 [pii] doi : 10.1016/j.mam.2012.10.010 pmid:23506881.

CHAPITRE 3

Discussion et Conclusion

1. Retour sur les résultats

1.1 La DOX chez *S. cerevisiae*

Les résultats démontrent que les levures sont en mesure d'absorber la DOX et que celle-ci, tout comme chez l'humain, s'accumule préférentiellement sur la chromatine. De plus, la DOX à un effet létal sur la levure dont le mécanisme d'action est identique à celui retrouvé chez les mammifères puisque *S. cerevisiae* possède également une TOP II ayant les mêmes fonctions que celles retrouvées chez l'humain [92, 222]. Il faut toutefois observer que les concentrations de DOX utilisées dans cette étude sont incroyablement grandes comparativement à celles utilisées sur les cellules humaines. En effet, alors que les levures requièrent une concentration minimale de 100 μM pour observer une accumulation visible de DOX sur l'ADN et de 800 μM pour induire la mort cellulaire suite à une courte exposition, les études menées sur des cellules humaines utilisent des concentrations dépassant rarement les 5 μM et pouvant aller jusqu'à 0,25 μM [63, 74, 98, 109, 110]. Des études avec la DOX, chez la levure, ont déjà été menées en utilisant des concentrations inférieures à 800 μM , cependant, en utilisant des temps d'exposition bien supérieurs, toutefois, même dans ces études, les concentrations de DOX n'approchaient pas celles utilisées avec les cellules humaines [88, 223]. Cela implique que, bien que la DOX agisse chez la levure de manière similaire à son mode d'action chez l'humain, les levures sont, en comparaison, beaucoup plus résistantes à la DOX et, plus particulièrement, à l'accumulation de DOX dans la cellule. Il y a plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer ce phénomène. Peut-être la levure ne dispose-t-elle pas de système de haute affinité pour l'absorption de la DOX. Il est également possible qu'elle exprime naturellement des transporteurs qui font ressortir la DOX de la cellule en empêchant son

accumulation. En effet, ce genre de transporteur existe chez l'humain [98, 106, 107]. Il est possible que des transporteurs comme les TPO soient impliqués dans le transport de la DOX depuis le cytoplasme vers l'extérieur [158, 160, 161, 224-226]. Une autre hypothèse est l'implication de la paroi cellulaire que possèdent les levures. En effet, avant d'interagir avec un quelconque transporteur la molécule doit d'abord diffuser à travers cette paroi. Si la DOX éprouvait des difficultés à passer la paroi cellulaire, cela pourrait expliquer la résistance des levures à l'accumulation de la DOX [227-229]. C'est d'ailleurs par une modification de la paroi cellulaire que le Ca^{2+} pourrait empêcher l'entrée de DOX dans la levure. En effet, la calcineurine peut déphosphoryler le facteur de transcription Crz1, ce qui conduirait à une modification de l'expression de plusieurs protéines dépendantes du Ca^{2+} , dont plusieurs composent la paroi cellulaire [230-233].

1.2 Agp2 contrôle l'absorption de la DOX chez *S. cerevisiae*

Ces résultats montrent que malgré la résistance naturelle des levures à la DOX, il est possible d'étudier le transport de cette molécule chez la levure. En effet, même à de très fortes concentrations, la délétion du gène AGP2 augmente la résistance de la levure à la DOX et diminue de façon importante son accumulation dans la cellule. Cela contredit fortement l'idée selon laquelle la DOX entrerait dans les cellules par simple diffusion passive à travers la membrane des cellules. Toutefois, il est peu probable qu'Agp2 agisse comme transporteur de la DOX [3]. De fait, la délétion simultanée des transporteurs de polyamines Sam3 et Dur3 permet de réduire l'absorption de la DOX alors que la délétion d'un seul transporteur à la fois n'a que peu ou pas d'effet. Cela suggère que ces deux transporteurs, bien que possédant des affinités et des substrats différents

[211-216], sont tous deux capables de transporter la DOX et en l'absence de l'un d'eux, l'autre comblera le manque. Ce constat est supporté par le fait que la sur-expression de l'un ou l'autre de ces transporteurs stimule l'accumulation de DOX dans un double mutant *sam3Δdur3Δ*. Toutefois, on n'observe pas ce phénomène dans le mutant *agp2Δ*, ce qui est tout à fait logique puisque ces gènes ont été surexprimés en utilisant leur promoteur endogène et que celui-ci est sous le contrôle d'Agp2. Malheureusement, le RT-PCR n'est pas aussi informatif qu'un western blot sur l'activité de ces transporteurs, toutefois, il nous a été impossible d'insérer un tag sur protéines et nous ne possédons pas d'anticorps reconnaissant ces protéines. Il est peu probable que l'effet de SAM3 et DUR3 soit dû à un effet indirect de ces protéines puisqu'elles sont caractérisées comme transporteurs [3, 158, 162, 212, 217]. On remarque, dans la microscopie, que certaines cellules *agp2Δ* brillent plus que les autres. Cela pourrait être un effet du cycle cellulaire ou simplement des cellules mortes ou mourantes. On remarque, cependant, que l'accumulation de DOX dans le double mutant *sam3Δdur3Δ* demeure supérieure à celle d'un mutant *agp2Δ*. Cela suggère que, même si Sam3 et Dur3 sont tous deux capables de transporter la DOX, il existe une autre voie également sous le contrôle d'Agp2. Dans un mutant *agp2Δ*, il y a plus de 20 transporteurs qui sont sous-exprimés. Chacun d'entre eux pourrait être responsable de la différence d'accumulation de DOX entre le double mutant *sam3Δdur3Δ* et le mutant *agp2Δ* [3]. Le plus probable est HNM1 puisqu'il s'agit du transporteur de choline. Or il a été démontré que la choline inhibait l'accumulation d'une autre anthracycline, la DNR, chez l'humain [204, 208, 234, 235]. D'ailleurs, le fait que la présence d'un composé dans le milieu, tout comme la suppression d'un transporteur, puisse compromettre l'entrée des anthracyclines dans la cellule suggère fortement que la diffusion passive n'est pas impliquée dans l'entrée des anthracyclines dans les cellules ou qu'elle constitue une voie négligeable.

1.3 L'expression de OCT-1 de *C. elegans* restaure l'absorption de la DOX chez le mutant *agp2Δ*.

L'expression de protéines provenant d'autres organismes eucaryotes chez la levure avait déjà été tentée [220], mais les résultats de cette étude confirment cette possibilité et l'intérêt d'utiliser la levure pour étudier des protéines d'autres organismes eucaryotes. En effet, les résultats suggèrent fortement que la protéine de *C. elegans* OCT-1 était capable d'utiliser la DOX comme substrat. Sa sur-expression a permis de rétablir l'accumulation de DOX chez le mutant *agp2Δ* et d'augmenter la sensibilité de la souche WT à ses effets létaux. Pour une raison inconnue, la sur-expression de CeOCT-1 ne semblait pas sensibiliser les cellules *agp2Δ* à la DOX. Cela pourrait être dû au changement d'expression d'une ou de plusieurs protéines induit par la délétion de AGP2 [3]. Il serait possible que l'augmentation de l'accumulation de DOX dans la cellule soit due à un effet indirect de la protéine. Toutefois, comme CeOCT-1 a été caractérisé comme transporteur [236, 237], cela est peu probable. Le fait que des mutations ponctuelles puissent prévenir l'effet de la sur-expression de CeOCT-1 réduit la probabilité que l'effet de CeOCT-1 soit uniquement dû à une perturbation de la membrane cytoplasmique puisque ces mutations n'affectent pas nécessairement la localisation de la protéine [234]. Elles n'excluent toutefois pas complètement la possibilité que CeOCT-1 augmente l'accumulation de DOX via une interaction avec une autre protéine. Cette protéine a été identifiée chez *C. elegans* en 1999 en scannant le génome de cet organisme à la recherche de séquences homologues à celles des OCTs chez l'humain [237]. Récemment, un transporteur de haute affinité pour les anthracyclines a été identifié chez l'humain : OCT1 [234]. Ainsi, ces résultats sont cohérents avec l'implication de OCT1 comme transporteur d'anthracyclines, chez l'humain, et l'homologie partagée avec la protéine de *C. elegans* OCT-1.

