



HAL
open science

Resistance and toxicity mechanisms of 2-deoxyglucose, a metabolic inhibitor

Clotilde Laussel

► **To cite this version:**

Clotilde Laussel. Resistance and toxicity mechanisms of 2-deoxyglucose, a metabolic inhibitor. Cellular Biology. Université Paris Cité, 2021. English. NNT : 2021UNIP7103 . tel-03991627

HAL Id: tel-03991627

<https://theses.hal.science/tel-03991627>

Submitted on 16 Feb 2023

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

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



Université de Paris

École doctorale 562 Bio Sorbonne Paris Cité

Laboratoire Institut Jacques Monod (UMR 7592), Equipe Trafic membranaire, ubiquitine et signalisation

Mécanismes de résistance et de toxicité à l'inhibiteur métabolique, le 2-deoxyglucose

Par Clotilde LAUSSEL

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Dirigée par Sébastien LÉON

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2021

Devant un jury composé de :

Alenka COPIC, DR, Université de Montpellier, Rapportrice
Pierre MORSOMME, Professor, Université Catholique de Louvain, Rapporteur
Anne PLESSIS, Professeur des Universités, Université de Paris, Examinatrice
Alexandre SOULARD, MCU, Université Claude Bernard Lyon 1, Examineur
Sébastien LÉON, DR, Université de Paris, Directeur de thèse

LISTE DES ÉLÉMENTS SOUS DROITS

Liste de **tous les éléments retirés** de la version complète de la thèse
faute d'en détenir les droits

Document à intégrer dans la version partielle de la thèse

Illustrations, figures, images...

Légende de l'image	N° de l'image	Page(s) dans la thèse
<p>Métabolisme du carbone chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - (D'après Fraenkel, 2011) - La glycolyse, le cycle de Krebs et une partie de la voie des pentoses phosphates sont représentés. Le nom des enzymes impliquées dans ces différentes voies est indiqué en bleu le long des flèches. Hxk1/2 : Hexokinase ; Glk1 : Glucokinase ; Pgi1 : Phosphoglucoisomerase ; Pfk1 : Phosphofructokinase ; Fbp1 : Fructose 1,6-biphosphatase ; Fba1 : Fructose 1,6-bisphosphate aldolase ; Tpi1 : Triose phosphate isomerase ; Gpd1/2 : Glycerol 3-phosphate dehydrogenase ; Gut1 : Glycerol kinase ; Gut 2 : Glycerol 3-phosphate dehydrogenase mitochondrial ; Hor2/Rhr2 : Glycerol 3-phosphate phosphatase ; Tdh1/2/3 : Triose phosphate dehydrogenase ; Pgc1 : 3-phosphoglycerate kinase ; Gpm1 : Glycerate phosphomutase ; Eno1/2 : Enolase ; Pyk2/Cdc19 : Pyruvate kinase ; CyB2 : Cytochrome B2 ; Pdc : Pyruvate decarboxylase ; Pdh : Pyruvate Dehydrogenase ; Adh : Alcohol dehydrogenase ; Ald : Aldehyde dehydrogenase ; Acs1 : Acetyl CoA synthetase ; Pyc1/2 : Pyruvate carboxylase ; Cit1/2/3 : Citrate synthase ; Aco1/2 : Aconitase ; Idh1/2 : Isocitrate dehydrogenase ; Kgd1/2 : alpha-ketoglutarate dehydrogenase ; Lsc1/2 : Succinyl CoA ligase ; Sdh1/2/3 : Succinate dehydrogenase ; Fum1 : Fumarate ; Mdh1/2/3 : Malate dehydrogenase</p>	1.2	16
<p>Arbre de glycosylation des protéines chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. D'après (Guo et al., 2014) - GlcNac : N-acétylglucosamine; Man : Mannose; Glu : Glucose.</p>	1.8	25

Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier La Ligue Contre Le Cancer qui a financé ma thèse et m'a permis d'effectuer tout ce que j'ai pu faire pendant ces 3 années de thèses. Je souhaite également remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'en faire partie et d'accepter d'évaluer ma thèse. Merci aux rapporteurs Alenka Copic et Pierre Morsomme et aux examinateurs, Anne Plessis et Alexandre Soulard.

Je remercie bien évidemment Sébastien de m'avoir accueilli dans le laboratoire dès mon stage de master 1, de m'avoir aidé à évoluer durant toutes ses années. Merci pour tes précieux conseils scientifiques, d'avoir cru en moi et de m'avoir épaulé tout au long de ma thèse.

Merci aussi aux autres membres du laboratoire. Merci à Véronique pour son aide, son soutien et tous ses conseils. Merci à Francisco de m'avoir soutenu pendant ces années de thèse et de m'avoir nourri de chocolat. Good luck with your monthly new resolutions! Merci aussi à Alberto d'avoir toujours été de bonne humeur et d'avoir réussi à me mettre en tête chaque jour des nouvelles chansons. Good luck with your PhD! Et merci aux stagiaires qui ont été de passage au laboratoire : Lina, Paola,... Merci aussi à Rosine de m'avoir fait découvrir les Apprentis Chercheurs, j'y ai appris beaucoup de choses et merci de m'avoir fait goûter les meilleures chouquettes de Paris.

Merci à Agathe pour toute son aide, son soutien et d'avoir toujours réussi à me remonter le moral. Merci à Quentin d'avoir encadré mon stage en Master 1 dans le laboratoire, j'y ai appris beaucoup de choses. Merci à Brice d'avoir accompagné un petit bout de ma thèse, en espérant que la tienne se déroule bien.

Merci aux membres de mon CSI, Nicolas Joly et Alexandre Soulard de m'avoir écouté et conseillé. Merci aussi aux autres membres du YSC, Hugo, Thomas et Amina avec qui je suis ravie d'avoir partagé cette petite expérience et merci à Juan-Martin de toujours m'avoir fait bien rire. Merci à Norry et Jonathan pour leur bonne humeur, leur humour et leur aide. Enfin, merci à Jean-Claude, Kristy, Nadine et Nathalie pour leur aide précieuse au sein de l'institut.

Pour ma famille, je remercie bien évidemment mes parents de m'avoir accompagnés tout du long de mes études et d'avoir été énormément là pour moi pendant ma thèse. Merci à mes frères Antoine et Baptiste, on peut ne pourrait pas rêver mieux comme famille. Merci aussi à Anne et Nelly pour leur soutien et merci à tous les autres membres de ma famille !

Pour mes ami.e.s, je remercie bien sûr Elsa de me supporter depuis si longtemps, de toujours être là pour moi. On a fait beaucoup de bêtises ensemble et j'espère qu'on continuera toujours à en faire (ça ne veut pas dire qu'on va sauter dans la Seine). Je remercie Alice et Seb d'aussi toujours être là pour moi. On forme un super trio en carton et je sais que je peux compter sur vous quoi qu'il arrive. Merci aussi à Maëva pour tout son soutien pendant cette thèse, je vais avoir le temps de venir observer le plus beau bâtiment

de Paris avec toi et merci à Julie pour tout et son énergie au quotidien qui me motive à bouger. Merci à tous les autres d'avoir été là à un moment ou un autre pendant ces 3 ans : Thibault, Francky, Alex, Lionel, Ugo, Ariane, Hortense et tous ceux que j'oublie.

Merci également à Delphine Verluca pour son aide pendant ces derniers mois. et enfin, je souhaite remercier Monsieur Gardarein de m'avoir transmis cette passion pour la biologie et merci à la levure, dans toutes ses formes.

Résumé

La plupart des cellules cancéreuses ont un métabolisme basé sur une forte activité glycolytique. Ainsi, inhiber la glycolyse dans les cellules cancéreuses est une piste étudiée pour limiter la prolifération cancéreuse. Le 2-deoxyglucose (2DG) est un analogue du glucose qui est importé dans les cellules tel du glucose. Il est ensuite phosphorylé en 2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG6P) et inhibe la glycolyse. Cela induit une diminution de la concentration d'ATP intracellulaire et peut conduire à la mort cellulaire. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cet inhibiteur entraîne l'activation de voies de signalisation conduisant à l'expression des protéines Dog1 et Dog2, des phosphatases qui détoxifient le 2DG6P et permettent aux cellules de résister partiellement au 2DG. De plus, le 2DG induit l'endocytose de deux transporteurs de glucose, et il a été proposé que ce mécanisme contribue aussi à la résistance vis-à-vis de cet inhibiteur.

Cette étude a consisté à étudier les mécanismes par lesquels le 2DG déclenche l'endocytose ainsi qu'aux autres effets cellulaires que pouvait avoir le 2DG chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour l'endocytose en réponse au 2DG, j'ai observé que lors d'un traitement des cellules avec cette drogue, la quasi-totalité des protéines membranaires étudiées est endocytée. Je me suis ensuite concentrée sur le mécanisme d'endocytose de la protéine de fonction inconnue, Ina1. En réponse au 2DG, cette protéine est endocytée via l'arrestine Rod1 ainsi que via l'E3 ubiquitine ligase, Rsp5. Rod1 est bien connue pour son rôle dans la régulation de l'endocytose en réponse au glucose, et j'ai montré qu'elle est aussi cruciale pour l'endocytose en réponse au 2DG. En m'intéressant ensuite à la régulation de cette arrestine, j'ai confirmé qu'elle était activée en réponse au 2DG par la phosphatase PP1/Reg1 et inhibée par la kinase AMPK/Snf1, et que la fonction de ce couple antagoniste est régulée par le 2DG.

J'ai également observé de nouveaux effets du 2DG sur le métabolisme lipidique ou la morphologie de la vacuole. En exploitant un crible publié, j'ai aussi cherché à identifier de nouveaux mécanismes de résistance au 2DG. Par exemple, la délétion de gènes du complexe SAGA, qui régule l'acétylation des histones, rend les cellules sensibles au 2DG.

Ainsi, ce travail précise notre compréhension des mécanismes de résistance et de toxicité du 2DG chez *Saccharomyces cerevisiae* et pourrait ainsi contribuer à mieux connaître les effets du 2DG dans les cellules cancéreuses.

Mots clés : 2-deoxyglucose, *Saccharomyces cerevisiae*, endocytose, métabolisme, arrestines

Abstract

Most cancer cells have a metabolism based on high glycolytic activity. Thus, inhibiting glycolysis in cancer cells is a track being explored to limit cancer proliferation. 2-deoxyglucose (2DG) is a glucose analogue that is imported into cells as glucose. It is then phosphorylated to 2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG6P) and inhibits glycolysis. This induces a decrease in intracellular ATP concentration and can lead to cell death. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this inhibitor causes the activation of signaling pathways leading to the expression of Dog1 and Dog2 proteins, phosphatases that detoxify 2DG6P and allow cells to partially resist 2DG. In addition, 2DG induces endocytosis of two glucose transporters, and it has been proposed that this mechanism also contributes to resistance to this inhibitor.

This study investigated the mechanisms by which 2DG triggers endocytosis as well as other cellular effects that 2DG may have in *Saccharomyces cerevisiae*.

For endocytosis in response to 2DG, I observed that when cells were treated with this drug, almost all of the membrane proteins studied were endocytosed. I then focused on the mechanism of endocytosis of the protein of unknown function, Ina1. In response to 2DG, this protein is endocytosed via the arrestin Rod1 as well as via the E3 ubiquitin ligase, Rsp5. Rod1 is well known for its role in the regulation of endocytosis in response to glucose, and I have shown that it is also crucial for endocytosis in response to 2DG. By then focusing on the regulation of this arrestin, I confirmed that it is activated in response to 2DG by PP1/Reg1 phosphatase and inhibited by AMPK/Snf1 kinase, and that the function of this antagonist pair is regulated by 2DG.

I also observed new effects of 2DG on lipid metabolism or vacuole morphology. By exploiting a published screen, I also sought to identify new mechanisms of 2DG resistance. For example, deletion of genes in the SAGA complex, which regulates histone acetylation, makes cells sensitive to 2DG.

Thus, this work refines our understanding of the mechanisms of 2DG resistance and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and may contribute to a better understanding of the effects of 2DG in cancer cells.

Key words : 2-deoxyglucose, *Saccharomyces cerevisiae*, endocytosis, metabolism, arrestins

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	5
Abstract	6
Sommaire	7
Abréviations	9
1 - Introduction	11
<u>A - Le métabolisme chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : utilisation et effet des différentes sources de carbone</u>	<u>13</u>
A.1 Le glucose et les autres sources de carbone utilisées par les cellules de levures	13
A.1.1 La répression induite par le glucose	13
A.1.2 La levée de la répression induite par le glucose	14
A.2 Les premières étapes de la signalisation du glucose dans les cellules	15
A.2.1 Le transport du glucose à travers la membrane	15
A.2.1.1 L'import du glucose dans les cellules via les transporteurs d'hexose HXT	16
A.2.1.2 Snf3 et Rgt2 : les senseurs de glucose	16
A.2.1.3 Gpr1 : un GPCR senseur de glucose	16
A.2.2 La glycolyse	17
A.2.3 La voie de répression induite par le glucose : rôle des protéines et complexes Hxk2, Snf1/AMPK et Reg1/PP1	18
A.2.3.1 Le rôle de l'hexokinase Hxk2	19
A.2.3.2 Le rôle du complexe Reg1/Glc7 et de la protéine Snf1/AMPK dans la signalisation du glucose	19
<u>B - Le 2-Deoxy-D-Glucose</u>	<u>21</u>
B.1 Présentation du 2-Deoxy-D-Glucose	21
B.2 Les premières utilisations du 2DG chez les mammifères et chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
B.3 Les différents effets du 2DG	22
B.3.1 Les effets du 2DG sur la glycolyse et le niveau d'ATP intracellulaire	23
B.3.2 L'activation transcriptionnelle de DOG1 et DOG2 par le 2DG	23
B.3.3 L'effet du 2DG sur la N-glycosylation des protéines	24
B.3.4 L'effet du 2DG sur la voie de signalisation de l'intégrité de la paroi cellulaire	25
B.3.5 L'effet du 2DG sur les protéines Snf1/AMPK et Reg1/PP1 : voie de signalisation et répression induite par le glucose	26
B.4 Le 2DG dans les cellules cancéreuses	26
B.4.1 L'utilisation du 2DG dans le cadre de traitements anticancéreux et essais cliniques	26
B.4.2 L'utilisation du 2DG dans le cadre de radiothérapies et de PET scan	28
<u>C - L'endocytose chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	<u>28</u>
C.1 Les différents acteurs de l'internalisation	28

C.1.1 L'internalisation médiée par la clathrine	28
C.1.2 L'endocytose indépendante de la clathrine	30
C.1.3 L'ubiquitine et son rôle dans l'endocytose	30
C.1.3.1 Rôle de l'ubiquitine au niveau de la membrane plasmique	31
C.1.3.2 Rôle de l'ubiquitine au niveau du trafic endosomal	31
C.1.4 Rsp5, une E3 ubiquitine ligase indispensable pour l'endocytose	31
C.2 Les protéines et les domaines présents au niveau de la membrane plasmique	32
C.2.1 Les compartiments de la membrane plasmique et sous-domaines membranaires	32
C.2.2 Les protéines et transporteurs membranaire	33
C.3 Les différents signaux pouvant induire l'endocytose	34
C.3.1 Changement d'un paramètre du milieu extracellulaire	34
C.3.1.1 Changement dans la concentration d'acides aminés	34
C.3.1.2 Changement dans l'homéostasie des métaux	34
C.3.1.3 Changement de concentration de base nucléique	34
C.3.1.4 Changement métabolique	35
C.3.2 Les phéromones	35
C.3.3 Ajout d'une drogue synthétique dans le milieu extracellulaire	35
C.4 Les arrestines : protéines régulatrices de la signalisation	36
C.4.1 Présentation des arrestines chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
C.4.2 Les différents signaux régulant l'activité des arrestines	37
C.4.3 La régulation des arrestines via les modifications post-traductionnelles	39
<u>D - Étude de l'effet du 2DG chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	<u>41</u>
<u>E - Objectifs de thèse</u>	<u>42</u>
<u>F - Introduction du chapitre 2</u>	<u>43</u>
2-deoxyglucose transiently activates Protein Phosphatase 1 (PP1) and induces massive endocytosis causing increased sensitivity to the drug	44
<u>Abstract</u>	<u>45</u>
<u>Introduction</u>	<u>46</u>
<u>Results</u>	<u>50</u>
2DG triggers the endocytosis of many plasma membrane proteins	50
Ina1, a member of the SUR7/Pall family, is endocytosed by a canonical ART/Rsp5-dependent pathway in response to 2DG	54
Ina1 endocytosis depends on the canonical Rsp5/arrestin-dependent endocytosis	56
2DG leads to Rod1 dephosphorylation and ubiquitylation by transiently inducing PP1 activity	57
2DG-induced post-translational modifications of Rod1 are required for 2DG-induced endocytosis	61
Low affinity glucose transporters are required for the resistance displayed by the Rod1 mutant	64
<u>Discussion</u>	<u>65</u>
<u>Materials and Methods</u>	<u>70</u>
<u>Bibliography</u>	<u>74</u>
<u>Acknowledgments</u>	<u>79</u>
<u>Supplementary materials</u>	<u>80</u>

3 - Autres observations sur les effets cellulaires du 2DG et les mécanismes de résistance	88
<u>A - Régulation de l'endocytose d'Ina1-GFP par le 2DG</u>	<u>89</u>
A.1 - L'endocytose d'Ina1-GFP en réponse au 2DG n'est pas dû à l'induction d'un stress du RE	89
A.2 - L'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG ou la carence en glucose fait intervenir des mécanismes distincts	90
A.3 - Rod1 contrôle le trafic de Ina1 en réponse au 2DG mais pas en réponse à une carence en glucose	92
A.4 - Le paralogue d'Ina1, Fat3, n'est pas observable par microscopie dans les conditions testées	93
A.5 - Discussion	94
<u>B - Les différents effets du 2DG observés dans les cellules de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	<u>95</u>
B.1 - Le 2DG induit une fragmentation de la vacuole	95
B.2 - Un traitement des cellules au 2DG induit la formation de gouttelettes lipidiques	96
B.3 - Le 2DG n'induit pas l'autophagie dans des cellules de levures	97
B.4 - Le 2DG n'induit pas de changement de profil d'ubiquitination totale chez la levure	98
B.5 - Discussion	99
B.5.1 - Comment un traitement au 2DG peut induire une fragmentation vacuolaire et la formation de gouttelettes lipidiques ?	99
B.5.2 - A l'inverse de son effet dans les cellules humaines, le 2DG ne semble pas induire l'autophagie chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
<u>C - Cribles génétiques pour comprendre les différents mécanismes de résistance et sensibilité des cellules au 2DG</u>	<u>101</u>
C.1 - Exploitation d'un crible génétique publié (Hoepfner et al., 2014)	101
C.2 - Crible génétique pour déterminer l'origine de la résistance du mutant <i>rod1Δ</i> au 2DG	107
C.3 - Discussion	110
C.3.1 - Identification de nouveaux mutants sensibles au 2DG	110
C.3.1.1 - Le complexe SAGA participe à la résistance au 2DG	110
C.3.1.2 Le rôle des protéines Sla1 et Bni4 dans la résistance au 2DG	111
C.3.2 - Un crible génétique permet d'identifier des protéines jouant un rôle dans la résistance au 2DG	112
4 - Conclusion générale et perspectives	114
Matériels et méthodes	117
Matériels supplémentaires	121
Bibliographie	127

Abréviations

cER : RE cortical
¹⁸FDG : ¹⁸Fluoro-2-Deoxyglucose
2DG : 2-Deoxy-D-Glucose
2DG6P : 2-Deoxy-D-Glucose 6 Phosphate
aa : acides aminés
ABC : ATP Binding Cassette
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMP : Adénosine MonoPhosphate
AMPc : Adénosine MonoPhosphate Cyclique
AMPK : AMP-Activated Protein Kinase
APC : Amino acid-polyamine-choline
ARN pol II : ARN polymérase II
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARRDC : Arrestin Domain Containing protein
ARTs : Arrestin-Related Trafficking Adaptators
ATP : Adenosine TriPhosphate
CCV : Clathrin Coated Vesicle
CDF : Cation Diffusion facilitator
CHX : Cycloheximide
CIE : Clathrin Independent Endocytosis
CIP : Calf Intestine Phosphatase
CME : Clathrin Mediated Endocytosis
CWI : Cell Wall Integrity
DAG : Diacylglycérol
DO : Densité Optique
DUB : Deubiquitinase
EE : Early Endosome
EndoH : Endoglycosidase H
ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
F6P : Fructose-6-Phosphate
Fbp1 : Fructose 1,6-biPhosphatase
FRET : Förster Resonance Energy Transfer
G3P : Glycérol-3-Phosphate
G6P : Glucose-6-Phosphate
GDP : Guanosine DiPhosphate
GFP : Green Fluorescent Protein
Glc ON : Glucose OverNight
Glc1 : Glucokinase 1
HAD : HaloAcid Dehalogenase
HAT : Histone AcetylTransferase
HDHD1 : Haloacid Dehalogenase-like Hydrolase Domain-containing protein 1
Hxk1/2 : Hexokinase 1/2
HXT : Hexose Transporter
LD : Lipid Droplet
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MCC : Membrane Compartments of Can1

MCL : Membrane Compartment of Lam4
MCP : Membrane Compartment of Pma1
MCT : Membrane Compartment of Tor2
MCW : Membrane Compartment of Wsc1
MIP : Major Intrinsic Protein
MM : Milieu Minimum
MP : Membrane Plasmique
MPT : Modification Post-Traductionnelle
MVB : MultiVesicular Bodies
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PCR : Polymerase Chain Reaction
PET Scan : Positron Emission Tomography Scanner
Pgi1 : PhosphoGlucosomérase 1
PKA : Protein Kinase A
PP1 : Protein Phosphatase 1
PPP : Pentose Phosphate Pathway
RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G
RE : Réticulum Endoplasmique
SAGA : Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase
STRE : Stress Response Element
TCA : TriChloracetic Acid
Tn : Tunicamycine
TORC1 : Target Of Rapamycin Complex 1
UIM : Ubiquitin Interaction Motif
UPR : Unfolded Protein Response
VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VPS : Vacuolar Protein Sorting
WT : Wild Type
YNB : Yeast Nitrogen Base
YPD : Yeast Extract-Peptide-Dextrose

1 - Introduction

A - Le métabolisme chez *Saccharomyces cerevisiae* : utilisation et effet des différentes sources de carbone

A.1 Le glucose et les autres sources de carbone utilisées par les cellules de levures

Dans son environnement naturel, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est retrouvée au niveau d'écorce et feuilles d'arbre ainsi que sur des fruits et baies endommagées. L'environnement de ces levures est souvent un environnement pauvre en ressources ce qui en fait un organisme avec une forte capacité d'adaptation. Afin de survivre, les levures ont besoin d'une source de carbone telle que le glucose, qu'elles peuvent métaboliser très rapidement par fermentation alcoolique même en présence d'oxygène (l'effet Crabtree). Lors de cette fermentation, elles libèrent de l'éthanol dans l'environnement qu'elles peuvent utiliser lorsque la source de glucose est tarie; de plus, l'éthanol est non-assimilable par d'autres organismes présents dans son environnement, voire leur est toxique (Revue : Jouhten et al., 2016; Liti, 2015). Cette utilisation particulière du glucose par *Saccharomyces cerevisiae* lui permet donc de s'adapter facilement à son environnement et de survivre.

A.1.1 La répression induite par le glucose

Le glucose est un sucre monosaccharide composé de 6 carbones (**Figure 1.1**), un hexose. Source importante d'énergie de la cellule, le glucose est généralement métabolisé par glycolyse.

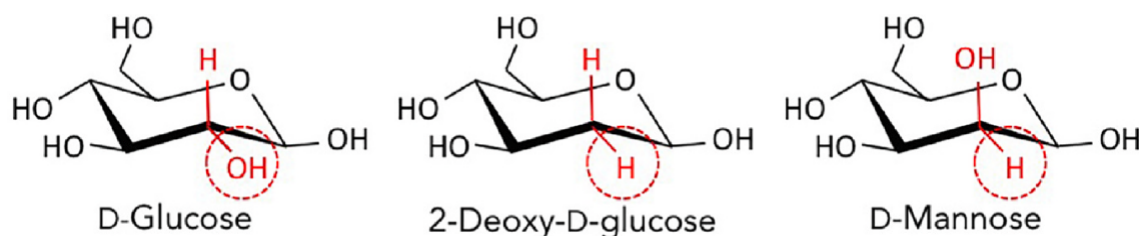


Figure 1.1 - Structures moléculaire du D-Glucose, du 2-Deoxy-D-glucose et du D-Mannose
(Laussel and Léon, 2020)

En 1927, en étudiant des tumeurs de rats, Otto Warburg montre que dans des tissus différenciés non tumoraux, les cellules ne produisent pas d'acide lactique et ne font donc pas de fermentation. En absence d'oxygène, les cellules génèrent de l'acide lactique par fermentation. Il montre, en comparaison, que dans des tumeurs, la formation d'acide lactique se fait quelle que soit la position des cellules dans la tumeur (plus ou moins proche des capillaires, donc de l'apport en oxygène) (Warburg et al., 1927). Cette étude permet ainsi de définir ce qu'on appelle maintenant l'effet Warburg : la répression du métabolisme oxydatif (respiration et phosphorylation oxydative) même en présence d'oxygène dans les cellules tumorales. Le seul moyen d'entraîner la mort de cellules tumorales est donc de couper tout apport en oxygène et en carbone afin de stopper la respiration et la fermentation

lactique.

Suivant les études de Warburg sur la fermentation et la respiration, Herbert Grace Crabtree montre en 1929, dans des tumeurs de souris, qu'en présence de glucose, il y a une diminution de la respiration de 12% par rapport à des cellules en présence de xylose. De plus, il n'observe pas de formation d'acide lactique en présence de xylose dans le milieu, indépendamment de la présence d'oxygène. Il n'y a donc pas de fermentation. Il en conclut alors que l'activité glycolytique a un effet sur la capacité de respiration des cellules tumorales (Crabtree, 1929). Il décrit ce qu'on appelle maintenant l'effet Crabtree : la suppression de la respiration et la phosphorylation oxydative induite par le glucose, de manière réversible et temporaire.

Des mutants de la levure *Saccharomyces cerevisiae* déficients pour la respiration ont un taux de croissance moins important en présence de galactose qu'en présence de glucose. De plus, le taux de respiration est plus important dans des levures en présence de galactose qu'en présence de glucose, où le taux de fermentation est très important (De Deken, 1966). L'augmentation de la respiration en présence de galactose compense un taux de fermentation insuffisant. Ainsi, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme "Crabtree positif". La levure *Schizosaccharomyces pombe* est également une levure "Crabtree positive" mais ce n'est pas le cas de toutes les levures. En effet, des levures de l'espèce *Candida* sont "Crabtree négatives" (De Deken, 1966) : le glucose n'a pas cet effet de suppression de la respiration et de la phosphorylation oxydative.

Chez la levure, l'import et l'utilisation du glucose dans les cellules induit notamment une répression de certaines voies de signalisation et de transcription de certains gènes. Ce mécanisme de répression est décrit avec précision dans cette revue : (Kayikci and Nielsen, 2015). En présence au glucose, l'activité de la protéine Snf1/AMPK est inhibée (chapitre A.2.3.2). Cette protéine, lorsqu'elle est activée par l'absence de glucose, active la transcription et l'expression des gènes d'autres métabolismes que celui du glucose. Ainsi, en présence de glucose, les gènes du métabolisme du glucose sont transcrits et la transcription des gènes de la respiration ou encore de néoglucogenèse (Klein et al., 1998) est inhibée.

En plus d'inhiber la transcription des gènes, la répression induite par le glucose a lieu également par la dégradation des protéines non impliquées dans le métabolisme du glucose (Holzer, 1976) lorsque du glucose est ajouté à un milieu sans. Enfin, un autre mécanisme de répression induite par le glucose est une augmentation de la dégradation de l'ARNm de certains gènes (Revue : Klein et al., 1998). Ainsi, lors de l'ajout de glucose dans un milieu sans, il y a une diminution de la stabilité de l'ARNm de *SUC2*, un gène codant pour l'invertase, une enzyme qui hydrolyse le saccharose.

Ainsi, la répression induite par le glucose se fait via plusieurs mécanismes, expliquant l'effet Crabtree chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, lorsqu'il n'y a plus de glucose dans le milieu, d'autres métabolismes peuvent se mettre en place.

A.1.2 La levée de la répression induite par le glucose

En absence de glucose dans le milieu de croissance des levures et en présence d'autres sources de carbone non fermentescibles, la fermentation n'a plus lieu laissant sa place à la respiration et phosphorylation oxydative. Ce changement de métabolisme est dû à une dérépression de gènes de la respiration grâce à l'absence de glucose. Cette dérépression des gènes d'autres métabolismes passent par l'activation de la protéine Snf1/AMPK. Cela induit l'activation des gènes de la néoglucogenèse et régule également les gènes de réponse au stress (Revue : Conrad et al., 2014).

En présence d'autres sources de carbone non fermentescibles, certains gènes vont

être transcrits et traduits. Ainsi, en présence de galactose, les gènes *GAL*, dont le gène *GAL2*, codant pour une perméase de galactose, (Tschopp et al., 1986) dont la transcription est réprimée en présence de glucose, vont être transcrits et traduits (Kew and Douglas, 1976).

A.2 Les premières étapes de la signalisation du glucose dans les cellules

A.2.1 Le transport du glucose à travers la membrane

A.2.1.1 L'import du glucose dans les cellules via les transporteurs d'hexose

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le glucose est importé dans les cellules via les transporteurs d'hexoses présents à la membrane. Il existe 20 gènes codant pour des potentiels transporteurs d'hexose (*HXT1* à *HXT17*, *GAL2*, *SNF3* et *RGT2*) (Kruckeberg, 1996). Les protéines Snf3 et Rgt2 n'ont pas la capacité de transporter du glucose, contrairement aux autres protéines de la famille des transporteurs d'hexoses, nous reviendrons dessus dans les chapitres A.2.1.2 et A.2.1.3. La séquence protéique de ces transporteurs est conservée et on retrouve une forte similarité protéique entre ces protéines. Ainsi, Hxt6 et Hxt7 sont identiques à 99,7% et cela vient de la duplication du génome de *Saccharomyces cerevisiae* (Kellis et al., 2004), expliquant également le nombre important de gènes dans la famille des transporteurs d'hexoses. De plus, leur structure secondaire est semblable avec 12 domaines transmembranaires; les extrémités N-terminale et C-terminale se trouvent dans le cytoplasme (Kruckeberg, 1996).

Dans la famille des transporteurs d'hexose, on retrouve des transporteurs à haute affinité (Hxt6, Hxt7, Gal2) ainsi que des transporteurs à basse affinité (Hxt1 et Hxt3) (Reifenberger et al., 1997, 1995) dont l'expression varie en fonction de la concentration d'hexose présente dans le milieu extracellulaire.

Dans la souche de levures de laboratoire de *Saccharomyces cerevisiae*, la délétion des gènes des transporteurs *HXT1* à *HXT17* et *GAL2* (*hxt1-hxt17 gal2*) empêche l'utilisation du glucose, fructose, mannose, saccharose et raffinose (Wieczorke et al., 1999). Ces transporteurs sont donc essentiels pour le transport de glucose dans les cellules. De plus, le fructose inhibe le transport de glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces uvarum* (utilisée dans la fabrication de bière) indiquant que l'import dans les cellules de ces deux sucres s'effectue via les mêmes transporteurs (D'Amore et al., 1989).

A.2.1.2 Snf3 et Rgt2 : les senseurs de glucose

Parmi les 20 transporteurs d'hexose qui sont exprimés chez *Saccharomyces cerevisiae*, il existe 2 protéines à 12 domaines transmembranaires, similaires aux transporteurs de glucose qui sont des senseurs de glucose, Snf3 et Rgt2 (Ozcan et al., 1996). Incapables de transporter le glucose, ils agissent comme des senseurs : Snf3 est un senseur pour les concentrations faibles de glucose et Rgt2 pour les hautes concentrations de glucose. Leur rôle est fondamental car ils sont requis pour l'induction des gènes des transporteurs de glucose *HXT* (**Figure 1.2**). Lorsque le glucose se lie à ces senseurs, cela active une voie de signalisation, via la queue C-terminale des senseurs (Ozcan et al., 1998) et les kinases Yck1 et Yck2 qui permet l'activation transcriptionnelle des gènes *HXT* (Gancedo, 2008). Chez la levure *Kluyveromyces lactis*, on retrouve également ce type de

senseur de glucose avec la protéine *K/Rag4*, régulée par la glycolyse (Cairey-Remonnay et al., 2015).

A.2.1.3 Gpr1 : un GPCR senseur de glucose

Gpr1 est une protéine à 7 domaines transmembranaires couplée à la protéine G (RCPG : récepteur couplé à une protéine G) Gpa2. Elle est impliquée dans l'activation d'une voie de signalisation AMPc-dépendante en réponse au glucose (Kraakman et al., 1999). Le glucose se fixe à Gpr1 (Lemaire et al., 2004) induisant l'interaction avec Gpa2 et son activation (Kraakman et al., 1999). Cela induit l'activation de l'adénylate cyclase, Cyr1 (**Figure 1.2**) puis une augmentation du niveau d'AMPc dans les cellules et l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Gancedo, 2008) : l'AMPc se lie à la protéine inhibitrice Bcy1 qui se dissocie alors des sous-unités catalytiques Tpk1, Tpk2 ou Tpk3 qui deviennent ainsi actives. Cette activation libère la répression exercée sur le gène de l'hexokinase *HXK2* (Palomino et al., 2006) qui est alors transcrit, exprimé et peut ainsi phosphoryler le glucose en G6P lorsqu'il rentre dans les cellules.

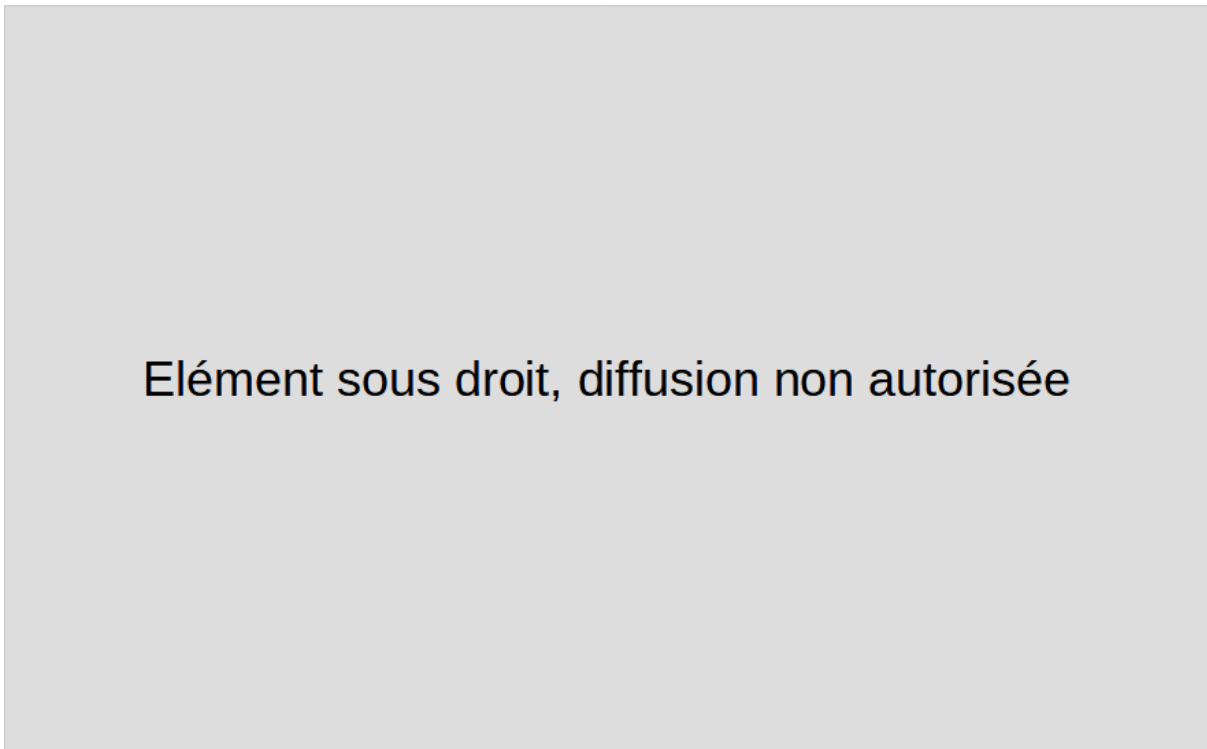


Figure 1.2 - Représentation schématique simplifiée des trois voies de réponse au glucose caractérisées chez *Saccharomyces cerevisiae*. (Geladé et al., 2003)

(a) La voie principale de répression induite par le glucose. En réponse à des concentrations élevées de glucose, le complexe contenant la kinase Snf1 inhibe le complexe contenant le répresseur Mig1 et réprime ainsi les gènes impliqués dans la respiration, la gluconéogenèse et le métabolisme des sources alternatives de carbone, comme le galactose (gènes *GAL*) et le maltose (gènes *MAL*). PP1 agit dans un complexe avec Reg1 pour réguler à la baisse Snf1 dans des conditions de faible glucose. La phosphorylation du glucose par Hxk2 est requise pour cette voie, mais l'étape à laquelle elle agit n'est pas connue. **(b) La voie de détection du glucose Snf3/Rgt2.** En l'absence de glucose, Rgt1 agit dans un complexe avec Std1 et Mth1 comme répresseur transcriptionnel des gènes *HXT1-HXT4*. En présence de glucose, le facteur de transcription Rgt1 est inactivé par l'inactivation et la dégradation de Mth1 et Std1 médiées par SCF-Grr1, et l'hyperphosphorylation par PKA, ce qui entraîne la dissociation de Rgt1 des promoteurs *HXT*. Snf3 déclenche l'induction de *HXT1-HXT4* en réponse à de faibles concentrations de glucose. Des concentrations élevées de glucose augmentent encore l'expression de *HXT1* par l'intermédiaire de Rgt2 dans un processus qui implique la conversion de Rgt1 en un activateur transcriptionnel. **(c) La voie de détection du glucose Gpr1/Gpa2.** Des concentrations élevées de glucose activent la synthèse de l'AMPc par l'adénylate cyclase Cyr1

(qui dépend de Ras) par l'intermédiaire du récepteur Gpr1 couplé à la protéine G Gpa2, de manière dépendante de la phosphorylation du glucose. L'activation de la protéine kinase A (PKA) qui en résulte affecte une grande variété de gènes cibles impliqués, par exemple, dans le métabolisme du carbone et la résistance au stress. Certains de ces effets sont médiés par les facteurs de transcription Msn2 et Msn4. STRE, élément de réponse au stress.

Le saccharose est un sucre constitué d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose qui est clivable en deux par l'invertase Suc2, une enzyme sécrétée dans le milieu extracellulaire par les levures (Marques et al., 2016). Ce sucre peut également induire l'activation de Gpr1 et une augmentation du niveau d'AMPc de façon encore plus importante que le glucose. Au contraire, malgré sa similitude avec le glucose (**Figure 1.1**), le mannose agit comme un antagoniste de Gpr1 en se fixant à Gpr1 sans l'activer (Lemaire et al., 2004).

A.2.2 La glycolyse

Le glucose est importé dans les cellules via différents membres de la famille des transporteurs d'hexose, décrits précédemment. Dès son entrée dans les cellules, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par les hexokinases Hxk1, Hxk2 ou la glucokinase Glk1. Le G6P est isomérisé en fructose-6-phosphate (F6P) par la phosphoglucose isomérase, Pgi1. Suivant plusieurs étapes, le F6P est transformé en pyruvate (**Figure 1.3**). Chaque molécule de glucose qui est importée dans les cellules permet d'induire la formation de deux molécules de pyruvate via la glycolyse et cela permet de générer 2 molécules d'ATP. Le pyruvate peut alors entrer dans le processus de fermentation (Bender et al., 2015), menant à la formation d'éthanol, qui est exporté des cellules par simple diffusion (Kotyk and Alonso, 1985), ou alors entrer dans les mitochondries (Bender et al., 2015) et participer à la respiration et la phosphorylation oxydative menant à la formation de dioxyde de carbone. Le processus de respiration et phosphorylation oxydative génère 32 molécules d'ATP de plus par molécule de glucose.

Le G6P peut également être transformé en 6-phosphogluconate puis en ribulose 5-phosphate via la voie des pentoses phosphates (PPP : Pentose Phosphate Pathway) permettant une production importante de NADPH qui protège les cellules des stress oxydatifs (Juhnke et al., 1996).

Pour ce qui est du galactose, l'entrée de cet hexose dans les cellules se fait via des perméases spécifiques. Par différentes étapes, la voie de signalisation Leloir (décrite dans cet article : Lazar et al., 2015), ce sucre est converti en G6P et participe ensuite à la glycolyse (Timson, 2007).

A.2.3 La voie de répression induite par le glucose : rôle des protéines et complexes Hxk2, Snf1/AMPK et Reg1/PP1

A.2.3.1 Le rôle de l'hexokinase Hxk2

Lors de son import dans les cellules, le glucose est phosphorylé en G6P par Hxk1, Hxk2 et Glk1 (Lobo and Maitra, 1977). Ces enzymes phosphorylent également le fructose, le mannose ainsi que le 2-deoxyglucose. En présence de sources de carbone fermentescibles (glucose, fructose ou mannose), Hxk2 réprime l'expression de *GLK1* et *HXK1*. C'est donc la principale enzyme active en présence de glucose. Lorsque le métabolisme change pour une source de carbone non fermentescible, *HXK2* est réprimée et les gènes *GLK1* et *HXK1* sont exprimés (Rodríguez et al., 2001).

Cette régulation d'Hxk2 en réponse à la concentration de glucose se fait également via la phosphorylation de l'enzyme qui est essentielle pour la signalisation du glucose (Randez-Gil et al., 1998). Les modifications post-traductionnelles d'Hxk2 sont régulées par la phosphatase Reg1/PP1, qui, en réponse au glucose, déphosphoryle Hxk2, la retenant dans le cytoplasme. Lorsque la concentration de glucose est basse, la kinase Snf1/AMPK, qui est activée, phosphoryle Hxk2, la retenant dans le noyau (Ahuatzi et al., 2004; Moreno and Herrero, 2002). Ainsi, dans ces conditions, Hxk2 est dans configuration ouverte, n'est pas lié au complexe formé par les facteurs de transcription Mig1 et Mig2, Snf1 et Reg1, permettant l'expression transcriptionnelle de l'invertase *SUC2*. Au contraire, en présence de glucose, Hxk2 se lie à Mig1 et forme alors un complexe inhibant l'activation transcriptionnelle de *SUC2* (Vega et al., 2016).

D'autre part, la phosphorylation du glucose par Hxk2 semble générer un signal, peut-être d'origine métabolique ou conformationnel (Gancedo, 2008), qui agit sur d'autres acteurs de la voie, présentés dans le paragraphe suivant.

A.2.3.2 Le rôle du complexe Reg1/Glc7 et de la protéine Snf1/AMPK dans la signalisation du glucose

Comme décrit plus haut (chapitre A.1.1), la présence de glucose induit la répression de nombreux gènes. Cette voie de signalisation implique deux protéines majeures : la protéine Reg1, du complexe PP1 (Protein Phosphatase 1), et la protéine Snf1/AMPK.

Le complexe PP1 est composé d'une sous-unité catalytique, Glc7, essentielle pour la viabilité des levures (Feng et al., 1991). Glc7 s'associe à différentes sous-unités régulatrices. Ces différentes sous-unités vont se fixer à différents substrats et conférer plusieurs fonctions à PP1. Ainsi, Glc7 peut se lier avec la sous-unité régulatrice Shp1 afin de jouer un rôle dans la polarité cellulaire (Zhang et al., 1995). Une autre sous-unité régulatrice de PP1 est la protéine Reg1 qui est impliquée dans la voie de répression induite par le glucose en inhibant l'expression transcriptionnelle de certains gènes en réponse au glucose (Tu and Carlson, 1994) par les mécanismes précisés ci-dessous.

Snf1 est une kinase essentielle pour l'utilisation du saccharose et d'autres sources de carbone non fermentescibles dans les cellules (Carlson et al., 1981). Elle fonctionne en complexe avec une sous-unité activatrice gamma, Snf4 (Celenza et al., 1989), et une sous-unité bêta, Sip1, Sip2 ou Gal83 (Jiang and Carlson, 1997). Lors d'une carence de glucose, Snf1 est phosphorylée et activée par les kinases Sak1 (Nath et al., 2003), Elm1 (Sutherland et al., 2003) et Tos3 (Hong et al., 2003; Wilson et al., 1996), et participe à l'activation de la transcription des gènes réprimés par le glucose.

En réponse au glucose, la protéine Reg1 est activée mais l'activation de cette

protéine en réponse à ce sucre n'est pas encore comprise aujourd'hui. Cependant, des données indiquent que l'hexokinase jouerait un rôle clé dans cette étape; en effet, la mutation d'*HXK2* entraîne une dérégulation de l'invertase (Entian and Zimmermann, 1980; Ma et al., 1989) et une phosphorylation accrue de Snf1 (McCartney et al., 2014). En présence de glucose, le complexe Reg1/PP1 déphosphoryle la kinase Snf1/AMPK, la rendant inactive et conduisant à la répression des gènes requis pour l'utilisation d'autres sources de carbone que le glucose (Sanz et al., 2000). Par exemple, les gènes *GAL* et *SUC2* sont réprimés via les facteurs de transcription Nrg1, Mig1 et Mig2 en réponse au glucose (Zhou and Winston, 2001) (**Figure 1.4**). C'est la voie de répression induite par le glucose.

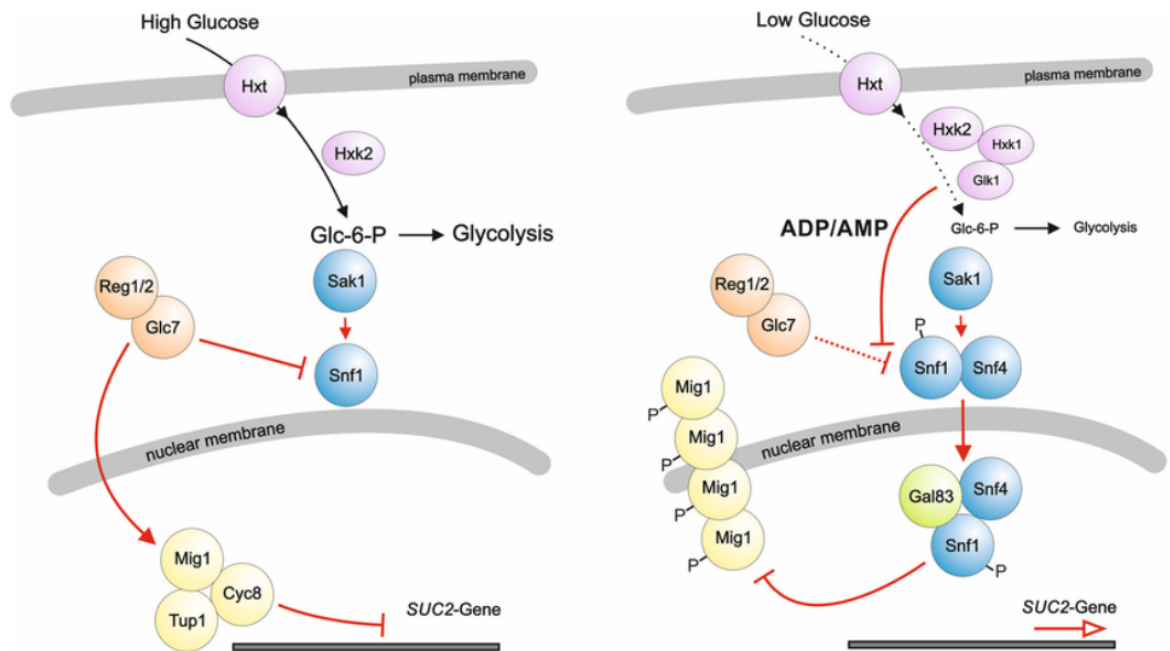


Figure 1.4 - Représentation schématique de la voie de signalisation Snf1/Mig1 chez *Saccharomyces cerevisiae*. (Bendrioua et al., 2014)

La voie Snf1/Mig1 est représentée en présence de niveaux élevés et faibles de glucose dans le milieu de croissance. À des niveaux élevés de glucose, Hxk2 phosphoryle le glucose et la glycolyse est pleinement active. La phosphatase Glc7 maintient Snf1 et Mig1 déphosphorylés, et, par conséquent, Mig1 est situé dans le noyau et, en complexe avec Cyc8 et Tup1, réprime l'expression des gènes. À faible taux de glucose, Hxk1 et Glk1 participent également à la phosphorylation du glucose, mais la glycolyse fonctionne à un rythme plus faible.

Au contraire, en absence de glucose, ces gènes sont dérégulés via l'activation et l'action de Snf1. Ainsi, parmi les gènes-cibles du complexe Snf1, on retrouve le facteur de transcription *ADR1*, qui joue un rôle dans le métabolisme respiratoire (Young et al., 2012). De plus, Snf1 phosphoryle les facteurs de transcription Mig1 et Mig2 qui répriment l'expression de certains gènes en réponse au glucose. Ces facteurs de transcription, lorsqu'ils sont phosphorylés, sont exportés du noyau et les gènes réprimés par le glucose sont alors exprimés (Lutfiyya et al., 1998). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, une protéine orthologue de Snf1 régule aussi la dérégulation de certains gènes en absence de glucose (Matsuzawa et al., 2012). De plus, Snf1/AMPK est également phosphorylée et activée en réponse à des stress environnementaux autres que la limitation en glucose dans le milieu. Un stress oxydatif ou un pH alcalin induisent aussi l'activation de Snf1/AMPK chez *Saccharomyces cerevisiae* (Hong and Carlson, 2007).

Pour une revue sur les différentes voies de signalisation régulées par Snf1/AMPK, voir (Hedbacker and Carlson, 2008) et sur les voies de signalisation du glucose dans les

premières étapes de sa signalisation, voir la revue (Gancedo, 2008).

B - Le 2-Deoxy-D-Glucose

B.1 Présentation du 2-Deoxy-D-Glucose

Le 2-Deoxy-D-Glucose (2DG) est un inhibiteur métabolique non naturel. Analogue synthétique du glucose (**Figure 1.1**), il se différencie de ce dernier par l'absence d'oxygène au niveau du carbone 2 de la molécule. Reconnu par les cellules comme du glucose, il est importé, chez *Saccharomyces cerevisiae* via les transporteurs de glucose (Van Steveninck, 1968), de haute et de basse affinités. Cependant, contrairement au glucose, il ne peut pas se fixer et activer le RCPG Gpr1 (Lemaire et al., 2004). Il est phosphorylé par l'hexokinase chez la levure (Hxk2, Hxk1 et Glk1 le phosphorylent) (Cramer and Woodward, 1952; Lobo and Maitra, 1977; Soncini et al., 2020; Woodward and Hudson, 1955), dans le cerveau (Sols and Crane, 1954) et au niveau des muscles (Wick et al., 1957) en 2-Deoxy-6-Phosphate (2DG6P). Le 2DG6P s'accumule dans les cellules et ne participe pas par la suite à la glycolyse, contrairement au G6P (Novak et al., 1990). Le 2DG6P inhibe alors les protéines Hxk2 et Pgi1, de façon non-compétitive (Chen and Guéron, 1992) et compétitive (Wick et al., 1957) respectivement induisant une diminution du niveau d'ATP intracellulaire. En présence de 2DG, la phosphorylation des autres sucres est inhibée et il n'y a pas d'accumulation de G6P ou d'intermédiaires d'autres voies de signalisation alternatives à la glycolyse (Tower, 1958).

B.2 Les premières utilisations du 2DG chez les mammifères et chez *Saccharomyces cerevisiae*

De par sa ressemblance avec le glucose, le 2DG a été utilisé très tôt afin d'inhiber le métabolisme du glucose dans des cellules hypermétaboliques, comme les cellules cancéreuses. Ainsi, les premières études avec du 2DG datent des années 1950. En 1952, des chercheurs étudient son effet sur des cellules du cancer du sein de rat (Woodward and Cramer, 1952) et montrent que le 2DG inhibe le métabolisme anaérobie du glucose de près de 60%. Cela est confirmé lors d'une étude sur des tissus de rats sains et tumoraux durant laquelle, il est montré que le 2DG inhibe la glycolyse dans les deux types de tissus (Woodward and Hudson, 1954); le 2DG entre donc en compétition avec le glucose lorsqu'il est présent dans le milieu. Il est également montré que le 2DG inhibe la prolifération cellulaire de fibroblastes cardiaques de poulet (Ely et al., 1952) et des cellules de Krebs carcinomales (Ely, 1954). Ces différents résultats ont ensuite été confirmés dans des études postérieures. En 1955, Wick et al confirment que le 2DG bloque le métabolisme du glucose en agissant comme compétiteur, en inhibant le transfert et l'oxydation du glucose dans des tissus extra hépatiques (Wick et al., 1955). Enfin, Landau et Lubs, en étudiant des souris, des rats et des lapins, montrent que lorsqu'on traite ces animaux avec du 2DG, le taux de glucose dans le sang augmente; le 2DG serait donc bien en compétition avec le glucose au niveau du métabolisme glucidique (Landau and Lubs, 1958).

Les études chez *Saccharomyces cerevisiae* commencent également très tôt puisqu'au début des années 1950, Gladys E. Woodward et Francis B. Cramer étudient les

effets du 2DG sur la croissance, le métabolisme et la fermentation du glucose chez la levure (Cramer and Woodward, 1952; Woodward, 1952). Ils montrent alors que le 2DG inhibe la fermentation anaérobie du glucose chez les levures, qu'il est importé dans les cellules et que c'est également un substrat de l'hexokinase, comme le glucose. Le 2DG est donc en compétition avec le glucose pour son métabolisme chez *Saccharomyces cerevisiae*, comme cela a été montré pour les cellules mammifères. Par la suite, il est montré que, comme le glucose, le 2DG inhibe l'utilisation d'autres sources de carbones en inhibant la synthèse d'enzymes participant à la formation de carbohydrates à partir d'alcool (Witt et al., 1966). Il inhibe aussi, comme le glucose, l'activation de Snf1/AMPK qui, lorsqu'activée, induit l'activation des gènes réprimés par le glucose (Hedbacker and Carlson, 2006; Randez-Gil et al., 1995b).

Ensuite, le 2DG est utilisé dans différentes études chez *Saccharomyces cerevisiae* en association avec différentes sources de carbone et cela permet d'identifier différents acteurs de la répression induite par le glucose. En 1984, Entian et Fröhlich effectuent un crible en cultivant des levures en présence de raffinose et 2DG (Entian and Fröhlich, 1984). Cela confirme que l'hexokinase Hxk2 possède une activité catalytique en phosphorylant le glucose et que c'est également un acteur de la voie de répression induite par le glucose. Neigeborn et Carlson (Neigeborn and Carlson, 1987) identifient des mutants capables de pousser en présence de 2DG sur un milieu contenant du saccharose. Cela permet alors de confirmer le rôle d'Hxk2 comme acteur de la voie de répression induite par le glucose, et d'identifier Reg1 et Glc7 comme acteurs additionnels de cette voie. Le 2DG est donc un inhibiteur métabolique utilisé en recherche chez *Saccharomyces cerevisiae* depuis 70 ans, qui a permis de déchiffrer des voies de signalisation importantes et qui a différents effets sur les cellules.

B.3 Les différents effets du 2DG

En **Figure 1.5** est présenté un résumé des différents effets du 2DG en fonction de différents organismes modèles. Ici, nous nous concentrerons principalement sur les effets du 2DG chez *Saccharomyces cerevisiae*.

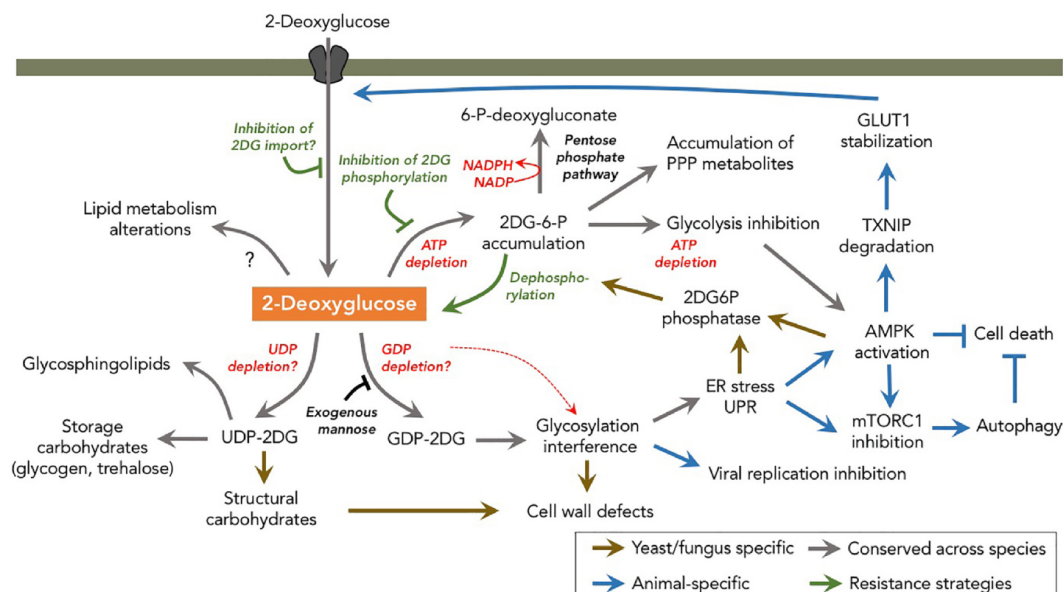


Figure 1.5 - Exemples des effets cellulaires et métaboliques du 2DG et les mécanismes de

B.3.1 Les effets du 2DG sur la glycolyse et le niveau d'ATP intracellulaire

Comme vu précédemment (chapitre B.1), lorsque le 2DG est importé dans les cellules, il est phosphorylé en 2DG6P et inhibe la glycolyse via l'inhibition des protéines Hxk2 et Pgi1. Cela a pour effet d'induire une diminution du niveau d'ATP intracellulaire. En effet, la phosphorylation du glucose en G6P ou celle du 2DG en 2DG6P requiert de l'ATP. Cependant, dans le cas du G6P, ce métabolite participe à la glycolyse et permet de régénérer de l'ATP. Au contraire, le 2DG6P ne participe pas à la glycolyse, l'investissement initial en ATP n'est donc jamais récupéré (**Figure 1.6**).

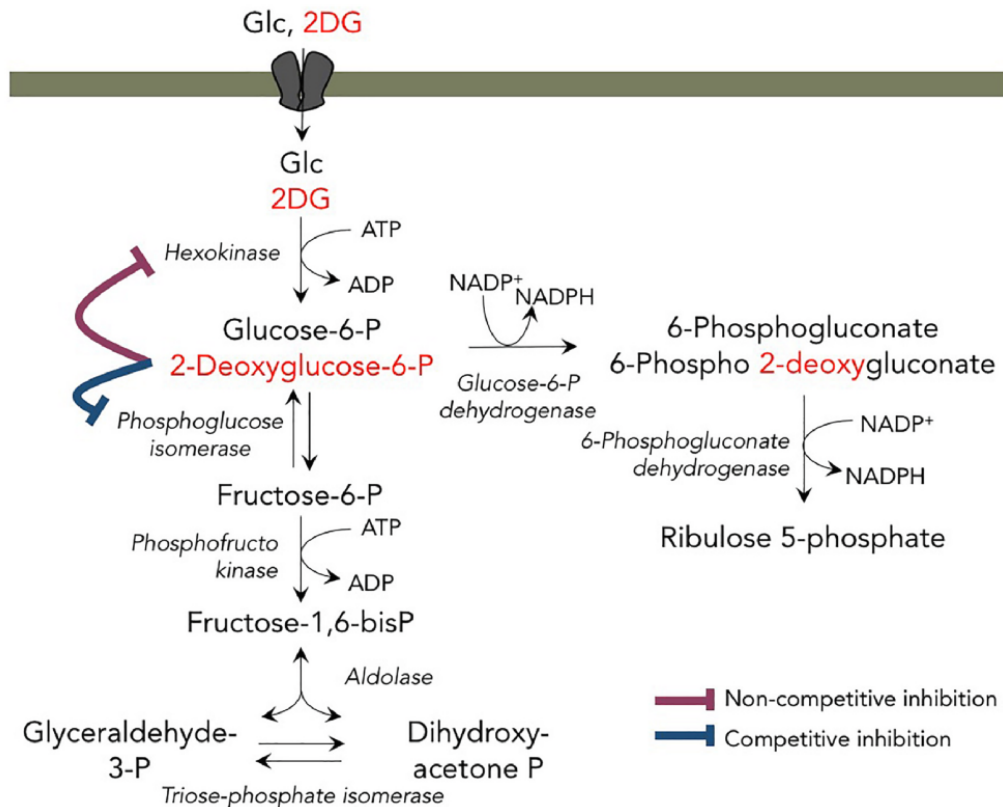


Figure 1.6 - Métabolisme du 2-deoxyglucose dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphates et ses effets inhibiteurs (Laussel and Léon, 2020)

B.3.2 L'activation transcriptionnelle de *DOG1* et *DOG2* par le 2DG

Dans les années 1990, un groupe de chercheurs a découvert les gènes *DOG1* et *DOG2* (Randez-Gil et al., 1995a; Sanz et al., 1994). Issus de la duplication du génome de *Saccharomyces cerevisiae* (Katju et al., 2009), ces gènes codent pour les protéines du même nom qui sont des phosphatases. Elles participent à la détoxification du 2DG des cellules en déphosphorylant le 2DG6P, limitant ainsi l'interférence de ce composé avec le métabolisme. Leur surexpression permet aux levures de résister au 2DG (Randez-Gil et al., 1995a). Ces protéines font partie d'une famille de protéines, les HaloAcid Dehalogenase (HAD), des protéines composant la plus grande famille de phosphatases connues à ce jour. Parmi les protéines HAD, il existe une protéine humaine, HDHD1 (Haloacid Dehalogenase-like Hydrolase Domain-containing protein 1), avec près de 40% d'homologie

avec Dog2, qui, lorsqu'elle est surexprimée, induit une résistance au 2DG des cellules cancéreuses HeLa (Defenouillère et al., 2019).

Les protéines Dog1 et Dog2 possèdent une forte affinité pour le 2DG avec des Km peu élevés (1,39mM pour Dog1 et 0,77mM pour Dog2), contrairement aux autres métabolites pour lesquels le Km est plus élevé (Kuznetsova et al., 2015). De plus, lorsqu'elles sont exprimées, le 2DG n'a plus d'effet sur le métabolisme et les gènes réprimés en réponse au glucose (Randez-Gil et al., 1995b).

En réponse à un traitement des cellules au 2DG, les protéines Dog1 et Dog2 sont induites via les voies de signalisation UPR et CWI (chapitres B.3.3 et B.3.4), permettant aux cellules de survivre en présence de la drogue à des concentrations modérées (Defenouillère et al., 2019) (**Figure 1.7**).

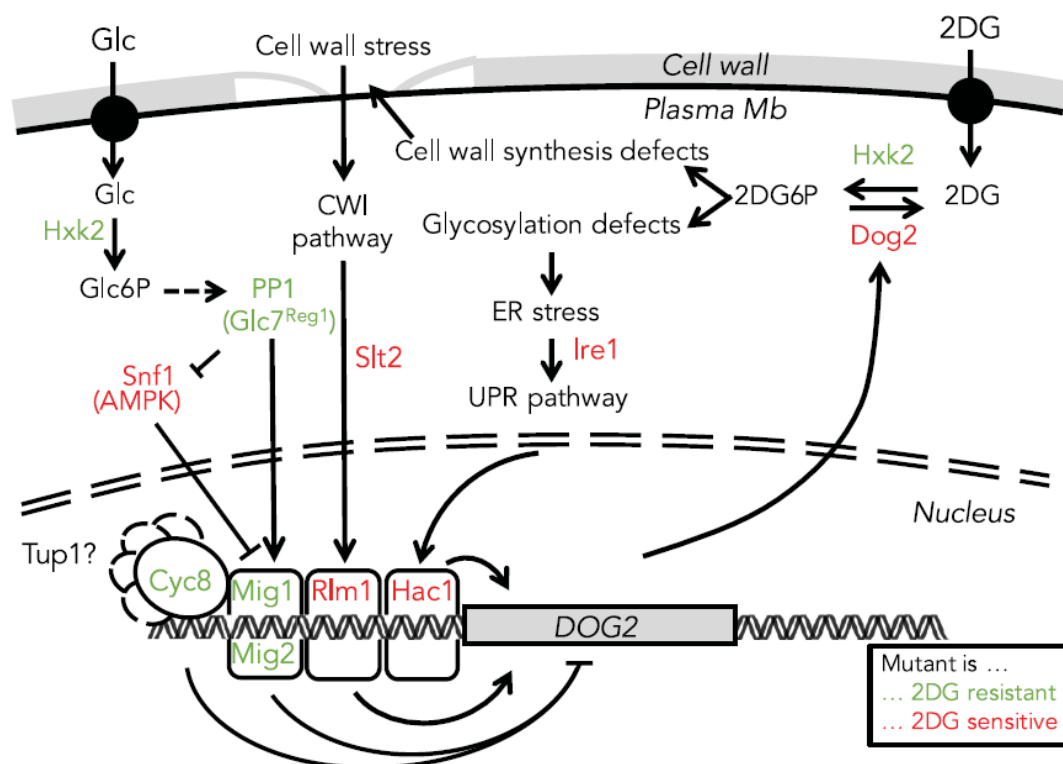


Figure 1.7 - Différents effets du 2-deoxyglucose sur chez *Saccharomyces cerevisiae*. (Defenouillère et al., 2019)

Le 2DG induit un stress du RE, déclenche la voie de l'UPR, induisant l'activation d'Hac1 et l'activation transcriptionnelle de *DOG2*. Le 2DG induit aussi l'activation de la CWI qui permet aussi la transcription de *DOG2* via l'activation de Rlm1.

B.3.3 L'effet du 2DG sur la N-glycosylation des protéines

En plus d'être un analogue du glucose, le 2DG est également un analogue du mannose (**Figure 1.1**). Ce sucre est un composant important des arbres de N-glycosylation des protéines. Il est incorporé dans les arbres de glycosylation sous forme de GDP-mannose (**Figure 1.8**). Cependant, lors d'un traitement des cellules au 2DG, le 2DG est également transformé en GDP-2DG et il existe une compétition entre les 2 types de GDP pour la liaison aux protéines, entraînant la synthèse de protéines partiellement ou pas glycosylées. Ce phénomène a été observé en premier dans les glycoprotéines virales (Courtney et al., 1973; Kaluza et al., 1973; Nakamura and Compans, 1978; Stohrer and Hunter, 1979). L'ajout de mannose extérieur permet un retour à la normale de l'état de

N-glycosylation des protéines par compétition avec le 2DG (Kaluza et al., 1973). Ce défaut de N-glycosylation des protéines lors d'un traitement des cellules au 2DG induit un stress du réticulum endoplasmique (ER) et déclenche alors la voie de signalisation de l'UPR (Unfolded Protein Response) dans des cellules cancéreuses (Kurtoglu et al., 2007) ainsi que chez la levure (Defenouillère et al., 2019). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, lors d'un traitement au 2DG activant l'UPR, le facteur de transcription Hac1 est activé et participe à l'activation de la transcription de *DOG2* (Figure 1.7).

Enfin, il a été montré que l'induction d'un stress du RE et l'activation de l'UPR active l'autophagie dans trois lignées de cellules cancéreuses différentes (Xi et al., 2011).

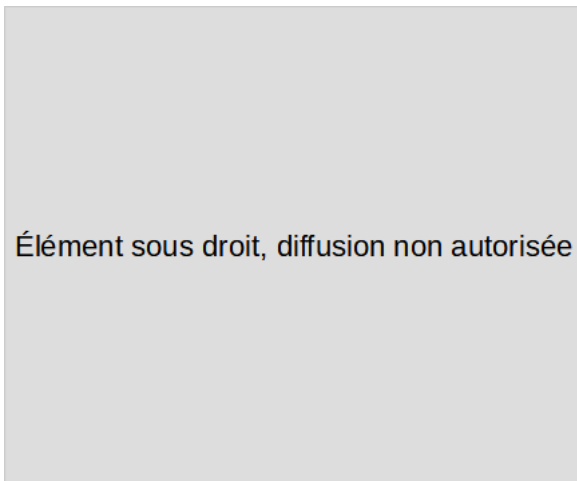


Figure 1.8 - Arbre de glycosylation des protéines chez *Saccharomyces cerevisiae*. D'après (Guo et al., 2014)
GlcNac : N-acétylglucosamine; Man : Mannose; Glu : Glucose.

B.3.4 L'effet du 2DG sur la voie de signalisation de l'intégrité de la paroi cellulaire

La majorité des champignons et toutes les espèces de levures possèdent, en plus de la membrane plasmique, une paroi cellulaire (Xie and Lipke, 2010), protégeant les cellules des agressions extérieures possibles. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la paroi cellulaire est composée en majorité de β 1,3-glucans (50% de la masse de la paroi), de β 1,6-glucans (10% de la masse) et de mannoprotéines (40% de la masse), fortement glycosylées (Lipke and Ovalle, 1998). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, la paroi cellulaire est également constituée de β -glucans et mannoprotéines et les β -glucans sont impliqués dans le processus de fission de ces levures (Horisberger and Rouvet-Vauthey, 1985). En présence de 2DG, on observe chez *S. pombe* une paroi cellulaire plus fragile (Megnet, 1965). Le 2DG peut également entraîner une lyse des cellules au niveau du site de fission, lieu de synthèse des β -glucans (Megnet, 1965). De même, chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia farinosa*, on observe une lyse de la paroi cellulaire au niveau des régions de synthèses des β -glucans lors d'un traitement des cellules au 2DG (Johnson, 1968). Chez la levure *Candida albicans*, en testant l'incorporation de 2DG radioactif dans les parois cellulaires, il a été montré que le 2DG est incorporé dans les β -glucans avec une fraction radioactif de près de 50% dans les β -glucans (Notario et al., 1982). Cette incorporation du 2DG dans les 1,3- β -glucans altère leur stabilité (Gale et al., 1984) et déstabilise la paroi cellulaire. De par son effet sur la glycosylation des protéines (chapitre B.3.3), le 2DG induit un défaut de synthèse des mannoprotéines (Krátký et al., 1975), protéines fortement glycosylées, induisant une lyse de la paroi cellulaire.

Lors d'un traitement des cellules au 2DG, on observe l'activation de la voie de signalisation CWI (Cell Wall Integrity), une voie de signalisation de réponse au stress de paroi (Defenouillère et al., 2019). Cette activation permet aux cellules de résister au 2DG via l'activation d'un facteur de transcription, Rlm1, qui participe à l'activation de la transcription de *DOG2* (Figure 1.7).

B.3.5 L'effet du 2DG sur les protéines Snf1/AMPK et Reg1/PP1 : voie de signalisation et répression induite par le glucose

Comme vu précédemment, le 2DG a été utilisé dans différents cribles en présence de source de carbone afin d'identifier les acteurs de la voie de répression induite par le glucose (Neigeborn and Carlson, 1987; Zimmermann and Scheel, 1977). Cela a ainsi permis d'identifier le complexe Reg1/Glc7 comme ayant un rôle dans cette répression. Le mutant de délétion de *REG1*, la sous-unité régulatrice de ce complexe, a été identifié et confirmé comme résistant au 2DG (McCartney et al., 2014; Ralser et al., 2008).

De plus, lorsque le 2DG est ajouté à des levures cultivées dans un milieu contenant peu de glucose, il inhibe rapidement l'activité de Snf1/AMPK (Hedbacker and Carlson, 2006). Des données plus récentes montrent que l'ajout de 2DG à des levures cultivées dans un milieu contenant du glucose induit l'activation de Snf1/AMPK après plusieurs heures (O'Donnell et al., 2015).

B.4 Le 2DG dans les cellules cancéreuses

Comme vu précédemment, le 2DG a différents effets sur dans les cellules cancéreuses. Il inhibe la glycolyse, active l'UPR en induisant un défaut de N-glycosylation des protéines au niveau du RE et en déclenchant ainsi l'autophagie. De part sa forte ressemblance avec le glucose et ses effets dans les cellules, le 2DG peut-être utilisé dans des traitements anticancéreux. De plus, il existe également des dérivés du 2DG qui sont utilisés aujourd'hui, pour de la radiothérapie par exemple.

B.4.1 L'utilisation du 2DG dans le cadre de traitements anticancéreux et essais cliniques

Comme vu précédemment, les cellules cancéreuses ont un métabolisme glycolytique particulier, différent de celui de cellules saines. En effet, elles présentent une glycolyse plus importante avec une augmentation de la consommation de glucose et une répression du métabolisme oxydatif. Ainsi, un des moyens d'affaiblir les cellules cancéreuses est d'inhiber la glycolyse dans ces cellules. Le 2DG, de part sa ressemblance avec le glucose pour les cellules, est un inhibiteur métabolique intéressant pour cela.

Le premier essai clinique réalisé avec du 2DG sur des patients atteints de cancers date de 1958 (Landau et al., 1958). Dans cet essai, des patients avec différents types de cancers ont été traités au 2DG une fois et différents effets secondaires, comme de l'hypoglycémie, ont été observés; effets secondaires qui disparaissaient 30 minutes après le traitement. Par la suite, un autre essai clinique de phase I a été réalisé avec du 2DG uniquement sur des patients atteints de cancer de la prostate, permettant de déterminer la dose de 2DG la mieux supportée par les patients (45mg/kg) ainsi que de montrer, qu'en réponse au 2DG, on observe, chez ces patients, une diminution de l'autophagie, un mécanisme de survie cellulaire des cellules cancéreuses (Stein et al., 2010).

Le 2DG seul ne permettant pas d'induire la mort des cellules cancéreuses et maximisant les effets d'autres drogues sur les cellules cancéreuses (Maschek et al., 2004),

beaucoup d'études ont utilisé cet inhibiteur en association avec d'autres drogues afin de d'améliorer les effets des deux drogues sur les inhibiteurs métaboliques. Par exemple, un essai clinique de phase I en 2013 a utilisé le 2DG en association avec le docetaxel, un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules (Raez et al., 2013). Cet essai, réalisé chez des patients avec des tumeurs solides, a permis de montrer que la dose maximale par jour par patient est de 63 mg/kg, ce qui entraîne le moins d'effets secondaires indésirables possibles, sans accumulation du 2DG chez les patients ni interactions médicamenteuses entre les deux drogues. Ainsi, plusieurs essais *in vivo* et *in vitro* ont été réalisés sur des cellules cancéreuses avec le 2DG en association avec d'autres drogues. Ces différents essais sont résumés dans la **Tableau 1.1**. Ce n'est pas exhaustif de tout ce qui peut exister dans la littérature mais permet de donner une idée des différentes drogues testées en association avec le 2DG et des différents effets que cela a sur les cellules cancéreuses.

Tableau 1.1 - Essais cliniques réalisés et résultats obtenus sur des cellules cancéreuses avec du 2-deoxyglucose en association avec d'autres drogues (VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)

Drogue combinée avec le 2DG et sa fonction	Conditions de l'étude	Résultats obtenus	Référence
Docetaxel (inhibe la dépolymérisation des microtubules - utilisé en chimiothérapie)	Essai clinique sur des patients avec des tumeurs solides	63 mg/kg/jour maximum par patient	(Raez et al., 2013)
Adriamycin (agent intercalant de l'ADN - utilisé en chimiothérapie)	Xenograft d'ostéo carcinome	Diminution significative de la croissance des tumeurs lors de la combinaison des 2 drogues (en comparaison avec les drogues seules)	(Maschek et al., 2004)
Paclitaxel (inhibe la dépolymérisation des microtubules - utilisé en chimiothérapie)	Xenograft de cellules pulmonaires cancéreuses	Diminution significative de la croissance des tumeurs lors de la combinaison des 2 drogues (en comparaison avec les drogues seules)	(Maschek et al., 2004)
Oxamate (inhibiteur de la lactate déshydrogénase)	Cellules d'ostéo carcinome - <i>in vitro</i>	En hypoxie, les cellules sont hypersensibles aux drogues	(Liu et al., 2002)
Metformin (anti hyperglycémiant - agoniste de l'AMPK)	Cellules cancéreuses gastriques et de l'oesophage - <i>in vitro</i>	Mort cellulaire significative et diminution de l'ATP cellulaire	(Cheong et al., 2011)
Metformin (anti hyperglycémiant - agoniste de l'AMPK)	Xenograft de cellules cancéreuses du sein	Diminution de la croissance tumorale,	(Cheong et al., 2011)
AICAR (agoniste de l'AMPK)	Cellules cancéreuses gastriques et de l'oesophage	Pas d'effet significatif de l'association des deux drogues	(Cheong et al., 2011)
Metformin (anti hyperglycémiant - agoniste de l'AMPK)	Cellules endothéliales microvasculaires de souris - <i>in vitro</i>	Diminution du niveau de VEGFR2 phosphorylé; inhibition de la voie Akt/mTOR; diminution de la prolifération et migration cellulaire	(Mathews Samuel et al., 2019)

Etoposide (inhibiteur de la topoisomérase I - utilisé en chimiothérapie)	Cellules primaires du système lymphatiques - ex vivo	Activation efficace des cellules-T spécifiques des tumeurs et augmentation de la mort cellulaire	(Bénéteau et al., 2012)
ABT-263 et ABT-737 (antagoniste de Bcl2)	Xenograft de cellules cancéreuses de la prostate résistantes à ABT	Le pré-traitement des cellules au 2DG permet à ABT d'induire l'apoptose	(Yamaguchi et al., 2011)
Carboplatine (inhibiteur de la réplication de l'ADN - utilisé en chimiothérapie)	Cellules tumorales de rétines de souris vasculaires et hypoxiques - in vivo	Diminution de la charge tumorale en présence des deux drogues; réduction de la population de cellules hypoxiques en présence de 2DG	(Boutrid et al., 2008)

On remarque qu'en condition d'hypoxie (manque d'apport en oxygène au niveau des tissus), les cellules cancéreuses sont sensibles à un traitement au 2DG en association ou non avec d'autres drogues. Cela s'explique par le fait que le seul moyen de pouvoir tuer des cellules cancéreuses est de couper tout apport en oxygène et en source de carbone en même temps (arrêt de la fermentation et de la respiration) de par l'effet Warburg (Warburg et al., 1927)

B.4.2 L'utilisation du 2DG dans le cadre de radiothérapies et de PET scan

Les cellules cancéreuses ayant une forte consommation de glucose en importent automatiquement plus (voir l'effet Warburg). Partant de ce postulat, il a été développé en 1977, un dérivé du 2DG, le ¹⁸-Fluoro-2-Deoxyglucose (¹⁸FDG) (Sokoloff et al., 1977). Cet analogue s'accumule dans les cellules hypermétaboliques, dont les cellules cancéreuses. Il peut être suivi par PET-Scan (technique d'imagerie - tomographie à émission de positons) et permet de détecter des cellules cancéreuses ainsi que suivre l'évolution de tumeurs (Voir la revue : Phelps, 2000).

La revue (Laussel and Léon, 2020), à laquelle j'ai participé, détaille avec précision les différents effets du 2DG chez *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que chez l'humain. De plus, l'utilisation du 2DG dans le contexte du traitement du cancer ainsi que les stratégies de résistance des levures et cellules humaines sont précisées dans cette revue.

C - L'endocytose chez *Saccharomyces cerevisiae*

C.1 Les différents acteurs de l'internalisation

C.1.1 L'internalisation médiée par la clathrine

L'endocytose médiée par la clathrine (CME) est le type majeur d'endocytose chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cette endocytose se déroule en 2 phases : la phase précoce et la phase tardive (Revue : Lu et al., 2016; Weinberg and Drubin, 2012) (**Figure 1.9**).

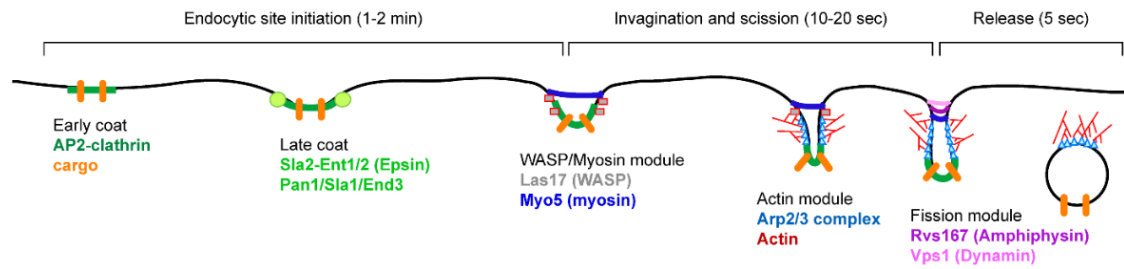


Figure 1.9 - Le processus d'internalisation de l'endocytose. (Feyder et al., 2015)

Les sites d'endocytose sont d'abord initiés par le recrutement de la clathrine via le complexe adaptateur AP-2 (early coat) pour regrouper les protéines cargo vers les sites d'invagination endocytique de la membrane plasmique (MP). L'initiation est terminée par le recrutement des protéines Sla2 contenant le domaine ANTH- (AP180 N-terminal homology) et ENTH- (epsin N-terminal homology) et des epsines Ent1 et Ent2 pour former le manteau tardif. L'invagination commence par le recrutement du module WASP/Myosine pour initier la polymérisation des ramifications d'actine par le module actine (complexe Arp2/3 et actine). La myosine comprime la MP pendant que le module d'actine étend l'invagination. Une fois que l'invagination est suffisamment longue, le module de fission commence à pincer les vésicules qui sont libérées dans le cytoplasme.

Une des premières protéines à arriver au niveau de la membrane plasmique au lieu d'endocytose (patch d'endocytose) est Ede1, une protéine qui possède un motif d'interaction à l'ubiquitine (UIM). Ce recrutement de protéines est suivi par l'accumulation des protéines à endocyter au niveau de ces patches ainsi que d'autres protéines de la phase précoce d'endocytose telles que le complexe AP2 (adaptateur de la clathrine). La deuxième étape de la CME est la maturation du manteau d'endocytose avec le recrutement des protéines du manteau tardif telles qu'Ent1/2 qui possèdent également des UIM. Par la suite, les protéines du complexe WASP/Myo sont recrutées et l'actine s'assemble en polymères au niveau du patch d'endocytose. Combiné avec l'action des amphiphysines Rvs161 et Rvs167, cela permet la formation et l'invagination des vésicules d'endocytose. La dernière étape de cette endocytose est la scission de la vésicule de la membrane plasmique.

Suite à leur invagination, les vésicules d'endocytose sont soit dégradées dans la vacuole en passant par les MVB ou peuvent également être recyclées à la membrane en passant par l'appareil de Golgi. Les différentes voies que peuvent emprunter ses vésicules sont décrites en **Figure 1.10**. Les protéines sont synthétisées au niveau de RE et transportées au Golgi. Les protéines peuvent alors être triées dans les vésicules de sécrétion (SEC) pour les protéines de la MP et extracellulaires. Elles peuvent aussi être triées dans les vésicules de tri des protéines vacuolaires (VPS) pour les protéines de la vacuole. Les protéines et composants du milieu extracellulaire internalisées à partir de la MP le sont via la voie endocytique (END). Au niveau des endosomes précoces (EE), les protéines sont triées entre celles qui sont destinées à être dégradées dans la vacuole, après maturation de l'EE en endosome tardif ou corps multivésiculaire (MVB), et celles qui suivent la voie du recyclage (RCY) pour éviter la dégradation en étant dirigées vers le Golgi (Feyder et al., 2015)

donne lieu à la création d'une chaîne K48 qui est un signal de dégradation de la protéine cible par le protéasome. Une chaîne de molécules d'ubiquitine reliées par leur lysine 63 (chaîne K63) est le signal typique d'endocytose des protéines membranaires chez *Saccharomyces cerevisiae* (Akutsu et al., 2016).

Ainsi, pour l'endocytose des protéines membranaires chez la levure, l'ubiquitine est fixée sur les cargos à endocyter et forme des chaînes de type K63. Cette ubiquitylation se fait via l'E3 ubiquitine ligase Rsp5 (chapitre C.1.4). L'ubiquitylation des protéines membranaires régule également leur localisation à plusieurs endroits dans la cellule.

C.1.3.1 Rôle de l'ubiquitine au niveau de la membrane plasmique

Au niveau de la membrane plasmique, l'ubiquitine agit comme un signal d'endocytose du transporteur ubiquitylé. Les premières études sur le rôle de l'ubiquitine dans l'endocytose montre que lors de l'inhibition de l'internalisation du transporteur Ste6, ce dernier s'accumule au niveau de la membrane plasmique en étant ubiquitylé (Kölling and Hollenberg, 1994). De plus, pour les protéines membranaires Ste2, Fur4 et Gap1, l'inhibition de la machinerie d'ubiquitylation des protéines entraîne l'inhibition de l'endocytose de ces transporteurs (C. Hein et al., 1995; Hicke and Riezman, 1996). Ainsi, le transporteur d'uracile Fur4 (Galan et al., 1996), la perméase Gap1 (Springael et al., 1999) ou encore le transporteur de zinc Zrt1 (Gitan and Eide, 2000) sont endocytés après avoir été ubiquitylés par Rsp5, une E3 ubiquitine ligase.

C.1.3.2 Rôle de l'ubiquitine au niveau du trafic endosomal

Suite à leur endocytose, les transporteurs ubiquitylés sont internalisés dans des endosomes puis dans les corps multivésiculaires (MVBs : multivesicular bodies). Les chaînes K63 attachées aux protéines membranaires sont essentielles pour le tri de ces protéines lors de leur endocytose. En effet, dans des cellules mutantes incapables de former des chaînes K63 (Ub^{K63R}), l'endocytose de la perméase d'acides aminés Gap1 s'arrête avant son entrée dans les MVBs et ne rentre jamais dans la vacuole (Lauwers et al., 2009). De plus, l'ubiquitylation des transporteurs est nécessaire pour qu'ils soient correctement envoyés dans les vésicules internes du lumen pour ensuite être dégradés, sans quoi, ces transporteurs s'accumulent au niveau de la membrane de la vacuole (Reggiori and Pelham, 2001). En réponse au glucose, l'endocytose du transporteur de lactate Jen1 est dépendante des chaînes d'ubiquitylation K63 qui jouent également un rôle dans le tri du transporteur dans les MVBs (Paiva et al., 2009). Pour une revue complète sur les différents rôles des chaînes K63 d'ubiquitine chez différents organismes vivants, voir : (Erpapazoglou et al., 2014).

C.1.4 Rsp5, une E3 ubiquitine ligase indispensable pour l'endocytose

La protéine Rsp5 est une E3 ubiquitine ligase de la famille de NEDD4, un de ces orthologue chez l'humain. Elle est essentielle pour la viabilité des levures et est une des principales E3 ubiquitine ligase impliquée dans l'endocytose chez *Saccharomyces cerevisiae* (Galan et al., 1996; C. Hein et al., 1995; Wang et al., 1999).

Un des rôles de Rsp5 est donc sa participation à la régulation de l'endocytose. En effet, via ses domaines WW, elle se fixe aux protéines ART (arrestines - chapitre C.4), des adaptateurs de l'endocytose, via leur domaine PPxY (Lin et al., 2008; Yashiroda et al., 1996). Rsp5 peut alors ubiquityler les arrestines (Becuwe et al., 2012b; O'Donnell et al., 2015), ce qui peut induire leur activation. Les arrestines permettent le rapprochement de

Rsp5 avec les transporteurs membranaires. Rsp5 ubiquityle alors les transporteurs; par exemple, la perméase Dip5 et le transporteur d'arsenite Acr3 (Hatakeyama et al., 2010; Wawrzycka et al., 2019). Cette ubiquitylation est un signal qui induit l'endocytose de ces protéines membranaires. Il a également été montré que Rsp5 joue un rôle dans l'ubiquitylation et le tri de la carboxypeptidase S, un cargo des MVBs (Katzmann et al., 2004). En effet, dans un mutant thermosensible de *RSP5*, on observe des défauts d'ubiquitylation de tri de ce cargo.

En plus de ces différents rôles dans la voie d'endocytose des protéines membranaires, Rsp5 a d'autres fonctions comme la régulation de l'ARN polymérase II, la régulation de la synthèse d'acides gras non saturés ou encore la régulation de la voie du mévalonate (Voir la revue : Kaliszewski and Zoładek, 2008).

En parallèle des ubiquitine ligases, il existe également des déubiquitinases (DUBs) qui clivent les fusions entre les protéines et les ubiquitines, induisant alors une déubiquitylation des protéines. Cette déubiquitylation participe à la régulation des protéines ainsi que d'autres phénomènes. Par exemple, la CME est régulée par l'ubiquitination et la déubiquitylation dynamiques des protéines présentes à la membrane plasmique au niveau de la machinerie d'endocytose (Weinberg and Drubin, 2014). De plus, lors de l'endocytose du transporteur de lactate Jen1, ce dernier est déubiquitylé avant son entrée dans les MVBs (Becuwe and Léon, 2014).

C.2 Les protéines et les domaines présents au niveau de la membrane plasmique

C.2.1 Les compartiments de la membrane plasmique et sous-domaines membranaires

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la membrane plasmique est divisée en sous-domaines et compartiments membranaires très spécifiques (Revue : Athanasopoulos et al., 2019) (**Figure 1.11**). Parmi les différents compartiments membranaires identifiés, on retrouve : les MCCs (Membrane Compartment of Can1), des sous-domaines identifiés initialement comme contenant le transporteur d'arginine Can1 (Malinska et al., 2004). Ces MCCs sont associés aux eisosomes, des domaines sous-corticaux. Identifiés, en premier lieu, comme des sites statiques d'endocytose (Walther et al., 2006), il s'agit de domaines membranaires au niveau desquels il n'y a jamais d'endocytose. Ils correspondent à des invaginations de la MP distribuées de manière aléatoire, ressemblant à des sillons. Les MCCs chevauchent les sites d'endocytose mais ne sont pas présents au niveau des bourgeons des cellules. Au niveau de la membrane plasmique, on retrouve également les MCPs (Membrane Compartment of Pma1), des compartiments composés de Pma1, une ATPase H⁺ et également composés de sphingolipides (Malínská et al., 2003). Ces domaines recouvrent une partie importante de la MP. On y retrouve aussi les MCTs (Membrane Compartment of Tor2) qui contiennent Tor2, une protéine du complexe TORC2 et qui jouent un rôle dans la signalisation de ce complexe (Berchtold and Walther, 2009). Les MCLs (Membrane Compartment of Lam4) sont situés au niveau des sites de contact entre la membrane plasmique et le RE et jouent un rôle dans le transport de stérols (Gatta et al., 2015). Les MCWs (Membrane Compartment of Wsc1) qui contiennent Wsc1, un senseur de stress jouent un rôle dans le sensing de stress de la paroi cellulaire (Kock et al., 2016). Enfin, on retrouve les sites d'endocytose composés de plusieurs dizaines de protéines de la voie d'endocytose.

Ces domaines sont les principaux que l'on retrouve au niveau de la membrane plasmique mais on peut également y retrouver d'autres sous-domaines. (Pour une description détaillée de tous ces domaines, voir la revue : Athanasopoulos et al., 2019).

La présence de ces différents sous-domaines et compartiments permet à la membrane plasmique de réguler un nombre important de processus physiologiques en fonction de l'espace et du temps. Les différents domaines membranaires sont liés et il existe une dynamique active des transporteurs et domaines membranaires. Par exemple, le transporteur Can1 est situé au niveau des MCCs/eisosomes lors d'une carence en arginine. Lorsque de l'arginine se trouve en concentration importante dans le milieu extracellulaire, on observe une translocation de Can1 des MCCs/eisosomes vers l'extérieur de ce sous-domaine membranaire et le transporteur peut alors être endocyté (Gournas et al., 2018).

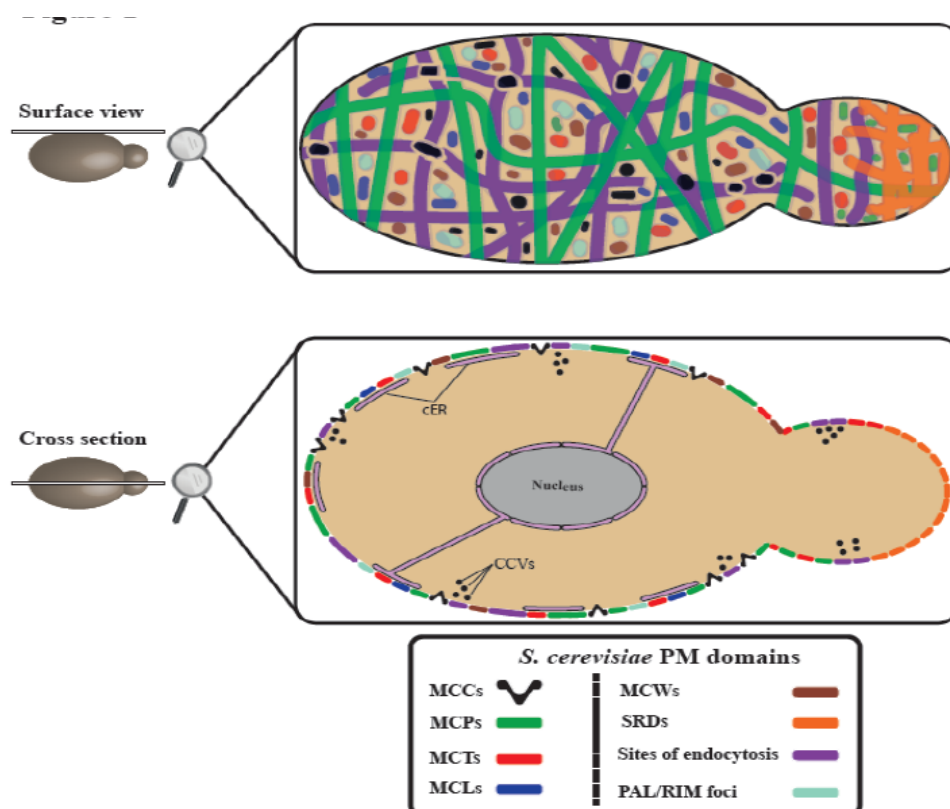


Figure 1.11 - Représentation schématique des domaines connus de la membrane plasmique (MP) dans des sections de surface et transversales de *Saccharomyces cerevisiae*. (Athanasopoulos et al., 2019)

La représentation est simplifiée et surtout qualitative, car les données quantitatives sur l'abondance relative des domaines de la membrane sont encore rares. (Voir le texte)

C.2.2 Les protéines et transporteurs membranaires

Au niveau de la membrane plasmique, on retrouve un nombre important de protéines et transporteurs membranaires. En 2010, près de 200 protéines sont considérées comme des transporteurs membranaires (Brohée et al., 2010). Il existe un certain nombre de différents types de transporteurs et protéines membranaires avec différentes fonctions. Selon cet article de 1998 (Paulsen et al., 1998), les transporteurs peuvent être classés selon ces différentes catégories :

- Les transporteurs de types canaux dans lesquels on retrouve les protéines protéines intrinsèques majeures (MIP : Major Intrinsic Protein);
- Les transporteurs de type “carrier” dans lesquels on retrouve les transporteurs de sucre, décrit précédemment;
- Les transporteurs actifs avec des liaisons pyrophosphates dirigés par l’hydrolyse dans lesquels on retrouve les transporteurs de type ABC qui représentent la famille de transporteurs la plus importante chez *Saccharomyces cerevisiae*;
- Les transporteurs actifs dirigés par l’oxydoréduction;
- Les autres transporteurs avec des modes de transport ou des mécanismes de couplage énergétique inconnus;
- Enfin, des transporteurs putatifs, considérés comme tels en fonction de leur séquence.

On s’est concentré ici sur les différents transporteurs présents à la membrane plasmique chez *Saccharomyces cerevisiae*, mais il existe également un nombre important de transporteurs présents à la membrane des différents organites des cellules. Par exemple, on retrouve les perméases Vba1, Vba2 et Vba3, au niveau de la membrane de la vacuole qui jouent un rôle dans le transporteur d’acides aminés basiques dans les cellules (dos Santos et al., 2014).

C.3 Les différents signaux pouvant induire l’endocytose

Parmi les différentes protéines présentes à la membrane plasmique, on retrouve de nombreux transporteurs qui, en réponse à des signaux extracellulaires, peuvent être synthétisés ou endocytés. Nous allons décrire les différents signaux pouvant induire l’endocytose de transporteurs et protéines membranaires (Revue : Haguenaer-Tsapis and André, 2004).

C.3.1 Changement d’un paramètre du milieu extracellulaire

C.3.1.1 Changement dans la concentration d’acides aminés

Parmi les transporteurs membranaires, on retrouve des perméases d’acides aminés (aa), qui facilitent la diffusion d’aa du milieu extracellulaire dans le cytoplasme. Elles sont régulées, notamment par la concentration d’aa ou d’azote présents dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la perméase générale Gap1, est endocytée lors de la présence d’une forte concentration d’azote dans le milieu (Springael and André, 1998) ou lorsque la concentration en glutamine, est importante (Stanbrough and Magasanik, 1995). Elle est également endocytée en réponse à l’ajout d’arginine dans un milieu contenant déjà de la proline (Nishimura et al., 2020).

C.3.1.2 Changement dans l’homéostasie des métaux

D’autres signaux peuvent aussi induire l’endocytose de protéines présentes à la membrane. Ainsi, le transporteur de zinc, Zrt1, est internalisé via l’endocytose suite à l’exposition des cellules à une forte concentration extracellulaire de zinc (Gitan et al., 1998). On retrouve le même phénotype pour le transporteur de magnésium, Alr1, qui est endocyté en réponse à de fortes concentrations extracellulaires en magnésium (Graschopf et al., 2001).

C.3.1.3 Changement de concentration de base nucléique

La protéine membranaire Fur4 est la perméase d'uracile décrite chez *Saccharomyces cerevisiae*. Elle permet de faire rentrer cette base nucléique dans les cellules. Il a été montré que la disponibilité d'uracile dans le milieu extracellulaire a un effet négatif sur le niveau de Fur4 présent dans les cellules. En effet, l'uracile induit d'une part une diminution du niveau d'ARNm de *FUR4* mais également une endocytose des protéines présentes à la membrane (Séron et al., 1999).

C.3.1.4 Changement métabolique

Saccharomyces cerevisiae possède de fortes capacités d'adaptation au milieu dans lequel les cellules se trouvent et à la présence des différentes sources de carbone présentes dans ce milieu. Ainsi, lors d'un changement de source de carbone dans le milieu extracellulaire, on observe l'endocytose d'un certain nombre de transporteurs. Lorsque des cellules sont cultivées dans un milieu contenant du galactose, le transporteur Gal2 est exprimé à la membrane. Il est internalisé via l'endocytose lorsque du glucose est ajouté dans le milieu extracellulaire (Horak and Wolf, 1997). De même pour les transporteurs de maltose, Mal61, et de lactate, Jen1 qui sont endocytés lors de l'ajout de glucose dans le milieu extracellulaire (Lucero and Lagunas, 1997; Paiva et al., 2002). Il existe également un phénomène d'endocytose pour les différents transporteurs de glucose qui ont différentes affinités pour cette source de carbone. Ainsi, les transporteurs à forte affinité, Hxt6 et Hxt7, exprimés lorsqu'il y a peu de glucose dans le milieu extracellulaire, sont endocytés en réponse à une forte augmentation de la concentration de glucose (Krampe and Boles, 2002). Au contraire, en réponse à une carence en glucose, le transporteur à faible affinité Hxt1 est endocyté dans les cellules (Roy et al., 2014).

C.3.2 Les phéromones

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il existe deux types sexuels de cellules haploïdes, les cellules Mata et les celles Mat α . Lors qu'une molécule de facteur α (phéromone) se fixe sur un récepteur membranaire à phéromones d'une cellule de type Mata, cela induit un arrêt du cycle cellulaire, une fusion et la formation de cellules diploïdes. Cependant, un contact prolongé entre le facteur α - et le récepteur membranaire des cellules type Mata, Ste2, peut entraîner la mort des cellules. Ainsi, il a été montré, que l' α -facteur induit l'endocytose de Ste2 dans les cellules de type Mata (Alvaro et al., 2014; Hicke and Riezman, 1996). De même, le récepteur à phéromone des cellules de type Mat α , Ste3, est endocyté lors de la fixation de l' α -facteur (Davis et al., 1993).

C.3.3 Ajout d'une drogue synthétique dans le milieu extracellulaire

Les différents signaux décrits précédemment induisant l'endocytose peuvent être retrouvés dans la nature. Cependant, il a été montré que l'ajout de drogues synthétiques dans le milieu de culture des levures peut également induire l'endocytose de certains transporteurs membranaires. Ainsi, l'ajout de cycloheximide (CHX), un antifongique bloquant la synthèse de nouvelles protéines, induit aussi l'endocytose de protéines membranaires telles que le transporteur de lactate Jen1 (Becuwe et al., 2012b), la perméase Lyp1 (Lin et al., 2008), la perméase Tat2, le transporteur de glucose Hxt6 (Nikko and Pelham, 2009) ou encore la perméase d'uracile Fur4 (Volland et al., 1994). Il a également été montré que le FTY720 ou fingolimod, un analogue des sphingosines, utilisé dans le traitement des scléroses en plaque, induit l'endocytose de plusieurs perméases (Gap1, Can1, Lyp1 et Fur4)

quand rajouté dans le milieu de croissance des levures via l'inhibition de TORC1 (Barthelemy et al., 2017).

Enfin, concernant le 2-deoxyglucose (2DG), en 2015, O'Donnell et al. (O'Donnell et al., 2015) ont montré qu'un traitement des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* au 2DG induit l'endocytose des deux transporteurs de glucose à faible affinité, Hxt1 et Hxt3. Cette endocytose est dépendante des arrestines Rod1 et Rog3 (chapitre C.4) ainsi que le protéine Snf1. Le 2DG est donc un des signaux extérieurs synthétiques existant pouvant entraîner une endocytose de protéines membranaires.

Tous ces exemples donnés montrent à quel point la levure *Saccharomyces cerevisiae* peut adapter son protéome membranaire à l'environnement extérieur afin d'optimiser l'utilisation des ressources du milieu. Pour ce faire, les levures utilisent des protéines fonctionnant à l'interface entre signalisation et trafic membranaire, appelées arrestines, que nous allons maintenant introduire.

C.4 Les arrestines : protéines régulatrices de la signalisation

C.4.1 Présentation des arrestines chez *Saccharomyces cerevisiae*

Il existe plusieurs types d'arrestines, telles que les β -arrestines et α -arrestines. Les β -arrestines sont les premières arrestines identifiées comme régulatrices du RCPG β 2-adrénérique, elles régulent l'endocytose de nombreux RCPG. Se relocalisant au niveau de la membrane plasmique lors de la stimulation du RCPG cible, elles jouent le rôle d'adaptateur entre le récepteur cible et la machinerie d'endocytose. Elles sont régulées par ubiquitination et leur rôle d'adaptateur permet également le recrutement d'ubiquitine ligase qui participent à la régulation des transporteurs membranaires (Revue : Becuwe et al., 2012a). Elles contiennent des motifs d'interaction avec la clathrine et sont présentes chez tous les organismes vivants. Les α -arrestines ou ART (Arrestin-Related Trafficking adaptors), présentes chez tous les êtres vivants à l'exception des plantes, sont conservées entre l'humain et la levure *Saccharomyces cerevisiae* et possèdent des motifs PPXY qui se lient aux domaines WW d'ubiquitine ligases de la famille Nedd4 (Alvarez, 2008), (Rsp5 chez la levure). 14 protéines ARTs ont été identifiées chez la levure ; ce sont les homologues des 6 protéines ARRDC humaines identifiées (Revue : Becuwe et al., 2012a).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, 14 protéines ART, nommées arrestines par la suite, ont été identifiées pour le moment (**Figure 1.12**). Les premières arrestines identifiées sont Ldb19 et Ecm21 qui régulent l'endocytose des transporteurs Can1, Lyp1 et Mup1 (Lin et al., 2008). Les auteurs ont pu identifier 9 protéines de la famille des arrestines (Ldb19/Art1 à Rim8/Art9) qui possèdent un motif arrestine présent chez la β -arrestine 1 humaine ainsi que des motifs PPXY permettant l'interaction avec Rsp5. De plus, 7 arrestines parmi les 9 possèdent un domaine N-terminal spécifique des arrestines similaire à celui que l'on retrouve chez les arrestines des mammifères (Baile et al., 2019). Par la suite, 5 autres arrestines ont été identifiées. L'arrestine Art10, identifiée comme un substrat de Rsp5 (Gupta et al., 2007); Bul1 identifiée comme se liant à Rsp5 (Yashiroda et al., 1998, 1996); Bul2 est le paralogue de Bul1; Bul3 identifiée grâce à l'homologie de séquence avec les protéines Bul1 et Bul2 (Novoselova et al., 2012) et enfin Spo23 (Tevzadze et al., 2007).