Toutefois, il existe également un CeOCT-2 chez *C. elegans* et il est bien possible qu'il soit également capable d'utiliser la DOX comme substrat, mais on ne peut trouver que très peu de littérature sur cette protéine. Il est connu que, chez l'humain, les protéines OCT1, OCT2 et OCT3 partagent un grand nombre de substrats tout en possédant leur affinité propre, pour chacun d'entre eux [101, 138]. En exemple, la metformine, un médicament antidiabétique, peut être transportée par les trois protéines [115, 132, 238-249]. Ainsi, il pourrait être intéressant de répéter l'expérience en utilisant la protéine de *C. elegans* CeOCT-2.

1.4 Faiblesses de l'étude

Comme toute étude, celle-ci comporte quelques faiblesses. Nous avons tenté d'exprimer OCT1, récemment identifié comme transporteur de haute affinité pour les anthracyclines chez l'humain. Bien que l'expression de hOCT1 ait augmenté l'accumulation de DOX dans le mutant *agp2Δ*, cette augmentation n'était pas aussi grande qu'avec CeOCT-1. Or, il a été démontré que hOCT1 était en mesure de transporter la DNR à des concentrations de moins de 5 μ M. Ainsi, la faiblesse de l'étude est que, bien qu'elle puisse identifier un transporteur pour les anthracyclines, elle n'est pas représentative de l'affinité du transporteur pour le substrat. Les levures sont résistantes à l'accumulation de DOX et il semblerait que l'expression de transporteur d'autres organismes eucaryotes ne soit pas en mesure de venir à bout de cette résistance naturelle. Cela réduit la probabilité que cette résistance soit due à l'absence de transport de haute affinité chez *S. cerevisiae*, puisque, même en y exprimant un transporteur de haute affinité, on n'observe toujours pas d'effet notable à moins de 100 μ M de DOX. Toutefois, il faut noter que les conditions dans

lesquelles sont effectués les tests d'absorption ne sont peut-être pas optimales pour ces transporteurs exogènes. De plus, les protéines membranaires, comme les transporteurs, doivent subir des modifications posttraductionnelles, c'est-à-dire qu'une fois la protéine formée, elle doit être modifiée, par exemple, par la glycosylation ou la phosphorylation [250, 251]. L'absence de ces modifications peut empêcher la protéine de fonctionner correctement. Ainsi, si cette méthode permet d'identifier des transporteurs d'autres organismes eucaryotes pour les anthracyclines, des études menées directement sur l'organisme en question seront nécessaires pour caractériser ce transporteur. Il faut aussi noter que cette étude ne démontre pas hors de tout doute que CeOCT-1 transporte directement la DOX. L'effet pourrait tout de même être indirect via une interaction avec une autre protéine ou une altération de la membrane cytoplasmique.

1.5 Forces de l'étude

L'avantage d'utiliser la levure comme système d'expression est que la protéine exprimée a peu de chances d'affecter l'expression d'autres gènes et permet d'identifier des transporteurs de faible affinité. Il a été démontré que la sous-expression d'un transporteur peut affecter l'expression des autres. En effet, on peut observer, dans des cellules exprimant un faible taux de OCT1, une sur-expression de OCT3. Chez *C. elegans* l'étude du transporteur CeOCT-1 se fait surtout en en réduisant l'expression [236]. De fait, cette sous-expression de CeOCT-1 pourrait induire une surexpression d'un autre transporteur tel CeOCT-2, par exemple. Ainsi, si CeOCT-2 s'avérait également capable de transporter la DOX, la délétion de CeOCT-1 n'aurait aucun effet sur l'accumulation de DOX et l'on pourrait croire que CeOCT-1 n'est pas impliqué. Aussi, s'il devait

s'avérer que CeOCT-1 n'était qu'un transporteur de faible affinité et qu'il existait un transporteur de haute affinité, l'effet de la délétion de CeOCT-1 serait invisible. Ainsi, l'expression de la protéine de *S. cerevisiae* permet d'exclure les effets secondaires d'une délétion ou d'une sur-expression dans l'organisme d'origine, et la présence d'un transporteur de plus grande affinité. Donc, cette méthode permet d'identifier toute protéine capable de transporter la DOX, quelle que soit son affinité ou sa régulation dans l'organisme d'origine.

2 Importance de l'étude des transporteurs

L'étude des transporteurs n'est pas récente. Chez les mammifères, plusieurs transporteurs ont été identifiés dans les années 90, tels les transporteurs OCT1, OCT2 et OCT3 [252-254]. Malgré tout, leur implication dans la cinétique des médicaments n'est pas connue de tous, particulièrement dans l'absorption des médicaments par les cellules cibles. Certains croient toujours que les médicaments entrent dans les cellules par diffusion passive [60]. Il a pourtant été démontré qu'un grand nombre de molécules utilisent des transporteurs pour en entrer dans les cellules, particulièrement les transporteurs de la famille des OCTs.

2.1 Les OCTs

Les OCTs sont des transporteurs de cations organiques de la famille des SLC22 et comptent trois membres OCT1 (SLC22A1), OCT2 (SLC22A2) et OCT3 (SLC22A3). Toutefois, la famille des SLC22 comporte bien d'autres membres, dont OCTN1 (SLC22A4), OCTN2 (SLC22A5) et OCT6, aussi appelé hCT2 (SLC22A16) et comporte également des transporteurs d'anions organiques (OAT) dont OAT1 (SLC22A6), OAT2 (SLC22A7) et OAT3 (SLC22A8) ainsi que quelques autres [17, 111, 114, 255-259]. Les gènes de OCT1, OCT2 et OCT3 sont tous situés sur le chromosome 6 [260], dans une région de 400 kb et sont positionnés l'un à la suite de l'autre [102]. Ils possèdent tous 12 PTM, une grande boucle extracellulaire entre le PTM 1 et 2 et une grande boucle intracellulaire entre les PTM 6 et 7 [111]. Ils sont exprimés dans une grande variété de tissus et impliqués dans le transport de nombreuses molécules endogènes [111, 114, 124, 260-

264]. Ces transporteurs sont également impliqués dans le transport de certaines toxines dont l'aflotoxine B1, le bromure d'éthidium, le N-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP+), le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), l'aconitine, le chlorpyrifos et le fenitrothion [111, 131, 265, 266]. Mais ils ont grandement été impliqués dans le transport de médicaments et leur expression influence l'absorption, la distribution et l'élimination de plusieurs médicaments [267].