S. cerevisiae

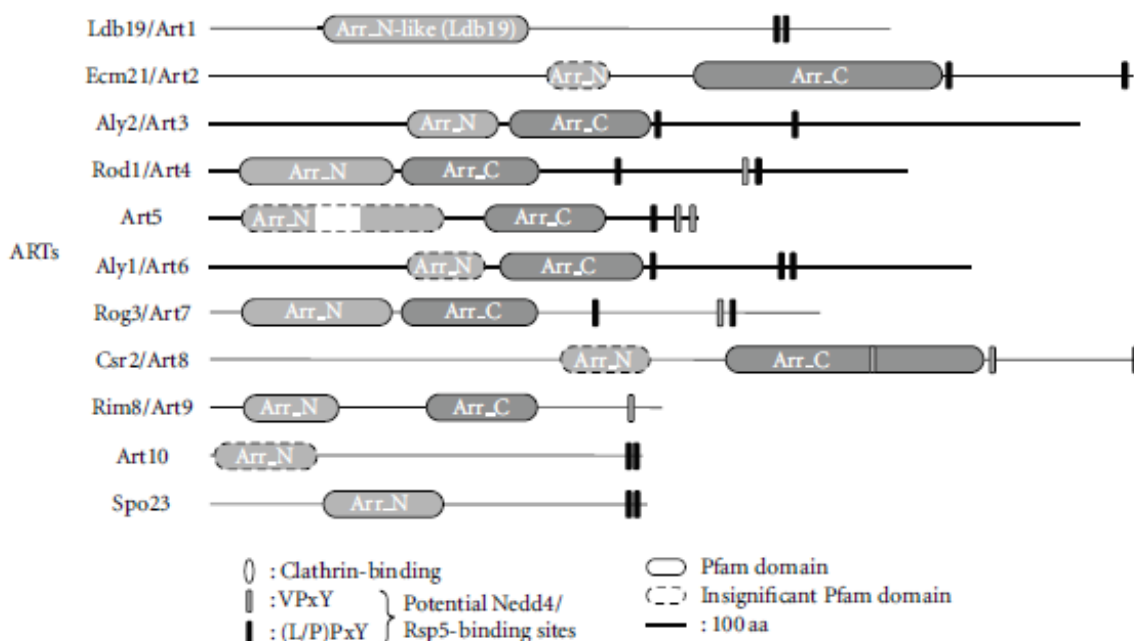


Figure 1.12 - Représentation schématique de l'organisation des domaines des ARTs de levure (arrestin-related trafficking adaptors). (Becuwe et al., 2012a) - Les domaines détectés par Pfam 26.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) sont montrés et correspondent aux accessions Pfam-A suivantes : Arr_N : PF00339, Arr_C : PF02752, Arr_N-like (Ldb19) : PF13002. Un domaine Arr_N putatif dans Ecm21/Art2 a été identifié par alignement avec le domaine Arr_N présumé de Csr2/Art8. Les sites de liaison potentiels des ubiquitines ligases de la famille Nedd4 (Rsp5) sont également indiqués sur les protéines ART.

C.4.2 Les différents signaux régulant l'activité des arrestines

Les arrestines sont donc les adaptateurs de l'endocytose. Activées par un certain type de signal extérieur, elles vont se fixer sur un transporteur spécifique afin que l'E3 ubiquitine ligase Rsp5 puisse ubiquityler la protéine à endocyter. Elles jouent le rôle d'adaptatrices de Rsp5 et font le lien entre l'endocytose et le milieu extérieur ainsi que le métabolisme.

Cependant, en fonction du signal, les arrestines ne vont pas toujours cibler les mêmes transporteurs et deux signaux différents peuvent activer deux arrestines différentes qui vont cependant se fixer sur le même transporteur. Par exemple, lors de l'augmentation de la concentration en glucose dans le milieu, l'arrestine Rod1 est activée et permet, avec Rsp5, l'endocytose du transporteur de glucose à haute affinité, Hxt6. Cependant, ce dernier est également endocyté en réponse à la cycloheximide et cette endocytose dépend de l'activation de la protéine Csr2 (Nikko and Pelham, 2009). En **Tableau 1.2** est résumé les connaissances que l'on a actuellement sur les arrestines, les cargos pour lesquels elles participent à l'endocytose en fonction des différents signaux également indiqués. Des cargos ont pu être identifiés pour 11 arrestines pour le moment.

Tableau 1.2 : Noms et alias des protéines ART; cargos pour lesquels elles participent à l'endocytose et signaux déclenchant l'activation et l'endocytose des dit cargos chez *Saccharomyces cerevisiae*. D'après (Kahlhofer et al., 2021; O'Donnell and Schmidt, 2019)

((1) Nikko and Pelham, 2009) ((2) Nikko et al., 2008) ((3) Lin et al., 2008) ((4) O'Donnell et al., 2015) ((5) Becuwe et al., 2012b) ((6) MacGurn et al., 2011) ((7) Lei et al., 2013) ((8) Alvaro et al., 2014) ((9)

Prosser et al., 2015) ((10) Ivashov et al., 2020) ((11) Savocco et al., 2019) ((12) O'Donnell et al., 2010) ((13) Hatakeyama et al., 2010; (14) O'Donnell et al., 2013) ((15) Crapeau et al., 2014) ((16) Sen et al., 2020) ((17) Nishimura et al., 2020) ((18) Wawrzycka et al., 2019) ((19) Hovsepian et al., 2018) ((20) Becuwe and Léon, 2014) ((21) Ho et al., 2017) ((22) Hovsepian et al., 2017; (23) Snowdon and van der Merwe, 2012) ((24) Herrador et al., 2010) ((25) Smardon and Kane, 2014) ((26) Marqués et al., 2015) ((27) Abe and Iida, 2003) ((28) Liu et al., 2007) ((29) Gournas et al., 2017) ((30) Suzuki et al., 2013) ((31) Kawai et al., 2014) ((32) Talaia et al., 2017) ((33) : Hager et al., 2018)

CHX : cycloheximide; aa : acides aminés

Nom / Gène	Alias	Cargos / Signal
Ldb19 / YOR322C	Art1	<ul style="list-style-type: none"> • Tat2 / Tryptophane (1) • Fur4 / Uracil & CHX (1) (6) • Mup1 / Methionine (3) & CHX (6) • Can1 / Arginine (3) • Lyp1 / Lysine (3) & stress de chaleur (7) • Ste2 / Turnover (8) & turnover sans clathrine (9)
Ecm21 / YBL101C	Art2	<ul style="list-style-type: none"> • Tat2 / Tryptophane & CHX (1) & carence en aa et azote (10) • Fur4 / Uracil & CHX (1) • Lyp1 / CHX (3) & Carence en aa et azote (10) • Smf1 / Cadmium (2) • Mup1 & Can1 / carence en aa et azote (10) • Ina1 / carence en aa et azote (10) • Thi7 / thiamine & CHX (11) • Nrt1 & Thi72 / Thiamine (11)
Aly2 / YJL084C	Art3	<ul style="list-style-type: none"> • Gap1 / aa et azote (12) • Dip5 / excès acide aspartique et glutamique & stress de chaleur & turnover (13) & ammonium (14) • Gap1 / Rapamycine et autres stress (15) • Ste3 / Turnover sans clathrine (9) • Ena1 / NaCl (16) • Put4 / Arginine (17) • Acr3 / CHX (18)
Rod1 / YOR018W	Art4	<ul style="list-style-type: none"> • Hxt1 / 2-Deoxyglucose (4) • Hxt3 / 2-Deoxyglucose (4) & carence en aa et azote (10) • Jen1 / Glucose (5) & cycloheximide (19) • Hxt6 / Glucose (1) • Ste2 / alpha-facteur de phéromone (8) & turnover sans clathrine (9) • Sfl1 / Glucose (20) • Acr3 / CHX (18)
Art5 / YGR068C		<ul style="list-style-type: none"> • Itr1 / Inositol (1)
Aly1 / YKR021W	Art6	<ul style="list-style-type: none"> • Gap1 / aa et azote (12) & rapamycine et autres stress (15) • Dip5 / turnover (13) & (14) • Ste3 / Turnover sans clathrine (9) • Kir2.1 (canal humain) / Potassium (33)
Rog3 / YFR022W	Art7	<ul style="list-style-type: none"> • Hxt3 / 2-Deoxyglucose (4) • Ste2 / alpha-facteur de phéromone (8) & turnover sans clathrine (9) • Hxt6 / Glucose (21)
Csr2 / YPR030W	Art8; Mrg19	<ul style="list-style-type: none"> • Hxt6 / CHX (1) • Tat2 / Tryptophane & CHX (1) • Smf1 / cadmium (2) • Hxt2 & Hxt4 & Hxt6 & Hxt7 / Lactate (22)

		<ul style="list-style-type: none"> • Hxt3 / éthanol (23) & 2-deoxyglucose (4)
Rim8 / YGL045W	Art9; Pal3	<ul style="list-style-type: none"> • Rim21 / augmentation de pH (24) • Pma1 / Perte d'activité de la vATPase (25) • Ena1 / NaCl (26)
Art10 / YLR392C		
Spo23 / YBR250W		
Bul1 / YMR275C	Smm2; Dag1; Rds1	<ul style="list-style-type: none"> • Tat2 / Tryptophane & CHX (1) & Augmentation de la pression hydrostatique (27) • Fur4 / Uracil & CHX (1) • Ctr1 / Turnover et cuivre (28) • Gap1 / Rapamycine et autres stress (15) • Can1 / Arginine (29) • Tat1 / Augmentation de la pression hydrostatique (30) • Ptr2 / CHX (31) • Jen1 / Glucose & CHX (19) & alcalinisation du milieu & cycloheximide & rapamycine & croissance prolongée en lactate (32)
Bul2 / YML111W		<ul style="list-style-type: none"> • Gap1 / Rapamycine et autres stress (15) • Ctr1 / Turnover et cuivre (28) • Can1 / Arginine (29) • Tat1 / Augmentation de la pression hydrostatique (30) • Ptr2 / CHX (31) • Jen1 / Alcalinisation du milieu & Rapamycine (32)
Bul3 / YNR068C		

C.4.3 La régulation des arrestines via les modifications post-traductionnelles

Les arrestines participent donc à la régulation de l'endocytose des protéines membranaires. Pour cela, elles sont activées et inhibées en fonction des différents signaux extracellulaires. Lorsqu'un signal induit l'activation ou l'inhibition d'une arrestine, ce sont des modifications post-traductionnelles (MPT) qui vont permettre la régulation de ces protéines (**Figure 1.13**). Pour le moment, il a été montré qu'uniquement la phosphorylation des arrestines inhibe leur activité et que la déphosphorylation et/ou la mono- ou poly-ubiquitination, induit leur activation. De plus, seule l'E3 ubiquitine ligase Rsp5 ubiquityle les arrestines pour les activer. Au contraire, pour la phosphorylation et déphosphorylation de ces protéines, plusieurs kinases et phosphatases ont été identifiées. Nous allons nous intéresser à plusieurs exemples par la suite.

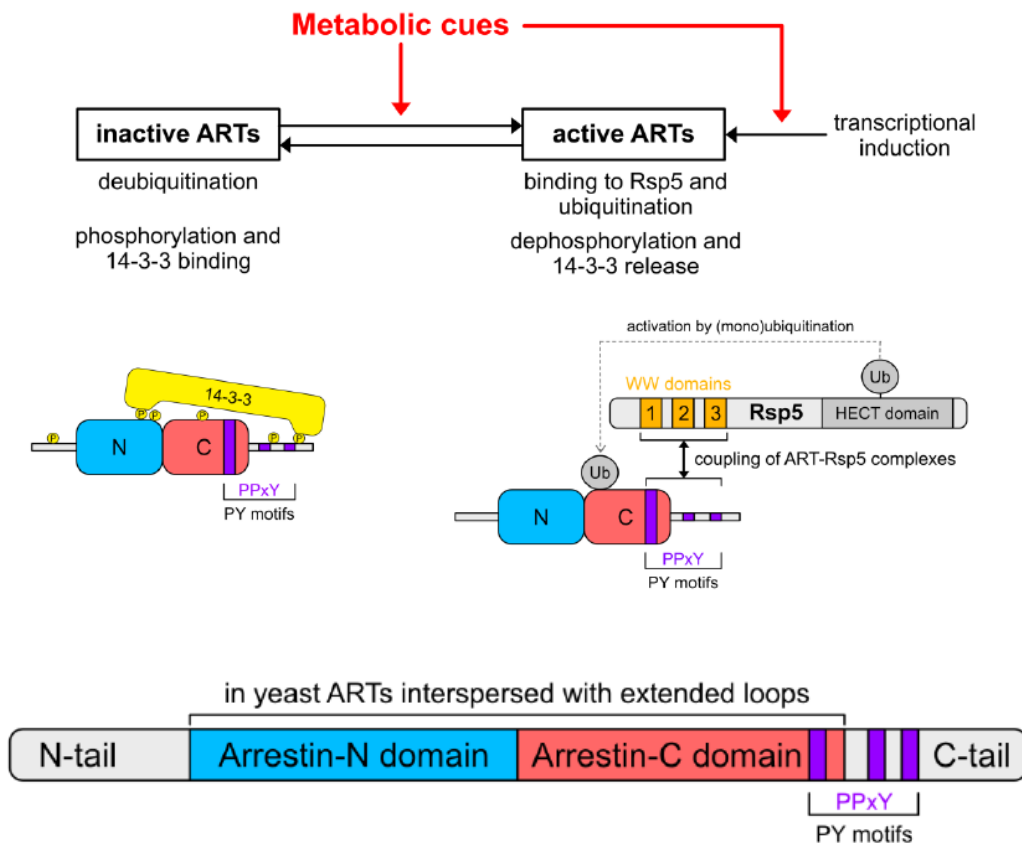


Figure 1.13 - Les modifications post-traductionnelles régulent l'activité des protéines ARTs.

D'après (Kahlhofer et al., 2021)

Les ART inactives sont phosphorylées, ce qui crée souvent des sites de liaison pour les protéines 14-3-3. La liaison des 14-3-3 peut entraver l'interaction avec l'ubiquitine ligase Rsp5, et par la suite, l'ubiquitination et l'activation des ART. Lors de signaux métaboliques spécifiques (par exemple, la disponibilité du glucose), les protéines ART sont libérées des protéines 14-3-3 et deviennent déphosphorylées. Rsp5 se lie avec ses domaines WW aux motifs PPxY des ARTs, ce qui facilite l'ubiquitination et l'activation des ARTs. Le complexe ART-Rsp5 activé se lie à son substrat, le transporteur à la membrane, ce qui facilite son endocytose. Il convient de noter que certains événements d'endocytose peuvent se produire indépendamment de ce processus d'activation. Certaines ARTs sont également induites transcriptionnellement en réponse à des signaux métaboliques.

La kinase Snf1/AMPK, qui est activée en absence de glucose dans le milieu extracellulaire phosphoryle Rod1 en réponse au lactate, la rendant inactive. En réponse au glucose, elle est déphosphorylée par la phosphatase Reg1 puis ubiquitylée par Rsp5 et participe à l'endocytose du transporteur de lactate Jen1 (Becuwe et al., 2012b). En effet, dans un mutant Rod1-KR, où les 4 lysines ubiquitylées par Rsp5 sont mutées en arginine, Rod1 n'est pas ubiquitylée et Jen1 n'est pas endocyté en réponse au glucose. Pour la perméase d'acides aminées Dip5, c'est l'arrestine Aly1 qui induit son endocytose et en réponse au calcium, la phosphatase Cnb1, la calcineurine, est activée et déphosphoryle Aly1 qui induit participe ensuite à l'endocytose de Dip5 (O'Donnell et al., 2013). Pour Ldb19, en réponse à la méthionine, les phosphatases Ppz1 et Ppz2 déphosphorylent l'arrestine qui participe alors à l'endocytose de la perméase Mup1 (Lee et al., 2019). Cette arrestine est d'ailleurs phosphorylée, donc inactivée par Npr1 (MacGurn et al., 2011). Cette dernière, dans des conditions de carence en azote, phosphoryle les arrestines Bul1 et Bul2, inhibant

leur activité quant à l'endocytose de la perméase Gap1. En revanche, en présence d'une forte concentration d'azote dans le milieu, Npr1 est phosphorylée et inhibée via l'activation du complexe TOR. Les protéines Bul1 et Bul2 sont alors déphosphorylées par la phosphatase Sit4 et participent à l'endocytose de Gap1 (Merhi and André, 2012).

Cependant, il a également été montré que pour certaines arrestines, en réponse à des signaux spécifiques, l'ubiquitination des arrestines n'est pas nécessaire pour leur activation et participation à l'endocytose. Par exemple, pour l'arrestine Rod1, O'Donnell et al ont montré que l'ubiquitination de cette arrestine n'est pas nécessaire pour induire l'endocytose des transporteurs Hxt1 et Hxt3 en réponse au 2DG (O'Donnell et al., 2015). Uniquement la déphosphorylation de Rod1 semble nécessaire pour induire l'endocytose de ces transporteurs en réponse au 2DG; dans un mutant *rod1Δ* pour lequel les 4 lysines ubiquitylées par Rsp5 sont mutées, on observe toujours une endocytose de Hxt1 et Hxt3 lors d'un traitement au 2DG. De même pour l'endocytose de Gap1 en réponse à un stress extracellulaire, les arrestines Bul1, Bul2, Aly2 et Aly1 ne sont pas forcément ubiquitylées et participent tout de même à l'endocytose de la perméase (Crapeau et al., 2014). Enfin, pour l'arrestine Ldb19 qui régule l'endocytose de Ste2, son ubiquitylation n'est pas nécessaire pour induire l'endocytose de cette protéine en réponse aux phéromones (Alvaro et al., 2014).

La régulation des arrestines s'effectuent donc principalement par des MPT en réponse à certains signaux. Cependant, certaines arrestines, en réponse à des signaux spécifiques, sont également régulées au niveau transcriptionnel. Ainsi, en réponse à une carence en azote, l'arrestine Ecm21 participe à l'endocytose de 4 perméases. Elle est régulée par des MPT en réponse à cette carence mais également au niveau transcriptionnel. Lors de cette carence, on observe une augmentation du niveau d'ARNm de l'arrestine, ce qui ne se passe pas dans un mutant de délétion de *GCN4*, qui code pour un facteur de transcription (Ivashov et al., 2020). L'arrestine Csr2, qui promeut l'endocytose de transporteurs Hxt6 et Hxt7 en réponse à l'absence de glucose, est exprimée sous forme ubiquitylée et donc activée en réponse au lactate. Cependant, en présence de glucose dans le milieu extracellulaire, l'expression transcriptionnelle de *CSR2* est réprimée (Hovsepian et al., 2017).

Enfin, en plus de réguler l'endocytose de protéines membranaires de *Saccharomyces cerevisiae*, Hager et al ont montré que plusieurs arrestines, Ldb19, Aly2 et Aly1, et principalement cette dernière, jouaient un rôle dans la régulation de la présence d'un canal de potassium humain, Kir2.1, à la membrane et Aly1 participe à la régulation de son endocytose en réponse au potassium (Hager et al., 2018). De plus, Rsp5 joue aussi un rôle dans cette régulation, montrant que l'étude de ces protéines est essentielle pour comprendre les différents mécanismes d'endocytose, quel que soit l'organisme étudié.

D - Étude de l'effet du 2DG chez *Saccharomyces cerevisiae*

Comme vu précédemment, le 2DG a un effet sur l'UPR, la N-glycosylation ainsi que sur la glycolyse. Ces effets du 2DG ont été montrés dans des cellules de levures ainsi que dans des cellules humaines. De plus, le 2DG a d'autres effets non précisés ici que ce soit dans des cellules humaines ou de levure avec par exemple l'effet sur l'UDP et le GDP (Laussel and Léon, 2020). Ces différentes voies de signalisation sont conservées entre l'humain et *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, l'endocytose est processus également conservé avec un rôle de l'ubiquitine et des E3 ubiquitine ligase de la famille de NEDD4 chez l'humain et chez *Saccharomyces cerevisiae*. Comme les cellules cancéreuses, les levures

ont un métabolisme de type Warburg : elles consomment du glucose par glycolyse plutôt que par respiration, même en présence d'oxygène.

Enfin, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme modèle qui est simple à étudier, études qui se font en général à bas coûts. De plus, beaucoup d'outils d'étude de la levure sont également disponibles. Cela en fait un outil de découverte rapide.

Ainsi, de par ces similarités entre la levure et les cellules cancéreuses ainsi que par sa simplicité d'étude, la levure *Saccharomyces cerevisiae* peut être utilisée pour comprendre les mécanismes de résistance et de toxicité du 2DG et étudier les différents effets cellulaires de cet inhibiteur métabolique.

E - Objectifs de thèse

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux différents mécanismes de résistance et de toxicité à l'inhibiteur métabolique, le 2DG. Ce dernier est un agent anticancéreux utilisé en combinaison avec d'autres drogues. Mon travail consistait à caractériser l'impact du 2DG sur le métabolisme et les voies de signalisation cellulaires afin d'identifier les bases des mécanismes de résistance et de toxicité de cette drogue. De par son analogie avec le glucose, le 2DG est importé dans les cellules et est phosphorylé en 2DG6P. Ce dernier inhibe la glycolyse (Chen and Guéron, 1992) et provoque un stress du RE (Kurtoglu et al., 2007) induisant une mort cellulaire. Tous les effets cellulaires du 2DG ne sont cependant pas compris et ce projet visait à les caractériser. Ce projet a été réalisé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui, de par son métabolisme particulier, a un métabolisme semblable au métabolisme Warburg observé dans les cellules cancéreuses.

Pour étudier les effets cellulaires du 2DG, je me suis concentrée sur l'étude de l'endocytose des protéines membranaires en réponse au 2DG ainsi qu'aux mécanismes d'endocytose associés : le rôle de l'ubiquitine, de l'E3 ubiquitine ligase Rsp5 ainsi que des arrestines dans cette endocytose. Je me suis également intéressée à la régulation de l'arrestine Rod1 en réponse au 2DG, et ai cherché à comprendre pourquoi la délétion de cette arrestine conduit à une résistance des cellules au 2DG.

Je me suis également concentrée sur d'autres effets cellulaires du 2DG observés dans les cellules de levure : fragmentation de la vacuole, formation de gouttelettes lipidiques. Enfin, par l'exploitation d'un crible génétique publié et la réalisation d'un nouveau crible génétique "multicopy suppressor", j'ai pu identifier et étudier des nouveaux mécanismes et voies de signalisation impliquées dans la résistance ou sensibilité au 2DG.

F - Introduction du chapitre 2

Les résultats de ma thèse sont séparés en 2 parties : une première sous forme d'une future publication et une deuxième sous forme de résultats supplémentaires.

Dans la première partie des résultats de ma thèse, je me suis intéressée à l'effet du 2DG sur l'endocytose de plusieurs protéines membranaires. Cette étude a commencé à la suite de la publication d'un papier de l'équipe (Defenouillère et al., 2019) auquel j'ai participé. Dans cette étude, une étude protéomique avait été réalisée et des protéines régulées à la hausse ou à la baisse en réponse au 2DG avaient été identifiées. Ainsi, je me suis basé sur cette étude, en identifiant des protéines membranaires régulées à la baisse, pour étudier l'endocytose des protéines membranaires en réponse au 2DG.

J'ai donc pu montrer que la protéine Ina1, protéine membranaire de fonction inconnue, est endocytée en réponse au 2DG, comme la plupart des protéines membranaires et transporteurs étudiés. Cette endocytose dépend de l'E3 ubiquitine ligase ainsi que de l'arrestine Rod1. Je me suis ensuite concentrée sur la régulation de cette arrestine en réponse au 2DG. J'ai pu montrer que le 2DG induit l'activation transitoire de PP1 ce qui conduit à la déphosphorylation et ubiquitylation de Rod1. De plus, cette ubiquitylation et interaction de Rod1 avec Rsp5 sont nécessaires pour l'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG. Enfin, le mutant *rod1Δ* étant résistant au 2DG, je me suis aussi intéressée à cette résistance et ai pu montrer que les transporteurs de glucose à faible affinité, Hxt1 et Hxt3, participent à cette résistance. Cette étude de l'endocytose et de sa régulation en réponse au 2DG a permis d'identifier des effets cellulaires de cette drogue dans les cellules ainsi que de comprendre comment les cellules peuvent résister ou non, au 2DG lorsque ce dernier est importé dans les cellules.

2-deoxyglucose transiently activates Protein Phosphatase 1 (PP1) and induces massive endocytosis causing increased sensitivity to the drug

Clotilde Laussel¹, Véronique Albanèse¹, Francisco Javier García-Rodríguez¹, Quentin Defenouillère¹, Sébastien Léon^{1,2}

Affiliations:

¹: Université de Paris, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75006, Paris, France.

²: Author for correspondence:

Sébastien Léon, PhD
Institut Jacques Monod
15 Rue Hélène Brion
75205 Paris cedex 13, France.
email : sebastien.leon@ijm.fr ; tel. +33 (0)1 57 27 80 57.

Abstract

2-deoxyglucose is a glucose analog which interferes with many aspects of the cell's metabolism and physiology. After entry into the cell, it is phosphorylated into 2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG6P) which interferes with several pathways, including glycolysis and protein N-glycosylation. Despite this systemic effect, genetic studies in yeast revealed the existence of resistance strategies that are only partially understood. In particular, resistance is often associated with mutations causing an increased activity of the yeast orthologue of AMPK, Snf1. We previously reported that in these mutants, the increased expression of a 2DG6P phosphatase participates in the detoxification of this metabolite. In this study, we focus on the resistance mechanism of a mutant lacking the alpha-arrestin Rod1, an adaptor protein involved in transporter ubiquitylation and endocytosis. We first show that 2DG causes a massive internalization of plasma membrane proteins, many of which depend on the arrestin Rod1 for their endocytosis. Among those is Ina1, a transmembrane protein member of the SUR7/Pall family, for which endocytosis was never reported before. Ina1 endocytosis involves its ubiquitylation, Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5, reminiscent of a canonical ubiquitin-dependent endocytosis as observed for nutrient transporters. We found that 2DG triggers changes in Rod1 post-translational modifications through a transient, 2DG-induced activation of the phosphatase PP1, thereby favoring Rod1 activity in endocytosis. The lack of Rod1 causes the maintenance of many transporters at the plasma membrane, and particularly, the stabilization of low-affinity hexose transporters is crucial for the resistance of the *rod1* Δ mutant. We propose that a defective endocytosis of hexose transporters contributes to 2DG resistance by allowing the export of 2DG originating from the dephosphorylation of 2DG6P, thus terminating the process of 2DG detoxification.

Introduction

2DG is a glucose analogue which lacks a hydroxyl group in position 2, and mainly acts as a competitive inhibitor of glucose metabolism (Xi et al., 2014). As such, it competes with glucose for entry into cells and for its subsequent phosphorylation by hexokinase, but is almost not further metabolized. This leads to the intracellular accumulation of 2DG-6-phosphate, a toxic metabolite that inhibits glycolysis and thus leads to a rapid depletion of ATP stores, and the activation of nutrient starvation-activated pathways such as AMPK (Hardie, 2016). Moreover, since mannose is the C2 epimer of glucose, 2-deoxyglucose can also be considered as 2-deoxymannose and thus also interferes with mannose metabolism, notably inhibiting protein N-glycosylation (reviewed in Laussel and Leon, 2020). This has a series of cellular effects, particularly the onset of the Unfolded Protein Response pathway to face the stress encountered by a defective glycosylation of proteins at the endoplasmic reticulum, which in some conditions is reported to be the main toxic effect of 2DG (Kurtoglu et al., 2007).

The realization that many cancer cells display an aberrantly high glucose uptake and metabolism has led to the idea that glycolysis inhibitors could be used to preferentially target and kill tumor cells (Luengo et al., 2017). This also allowed the use of radiolabeled glucose derivatives, such as 18-fluoro-2-deoxyglucose, to preferentially label tumors for cancer imaging (PET-scans) (Pajak et al., 2019). So far, trials using 2DG as the sole chemotherapeutic agent have failed because of the relative toxicity of this molecule, however strategies using 2DG or other 2-deoxy-substituted versions of glucose in combination with other drugs are under study and are promising (Pajak et al., 2019).

2DG has also been extensively used to understand glucose signaling in micro-organisms such as the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where it has been instrumental to delineate the molecular mechanisms by which glucose regulates gene expression (reviewed in Laussel and Leon, 2020). The metabolism of *S. cerevisiae* is biased towards the preferential use of glucose as a carbon source, from which it retrieves most of its energy by fermentation. At the molecular level, glucose represses the expression of many genes involved in respiratory metabolism or in the use of other carbon sources, thereby favoring the preferential use of glucose by fermentation. Among the actors in charge of adapting the transcriptional program with respect to glucose availability is the yeast orthologue of AMPK, Snf1 (Cocchetti et al., 2018). Snf1 is the catalytic subunit of a heterotrimeric complex which is active in the absence of glucose in the medium. A canonical example of a Snf1-regulated transcription is that of the invertase *SUC2*, required for sucrose hydrolysis and metabolism. Transferring yeast cells to sucrose medium activates Snf1, causing the phosphorylation

of the transcriptional repressor Mig1, its translocation out of the nucleus and the derepression of invertase (De Vit et al., 1997; Papamichos-Chronakis et al., 2004).

Snf1, like other kinases of the AMPK family, is activated by phosphorylation of a residue in its activation loop (McCartney and Schmidt, 2001). This involves one of 3 upstream kinases whose activity is, surprisingly, not regulated by glucose. Rather, evidence suggests that Snf1 activity is regulated by its dephosphorylation by the Protein Phosphatase 1 (PP1) complex made of the catalytic subunit, Glc7, and the regulatory (and glucose-specific) subunit Reg1 (Rubenstein et al., 2008). How PP1 activity is linked to glucose availability is not yet clear, but deletion of *REG1* leads to constitutive Snf1 activity and to the expression of glucose-repressed genes even in the presence of glucose (Tu and Carlson, 1995).

Another phenotype displayed by the *reg1* Δ strain is its ability to grow robustly despite the presence of 2DG (Laussel and Leon, 2020; Ralser et al., 2008). This is attributed to the constitutive activation of Snf1 in this strain, since yeast lacking both Reg1 and Snf1 is no longer resistant to 2DG and accordingly, mutations in *SNF1* cause hypersensitivity to 2DG (McCartney et al., 2014). Indeed, and despite the multifaceted cellular effects of 2DG, cells can overcome 2DG toxicity by mechanisms that are currently being unraveled (reviewed in Laussel and Leon, 2020; Schmidt and O'Donnell, 2021). This was observed in HeLa cells exposed for prolonged period in 2DG-containing medium, leading to the selection of resistant clones (Barban, 1962). These cells displayed a high phosphatase activity towards 2DG-6-P, suggesting the presence of an unidentified enzyme that could detoxify this metabolite back into 2DG and thus prevent glycolysis inhibition. Studies in yeast also identified phosphatases, named Dog1 and Dog2, with a similar activity and whose overexpression allows growth in 2DG-containing medium (Randez-Gil et al., 1995; Sanz et al., 1994). Recently, we found that the most abundant isoform, Dog2, is itself a glucose-repressed gene (Defenouillère et al., 2019). This partially explains why strains with high Snf1/AMPK activity are resistant to 2DG, such as *reg1* Δ (McCartney et al., 2014; Ralser et al., 2008), other *reg1* mutant alleles (Defenouillère et al., 2019; Soncini et al., 2020), a viable *glc7* mutation (Q48K) (Soncini et al., 2020) or gain-of-function mutations in *SNF1* (McCartney et al., 2014; Soncini et al., 2020). However, additional resistance mechanisms independent of *DOG2* expression are at stake in these strains (Defenouillère et al., 2019; Soncini et al., 2020). This is suggested by the fact that deletion of *DOG2* does not completely re-sensitize *reg1* Δ mutants to 2DG, and that the isolated point mutation in *REG1* (*reg1-P231L*) (Soncini et al., 2020) confers 2DG resistance but does not impact on the glucose-mediated repression of genes. Thus, Snf1 activity in 2DG resistance might involve the phosphorylation of other actors.

One such candidate is the arrestin-related protein, Rod1. Arrestin-related proteins are involved in the recruitment of the ubiquitin ligase Rsp5 to nutrient transporters at the plasma membrane, and their subsequent ubiquitylation and endocytosis (Sardana and Emr, 2021). Both act as targets of nutrient signaling pathways and actors of endocytosis, allowing to remodel the landscape of transporters at the plasma membrane to meet the physiological needs of cells facing a nutrient challenge (Babst, 2020; Kahlhofer et al., 2021). Particularly, Rod1 regulates the endocytosis in response to glucose availability, and its activity is oppositely regulated by Snf1 and PP1 (Becuwe et al., 2012; Llopis-Torregrosa et al., 2016; O'Donnell and Schmidt, 2019). Since Rod1 is a target of Snf1 (Shinoda, 2007 #275), Rod1 might be the missing actor through which Snf1 activity leads to 2DG resistance. An initial screen revealed that *rod1Δ* is indeed resistant to 2DG (Ralser et al., 2008), suggesting that a Snf1-mediated inhibition of Rod1 might contribute to 2DG resistance. 2DG resistance is further increased by the additional deletion of *ROG3*, the paralogue of *ROD1* (O'Donnell et al., 2015). Point mutations aimed at abolishing their interaction with the ubiquitin ligase Rsp5, thereby annihilating their function as adaptor proteins in endocytosis, also led to increased resistance to 2DG suggesting that both arrestins mediate 2DG toxicity through their function in endocytosis (O'Donnell et al., 2015). Rod1 (and Rog3, to a lesser extent) controls the endocytosis of the glucose transporters Hxt1 and Hxt3 triggered in response to 2DG exposure, and overexpression of the same transporters in a *snf1Δ* mutant restored partial resistance to 2DG (O'Donnell et al., 2015). In agreement with this, deletion of *ROD1* and *ROG3* stabilized transporters at the plasma membrane in *snf1Δ* and restored its 2DG-sensitivity to WT levels, suggesting that Snf1 positively regulates Rod1 and Rog3 to boost Hxt1 and Hxt3 endocytosis in response to 2DG (O'Donnell et al., 2015). However, whether the effects of 2DG on endocytosis extend beyond glucose transporters is unknown, and there is currently no molecular understanding of how transporter expression/localization may contribute to 2DG resistance.

In this study, we examined the effects of 2DG on endocytosis and found that 2DG triggers the endocytosis of many plasma membrane proteins. After 2DG treatment, other transporters in addition to glucose transporters are endocytosed, many of which depend on Rod1 for their endocytosis. For the first time, we also report the endocytosis of a protein of the SUR7/Pal1 protein, Ina1, which follows a canonical Rod1 and Rsp5-dependent ubiquitylation and endocytosis in these conditions. Mechanistically, we show that 2DG addition leads to a transient surge in PP1 activity, leading to the dephosphorylation of Snf1 and its targets such as Rod1. This allows Rod1 function in endocytosis and thus provides a rationale as to why this arrestin is central to 2DG-induced endocytosis. Finally, we demonstrate that the 2DG resistance of the *rod1Δ* strain can be solely

attributed to the maintenance of active, low-affinity glucose transporters at the membrane. We propose that this contributes to the detoxification of 2DG out of the cells after 2DG6P has been dephosphorylated by the DOG phosphatases, thus terminating the detoxification process.

Results

2DG triggers the endocytosis of many plasma membrane proteins

Previously, we had described the proteomic changes occurring in response to 2DG and focused on proteins that were upregulated in this condition (Defenouillère et al., 2019). In addition, three transmembrane/PM proteins displayed a significantly decreased abundance after 2DG treatment, including the amino acid permease Tat1 and the hexose transporter Hxt2 (Defenouillère et al., 2019). This could either be caused by a decreased synthesis or by an active degradation by endocytosis. We verified this by looking at the regulation of several endogenously GFP-tagged transporters from different protein families. Treatment of glucose-grown cells with 0.2% 2DG led to the degradation of pre-existing transporters (**Fig 1A** and **B**), which was accompanied by a targeting of PM-localized transporters to the vacuole (**Fig 1C**). Of note, and confirming recent findings (Yang et al., 2021), we observed that the vacuole was strongly fragmented in response to 2DG (**Fig S1**). This may be linked to the fact that 2DG causes ER stress in yeast (Defenouillère et al., 2019), and ER stress induces vacuolar fragmentation (Stauffer and Powers, 2015).

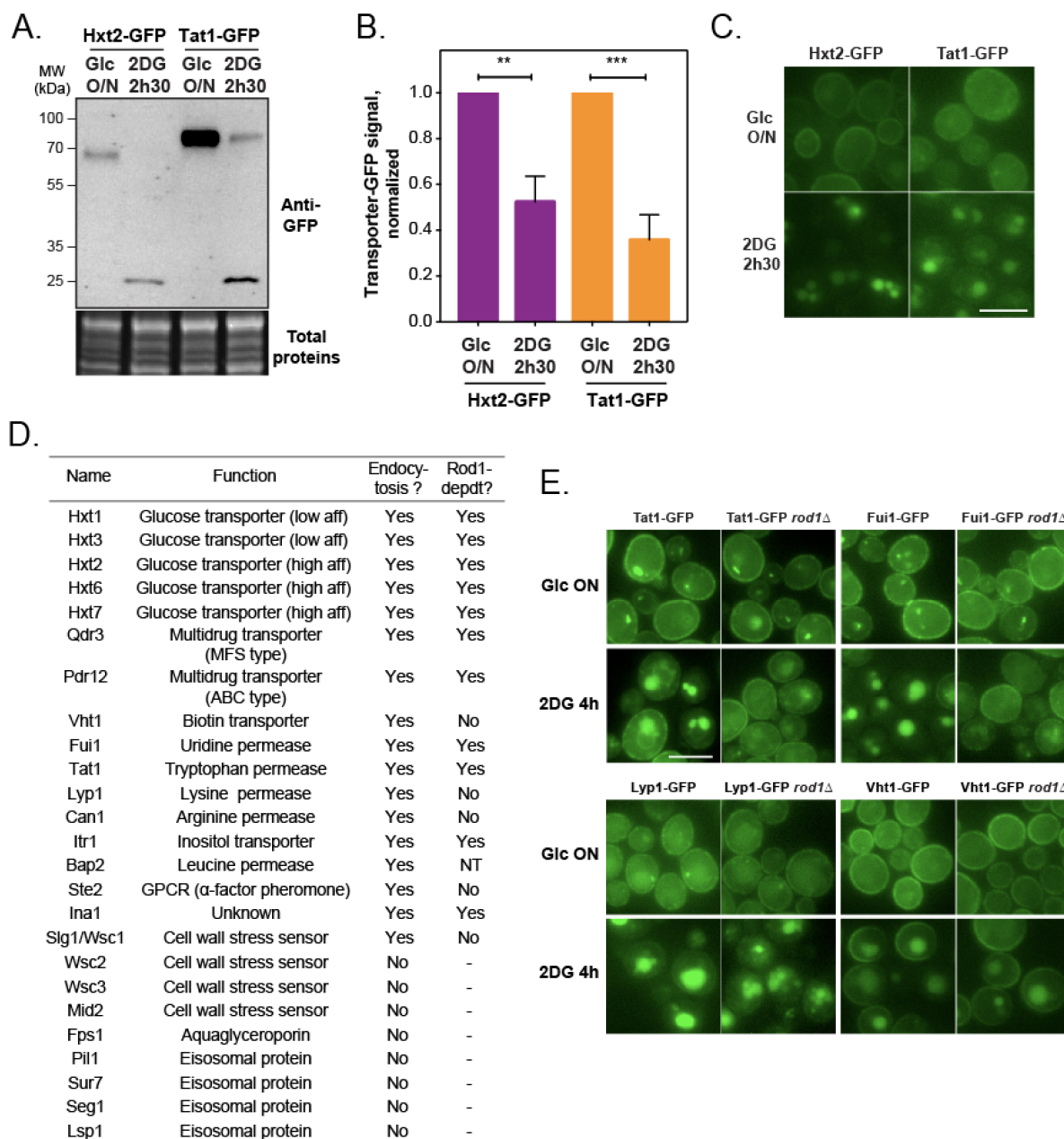


Fig. 1 - 2DG treatment induces a massive endocytosis of plasma membrane proteins, that is mainly Rod1-dependent. (A) Western blot on total protein extracts from Hxt2-GFP- and Tat1-GFP-expressing cells before and after 2DG addition for 2h30, using anti-GFP antibodies. (B) Quantification of western blot signals for Hxt2-GFP and Tat1-GFP before and after 2DG treatment for 2h30 (ANOVA test; $n=3$). (C) Cells expressing Hxt2-GFP and Tat1-GFP cells were grown overnight in a glucose-containing medium (exponential phase) and treated with 2DG for 2h30 and observed by fluorescence microscopy. Scale bar: 5 μ m. (D) Plasma membrane proteins whose localization was examined by fluorescence microscopy before and after 2h30 2DG. When endocytosed, the same proteins were also observed in a *rod1* Δ context to check for Rod1 dependence (NT, not tested). (E) Microscopy of WT and *rod1* Δ cells expressing either Tat1-GFP or Hxt2-GFP before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar: 5 μ m.

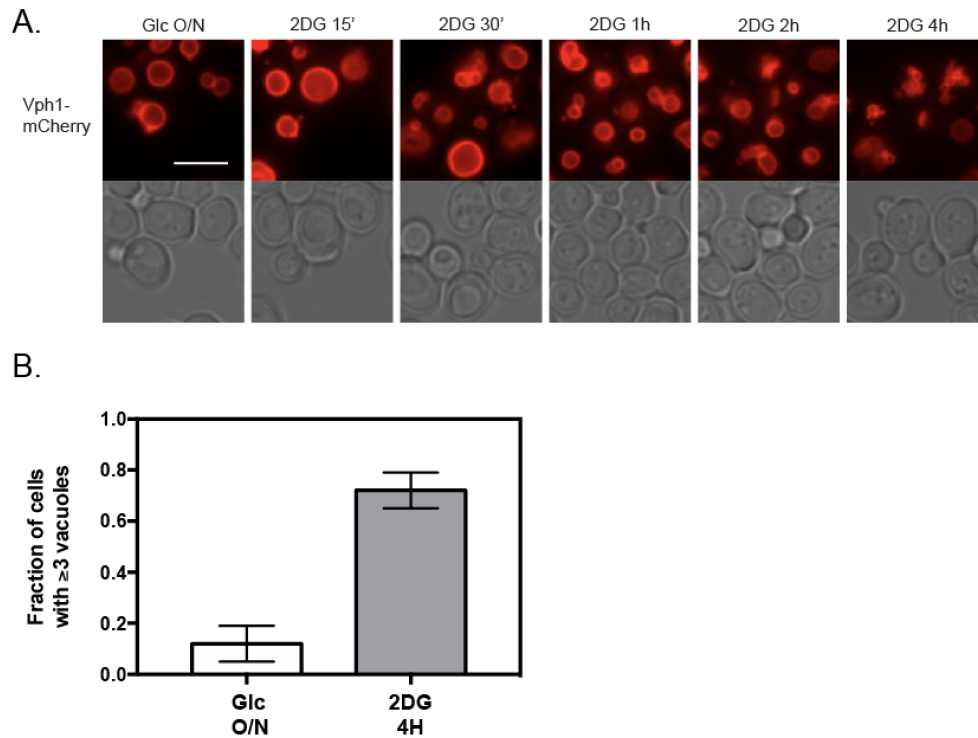


Figure S1 - 2DG treatment induces vacuolar fragmentation. **A.** WT cells expressing Vph1 tagged with mCherry were grown overnight in glucose medium (exponential phase) and treated with 0,2% 2DG. Cells were collected and observed by fluorescence microscopy at the indicated times. Scale bar : 5 μ m. **B.** Quantification of 2DG-induced vacuolar fragmentation \pm SEM, $n=3$ independent experiments).

To further document the extent of plasma membrane remodeling caused by 2DG exposure, we looked at the individual localization of 25 plasma membrane proteins, including transporters for various substrates and of various structural classes as well as receptor/sensor proteins, before and after 2DG treatment (**Fig 1D-E, Fig S2**). This showed that many are endocytosed in response to 2DG, implying that 2DG triggers the massive endocytosis of plasma membrane proteins.

In yeast, nutrient transporter endocytosis is triggered by their ubiquitylation at the plasma membrane, which relies on the action of an ubiquitin ligase named Rsp5 and adaptor proteins of the arrestin-like family (ARTs) (Kahlhofer et al., 2021; MacGurn et al., 2012). Previous work highlighted the importance of the arrestin-related protein Rod1 in the 2DG-induced endocytosis of the hexose transporters Hxt1 and Hxt3 (O'Donnell et al., 2015). Indeed, most of the studied cargoes depended on Rod1 for their 2DG-induced endocytosis (**Fig 1D-E, Fig S2**). The Rod1 paralogue Rog3, which displays some level of functional redundancy with Rod1 (O'Donnell et al., 2015), was not responsible for the endocytosis of the Rod1-independent cargo Lyp1-GFP, since endocytosis was comparable in the double *rod1* Δ *rog3* Δ mutant (**Figure S3**), although this may be the case for other cargoes. Altogether, these results confirm that Rod1 is a major player of 2DG-induced endocytosis, and reveal that several cargoes are endocytosed in response to 2DG in a Rod1-independent manner.

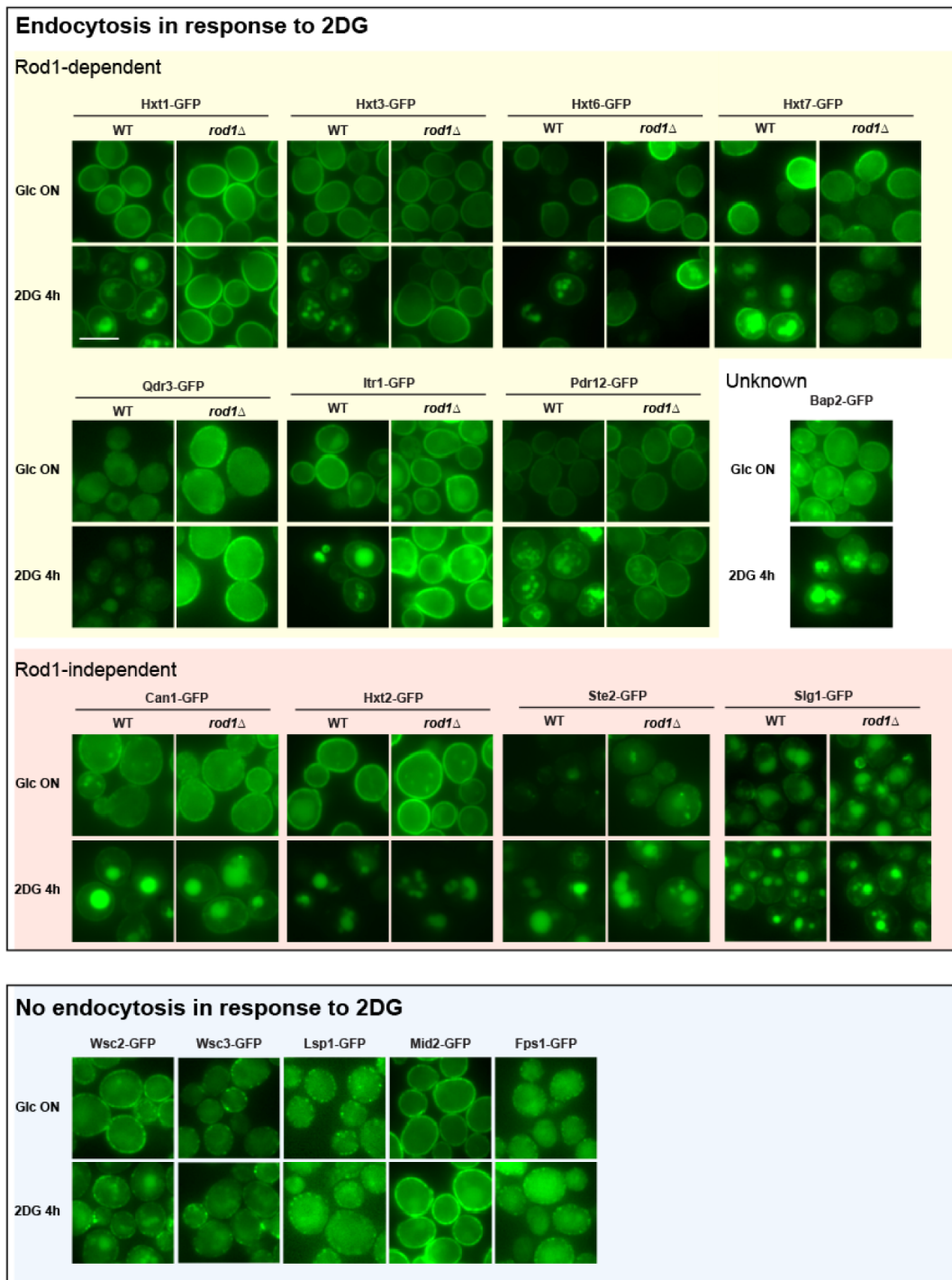
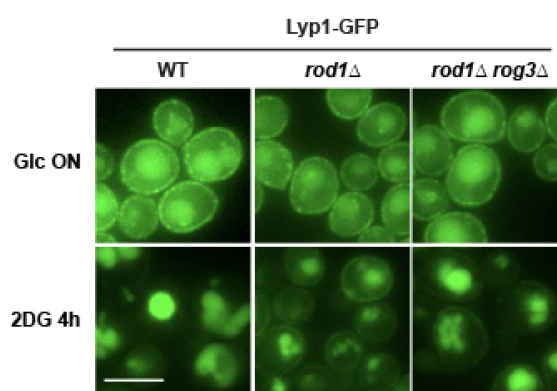


Figure S2 - Most of the studied plasma membrane proteins are endocytosed in response to 2DG and this endocytosis is often Rod1-dependent. WT or *rod1* Δ cells expressing the indicated membrane proteins tagged with GFP at their endogenous genomic locus were observed by fluorescence microscopy before and after treatment with 2DG for 4h. Scale bar, 5 μ m.



(Page before) Figure S3 - Rog3 is not responsible for the observed Rod1-independent endocytosis of Lyp1-GFP in response to 2DG. Microscopy of WT, *rod1* Δ and *rod1* Δ *rog3* Δ cells expressing Lyp1-GFP, before and after treatment with 2DG for 4h. Scale bar, 5 μ m.

Ina1, a member of the SUR7/Pall family, is endocytosed by a canonical ART/Rsp5-dependent pathway in response to 2DG

In our proteomics data (Defenouillère et al., 2019), a plasma membrane protein of unknown function named Ina1 (Germann et al., 2014) was among the list of downregulated membrane proteins and thus possibly endocytosed cargoes in response to 2DG. Ina1 localized to the plasma membrane in cells grown in glucose medium and was indeed targeted to the vacuole in response to 2DG (**Fig 2A**). Ina1 vacuolar targeting depended on the amphiphysin-like protein Rvs167, an essential actor of endocytosis in yeast, further confirming that the vacuolar localization of Ina1 occurred by endocytosis (**Fig 2B**).