2.1.1 OCT1 (SLC22A1)

Bien que les trois OCTs partagent beaucoup de substrats, ils ont une affinité variable pour chacun d'eux et certains de ces substrats sont spécifiques à un OCT en particulier [138]. Aussi les OCTs, bien que tous exprimés dans un grand nombre de tissus, ne sont pas tous exprimés dans les mêmes tissus et leurs niveaux d'expression varient de l'un à l'autre [113, 265]. OCT1 est principalement exprimé dans le foie, mais on le retrouve aussi dans les reins, le cerveau, l'intestin, le cœur, les poumons et plusieurs autres tissus ainsi que certaines cellules cancéreuses [112-114, 248, 252, 266, 268-273]. En plus d'avoir été identifié dans l'absorption des anthracyclines [234] et de la metformine, OCT1 est capable de transporter un grand nombre de médicaments, dont l'amiloride, la bendamustine, la berberine, le fenoterol, le glycopyrrolate, l'imatinib, l'ipratropium, l'irinotecan, le lamivudine, l'oxaliplatine, l'oxyphenonium, le paclitaxel, la phenformine et la ranidine [100, 101, 125, 243, 274-276]. L'activité de OCT1 est influencée par l'activation de quelques kinases [250]. L'altération de l'activité de OCT1, par la réduction de son expression ou par l'apparition de mutations qui en modifient l'activité, l'affinité ou la sélectivité, de la protéine, affecte la réponse de plusieurs médicaments. Actuellement, plusieurs SNP de SLC22A1 sont connus et ont des effets variables sur la protéine [115, 247, 273, 274, 277-283]. Le fait est que l'on

observe des réponses variables entre les individus à des médicaments qui sont substrats de OCT1. Ainsi, une réduction de l'activité de OCT1 dans l'intestin peut induire une toxicité gastro-intestinale de la metformine puisque la molécule s'accumulera dans l'intestin. Si cette réduction d'activité est plutôt localisée sur la cellule cible alors celle-ci ne répondra pas à la metformine [246, 248, 284]. Ainsi, les variations génétiques observées sur le gène SLC22A1 influencent grandement la réponse à la metformine. On observe ce phénomène également pour d'autres médicaments. Des cellules exprimant un OCT1 muté ne répondent pas à la bendamustine [125]. De même, une diminution de l'activité de OCT1 réduit la réponse à l'imatinib [285, 286]. Il en va de même pour l'irinotecan, le paclitaxel et l'oxaliplatine pour lesquels l'activité de OCT1 représente un point charnière de leur efficacité [100, 104].

3 Conclusion

En conclusion, l'absorption de la DOX, par la levure, est majoritairement dépendante du transport médié par la protéine membranaire Agp2, via son contrôle sur l'activité de nombreux transporteurs, dont Sam3 et Dur3. De plus, les résultats suggèrent que la protéine CeOCT-1 est un transporteur fonctionnel pour les anthracyclines. Aussi, la sensibilité des cellules à leur effet toxique de la DOX est dépendante de sa capacité à pénétrer dans la cellule. Cela démontre l'importance des transporteurs dans la réponse aux anthracyclines, et toute cellule cible n'exprimant pas le transporteur requis, sera insensible à ces molécules. De manière générale, les transporteurs sont essentiels à la bonne absorption, la bonne distribution, l'efficacité et la bonne élimination des médicaments. Toute altération d'un transporteur impliqué dans le transport transmembranaire d'un médicament influencera la réponse du patient à celui-ci; faisant des transporteurs un facteur primordial de la pharmacogénétique.

Références

1. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(2) : p. 185-229.
2. Gardiner, D.M., et al., *Early activation of wheat polyamine biosynthesis during Fusarium head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production*. BMC Plant Biol, 2010. **10**: p. 289.
3. Aouida, M., et al., *Agp2, a member of the yeast amino acid permease family, positively regulates polyamine transport at the transcriptional level*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65717.
4. Canada, S. *Principales causes de décès, selon le sexe (Les deux sexes)*. [Web page] 2011 2014-01-28 [cited 2015 6 juin 2015]; Available from : <http://www.statcan.gc.ca/tables-tableaux/sum-som/102/cst01/hlth36a-fra.htm>.
5. Fong, K.M., et al., *Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications*. Thorax, 2003. **58**(10): p. 892-900.
6. Dong, P., et al., *Reactivating p53 functions by suppressing its novel inhibitor iASPP: a potential therapeutic opportunity in p53 wild-type tumors*. Oncotarget, 2015. **6**(24): p. 19968-75.
7. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
8. Ardies, C.M., *Inflammation as cause for scar cancers of the lung*. Integr Cancer Ther, 2003. **2**(3): p. 238-46.
9. Ballaz, S. and J.L. Mulshine, *The potential contributions of chronic inflammation to lung carcinogenesis*. Clin Lung Cancer, 2003. **5**(1) : p. 46-62.
10. Marteijn, J.A., et al., *Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 465-81.
11. Bassing, C.H. and F.W. Alt, *The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 781-96.
12. Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek, *An oncogene-induced DNA damage model for cancer development*. Science, 2008. **319**(5868) : p. 1352-5.
13. Khanna, K.K. and S.P. Jackson, *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection*. Nat Genet, 2001. **27**(3) : p. 247-54.
14. Gorbunova, V. and A. Seluanov, *DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection*. Mutat Res, 2016. **788**: p. 2-6.
15. Klement, K. and A.A. Goodarzi, *DNA double strand break responses and chromatin alterations within the aging cell*. Exp Cell Res, 2014. **329**(1): p. 42-52.
16. Motohashi, H., et al., *Precise comparison of protein localization among OCT, OAT, and MATE in human kidney*. J Pharm Sci, 2013. **102**(9): p. 3302-8.
17. Motohashi, H., et al., *Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(4): p. 866-74.

18. Motohashi, H., et al., *Different transport properties between famotidine and cimetidine by human renal organic ion transporters (SLC22A)*. Eur J Pharmacol, 2004. **503**(1-3): p. 25-30.
19. Mrozek, K., et al., *Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?* Blood, 2007. **109**(2): p. 431-48.
20. Cejka, P., *DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination*. J Biol Chem, 2015. **290**(38): p. 22931-8.
21. Richardson, C., N. Horikoshi, and T.K. Pandita, *The role of the DNA double-strand break response network in meiosis*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9) : p. 1149-64.
22. Bartek, J. and J. Lukas, *DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 238-45.
23. Jackson, S.P., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. Carcinogenesis, 2002. **23**(5): p. 687-96.
24. Shibata, A., et al., *Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(13): p. 3371-83.
25. Alagpulinsa, D.A., S. Ayyadevara, and R.J. Shmookler Reis, *A Small-Molecule Inhibitor of RAD51 Reduces Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to Doxorubicin*. Front Oncol, 2014. **4** : p. 289.
26. Moore, S., F.K. Stanley, and A.A. Goodarzi, *The repair of environmentally relevant DNA double strand breaks caused by high linear energy transfer irradiation--no simple task*. DNA Repair (Amst), 2014. **17**: p. 64-73.
27. Stanley, F.K., S. Moore, and A.A. Goodarzi, *CHD chromatin remodelling enzymes and the DNA damage response*. Mutat Res, 2013. **750**(1-2): p. 31-44.
28. Stiff, T., et al., *ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling*. Embo j, 2006. **25**(24): p. 5775-82.
29. Beucher, A., et al., *ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2*. Embo j, 2009. **28**(21) : p. 3413-27.
30. Cimprich, K.A. and D. Cortez, *ATR: an essential regulator of genome integrity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(8): p. 616-27.
31. Goodarzi, A.A. and P.A. Jeggo, *The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: how to get the entry visa*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(9): p. 11844-60.
32. Goodarzi, A.A., et al., *ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin*. Mol Cell, 2008. **31**(2): p. 167-77.
33. Goodarzi, A.A., et al., *DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity*. Embo j, 2006. **25**(16) : p. 3880-9.
34. Kakarougkas, A., et al., *Opposing roles for 53BP1 during homologous recombination*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(21): p. 9719-31.
35. Noon, A.T. and A.A. Goodarzi, *53BP1-mediated DNA double strand break repair: insert bad pun here*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(10): p. 1071-6.
36. Noon, A.T., et al., *53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(2): p. 177-84.
37. Sapkota, G.P., et al., *Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 2): p. 507-16.

38. Kurosawa, A., et al., *DNA ligase IV and artemis act cooperatively to suppress homologous recombination in human cells: implications for DNA double-strand break repair*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72253.
39. Lieber, M.R., *The mechanism of human nonhomologous DNA end joining*. J Biol Chem, 2008. **283**(1) : p. 1-5.
40. Cromie, G.A., J.C. Connelly, and D.R. Leach, *Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans*. Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1163-74.
41. Daley, J.M., et al., *Investigations of homologous recombination pathways and their regulation*. Yale J Biol Med, 2013. **86**(4): p. 453-61.
42. San Filippo, J., P. Sung, and H. Klein, *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. Annu Rev Biochem, 2008. **77** : p. 229-57.
43. Lieber, M.R., K. Yu, and S.C. Raghavan, *Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(9-10) : p. 1234-45.
44. Woodbine, L., et al., *An Artemis polymorphic variant reduces Artemis activity and confers cellular radiosensitivity*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(9) : p. 1003-10.
45. Moon, A.F., et al., *The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(12): p. 1709-25.
46. De Ioannes, P., et al., *Structural basis of DNA ligase IV-Artemis interaction in nonhomologous end-joining*. Cell Rep, 2012. **2**(6): p. 1505-12.
47. Woodbine, L., et al., *Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(16): p. 6986-97.
48. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-68.
49. Puumalainen, M.R., et al., *Chromatin retention of DNA damage sensors DDB2 and XPC through loss of p97 segregase causes genotoxicity*. Nat Commun, 2014. **5** : p. 3695.
50. Board, P.D.Q.A.T.E., *Adult Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ(R)) : Health Professional Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002, National Cancer Institute (US): Bethesda (MD).
51. Dann, E.J., *Advanced hodgkin lymphoma: a new era of therapy*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2014. **6**(1): p. e2014063.
52. Stinchcombe, T.E., et al., *Pemetrexed With Platinum Combination as a Backbone for Targeted Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer*. Clin Lung Cancer, 2015.
53. DiNardo, C.D. and J.E. Cortes, *New treatment for acute myelogenous leukemia*. Expert Opin Pharmacother, 2015. **16**(1) : p. 95-106.
54. Park, H.J., et al., *Statistics of hematologic malignancies in Korea: incidence, prevalence and survival rates from 1999 to 2008*. Korean J Hematol, 2012. **47**(1): p. 28-38.
55. Miraki-Moud, F., et al., *Acute myeloid leukemia does not deplete normal hematopoietic stem cells but induces cytopenias by impeding their differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(33): p. 13576-81.
56. Kaur, I., et al., *An extensive pharmacokinetic, metabolic and toxicological review of elderly patients under intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2015. **11**(1): p. 53-65.
57. Lowenberg, B., *Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008: p. 1-11.

58. Megias-Vericat, J.E., et al., *Influence of ABCB1 polymorphisms upon the effectiveness of standard treatment for acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis of observational studies*. Pharmacogenomics J, 2015. **15**(2): p. 109-18.
59. Vyas, P., F.R. Appelbaum, and C. Craddock, *Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(1): p. 8-15.
60. Nikitovic, D., et al., *Anthracycline-dependent cardiotoxicity and extracellular matrix remodeling*. Chest, 2014. **146**(4): p. 1123-30.
61. van Dalen, E.C., et al., *Treatment including anthracyclines versus treatment not including anthracyclines for childhood cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **9**: p. Cd006647.
62. Deniset-Besseau, A., et al., *A fluorescence-based assay for monitoring clinical drug resistance*. J Clin Pathol, 2012. **65**(11): p. 1003-7.
63. Swietach, P., et al., *Importance of intracellular pH in determining the uptake and efficacy of the weakly basic chemotherapeutic drug, doxorubicin*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35949.
64. Zhang, Z., et al., *Anthracyclines potentiate anti-tumor immunity: A new opportunity for chemoimmunotherapy*. Cancer Lett, 2015.
65. Guan, X., et al., *A pH-sensitive charge-conversion system for doxorubicin delivery*. Acta Biomater, 2013. **9**(8): p. 7672-8.
66. Curigliano, G., et al., *Cardiotoxicity of anticancer treatments: Epidemiology, detection, and management*. CA Cancer J Clin, 2016.
67. Singal, P.K. and N. Iliskovic, *Doxorubicin-induced cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1998. **339**(13) : p. 900-5.
68. Guo, H., et al., *Alleviation of doxorubicin-induced hepatorenal toxicities with sesamin via the suppression of oxidative stress*. Hum Exp Toxicol, 2016.
69. Chastagner, P., et al., *Phase I study of non-pegylated liposomal doxorubicin in children with recurrent/refractory high-grade glioma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **76**(2): p. 425-32.
70. Fernandes, R.S., et al., *Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification*. Nucl Med Commun, 2016. **37**(3) : p. 307-12.
71. Gusella, M., et al., *Age affects pegylated liposomal doxorubicin elimination and tolerability in patients over 70 years old*. Cancer Chemother Pharmacol, 2014. **73**(3): p. 517-24.
72. Kumar, P., et al., *Development of a single vial kit formulation of [99mTc]-labeled doxorubicin for tumor imaging and treatment response assessment-preclinical evaluation and preliminary human results*. J Labelled Comp Radiopharm, 2015. **58**(6): p. 242-9.
73. Liu, P., et al., *Intracellular routing in breast cancer cells of streptavidin-conjugated trastuzumab Fab fragments linked to biotinylated doxorubicin-functionalized metal chelating polymers*. Biomacromolecules, 2014. **15**(3): p. 715-25.
74. Pecoraro, M., et al., *Doxorubicin-Mediated Cardiotoxicity : Role of Mitochondrial Connexin 43*. Cardiovasc Toxicol, 2015.
75. Zhang, S., et al., *Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Nat Med, 2012. **18**(11): p. 1639-42.
76. Li, X., et al., *The effects of idarubicin versus other anthracyclines for induction therapy of patients with newly diagnosed leukaemia*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(6): p. Cd010432.

77. Galsky, M.D., et al., *Phase 2 trial of the topoisomerase II inhibitor, amrubicin, as second-line therapy in patients with metastatic urothelial carcinoma*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015. **76**(6): p. 1259-65.
78. Dell'Ova, M., et al., *Tumour biology, metastatic sites and taxanes sensitivity as determinants of eribulin mesylate efficacy in breast cancer: results from the ERIBEX retrospective, international, multicenter study*. *BMC Cancer*, 2015. **15**(1) : p. 659.
79. Guo, S. and S. Wong, *Cardiovascular toxicities from systemic breast cancer therapy*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 346.
80. Otani, S., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of erlotinib administered in combination with amrubicin in patients with previously treated, advanced non-small cell lung cancer*. *Am J Clin Oncol*, 2015. **38**(4): p. 405-10.
81. Pasello, G., et al., *Epirubicin plus paclitaxel regimen as second-line treatment of patients with small-cell lung cancer*. *Anticancer Res*, 2015. **35**(4): p. 2183-9.
82. Hess, V., et al., *Phase I study of carboplatin, doxorubicin and weekly paclitaxel in patients with advanced ovarian carcinoma*. *Ann Oncol*, 2003. **14**(4) : p. 638-42.
83. Kim, J.E., et al., *Paclitaxel-exposed ovarian cancer cells induce cancerspecific CD4+ T cells after doxorubicin exposure through regulation of MyD88 expression*. *Int J Oncol*, 2014. **44**(5): p. 1716-26.
84. Lowenberg, B., et al., *High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(13) : p. 1235-48.
85. de Bruijn, P., et al., *Determination of doxorubicin and doxorubicinol in plasma of cancer patients by high-performance liquid chromatography*. *Anal Biochem*, 1999. **266**(2) : p. 216-21.
86. Greene, R.F., et al., *Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols*. *Cancer Res*, 1983. **43**(7): p. 3417-21.
87. Hintzpeter, J., et al., *Inhibition of human anthracycline reductases by emodin - A possible remedy for anthracycline resistance*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016. **293** : p. 21-9.
88. Huang, R.Y., et al., *Small ubiquitin-related modifier pathway is a major determinant of doxorubicin cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae**. *Cancer Res*, 2007. **67**(2) : p. 765-72.
89. Huang, F. and A.V. Mazin, *A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e100993.
90. Deng, S., et al., *Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both topoisomerase II isoforms*. *BMC Cancer*, 2014. **14** : p. 842.
91. Berger, J.M., *Structure of DNA topoisomerases*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1400**(1-3) : p. 3-18.
92. Champoux, J.J., *DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70** : p. 369-413.
93. Wang, J.C., *DNA topoisomerases*. *Annu Rev Biochem*, 1996. **65** : p. 635-92.
94. Majumdar, P., et al., *Design, synthesis and evaluation of thiohydantoin derivatives as potent topoisomerase I (Top1) inhibitors with anticancer activity*. *Eur J Med Chem*, 2015. **102** : p. 540-51.
95. Sandri, M.I., et al., *Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta genes in human breast cancers*. *Br J Cancer*, 1996. **73**(12): p. 1518-24.

96. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
97. Marie, J.P., *Drug resistance in hematologic malignancies*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(6): p. 463-9.
98. Riganti, C., et al., *Two repeated low doses of doxorubicin are more effective than a single high dose against tumors overexpressing P-glycoprotein*. Cancer Lett, 2015. **360**(2): p. 219-26.
99. Koltitz, J.E., et al., *P-glycoprotein inhibition using valsopodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808*. Blood, 2010. **116**(9): p. 1413-21.
100. Gupta, S., et al., *Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **341**(1) : p. 16-23.
101. Hendrickx, R., et al., *Identification of novel substrates and structure-activity relationship of cellular uptake mediated by human organic cation transporters 1 and 2*. J Med Chem, 2013. **56**(18): p. 7232-42.
102. Nigam, S.K., *What do drug transporters really do?* Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(1): p. 29-44.
103. Yonezawa, A., et al., *Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family)*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **319**(2) : p. 879-86.
104. Zhang, S., et al., *Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity*. Cancer Res, 2006. **66**(17) : p. 8847-57.
105. Chauncey, T.R., *Drug resistance mechanisms in acute leukemia*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(1): p. 21-6.
106. Chen, G., et al., *Prevalence of multidrug resistance related to activation of the *mdr1* gene in human sarcoma mutants derived by single-step doxorubicin selection*. Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 4980-7.
107. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. J Lipid Res, 2001. **42**(7): p. 1007-17.
108. Gottesman, M.M., et al., *Genetic analysis of the multidrug transporter*. Annu Rev Genet, 1995. **29**: p. 607-49.
109. Okabe, M., et al., *Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(3) : p. 754-62.
110. Okabe, M., et al., *Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(9): p. 3081-91.
111. Koepsell, H., *The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 413-35.
112. Nies, A.T., et al., *Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy*. Handb Exp Pharmacol, 2011(201): p. 105-67.
113. Nies, A.T., et al., *Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver*. Hepatology, 2009. **50**(4): p. 1227-40.

114. Koepsell, H., K. Lips, and C. Volk, *Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications*. Pharm Res, 2007. **24**(7) : p. 1227-51.
115. Shu, Y., et al., *Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(2) : p. 273-80.
116. Koepsell, H., *Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters*. Biol Chem, 2011. **392**(1-2) : p. 95-101.
117. Kanner, B.I., *Molecular physiology : intimate contact enables transport*. Nature, 2005. **437**(7056) : p. 203-5.
118. Rosental, N. and B.I. Kanner, *A conserved methionine residue controls the substrate selectivity of a neuronal glutamate transporter*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21241-8.
119. Volk, C., et al., *Five amino acids in the innermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with extracellular and intracellular corticosterone*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(2): p. 275-89.
120. Budiman, T., et al., *Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29413-20.
121. Schmitt, B.M., et al., *Charge-to-substrate ratio during organic cation uptake by rat OCT2 is voltage dependent and altered by exchange of glutamate 448 with glutamine*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(4): p. F709-22.
122. Volk, C., et al., *Different affinities of inhibitors to the outwardly and inwardly directed substrate binding site of organic cation transporter 2*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(5): p. 1037-47.
123. Egenberger, B., et al., *A substrate binding hinge domain is critical for transport-related structural changes of organic cation transporter 1*. J Biol Chem, 2012. **287**(37): p. 31561-73.
124. Gorbunov, D., et al., *High-affinity cation binding to organic cation transporter 1 induces movement of helix 11 and blocks transport after mutations in a modeled interaction domain between two helices*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(1): p. 50-61.
125. Arimany-Nardi, C., et al., *Human organic cation transporter 1 (hOCT1) as a mediator of bendamustine uptake and cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells*. Pharmacogenomics J, 2015. **15**(4): p. 363-71.
126. Bachmakov, I., et al., *Interaction of beta-blockers with the renal uptake transporter OCT2*. Diabetes Obes Metab, 2009. **11**(11): p. 1080-3.
127. Belzer, M., et al., *Substrate-dependent ligand inhibition of the human organic cation transporter OCT2*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **346**(2) : p. 300-10.
128. Bourdet, D.L., J.B. Pritchard, and D.R. Thakker, *Differential substrate and inhibitory activities of ranitidine and famotidine toward human organic cation transporter 1 (hOCT1; SLC22A1), hOCT2 (SLC22A2), and hOCT3 (SLC22A3)*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(3): p. 1288-97.
129. Chen, R., et al., *A nucleoside-sensitive organic cation transporter in opossum kidney cells*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 2): p. F323-8.
130. Cheng, Y., et al., *Characterization of the inhibitory effects of N-butylpyridinium chloride and structurally related ionic liquids on organic cation transporters 1/2 and human toxic extrusion transporters 1/2-k in vitro and in vivo*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(9): p. 1755-61.
131. Chiba, S., et al., *Human organic cation transporter 2 (hOCT2) : Inhibitor studies using S2-hOCT2 cells*. Toxicology, 2013. **310**: p. 98-103.

132. Choi, M.K., et al., *Effects of tetraalkylammonium compounds with different affinities for organic cation transporters on the pharmacokinetics of metformin*. *Biopharm Drug Dispos*, 2007. **28**(9): p. 501-10.
133. Ciarimboli, G., et al., *Proximal tubular secretion of creatinine by organic cation transporter OCT2 in cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(4) : p. 1101-8.
134. Dresser, M.J., et al., *Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2)*. *Pharm Res*, 2002. **19**(8) : p. 1244-7.
135. Feng, B., et al., *Effect of human renal cationic transporter inhibition on the pharmacokinetics of varenicline, a new therapy for smoking cessation: an in vitro-in vivo study*. *Clin Pharmacol Ther*, 2008. **83**(4) : p. 567-76.
136. Goralski, K.B., et al., *The cation transporters rOCT1 and rOCT2 interact with bicarbonate but play only a minor role for amantadine uptake into rat renal proximal tubules*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **303**(3): p. 959-68.
137. Hacker, K., et al., *Substrate-Dependent Inhibition of the Human Organic Cation Transporter OCT2: A Comparison of Metformin with Experimental Substrates*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0136451.
138. Haenisch, B., et al., *Interaction of antidepressant and antipsychotic drugs with the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2012. **385**(10): p. 1017-23.
139. Burger, H., et al., *Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2)*. *Br J Pharmacol*, 2010. **159**(4) : p. 898-908.
140. Busch, A.E., et al., *Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine*. *Mol Pharmacol*, 1998. **54**(2) : p. 342-52.
141. Chen, Y., et al., *Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **322**(2) : p. 695-700.
142. Ciarimboli, G., et al., *New clues for nephrotoxicity induced by ifosfamide: preferential renal uptake via the human organic cation transporter 2*. *Mol Pharm*, 2011. **8**(1): p. 270-9.
143. Diao, L., Y. Shu, and J.E. Polli, *Uptake of pramipexole by human organic cation transporters*. *Mol Pharm*, 2010. **7**(4): p. 1342-7.
144. Filipinski, K.K., et al., *Interaction of Cisplatin with the human organic cation transporter 2*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(12): p. 3875-80.
145. Galetti, M., et al., *Functional characterization of gefitinib uptake in non-small cell lung cancer cell lines*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **80**(2): p. 179-87.
146. Grundemann, D., et al., *Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT2)*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **304**(2): p. 810-7.
147. Grundemann, D., et al., *Discovery of the ergothioneine transporter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(14): p. 5256-61.
148. Grundemann, D., et al., *Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(47) : p. 30915-20.
149. Gaspar, Y.M., et al., *Field resistance to Fusarium oxysporum and Verticillium dahliae in transgenic cotton expressing the plant defensin NaD1*. *J Exp Bot*, 2014. **65**(6) : p. 1541-50.