Ina1 belongs to a family of fungal-specific transmembrane proteins (SUR7/Pall family, Pfam entry PF06687) which comprises 10 members in yeast (**Fig 2C** and **S4A**). They are predicted to contain an N-terminal signal peptide and three transmembrane domains (Li and Mitchell, 1997). These include the Ina1 paralogue Fat3 (involved in fatty acids transport; (Jung et al., 2013)), Sur7 (a component of eisosomes - see below, Walther et al., 2006), Pun1 (involved in cell wall integrity signaling, Hosiner et al., 2011), Rim9 (involved in alkaline pH signaling, Denison et al., 1998), Ecm7 (involved in calcium uptake, Martin et al., 2011), and two additional paralogue pairs, Fmp45 and Ynl194c, as well as Dcv1 and Tos7 (the latter being involved in secretion and cell wall organization, Zhu et al., 2020). Of note, none of these proteins were previously found to be regulated by endocytosis. Moreover, Pun1, Fmp45, Tos7 and Ynl194c also localize to eisosomes (Alvarez et al., 2008; Hosiner et al., 2011; Jung et al., 2013; Young et al., 2002; Zhu et al., 2020), which are protective plasma membrane subcompartments where endocytosis does not occur (Busto et al., 2018; Gournas et al., 2018). Indeed, treatment of cells expressing various eisosomal proteins fused to GFP (Sur7, Pil1, Lsp1, Seg1) revealed that the latter were not endocytosed in response to 2DG (**Fig S4B**). Conversely, Ina1-GFP did not specifically localize at eisosomes as defined by Pil1-mCherry (**Fig S4C**). Therefore, despite being a member of the SUR7/Pall family, Ina1 is not an eisosomal protein and is so far the first member of this family to display a regulated endocytosis.

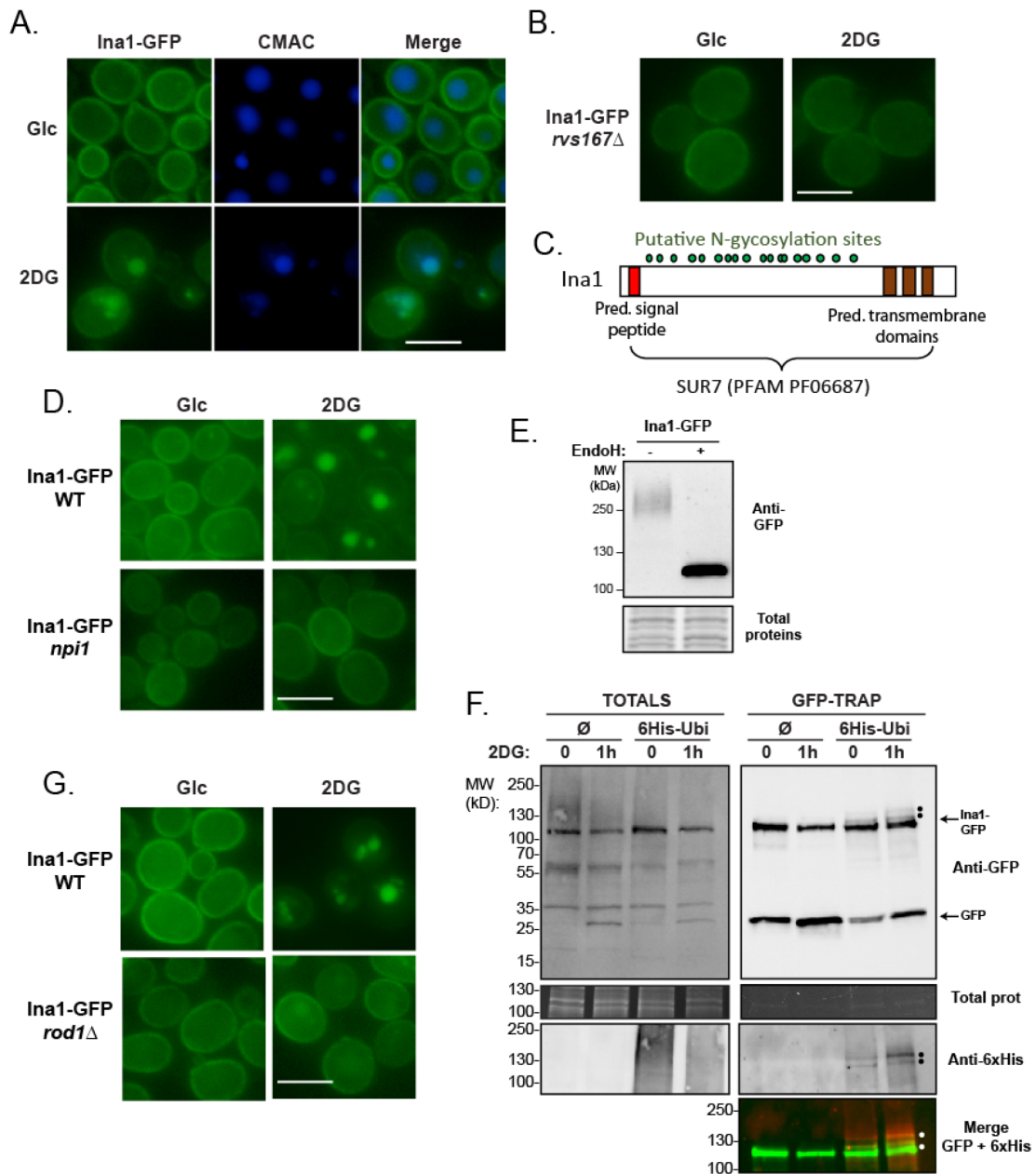
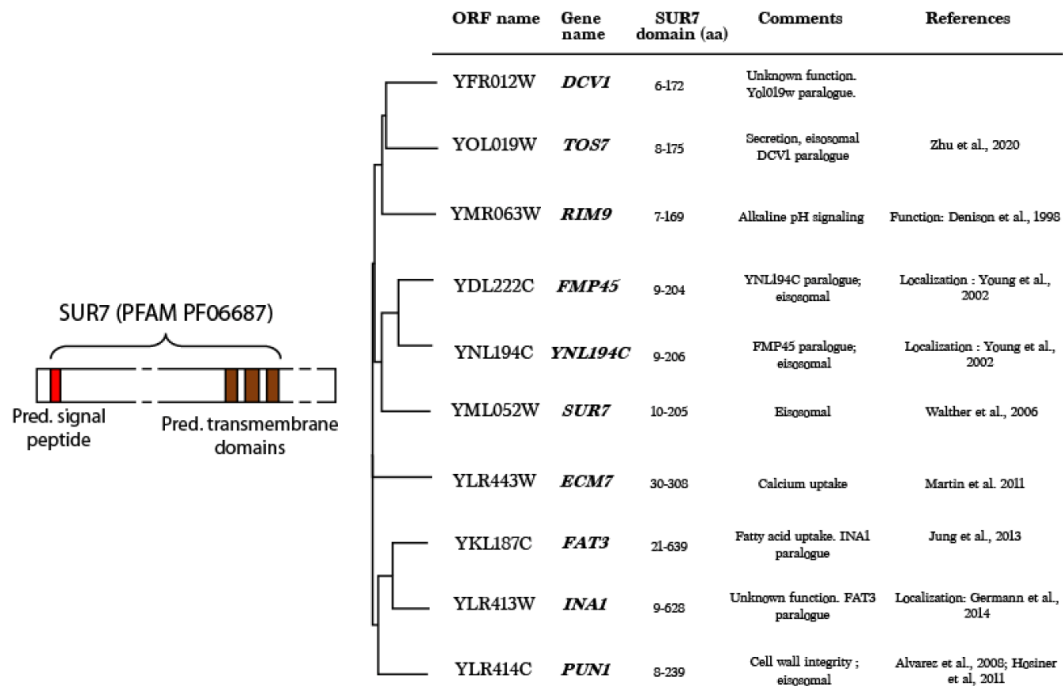
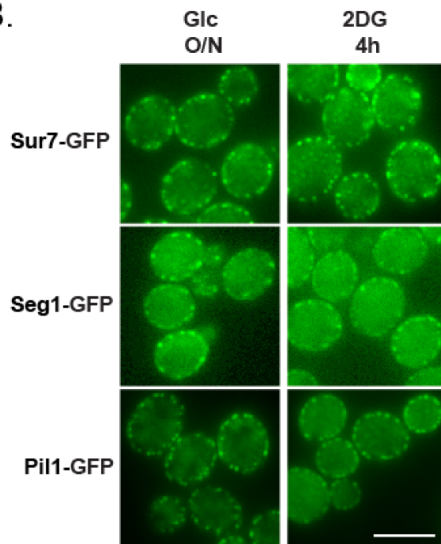


Figure 2 (Next page) - Ina1-GFP is a novel type of cargo of the Pali/Sur7 family endocytosed in response to 2DG in a Rod1- and Rsp5-dependent fashion. (A) WT cells expressing Ina1-GFP were grown in a glucose-containing medium in exponential phase and observed by fluorescence microscopy before and after treatment with 2DG for 4h. Cells were also incubated with CMAC to label vacuoles. Scale bar: 5 μ m. (B) *rvs167* Δ cells expressing Ina1-GFP were grown in a glucose-containing medium in exponential phase and observed by fluorescence microscopy before and after treatment with 2DG for 4h. Scale bar: 5 μ m. (C) Schematic showing Ina1 predicted primary structure. (D) WT and *npi1* cells expressing Ina1-GFP were grown in a glucose-containing medium in exponential phase and observed by fluorescence microscopy before and after treatment with 2DG for 4h. Scale bar: 5 μ m. (E) WT cells expressing Ina1-GFP were grown in a glucose-containing medium in exponential phase. Total protein extracts were prepared and treated or not with endoglycosidase H (EndoH), and immunoblotted using GFP antibodies. (F) WT cells expressing Ina1-GFP and transformed with either an empty vector or a vector expressing 6xHis-tagged ubiquitin were grown in a glucose-containing medium and treated with 2DG for 1h. Protein extracts were prepared and used to immunoprecipitate Ina1-GFP with GFP-trap. Total extracts and immunoprecipitates were treated with endoglycosidase H and immunoblotted with anti-GFP or anti-6xHis antibodies. • indicate bands revealing ubiquitylated species on both blots. The merge panel corresponds to an aligned overlay of both blots, false-colored (GFP: green, anti-6xHis: red) to show common bands. (G) WT and *rod1* Δ cells expressing Ina1-GFP were grown in a glucose-containing medium in exponential phase and observed by fluorescence microscopy before and after treatment with 2DG for 4h. Scale bar: 5 μ m.

A.



B.



C.

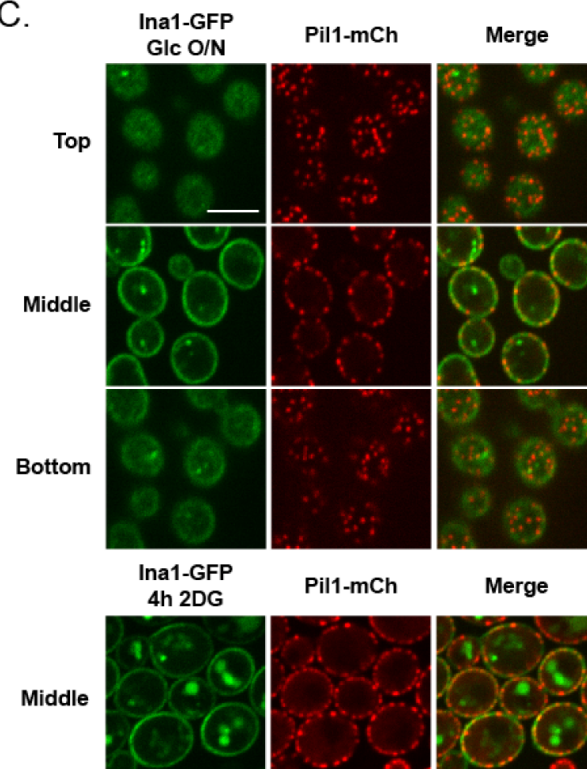


Figure S4 - Ina1, a member of the Pali/SUR7 family, is endocytosed in response to 2DG. (A) Pali/SUR7 family members and predicted topology. **(B)** Microscopy of Sur7-GFP, Seg1-GFP and Pil1-GFP before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μ m. **(C)** Spinning-disk confocal fluorescent microscopy of WT cells expressing Ina1-GFP and the eisosomal marker Pil1-mCherry before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μ m.

Ina1 endocytosis depends on the canonical Rsp5/arrestin-dependent endocytosis

Although nutrient transporters endocytosis is known to require their prior ubiquitylation by Rsp5 and arrestin-related trafficking adaptors (ART), much less is known concerning the endocytosis

of other types of plasma membrane proteins. The alpha-peptide pheromone receptor Ste2, a GPCR, also requires Rsp5 and ART proteins (Alvaro et al., 2016; Alvaro et al., 2014). However, the internalization of Slg1/Wsc1, a transmembrane sensor of cell wall integrity, occurs through direct interaction with the endocytic component Sla1 through its NPFxD motif (Piao et al., 2007).

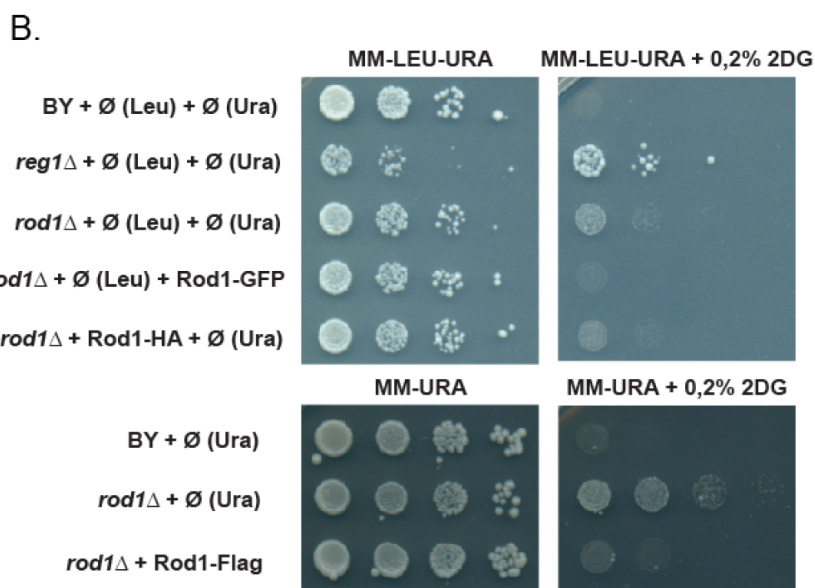
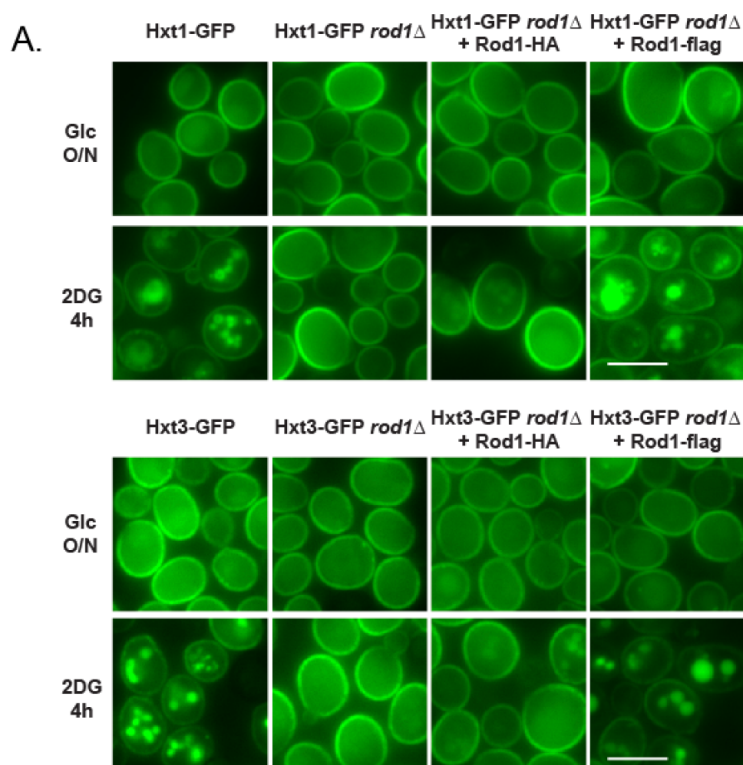
We studied the dependence of Ina1 endocytosis on Rsp5, Ina1 ubiquitylation, and ART proteins. The 2DG-induced endocytosis of Ina1 no longer occurred in a hypomorphic mutant (*npi1*) of the essential *RSP5* gene (Hein et al., 1995) (Fig 2D). To further demonstrate that Ina1-GFP is indeed ubiquitylated during its endocytosis, we expressed a 6xHis-tagged ubiquitin, purified Ina1-GFP in denaturing conditions using nanobodies and immunoblotted for the presence of 6xHis-tagged in the immunoprecipitate. Before loading, samples were treated with endoglycosidase because we found that Ina1-GFP migrated at an apparent molecular weight of ≥ 250 kDa, far above its predicted molecular weight (102 kDa), and deglycosylation of the sample with endoglycosidase H revealed that this shift could be attributed to N-glycosylation (Fig 2E), as predicted from the primary structure of Ina1 (Fig 2C). The results show that Ina1-GFP ubiquitylation was increased in response to 2DG at early stages of its endocytosis (1h), and was also partially degraded, with the appearance of a GFP moiety reminiscent of its vacuolar degradation (Fig 2F). Altogether, these findings demonstrate that the endocytosis of Ina1, a novel type of endocytic cargo, relies on Rsp5 and correlates with its ubiquitylation. In line with our previous conclusions, the single deletion of *ROD1* almost totally abolished Ina-GFP endocytosis and degradation (Fig 2G). Therefore, Rod1 is involved in the endocytosis of this new type of cargo in response to 2DG.

2DG leads to Rod1 dephosphorylation and ubiquitylation by transiently inducing PP1 activity

We then focused on understanding how Rod1 function is so tightly linked to 2-deoxyglucose as an endocytic signal. As initially demonstrated in the case of glucose-induced endocytosis, Rod1 activity in endocytosis is regulated through its changes in post-translational modifications (Becuwe et al., 2012; Llopis-Torregrosa et al., 2016). In a glucose-deprived medium, the yeast AMPK kinase Snf1 is active and phosphorylates Rod1, inhibiting its function (Becuwe and Leon, 2014; Llopis-Torregrosa et al., 2016; Shinoda and Kikuchi, 2007, Becuwe, 2012 #21). Conversely, glucose addition in the medium leads to Rod1 dephosphorylation in a Protein Phosphatase-1 (PP1)-dependent manner, followed by its ubiquitylation by the ubiquitin ligase Rsp5 (Becuwe et al., 2012; Llopis-Torregrosa et al., 2016). These modifications were proposed to promote its function as an Rsp5 adaptor, leading to transporter ubiquitylation, endocytosis and vacuolar sorting (Becuwe and Leon, 2014; Becuwe et al., 2012; Llopis-Torregrosa et al., 2016). Similarly, 2DG addition to glucose-grown cells triggers Rod1 ubiquitylation in an Rsp5- and PP1-dependent manner, but paradoxically was also reported to increase Snf1 activity (O'Donnell et al., 2015; O'Donnell and Schmidt, 2019). Thus, how 2DG

regulates the relative activities of Snf1/PP1 and how this impacts on Rod1 activity are not fully understood.

First, we realized that although tagging Rod1 with a 3HA epitope did not alter its function in the glucose-induced endocytosis of Jen1 (Becuwe et al., 2012), this tagged version was unable to restore the 2DG-induced endocytosis of Hxt1- and Hxt3-GFP when expressed in a *rod1* Δ context (Fig S5A). Consequently, we turned to another epitope-tagged Rod1 construct (Flag) which functionally behaved like the wild-type protein (Fig S5A and B).



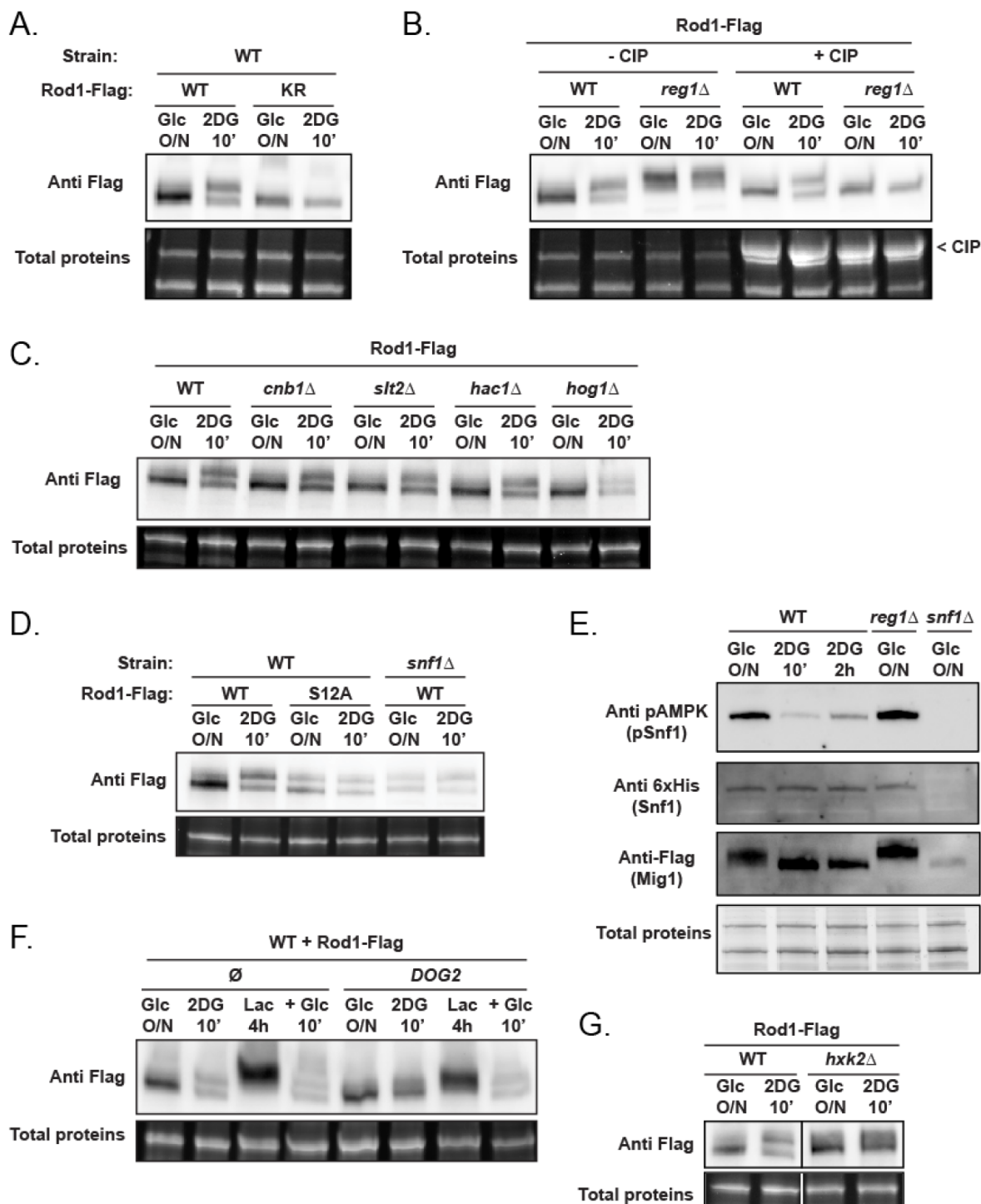
(Page before) Figure S5 - Expression of Rod1-3HA does not restore endocytosis nor sensitivity to 2DG in a *rod1*Δ context, contrary to Rod1-Flag. (A) The indicated strains were observed by fluorescence microscopy after growth in a glucose-containing medium and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μm. (B) Serial dilutions of cultures of the indicated mutants were spotted on minimal medium (MM) or MM + 0,2% 2DG and grown for 3 days at 30°C.

Then, using the Flag-tagged constructs, we observed drastic changes in the post-translational modifications of Rod1-Flag in response to 2DG, as previously reported for Rod1-3HA (O'Donnell et al., 2015). The diffuse band given by the Rod1-Flag signal obtained from glucose-grown cells resulted from a mild phosphorylation, as determined by phosphatase treatment, and reminiscent of observations made for Rod1-3HA (Becuwe et al., 2012; O'Donnell et al., 2015) (Fig 3A). This pattern gave rise to two discrete bands upon 2DG exposure (Fig 3A). As described previously (Becuwe et al., 2012; O'Donnell et al., 2015), the upper band corresponded to ubiquitylated Rod1, as shown by its disappearance when mutation of the known ubiquitylated lysine(s) on Rod1 (Fig 3A). The lower band corresponded to a dephosphorylated species of Rod1, as demonstrated by the fact that it migrated similarly as Rod1-Flag from phosphatase-treated extracts (Fig 3B). This fitted with previous results obtained in the context of glucose-induced endocytosis showing that glucose treatment of lactate-grown cells led to Rod1 ubiquitylation, which was preceded by its PP1-dependent dephosphorylation. In line with these observations, the migration pattern of Rod1 was not affected by 2DG treatment in the *reg1*Δ mutant (Fig 3B) whereas mutations in a described Rod1 phosphatase, calcineurin (*cnb1*Δ) (Alvaro et al., 2016; Alvaro et al., 2014) or in various signaling pathways whose activation is triggered by 2DG treatment (Defenouillère et al., 2019) (MAPK= *slt2*Δ, *hog1*Δ; UPR: *hac1*Δ) did not have an effect on Rod1 modifications (Fig 3C). This suggested that PP1 activity is required for the 2DG-induced dephosphorylation of Rod1. Moreover, the mutation of 12 serine residues in the context of potential Snf1 consensus sequences (Alvaro et al., 2016) led to a comparable profile even before 2DG treatment, further suggesting that lack of Rod1 phosphorylation mimics the situation observed in the presence of 2DG (Fig 3D). Thus, we hypothesized that 2DG treatment leads to a transient activation of PP1, leading to the rapid dephosphorylation and subsequent ubiquitylation of Rod1.

Intriguingly, 2DG was previously proposed to induce a mild phosphorylation (activation) of Snf1 after 1h treatment with 2DG (McCartney et al., 2014). Yet, when looking within minutes after treatment, we found that instead 2DG led to a strong decrease in Snf1 phosphorylation (Fig 3E). This was accompanied by the dephosphorylation of the Snf1 substrate Mig1, confirming our results obtained on Rod1. Thus, 2DG treatment leads to a fast inhibition of Snf1. Of note, this did not happen in a *reg1*Δ mutant, suggesting either that 2DG had no effect in this mutant, or that PP1 is required for dephosphorylation. Given that *reg1*Δ cells are still able to react to 2DG (eg. endocytosis, see Fig 4C), we favor the hypothesis by which 2DG, akin to the effect of glucose when added to

glucose-starved cells, transiently activates PP1 and thus, leads to Snf1 inhibition and the direct or indirect dephosphorylation of Snf1 substrates such as Mig1 or Rod1.

The 2DG-elicited changes in Rod1 post-translational modifications did not occur in cells overexpressing the 2DG-6-P phosphatase Dog2, which detoxifies 2DG-6-P (Fig 3F). Similar results were obtained in the *hxx2Δ* hexokinase mutant, on which 2DG treatment had virtually no effect (Fig 3G). Thus, despite the fact that *in vitro* assays showed that Hxx1 and Hxx2 are equally able to phosphorylate 2DG (Soncini et al., 2020), Hxx2 is paramount to couple the presence of 2DG to Rod1 dephosphorylation.



(Page before) Figure 3 - Following 2DG treatment, Rod1 is dephosphorylated in a PP1-dependent manner. (A) Total protein extracts of WT cells expressing either Rod1-Flag or Rod1-KR-Flag were prepared before and after 2DG addition for 10', and immunoblotted using an anti-Flag antibody. (B) Total protein extracts of WT or *reg1Δ* cells expressing Rod1-Flag were prepared before and after 2DG addition for 10', and immunoblotted using an anti-Flag antibody. Samples were dephosphorylated by CIP where indicated. (C) Total protein extracts of WT, *cnb1Δ*, *slt2Δ*, *hac1Δ*, or *hog1Δ* expressing Rod1-Flag were prepared before and after 2DG addition for 10', and immunoblotted using an anti-Flag antibody. (D) Total protein extract of WT or *snf1Δ* cells expressing Rod1-Flag or Rod1-S12A-Flag were prepared before and after 2DG addition for 10' using an anti-Flag antibody. (E) Total protein extracts of WT, *reg1Δ* and *snf1Δ* cells expressing Mig1-Flag were prepared before and after 2DG addition for 10' and 2h and immunoblotted using anti-AMPK-P, anti-polyHistidine and anti-Flag antibodies. (F) Total protein extracts of WT cells expressing Rod1-Flag and transformed with an empty vector or a vector containing *pGPD-DOG2* were prepared after growth in the indicated conditions, and were immunoblotted using an anti-Flag antibody. (G) Total protein extract of WT and *hxx2Δ* expressing Rod1-Flag were prepared before and after 2DG treatment for 10' and immunoblotted using an anti-Flag antibody.

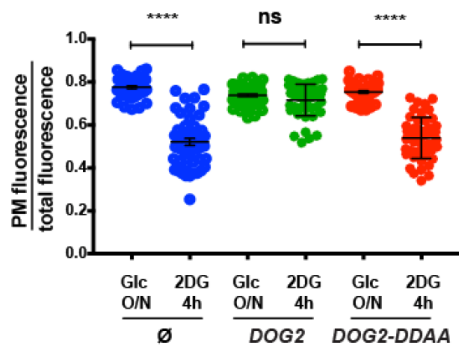
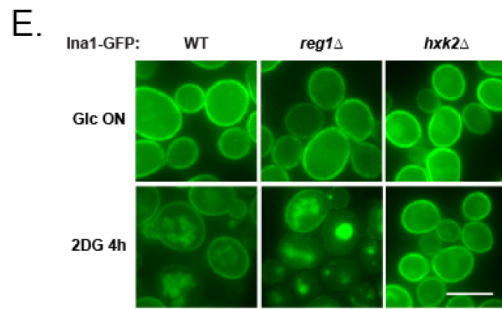
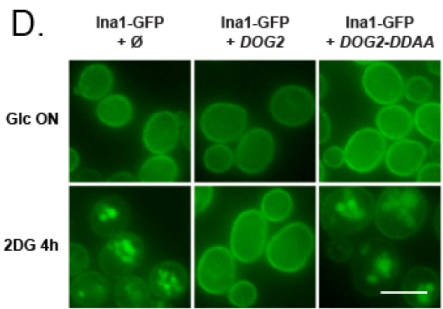
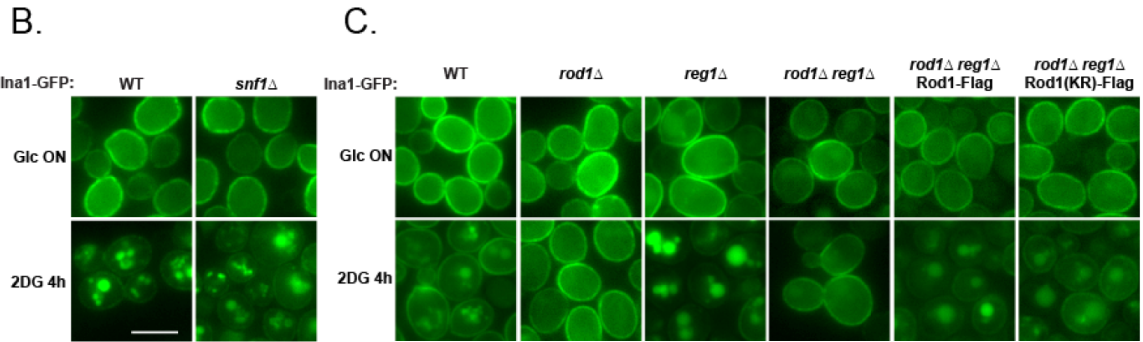
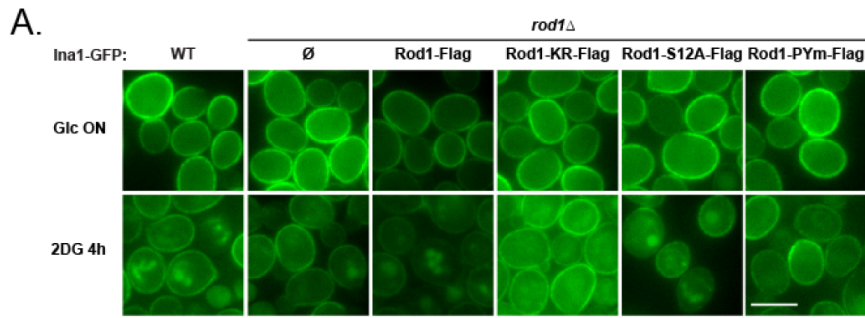
2DG-induced post-translational modifications of Rod1 are required for 2DG-induced endocytosis

Having confirmed how Rod1-Flag is post-translationally modified in response to 2DG, we then assessed the functional consequences abrogating these modifications on the function of Rod1 in endocytosis. For this, we used Ina1-GFP as a model cargo because, unlike Hxt1 or Hxt3 (O'Donnell et al., 2015), its expression is neither glucose-regulated nor is influenced by the deletion of *SNF1* or *REG1* (see below). Mutation of ubiquitylation site(s) in Rod1 resulted in a slow down of Ina1 endocytosis, whereas mutation of the PPxY motifs preventing the interaction with Rsp5 completely abolished it (Fig 4A). Interestingly, despite the fact that Rod1-S12A-Flag appeared constitutively dephosphorylated/ ubiquitylated (see Fig 3D), it was not constitutively active since Ina1-GFP endocytosis still relied on 2DG addition. Accordingly, Ina1 endocytosis was still regulated by 2DG in the *snf1Δ* mutant (Fig 4B), and we observed the same for the endocytosis of other Rod1 cargoes such as the inositol transporter Itr1 or the ABC transporter Pdr12 (Fig S6A). Thus, Rod1 dephosphorylation is not sufficient to trigger endocytosis, suggesting yet an additional level of regulation.

Conversely, we looked at Ina1-GFP endocytosis in the *reg1Δ* mutant, in which Rod1 is not subject to dephosphorylation or ubiquitylation in response to 2DG (see Fig 3B). However, despite the lack of changes in Rod1 post-translational modifications, the *reg1Δ* strain was still able to endocytose Ina1-GFP (Fig 4B). Similar observations were made for other Rod1 cargoes such as Hxt2 and Itr1 (Fig S6B). Given that phosphorylated Rod1 is usually considered as inactive, this finding was surprising and so we looked whether endocytosis in the *reg1Δ* still occurs in a Rod1-dependent manner. In a *reg1Δ rod1Δ* double mutant, Ina1 endocytosis no longer occurred after 2DG treatment, demonstrating that endocytosis in *reg1Δ* still depends on Rod1 despite the apparent lack of post-translational modifications (Fig 4C). This was confirmed by the use of a non-ubiquitylatable version of Rod1 (Rod1-KR) (Becuwe et al., 2012) in the context of a *reg1Δ rod1Δ* mutant: despite its lack of ubiquitylation, Rod1-KR was able to restore endocytosis to WT levels (Fig 4C). These results have several important implications. First, they demonstrate that in the *reg1Δ* genetic context, Rod1

modifications are not required for endocytosis, suggesting that a slightly different mechanism controls endocytosis from that in WT cells. Second, they also prove that 2DG is able to elicit some of its cellular effects independently of PP1 activation, and thus that PP1 is not the only 2DG-responsive pathway. Third, despite its strong resistance to 2DG and the constitutive activity of Snf1 in this strain, the *reg1Δ* strain still responded to 2DG addition as it is able to initiate endocytosis, suggesting that its resistance is not due to a complete lack of effect of 2DG (i.e. import defect or detoxification). In contrast, 2DG-induced endocytosis was abolished when Dog2 was overexpressed, but not its catalytic-dead mutant (Dog2-DDAA) (Fig 4D). A similar block in 2DG-induced endocytosis was also observed in the *hxx2Δ* mutant, once again in line with the idea that 2DG requires Hxx2 to induce cellular defects *in vivo* (Fig 4E).

(Next page) Figure 4 - Rod1 ubiquitylation and interaction with Rsp5 are required for the 2DG-dependent endocytosis of Ina1-GFP (A) WT or *rod1Δ* cells expressing the various *ROD1*-Flag constructs were grown in a glucose-containing medium and observed by fluorescence microscopy before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μm (B) WT or *snf1Δ* cells expressing Ina1-GFP were grown in a glucose-containing medium and observed by fluorescence microscopy before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μm (C) WT, *rod1Δ*, *reg1Δ*, *rod1Δreg1Δ*, and *rod1Δreg1Δ* + Rod1-Flag or Rod1-KR-Flag expressing Ina1-GFP were grown in a glucose-containing medium and observed by fluorescence microscopy before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μm (D) *Top*, WT cells expressing Ina1-GFP and transformed with an empty plasmid, or with plasmids allowing the overexpression of *DOG2* or its catalytic mutant *DOG2-DDAA* were grown in a glucose-containing medium and observed by fluorescence microscopy before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μm. *Bottom*, Quantification of the ratio of fluorescence at the PM on total fluorescence (ANOVA test, n = 100) (E) WT, *reg1Δ* or *hxx2Δ* cells expressing Ina1-GFP were grown in a glucose-containing medium and observed by fluorescence microscopy before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μm.



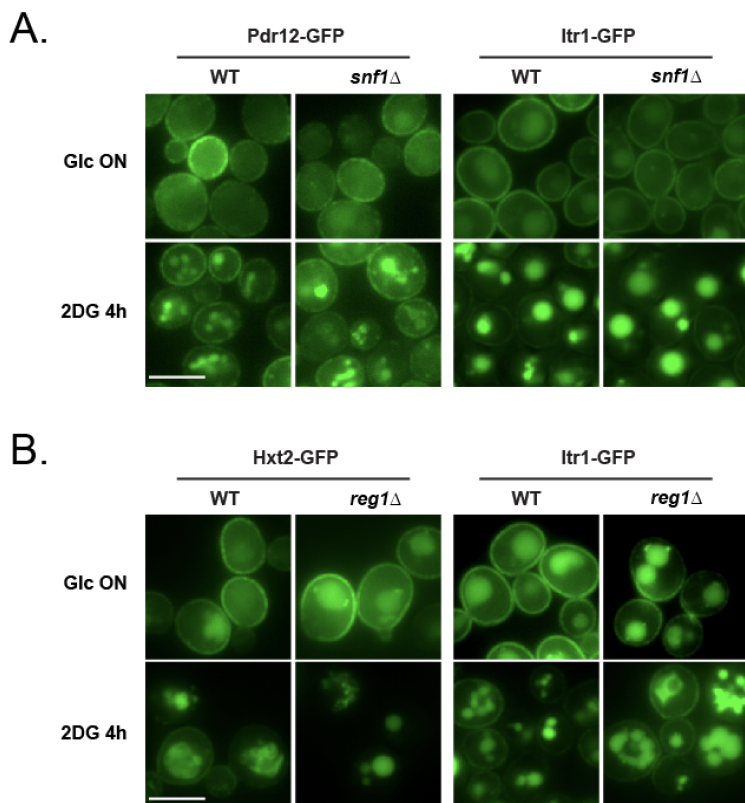


Figure S6 - *SNF1* or *REG1* deletion are not sufficient to block endocytosis in response to 2DG. (A) Pdr12-GFP, Pdr12-GFP *snf1* Δ , Itr1-GFP and Itr1-GFP *snf1* Δ cells were grown in a glucose-containing medium and observed by fluorescence microscopy before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μ m (B) Hxt2-GFP, Hxt2-GFP *reg1* Δ , Itr1-GFP and Itr1-GFP *reg1* Δ cells were grown in a glucose-containing medium and observed by fluorescence microscopy before and after 2DG treatment for 4h. Scale bar, 5 μ m

Low affinity glucose transporters are required for the resistance displayed by the Rod1 mutant

A previous study (Ralser et al., 2008) revealed that the deletion of *ROD1* leads to 2DG resistance. Moreover, a strain deleted for both *ROD1* and its paralogue *ROG3* is even more resistant (O'Donnell et al., 2015). Yet, the precise mechanism by which the mutation of (an) arrestin(s) can cause 2DG resistance is not understood. We previously described that a frequent strategy leading to 2DG resistance involves an increased expression of the Dog2 phosphatase at the transcriptional level (Defenouillère et al., 2019). However, using a *pDOG2::LacZ* reporter, we found that this was not the case in the *rod1* Δ mutant, suggesting a distinct mechanism (Fig 5A).

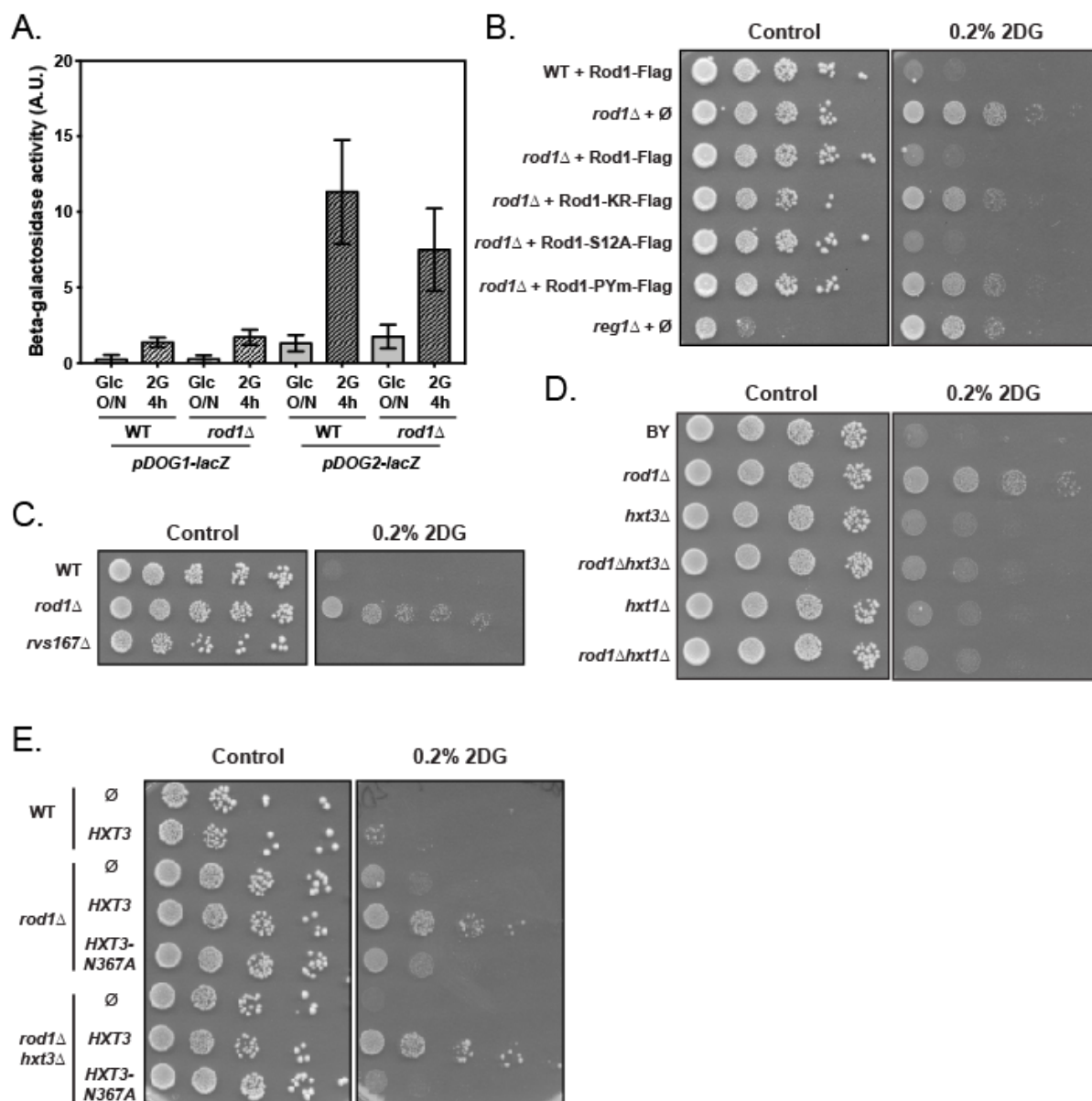
Point mutations on Rod1-Flag at its site(s) of ubiquitylation or on its Rsp5-interacting motifs led to 2DG resistance (Fig 5B) (O'Donnell et al., 2015), thus 2DG resistance correlates with its activity in endocytosis. Since Rod1 has a central role in plasma membrane protein remodeling by 2DG (Fig 1D and Fig S2), we first hypothesized that the 2DG-mediated activation of Rod1 might trigger excessive endocytosis that is deleterious for the cell, which could be ameliorated by *ROD1* deletion. Importantly, deletion of the gene encoding the amphiphysin orthologue *RVS167*, involved in endocytosis, did not result in 2DG resistance, but rather in 2DG sensitivity indicating that a global endocytosis blockade does not promote 2DG resistance (Fig 5C). Thus, it seems that only a selective endocytosis defect such as that observed in the *rod1* Δ (or *rod1* Δ *rog3* Δ) mutant causes 2DG

resistance, and, we postulated that the stabilization of one or more of the Rod1-regulated cargoes at the plasma membrane may lead to 2DG resistance.

The hypersensitivity of the *snf1Δ* mutant to 2DG is rescued by overexpression of the low affinity hexose transporters, Hxt1 and Hxt3, through an unknown mechanism (O'Donnell et al., 2015). Moreover, duplication of a chromosomal region containing glucose transporter genes (*HXT3*, *HXT6* and *HXT7*) was also associated with 2DG-resistance (Barney et al., 2021). Since these transporters are not endocytosed in the *rod1Δ* mutant (Fig 1D, S2, and O'Donnell et al., 2015), we considered that their stabilization could contribute to the resistance mechanism of this mutant. Indeed, the deletion of either *HXT3* or *HXT1* abolished the resistance of the *rod1Δ* mutant strain (Fig 5D). This suggests that both transporters are required for the 2DG resistance displayed by the *rod1Δ* strain.

The growth defect of the obtained *rod1Δ hxt3Δ* strain was restored by expressing a GFP-tagged version of Hxt3 from a low-copy (centromeric) plasmid and driven by its own promoter (Fig 5E). This mild overexpression of Hxt3 also increased resistance to 2DG of WT cells but also of the already resistant *rod1Δ* strain. Thus, glucose transport correlates with 2DG resistance. Structure/function studies of transporters (reviewed in Yan, 2017) identified residues critical for hexose binding and translocation. In particular, residue N317 of the human glucose transporter GLUT1 binds glucose (Deng et al., 2014; Mueckler and Makepeace, 2009) and mutation of the corresponding residue in yeast transporters alters substrate specificity and transport (Farwick et al., 2014; Nijland et al., 2014; Shin et al., 2015). Particularly, mutation of this residue in Hxt1 (N370A) abolished glucose uptake (Roy et al., 2015). We mutated the corresponding residue in Hxt3 (N367A) and evaluated its functionality in 2DG resistance. We observed that expression of the Hxt3-N367A mutant no longer rescued growth on 2DG, suggesting that transport is required for 2DG resistance (Fig 5E). Since 2DG and glucose use the same transporters to go across the membrane, whether (1) it is glucose or 2DG transport and (2) with which directionality (import or export) will need to be established in the near future.

(Next page) Figure 5 - Low affinity glucose transporters are required for the resistance of the *rod1Δ* mutant to 2DG (A) Beta-galactosidase assays of WT and *rod1Δ* cells expressing *LacZ* under the control of the *pDOG1* or *pDOG2* promoters, before and after 2DG treatments for 4h (+/- SEM, n=3 independent experiments, t test). A.U., arbitrary units. (B-E) Serial dilutions of cultures of the indicated strains were spotted on SC medium or SC + 0,2% 2DG medium and grown for 3 days at 30°C.



Discussion

Several strategies are known to modulate 2DG sensitivity/resistance in yeast (Laussel and Leon, 2020). The most common mechanism is through the aberrant activation of the AMPK orthologue, Snf1, either by gain-of-function mutation in constituents of the AMPK heterotrimeric complex, or by loss-of-function mutations of its inhibitory phosphatase (PP1: Glc7/Reg1) (Laussel and Leon, 2020; Soncini et al., 2020). Although it is unclear how AMPK hyperactivation contributes to 2DG resistance, it seems that this partially occurs through the expression of the detoxification enzyme Dog2, which is overexpressed in conditions of AMPK activation (Defenouillère et al., 2019). Mutations in other genes such as that encoding the arrestin Rod1 also cause 2DG resistance but do not impact on Snf1 activity - rather, Rod1 is a substrate of Snf1 (Shinoda and Kikuchi, 2007) and thus could contribute to the resistance mechanism observed when Snf1 is hyperactive.

In this study, we reveal that 2DG acts as a strong endocytosis signal, leading to the endocytosis of many plasma membrane proteins. These include a GPCR (Ste2) as well as various classes of transporters, such as permeases for glucose, amino-acids or other nutrients, and other types of solute carriers such as multidrug transporters of the major facilitator superfamily (MFS) or ATP-binding cassette (ABC) types. Additionally, we show that Ina1, a protein of unknown function and member of the SUR7/Pall family, is also endocytosed in this condition and is thus the first member of this family for which endocytosis is described. Our results show that endocytosis of Ina1 follows a canonical Rsp5- and arrestin-dependent route, thus extending the mechanism of endocytosis initially described for transporters (Egner and Kuchler, 1996; Galan et al., 1996; Hein et al., 1995; Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009; Nikko et al., 2008) and receptors (Alvaro et al., 2016; Alvaro et al., 2014; Hicke and Riezman, 1996) to this new class of proteins. The metabolic blockade caused by 2DG thus triggers a major remodeling of the plasma membrane proteome, which could contribute to the toxicity of this drug. This massive endocytosis and degradation of membrane proteins is also reminiscent of that observed in other situations of metabolic stresses such as acute glucose (Lang et al., 2014) or nitrogen (Müller et al., 2015) starvation. Because 2DG is an artificial molecule, the observed endocytosis is unlikely to originate from an adaptation strategy but rather informs us that 2DG unleashes endocytosis by means that had remained to be explored.

Our work highlights a major role of the arrestin Rod1 in 2DG-induced endocytosis. It was previously found that Rod1 participates in the endocytosis of the glucose transporters Hxt1 and Hxt3 upon 2DG treatment (O'Donnell et al., 2015). We extend these findings and found that many other membrane proteins require Rod1 for their 2DG-induced downregulation. Thus, a sudden activation of Rod1 might at least partially explain the observed endocytosis in response to 2DG. Rod1 is known to be regulated by phosphorylation and ubiquitylation (Alvaro et al., 2016; Becuwe et al., 2012; Llopis-Torregrosa et al., 2016; Shinoda and Kikuchi, 2007) and previous work showed that Rod1 post-translational modifications are altered after 2DG treatment (O'Donnell et al., 2015) which could thus regulate its activity in these conditions, as detailed below.

Several reports focusing on the regulation of Rod1 by glucose availability showed that phosphorylated Rod1 is inactive, and that Rod1 dephosphorylation and its subsequent ubiquitylation are required for its activity in endocytosis (Becuwe et al., 2012; Llopis-Torregrosa et al., 2016). Phosphorylation is a frequent mechanism for arrestin inhibition (Becuwe et al., 2012; Lee et al., 2019; MacGurn et al., 2011; Merhi and André, 2012), perhaps by introducing negative charges that may hinder transporter interactions (Ivashov et al., 2020) (reviewed in Kahlhofer et al., 2021). On the other hand, arrestin ubiquitylation is often required for their function (Becuwe et al., 2012; Lin et al., 2008; Merhi and André, 2012) and this may favor interaction with Rsp5 and thus the Rsp5-mediated ubiquitylation of transporters (MacDonald et al., 2020). Thus, the observed dephosphorylation and

ubiquitylation of Rod1 in response to 2DG (this study and O'Donnell et al., 2015) likely provides the basis for the observed increase in Rod1-dependent endocytic trafficking.