150. Lay, F.T., et al., *Dimerization of plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity*. J Biol Chem, 2012. **287**(24) : p. 19961-72.
151. van der Weerden, N.L., F.T. Lay, and M.A. Anderson, *The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of Fusarium oxysporum hyphae*. J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14445-52.
152. van der Weerden, N.L., R.E. Hancock, and M.A. Anderson, *Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process*. J Biol Chem, 2010. **285**(48) : p. 37513-20.
153. Hayes, B.M., et al., *Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD1 as a new member of the antifungal drug arsenal against Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(8): p. 3667-75.
154. Bleackley, M.R., et al., *Agp2p, the plasma membrane transregulator of polyamine uptake, regulates the antifungal activities of the plant defensin NaD1 and other cationic peptides*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(5): p. 2688-98.
155. Gerner, E.W. and F.L. Meyskens, Jr., *Polyamines and cancer: old molecules, new understanding*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 781-92.
156. Schuber, F., *Influence of polyamines on membrane functions*. Biochem J, 1989. **260**(1): p. 1-10.
157. Igarashi, K. and K. Kashiwagi, *Polyamine transport in bacteria and yeast*. Biochem J, 1999. **344 Pt 3**: p. 633-42.
158. Igarashi, K. and K. Kashiwagi, *Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes*. Plant Physiol Biochem, 2010. **48**(7): p. 506-12.
159. Sala-Rabanal, M., et al., *Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3*. Mol Pharm, 2013. **10**(4) : p. 1450-8.
160. Uemura, T., et al., *Characteristics of the polyamine transporter TPO1 and regulation of its activity and cellular localization by phosphorylation*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9646-52.
161. Albertsen, M., et al., *Localization and function of the yeast multidrug transporter Tpo1p*. J Biol Chem, 2003. **278**(15) : p. 12820-5.
162. Uemura, T., K. Kashiwagi, and K. Igarashi, *Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7733-41.
163. Wallace, H.M., *The polyamines: past, present and future*. Essays Biochem, 2009. **46**: p. 1-9.
164. Marton, L.J. and A.E. Pegg, *Polyamines as targets for therapeutic intervention*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995. **35** : p. 55-91.
165. Pegg, A.E., *The function of spermine*. IUBMB Life, 2014. **66**(1): p. 8-18.
166. Nishimura, K., et al., *Essential role of S-adenosylmethionine decarboxylase in mouse embryonic development*. Genes Cells, 2002. **7**(1): p. 41-7.
167. Pendeville, H., et al., *The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(19): p. 6549-58.
168. Nilsson, J., A. Gritli-Linde, and O. Heby, *Skin fibroblasts from spermine synthase-deficient hemizygous gyro male (Gy/Y) mice overproduce spermidine and exhibit increased resistance to oxidative stress but decreased resistance to UV irradiation*. Biochem J, 2000. **352 Pt 2**: p. 381-7.
169. Simoneau, A.R., et al., *Alpha-difluoromethylornithine and polyamine levels in the human prostate: results of a phase IIa trial*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(1): p. 57-9.

170. Korhonen, V.P., et al., *Spermine deficiency resulting from targeted disruption of the spermine synthase gene in embryonic stem cells leads to enhanced sensitivity to antiproliferative drugs*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(2): p. 231-8.
171. Mackintosh, C.A. and A.E. Pegg, *Effect of spermine synthase deficiency on polyamine biosynthesis and content in mice and embryonic fibroblasts, and the sensitivity of fibroblasts to 1,3-bis-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea*. Biochem J, 2000. **351 Pt 2** : p. 439-47.
172. Pegg, A.E. and A.J. Michael, *Spermine synthase*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(1): p. 113-21.
173. Albert, J., et al., *Snyder-Robinson Syndrome*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

174. Cason, A.L., et al., *X-linked spermine synthase gene (SMS) defect: the first polyamine deficiency syndrome*. Eur J Hum Genet, 2003. **11**(12) : p. 937-44.
175. Peron, A., et al., *Snyder-Robinson syndrome: a novel nonsense mutation in spermine synthase and expansion of the phenotype*. Am J Med Genet A, 2013. **161a**(9) : p. 2316-20.
176. Della Latta, V., et al., *Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions*. Pharmacol Res, 2015. **97**: p. 122-30.
177. Hecht, S.M., *Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action*. J Nat Prod, 2000. **63**(1) : p. 158-68.
178. Ramotar, D. and H. Wang, *Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 2003. **43**(4) : p. 213-24.
179. Urakami, Y., et al., *cDNA cloning, functional characterization, and tissue distribution of an alternatively spliced variant of organic cation transporter hOCT2 predominantly expressed in the human kidney*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(7): p. 1703-10.
180. Gbabe, O.F., et al., *Treatment of severe or progressive Kaposi's sarcoma in HIV-infected adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(9): p. Cd003256.
181. Shippee, B.M., J.S. Bates, and K.L. Richards, *The role of screening and monitoring for bleomycin pulmonary toxicity*. J Oncol Pharm Pract, 2016. **22**(2): p. 308-12.
182. MacIntosh, P.W., M.K. Yoon, and A. Fay, *Complications of intralesional bleomycin in the treatment of orbital lymphatic malformations*. Semin Ophthalmol, 2014. **29**(5-6) : p. 450-5.
183. Miyaki, M., et al., *Binding of bleomycin to DNA in bleomycin-sensitive and -resistant rat ascites hepatoma cells*. Cancer Res, 1975. **35**(8) : p. 2015-19.
184. Robertson, K.A., et al., *Altered expression of *Ape1/ref-1* in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation*. Cancer Res, 2001. **61**(5) : p. 2220-5.
185. Jani, J.P., et al., *In vivo circumvention of human colon carcinoma resistance to bleomycin*. Cancer Res, 1992. **52**(10) : p. 2931-7.
186. Pei, Z., et al., *Yeast cysteine proteinase gene *ycp1* induces resistance to bleomycin in mammalian cells*. Mol Pharmacol, 1995. **48**(4): p. 676-81.
187. Aouida, M., R. Poulin, and D. Ramotar, *The human carnitine transporter SLC22A16 mediates high affinity uptake of the anticancer polyamine analogue bleomycin-A5*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6275-84.