One question that remained open was how 2DG can trigger these changes, given that the precise effect of 2DG on Rod1 regulatory kinases or phosphatase is unclear. 2DG triggers AMPK activation in mammalian cells [REF], and a similar but milder effect was reported for Snf1 in yeast (McCartney et al., 2014). Yet, this 2DG-mediated activation of Snf1 did not translate into an increased phosphorylation of its well-established substrate Mig1, and the observed post-translational modifications on its other target, Rod1, in response to 2DG are not in line with an increased Snf1 activity. Instead, we observed that shortly after 2DG addition, Snf1 phosphorylation was instead decreased, suggesting Snf1 is inhibited. This likely occurred through an increased activity of (or accessibility to) its cognate phosphatase PP1 (Reg1/Glc7) (Rubenstein et al., 2008; Tu and Carlson, 1994) and accordingly, phosphorylation of the Snf1/PP1 target Mig1 also decreased in response to 2DG. Since Rod1 requires PP1 for its dephosphorylation in response to glucose (Becuwe et al., 2012; Llopis-Torregrosa et al., 2016) or 2DG (this study and O'Donnell et al., 2015), we believe that a sudden 2DG-mediated increase in PP1 activity could explain why Rod1 is activated in this condition.

This is reminiscent of the activation of PP1 observed when glucose is added to cells deprived of glucose (Castermans et al., 2012). However, PP1 (Glc7/Reg1) activity in glucose-grown cells is already high (Rubenstein et al., 2008; Tu and Carlson, 1994), so how may 2DG further increase this activity? We found that the 2DG-mediated dephosphorylation of Rod1 did not occur in the *hvk2Δ* strain, lacking the main hexokinase isoform which phosphorylates 2DG into 2DG-6-P, nor in strains overexpressing the 2DG-6-P phosphatase Dog2, which converts 2DG-6-P back into 2DG. This suggests that 2DG-6-P, or a derived metabolite, promotes this surge of PP1 activity, perhaps because 2DG6P accumulates at high levels in cells following its almost complete lack of metabolism (reviewed in Laussel and Leon, 2020). However, the molecular mechanism by which PP1 could be activated in these conditions is not elucidated. Altogether, our data strongly suggest that shortly after treatment, 2DG mimics glucose excess rather than starvation, and that part of the early 2DG response involves a boost in PP1 activity. However, other mechanisms are at stake because endocytosis was still triggered by 2DG even in *reg1Δ* cells, suggesting that other signaling pathways contribute to 2DG sensing and response. This includes, but may not be limited to, stress-signaling pathways such as the UPR or cell-wall integrity signaling (Defenouillère et al., 2019).

Whether the 2DG resistance observed in the *rod1Δ* strain was directly linked to the role of Rod1 in 2DG-mediated endocytosis was not fully demonstrated. Evidence obtained using point mutants of Rod1 affected for its function in endocytosis suggested a correlation between the loss of Rod1-mediated endocytosis and 2DG resistance. Of all the transporters that are downregulated upon 2DG treatment, we show that the stabilization of Hxt1 and Hxt3 at the plasma membrane is necessary for the 2DG resistance observed in the *rod1Δ* strain. This is in line with previous studies

demonstrating that overexpression of low-affinity glucose transporters contributes to 2DG resistance (O'Donnell et al., 2015).

A previously proposed hypothesis suggests that the maintenance of transporters at the plasma membrane may allow the continuation of glucose import and thus prevent a potential 2DG-induced glucose starvation (O'Donnell et al., 2015). While this remains possible, we believe that this is unlikely because 2DG6P inhibits hexokinase and thus blocks glucose phosphorylation, which itself drives glucose import (Bisson and Fraenkel, 1983; reviewed in Lagunas, 1993). Thus, increasing transporter availability should not increase glucose import nor glycolysis. Rather, we propose that maintenance of low affinity glucose transporters at the membrane allows 2DG export from the cells, after it has been generated by dephosphorylation of 2DG-6-P. Indeed, we previously found that 2DG triggers the induction of the Dog1 and Dog2 phosphatases which detoxicate 2DG-6-P into 2DG (Defenouillère et al., 2019). 2DG could then presumably be exported when its cytosolic concentration is higher than that of the medium, but this is only possible if transporters are maintained at the plasma membrane. Preventing Hxt3 endocytosis could thus allow cells to complete the detoxification initiated by the 2DG6P phosphatases. This hypothesis is supported by the fact that (i) we showed transport across the membrane is required to confer resistance, (ii) the same transport systems are used both for 2DG and glucose (van Steveninck, 1968), and (iii) proteins of the GLUT/HXT family support bidirectional fluxes across the membrane (as shown for GLUT2 in hepatocytes, reviewed in Mueckler and Thorens, 2013). Further work aimed at measuring 2DG release from cells will allow testing of this model (Fig 6).

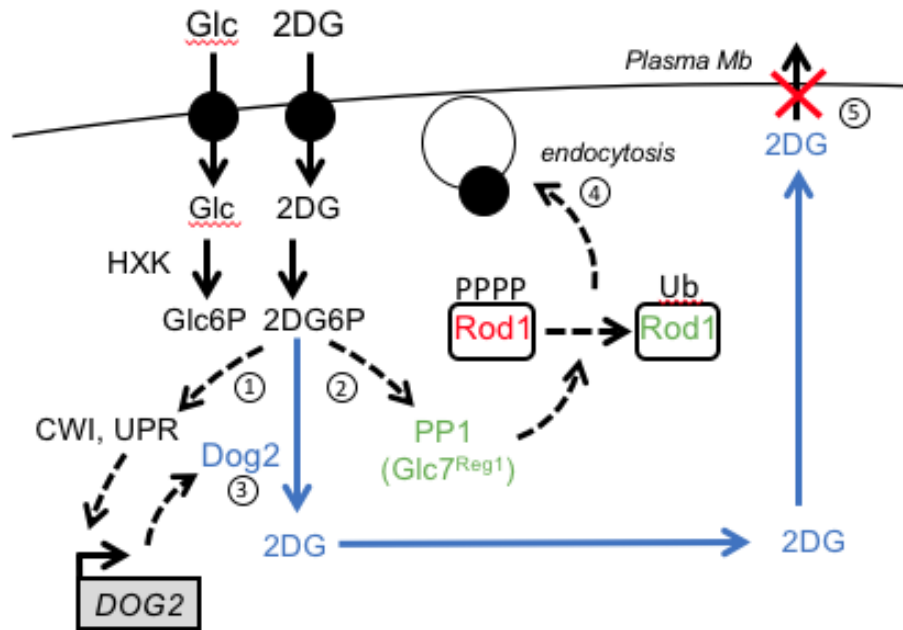


Figure 6 - Hypothetical model for a role of hexose transporters in 2DG detoxification. Treatment of cells with 2DG triggers the accumulation of intracellular 2DG6P. This activates stress-signaling pathways such as cell-wall integrity signaling (CWI) or the unfolded protein response (UPR), converging onto *DOG2* expression (1) (Defenouillère et al., 2019). On the other hand, 2DG6P elicits a fast PP1 activation (2) which causes Rod1 dephosphorylation. By the time Dog2 is induced and begins to dephosphorylate 2DG6P (3), Rod1 has already triggered the endocytosis of many plasma membrane proteins (4), including that of low affinity glucose transporters. (5) This may prevent 2DG exit and detoxification.

Materials and Methods

Yeast strain construction and growth conditions

All yeast strains used in this study derive from the *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 or BY4742 background and are listed in [table S1](#). Apart from the mutant strains obtained from the yeast deletion collection (Euroscarf) and the fluorescent GFP-tagged strains originating from the yeast GFP clone collection (Huh, 2003 #123), all yeast strains were constructed by transformation with the standard lithium acetate–polyethylene glycol protocol using homologous recombination and verified by polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA prepared with a lithium acetate (200 mM)/SDS (0.1%) method (104). Yeast cells were grown in YPD medium (2%) or in SC medium [containing yeast nitrogen base (1.7 g/liter; MP Biomedicals), ammonium sulfate (5 g/liter; Sigma-Aldrich), the appropriate drop-out amino acid preparations (MP Biomedicals), and 2% (w/v) glucose, unless otherwise indicated]. Alternatively, SC medium could contain 0.5% lactate as a carbon source (from a 5% stock adjusted to pH 5; Sigma-Aldrich). Precultures of 4 ml were incubated at 30°C for 8 hours and diluted in fresh medium on the evening to 20-ml cultures grown overnight with inoculation optical densities at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.0003 for YPD and 0.001 for SC medium, giving a culture at mid-log phase the next morning. For glucose-depletion experiments, cultures were centrifuged and resuspended in an equal volume of SC/lactate medium and incubated at 30°C during the indicated times. For 2DG treatment, the compound was added to mid-log phase yeast cultures grown overnight to final concentrations of 0.2% (w/v) and incubated for the indicated times. 2DG was purchased from Sigma-Aldrich. All reagents are listed in [table S3](#).

Plasmid construction

All plasmids used in this study are listed in [table S2](#).

Plasmid pSL553 (pRS313-based, $p_{ROD1}:ROD1$ -NcoI-Flag) was generated by site-directed mutagenesis on pSL234 (pRS313-based, $p_{ROD1}:ROD1$ -Flag, a kind gift of O. Vincent, CSIC, Madrid, Spain) to integrate a NcoI site between *ROD1* and the Flag-tag, allowing to substitute the WT ORF of *ROD1* by mutated versions at Sall-NcoI sites as follows.

The inserts $p_{ROD1}:ROD1$ -WT-NcoI-Flag (pSL559), $p_{ROD1}:ROD1$ -PYm-NcoI-Flag (pSL560) $p_{ROD1}:ROD1$ -S12A-NcoI-Flag (pSL561) and $p_{ROD1}:ROD1$ -KR-NcoI-Flag (pSL563) were PCR amplified (oSL1662/oSL1663) using as templates pSL94 ($p_{ROD1}:ROD1$ -3HA) (Becuwe et al., 2012), pSL119 ($p_{ROD1}:ROD1$ -PYm-3HA) (Becuwe et al., 2012), pSL152 ($p_{ROD1}:ROD1$ -S12A-3HA) (unpublished), and pSL147 ($p_{ROD1}:ROD1$ -KR-3HA) (Becuwe et al., 2012) respectively. They were digested with Sall/NotI and cloned at these sites into pSL553 ($p_{ROD1}:ROD1$ -NcoI-Flag).

Plasmid pSL152 was made from a synthetic gene designed to mutate S125, S138, S315, S358, S447, S623, S641, S706, S720, S734, S781, and S821 residues into A, and cloned into pSL94 at the place of WT *ROD1* ($p_{ROD1}:ROD1$ -3HA) (Becuwe et al., 2012) (kind gift of M. Becuwe).

All constructs were verified by sequencing.

Protein extracts and immunoblotting

Yeast were always grown in SC medium. For each protein sample, 1.4 ml of culture was incubated with 100 μ l of 100% TCA for 10 min on ice to precipitate proteins, centrifuged at 16,000g at 4°C for 10 min, and broken for 10 min with glass beads. Lysates were transferred to another 1.5-ml tube and centrifuged for 5 min at 16,000g at 4°C, supernatants were discarded, and protein pellets were resuspended in sample buffer [50 mM tris-HCl (pH 6.8), 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 10% glycerol, complemented with 50 mM tris-base (pH 8.8)] in 50 μ l/OD. Protein samples were heated at 37°C for 5 min and 10 μ l was loaded on SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels (4 to 20% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free, Bio-Rad). After electrophoresis for 30 min, total proteins were visualized by in-gel fluorescence using a trihalo compound incorporated in SDS–PAGE gels (stain-free TGX gels, 4–20%; Bio-Rad) after 45 sec UV-induced photoactivation using a ChemiDoc MP imager (BioRad), serving as a loading control. Gels were transferred on nitrocellulose membranes for 60 min in a liquid transfer system (Bio-Rad). Membranes were blocked in 2% milk for 30 min and incubated for at least 2 hours with the corresponding

primary antibodies. Membranes were washed 3x10 min in Tris-buffered saline solution containing 0.5% Tween-20 (TBST) and incubated for at least an hour with the corresponding secondary antibody (coupled with horseradish peroxidase). Membranes were washed 3x10 min in Tris-buffered saline solution containing 0.5% Tween-20 (TBST) and incubated with SuperSignal™ West Femto reagent (Thermo). Luminescence signals were acquired using a ChemiDoc MP imager (BioRad). Primary and secondary antibodies used in this study as well as their dilutions are listed in [table S3](#).

Treatment of protein extracts with calf intestinal phosphatase (CIP) or Endoglycosidase H (EndoH)

Calf Intestine Phosphatase (Roche ref 11097075001) was used to dephosphorylate proteins prior to electrophoresis. Samples were prepared using 20 µL of TCA protein extract (see “Protein extracts and immunoblotting”, above), to which 20 µL of 10X CIP buffer supplied with the enzyme, as well as 0.6 µL of 1.5M Tris pH 8.8, 0.2 µL 0.1M MgSO₄, and 17.2 µL of H₂O were added. The extract was split in 2 and 0.6U CIP was added to one of the samples. Samples were incubated at 37°C for 3 h, and loaded on SDS-PAGE.

Endoglycosidase H (EndoH) (Promega V4871, 500 U/µL) was used to deglycosylate Ina1. Samples were prepared using 10 µL of TCA protein extract (see “Protein extracts and immunoblotting”, above) to which 2 µL of the supplied buffer, 1 µL of EndoH and 7 µL of water were added. A control sample without EndoH was also prepared. Samples were incubated for 2 h at 37°C and loaded on SDS-PAGE.

Purification of Ina1-GFP for ubiquitylation analysis

Strains expressing Ina1-GFP were transformed with an empty plasmid or a plasmid containing 6xHis-tagged ubiquitin under the control of the promoter of the copper-inducible *CUP1* gene (pSL205). They were grown to the exponential phase before induction with 100µM CuSO₄ and 2DG 0.2% for 1h at 30°C. Around 20 OD of cells were centrifuged at 4,000 g for 5 minutes, the pellets were washed with sterile water and resuspended with 200µl of RIPA buffer (50 mM TRIS /HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% NP-40, 0,5% Na-Deoxycholate, 1% Glycerol) supplemented with protease inhibitor (Roche), 1mM PMSF, 10mM NEM (Sigma) and 0.1mM MG-132 and broken with glass beads for 8 min at 4°C. Lysates were then rotated at 4°C for 15 minutes and centrifuged at 10,000g for 10 min at 4°C. 10µl of GFP-Trap magnetic beads were added to the lysates and rotated overnight at 4°C. After 2 washes with 1.5 mL of wash buffer (50 mM TRIS /HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5% Glycerol) at 4°C and 1 wash with 1.5mL TBST 0.1% at RT, the beads were resuspended with 25µl of boiling buffer (50 mM TRIS, pH =7,5, 1 mM EDTA, 1% SDS, 20% Glycerol) and incubated at 37°C for 30 minutes. 25µl of Urea SDS buffer (150mM TRIS, pH =6.8, 6M Urea, 6% SDS, bromophenol blue) were added and the proteins were incubated for another 30 minutes at 37°C before loading on a 4-12% SDS-PAGE.

beta-Galactosidase assays

beta-Galactosidase assays were performed using 1 ml of mid-log phase yeast cultures carrying the *pDOG1-LacZ* (pSL409) or *pDOG2-LacZ* plasmids (pSL410) (Defenuillère et al., 2019), grown overnight in SC medium without uracil with 2% glucose and switched to the specified conditions. The OD (600 nm) of the culture was measured, and samples were taken and centrifuged at 16,000g at 4°C for 10 min. Cell pellets were snap-frozen in liquid nitrogen and resuspended in 800 µl of buffer Z (pH 7, 50 mM NaH₂PO₄, 45 mM Na₂HPO₄, 10 mM MgSO₄, 10 mM KCl, and 38 mM beta-mercaptoethanol). After addition of 160µl of ONPG (ortho-nitrophenyl-d-galactopyranoside, 4 mg/ml; Sigma-Aldrich - N1127), samples were incubated at 37°C. Enzymatic reactions were stopped in the linear phase (60-min incubation for *pDOG2-LacZ* and 120-min incubation for the *pDOG1-LacZ* plasmid, as per initial tests) (Defenuillère et al., 2019) by addition of 400 µl of Na₂CO₃, and cell debris were discarded by centrifugation at 16,000g. The absorbance of clarified samples was measured with a spectrophotometer set at 420 nm.

Galactosidase activities (arbitrary units) were calculated using the formula $1000 * [A_{420} / (A_{600} * t)]$, where A₄₂₀ refers to the enzyme activity, A₆₀₀ is the turbidity of the culture, and t is the incubation time. Each enzymatic assay was repeated independently at least three times.

Drop tests

Yeast cells grown in liquid-rich or SC medium for at least 6 hours at 30°C were adjusted to an optical density (600 nm) of 1. Serial 10-fold dilutions were prepared in 96-well plates and spotted on plates containing rich or SC medium containing 2% (w/v) agar and, when indicated, 2DG [0.05 or 0.2% (w/v)]. Plates were incubated at 30°C for 3 to 4 days before scanning.

Microscopy

Widefield microscopy. Cells were mounted in synthetic complete medium with the appropriate carbon source and observed with a motorized Olympus BX-61 fluorescence microscope equipped with an Olympus PlanApo 100× oil-immersion objective (1.40 NA), a Spot 4.05 charge-coupled device camera and the MetaVue acquisition software (Molecular Devices; Sunnyvale, CA) and imaged at room temperature. GFP-tagged proteins were visualized using a Chroma GFP II filter (excitation wavelength 440–470 nm). mCh-tagged proteins were visualized using an HcRed I filter (excitation wavelength 525–575 nm). Images were processed in ImageJ (NIH).

Spinning disk. For Fig. S4C, Spinning disk microscopy was used to look at Ina-GFP Pil1-mCherry strain. 1 mL of exponential phase yeast culture was collected in Glc ON and 2DG 4h and centrifuged with 1 μL of 0.1% NP-40 to facilitate sedimentation. Cells were then observed with an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss), equipped with an oil immersion plan apochromat 100× objective NA 1.4, an sCMOS PRIME 95 camera (Photometrics) and a spinning-disk confocal system CSU-X1 (Yokogawa) with the GFP and mCherry filter. The images obtained were then processed with ImageJ and Adobe Illustrator CS5.

CMAC labeling of yeast vacuoles. Vacuolar staining was obtained by incubating cells grown in the desired condition with 100 μM CMAC (stock at 10mM in DMSO - Life Technologies) for 10 min under agitation at 30°C. Cells are then washed twice with water before observations with a fluorescence microscope equipped with a DAPI filter.

FM4-64 labeling of yeast vacuoles (Vida and Emr, 1995). FM4-64 is a dye used to follow the endocytic pathway and to colore vacuoles membranes. Cells were grown overnight in exponential phase, centrifuged and washed twice with minimal medium, and resuspended in 100 μl of MM. 1 μl of FM4-64 stock solution (Invitrogen - 8 mM) was added to the cells. The cells were incubated for 15 min on ice and then centrifuged at 4°C to remove excess FM4-64. They were washed 3 times with water at 4°C and the cell pellets were resuspended in 1 mL of water. A first aliquot of 250 μl at t = 0 min was collected, transferred to 1 tube on ice and 1 mL of water was added to this tube. The cells were centrifuged at 4°C and resuspended in 1 mL of MM and observed directly under the microscope with the mCherry exposure filter. Aliquots were then collected at 15 min, 30 min, 1h, 2h and 4h and the cells were observed under the microscope.

Statistical analysis

Mean values were calculated using a minimum of three independent measurements from three biological replicates and were plotted with error bars representing SEM. Statistical significance was determined using a t test for paired variables assuming a normal distribution of the values, as follows: *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001; ns, P > 0.05 using GraphPad Prism7.

Quantification of endocytosis

Quantification of endocytosis was performed with ImageJ. For each cell, the background of the image was subtracted from the integrated density (area of the region of interest multiplied by the average of the pixel intensity of the region of interest) of the cell and its vacuole. This gives the corrected integrated densities of the cell and its vacuole. The corrected integrated density of the cell was divided by the corrected integrated density of the vacuole. This gives the ratio of fluorescent proteins in the vacuole, and by subtraction, the final ratio of membrane fluorescent proteins. The

ratio of fluorescent proteins at the membrane to fluorescent proteins in the vacuole is shown. At least 100 cells per condition were used to calculate these ratios.

Datas were analyzed and processed with Prism7 software (GraphPad). The statistical test performed was a one-way analysis of variance (ANOVA) test. *: $0.01 < P\text{-value} < 0.05$; **: $0.001 < P\text{-value} < 0.01$; ***: $0.0001 < P\text{-value} < 0.001$; ****: $P\text{-value} < 0.0001$.

Quantification of vacuolar fragmentation

Quantification of vacuolar fragmentation was performed with ImageJ. For each condition and each strain, at least 30 cells were used. Cells with more than 3 vacuoles were considered as cells with highly fragmented vacuoles. The ratio between the number of cells counted and the number of cells with a fragmented vacuole was then made and reported on a graph. This quantification was done blindly, the person performing the quantifications does not know which conditions or strains they are quantifying.

Quantification of Western-blot

Western blot quantifications were performed with ImageJ. The integrated density of proteins of interest was divided by the integrated density of total proteins. Results were normalized to the Glc ON condition of each protein. The ratio of undegraded protein is shown. The experiments were repeated three times.

Datas were analyzed and processed with Prism7 software (GraphPad). The statistical test performed was a one-way analysis of variance (ANOVA) test. *: $0.01 < P\text{-value} < 0.05$; **: $0.001 < P\text{-value} < 0.01$; ***: $0.0001 < P\text{-value} < 0.001$; ****: $P\text{-value} < 0.0001$.

Bibliography

- Alvarez, F.J., L.M. Douglas, A. Rosebrock, and J.B. Konopka. 2008. The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 19:5214-5225.
- Alvaro, C.G., A. Aindow, and J. Thorner. 2016. Differential Phosphorylation Provides a Switch to Control How alpha-Arrestin Rod1 Down-regulates Mating Pheromone Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 203:299-317.
- Alvaro, C.G., A.F. O'Donnell, D.C. Prosser, A.A. Augustine, A. Goldman, J.L. Brodsky, M.S. Cyert, B. Wendland, and J. Thorner. 2014. Specific alpha-arrestins negatively regulate *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response by down-modulating the G-protein-coupled receptor Ste2. *Mol Cell Biol*. 34:2660-2681.
- Babst, M. 2020. Regulation of nutrient transporters by metabolic and environmental stresses. *Curr Opin Cell Biol*. 65:35-41.
- Barban, S. 1962. Studies on the mechanism of resistance to 2-deoxy-D-glucose in mammalian cell cultures. *J Biol Chem*. 237:291-295.
- Barney, J.B., D.G. Chandrashekarappa, S.R. Soncini, and M.C. Schmidt. 2021. Drug resistance in diploid yeast is acquired through dominant alleles, 2 haploinsufficiency, gene duplication and aneuploidy. *Personal communication*.
- Becuwe, M., and S. Leon. 2014. Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *eLife*. 3:03307.
- Becuwe, M., N. Vieira, D. Lara, J. Gomes-Rezende, C. Soares-Cunha, M. Casal, R. Haguenaer-Tsapis, O. Vincent, S. Paiva, and S. Léon. 2012. A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J Cell Biol*. 196:247-259.
- Bisson, L.F., and D.G. Fraenkel. 1983. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80:1730-1734.
- Brachmann, C.B., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, and J.D. Boeke. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 14:115-132.
- Busto, J.V., A. Elting, D. Haase, F. Spira, J. Kuhlman, M. Schafer-Herte, and R. Wedlich-Soldner. 2018. Lateral plasma membrane compartmentalization links protein function and turnover. *EMBO J*. 37.
- Castermans, D., I. Somers, J. Kriel, W. Louwet, S. Wera, M. Versele, V. Janssens, and J.M. Thevelein. 2012. Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell Res*. 22:1058-1077.
- Cocchetti, P., R. Nicastro, and F. Tripodi. 2018. Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell*. 5:482-494.
- De Vit, M.J., J.A. Waddle, and M. Johnston. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Molecular Biology of the Cell*. 8:1603-1618.
- Defenouillère, Q., A. Verraes, C. Laussel, A. Friedrich, J. Schacherer, and S. Leon. 2019. The induction of HAD-like phosphatases by multiple signaling pathways confers resistance to the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose. *Sci Signal*. 12:aaw8000.
- Deng, D., C. Xu, P. Sun, J. Wu, C. Yan, M. Hu, and N. Yan. 2014. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*. 510:121-125.
- Denison, S.H., S. Negrete-Urtasun, J.M. Mingot, J. Tilburn, W.A. Mayer, A. Goel, E.A. Espeso, M.A. Penalva, and H.N. Arst, Jr. 1998. Putative membrane components of signal

- transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol Microbiol.* 30:259-264.
- Egner, R., and K. Kuchler. 1996. The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole. *FEBS Lett.* 378:177-181.
- Farwick, A., S. Bruder, V. Schadeweg, M. Oreb, and E. Boles. 2014. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:5159-5164.
- Galan, J.M., V. Moreau, B. André, C. Volland, and R. Haguenaer-Tsapis. 1996. Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem.* 271:10946-10952.
- Germann, S.M., V. Schramke, R.T. Pedersen, I. Gallina, N. Eckert-Boulet, V.H. Oestergaard, and M. Lisby. 2014. TopBP1/Dpb11 binds DNA anaphase bridges to prevent genome instability. *J Cell Biol.* 204:45-59.
- Gournas, C., S. Gkionis, M. Carquin, L. Twyffels, D. Tyteca, and B. Andre. 2018. Conformation-dependent partitioning of yeast nutrient transporters into starvation-protective membrane domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115:E3145-E3154.
- Hardie, D.G. 2016. Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharm Sin B.* 6:1-19.
- Hein, C., J.Y. Springael, C. Volland, R. Haguenaer-Tsapis, and B. André. 1995. NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol Microbiol.* 18:77-87.
- Hicke, L., and H. Riezman. 1996. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell.* 84:277-287.
- Hosiner, D., G. Sponder, A. Graschopf, S. Reipert, R.J. Schweyen, C. Schuller, and M. Aleschko. 2011. Pun1p is a metal ion-inducible, calcineurin/Crz1p-regulated plasma membrane protein required for cell wall integrity. *Biochim Biophys Acta.* 1808:1108-1119.
- Hovsepian, J., Q. Defenouillere, V. Albanese, L. Vachova, C. Garcia, Z. Palkova, and S. Leon. 2017. Multilevel regulation of an alpha-arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. *J Cell Biol.* 216:1811-1831.
- Huh, W.K., J.V. Falvo, L.C. Gerke, A.S. Carroll, R.W. Howson, J.S. Weissman, and E.K. O'Shea. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature.* 425:686-691.
- Ivashov, V., J. Zimmer, S. Schwabl, J. Kahlhofer, S. Weys, R. Gstir, T. Jakschitz, L. Kremser, G.K. Bonn, H. Lindner, L.A. Huber, S. Leon, O. Schmidt, and D. Teis. 2020. Complementary alpha-arrestin-ubiquitin ligase complexes control nutrient transporter endocytosis in response to amino acids. *eLife.* 9.
- Jones, G.M., J. Stalker, S. Humphray, A. West, T. Cox, J. Rogers, I. Dunham, and G. Prelich. 2008. A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Methods.* 5:239-241.
- Jung, S., J.J. Smith, P.D. von Haller, D.J. Dilworth, K.A. Sitko, L.R. Miller, R.A. Saleem, D.R. Goodlett, and J.D. Aitchison. 2013. Global analysis of condition-specific subcellular protein distribution and abundance. *Mol Cell Proteomics.* 12:1421-1435.
- Kahlhofer, J., S. Leon, D. Teis, and O. Schmidt. 2021. The alpha-arrestin family of ubiquitin ligase adaptors links metabolism with selective endocytosis. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization.* 113:183-219.
- Kurtoglu, M., N. Gao, J. Shang, J.C. Maher, M.A. Lehrman, M. Wangpaichitr, N. Savaraj, A.N. Lane, and T.J. Lampidis. 2007. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in

- select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Molecular cancer therapeutics*. 6:3049-3058.
- Lagunas, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 10:229-242.
- Lang, M.J., J.Y. Martinez-Marquez, D.C. Prosser, L.R. Ganser, D. Buelto, B. Wendland, and M.C. Duncan. 2014. Glucose starvation inhibits autophagy via vacuolar hydrolysis and induces plasma membrane internalization by down-regulating recycling. *J Biol Chem*. 289:16736-16747.
- Laussel, C., and S. Leon. 2020. Cellular toxicity of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose and associated resistance mechanisms. *Biochem Pharmacol*. 182:114213.
- Lee, S., H.C. Ho, J.M. Tumolo, P.C. Hsu, and J.A. MacGurn. 2019. Methionine triggers Ppz-mediated dephosphorylation of Art1 to promote cargo-specific endocytosis. *J Cell Biol*. 218:977-992.
- Li, W., and A.P. Mitchell. 1997. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*. 145:63-73.
- Lin, C.H., J.A. MacGurn, T. Chu, C.J. Stefan, and S.D. Emr. 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell*. 135:714-725.
- Llopis-Torregrosa, V., A. Ferri-Blazquez, A. Adam-Artigues, E. Deffontaines, G.P. van Heusden, and L. Yenush. 2016. Regulation of the Yeast Hxt6 Hexose Transporter by the Rod1 alpha-Arrestin, the Snf1 Protein Kinase, and the Bmh2 14-3-3 Protein. *J Biol Chem*. 291:14973-14985.
- Luengo, A., D.Y. Gui, and M.G. Vander Heiden. 2017. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol*. 24:1161-1180.
- MacDonald, C., S.B. Shields, C.A. Williams, S. Winistorfer, and R.C. Piper. 2020. A Cycle of Ubiquitination Regulates Adaptor Function of the Nedd4-Family Ubiquitin Ligase Rsp5. *Curr Biol*. 30:465-479 e465.
- MacGurn, J.A., P.C. Hsu, and S.D. Emr. 2012. Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem*. 81:231-259.
- MacGurn, J.A., P.C. Hsu, M.B. Smolka, and S.D. Emr. 2011. TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell*. 147:1104-1117.
- Martin, D.C., H. Kim, N.A. Mackin, L. Maldonado-Baez, C.C. Evangelista, Jr., V.G. Beaudry, D.D. Dudgeon, D.Q. Naiman, S.E. Erdman, and K.W. Cunningham. 2011. New regulators of a high affinity Ca²⁺ influx system revealed through a genome-wide screen in yeast. *J Biol Chem*. 286:10744-10754.
- McCartney, R.R., D.G. Chandrashekarappa, B.B. Zhang, and M.C. Schmidt. 2014. Genetic analysis of resistance and sensitivity to 2-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 198:635-646.
- McCartney, R.R., and M.C. Schmidt. 2001. Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *The Journal of biological chemistry*. 276:36460-36466.
- Merhi, A., and B. André. 2012. Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol Cell Biol*. 32:4510-4522.
- Mueckler, M., and C. Makepeace. 2009. Model of the exofacial substrate-binding site and helical folding of the human Glut1 glucose transporter based on scanning mutagenesis. *Biochemistry*. 48:5934-5942.
- Mueckler, M., and B. Thorens. 2013. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*. 34:121-138.

- Müller, M., O. Schmidt, M. Angelova, K. Faserl, S. Weys, L. Kremser, T. Pfaffenwimmer, T. Dalik, C. Kraft, Z. Trajanoski, H. Lindner, and D. Teis. 2015. The coordinated action of the MVB pathway and autophagy ensures cell survival during starvation. *eLife*. 4:e07736.
- Nijland, J.G., H.Y. Shin, R.M. de Jong, P.P. de Waal, P. Klaassen, and A.J. Driessen. 2014. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 7:168.
- Nikko, E., and H.R. Pelham. 2009. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic*. 10:1856-1867.
- Nikko, E., J.A. Sullivan, and H.R. Pelham. 2008. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep*. 9:1216-1221.
- O'Donnell, A.F., R.R. McCartney, D.G. Chandrashekarappa, B.B. Zhang, J. Thorner, and M.C. Schmidt. 2015. 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and alpha-arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. *Mol Cell Biol*. 35:939-955.
- O'Donnell, A.F., and M.C. Schmidt. 2019. AMPK-Mediated Regulation of Alpha-Arrestins and Protein Trafficking. *Int J Mol Sci*. 20.
- Pajak, B., E. Siwiak, M. Soltyka, A. Priebe, R. Zielinski, I. Fokt, M. Ziemniak, A. Jaskiewicz, R. Borowski, T. Domoradzki, and W. Priebe. 2019. 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci*. 21.
- Papamichos-Chronakis, M., T. Gligoris, and D. Tzamarias. 2004. The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO Rep*. 5:368-372.
- Piao, H.L., I.M. Machado, and G.S. Payne. 2007. NPFxD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. *Mol Biol Cell*. 18:57-65.
- Ralser, M., M.M. Wamelink, E.A. Struys, C. Joppich, S. Krobitsch, C. Jakobs, and H. Lehrach. 2008. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:17807-17811.
- Randez-Gil, F., A. Blasco, J.A. Prieto, and P. Sanz. 1995. DOGR1 and DOGR2: two genes from *Saccharomyces cerevisiae* that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed. *Yeast*. 11:1233-1240.
- Roy, A., A.D. Dement, K.H. Cho, and J.H. Kim. 2015. Assessing glucose uptake through the yeast hexose transporter 1 (Hxt1). *PLoS One*. 10:e0121985.
- Rubenstein, E.M., R.R. McCartney, C. Zhang, K.M. Shokat, M.K. Shirra, K.M. Arndt, and M.C. Schmidt. 2008. Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. *J Biol Chem*. 283:222-230.
- Sanz, P., F. Randez-Gil, and J.A. Prieto. 1994. Molecular characterization of a gene that confers 2-deoxyglucose resistance in yeast. *Yeast*. 10:1195-1202.
- Sardana, R., and S.D. Emr. 2021. Membrane Protein Quality Control Mechanisms in the Endo-Lysosome System. *Trends Cell Biol*. 31:269-283.
- Schmidt, M.C., and A.F. O'Donnell. 2021. 'Sugarcoating' 2-deoxyglucose: mechanisms that suppress its toxic effects. *Current genetics*. 67:107-114.
- Shin, H.Y., J.G. Nijland, P.P. de Waal, R.M. de Jong, P. Klaassen, and A.J. Driessen. 2015. An engineered cryptic Hxt11 sugar transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 8:176.

- Shinoda, J., and Y. Kikuchi. 2007. Rod1, an arrestin-related protein, is phosphorylated by Snf1-kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 364:258-263.
- Soncini, S.R., D.G. Chandrashekarappa, D.A. Augustine, K.P. Callahan, A.F. O'Donnell, and M.C. Schmidt. 2020. Spontaneous mutations that confer resistance to 2-deoxyglucose act through Hxk2 and Snf1 pathways to regulate gene expression and HXT endocytosis. *PLoS Genet*. 16:e1008484.
- Stauffer, B., and T. Powers. 2015. Target of rapamycin signaling mediates vacuolar fission caused by endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 26:4618-4630.
- Tu, J., and M. Carlson. 1994. The GLC7 type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 14:6789-6796.
- Tu, J., and M. Carlson. 1995. REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 14:5939-5946.
- van Steveninck, J. 1968. Transport-associated phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose in yeast. *Biochim Biophys Acta*. 163:386-394.
- Vida, T.A., and S.D. Emr. 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*. 128:779-792.
- Walther, T.C., J.H. Brickner, P.S. Aguilar, S. Bernales, C. Pantoja, and P. Walter. 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*. 439:998-1003.
- Xi, H., M. Kurtoglu, and T.J. Lampidis. 2014. The wonders of 2-deoxy-D-glucose. *IUBMB Life*. 66:110-121.
- Yan, N. 2017. A Glimpse of Membrane Transport through Structures-Advances in the Structural Biology of the GLUT Glucose Transporters. *J Mol Biol*. 429:2710-2725.
- Yang, X., L. Reist, D.A. Chomchai, L. Chen, F.M. Arines, and M. Li. 2021. ESCRT, not intraluminal fragments, sorts ubiquitinated vacuole membrane proteins for degradation. *J Cell Biol*. 220.
- Young, M.E., T.S. Karpova, B. Brugger, D.M. Moschenross, G.K. Wang, R. Schneiter, F.T. Wieland, and J.A. Cooper. 2002. The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol Cell Biol*. 22:927-934.
- Zhu, J., Z.W. Jia, C.Y. Xia, and X.D. Gao. 2020. The Sur7/Pall family transmembrane protein Tos7 (Yol019w) plays a role in secretion in budding yeast. *Fungal Genet Biol*. 144:103467.

Acknowledgments

We thank Agathe Verraes for assistance, Olivier Vincent (CSIC, Madrid, Spain) and Michel Becuwe for sharing reagents and Martin Schmidt (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA) for sharing unpublished results prior publication. We also acknowledge the IJM ImagoSeine facility, member of IBI SA and the France-BioImaging infrastructure (ANR-10-INBS-04). This work was supported by grants from the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (PJA20181208080 and ARCPJA32020060002096 to SL) and individual fellowships from the Ligue contre le cancer (TAZK20115 to CL) and the Fondation pour la Recherche Médicale (SPF20150934065 to QD). **Author contributions:** CL, VA, FJGR, and QD contributed reagents, performed experiments, and acquired and analyzed the data. SL wrote the manuscript and directed the work. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

Supplementary materials

Table S1 : Yeast strains used in this study

Name	Genotype & Description	Origin & Reference
ySL0046: <i>npi1</i>	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pRSP5:KANMX</i>	Bruno André
ySL0066: BY4741 (WT)	<i>MAT a ; ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
ySL0534: rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rod1Δ::KANMX</i>	Euroscarf
ySL0541: reg1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 reg1Δ::HIS3MX</i>	Léon lab
ySL0567: snf1Δ	<i>Mat alpha, leu2Δ0, lysΔ0, ura3Δ0, his3Δ0 snf1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
ySL0854: cnb1Δ	<i>MAT a, leu2Δ0, lysΔ0, ura3Δ0, his3Δ0 cnb1Δ::KANMX</i>	Euroscarf
ySL1027: Hxt3-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT3::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL1140: Hxt2-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT2::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL1184: Hxt6-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT6::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL1186: Hxt1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT1::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL1551: Hxt7-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT7::GFP-His3MX</i>	(Hovsepian et al., 2017)
ySL1690: hvk2Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hvk2Δ::KANMX</i>	Euroscarf
ySL1961: slt2Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 slt2Δ::KANMX</i>	Euroscarf
ySL2092: Vht1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 VHT1::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)

ySL2110: Pdr12-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PDR12::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2119: Bap2-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 BAP2::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2123: Fps1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FPS1::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2132: Mid2-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 MID2::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2142: Qdr3-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 QDR3::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2169: Slg1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SLG1::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2175: Ste2-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 STE2::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2204: hac1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hac1Δ::KANMX</i>	Euroscarf
ySL2216: Itr1-GFP snf1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 snf1ΔhphNT1 ITR1::GFP-HIS3MX</i>	Léon lab
ySL2219: Tat1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TAT1::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2219: Tat1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TAT1::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2221: Can1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 CAN1::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2222: Lyp1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 LYP1::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2223: Fui1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FUI1::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2224: Itr1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ITR1::GFP-His3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2237: Pdr12-GFP snf1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PDR12::GFP-His3MX snf1Δ::NATNT2</i>	Léon lab

ySL2245: Itr1-GFP reg1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 reg1ΔhphNT1 ITR1::GFP-HIS3MX</i>	This study
ySL2275: Hxt6-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT6::GFP-HIS3MX rod1Δ::HPHNT1</i>	Léon Lab
ySL2288: Ina1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 INA1::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2315: hog1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hog1Δ::KANMX</i>	Euroscarf
ySL2323: Ina1-GFP 6arrΔ	<i>Mat alpha ; his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0 art1Δ::hisG art3Δ::hisG rod1Δ::hisG art5Δ::hisG art6Δ::hisG art7Δ::KANMX INA1::GFP-HIS3MX</i>	This study
ySL2325: Ina1-GFP npi1	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 INA1::GFP-HIS3MX pRSP5::KANMX</i>	This study
ySL2395: Ina1-GFP snf1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 snf1Δ::HIS3MX INA1::GFP-HPHNT1</i>	This study
ySL2401: Ina1-GFP ldb19Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 INA1::GFP-HPHNT1 ldb19Δ::Kan</i>	This study
ySL2406: Ina1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 INA1::GFP-HPHNT1 rod1Δ::Kan</i>	This study
ySL2412: Ina1-GFP rvs167Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rvs167ΔKANMX4 INA1::GFP-HPHNT1</i>	This study
ySL2433: Ina1-GFP reg1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 reg1Δ::HIS3MX INA1::GFP-HPHNT1</i>	This study
ySL2434: Ina1-Δ5-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 INA1-Δ5::GFP-KanMX</i>	This study
ySL2443: Pil1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PIL1::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2444: Sur7-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SUR7::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2445: Lsp1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 LSP1::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2446: Seg1-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SEG1::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)

ySL2448: Slg1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SLG1::GFP-His3MX rod1Δ::HPHNT1</i>	This study
ySL2450: Hxt7-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT7::GFP-HPHNT1 rod1Δ::KANMX</i>	This study
ySL2451: Lyp1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 LYP1::GFP-His3MX rod1Δ::KANMX</i>	This study
ySL2452: Qdr3-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 QDR3::GFP-His3MX rod1Δ::KANMX</i>	This study
ySL2541: Hxt2-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT2::GFP-HIS3MX rod1Δ::HPHNT1</i>	This study
ySL2545: Tat1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TAT1::GFP-His3MX rod1Δ::KANMX</i>	This study
ySL2546: Fui1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FUI1::GFP-His3MX rod1Δ::KANMX</i>	This study
ySL2548: rvs167Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rvs167Δ::KANMX</i>	Euroscarf
ySL2580: Vht1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 VHT1::GFP-His3MX rod1Δ::URA3</i>	This study
ySL2591: Ste2-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 STE2::GFP-His3MX rod1Δ::URA3</i>	This study
ySL2592: Can1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 CAN1::GFP-His3MX rod1Δ::URA3</i>	This study
ySL2623: Wsc3-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 WSC3::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2628: Wsc2-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 WSC2::GFP-HIS3MX</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2671: Ina1-GFP hvk2Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; INA1::GFP-HIS3MX hvk2Δ::KANMX</i>	This study
ySL2711: Hxt2-GFP reg1Δ	<i>MAT a, his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT2::GFP-HIS3MX; reg1Δ::LEU2</i>	This study
ySL2724: Hxt1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT1::GFP-HIS3MX rod1Δ::HPHNT1</i>	This study
ySL2725: Hxt3-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HXT3::GFP-HIS3MX rod1Δ::HPHNT1</i>	This study

ySL2726: Itr1-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ITR1::GFP-His3MX rod1Δ::HPHNT1</i>	This study
ySL2727: Pdr12-GFP rod1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>PDR12::GFP-His3MX rod1Δ::HPHNT1</i>	This study
ySL2728: Lyp1-GFP rod1Δ rog3Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>LYP1::GFP-His3MX rod1Δ::KANMX;</i> <i>rog3Δ::NATNT2</i>	This study
ySL2739: Vph1-mCherry	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0;</i> <i>VPH1::mCherry-Nat</i>	This study
ySL2768: Ina1-GFP hac1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>hac1Δ::LEU2 INA1::GFP-HPHNT1</i>	This study
ySL2865: Ina1-GFP rod1Δ reg1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>reg1Δ::HIS3MX rod1Δ::KANMX</i> <i>INA1::GFP-HPHNT1</i>	This study
ySL2880: Ina1-GFP Pil1-mCherry	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>INA1::GFP-HIS3MX PIL1::mCherry-NATNT2</i>	This study
ySL3003: rod1Δ Hxt3-GFP	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>rod1Δ::KANMX Hxt3::GFP-HPHNT1</i>	This study
ySL3026: hxt3Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>hxt3Δ::KANMX</i>	Euroscarf
ySL3027: rod1Δhxt3Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>hxt3Δ::KANMX rod1Δ::HphNT1</i>	This study
ySL3029: rod1Δhxt1Δ	<i>MAT a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>hxt1Δ::KANMX rod1Δ::HphNT1</i>	This study

Table S2 : Plasmids used in this study

Name	Description	Origin & Reference
pJMG383	pRS415 empty vector (CEN, <i>LEU2</i>)	Leon lab
pRHT93	pRS425 empty vector (2μ, <i>LEU2</i>)	Leon lab
pRHT95	pRS416 empty vector (CEN, <i>URA3</i>)	Leon lab

pSL093	pRS416-derived (CEN, URA3) <i>p_{ROD1}:ROD1-GFP</i>	(Becuwe et al., 2012)
pSL094	pRS415-derived (CEN, LEU2) <i>p_{ROD1}:ROD1-3HA</i>	(Becuwe et al., 2012)
pSL112	pGP564-based genomic clone YGPM2p12 containing <i>ROD1</i> ; 2 μ , <i>LEU2</i> (genomic tiling collection - chr XV: 357634 - 372838)	(Jones et al., 2008)
pSL205	<i>p_{CUP1}:6xHis-Ub</i> (2 μ , <i>LEU2</i>) (pJD421)	(Dohmen et al., 1995)
pSL237	pRS316-derived (CEN, URA3) <i>p_{Rod1}:Rod1-3Flag</i>	Olivier Vincent
pSL374	pGP564-based genomic clone YGPM14o15 containing <i>LDB19</i> ; 2 μ , <i>LEU2</i> (genomic tiling collection - chr XV: 917822 - 931375)	(Jones et al., 2008)
pSL376	pGP564-based genomic clone YGPM14o18 containing <i>ALY2</i> ; 2 μ , <i>LEU2</i> (genomic tiling collection - chr X: 271628 - 284025)	(Jones et al., 2008)
pSL377	pGP564-based genomic clone YGPM29I08 containing <i>ART5</i> ; 2 μ , <i>LEU2</i> (genomic tiling collection - chr VII: 618367 - 628321)	(Jones et al., 2008)
pSL378	pGP564-based genomic clone YGPM22k12 containing <i>ALY1</i> ; 2 μ , <i>LEU2</i> (genomic tiling collection - chr XI: 473556 - 485397)	(Jones et al., 2008)
pSL379	pGP564-based genomic clone YGPM3n06 containing <i>ROG3</i> ; 2 μ , <i>LEU2</i> (genomic tiling collection - chr VI: 182842 - 201397)	(Jones et al., 2008)
pSL409	<i>Yep358-based</i> (2 μ , URA3) <i>p_{DOG1}(1000bp):LacZ</i>	(Defenouillère et al., 2019)
pSL410	<i>Yep358-based</i> (2 μ , URA3) <i>p_{DOG2}(1000bp):LacZ</i>	(Defenouillère et al., 2019)
pSL412	pRS426-derived (2 μ , URA3) <i>p_{GPD}:DOG2</i>	(Defenouillère et al., 2019)
pSL436	pRS426-derived (2 μ , URA3) <i>p_{GPD}:DOG2(DD>AA)</i>	(Defenouillère et al., 2019)
pSL559	pRS313-derived (CEN, HIS3) <i>p_{ROD1}:ROD1-Flag</i>	This study

pSL560	pRS313-derived (CEN, <i>HIS3</i>) <i>p_{ROD1}:ROD1-PYm-Flag</i>	This study
pSL561	pRS313-derived (CEN, <i>HIS3</i>) <i>p_{ROD1}:ROD1-S12A-Flag</i>	This study
pSL563	pRS313-derived (CEN, <i>HIS3</i>) <i>p_{ROD1}:ROD1-KR-Flag</i>	This study
pSL589	pUG35-derived (ARS/CEN, URA3) <i>pHXT3:HXT3-GFP</i>	This study
pSL591	pUG35-derived (ARS/CEN, URA3) <i>pHXT3:HXT3(N370A)-GFP</i>	This study

Table S3 : Reagents and compound used this study

Reagent type	Name	Description	Information	Reference/Origin
Antibody	α GFP	Mouse monoclonal against GFP, clones 7.1 and 13.1	1/5000	11814460001 - Roche
Antibody	α Flag	Mouse monoclonal against Flag	1/5000	F3165 - Sigma
Antibody	α P ^{AMPK} / P ^{Snf1}	Rabbit polyclonal against Thr172-phosphorylated human AMPK α	1/1000	#2535 – Cell Signaling Technology
Antibody	α polyHIS tag	Mouse monoclonal antibody used to reveal endogenous Snf1 which contains a stretch of 13 His residues	1/2000	H1029 - Sigma
Antibody	α Ubiquitin	Mouse monoclonal antibody against ubiquitin	1/1000	P4D1 - Santa Cruz
Antibody	α Rabbit IgG	Goat secondary antibody against Rabbit IgG	1/5000	A6154 - Sigma Aldrich
Antibody	α Mouse IgG	Goat secondary antibody against Mouse IgG	1/5000	A5278 - Sigma Aldrich
Chemical compound, drug	2DG	2-Deoxyglucose	20% stock	D8375-5G / D8375-25G - Merck
Chemical compound, drug	CIP	Calf Intestinal Phosphatase		11097075001 - Roche

Chemical compound, drug	EndoH	Endoglycosidase H		V4871A - Promega
Carbon source	Lactate		pH 5 - 0,5% from 5% stock	W261114-5KG-K - Merck

3 - Autres observations sur les effets cellulaires du 2DG et les mécanismes de résistance

A - Régulation de l'endocytose d'Ina1-GFP par le 2DG

A.1 - L'endocytose d'Ina1-GFP en réponse au 2DG n'est pas dû à l'induction d'un stress du RE

La protéine Ina1, dont la fonction est inconnue, est prédite comme ayant de nombreux sites de glycosylation, principalement au niveau de la partie N-terminale de la protéine ("SIB Swiss Institute of Bioinformatics | Expasy," n.d.). La protéine migre à un poids moléculaire apparent de plus de 250 kDa, bien supérieur à son poids moléculaire prédit (102 kDa) (**Figure 3.1A**). La déglycosylation de l'échantillon protéique avec l'endoglycosidase H montre que cette différence de migration est sûrement liée à une forte N-glycosylation (**Figure 3.1A**). Le 2DG interfère avec la glycosylation des protéines et déclenche la voie de réponse aux protéines mal repliées (UPR, Unfolded protein response) (Andresen et al., 2012; Defenouillère et al., 2019; Kurtoglu et al., 2007). Un traitement au 2DG conduit à une dégradation progressive d'Ina1-GFP (**Figure 3.1B**), avec la génération d'un produit de dégradation à la taille de la GFP, correspondant à une protéolyse vacuolaire d'Ina1. Pour voir si l'endocytose d'Ina1 après le traitement au 2DG est déclenchée par un stress du réticulum endoplasmique (RE), nous avons traité les cellules exprimant Ina1-GFP avec la tunicamycine (Tn), un inhibiteur de N-glycosylation qui provoque également une induction de l'UPR. Contrairement au 2DG, le traitement à la Tn déclenche l'apparition d'Ina1-GFP non glycosylée (102 kDa), en accord avec une altération globale de la N-glycosylation lors d'un traitement à la Tn, mais ne conduit pas à une dégradation majeure d'Ina1-GFP (**Figure 3.1B**). Ces résultats ont été confirmés par l'examen de la localisation d'Ina1-GFP (**Figure 3.1C**) lors d'un traitement au 2DG ou à la Tn. Ainsi, l'induction de l'UPR est peu susceptible d'expliquer l'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG. En conséquence, l'endocytose d'Ina1-GFP induite par le 2DG se produit toujours dans les cellules du mutant *hac1Δ*, un mutant déficient pour l'UPR (**Figure 3.1D**).

Le 2DG étant un inhibiteur connu de la glycolyse, nous avons testé si une altération du métabolisme pouvait être responsable de l'endocytose d'Ina1. En effet, les transporteurs de glucose Hxt1 et Hxt3 sont endocytés en réponse au 2DG (O'Donnell et al., 2015) mais également lors du transfert des cellules d'un milieu glucose vers une autre source de carbone, comme le lactate (source de carbone non fermentescible) (Hovsepian et al., 2017; Roy et al., 2014; Snowdon and van der Merwe, 2012). Il est intéressant de noter que l'endocytose et la dégradation de Ina1-GFP sont aussi déclenchées dans ces conditions (**Figure 3.1B/C**). Ainsi, comme pour Hxt1 et Hxt3, l'exposition au 2DG mais aussi une carence en glucose déclenchent l'endocytose d'Ina1-GFP.

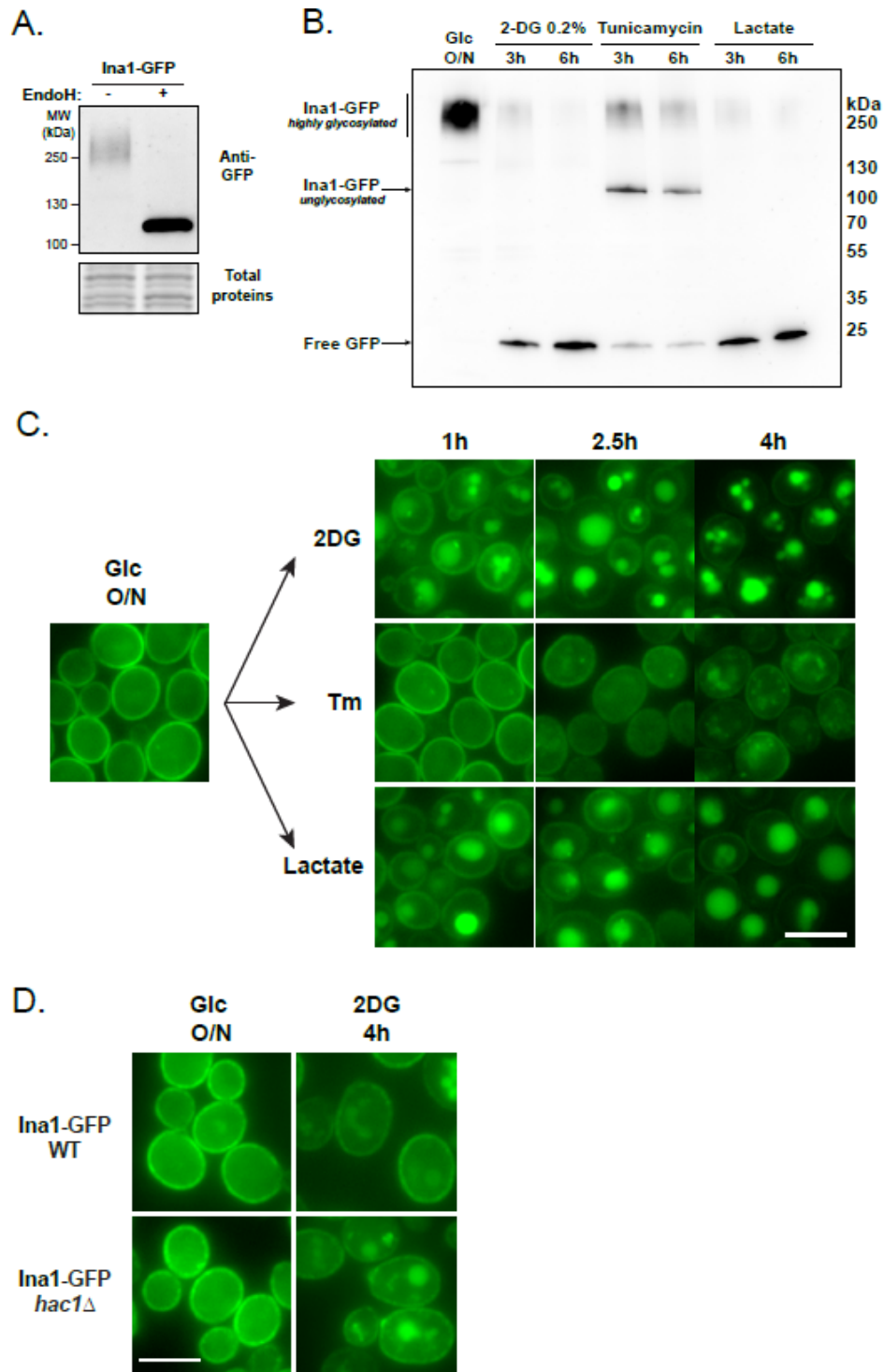


Figure 3.1 - La protéine hyperglycosylée Ina1 n'est pas endocytée en réponse au 2DG via l'UPR mais via un autre mécanisme induit par le 2DG. (A) Western blot sur extraits protéiques totaux de levures exprimant Ina1-GFP avant et après traitement des extraits à l'endoglycosidase H. Utilisation d'un anticorps anti GFP. **(B)** Western blot sur extraits protéiques totaux de levures exprimant Ina1-GFP avant et après un traitement au 2DG, à la tunicamycine ou au lactate jusqu'à 6h. Utilisation d'un anticorps anti GFP. **(C)** Localisation d'Ina1-GFP par microscopie à fluorescence avant et après un traitement au 2DG, à la tunicamycine ou au lactate, aux temps indiqués. Barre d'échelle : 5µm **(D)** Localisation d'Ina1-GFP dans les souches WT ou *hac1Δ* par microscopie à fluorescence avant et après 4h de traitement au 2DG. Barre d'échelle : 5µm

A.2 - L'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG ou la carence en glucose fait intervenir des mécanismes distincts

Chez la levure, l'endocytose des transporteurs de nutriments est déclenchée par leur ubiquitylation à la membrane plasmique, qui repose sur l'action de l'ubiquitine ligase Rsp5 et des protéines adaptatrices, les arrestines (Kahlhofer et al., 2021).

Nous avons donc étudié la dépendance de l'endocytose d'Ina1 vis-à-vis de Rsp5, de l'ubiquitylation d'Ina1 et des arrestines. Comme vu dans le chapitre précédent, (**Figure 2.2D**) l'endocytose d'Ina1 induite par la 2DG ne se produit plus dans un mutant hypomorphe (*npi1*) du gène essentiel *RSP5* (Catherine Hein et al., 1995) ni dans une souche dans laquelle plusieurs gènes codant pour les arrestines sont délétés (*6arrΔ* : *ldb19Δ aly1Δ aly2Δ rod1Δ rog3Δ art5Δ*) (Nikko and Pelham, 2009) (**Figure 3.2A et 3.2B**). En revanche, l'endocytose d'Ina-GFP se produit encore chez le mutant *6arrΔ* lors du passage des cellules du milieu glucose au milieu lactate, ce qui suggère que l'endocytose dans cette condition diffère de celle qui se produit en réponse au 2DG.

La topologie prédite d'Ina1 suggère que 4 lysines sont exposées dans le cytosol, dont l'une (K671) a été signalée comme étant ubiquitylée dans les bases de données ("GPMDB Proteome Database," n.d.) et est située dans les 5 derniers résidus en C-terminal d'Ina1. La délétion de ces 5 résidus n'a pas d'effet sur l'endocytose d'Ina1 lors du transfert en milieu lactate, mais elle abolit l'endocytose de la protéine en réponse à la 2DG (**Figure 3.3**), ce qui suggère que ces événements impliquent des mécanismes distincts. Dans l'ensemble, ces résultats confirment que l'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG dépend bien de Rsp5, des arrestines et montrent que cela est corrélé à l'ubiquitylation de la protéine membranaire.

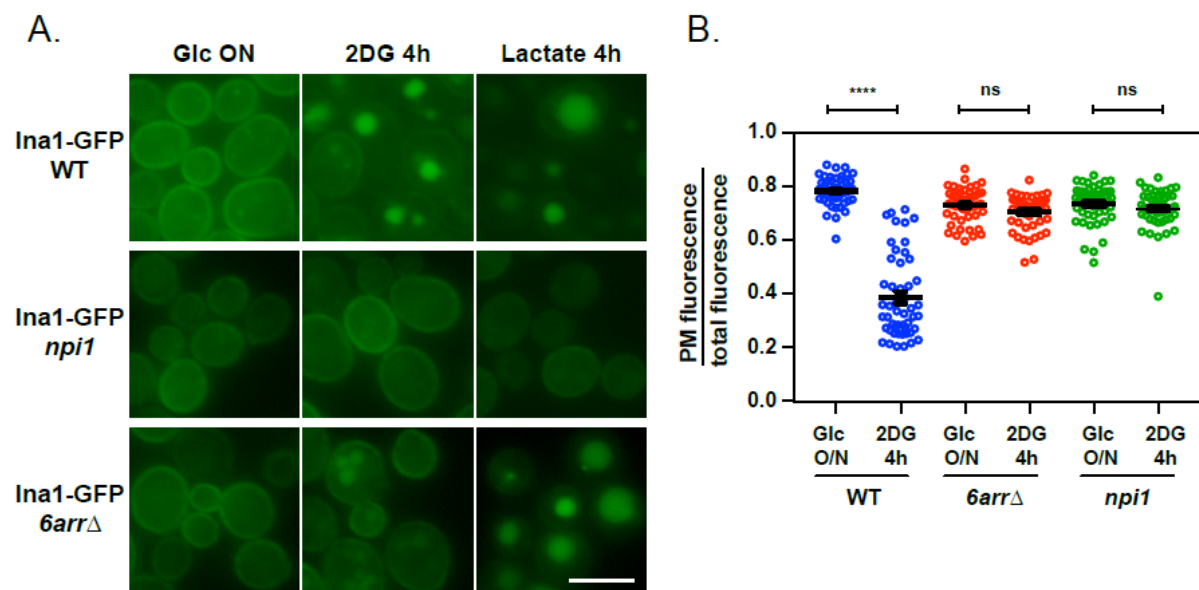


Figure 3.2 - L'endocytose d'Ina1-GFP en réponse au 2DG dépend de Rsp5 et des arrestines. En réponse au lactate, Ina1-GFP est également endocytée dépendamment de Rsp5 mais pas des arrestines délétées dans la souche *6arrΔ*. (A) Localisation d'Ina1-GFP, Ina1-GFP *npi1* et Ina1-GFP *6arrΔ* par microscopie à fluorescence avant et après un traitement au 2DG ou au lactate pendant 4h. Barre d'échelle : 5µm (B) Quantification de la fluorescence à la membrane plasmique sur la fluorescence totale dans les souches observées en microscopie en (A) (n = 100).

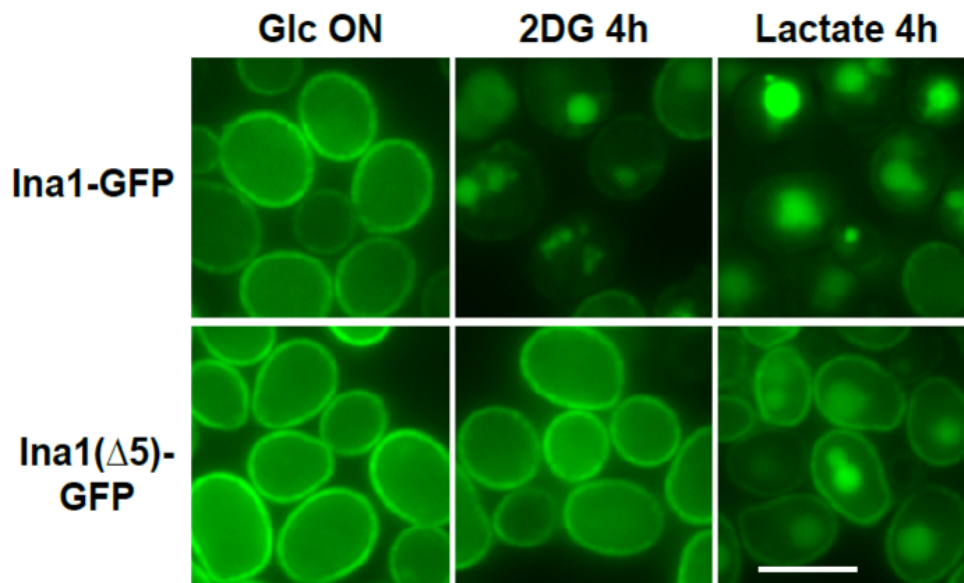


Figure 3.3 - La délétion des 5 derniers acides aminés, contenant une lysine, inhibe l'endocytose d'Ina1-GFP en réponse au 2DG mais pas en réponse au lactate. Localisation d'Ina1-GFP et Ina- Δ 5-GFP par microscopie à fluorescence avant et après un traitement au 2DG ou au lactate pendant 4h. Barre d'échelle : 5 μ m.

A.3 - Rod1 contrôle le trafic de Ina1 en réponse au 2DG mais pas en réponse à une carence en glucose

Comme montré dans le chapitre précédent, nous avons identifié que l'arrestine impliquée dans l'endocytose d'Ina1-GFP en réponse au 2DG est Rod1 (**Figure 2.2F**). Afin d'arriver à cette conclusion, nous avons utilisé une approche classique en complétant le défaut de trafic d'Ina1 observé dans la souche *6arr* Δ (**Figure 3.2A**) avec des clones génomiques contenant chacun des gènes d'arrestine manquants, et évalué si leur expression restaurait l'endocytose et la dégradation d'Ina1-GFP en réponse au 2DG (**Figure 3.4A**). Ceci a révélé que l'expression de l'arrestine Rod1 était suffisante pour restaurer le trafic d'Ina1 vers la vacuole. Une autre arrestine, Ldb19, restaure l'endocytose dans une moindre mesure. En revanche, la seule délétion de *ROD1* abolit presque totalement l'endocytose et la dégradation d'Ina-GFP, alors que celle de *LDB19* n'entraîne qu'un défaut partiel de cette endocytose en réponse au 2DG (**Figure 3.4B-C**). Par conséquent, Rod1 agit comme la principale arrestine pour l'endocytose d'Ina1 induite par la 2DG, ce qui rappelle les travaux précédents sur l'endocytose des transporteurs de glucose Hxt1 et Hxt3 dans ces conditions (O'Donnell et al., 2015).

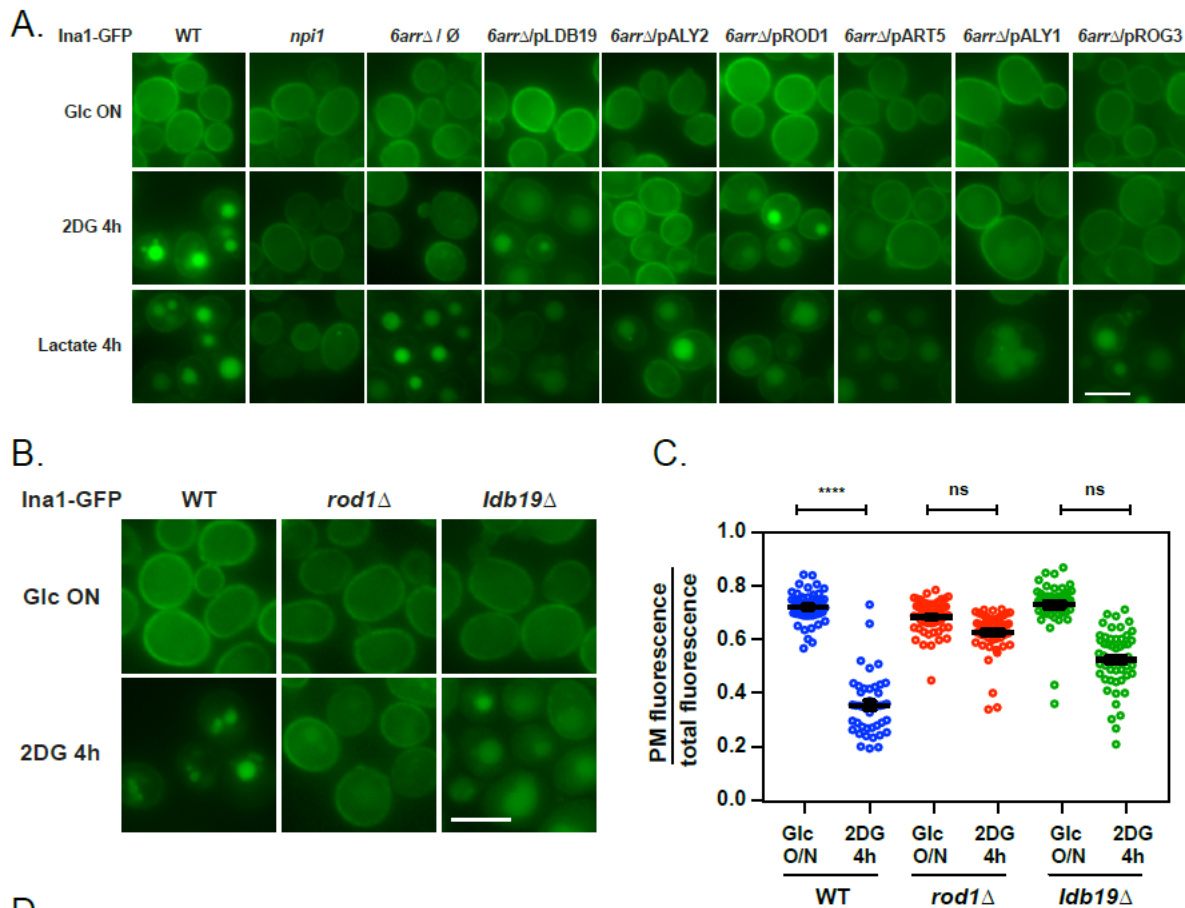


Figure 3.4 - L'endocytose d'Ina1-GFP en réponse au 2DG dépend de Rod1 et l'arrestine Ldb19 y participe un peu. (A) Localisation d'Ina1-GFP WT, *np1*, *6arrΔ* + LDB19 / ALY2 / ROD1 / ART5 / ALY1 / ROG3 et Ina- Δ 5-GFP par microscopie à fluorescence avant et après un traitement au 2DG ou au lactate pendant 4h. Barre d'échelle : 5 μ m (B) Localisation d'Ina1-GFP WT, Ina1-GFP *rod1Δ* et Ina1-GFP *ldb19Δ* par microscopie à fluorescence avant et après un traitement au 2DG pendant 4h. Microscopie de cellules Ina1-GFP WT, Ina1-GFP *rod1Δ* et Ina1-GFP *ldb19Δ* avant et après un traitement au 2DG pendant 4h. Barre d'échelle : 5 μ m (C) Quantification de la fluorescence à la membrane plasmique sur la fluorescence totale dans des cellules des souches observées par microscopie en (B) (n = 100).

A.4 - Le paralogue d'Ina1, Fat3, n'est pas observable par microscopie dans les conditions testées

Ina1-GFP, dont l'endocytose en réponse au 2DG a été étudiée, possède un paralogue qui vient de la duplication du génome de *Saccharomyces cerevisiae* (Kellis et al., 2004) : Fat3. Cette protéine a été identifiée comme présente à la membrane, dans des patches corticaux, et est nécessaire pour l'absorption d'acide gras (Jung et al., 2013). Nous avons donc cherché à étudier la localisation de Fat3 en réponse au 2DG (Figure 3.5). Cependant; cette protéine n'est pas visible/exprimée lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu contenant du glucose (Figure 3.5). Pour observer Fat3, les cellules doivent être mises en culture en présence de glycérol ou d'oléate (Jung et al., 2013). Un signal fluorescent est observé lorsque les cellules sont en présence de glycérol pendant 24h. Cependant, la protéine n'est pas localisée au niveau de la membrane, contrairement à ce qui était attendu. Lorsqu'on traite les cellules avec du 2DG ou du glucose pendant 4h, on ne remarque pas de changement dans la distribution de fluorescence. Il est possible qu'un changement de promoteur permettrait une expression constitutive de Fat3 même en milieu glucose, et ainsi de tester les effets du 2DG sur la localisation; cependant nous avons

préférez nous focaliser sur l'étude des effets du 2DG dans de conditions physiologiques donc cet axe a été abandonné.

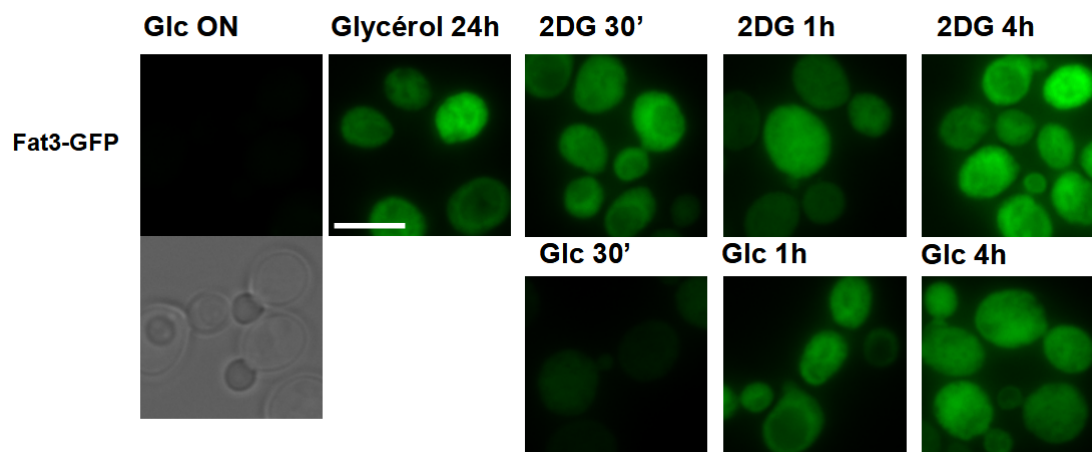


Figure 3.5 - Etude de la localisation du paralogue d'Ina1, Fat3-GFP. Localisation de Fat3-GFP par microscopie à fluorescence après un traitement de 24h au glycérol puis l'ajout de 2DG ou glucose aux temps indiqués. Barre d'échelle : 5µm

A.5 - Discussion

La protéine membranaire Ina1 est endocytée en réponse au 2DG et cette endocytose dépend de l'E3 ubiquitine ligase Rsp5 (**Figure 3.2**), de l'arrestine Rod1 (**Figure 3.3**) ainsi que des 5 derniers acides aminés de la protéine (**Figure 3.3**) indépendamment de l'induction du stress du RE (**Figure 3.1**) déclenché lors d'un traitement des cellules au 2DG (Defenouillère et al., 2019). Cette drogue déclenche un stress du RE et l'UPR (Unfolded Protein Response) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Defenouillère et al., 2019) ainsi que dans les cellules cancéreuses humaines (Xi et al., 2011). De par l'hyperglycosylation d'Ina1, on pouvait faire l'hypothèse qu'un traitement au 2DG induirait un défaut de glycosylation de la protéine, ce qui peut déclencher l'UPR. Nous nous sommes donc demandé si l'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG était dû au déclenchement de l'UPR. Cependant, dans des cellules où l'UPR ne se déclenche pas, mutées pour *HAC1*, on remarque que l'endocytose se déclenche tout de même en réponse au 2DG (**Figure 3.1D**). De plus, la protéine Ina1 est également endocytée lors d'une carence en glucose. On sait qu'une carence en glucose induit une importante endocytose des protéines membranaires via l'activation du facteur de transcription Mig1 ainsi qu'une inhibition du recyclage des protéines membranaires des endosomes précoces à la membrane plasmique (Laidlaw et al., 2021). On peut donc faire l'hypothèse qu'en présence de lactate, Ina1 est endocytée via l'activation de Mig1. De plus, il est intéressant de voir qu'Ina1 est endocytée en réponse au lactate même dans une souche *6arrΔ* (**Figure 3.2A**) bien qu'elle dépende de Rsp5, montrant une fois de plus que l'identité des arrestines mobilisées pour l'endocytose dépend du signal induisant cette endocytose.

L'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG dépend donc de Rod1 (**Figure 3.4B**) ainsi que de Rsp5 (**Figure 3.2A**). On remarque également que la surexpression de l'arrestine *LDB19* dans une souche *6arrΔ* restaure l'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG (**Figure 3.4A**) sans que sa délétion (**Figure 3.4B**) n'inhibe son endocytose dans ces mêmes conditions. Concernant l'arrestine Ldb19, il semblerait qu'elle joue un rôle dans l'endocytose d'Ina1 lorsque Rod1 est absente. Ainsi, comme pour l'arrestine Bul1 qui participe à l'endocytose du transporteur de lactate Jen1 en réponse au glucose lorsque Rod1 est

délétée (Hovsepian et al., 2018), on peut faire l'hypothèse que l'arrestine Ldb19 participe à l'endocytose d'Ina1 en absence de Rod1 en réponse au 2DG.

Enfin, l'endocytose d'Ina1 en réponse au 2DG est également dépendante des 5 derniers acides aminés de la protéine, leur délétion induisant une absence d'endocytose de la protéine en réponse au 2DG (**Figure 3.3**). Parmi ces 5 derniers acides aminés, on retrouve une lysine potentiellement ubiquitylée selon ("GPMDB Proteome Database," n.d.). L'ubiquitylation des protéines membranaires est un signal d'endocytose (Kölling and Hollenberg, 1994). Ina1, dont la fonction est inconnue, semble donc endocytée comme la plupart des autres transporteurs membranaires. Il reste cependant à déterminer si cette lysine est bien ubiquitylée en réponse au 2DG. De plus, en réponse au lactate, la délétion des 5 derniers acides aminés n'inhibe pas l'endocytose d'Ina1. Ainsi, il est probable qu'une autre lysine soit ciblée dans ces conditions, montrant une fois de plus, qu'en fonction du signal, le mécanisme d'endocytose et les arrestines sont différents.

La protéine Ina1 étudiée dans le chapitre précédent a un paralogue issu de la duplication du génome de *Saccharomyces cerevisiae* (Kellis et al., 2004), Fat3. Nous n'avons pas réussi à observer cette protéine par microscopie (**Figure 3.5**). La souche que nous avons utilisée provient de la collection de souches fusionnées à la GFP (Huh et al., 2003). Peut-être faudrait-il construire nous-même la souche avec une étiquette GFP ou une autre étiquette. Une étude de 2013 (Jung et al., 2013) a permis d'en savoir plus sur cette protéine. Observable uniquement en présence de glycérol ou d'acide oléique, un acide gras, la protéine est localisée au niveau de la membrane plasmique, au niveau des patches corticaux, en dehors des MCCs/eisosomes, comme l'est Ina1 (**Figure 2.S4C**). De plus, cette protéine a également été identifiée comme indispensable à la croissance des levures en présence d'acides gras (Smith et al., 2006) et aurait un rôle dans le transport d'acides gras dans les cellules. Fat3 étant le paralogue d'Ina1, on peut donc se demander si les deux protéines ont la même fonction dans les cellules et il serait donc intéressant de regarder si Ina1 a également un rôle dans le transport d'acides gras.

B - Les différents effets du 2DG observés dans les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*

B.1 - Le 2DG induit une fragmentation de la vacuole

Lors de l'observation de cellules au microscope, nous avons remarqué qu'un traitement au 2DG de 4h induisait une importante fragmentation de la vacuole. Cet effet du 2DG a également été observé récemment lors d'une étude sur l'endocytose d'Hxt3 (Yang et al., 2021). Afin d'observer cela, nous avons, dans un premier temps, utilisé le colorant FM4-64 qui permet d'observer la dynamique d'endocytose mais également des membranes de la vacuole (Vida and Emr, 1995). Afin de quantifier cette fragmentation lors d'un traitement au 2DG, nous avons utilisé une souche dans laquelle la protéine Vph1, une sous-unité d'un domaine de l'ATPase vacuolaire, est étiquetée avec mCherry. Cette protéine est localisée au niveau de la membrane vacuolaire et permet ainsi d'observer la dynamique membranaire des vacuoles. Dans une souche sauvage (WT : Wild-Type), on observe une fragmentation des vacuoles lors d'un traitement de 4h au 2DG (**Figure 2S1 - Chapitre 2 et Figure 3.6A**). En présence de tunicamycine, on observe également une augmentation du nombre de vacuoles fragmentées par rapport à des levures en présence de glucose. Cela avait également été observé par (Stauffer and Powers, 2015). Afin de déterminer les protéines et voies de signalisation impliquées dans la fragmentation vacuolaire, nous avons

étudié ce phénomène dans différents mutants résistants (*rod1Δ*, *hvk2Δ*, *reg1Δ* et surexpression de la 2DG6P phosphatase *DOG2*) ou sensibles (*snf1Δ*) au 2DG ainsi qu'en présence de Tn et de lactate (**Figure 3.6**). On remarque que dans certaines souches résistantes au 2DG (*hvk2Δ*, *reg1Δ* et surexpression de *DOG2*), le nombre de vacuoles fragmentées est moins important en comparaison à une souche WT ou aux souches sensibles au 2DG (**Figure 3.6B**) mais ce n'est cependant pas le cas pour une souche *rod1Δ*. Il sera donc essentiel de déterminer comment le 2DG induit cette fragmentation et comment les différents mécanismes de résistance au 2DG chez différents mutants permettent, ou non, d'éviter la fragmentation des vacuoles lors d'un traitement au 2DG.

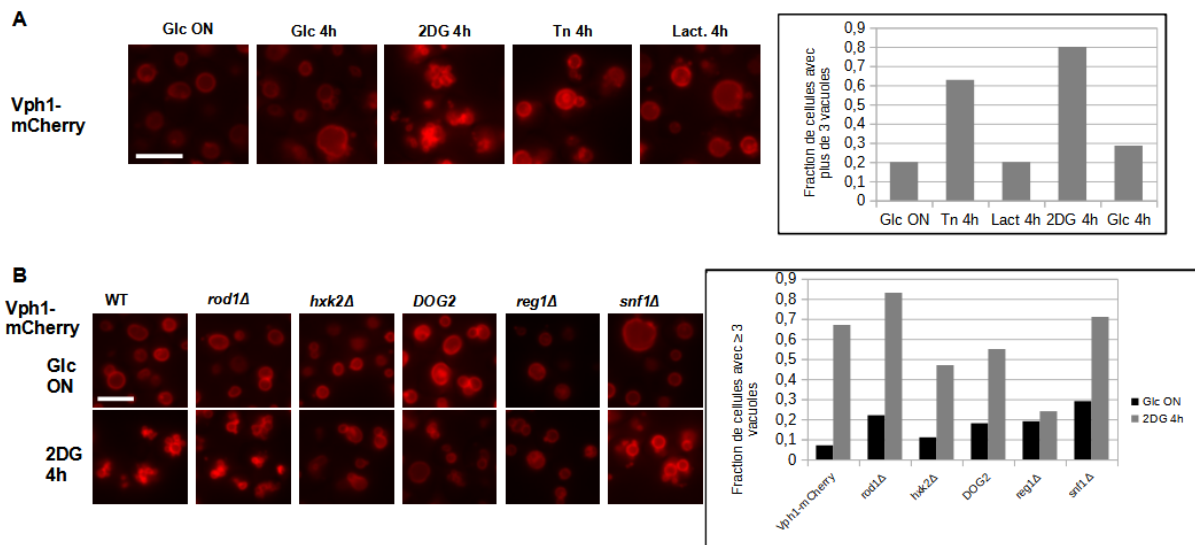


Figure 3.6 - Un traitement au 2DG induit une fragmentation vacuolaire dans des cellules WT, qui est diminuée chez certains mutants résistants au 2DG. (A) Localisation de Vht1-mCherry par microscopie à fluorescence avant et après 4h de traitement au 2DG, au glucose, au lactate ou à la tunicamycine. Quantification du nombre de cellules avec plus de 3 vacuoles (n = 35). Barre d'échelle : 5µm **(B)** Localisation de Vht1-mCherry WT, *rod1Δ*, *hvk2Δ*, GPD-*DOG2*, *reg1Δ* et *snf1Δ* par microscopie à fluorescence avant et après 4h de traitement au 2DG. Quantification du nombre de cellules avec plus de 3 vacuoles (n = 100). Barre d'échelle : 5µm

B.2 - Un traitement des cellules au 2DG induit la formation de gouttelettes lipidiques

Lors d'observation de cellules au microscope après un traitement des levures au 2DG pendant 4h, nous avons remarqué la présence de corps granuleux en lumière visible qui correspondent à des gouttelettes lipidiques (LDs : Lipid Droplets) (**Figure 3.7A**). Les LDs sont des organites de stockage de lipides neutres dans les cellules qui se forment lorsque les cellules sont en situation de carence ou en situation d'important stress, tels qu'une augmentation de pH ou de température (Hariri et al., 2018). Dans des fibroblastes embryonnaires de souris cultivées dans un milieu sans acides aminés, sans glucose, sans glutamine et sans sérum, le nombre de LDs atteint un plafond après 16h d'incubation (Li et al., 2017). Afin de comprendre quel pouvait être les protéines et voies de signalisation impliquées dans la formation de ces organites, nous les avons étudiés à l'aide d'un colorant fluorescent vert, le bodipy (Treibs and Kreuzer, 1968) qui s'accumule dans les LDs. Nous avons ainsi étudié la formation de ces organites dans une souche WT et des souches mutées (*atg8Δ*, *hac1Δ*, *rvs167Δ* et *pep4Δ*). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la délétion de *HAC1* rend les cellules sensibles au 2DG de par l'absence d'activation de l'UPR.

L'autophagie, via la protéine Atg8, joue un rôle dans la formation et le maintien des LDs (Maeda et al., 2017). Enfin, la protéine Rvs167 joue un rôle dans la survie cellulaire en réponse à une carence (Lee et al., 1998). Dans les différentes souches traitées au 2DG et observées au microscope, on ne remarque pas de différence évidente dans le nombre de LDs par rapport à une souche WT (**Figure 3.7B**). Cette étude n'a pas été continuée et les protéines et voies de signalisation régulant la formation de ces organites en réponse au 2DG restent donc encore à déterminer.

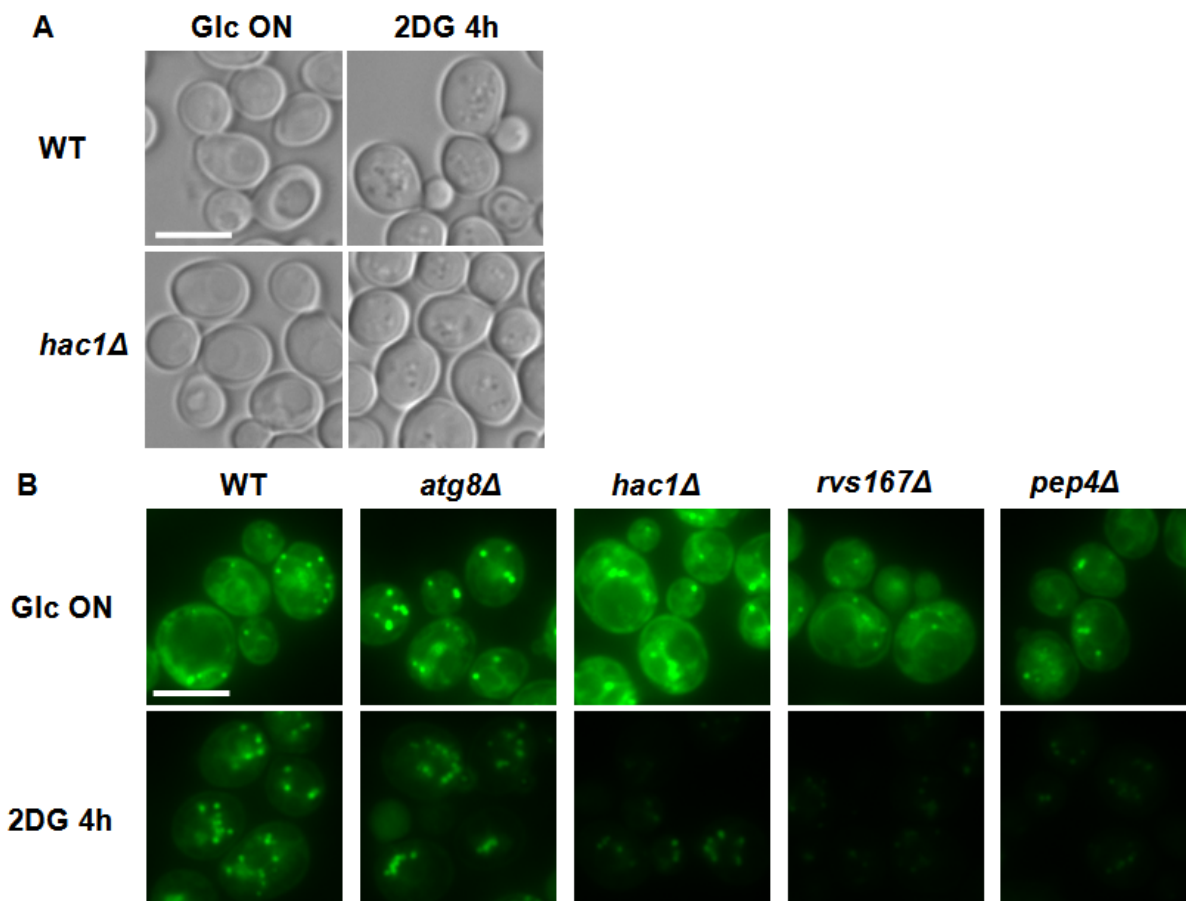


Figure 3.7 – Le traitement de cellules au 2DG entraîne la formation de gouttelettes lipidiques. (A) Microscopie de cellules WT et *hac1Δ* avant et après un traitement de 4h au 2DG. Observées au microscope au DIC. Barre d'échelle : 5µm (B) Localisation du bodipy dans des cellules WT, *atg8Δ*, *hac1Δ*, *rvs167Δ* et *pep4Δ* par microscopie à fluorescence avant et après un traitement de 4h au 2DG. Barre d'échelle : 5µm

B.3 - Le 2DG n'induit pas l'autophagie dans des cellules de levures

Il a été montré que le 2DG induit l'autophagie dans des cellules cancéreuses humaines via l'activation d'un stress du RE et de la voie de l'UPR (Xi et al., 2011). Il est connu que chez *Saccharomyces cerevisiae*, un traitement des cellules au 2DG induit un stress du RE ainsi que l'UPR (Defenouillère et al., 2019). Nous nous sommes donc demandé si le 2DG induisait l'autophagie également chez la levure. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, afin de détecter l'activation de l'autophagie, on étudie la dégradation de GFP-Atg8 (Torggler et al., 2017) par immunoblot ou sa localisation vacuolaire par microscopie à fluorescence. Pour cela, nous avons utilisé une souche avec Atg8 étiquetée avec la GFP en N-terminal (Klionsky, 2011) et nous nous sommes intéressés à l'activation de l'autophagie par immunoblot et microscopie en réponse au glucose, au 2DG et lors d'une carence en acides aminés (aa) (**Figure 3.8**). On remarque ainsi que lors d'une carence en

aa, il y a une dégradation d'Atg8 observable par immunoblot contrairement aux autres conditions (**Figure 3.8A**). De plus, par microscopie, on observe dans toutes les conditions la formation de puncta correspondant sans doute à la formation de phagophores, le précurseur de l'autophagosome, dont Atg8 contrôle la formation (Xie et al., 2008) (**Figure 3.8B**). On n'observe cependant pas d'adressage d'Atg8 au niveau des vacuoles comme attendu lors d'une carence en aa (Yin et al., 2016). D'après les données obtenues, le 2DG ne semble pas déclencher l'autophagie chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, les expériences ont été réalisées une seule fois. Il sera donc essentiel de les répéter afin de confirmer ce résultat en ajoutant un contrôle marquant la vacuole afin d'observer s'il existe un adressage d'Atg8 à la vacuole dans les conditions testées.

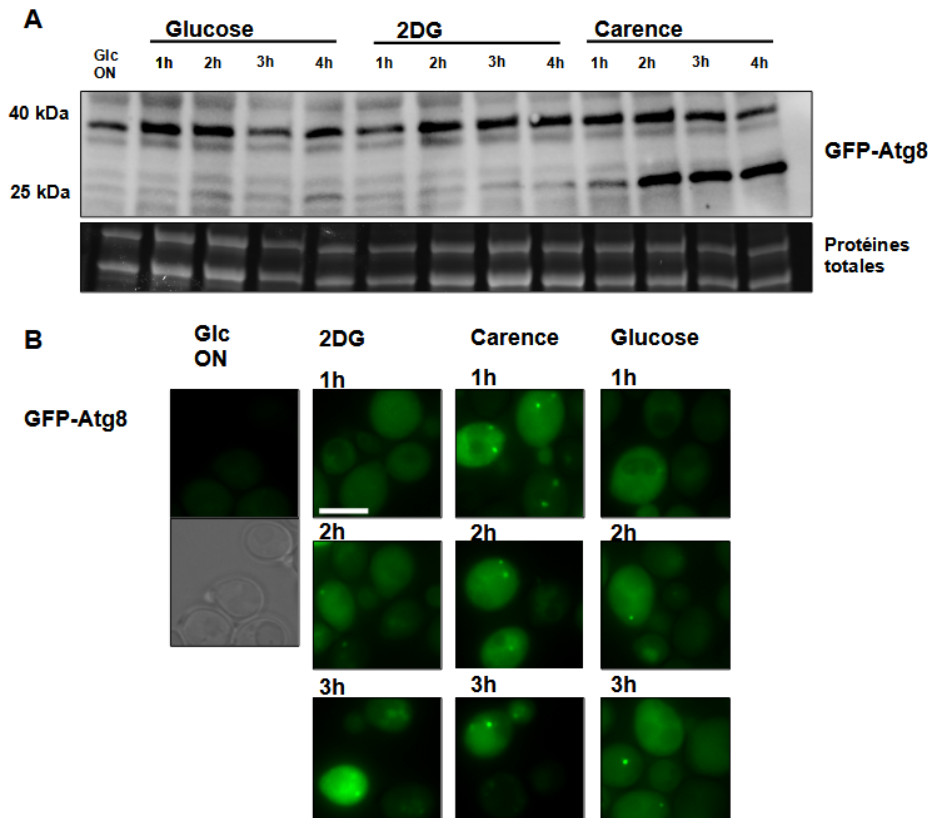


Figure 3.8 - Contrairement à une carence en glucose, un traitement au 2DG n'induit pas l'autophagie dans des cellules. (A) Western blot sur extraits protéiques totaux de levures exprimant GFP-Atg8 avant et après une carence en acides aminés, un traitement au 2DG ou au glucose aux temps indiqués. Utilisation d'un anticorps anti GFP. **(B)** Localisation de GFP-Atg8 par microscopie à fluorescence avant et après une carence en acides aminés, un traitement au 2DG ou un traitement au glucose, aux temps indiqués. Barre d'échelle : 5µm

B.4 - Le 2DG n'induit pas de changement de profil d'ubiquitination totale chez la levure

Le 2DG induit une déphosphorylation et l'ubiquitination de l'arrestine Rod1 (**Figure 2.3A**). Cette modification post-traductionnelle (MPT) induit l'activation de la protéine. Les MPT régulent fortement l'activation et l'inhibition des protéines et l'ubiquitination joue un rôle important dans cette régulation, principalement dans la dégradation des protéines. Nous avons donc regardé si le 2DG induisait un changement important dans les MPT et donc dans le profil total d'ubiquitination des protéines. Des données préliminaires obtenues au laboratoire suggéraient en effet un remodelage important du protéome ubiquitiné en réponse au 2DG (Q. Defenouillère, non publié). Pour confirmer cela, nous avons étudié le profil

d'ubiquitination totale des protéines dans des cellules WT et chez différents mutants (**Figure 3.9**). Nous avons donc observé l'ubiquitination totale des protéines dans des mutants *snf1Δ*, *hac1Δ* et *mig1Δmig2Δ* connus pour être sensibles au 2DG et des mutants *hvk2Δ* et *reg1Δ* connus pour y être résistants. Nous avons également observé cette ubiquitination dans un mutant *ubc6Δubc7Δ*. *UBC6* et *UBC7* codent pour des enzymes qui conjuguent l'ubiquitine sur les protéines et sont impliquées dans l'ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation), une voie de dégradation des protéines mal repliées dans la voie de sécrétion, au niveau du RE (Thibault and Ng, 2012). En effet, nous avons fait l'hypothèse que si des changements sont observés, ils pourraient être une conséquence de l'activation de cette voie de contrôle-qualité au niveau du RE suite au traitement au 2DG et les conséquences connues sur la glycosylation des protéines. Cependant, on remarque que dans les différentes souches traitées ou non au 2DG, il n'y a pas de différence d'ubiquitination totale des protéines (**Figure 3.9**). Ainsi, les résultats préliminaires n'ont pas été reproduits et le 2DG ne semble pas induire un changement de profil de l'ubiquitination totale des protéines chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, il sera donc essentiel de la répéter afin de confirmer les résultats obtenus.

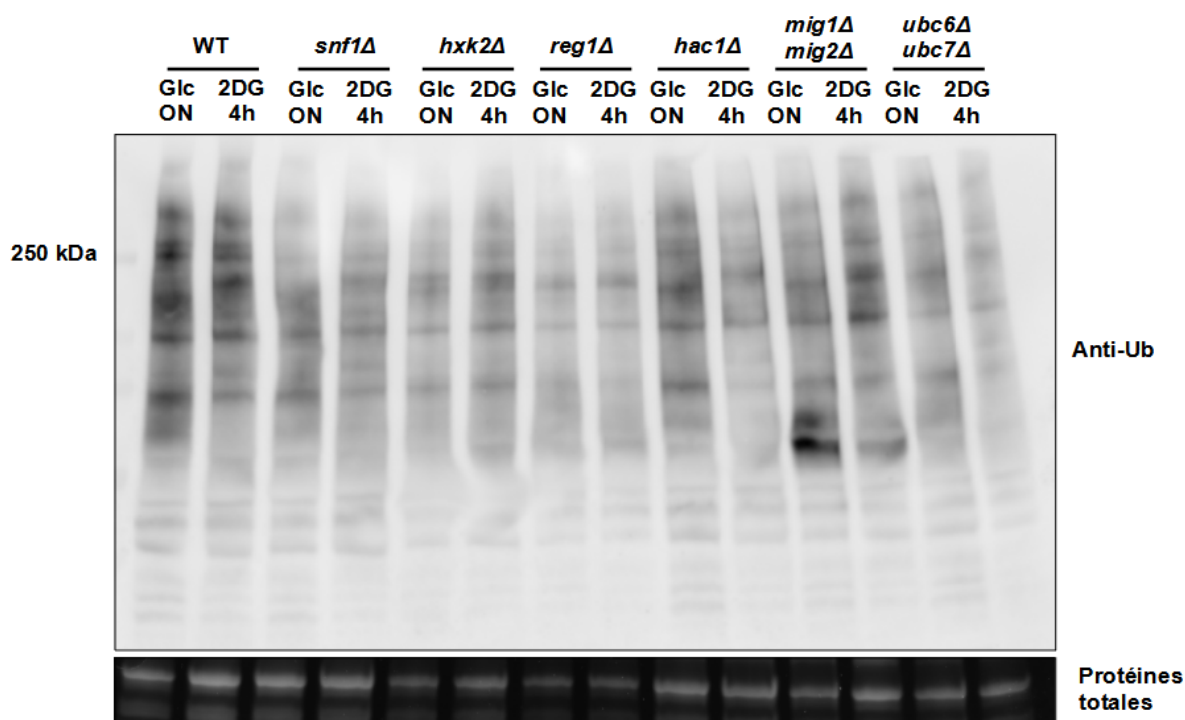


Figure 3.9 - Le traitement au 2DG de cellules WT ou mutées pour différents gènes ne modifie pas le profil d'ubiquitination des protéines. Western blot sur extraits protéiques totaux de levures WT, *snf1Δ*, *hvk2Δ*, *reg1Δ*, *hac1Δ*, *mig1Δmig2Δ* et *ubc6Δubc7Δ* avant et après ajout de 2DG pendant 4h. Utilisation d'un anticorps anti ubiquitine

B.5 - Discussion

Le 2DG, lors de son import dans les cellules semble donc avoir plusieurs conséquences cellulaires. Il existe sûrement d'autres effets non-identifiés du 2DG qui permettraient de comprendre un peu plus les mécanismes de résistance et toxicité des cellules à cette drogue.

B.5.1 - Comment un traitement au 2DG peut induire une fragmentation vacuolaire et la formation de gouttelettes lipidiques ?

Parmi les effets identifiés, on a remarqué qu'un traitement des levures au 2DG entraîne une fragmentation de la vacuole des cellules; un traitement à la tunicamycine induisant également une fragmentation des vacuoles (**Figure 3.6**) et ce via le déclenchement de l'UPR et l'activation du complexe TORC1 (Stauffer and Powers, 2015). Dans des mutants de ce complexe, on observe un défaut de fragmentation des vacuoles. On peut donc faire l'hypothèse que l'UPR, déclenché par un traitement au 2DG (Defenouillère et al., 2019), induit une fragmentation vacuolaire dans des cellules WT. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'observer la fragmentation des vacuoles dans des cellules mutées pour Hac1 ou Ire1, des protéines participant à l'UPR chez *Saccharomyces cerevisiae*. On s'attend à ce que la fragmentation vacuolaire soit moins importante dans ces mutants que dans des cellules WT si lors d'un traitement au 2DG, le stress du RE qui est déclenché entraîne une forte fragmentation vacuolaire via la voie UPR. De plus, un stress du RE et une carence en glucose induisant la formation des gouttelettes lipidiques (Henne et al., 2018), cela pourrait expliquer comment un traitement au 2DG induit la formation de ces gouttelettes (**Figure 3.7**).

Une autre hypothèse peut également expliquer cette importante fission vacuolaire lors d'un traitement des cellules au 2DG. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, la fission et la fusion vacuolaire sont des phénomènes dynamiques dans les cellules et un défaut de fusion entraîne une fission de la vacuole (Baars et al., 2007). De plus, de nombreux lipides sont impliqués dans ce phénomène : le diacylglycérol (DAG) et des phosphoinositides sont nécessaires pour la fusion de vacuoles (Starr and Fratti, 2019). Il est connu que dans des cellules humaines, le 2DG entraîne un changement de niveaux de distribution des lipides dès 4h de traitement avec des changements encore plus importants après 24h de traitement. Ainsi, après que les cellules aient été en contact avec le 2DG pendant 1 jour, on observe une augmentation de 1,5 fois le niveau de phosphoinositides et une diminution de presque 1,5 fois le niveau de DAG par rapport à des cellules non traitées au 2DG (Kavaliuskiene et al., 2015). On peut donc faire l'hypothèse qu'un traitement au 2DG entraîne des changements de niveaux de certains lipides (DAG et phosphoinositides) dans les cellules induisant un défaut de fusion des vacuoles et donc une fission de ces dernières. De plus, ces lipides sont essentiels pour la biogenèse et formation des gouttelettes lipidiques (Gao et al., 2019). Un changement du niveau d'expression de ces lipides pourrait expliquer la formation des gouttelettes lipidiques observée lors d'un traitement au 2DG (**Figure 3.7**).

On a remarqué également que dans certains mutants résistants au 2DG, c'est-à-dire *reg1* Δ , *hvk2* Δ ou la surexpression de *DOG2* la fragmentation des vacuoles est moins importante que dans des cellules WT (**Figure 3.6B**). Cependant, dans des mutants *rod1* Δ qui sont également résistants au 2DG, on observe toujours une fragmentation vacuolaire. Ceci suggère que les mécanismes à l'origine de la résistance sont différents. Le mutant *rod1* Δ présente essentiellement un défaut d'endocytose (**Chapitre 2**). Les autres mutants agissent soit directement sur la toxicité du 2DG (*hvk2* Δ ou surexpression de *DOG2*), soit via une augmentation de l'activité de Snf1, qui a de nombreuses conséquences cellulaires (*reg1* Δ). Les stratégies de résistance au 2DG sont donc différentes et il est possible que celle présente dans le mutant *rod1* Δ ne permette pas d'éviter la fragmentation vacuolaire.

B.5.2 - A l'inverse de son effet dans les cellules humaines, le 2DG ne semble pas induire l'autophagie chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le 2DG déclenchant l'autophagie chez l'humain (Xi et al., 2011), nous nous sommes intéressés à l'effet du 2DG sur l'autophagie chez *Saccharomyces cerevisiae*. On remarque que le 2DG ne semble pas induire l'autophagie chez la levure contrairement à une carence en aa (**Figure 3.8**). Chez l'humain, le 2DG entraîne un stress du RE qui déclenche l'autophagie (Xi et al., 2011). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, on sait que le 2DG induit un stress du RE (Defenouillère et al., 2019) et qu'un stress du RE induit par la Tn déclenche l'autophagie chez les levures (Yorimitsu et al., 2006). On aurait pu s'attendre à ce qu'un traitement au 2DG déclenche l'autophagie chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, l'expérience ayant été effectuée une seule fois, il faudrait la refaire afin de confirmer ou infirmer le résultat obtenu en variant les paramètres de concentrations de 2DG et de temps de traitement ainsi que d'ajouter un contrôle avec un traitement des cellules à la Tn.