188. Aouida, M., et al., *Characterization of a transport and detoxification pathway for the antitumour drug bleomycin in Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 2004. **384**(Pt 1) : p. 47-58.
189. Aouida, M., et al., *AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(25) : p. 24267-76.
190. Aouida, M., et al., *A genome-wide screen in Saccharomyces cerevisiae reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin*. *Cancer Res*, 2004. **64**(3): p. 1102-9.
191. Schreve, J.L. and J.M. Garrett, *Yeast Agp2p and Agp3p function as amino acid permeases in poor nutrient conditions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **313**(3) : p. 745-51.
192. Andre, B., *An overview of membrane transport proteins in Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1995. **11**(16) : p. 1575-611.
193. Regenbergh, B., et al., *Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1999. **36**(6) : p. 317-28.
194. Gaber, R.F., et al., *Constitutive and hyperresponsive signaling by mutant forms of Saccharomyces cerevisiae amino acid sensor Ssy1*. *Eukaryot Cell*, 2003. **2**(5): p. 922-9.
195. Iraqui, I., et al., *Amino acid signaling in Saccharomyces cerevisiae: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(2): p. 989-1001.
196. Donaton, M.C., et al., *The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 2003. **50**(3): p. 911-29.
197. Lee, J., et al., *Carnitine uptake by AGP2 in yeast Saccharomyces cerevisiae is dependent on Hog1 MAP kinase pathway*. *Mol Cells*, 2002. **13**(3): p. 407-12.
198. van Roermund, C.W., et al., *Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in Saccharomyces cerevisiae and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p*. *EMBO J*, 1999. **18**(21) : p. 5843-52.
199. van Rossum, H.M., et al., *Alternative reactions at the interface of glycolysis and citric acid cycle in Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2016. **16**(3).
200. Porat, Z., et al., *Mechanism of polyamine tolerance in yeast: novel regulators and insights*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(24): p. 3106-16.
201. Cuesta-Marban, A., et al., *Drug uptake, lipid rafts, and vesicle trafficking modulate resistance to an anticancer lysophosphatidylcholine analogue in yeast*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(12): p. 8405-18.
202. Ozcan, S., et al., *Two glucose transporters in Saccharomyces cerevisiae are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(22) : p. 12428-32.
203. Fernandez-Murray, J.P., et al., *NTE1-encoded phosphatidylcholine phospholipase b regulates transcription of phospholipid biosynthetic genes*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(52) : p. 36034-46.
204. Fernandez-Murray, J.P., M.H. Ngo, and C.R. McMaster, *Choline transport activity regulates phosphatidylcholine synthesis through choline transporter Hnm1 stability*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(50) : p. 36106-15.

205. Boumann, H.A., et al., *Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(2): p. 1006-17.
206. Howe, A.G., V. Zarembeg, and C.R. McMaster, *Cessation of growth to prevent cell death due to inhibition of phosphatidylcholine synthesis is impaired at 37 degrees C in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 44100-7.
207. Nikawa, J., et al., *Primary structure of the yeast choline transport gene and regulation of its expression*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(26): p. 15996-6003.
208. Zufferey, R., et al., *Reexamining the role of choline transporter-like (Ctlp) proteins in choline transport*. *Neurochem Res*, 2004. **29**(2): p. 461-7.
209. Nikawa, J., Y. Tsukagoshi, and S. Yamashita, *Cloning of a gene encoding choline transport in Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1986. **166**(1) : p. 328-30.
210. Ojini, I. and A. Gammie, *Rapid Identification of Chemoresistance Mechanisms Using Yeast DNA Mismatch Repair Mutants*. *G3 (Bethesda)*, 2015. **5**(9) : p. 1925-35.
211. Spence, K.D., *Mutation of Saccharomyces cerevisiae preventing uptake of S-adenosylmethionine*. *J Bacteriol*, 1971. **106**(2): p. 325-30.
212. Rouillon, A., Y. Surdin-Kerjan, and D. Thomas, *Transport of sulfonium compounds. Characterization of the s-adenosylmethionine and s-methylmethionine permeases from the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(40): p. 28096-105.
213. Vinci, C.R. and S.G. Clarke, *Homocysteine methyltransferases Mht1 and Sam4 prevent the accumulation of age-damaged (R,S)-AdoMet in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(27): p. 20526-31.
214. Zheng, S., S. Shuman, and B. Schwer, *Sinefungin resistance of Saccharomyces cerevisiae arising from Sam3 mutations that inactivate the AdoMet transporter or from increased expression of AdoMet synthase plus mRNA cap guanine-N7 methyltransferase*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(20): p. 6895-903.
215. ElBerry, H.M., et al., *Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1993. **175**(15) : p. 4688-98.
216. Rousselet, G., et al., *A second nitrogen permease regulator in Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1995. **359**(2-3) : p. 215-9.
217. Crespo-Sempere, A., et al., *Targeting Fusarium graminearum control via polyamine enzyme inhibitors and polyamine analogs*. *Food Microbiol*, 2015. **49**: p. 95-103.
218. Klebl, F., M. Wolf, and N. Sauer, *A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (Cucurbita pepo L.), and by Arabidopsis thaliana delta-TIP or gamma-TIP*. *FEBS Lett*, 2003. **547**(1-3): p. 69-74.
219. Zanin, L., et al., *The Urease Inhibitor NBPT Negatively Affects DUR3-mediated Uptake and Assimilation of Urea in Maize Roots*. *Front Plant Sci*, 2015. **6**: p. 1007.
220. Zhang, L., et al., *CsNIP2;1 is a Plasma Membrane Transporter from Cucumis sativus that Facilitates Urea Uptake When Expressed in Saccharomyces cerevisiae and Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2016. **57**(3): p. 616-29.
221. Nozawa, A., et al., *Roles of BORI, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006. **262**(2) : p. 216-22.
222. Nguyen, T.T., et al., *Fitness profiling links topoisomerase II regulation of centromeric integrity to doxorubicin resistance in fission yeast*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 8400.

223. Westmoreland, T.J., et al., *Comparative genome-wide screening identifies a conserved doxorubicin repair network that is diploid specific in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5830.
224. Kruger, A., et al., *Tpo1-mediated spermine and spermidine export controls cell cycle delay and times antioxidant protein expression during the oxidative stress response*. EMBO Rep, 2013. **14**(12) : p. 1113-9.
225. Mima, S., et al., *Identification of the TPO1 gene in yeast, and its human orthologue TETRAN, which cause resistance to NSAIDs*. FEBS Lett, 2007. **581**(7): p. 1457-63.
226. Tachihara, K., et al., *Excretion of putrescine and spermidine by the protein encoded by YKL174c (TPO5) in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2005. **280**(13) : p. 12637-42.
227. Kock, C., Y.F. Dufrene, and J.J. Heinisch, *Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains?* Appl Environ Microbiol, 2015. **81**(3) : p. 806-11.
228. Levin, D.E., *Regulation of cell wall biogenesis in Saccharomyces cerevisiae: the cell wall integrity signaling pathway*. Genetics, 2011. **189**(4): p. 1145-75.
229. Orlean, P., *Architecture and biosynthesis of the Saccharomyces cerevisiae cell wall*. Genetics, 2012. **192**(3): p. 775-818.
230. Cunningham, K.W., *Acidic calcium stores of Saccharomyces cerevisiae*. Cell Calcium, 2011. **50**(2): p. 129-38.
231. Cyert, M.S., *Calcineurin signaling in Saccharomyces cerevisiae : how yeast go crazy in response to stress*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **311**(4) : p. 1143-50.
232. Lavina, W.A., et al., *Functionally redundant protein phosphatase genes PTP2 and MSG5 co-regulate the calcium signaling pathway in Saccharomyces cerevisiae upon exposure to high extracellular calcium concentration*. J Biosci Bioeng, 2013. **115**(2) : p. 138-46.
233. Yoshimoto, H., et al., *Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2002. **277**(34) : p. 31079-88.
234. Andreev, E., et al., *The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20508.
235. Roggero, R., et al., *Unraveling the mode of action of the antimalarial choline analog G25 in Plasmodium falciparum and Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8) : p. 2816-24.
236. Cheah, I.K., et al., *Knockout of a putative ergothioneine transporter in Caenorhabditis elegans decreases lifespan and increases susceptibility to oxidative damage*. Free Radic Res, 2013. **47**(12): p. 1036-45.
237. George, R.L., et al., *Molecular cloning and functional characterization of a polyspecific organic anion transporter from Caenorhabditis elegans*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(2): p. 596-603.
238. Ahmadimoghaddam, D. and F. Staud, *Transfer of metformin across the rat placenta is mediated by organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) protein*. Reprod Toxicol, 2013. **39** : p. 17-22.
239. Chen, L., et al., *Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin*. Pharmacogenet Genomics, 2010. **20**(11) : p. 687-99.
240. Chen, Y., et al., *Effect of genetic variation in the organic cation transporter 2 on the renal elimination of metformin*. Pharmacogenet Genomics, 2009. **19**(7): p. 497-504.