C - Cribles génétiques pour comprendre les différents mécanismes de résistance et sensibilité des cellules au 2DG

C.1 - Exploitation d'un crible génétique publié (Hoepfner et al., 2014)

En 2014, Hoepfner *et al.* testent la croissance de près de 4500 mutants hétérozygotes et homozygotes de *Saccharomyces cerevisiae* sur près de 1800 composés biologiques dont le 2DG (Hoepfner et al., 2014). Parmi les différents mutants testés, on retrouve, par exemple, le mutant *reg1Δ*, résistant au 2DG comme attendu ainsi que d'autres mutants identifiés comme sensibles, *hac1Δ*, *ire1Δ*, *dog2Δ* (Defenouillère et al., 2019). Des résultats obtenus, nous avons sélectionné 24 mutants, sensibles ou résistants au 2DG (**Tableau 3.1**). Les mutants choisis l'ont été car leur sensibilité à 300μM de 2DG est supérieure ou inférieure à 4 (unité arbitraire) ou bien parce qu'ils faisaient partie de la voie TOR.

Tableau 3.1 – Liste des mutants sélectionnés à partir de l'article (Hoepfner et al., 2014) comme étant sensibles ou résistants au 2DG. Mutants classés en fonction de leur score de sensibilité au 2DG à différentes concentrations de la drogue (300 et 500 μ M) - Rouge : sensibilité élevée - Vert : résistance élevée

Gene name	Function	Sensitivity 300 μ M	Sensitivity 500 μ M
YPL067C	Mutant increase toxicity of amyloid overproduction	-11,23	14,62
IRS4	EH domain-containing protein	-6,63	-5,63
SLA1	Cytoskeletal protein binding protein	5,37	-3,96
NGG1	Transcriptional regulator involved in glucose repression	-5,35	-4,08
GTR2	Putative GTP binding protein that regulates the Ran/Tc4 GTPase cycle	-4,7	-3,56
LST4	Subunit of the Lst4p-Lst7p GTPase activating protein complex for Gtr2p	-4,42	-2,72
TCO89	Subunit of TORC1 (Tor1p or Tor2p-Kog1p-Lst8p-Tco89p)	-4,28	-2,95
MCK1	Dual-specificity ser/thr and tyrosine protein kinase	-4,25	-3,17
BNI4	Targeting subunit for Glc7p protein phosphatase	-4,1	-3,23
GTR1	Cytoplasmic GTPase	-2,94	-4,06
SAP155	Protein required for function of the Sit4p protein phosphatase	-2,94	-3,75
SAP4	Protein required for function of the Sit4p protein phosphatase	2,49	-0,58
RGL1	Regulator of Rho1p signaling, cofactor of Tus1p	-2,4	-4,38
LST7	Protein possibly involved in a post-Golgi secretory pathway	-1,93	-2,77
RVS167	Actin-associated protein with roles in endocytosis and exocytosis	0,01	0,01
VPS51	Component of the GARP (Golgi-associated retrograde protein) complex	0,13	0,49
SIP5	Protein of unknown function	0,15	0,36
BRE5	Ubiquitin protease cofactor	0,57	5,87
RCY1	F-box protein involved in recycling endocytosed proteins	0,81	5,72
UBP3	Ubiquitin-specific protease involved in transport and osmotic response	2,2	7,04
NPR1	Protein kinase	2,77	2,67
PEP12	Target membrane receptor (t-SNARE)	5,12	3,61
YPS9	Guanine nucleotide exchange factor (GEF)	5,85	4,47
SUR4	Elongase; involved in fatty acid and sphingolipid biosynthesis	7,32	7,33

Afin de vérifier leur résistance ou sensibilité, nous avons fait pousser ces mutants pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,05% ou 0,2% de 2DG (**Figure 3.10**). Ce test de croissance nous a permis de confirmer la sensibilité de 3 mutants au 2DG : les mutants *sla1 Δ* , *bni4 Δ* et *ngg1 Δ* . Afin de confirmer cette sensibilité, les mutants ont été complémentés avec des plasmides contenant une région génomique incluant les gènes manquants, afin de vérifier que les souches retrouvent leur résistance au 2DG (**Figure 3.11**). Ces complémentations ont confirmé que les mutants *sla1 Δ* , *bni4 Δ* et *ngg1 Δ* sont sensibles au 2DG. *SLA1* code pour une protéine impliquée dans l'endocytose qui se lie aux protéines du cytosquelette (Warren et al., 2002). *BNI4* code pour une protéine d'échafaudage impliquée, notamment, dans la localisation de la phosphatase Glc7 au niveau du bourgeon lors de l'émergence de ce dernier au cours de la division cellulaire (Kozubowski et al., 2003). Enfin, *NGG1* code pour une sous-unité protéique du complexe acétyltransférase SAGA, modificatrice d'histones (Brandl et al., 1993; Saleh et al., 1997) (**Figure 3.12**). Nous avons regardé dans un premier temps la localisation des protéines ainsi que leurs expressions par immunoblot afin de voir si un traitement au 2DG des cellules induisait un relocalisation, des MPT ou une dégradation de ces protéines (**Figure 3.13**). Nous avons pour cela utilisé les souches de la collection GFP (Huh et al., 2003). On observe qu'un traitement au 2DG n'induit pas de changement de localisation des 3 protéines. Quant à des potentielles MPT ou une potentielle dégradation, uniquement Sla1-GFP a pu être observé par immunoblot et on n'observe aucune MPT ou dégradation évidentes de la protéine lors d'un traitement au 2DG. Pour les 2 autres protéines, il sera essentiel de répéter l'expérience ou de construire des souches avec les protéines avec d'autres étiquettes, permettant de les observer par immunoblot.

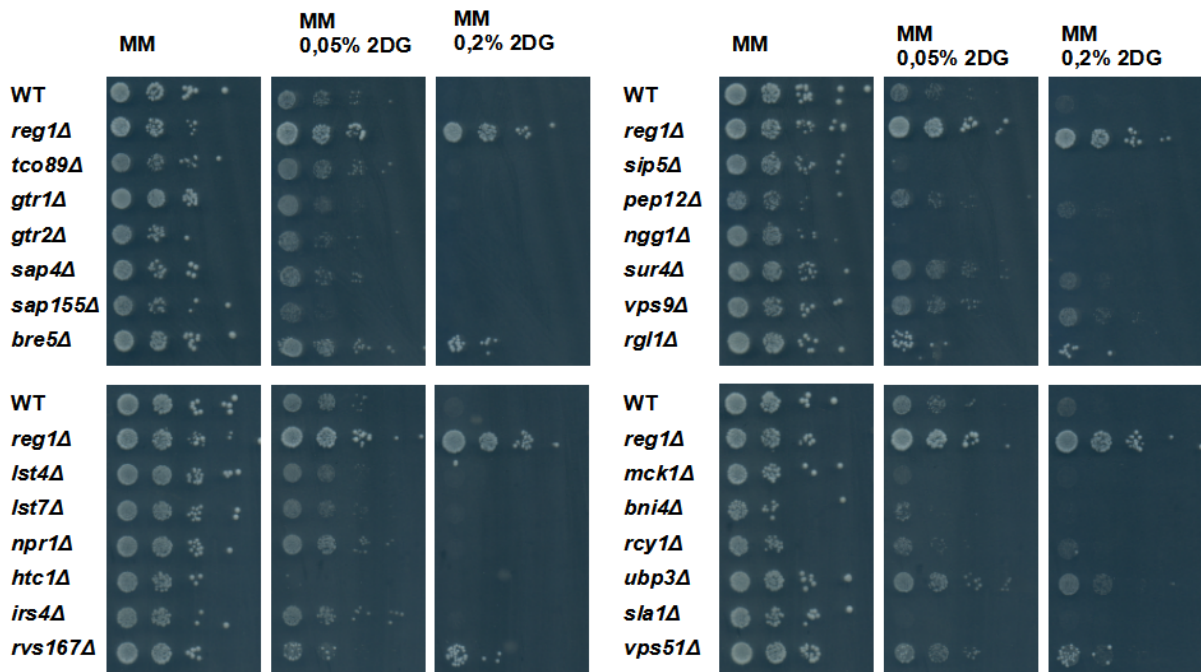


Figure 3.10 – Plusieurs mutants identifiés dans l'article Hoepfner *et al.* sont sensibles au 2DG. Dilutions en série de culture des différents mutants indiqués déposées sur milieu minimum (MM), MM + 0,05 % 2DG ou MM + 0,2 % 2DG et cultivées pendant 3 jours à 30°C

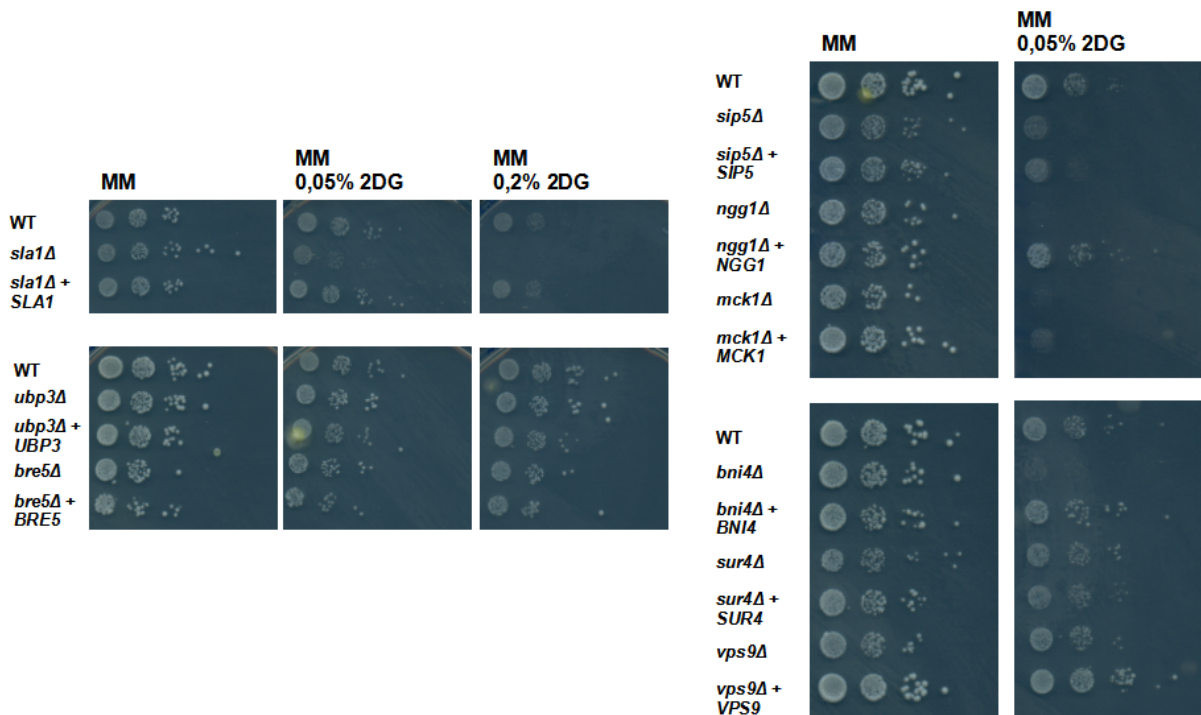


Figure 3.11 - Les mutants *sla1Δ*, *bni4Δ* et *ngg1Δ* sont sensibles au 2DG. Dilutions en série de culture des différents mutants indiqués déposées sur milieu minimum (MM), MM + 0,05 % 2DG ou MM + 0,2 % 2DG et cultivées pendant 3 jours à 30°C

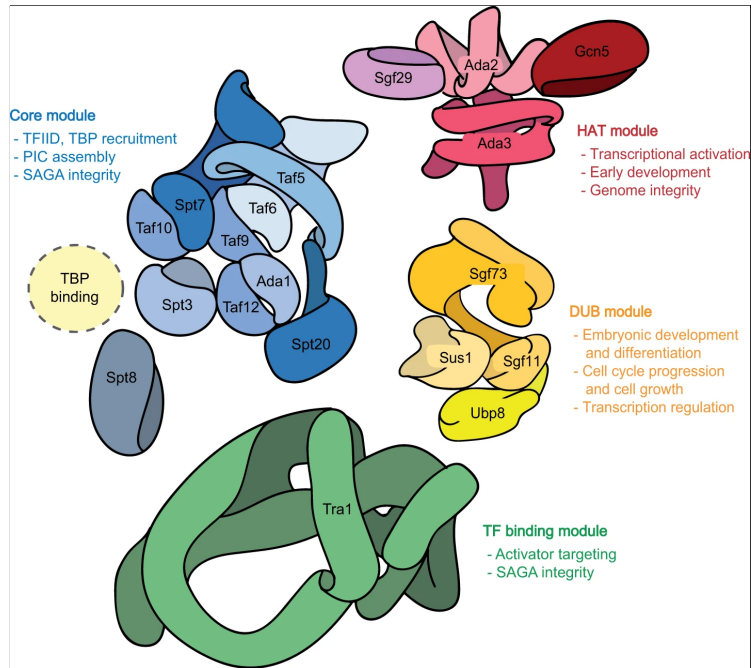


Figure 3.12 - Schéma de l'organisation du complexe SAGA (Cheon et al., 2020). Hfi1 est nommée Ada1 et Ngg1 est nommée Ada3 sur ce schéma.

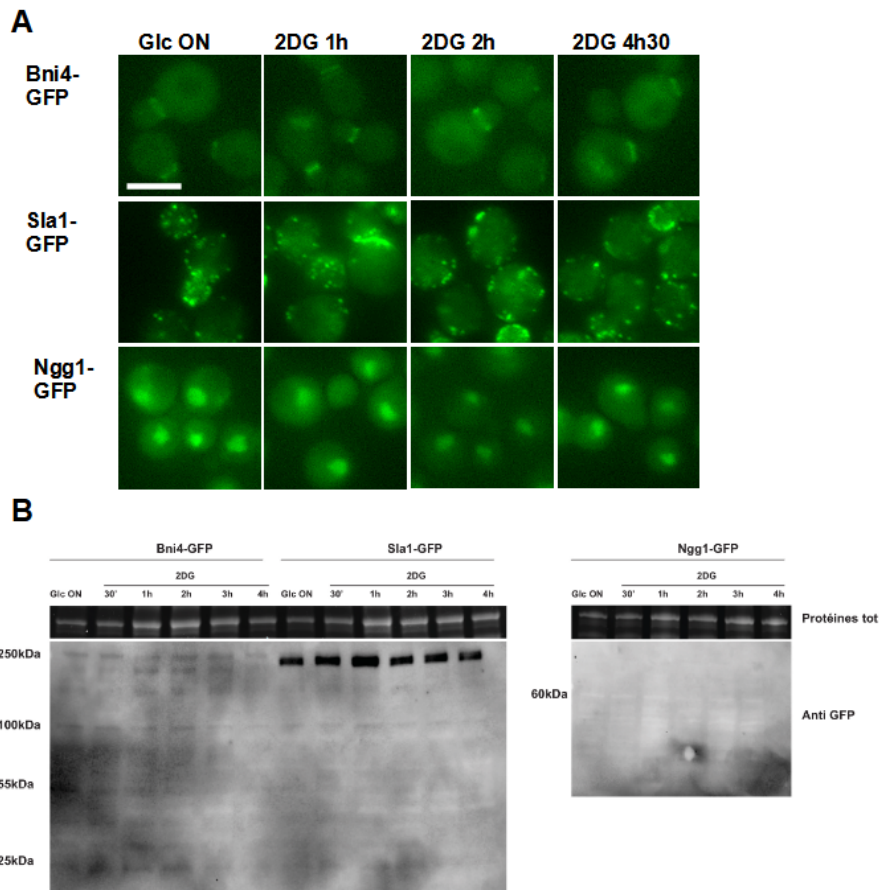


Figure 3.13 - La localisation de Bni4, Sla1 et Ngg1 ne change pas en réponse au 2DG et l'observation de ces protéines par immunoblot n'est pas convaincante. (A) Localisation de Bni4-GFP, Sla1-GFP et Ngg1-GFP par microscopie à fluorescence avant et après un traitement au 2DG, aux temps indiqués. Barre d'échelle : 5µm **(B)** Western blot sur extraits protéiques totaux de levure exprimant Bni4-GFP, Sla1-GFP et Ngg1-GFP avant et après un traitement au 2DG, aux temps indiqués. Utilisation d'un anticorps anti-GFP

Un mutant connu pour être hypersensible au 2DG est le mutant *snf1Δ*. Une des raisons de cette hypersensibilité est l'absence d'expression de la phosphatase Dog2 (Defenouillère et al., 2019). De même, le mutant *dog1Δdog2Δ* est hypersensible au 2DG. Pour essayer de comprendre la sensibilité des mutants *sla1Δ*, *bni4Δ* et *ngg1Δ* au 2DG, nous avons vérifié l'activité du promoteur de *DOG2* fusionné au rapporteur LacZ dans ces mutants, après une nuit de culture en milieu glucose et suite à un traitement au 2DG (**Figure 3.14A**). On remarque que suite à un traitement au 2DG, dans des cellules WT ou mutées pour *SLA1* et *BNI4*, l'expression de *DOG2* augmente en comparaison à la condition contrôle Glc ON. Chez le mutant *ngg1Δ*, on remarque, au contraire, qu'il n'y a pas de changement d'expression de *DOG2* en réponse au 2DG. Ainsi, la sensibilité de ce mutant au 2DG pourrait être due à l'absence d'expression de *DOG2*. Afin de vérifier si la protéine Dog2 était exprimée dans ce mutant, nous avons regardé son expression par immunoblot en réponse au 2DG. Dans des cellules WT, on observe une augmentation d'expression de la protéine en réponse au 2DG, comme attendu (Defenouillère et al., 2019). Dans les mutants *ngg1Δ*, il n'y a aucune expression de la phosphatase (**Figure 3.14B**). De plus, nous avons également regardé l'expression de la protéine Dog2 chez les mutants *bni4Δ* et *sla1Δ*. On remarque alors que Dog2 est exprimée chez ces 2 mutants (**Figure 3.14C**). Ainsi, ce n'est pas l'absence d'expression de Dog2 qui permet d'expliquer la sensibilité des mutants *bni4Δ* et *sla1Δ* au 2DG.

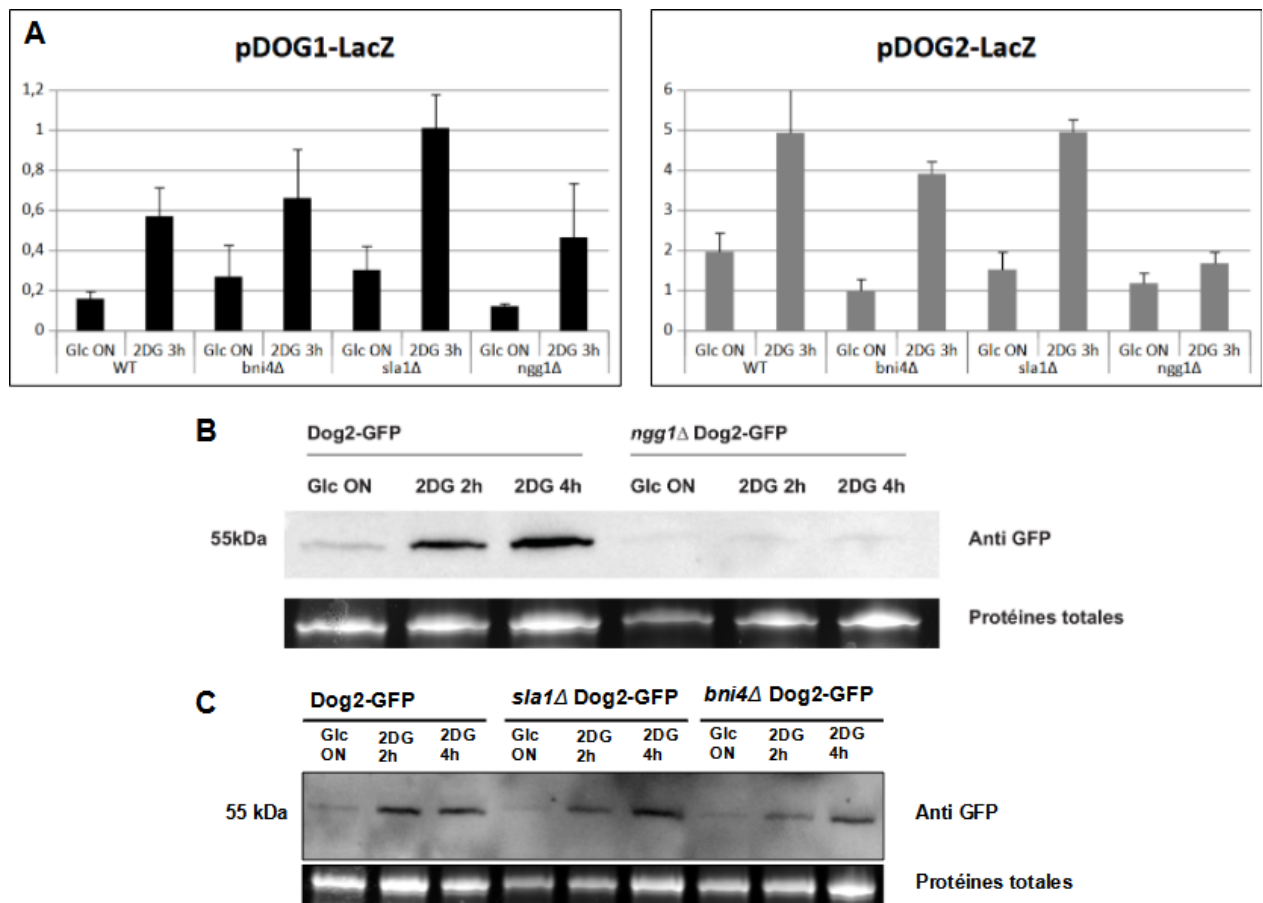


Figure 3.14 - La sensibilité du mutant *ngg1Δ* est peut-être due à l'absence d'expression transcriptionnelle et de la protéine *DOG2*. (A) Test β -galactosidase de cellules WT, *bni4Δ*, *sla1Δ* et *ngg1Δ* exprimant LacZ sous le contrôle des promoteurs de *DOG1* ou *DOG2* avant et après un traitement au 2DG pendant 3h (\pm SEM, n = 3 expériences indépendantes). (B-C) Western blot sur extraits protéiques totaux de levures exprimant Dog2-GFP, *bni4Δ* Dog2-GFP, *sla1Δ* Dog2-GFP et *ngg1Δ* Dog2-GFP avant et après un traitement au 2DG, aux temps indiqués. Utilisation d'un anticorps anti-GFP

Comme dit précédemment, Ngg1 est une sous-unité du complexe SAGA, une acétyltransférase modificateur d'histones. L'acétylation des histones permet un relâchement de la structure de la chromatine pour l'activation transcriptionnelle de loci génomique. Ce complexe multi-protéique est constitué de 2 modules enzymatiques médiant l'acétylation et la déubiquitination des histones, participant ainsi à l'activation de certains gènes. Dans ce complexe, Ngg1 fait partie du module HAT (Histone AcetylTransferase) du complexe (Revue : Koutelou et al., 2010) (**Figure 3.12**). Nous avons testé la croissance de 13 souches mutées pour différentes sous-unités de SAGA pendant 3 jours sur 0,05% et 0,2% de 2DG (**Figure 3.15A**). On remarque que deux autres mutants de sous-unités de SAGA sont également sensibles au 2DG : *sus1Δ* et *hfi1Δ*. *Sus1* est une sous-unité du module de déubiquitination de SAGA et *Hfi1* est une sous-unité architecturale de ce complexe (**Figure 3.12**).

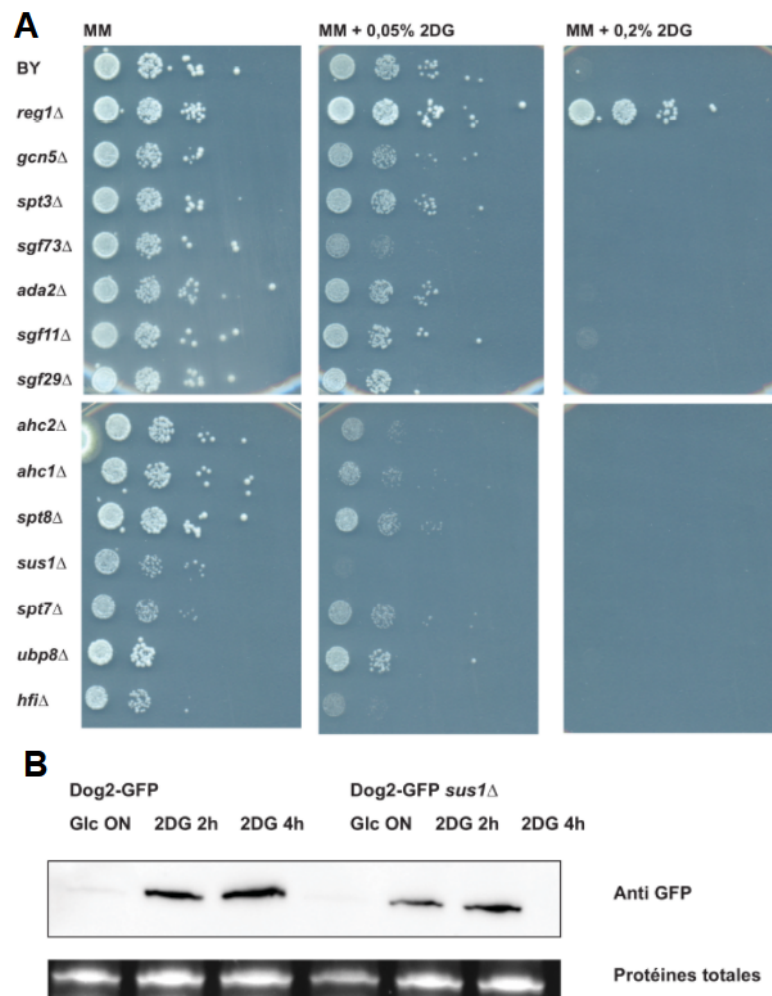


Figure 3.15 - Les mutants *sus1Δ* et *hfi1Δ*, du complexe SAGA, sont sensibles au 2DG. (A) Dilutions en série de culture des différents mutants indiqués déposées sur milieu minimum (MM), MM + 0,05 % 2DG ou MM + 0,2 % 2DG et cultivées pendant 3 jours à 30°C. (B) Western blot sur extraits protéiques totaux de cellules WT ou *sus1Δ* exprimant Dog2-GFP, avant et après un traitement au 2DG, aux temps indiqués. Utilisation d'un anticorps anti-GFP

Pour comprendre comment ces mutants sont sensibles au 2DG, nous nous sommes intéressés à l'expression de Dog2 dans ces mutants. L'expression de la phosphatase a donc été étudiée dans un mutant *sus1Δ* après une nuit de culture en milieu glucose et après un traitement au 2DG de 2h et 4h (**Figure 3.15B**). On remarque alors que chez ce mutant, l'expression de Dog2 est identique à celle dans une souche WT, puisqu'il y a une augmentation de l'expression de la phosphatase en réponse au 2DG. La sensibilité de la

souche *sus1Δ* n'est pas due à un défaut d'expression de la 2DG6P phosphatase et reste donc à déterminer. Il reste également à déterminer si la sensibilité de la souche *hfi1Δ* est due à un défaut d'expression de *DOG2* comme le mutant *ngg1Δ*.

C.2 - Crible génétique pour déterminer l'origine de la résistance du mutant *rod1Δ* au 2DG

Le travail qui suit a été réalisé en parallèle aux travaux sur *Ina1*, et avant d'avoir réalisé que la résistance du mutant *rod1Δ* peut être attribuée à la stabilisation d'Hxt3 et d'Hxt1 à la membrane plasmique (**Chapitre 2**).

Dans cette partie, nous avons cherché à comprendre l'origine de la résistance du mutant *rod1Δ* au 2DG. Un moyen commun pour un mutant de devenir résistant au 2DG est via la surexpression de la phosphatase *DOG2* (Defenouillère et al., 2019). En utilisant un rapporteur *pDOG2:LacZ*, nous avons remarqué que ce n'était pas le cas pour un mutant *rod1Δ*. La résistance de ce mutant ne peut donc pas être expliquée par une augmentation de l'expression de *DOG2*, qui détoxifierait les cellules (**Figure 2.5A**).

Afin d'essayer de comprendre comment un mutant *rod1Δ* peut être résistant au 2DG, nous avons réalisé un crible génétique. Le déroulé précis de ce crible génétique est expliqué en (**Figure 3.16**). En résumé, nous avons transformé la souche *rod1Δ* avec des plasmides surexprimant les différents gènes présents chez *Saccharomyces cerevisiae* (Jones et al., 2008). Les différentes souches obtenues ont été déposées à l'aide d'un robot sur deux séries de boîtes avec un milieu minimum (MM) et contenant ou non 0,2% 2DG. Les cellules ont été cultivées pendant 3 jours. Pour les souches sensibles au 2DG, les plasmides ont été extraits et séquencés afin d'identifier les gènes qui restaurent la sensibilité du mutant *rod1Δ* au 2DG. Ainsi, plusieurs plasmides ont été séquencés et cela nous a permis d'identifier des gènes dont la surexpression restaure la sensibilité au 2DG (**Tableau 3.2**).

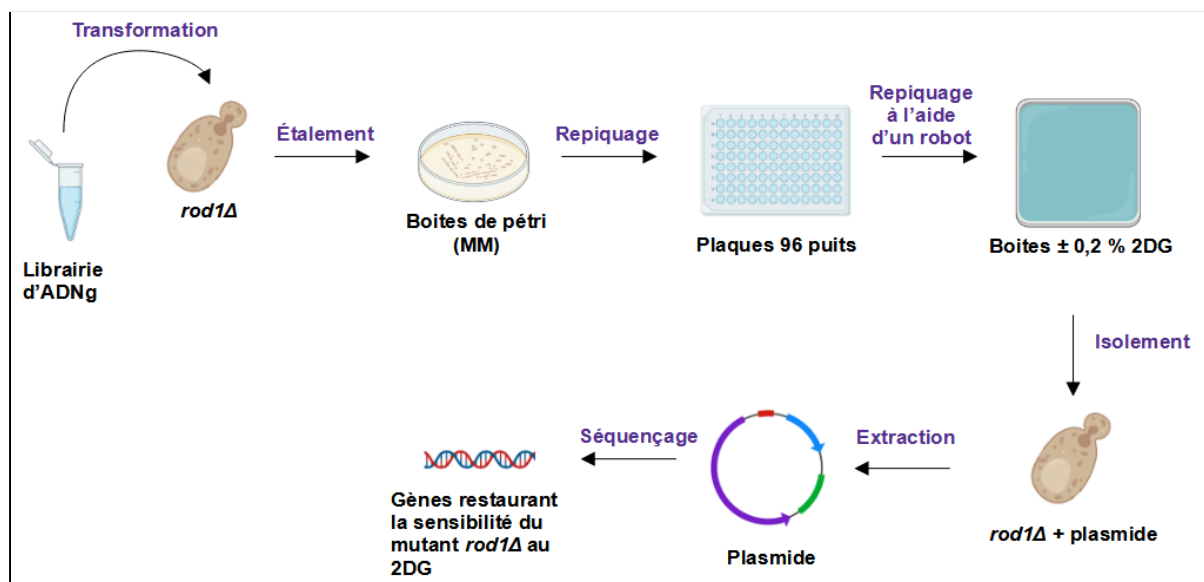


Figure 3.16 - Déroulé du crible génétique. La souche mutée pour *ROD1* a été transformée avec une banque d'ADN génomique (Jones et al., 2008) contenant des plasmides permettant la surexpression de différents gènes de chez *Saccharomyces cerevisiae* (plusieurs gènes par plasmides). Les levures obtenues ont été cultivées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu minimum (MM) sélectif pendant 3 jours à 30°C pour sélectionner les transformants. Les colonies isolées ont été repiquées dans des plaques 96 puits contenant un MM sélectif et cultivées pendant 3 jours à 30°C. A l'aide d'un robot (RoToR, Singer), les levures ont été répliquées sur deux séries de boîtes de MM sélectif contenant ou non 0,2% 2DG et cultivées 2 à 3 jours à 30°C. Les levures ne poussant pas sur 2DG ont été isolées et l'absence de croissance a été vérifiée sur de nouvelles

boîtes contenant 0,2% de 2DG. L'ADN de ces levures a ensuite été isolé et les plasmides ré-isolés ont été séquencés afin d'identifier les gènes restaurant la sensibilité du mutant *rod1Δ* au 2DG.

Tableau 3.2 - Résultats du crible génétique réalisé dans une souche *rod1Δ*. Plusieurs plasmides ont été retrouvés plusieurs fois. Pour *GPD1*, le même plasmide (YGPM31g24) a été retrouvé 2 fois (27H7 et 36A5) et 1 autre plasmide avec le même gène (YGPM14g08) a été retrouvé une fois (16D5). Les autres gènes présents sur les plasmides sont indiqués. Légende : '[]*' = 3' du gène manquant ; '[]&' = 5' du gène manquant; '[]' : ORF intacte, mais certaines régions régulatrices peuvent manquer.

Suppresseur	Plasmide (cf Jones et al., 2008)	Gènes présents sur le plasmide (gras : gène d'intérêt potentiel)	Commentaire
27H7, 36A5	YGPM31g24	<i>MRX9</i> / <i>YDL026W</i> / <i>RTK1</i> / <i>YDL025W-A</i> / <i>DIA3</i> / <i>YDL022C-A</i> / <i>tA(AGC)D</i> / <i>SRF4</i> / <i>GPD1</i> / <i>[GPM2]</i> *	La surexpression de Gpd1 restaure la sensibilité de la souche <i>rod1Δ</i> au 2DG
16D5	YGPM14g08	<i>[DIA3]</i> * / <i>YDL022C-A</i> / <i>tA(AGC)D</i> / <i>SRF4</i> / <i>GPD1</i> / <i>GPM2</i> / <i>RPN4</i> / <i>[OSH2]</i> &	La surexpression de Gpd1 restaure la sensibilité de la souche <i>rod1Δ</i> au 2DG
1D6, 8C10	YGPM31e15	<i>[YMR265C]</i> * / <i>RSN1</i> / <i>PPA2</i> / <i>PRP24</i> / <i>TMA23</i> / <i>RRN9</i> / <i>URA10</i> / <i>tQ(CUG)M</i>	
8H8, 11B8	YGPM3o05	<i>[MEP1]</i> * / <i>YGR121W-A</i> / <i>YGR122W</i> / <i>YGR122C-A</i> / <i>tR(UCU)G3</i> / <i>PPT1</i> / <i>tI(AAU)G</i> / <i>[ASN2]</i> *	
10E11, 11H5	YGPM12d11	<i>VAC7</i> / <i>MSG5</i> / <i>COX5A</i> / <i>[COG5]</i> *	
4C11	YGPM11a13	<i>[YDR026C]</i> * / <i>VPS54</i> / <i>REG1</i> / <i>YDR029W</i> / <i>[RAD28]</i> &	Reg1 est la sous-unité régulatrice de PP1. La surexpression de <i>REG1</i> avec un autre plasmide 2μ restaure la sensibilité de <i>rod1Δ</i> au 2DG
3A12	YGPM14o10	<i>[PMD1]</i> * / <i>snR52</i> / <i>GLC7</i> / <i>tH(GUG)E2</i> / <i>tK(CUU)E2</i> / <i>YER133W-A</i> / <i>YER134C</i> / <i>YER135C</i> / <i>tV(AAC)E1</i> / <i>[GDI1]</i> *	Glc7 est la sous-unité catalytique de PP1.
38B7	YGPM31d19	<i>[SET2]</i> * / <i>ERG20</i> / <i>QCR8</i> / <i>HAL5</i> / <i>TPK1</i> / <i>[YJL163C]</i>	La surexpression de Tpk1 restaure la sensibilité de la souche <i>rod1Δ</i> au 2DG
18F3	YGPM7b21	<i>[DIP2]</i> & / <i>ZRT2</i> / <i>ACE2</i> / <i>USB1</i> / <i>[CKI1]</i> *	La surexpression d'Ace2 ne restaure pas la sensibilité de la souche <i>rod1Δ</i> au 2DG
1F11	YGPM28b16	<i>[NUP159]</i> * / <i>POR2</i> / <i>SDP1</i> / <i>HOS4</i> / <i>COX5B</i> / <i>HPM1</i> / <i>SEC24</i>	
1H7	YGPM23k07	<i>tD(GUC)J4</i> / <i>YJR056C</i> / <i>tY(GUA)J2</i> / <i>CDC8</i> / <i>APS2</i> / <i>PTK2</i> / <i>CBF1</i> / <i>[YJR061W]</i> *	
4A7	YGPM11g11	<i>BNI1</i> / <i>ALP1</i> / <i>BSC4</i> / <i>LYP1</i> / <i>[PIK1]</i> *	
4G11	YGPM15k17	<i>SCS7</i> / <i>YMR272W-A</i> / <i>YMR272W-B</i> / <i>ZDS1</i> / <i>RCE1</i> / <i>[BUL1]</i> &	

8G8	YGPM32j19	[MSY1]& / ERI1 / PNG1 / YPL095C / SEC62 / NOG1 / [SSU1]*	
8H11	YGPM33m11	[YDR291W]& / SRP101 / SSD1 / [DPL1] / [HDA2]&	
11B7	YGPM9i05	[KAR1]& / SWT21 / UBP10 / MRPL19 / YNL184C / NPR1 / [PI3]&	
16C10	YGPM20f06	[PUB1]& / PBI2 / HEF3 / YNL013C / SPO1 / YNL011C / [YNL010W]*	
20D3	YGPM19m03	[LST7]* / YGR058W / SPR3 / snR48 / ERG25 / [ADE6]&	
20D6	YGPM20a07	[MTO1]* / YGL235W / ADE57 / SEC15 / [TAN1]*	
21A4	YGPM3e23	[YPR117W]& / YPR118W / tK(UUU)P / CLB2 / [CLB5]&	
23E2	YGPM29d04	SPG4 / ILV2 / MYO5 / YMR110C / [YMR111C]&	
26E3	YGPM19a16	MPT5 / YGL177W / YGL176C / SAE2 / BUD13 / [KEM1]&	
28B8	YGPM12f17	[YOL111C]* / [SHR5] / ZEO1 / tG(UCC)O / INO4 / YOL107W / YOL106W / tT(AGU)O1 / WSC3 / NDJ1 / [YOL103W-B]* / [YOL103W-A]*	
29A10	YGPM17m20	[YAL019W-A]& / [FUN30] / YAL018C / PSK1 / YAL016C-B / YAL016C-A / [TPD3]*	
3F1, 20C5, 23G11, 26D6	Séquençage échoué		

Étonnamment, nous n'avons pas trouvé de plasmide contenant *ROD1*, qui devrait pourtant restaurer la sensibilité de la souche au 2DG. Cependant, parmi les gènes identifiés, on retrouve 2 sous-unités de PP1 (Protein Phosphatase 1), *REG1* et *GLC7*. Le complexe PP1 inhibe Snf1 dont l'activité est essentielle pour la résistance au 2DG. Ainsi, identifier ces 2 gènes comme restaurant la sensibilité n'est pas étonnant et sert de contrôle pour ce crible.

Parmi les autres gènes identifiés, on retrouve *GPD1* et *TPK1* (**Figure 3.17**). *GPD1* code pour une glycérol-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NAD (Albertyn et al., 1994) et participe à la formation de glycérol. Régulée transcriptionnellement par la voie de signalisation basée sur la MAPK Hog1 (Albertyn et al., 1994), elle participe à la régulation de l'osmolarité des cellules et est nécessaire lors de la réponse à un stress osmotique, pour générer du glycérol intracellulaire (Lee et al., 2012). Quant à *TPK1*, il code pour une sous-unité de PKA (Protein Kinase A). PKA est une kinase constituée de 2 sous-unités : Bcy1, et une sous-unité catalytique: Tpk1, Tpk2 ou Tpk3. La fixation d'AMPc sur Bcy1 induit l'activation de Tpk1/Tpk2/Tpk3. Activée par une concentration élevée de glucose et lors d'un métabolisme prolifératif, PKA inhibe la transcription des gènes de réponse aux stress ainsi que l'autophagie et le stockage de carbohydrates chez *Saccharomyces cerevisiae* (Wilson and Roach, 2002).

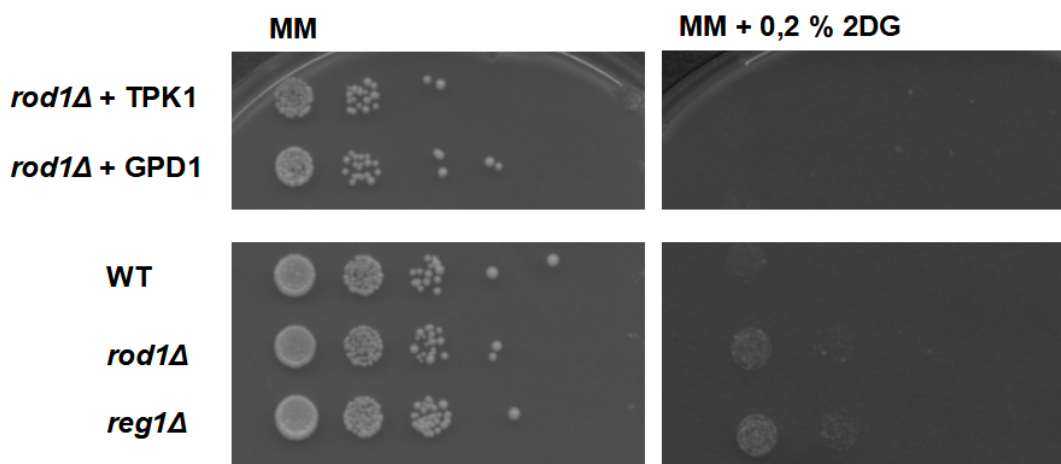


Figure 3.17 - La surexpression de *TPK1* et *GPD1* dans un mutant *rod1Δ* restaure la sensibilité de la souche au 2DG. Dilutions en séries de culture des différentes souches indiquées déposées sur milieu minimum (MM) ± 0,2 % 2DG et cultivées pendant 3 jours à 30°C

Ainsi, la surexpression de ces 2 gènes dans un mutant *rod1Δ* restaure la sensibilité de cette souche au 2DG. Afin de continuer cette étude, il serait nécessaire de vérifier si la surexpression de ces deux gènes affecte la sensibilité d'une souche WT afin de vérifier la spécificité de ce phénotype au mutant *rod1Δ*. De plus, il serait également intéressant de poursuivre ce crible et continuer à identifier les différents gènes restaurant la sensibilité du mutant *rod1Δ* au 2DG afin de mieux comprendre la résistance au 2DG dans ce mutant. Cela permettrait aussi peut-être d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance et sensibilité à cet inhibiteur métabolique.

C.3 - Discussion

C.3.1 - Identification de nouveaux mutants sensibles au 2DG

Parmi les 24 mutants isolés du crible génétique réalisé en 2014 (Hoepfner et al., 2014) (**Tableau 3.1**) dont nous avons retesté la croissance sur 2DG, nous avons pu identifier 3 nouveaux mutants sensibles au 2DG, *sla1Δ*, *bni4Δ* et *ngg1Δ* (**Figure 3.11**).

C.3.1.1 - Le complexe SAGA participe à la résistance au 2DG

Le mutant *ngg1Δ* est hypersensible au 2DG et présente un défaut d'induction transcriptionnelle de *DOG2* en réponse au 2DG, ainsi qu'un défaut d'expression de la protéine Dog2 (**Figure 3.14A/B**). La protéine Ngg1 appartient au complexe SAGA, un co-facteur de l'ARN polymérase II (ARN pol II), qui participe à l'activation de la transcription de certains gènes en acétylant et déubiquitinant les histones (Cheon et al., 2020) (**Figure 3.12**). Notre première hypothèse a donc été que SAGA contrôle l'expression du gène *DOG2* et contrôle ainsi la résistance au 2DG.

Les mutants de plusieurs autres membres du complexe HAT dont nous avons testé la résistance au 2DG (*GCN5*, *ADA2* et *SGF29*) ne sont pas sensibles au 2DG (**Figure 3.15A**). Gcn5 est la sous-unité catalytique du complexe SAGA lui permettant d'acétyler les histones (Ruiz-García et al., 1997). On pouvait donc s'attendre à ce que sa délétion rende les cellules sensibles au 2DG. Ainsi, la contribution de SAGA dans la résistance au 2DG est plus complexe qu'anticipée.

Cependant, le complexe SAGA participe à l'acétylation mais aussi à la déubiquitination (DUB) des histones (**Figure 3.12**). Dans le module DUB du complexe SAGA, on retrouve la protéine Ubp8, la protéase ubiquitine-spécifique de ce complexe (Henry et al., 2003) dont la délétion induit une diminution du nombre de gènes transcrits, diminution accentuée lorsque *GCN5* est également délétée. On peut faire l'hypothèse que la délétion des gènes codant les 2 sous-unités nécessaires pour ces deux fonctions, Gcn5 et Ubp8, soit requise pour rendre les cellules sensibles au 2DG. Il faut noter que le double mutant *gcn5Δ ubp8Δ* montre un métabolisme altéré, redirigeant le flux glycolytique vers la fermentation (De Palma et al., 2020), inhibant potentiellement l'expression des gènes réprimés par le glucose et donc la résistance des cellules au 2DG.

La délétion de 2 autres gènes, *SUS1* et *HFI1*, codant d'autres sous-unités de ce complexe, rend également les cellules sensibles au 2DG. Sus1 et Hfi1 sont respectivement une sous-unité du module de déubiquitylation (DUB) du complexe SAGA et un adaptateur de ce complexe requis pour son intégrité (**Figure 3.12**). Cependant, la délétion de ces gènes ne s'accompagne pas d'une baisse d'expression de Dog2 (**Figure 3.15**), au moins pour le mutant *sus1Δ*. La protéine Sus1 appartient aussi à un complexe situé au niveau des pores nucléaires qui participe à l'export des ARNm du noyau après leur transcription (García-Molinero et al., 2018). On peut donc faire l'hypothèse que la délétion de *SUS1* agit sur la transcription globale et induit cette sensibilité importante du mutant *sus1Δ* au 2DG. Quant à Hfi1, cette protéine est nécessaire au recrutement du complexe SAGA aux promoteurs de différents gènes (*GAL1*, *ADH1*, *PHO84*, ...) (Bhaumik and Green, 2002) et on peut donc faire l'hypothèse que Hfi1 est nécessaire pour le recrutement de SAGA au promoteur de *DOG2* afin d'induire sa transcription. Ceci devra être vérifié au niveau expérimental.

C.3.1.2 Le rôle des protéines Sla1 et Bni4 dans la résistance au 2DG

En plus du mutant *ngg1Δ*, nous avons confirmé 2 autres gènes dont la délétion rend les levures sensibles au 2DG : *SLA1* et *BNI4*. Cependant, pour ces 2 mutants de délétion, on n'observe pas de diminution de l'activité du promoteur de *DOG2* nous indiquant qu'il existe donc d'autres mécanismes de sensibilité au 2DG que la diminution de l'expression de *DOG2*.

Bni4 est une protéine d'échafaudage formant un complexe avec la sous-unité catalytique de la phosphatase PP1, Glc7, et permettant sa localisation au niveau du bourgeon (Kozubowski et al., 2003). Cela permet l'activation de la chitine synthase III et donc la synthèse de chitine au niveau du bourgeon émergent (Larson et al., 2008). Chez *Candida albicans*, l'orthologue CaBni4p possède 20% d'homologie avec la protéine de *Saccharomyces cerevisiae* et près de 75% au niveau du site de liaison avec Glc7 (Rowbottom et al., 2004). La délétion du gène correspondant entraîne la diminution de 30% de la chitine, élément donnant de la rigidité à la paroi. Ainsi, on peut s'attendre à ce que dans un mutant *bni4Δ* chez *Saccharomyces cerevisiae*, il y ait également une diminution de la quantité de chitine dans la paroi. Associée aux défauts que le 2DG induit au niveau de la paroi cellulaire (Defenouillère et al., 2019), cela pourrait expliquer la sensibilité du mutant *bni4Δ* au 2DG.

Sla1 est une protéine impliquée dans l'endocytose se liant au cytosquelette (Warren et al., 2002). Chez un mutant de Sla1 ne pouvant se lier à l'actine (substitution de 3 aa dans le motif de liaison de la clathrine de la protéine), on observe un délai de progression de l'endocytose (Tolsma et al., 2018) mais pas une inhibition totale de l'endocytose. Plusieurs mutants d'endocytose étant sensibles au 2DG, *npi1*, *rvs167Δ* (**Figure 2.5C**), cela pourrait expliquer la sensibilité du mutant de délétion au 2DG. De plus, on sait que Sla1 forme un

complexe avec la protéine Rvs167 et que la formation de ce complexe permet l'ubiquitination de Rvs167 (Stamenova et al., 2004), ce qui induit son activation et initiation de son rôle dans l'endocytose (Weinberg and Drubin, 2012). En absence de Sla1, l'inhibition de l'ubiquitination de Rvs167 et de son rôle dans l'endocytose pourrait contribuer à la sensibilité au 2DG, le mutant *rvs167Δ* étant lui-même hypersensible au 2DG (**Figure 2.5C**).

C.3.2 - Un crible génétique permet d'identifier des protéines jouant un rôle dans la résistance au 2DG

Afin de comprendre les mécanismes de résistance du mutant *rod1Δ*, nous avons commencé un crible de type "multicopy suppressor" dans ce mutant sur 2DG afin d'identifier des gènes dont la surexpression restaurerait la sensibilité de ce mutant au 2DG (**Figure 3.16**). Étonnamment, nous n'avons pas trouvé le plasmide contenant *ROD1* qui devrait pourtant restaurer la sensibilité de la souche au 2DG. Sur le plasmide permettant la surexpression de *ROD1* dans les cellules, on retrouve d'autres gènes, adjacents à *ROD1* et on peut faire l'hypothèse que la surexpression de ces gènes induit une résistance au 2DG qui compenserait la toxicité gagnée par la réintroduction de Rod1. Une autre hypothèse vient du fait que la surexpression d'adaptateurs de Rsp5 perturbe l'homéostasie de Rsp5 (Léon et al., 2008). La surexpression d'un adaptateur en particulier revient à dépléter le pool de Rsp5 libre, et il est possible que cela perturbe l'endocytose. Il sera donc essentiel de regarder l'effet de ce plasmide en présence de 2DG dans des cellules sauvages afin de voir si les cellules sont résistantes au 2DG.

Parmi les plasmides suppresseurs identifiés, deux d'entre eux portent les gènes codant les sous-unités de la phosphatase PP1, *REG1* et *GLC7*. Il est attendu que la surexpression de ces protéines inhibe l'activité de Snf1, dont on sait qu'elle corrèle avec la résistance au 2DG. Ainsi, l'inhibition de Snf1 rend la souche *rod1Δ* sensible au 2DG, comme attendu, le mutant mutant *rod1Δ snf1Δ* étant sensible au 2DG (O'Donnell et al., 2015).

Parmi les autres gènes identifiés dont la surexpression restaure la sensibilité au 2DG de la souche *rod1Δ*, on retrouve les gènes *TPK1* et *GPD1* (**Figure 3.17**). Cependant, la surexpression de ces gènes n'a été testée que dans une souche délétée pour *ROD1*. Il faudrait donc, afin de confirmer que les résultats obtenus sont spécifiques au mutant *rod1Δ*, tester la croissance de cellules WT transformées avec des plasmides permettant la surexpression de *TPK1* et *GPD1* afin de vérifier que cette surexpression ne rend pas les cellules WT encore plus sensibles au 2DG.