241. Cho, S.K., et al., *Rifampin enhances the glucose-lowering effect of metformin and increases OCT1 mRNA levels in healthy participants*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(3) : p. 416-21.
242. Christensen, M.M., et al., *A gene-gene interaction between polymorphisms in the OCT2 and MATE1 genes influences the renal clearance of metformin*. Pharmacogenet Genomics, 2013. **23**(10): p. 526-34.
243. Kwon, M., et al., *Organic cation transporter-mediated drug-drug interaction potential between berberine and metformin*. Arch Pharm Res, 2015. **38**(5): p. 849-56.
244. Moreno-Navarrete, J.M., et al., *OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects*. Diabetes, 2011. **60**(1): p. 168-76.
245. Song, I.S., et al., *Pharmacogenetics meets metabolomics: discovery of tryptophan as a new endogenous OCT2 substrate related to metformin disposition*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36637.
246. Tarasova, L., et al., *Association of genetic variation in the organic cation transporters OCT1, OCT2 and multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein genes with the gastrointestinal side effects and lower BMI in metformin-treated type 2 diabetes patients*. Pharmacogenet Genomics, 2012. **22**(9): p. 659-66.
247. Tzvetkov, M.V., et al., *The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **86**(3): p. 299-306.
248. Yang, J., et al., *Renal tumours in a Tsc1^{+/-} mouse model show epigenetic suppression of organic cation transporters Slc22a1, Slc22a2 and Slc22a3, and do not respond to metformin*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6) : p. 1479-90.
249. Yoon, H., et al., *Influences of organic cation transporter polymorphisms on the population pharmacokinetics of metformin in healthy subjects*. Aaps j, 2013. **15**(2): p. 571-80.
250. Ciarimboli, G., et al., *Regulation of the human organic cation transporter hOCT1*. J Cell Physiol, 2004. **201**(3): p. 420-8.
251. Strasser, R., *Plant protein glycosylation*. Glycobiology, 2016.
252. Grundemann, D., et al., *Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter*. Nature, 1994. **372**(6506): p. 549-52.
253. Okuda, M., et al., *cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **224**(2) : p. 500-7.
254. Grundemann, D., et al., *Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter*. Nat Neurosci, 1998. **1**(5) : p. 349-51.
255. Cheong, H.S., et al., *Screening of genetic variations of SLC15A2, SLC22A1, SLC22A2 and SLC22A6 genes*. J Hum Genet, 2011. **56**(9): p. 666-70.
256. Maeda, K. and Y. Sugiyama, *Transporter biology in drug approval: regulatory aspects*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 711-8.
257. Mohelnikova-Duchonova, B., et al., *The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **72**(3): p. 669-82.
258. Moss, D.M., et al., *Rilpivirine inhibits drug transporters ABCB1, SLC22A1, and SLC22A2 in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(11) : p. 5612-8.
259. Nezu, J., et al., *Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter*. Nat Genet, 1999. **21**(1) : p. 91-4.

260. Bergen, A.W., et al., *Organic cation transporter variation and response to smoking cessation therapies*. Nicotine Tob Res, 2014. **16**(12) : p. 1638-46.
261. Grundemann, D., et al., *Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(1) : p. 1-10.
262. Nakata, T., et al., *Organic cation transporter 2 (SLC22A2), a low-affinity and high-capacity choline transporter, is preferentially enriched on synaptic vesicles in cholinergic neurons*. Neuroscience, 2013. **252** : p. 212-21.
263. Sinclair, C.J., et al., *Functional expression of a high affinity mammalian hepatic choline/organic cation transporter*. J Lipid Res, 2000. **41**(11) : p. 1841-8.
264. Winter, T.N., W.F. Elmquist, and C.A. Fairbanks, *OCT2 and MATE1 provide bidirectional agmatine transport*. Mol Pharm, 2011. **8**(1) : p. 133-42.
265. Ahmadi-moghaddam, D., et al., *Organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter in the placenta and fetal tissues: expression profile and fetus protective role at different stages of gestation*. Biol Reprod, 2013. **88**(3) : p. 55.
266. Lee, W.K., et al., *Organic cation transporters OCT1, 2, and 3 mediate high-affinity transport of the mutagenic vital dye ethidium in the kidney proximal tubule*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(6): p. F1504-13.
267. Pan, X., et al., *Inhibition of human organic cation transporters by the alkaloids matrine and oxymatrine*. Fitoterapia, 2014. **92** : p. 206-10.
268. Ahlin, G., et al., *Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1*. J Med Chem, 2008. **51**(19): p. 5932-42.
269. Chen, L., et al., *OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(27): p. 9983-8.
270. Hayer, M., H. Bonisch, and M. Bruss, *Molecular cloning, functional characterization and genomic organization of four alternatively spliced isoforms of the human organic cation transporter 1 (hOCT1/SLC22A1)*. Ann Hum Genet, 1999. **63**(Pt 6): p. 473-82.
271. Heise, M., et al., *Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance*. BMC Cancer, 2012. **12** : p. 109.
272. Schaeffeler, E., et al., *DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma*. Genome Med, 2011. **3**(12): p. 82.
273. Dujic, T., et al., *Organic cation transporter 1 variants and gastrointestinal side effects of metformin in patients with Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2016. **33**(4) : p. 511-4.
274. Choi, M.K. and I.S. Song, *Genetic variants of organic cation transporter 1 (OCT1) and OCT2 significantly reduce lamivudine uptake*. Biopharm Drug Dispos, 2012. **33**(3): p. 170-8.
275. Kitada, N., et al., *Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **62**(4) : p. 577-84.
276. Sogame, Y., et al., *A comparison of uptake of metformin and phenformin mediated by hOCT1 in human hepatocytes*. Biopharm Drug Dispos, 2009. **30**(8): p. 476-84.
277. Du Plessis, M., et al., *Genetic polymorphisms of the organic cation transporter 1 gene (SLC22A1) within the Cape Admixed population of South Africa*. Mol Biol Rep, 2015. **42**(3): p. 665-72.

278. Giannoudis, A., et al., *The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia*. Blood, 2013. **121**(4): p. 628-37.
279. Kang, H.J., et al., *Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters in a Korean population*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(4): p. 667-75.
280. Kerb, R., et al., *Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences*. Pharmacogenetics, 2002. **12**(8): p. 591-5.
281. Seong, S.J., et al., *Influence of enzyme and transporter polymorphisms on trough imatinib concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia patients*. Ann Oncol, 2013. **24**(3) : p. 756-60.
282. Shu, Y., et al., *Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10) : p. 5902-7.
283. Takeuchi, A., et al., *Decreased function of genetic variants, Pro283Leu and Arg287Gly, in human organic cation transporter hOCT1*. Drug Metab Pharmacokinet, 2003. **18**(6): p. 409-12.
284. Becker, M.L., et al., *Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes mellitus*. Pharmacogenomics J, 2009. **9**(4): p. 242-7.
285. Clark, R.E., et al., *Pharmacologic markers and predictors of responses to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(4) : p. 639-42.
286. Koren-Michowitz, M., et al., *OCT1 genetic variants are associated with long term outcomes in imatinib treated chronic myeloid leukemia patients*. Eur J Haematol, 2014. **92**(4): p. 283-8.