Tpk1 est une sous-unité de PKA, protéine activée par la fixation d'AMPc en réponse à de fortes concentrations de glucose. Constituée d'une sous-unité régulatrice, Bcy1, et d'une sous-unité catalytique, Tpk1, Tpk2 ou Tpk3, PKA inhibe l'autophagie, la synthèse de glycogène ou encore le stockage de carbohydrates (Wilson and Roach, 2002) et participe à l'évolution du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S (Mizunuma et al., 2013). Le fait que la surexpression de Tpk1 induit une sensibilité des cellules au 2DG est en accord avec des résultats obtenus précédemment. En effet, des cellules qui présentent une forte activité de PKA sont sensibles à de nombreux stress, comme la température ou encore une carence en nutriment (Cameron et al., 1988; Cannon and Tatchell, 1987). De plus, PKA inhibe l'activation des gènes de réponse au stress (Smith et al., 1998). On peut donc faire l'hypothèse que la surexpression de *TPK1* dans les cellules rend les cellules hypersensibles au stress que le 2DG induit dans les levures. Cependant, le fait que *TPK1* restaure la sensibilité dans des cellules mutées pour *ROD1* ne permet pas de comprendre les mécanismes de résistance de la souche délétée pour *ROD1*.

L'autre gène identifié comme permettant de restaurer la sensibilité d'une souche *rod1Δ* lorsqu'il est surexprimé est *GPD1*. Ce gène code pour une glycérol-3-phosphate

déshydrogénase dépendante du NAD (Albertyn et al., 1994) qui participe à la formation de glycérol dans les cellules. Régulée transcriptionnellement par la voie MAPK Hog (Albertyn et al., 1994), elle participe à la régulation de l'osmolarité des cellules et est nécessaire lors de la réponse à un stress osmotique (Lee et al., 2012). Dans des levures surexprimant *GPD1*, on observe une augmentation de la production de glycérol de près de 3 fois plus que dans des levures WT ainsi qu'une augmentation de la capacité de fermentation en présence de fortes concentrations de glucose (Aslankoochi et al., 2015). De plus, chez le champignon *Mortierella alpina*, la surexpression des glycérol-3-phosphate déshydrogénase induit une accumulation d'acides gras dans les cellules (Yang et al., 2016), accumulation qui peut être toxique chez *Saccharomyces cerevisiae* (Eisenberg and Büttner, 2014). La surexpression de *GPD1* n'induit cependant pas forcément une accumulation de glycérol mais peut également induire une accumulation d'un métabolite intermédiaire, le glycérol-3-phosphate (G3P) (Påhlman et al., 2001). On peut donc se demander si cette accumulation n'est pas toxique pour les cellules, ce qui permettrait de comprendre en partie la sensibilité des cellules *rod1Δ* dans lesquelles *GPD1* est surexprimée, sachant que dans des cellules cancéreuses humaines, la surexpression de *GPD1* améliore l'effet anticancéreux de la metformine, en augmentant la concentration intracellulaire de G3P (Xie et al., 2020).

Le mécanisme restaurant la sensibilité au 2DG de cellules *rod1Δ* surexprimant *GPD1* n'est donc pas encore défini et il serait intéressant de comprendre ce mécanisme afin de peut-être identifier de nouvelles voies de signalisation ou protéines participant à la résistance ou toxicité des cellules au 2DG.

D'autre part, de nombreux autres gènes restent à tester vis-à-vis de leur capacité à rendre les levures sensibles au 2DG. Afin de se concentrer seulement sur ceux qui contournent spécifiquement le mécanisme de résistance du mutant *rod1Δ*, ces plasmides pourraient être transformés dans une souche sauvage pour voir leur effet sur la tolérance au 2DG.

4 - Conclusion générale et perspectives

Dans le chapitre 2, nous nous sommes intéressés à l'effet du 2DG sur l'endocytose de la protéine membranaire Ina1 ainsi que sur l'arrestine Rod1 et sa résistance au 2DG. Nous avons montré que la plupart des protéines membranaires sont endocytées en réponse au 2DG et que cette endocytose est dépendante, dans la plupart des cas, de l'arrestine Rod1 (**Figure 2.1D**). Il pourrait être intéressant, afin de classifier ces protéines et ces transporteurs membranaires, d'utiliser la technique du "High Content Imaging" (Gabay-Maskit et al., 2020), ou "criblage à haut contenu" (criblage phénotypique avec analyse de plusieurs paramètres simultanément sur des cellules entières), avec les protéines et transporteurs membranaires fusionnés à la GFP et vérifier leur localisation en réponse au 2DG et ce, dans des cellules WT ou délétées pour *ROD1*.

Nous nous sommes également intéressés à la protéine Ina1, de fonction inconnue, et avons montré que son endocytose en réponse au 2DG est dépendant de l'arrestine Rod1 (**Figure 2.1F**) et de Rsp5 (**Figure 2.1D**), comme c'est le cas pour la plupart des transporteurs endocytés. Pour continuer l'étude de cette endocytose, il sera donc essentiel de confirmer que l'ubiquitylation d'Ina1 en réponse au 2DG participe à son endocytose. Ainsi, muter la lysine K671 d'Ina1, ubiquitylée selon les banques de données ("GPMDB Proteome Database," n.d.), permettrait de confirmer qu'il s'agit bien de cet acide aminé qui est ubiquitylé par Rsp5 en réponse au 2DG.

Concernant l'arrestine Rod1, nous avons montré que son activation est nécessaire pour l'endocytose d'Ina1 (**Figure 2.4**) en réponse au 2DG et qu'en réponse à cette drogue, l'arrestine est régulée par les protéines antagonistes Reg1 (active Rod1) et Snf1/AMPK (inactive Rod1) (**Figure 2.3**). Enfin, le mutant *rod1Δ* étant résistant au 2DG, nous avons pu mettre en évidence que cette résistance n'était pas dû à un blocage général de l'endocytose mais à la rétention des transporteurs de glucose Hxt1 et Hxt3 à la membrane plasmique chez ce mutant (**Figure 2.5**). Suite à ce résultat, nous avons fait l'hypothèse que la résistance au 2DG de la souche *rod1Δ* était dû à l'export du 2DG des cellules via le transporteur de glucose, permettant de détoxifier les cellules. Afin de confirmer cela, il faudrait donc étudier le flux de 2DG dans différents mutants. Pour cela, on pourrait utiliser le 2-NBDG, un analogue fluorescent du glucose déjà utilisé pour l'étude de l'import de glucose dans les cellules de levure (Roy et al., 2015). Les essais réalisés dans l'équipe pour le moment sont infructueux (V. Albanèse, non publié). Du 2DG radioactif pourrait également être utilisé pour mesurer ces flux (Matsunami and Kawashima, 1995). Une autre possibilité à l'étude est d'utiliser des sondes FRET qui permettraient d'accéder à un dosage intracellulaire du 2DG par fluorescence. Ces outils ont été développés pour le glucose (Bermejo et al., 2010) et il reste à tester s'ils sont compatibles avec le 2DG. Puisque nous proposons que la résistance du mutant *rod1Δ* est due à l'export de 2DG par le transporteur Hxt3 ou Hxt1, il serait également intéressant de trouver un mutant des transporteurs de glucose incapable d'induire l'export de 2DG des cellules et d'étudier la résistance des cellules au 2DG chez ce mutant.

Dans le chapitre 3 concernant les autres effets cellulaires du 2DG et les mécanismes de résistance, nous avons donc pu voir différents effets qu'un traitement au 2DG a sur les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, un traitement de 4h au 2DG induit une fragmentation vacuolaire (**Figure 3.6**), une accumulation de LDs dans les cellules (**Figure 3.7**) sans pour autant induire l'autophagie (**Figure 3.8**) ou encore un changement d'ubiquitination totale des protéines (**Figure 3.9**), même si ces deux derniers résultats sont encore à confirmer. Suite à ces résultats, il sera donc essentiel de continuer l'étude de la

fragmentation vacuolaire et de la formation des LDs afin de comprendre comment se mettent en place ces phénotypes dans les cellules.

Concernant les LDs, ces dernières participeraient à la mise en place initiale des tumeurs ou encore à la protection des cellules cancéreuses de l'hypoxie (Cruz et al., 2020). Le 2DG semble favoriser la formation de LDs chez *Saccharomyces cerevisiae*, on peut se demander si c'est également le cas dans les cellules humaines. De plus, si c'est le cas, il pourrait être intéressant d'étudier l'effet du 2DG combiné avec une drogue inhibant la formation de ces LDs afin d'améliorer l'effet inhibiteur du 2DG sur la croissance des cellules cancéreuses.

Pour la fragmentation vacuolaire, l'étude des différents mutants dans lesquels on n'observe pas ou peu de fragmentation vacuolaire en réponse au 2DG devra être continuée. Cette étude nous permettra d'identifier le mécanisme qui induit cette forte fission de la vacuole lorsqu'on traite les cellules au 2DG. Les changements de niveau d'expression de certains lipides en réponse au 2DG sera étudié. En effet, dans des souches dans lesquelles des protéines impliquées dans la modification des lipides, on observe d'importants défauts de fragmentation de la vacuole (Michaillat and Mayer, 2013). On peut donc faire l'hypothèse que le 2DG induit des changements de concentration de certains lipides induisant une importante fission vacuolaire.

Enfin, nous avons pu identifier de nouvelles protéines participant à la résistance au 2DG : Ngg1, Sla1 et Bni4 (**Figure 3.11**) à l'aide des résultats d'un criblage génétique effectué préalablement par (Hoepfner et al., 2014) ainsi que Gpd1 et Tpk1 à l'aide d'un criblage que nous avons réalisé afin d'identifier les mécanismes de résistance au 2DG de cellules dans lesquelles l'arrestine *ROD1* est délétée (**Figure 3.17**). Ces deux études nous ont permis d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la résistance au 2DG mais leur étude n'est pas terminée. De plus, ces cribles génétiques pourraient nous permettre sans doute d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance ou toxicité au 2DG chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, on sait que les mutants *bni4Δ* et *sla1Δ* sont sensibles au 2DG via un mécanisme que l'on ne connaît pas pour le moment (**Figure 3.14A**) et il serait donc intéressant de l'identifier. Pour le mutant *ngg1Δ*, la suite de son étude permettrait de décrypter encore plus précisément comment la 2DG6P-phosphatase Dog2 est régulée en réponse au 2DG.

De plus, en continuant d'étudier les mutants de résistance et toxicité au 2DG identifiés par (Hoepfner et al., 2014), nous pourrions sans doute identifier de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la résistance ou la sensibilité des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* au 2DG.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont ainsi permis d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance et de toxicité à l'inhibiteur métabolique, le 2-Deoxyglucose chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette étude a été réalisée dans cet organisme modèle de par son métabolisme semblable au métabolisme Warburg que l'on retrouve dans des cellules tumorales.

Différents effets cellulaires du 2DG ont pu être identifiés. Parmi ces effets, l'endocytose massive de transporteurs et protéines membranaires est l'effet sur lequel je me suis principalement concentrée. Ainsi, on peut se demander si le 2DG a un effet sur l'endocytose dans des cellules humaines et précisément dans des cellules cancéreuses.

On sait que dans des cellules cancéreuses, il y a une augmentation de la rapidité de la CME en comparaison avec des cellules saines (López-Hernández et al., 2020). De plus, dans des cellules cancéreuses, la CME est altérée induisant une augmentation de la signalisation de la protéine Akt, qui favorise la survie des cellules cancéreuses (Schmid, 2017). Ce turn-over des cellules à la membrane des cellules cancéreuses participent à leur

développement et on peut donc se demander quel effet le 2DG peut avoir sur l'endocytose dans ces cellules et sur leur survie et croissance.

Matériels et méthodes

Souches de levures, milieu et conditions de croissance

Les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisées dérivent toutes de la souche BY4741 (Mata, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *ura3Δ0*, *met15Δ0*) dérivée de la souche S288C (Brachmann et al., 1998) et sont indiquées en [Tableau S1](#). Les cellules sont mises à pousser en milieu minimum (MM : YNB [Yeast Nitrogen Base], ammonium de sulfate et tous les acides aminés sauf ceux requis pour appliquer une sélection + 2% de glucose) pendant 15h sur la nuit à 30°C à une densité optique (DO) $DO_{600nm} = 0,001$. Cette DO permet d'avoir le lendemain des cellules en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,1-0,5$). Pour transférer les cellules d'un MM avec du glucose à un MM contenant du lactate, les cellules sont centrifugées et resuspendues dans le même volume de MM contenant 0,5% de lactate. Les cellules peuvent également être cultivées dans un milieu riche YPD (Yeast extract Peptone Dextrose). Le milieu utilisé pour chaque expérience est indiqué.

Pour déclencher l'autophagie, un milieu carencé en acides aminés (aa) est utilisé avec du YNB et 20% de glucose sans aa. Pour transférer les cellules d'un MM avec du glucose à un MM contenant du 2-Deoxyglucose (2DG), ce dernier est ajouté directement dans le milieu de culture. La concentration de 2DG utilisée est indiquée (0,2 ou 0,05%). Pour transférer les cellules d'un MM avec du glucose à un MM contenant du lactate, les cellules sont centrifugées à 4000 g pendant 4 min et resuspendues dans un même volume de MM avec du lactate 1%. Pour transférer les cellules d'un MM avec du lactate à un MM contenant du glucose, le glucose est ajouté directement dans le milieu de culture. Pour la tunicamycine (Merck - T7765 - stock à 10 mg/mL), 1 μ L est ajouté pour 1 mL de culture. Les réactifs utilisés sont indiqués en [Tableau S3](#).

Extraction de protéines

1,4 mL de culture de levures en phase exponentielle est récupéré et mis à précipiter en présence de 100 μ L d'acide trichloracétique (TCA) 100% sur la glace pendant au moins 10 minutes. Les cellules sont centrifugées à 4°C pendant 2 minutes à 16000 g et les culots cellulaires sont resuspendus dans 100 μ L de TCA 10%. Les cellules sont cassées avec des billes de verre sur un vortex pendant 10 minutes. Les protéines sont séparées des billes de verre et centrifugées pendant 2 minutes à 4°C à 16000 g. Les protéines sont ensuite resuspendues dans du tampon solution 1X (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% bleu de bromophénol et 10% de glycérol contenant 200 mM de Tris-Base) à une concentration de 50 μ L par unité de DO_{600nm} puis dénaturées à 37°C pendant 5 minutes.

Traitement des extraits protéiques avec l'Endoglycosidase H

L'enzyme Endoglycosidase H (EndoH) de chez Promega (V4871) 500 U/ μ L est utilisée pour enlever les glycosylations présentes sur les protéines d'intérêt. Après extraction des protéines et dénaturation à 37°C pendant 5 min, les échantillons sont laissés à température ambiante pendant 5 minutes. 2 μ L de tampon de réaction, fourni avec l'enzyme (ou préparé : 0.5M Sodium citrate pH 5.5), est ajouté dans l'échantillon. 1 μ L d'EndoH est ajouté à l'échantillon et de l'eau afin d'obtenir un volume final de 20 μ L. Un échantillon contrôle sans EndoH est également préparé. Les échantillons sont incubés pendant 2h à

37°C pour observer Ina1-GFP, la totalité est ensuite déposée sur gel et les protéines sont observées par Western blot.

Immunoblot

10µL d'extrait protéique (comme préparé ci-dessus) sont déposés sur un gel SDS-PAGE en gradient 4-20% (BioRad). Après une électrophorèse à 200 Volts pendant 30 minutes, les quantités de protéines chargées sont vérifiées par fluorescence (technologie Stain Free) avec l'appareil Gel Doc EZ Imager (BioRad), servant de contrôle de charge puis les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à 100 Volts pendant 1 heure. La membrane est ensuite incubée pendant 45 minutes avec du lait (5%) dans du TBST (Tris-Buffered Saline avec 0,05% Tween-20). Elle est ensuite incubée avec l'anticorps primaire à 4°C sur la nuit. Les anticorps utilisés sont indiqués en Tableau S3. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes au TBST puis incubée avec un anticorps secondaire pendant 1 heure. La membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes au TBST puis révélée par chemiluminescence en utilisant le réactif ECL (GE Healthcare, RPN2235). L'acquisition des images est réalisée avec un appareil Gel Doc EZ Imager (BioRad). Pour l'anti-ubiquitine HRP (1/1000 - Santa Cruz - sc-8017 HRP), la membrane est mise à incuber pendant 3h avec l'anticorps, lavée 3 fois au TBST puis révélée par chemiluminescence de la même façon que pour les autres anticorps.

Microscopie

Microscopie

1 mL de culture de levures en phase exponentielle est récupéré et mis à centrifuger avec 1µL de NP-40 0,1% pour faciliter la sédimentation. Les cellules sont observées grâce à un microscope à fluorescence Olympus BX61, un objectif 100X avec le filtre GFP ou le filtre mCherry. Les images obtenues sont ensuite traitées avec les logiciels ImageJ et Adobe Illustrator CS5.

FM4-64

Le FM4-64 est un colorant permettant de suivre la voie endocyttaire des levures et qui colore la membrane des vacuoles. Le protocole utilisé pour observer les cellules de levures avec le FM4-64 provient de l'article (Vida and Emr, 1995). Les cellules sont mises à pousser sur la nuit en YPD. Le matin, elles sont centrifugées et lavées deux fois avec du milieu minimum puis resuspendues dans 100 µl de MM. 1 µl de solution stock de FM4-64 (Invitrogen - 8 mM) est ajouté aux cellules. Les cellules sont mises à incuber pendant 15 minutes sur la glace puis sont centrifugées à 4°C pour retirer l'excès de FM4-64. Elles sont lavées 3 fois avec de l'eau à 4°C et les culots de cellules sont resuspendues dans 1 mL d'eau. Un premier aliquot de 250 µl à t = 0 min est récupéré, transféré dans 1 tube sur glace et 1 mL d'eau est ajouté dans ce tube. Les cellules sont centrifugées à 4°C et resuspendues dans 1 mL de MM et observées directement au microscope avec le filtre d'exposition mCherry. Des aliquots sont ensuite récupérés à 15 min, 30 min, 1h, 2h et 4h et les cellules sont observées au microscope.

Bodipy

Le Bodipy est un colorant permettant de colorer les lipides neutres et qui peut être utilisé comme traceur pour l'huile et les lipides non polaires. Le protocole utilisé pour observer les cellules de levures avec le Bodipy provient de l'article (Treibs and Kreuzer, 1968). Les cellules sont mises à pousser sur la nuit en MM. Dans les différentes conditions

d'observation (Glc ON et 2DG 4h), 1 mL de culture est mis dans un tube dans lequel est ajouté le Bodipy 493/503 (ThermoFisher) à 1µg/mL. Les cellules sont laissées à température ambiante puis lavées deux fois avec de l'eau puis observées directement au microscope avec le filtre vert.

Test bêta-galactosidase

1 mL de culture en phase exponentielle est récupéré dans lequel est ajouté 1µL de NP40 0,1% (0,1mL/100mL). Une centrifugation à 16000 g à 4°C est effectuée et le culot cellulaire est ensuite congelé dans de l'azote liquide. Le culot est resuspendu dans 800 µL de Tampon Z (NaH₂PO₄ 50mM, Na₂HPO₄ 45mM, KCl 10mM, MgSO₄ 10mM) avec 27 µL bêta-mercaptoéthanol (0,5 µM) pour 10 mL de tampon Z. 160µL d'ONPG (Ortho-nitrophényl-β-galactoside) est ensuite ajouté et les cellules sont mises à incuber à 37°C (pDOG1 : 167 min ; pDOG2 : 68 min). La réaction est arrêtée en ajoutant 400µL de Na₂CO₃ (40 µM). Les tubes sont ensuite centrifugés et l'absorbance à 420 nm est mesurée. Afin de normaliser les résultats des expériences, on utilise la formule suivante : $(A_{420}/(\text{temps d'incubation en minutes} \times \text{DO}_{600})) \times 1000$. Les résultats sont répétés 3 fois puis normalisés spécifiquement par rapport à une des valeurs pour chaque réplicat (2-DG 3 heures ou WT 3 heures).

Extraction d'ADN génomique

Deux techniques d'extraction d'ADN génomique sont utilisées. La première est utilisée lors de la vérification de souches de levure par PCR et la seconde pour toutes autres expériences nécessitant l'extraction d'ADN génomique de levures.

Première technique

Des cellules fraîchement striées sur boîte sont resuspendues dans 100µL de Lithium-Acétate (200mM) + SDS (1%) et vortexées. Elles sont mises à incuber pendant 15 minutes à 70°C. 300 µL d'éthanol 100% sont ensuite ajoutés au lysat cellulaire qui est vortexé puis mis à centrifuger pendant 10 minutes à 16000 g à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot est resuspendu dans 100µL d'éthanol 70% et centrifugé pendant 5 minutes à 16000 g à 4°C. Le surnageant est retiré et l'ADN précipité est séché à 37°C puis resuspendu dans 50 µL de Tris-EDTA 1X (Tris-HCl 100 m ; EDTA 50 mM) et chauffé à 65°C pendant 5 minutes.

Seconde technique

Des cellules fraîchement striées sur boîte sont resuspendues dans 1 mL d'eau, centrifugées et resuspendues dans 250 µL de tampon de resuspension A1 (Macherey Nagel - 740588.250). 100 µL de billes de verre de 0.5mm (Sigma - Z250465-1PAK) sont ajoutées à l'échantillon qui est mis à agiter pendant 10 minutes sur un vortex. Les cellules sont centrifugées 1 minute à 500 g et le lysat est transféré dans un nouveau tube. 250 µL de tampon de lyse (A2) et 350 µL de tampon de neutralisation (A3) sont ajoutés. L'échantillon est centrifugé 10 minutes à 16000 g. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et l'échantillon est centrifugé de nouveau pendant 10 minutes à 16000 g. Le surnageant est transféré dans une colonne de miniprep. L'échantillon est lavé, suivant le protocole du kit Macherey Nagel - 740588.250 et l'élution se fait dans 25 µL de tampon d'élution (AE).

Transformation d'ADN génomique dans la levure

Des levures fraîchement striées sont inoculées dans 10 mL de milieu YPD le matin, cultivées à 30°C et centrifugées l'après-midi lorsque la DO est autour de 2. 1 mL de TEL 1X

(Tris-HCl 100 mM ; EDTA 50 mM ; Lithium Acétate 100 mM) est ajouté et les cellules sont centrifugées. Le culot est resuspendu dans 50 µL de TEL 1X. 3 µL d'ADN simple brin de saumon est ajouté ainsi que 5 µL de cassette PCR (recombinaison homologue) ou 1 µL de plasmide. 300 µL de solution PEG (Poly-Ethylène-Glycol) 4000 (40% dans du TEL 1X) sont ajoutés et les cellules sont mises à incuber pendant 30 minutes à 30°C. Un choc thermique à 42°C pendant 20 minutes est ensuite effectué et les cellules sont centrifugées pendant 1 minute à 8000 g. Pour une sélection par auxotrophie, les cellules sont resuspendues dans 100 µL de milieu YPD puis étalées sur un milieu sélectif. Pour une sélection avec un antibiotique, les cellules sont resuspendues dans 600 µL de milieu YPD, incubées pendant 1 heure à 30°C afin de permettre l'expression du marqueur puis étalées sur un milieu sélectif.

Test de croissance sur boîtes

Des levures fraîchement striées sont inoculées dans 5 mL de milieu minimum le matin et cultivées à 30°C sur la journée. Le soir, pour chaque culture de levure en culture exponentielle, la DO est ajustée à 1. Des dilutions en série avec un facteur 10 de dilution sont effectuées dans une plaque de culture cellulaire à 96 puits et 8 µL correspondant à ces différentes solutions sont déposées sur des boîtes contenant un milieu minimum (sélectif ou non), avec ou sans 2DG (concentrations indiquées). Les levures sont observées après 72h de croissance à 30°C.

Crible génétique pour déterminer l'origine de la résistance du mutant *rod1Δ*

La souche *rod1Δ* a été transformée avec la banque d'ADN génomique contenant des plasmides permettant la surexpression de différents gènes de chez *Saccharomyces cerevisiae* avec plusieurs gènes par plasmide (Jones et al., 2008). Les levures obtenues ont été cultivées sur des boîtes de Pétri contenant un MM sélectif pendant 3 jours à 30°C pour sélectionner les transformants. 3800 colonies isolées ont été repiquées dans 40 boîtes 96 puits contenant un MM sélectif et cultivées pendant 3 jours à 30°C. Avec un robot (RoToR, Singer), les levures ont été répliquées sur deux séries de 40 boîtes de MM sélectif contenant ou non 0,2% de 2DG et cultivées 2 à 3 jours à 30°C. 94 colonies de levures ne poussant pas sur 2DG ont été isolées. L'absence de croissance a été vérifiée sur de nouvelles boîtes contenant 0,2% de 2DG et 32 colonies de levure ont été sélectionnées.

L'ADN de ces levures a été isolé par rescue/sauvetage. Les plasmides obtenus ont été digérés avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI afin de faire des groupes de digestion et d'identifier des plasmides identiques présents dans différentes souches de levures. Les plasmides ont ensuite été séquencés avec l'oligo M13 univ-43 (AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT) et, en parallèle, transformés dans une souche *rod1Δ* afin de reconfirmer la sensibilité de cette souche transformée avec ces plasmides et ce par test de croissance sur boîte contenant un MM sélectif avec ou non 0,2% de 2DG.

Suite au séquençage permettant d'identifier les différents gènes sur les plasmides, les gènes d'intérêt ont été digérés avec les enzymes de restriction BamHI et XhoI puis clonés dans un plasmide pRS425 avec leur propre promoteur et les plasmides obtenus ont été transformés dans une souche *rod1Δ*. Un test de croissance a ensuite été réalisé pour confirmer ou non que le gène d'intérêt restaure la sensibilité de la souche *rod1Δ* au 2DG.

Rescue/sauvetage de plasmide de la levure

Des levures fraîchement striées sont mises à pousser le matin dans 5 à 10 mL de MM. Après 5 à 6h, les cellules sont centrifugées, resuspendues dans 1 mL d'eau et

transférées dans un tube de 1,5 mL. Elles sont de nouveau centrifugées et resuspendues dans 250 µL de tampon de resuspension de miniprep (A1 du kit Macherey Nagel - 740588.250). 100 µL de billes de verre sont ajoutés aux cellules qui sont mises à agiter au vortex pendant 10 min. Les protéines sont centrifugées (1 min à 500 g) et le lysat est transféré dans un nouveau tube. Ensuite, le protocole du kit Macherey Nagel est suivi avec l'ajout de tampon de lyse (250 µL d'A2) et de tampon de neutralisation (350 µL d'A3). La réaction est mise à incuber pendant 10 min sur glace. Elle est centrifugée pendant 10 min à 4°C à vitesse maximale, le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et remis à centrifugé pendant 10 min à 4°C à vitesse maximale. Le surnageant est transféré dans une colonne de miniprep, lavé selon le protocole du kit Macherey Nagel et l'ADN est élué dans 25 µL d'eau. L'ADN obtenu est ensuite transformé dans 15 µL bactéries électrocompétentes.

Quantifications

Quantification de l'endocytose

Les quantifications d'endocytose ont été réalisées avec ImageJ. Pour chaque cellule, le bruit de fond de l'image est soustrait à la densité intégrée (aire de la région d'intérêt multipliée par la moyenne de l'intensité des pixels de la région d'intérêt) de la cellule et de sa vacuole. Cela permet d'obtenir les densités intégrées corrigées de la cellule et de sa vacuole. La densité intégrée corrigée de la cellule est divisée par la densité intégrée corrigée de la vacuole. Cela permet d'obtenir le ratio de protéines fluorescentes dans la vacuole, et par soustraction, d'en déduire le ratio final de protéines fluorescentes membranaires. Le ratio de protéines fluorescentes à la membrane par rapport aux protéines fluorescentes dans la vacuole est indiqué. 50 cellules par conditions ont été utilisées pour calculer ces ratios.

Quantification de la fragmentation vacuolaire

Les quantification de fragmentation vacuolaire ont été réalisées avec ImageJ. Pour chaque conditions et chaque souches, au moins 30 cellules ont été utilisées. Les cellules avec plus de 3 vacuoles ont été considérées comme cellules avec vacuole très fragmentées. Le ratio entre le nombre de cellules comptées et le nombre de cellules avec une vacuole fragmentée est ensuite fait et rapporté sur un graphique. Cette quantification est faite à l'aveugle, la personne effectuant les quantifications ne sait pas quelles conditions ou quelles souches elle observe.

Matériels supplémentaires

Tableau S1 : Souches de levure utilisées pour cette étude

Nom	Génotype & Description	Origine & Référence
ySL66 : BY4741 (WT)	<i>MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
ySL2288 : Ina1-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Ina1-GFP::HIS3</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2768 : Ina-GFP hac1Δ	<i>hac1Δ::Leu; INA1-GFP<HpH> Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Cette étude
ySL2325 : Ina1-GFP	<i>INA1-GFP<HIS3>; pRSP5:KanMX ; Mat a ; his3Δ1</i>	Cette étude

<i>npi1</i>	<i>leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	
ySL2323 : Ina1-GFP 6arrΔ	<i>Matalpha ; INA1-GFP<HIS3>; his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0 ; art1Δ::hisG ; art3Δ::hisG ; art4Δ::hisG ; art5Δ::hisG ; art6Δ::hisG ; art7Δ::KanMX</i>	Cette étude
ySL2434 : Ina1-Δ5-GFP	<i>INA1-5Δ-GFP<Kan>; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Cette étude
ySL2353 : Ina1-GFP 6arrΔ + pLDB19	<i>Matalpha ; INA1-GFP<HIS3>; his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0 ; art1Δ::hisG ; art3Δ::hisG ; art4Δ::hisG ; art5Δ::hisG ; art6Δ::hisG ; art7Δ::KanMX (+ pLDB19 2μ (LEU) - pSL374 : Prelich, YGPM14o15)</i>	Cette étude
ySL2354 : Ina1-GFP 6arrΔ + pALY2	<i>Matalpha ; INA1-GFP<HIS3>; his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0 ; art1Δ::hisG ; art3Δ::hisG ; art4Δ::hisG ; art5Δ::hisG ; art6Δ::hisG ; art7Δ::KanMX (+ pALY2 2μ (LEU) - pSL376 : Prelich, YGPM14o18)</i>	Cette étude
ySL2355 : Ina1-GFP 6arrΔ + pROD1	<i>Matalpha ; INA1-GFP<HIS3>; his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0 ; art1Δ::hisG ; art3Δ::hisG ; art4Δ::hisG ; art5Δ::hisG ; art6Δ::hisG ; art7Δ::KanMX (+ pROD1 2μ (LEU) - pSL112 : Prelich : YGPM2p12)</i>	Cette étude
ySL2356 : Ina1-GFP 6arrΔ + pART5	<i>Matalpha ; INA1-GFP<HIS3>; his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0 ; art1Δ::hisG ; art3Δ::hisG ; art4Δ::hisG ; art5Δ::hisG ; art6Δ::hisG ; art7Δ::KanMX (+ pART5 2μ (LEU) - pSL377 : Prelich, YGPM29I08)</i>	Cette étude
ySL2357 : Ina1-GFP 6arrΔ + pALY1	<i>Matalpha ; INA1-GFP<HIS3>; his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0 ; art1Δ::hisG ; art3Δ::hisG ; art4Δ::hisG ; art5Δ::hisG ; art6Δ::hisG ; art7Δ::KanMX (+ pALY1 2μ (LEU) - pSL378 : Prelich, YGPM22k12)</i>	Cette étude
ySL2358 : Ina1-GFP 6arrΔ + pROG3	<i>Matalpha ; INA1-GFP<HIS3>; his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0 ; art1Δ::hisG ; art3Δ::hisG ; art4Δ::hisG ; art5Δ::hisG ; art6Δ::hisG ; art7Δ::KanMX (+ pROG3 2μ (LEU) - pSL379 : Prelich, YGPM3n06)</i>	Cette étude
ySL2406 : Ina1-GFP rod1Δ	<i>INA1-GFP<Hph>; art4Δ::Kan; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Cette étude
ySL2401 : Ina1-GFP ldb19Δ	<i>INA1-GFP<Hph>; art1Δ::Kan; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Cette étude
ySL2739 : Vph1-mCherry	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; VPH1-mCherry::Nat</i>	Cette étude
ySL2743 : Vph1-mCherry rod1Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; VPH1-mCherry::Nat; art4Δ::Kan</i>	Cette étude
ySL2742 : Vph1-mCherry hxx2Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; VPH1-mCherry::Nat; hxx2Δ::Kan</i>	Cette étude
ySL2744 :	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0;</i>	Cette étude

Vph1-mCherry + pGPD-DOG2	<i>VPH1-mCherry::Nat + pRS426-derived (2μ, URA3) - p_{GPD}::DOG2</i>	
ySL2741 : Vph1-mCherry reg1Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; VPH1-mCherry::Nat; reg1Δ::Hph</i>	Cette étude
ySL2740 : Vph1-mCherry snf1Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; VPH1-mCherry::Nat; snf1Δ::Hph</i>	Cette étude
ySL2663 : Vph1-mCherry hac1Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; VPH1-mCherry::NAT; hac1Δ::LEU2</i>	Cette étude
ySL2204 : hac1Δ	<i>hac1ΔKANmx; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
ySL2547 : atg8Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 atg8ΔKanMX</i>	Euroscarf
ySL2548 : rvs167Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rvs167ΔKanMX</i>	Euroscarf
ySL208 : pep4Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pep4ΔKanMX</i>	Euroscarf
ySL541 : reg1Δ	<i>reg1Δ::HisMX ; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Laboratoire
ySL567 : snf1Δ	<i>snf1Δ::kanMX4 ; Matalpha, leu2Δ0, lysΔ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
ySL1690 : hxx2Δ	<i>hxx2Δ::KAN; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
ySL2194 : mig1Δmig2Δ	<i>mig1ΔKANmx; mig2ΔHIS3; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Defenouillèr e et al., 2019)
MHY552 ubc6Δubc7Δ	<i>his3-Δ200, leu2-3,112, ura3-52, lys2-801, trp1-1</i>	(Chen et al., 1993)
ySL2555 : Fat3-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FAT3-GFP::His</i>	(Huh et al., 2003)
ySL2506 : gtr1Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, gtr1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2507 : bni4Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, bni4Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2508 : htc1Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, htc1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2509 : irs4Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, irs4Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2511 : lst7Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, lst7Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2512 : mck1Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, mck1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2513 : ngg1Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, ngg1Δ::KanMX</i>	Euroscarf

ySL2514 : sap4 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sap4Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2515 : sap155 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sap155Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2516 : sla1 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sla1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2517 : sur4 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sur4Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2518 : tco89 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, tco89Δ::KanMX</i>	Euroscarf
gtr2 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, gtr2Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2549 : bre5 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bre5ΔKanMX</i>	Euroscarf
ySL943 : last4 Δ	<i>lst4Δ::kanMX4 ; Mat a, leu2Δ0, met15Δ, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
ySL1305 : npr1 Δ	<i>npr1Δ::kanMX ; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
ySL1782 : sip5 Δ	<i>SIP5:kanMX4 ; Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
ySL927 : pep12 Δ	<i>pep12Δ::kanMX4 ; Mat a, leu2Δ0, lysΔ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
ySL865 : vps9 Δ	<i>vps9Δ::kanMX4 ; Mat a, leu2Δ0, lysΔ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
ySL2544 : rgl1 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rgl1ΔKanMX</i>	Euroscarf
ySL1174 : rcy1 Δ	<i>rcy1Δ::NatMX4 ; Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
ySL440 : ubp3 Δ	<i>Mat a ; ubp3Δ::KanMX his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
ySL998 : vps51 Δ	<i>vps51Δ::kanMX4 ; Mat a, leu2Δ0, lysΔ0, ura3Δ0, his3Δ0</i>	Euroscarf
ySL2576 : Bni4-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, BNI4-GFP<His></i>	(Huh et al., 2003)
ySL2577 : Sla1-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, SLA1-GFP<His></i>	(Huh et al., 2003)
ySL2578 : Ngg1-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, NGG1-GFP<His></i>	(Huh et al., 2003)
ySL2290 : Dog2-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 DOG2-GFP::HIS3</i>	(Defenouillèr e et al., 2019)
ySL2630 : ngg1 Δ Dog2-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; DOG2-GFP<His>; ngg1Δ::KanMX</i>	Cette étude

ySL2650 : sla1 Δ Dog2-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sla1Δ::KanMX; DOG2-GFP::HIS</i>	Cette étude
ySL2651 : bni4 Δ Dog2-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, bni4Δ::KanMX; DOG2-GFP::HIS</i>	Cette étude
ySL2616 : gcn5 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, gcn5Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2617 : spt3 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, spt3Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2618 : sgf73 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sgf73Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2619 : ada2 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, ada2Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2623 : sgf11 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sgf11Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2620 : sgf29 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sgf29Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2621 : ahc2 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, ahc2Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ahc1 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, ahc1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2625 : spt8 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, spt8Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2624 : sus1 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sus1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2626 : spt7 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, spt7Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2622 : ubp8 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, ubp8Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2627 : hfi1 Δ	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, hfi1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
ySL2649 : sus1 Δ Dog2-GFP	<i>Mat a ; his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sus1Δ::KanMX; DOG2-GFP::HIS</i>	Cette étude

Tableau S2 : Plasmides utilisés dans cette étude

Nom	Description	Origine & Référence
pSL412	pRS426-derived (2 μ , URA3) p _{GPD} :DOG2	(Defenouillère et al., 2019)
pRHT619	pRS413-derived (CEN, HIS) p _{SLA1} -SLA1	Laboratoire
UBP3	pGP564-based genomic clone YGPM18f12 containing UB3; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr V: 464928 - 475865)	(Jones et al., 2008)
BRE5	pGP564-based genomic clone YGPM18f18 containing BRE5; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr XIV: 713318 - 724511)	(Jones et al., 2008)

SIP5	pGP564-based genomic clone YGPM2d09 containing SIP5; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr XIII: 541863 - 553683)	(Jones et al., 2008)
NGG1	pGP564-based genomic clone YGPM18d16 containing NGG1; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr IV: 804603 - 817629)	(Jones et al., 2008)
MCK1	pGP564-based genomic clone YGPM18m15 containing MCK1; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr XIV: 53233 - 64369)	(Jones et al., 2008)
BNI4	pGP564-based genomic clone YGPM3f14 containing BNI4; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr XIV: 197804 - 215164)	(Jones et al., 2008)
SUR4	pGP564-based genomic clone YGPM23I13 containing SUR4; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr XII: 861880 - 873343)	(Jones et al., 2008)
VPS9	pGP564-based genomic clone YGPM2k14 containing VPS9; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr XIII: 72454 - 82025)	(Jones et al., 2008)
pSL409	Yep358-based ((2 μ , URA3) p _{DOG1} (1000bp):LacZ	(Defenouillère et al., 2019)
pSL410	Yep358-based ((2 μ , URA3) p _{DOG2} (1000bp):LacZ	(Defenouillère et al., 2019)
pSL527	pRS425-derived (2 μ , URA3) p _{TPK1} :TPK1	Cette étude
GPD1	pGP564-based genomic clone YGPM14g08 containing GPD1; 2 μ , LEU2 (genomic tiling collection - chr IV: 409540 - 420901)	(Jones et al., 2008)
pJMG437	pRS416-derived (CEN, URA3) GFP:p _{ATG8} :ATG8	Fulvio Reggiori

Tableau S3 : Réactifs utilisés dans cette étude

Type de réactif	Nom	Description	Informations	Référence & Origine
Anticorps	α GFP	Mouse monoclonal against GFP, clones 7.1 and 13.1	1/5000	1181446000 1 - Roche
Anticorps	α Ubiquitin	Mouse monoclonal antibody against ubiquitin	1/1000	P4D1 - Santa Cruz
Anticorps	α Rabbit IgG	Goat secondary antibody against Rabbit IgG	1/5000	A6154 - Sigma Aldrich
Anticorps	α Mouse IgG	Goat secondary antibody against Mouse IgG	1/5000	A5278 - Sigma Aldrich
Produit chimique, drogue	2DG	2-Deoxyglucose	20% stock	D8375-5G / D8375-25G - Merck

Produit chimique, drogue	EndoH	Endoglycosidase H		V4871A - Promega
Produit chimique, drogue	Tn	Tunicamycine	10mg/mL stock	T7765 - Merck
Carbon source	Lactate		pH 5 - 0,5% à partir d'un stock à 5%	W261114-5K G-K - Merck

Bibliographie

- Abe, F., Iida, H., 2003. Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7566–7584. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.21.7566-7584.2003>
- Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T., Moreno, F., 2004. The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* 279, 14440–14446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313431200>
- Akutsu, M., Dikic, I., Bremm, A., 2016. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 875–880. <https://doi.org/10.1242/jcs.183954>
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Prior, B.A., 1994. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4135–4144. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.4135-4144.1994>
- Alvarez, C.E., 2008. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol. Biol.* 8, 222. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-222>
- Alvaro, C.G., O'Donnell, A.F., Prosser, D.C., Augustine, A.A., Goldman, A., Brodsky, J.L., Cyert, M.S., Wendland, B., Thorner, J., 2014. Specific α -arrestins negatively regulate *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response by down-modulating the G-protein-coupled receptor Ste2. *Mol. Cell. Biol.* 34, 2660–2681. <https://doi.org/10.1128/MCB.00230-14>
- Andresen, L., Skovbakke, S.L., Persson, G., Hagemann-Jensen, M., Hansen, K.A., Jensen, H., Skov, S., 2012. 2-Deoxy d-Glucose Prevents Cell Surface Expression of NKG2D Ligands through Inhibition of N-Linked Glycosylation. *J. Immunol.* 188, 1847–1855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004085>
- Aslankoochi, E., Rezaei, M.N., Vervoort, Y., Courtin, C.M., Verstrepen, K.J., 2015. Glycerol production by fermenting yeast cells is essential for optimal bread dough fermentation. *PLoS One* 10, e0119364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119364>
- Athanasopoulos, A., André, B., Sophianopoulou, V., Gournas, C., 2019. Fungal plasma membrane domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 642–673. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz022>
- Baars, T.L., Petri, S., Peters, C., Mayer, A., 2007. Role of the V-ATPase in Regulation of the Vacuolar Fission–Fusion Equilibrium. *Mol. Biol. Cell* 18, 3873–3882. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0205>
- Baile, M.G., Guiney, E.L., Sanford, E.J., MacGurn, J.A., Smolka, M.B., Emr, S.D., 2019. Activity of a ubiquitin ligase adaptor is regulated by disordered insertions in its arrestin domain. *Mol. Biol. Cell* 30, 3057–3072. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-08-0451>
- Barthelemy, C., Barry, A.O., Twyffels, L., André, B., 2017. FTY720-induced endocytosis of yeast and human amino acid transporters is preceded by reduction of their inherent activity and TORC1 inhibition. *Sci. Rep.* 7, 13816. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14124-2>
- Becuwe, M., Herrador, A., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., Léon, S., 2012a. Ubiquitin-mediated regulation of endocytosis by proteins of the arrestin family. *Biochem. Res. Int.* 2012, 242764. <https://doi.org/10.1155/2012/242764>
- Becuwe, M., Léon, S., 2014. Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *eLife* 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.03307>
- Becuwe, M., Vieira, N., Lara, D., Gomes-Rezende, J., Soares-Cunha, C., Casal, M., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., Paiva, S., Léon, S., 2012b. A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J. Cell Biol.* 196, 247–259. <https://doi.org/10.1083/jcb.201109113>
- Bender, T., Pena, G., Martinou, J.-C., 2015. Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by

- alternative pyruvate carrier complexes. *EMBO J.* 34, 911–924.
<https://doi.org/10.15252/emj.201490197>
- Bendrioua, L., Smedh, M., Almquist, J., Cvijovic, M., Jirstrand, M., Goksor, M., Adiels, C., Hohmann, S., 2014. Yeast AMP-Activated Protein Kinase Monitors Glucose Concentration Changes as well as Absolute Glucose Levels. *J. Biol. Chem.* 289.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547976>
- Bénéteau, M., Zunino, B., Jacquin, M.A., Meynet, O., Chiche, J., Pradelli, L.A., Marchetti, S., Cornille, A., Carles, M., Ricci, J.-E., 2012. Combination of glycolysis inhibition with chemotherapy results in an antitumor immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 20071–20076.
- Berchtold, D., Walther, T.C., 2009. TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol. Biol. Cell* 20, 1565–1575.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e08-10-1001>
- Bermejo, C., Haerizadeh, F., Takanaga, H., Chermak, D., Frommer, W.B., 2010. Dynamic analysis of cytosolic glucose and ATP levels in yeast using optical sensors. *Biochem. J.* 432, 399–406. <https://doi.org/10.1042/BJ20100946>
- Bhaumik, S.R., Green, M.R., 2002. Differential Requirement of SAGA Components for Recruitment of TATA-Box-Binding Protein to Promoters In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7365–7371. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.21.7365-7371.2002>
- Boutrid, H., Jockovich, M.-E., Murray, T.G., Piña, Y., Feuer, W.J., Lampidis, T.J., Cebulla, C.M., 2008. Targeting Hypoxia, a Novel Treatment for Advanced Retinoblastoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 2799–2805. <https://doi.org/10.1167/iov.08-1751>
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D., 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast Chichester Engl.* 14, 115–132.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2)
- Brandl, C.J., Furlanetto, A.M., Martens, J.A., Hamilton, K.S., 1993. Characterization of NGG1, a novel yeast gene required for glucose repression of GAL4p-regulated transcription. *EMBO J.* 12, 5255–5265.
- Brohée, S., Barriot, R., Moreau, Y., André, B., 2010. YTPdb: A wiki database of yeast membrane transporters. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1798, 1908–1912.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.008>
- Cairey-Remonnay, A., Deffaud, J., Wésolowski-Louvel, M., Lemaire, M., Soulard, A., 2015. Glycolysis Controls Plasma Membrane Glucose Sensors To Promote Glucose Signaling in Yeasts. *Mol. Cell. Biol.* 35, 747–757.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00515-14>
- Cameron, S., Levin, L., Zoller, M., Wigler, M., 1988. cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell* 53, 555–566. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90572-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90572-7)
- Cannon, J.F., Tatchell, K., 1987. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2653–2663.
- Carlson, M., Osmond, B.C., Botstein, D., 1981. Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* 98, 25–40.
- Celenza, J.L., Eng, F.J., Carlson, M., 1989. Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5045–5054.
<https://doi.org/10.1128/mcb.9.11.5045-5054.1989>
- Chaudhry, R., Varacallo, M., 2021. Biochemistry, Glycolysis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Chen, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S., Hochstrasser, M., 1993. Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. *Cell* 74, 357–369. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90426-q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90426-q)
- Chen, W., Guéron, M., 1992. The inhibition of bovine heart hexokinase by

- 2-deoxy-d-glucose-6-phosphate: characterization by ^{31}P NMR and metabolic implications. *Biochimie* 74, 867–873. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90070-U](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90070-U)
- Cheon, Y., Kim, H., Park, K., Kim, M., Lee, D., 2020. Dynamic modules of the coactivator SAGA in eukaryotic transcription. *Exp. Mol. Med.* 52, 991–1003. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0463-4>
- Cheong, J.-H., Park, E.S., Liang, J., Dennison, J.B., Tsavachidou, D., Nguyen-Charles, C., Wa Cheng, K., Hall, H., Zhang, D., Lu, Y., Ravoori, M., Kundra, V., Ajani, J., Lee, J.-S., Ki Hong, W., Mills, G.B., 2011. Dual Inhibition of Tumor Energy Pathway by 2-Deoxyglucose and Metformin Is Effective against a Broad Spectrum of Preclinical Cancer Models. *Mol. Cancer Ther.* 10, 2350–2362.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., Thevelein, J.M., 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 254–299. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- Courtney, R.J., Steiner, S.M., Benyesh-Melnick, M., 1973. Effects of 2-deoxy-d-glucose on herpes simplex virus replication. *Virology* 52, 447–455. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90340-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90340-1)
- Crabtree, H.G., 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 23, 536–545. <https://doi.org/10.1042/bj0230536>
- Cramer, F.B., Woodward, G.E., 1952. 2-Desoxy-D-glucose as an antagonist of glucose in yeast fermentation. *J. Frankl. Inst.* 253, 354–360. [https://doi.org/10.1016/0016-0032\(52\)90852-1](https://doi.org/10.1016/0016-0032(52)90852-1)
- Crapeau, M., Merhi, A., André, B., 2014. Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like Bul and Aly proteins. *J. Biol. Chem.* 289, 22103–22116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.582320>
- Cruz, A.L.S., Barreto, E. de A., Fazolini, N.P.B., Viola, J.P.B., Bozza, P.T., 2020. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2297-3>
- D'Amore, T., Russell, I., Stewart, G.G., 1989. Sugar utilization by yeast during fermentation. *J. Ind. Microbiol.* 4, 315–323. <https://doi.org/10.1007/BF01577355>
- Davis, N.G., Horecka, J.L., Sprague, G.F., 1993. Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J. Cell Biol.* 122, 53–65. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.53>
- De Deken, R.H., 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44, 149–156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>
- De Palma, A., Fanelli, G., Cretella, E., De Luca, V., Palladino, R.A., Panzeri, V., Roffia, V., Saliola, M., Mauri, P., Filetici, P., 2020. Gcn5p and Ubp8p Affect Protein Ubiquitylation and Cell Proliferation by Altering the Fermentative/Respiratory Flux Balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio* 11, e01504-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01504-20>
- Defenouillère, Q., Verraes, A., Laussel, C., Friedrich, A., Schacherer, J., Léon, S., 2019. The induction of HAD-like phosphatases by multiple signaling pathways confers resistance to the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose. *Sci. Signal.* 12. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw8000>
- dos Santos, S.C., Teixeira, M.C., Dias, P.J., Sá-Correia, I., 2014. MFS transporters required for multidrug/multixenobiotic (MD/MX) resistance in the model yeast: understanding their physiological function through post-genomic approaches. *Front. Physiol.* 5, 180. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00180>
- Eisenberg, T., Büttner, S., 2014. Lipids and cell death in yeast. *Fems Yeast Res.* 14, 179–197. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12105>
- Ely, J.O., 1954. 2-deoxy-d-glucose as an inhibitor of cancerous growth in animals. *J. Frankl. Inst.* 258, 157–160. [https://doi.org/10.1016/0016-0032\(54\)90946-1](https://doi.org/10.1016/0016-0032(54)90946-1)
- Ely, J.O., Tull, F.A., Hard, J.A., 1952. The influence of 2-Desoxy-D-glucose on the growth of embryonic chicken-heart fibroblasts in tissue culture. *J. Frankl. Inst.* 253, 361–365. [https://doi.org/10.1016/0016-0032\(52\)90853-3](https://doi.org/10.1016/0016-0032(52)90853-3)
- Entian, K.D., Fröhlich, K.U., 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of

- hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* 158, 29–35.
<https://doi.org/10.1128/jb.158.1.29-35.1984>
- Entian, K.D., Zimmermann, F.K., 1980. Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 177, 345–350. <https://doi.org/10.1007/BF00267449>
- Erpapazoglou, Z., Walker, O., Haguenaer-Tsapis, R., 2014. Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking. *Cells* 3, 1027–1088.
<https://doi.org/10.3390/cells3041027>
- Feng, Z.H., Wilson, S.E., Peng, Z.Y., Schlender, K.K., Reimann, E.M., Trumbly, R.J., 1991. The yeast *GLC7* gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 266, 23796–23801.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54353-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54353-2)
- Feyder, S., De Craene, J.-O., Bär, S., Bertazzi, D.L., Friant, S., 2015. Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1509–1525.
<https://doi.org/10.3390/ijms16011509>
- Fraenkel, D.G., 2011. *Yeast Intermediary Metabolism*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gabay-Maskit, S., Cruz-Zaragoza, L.D., Shai, N., Eisenstein, M., Bibi, C., Cohen, N., Hansen, T., Yifrach, E., Harpaz, N., Belostotsky, R., Schliebs, W., Schuldiner, M., Erdmann, R., Zalckvar, E., 2020. A piggybacking mechanism enables peroxisomal localization of the glyoxylate cycle enzyme *Mdh2* in yeast. *J. Cell Sci.* 133, jcs244376. <https://doi.org/10.1242/jcs.244376>
- Galan, J.M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R., 1996. Ubiquitination mediated by the *Npi1p/Rsp5p* ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 271, 10946–10952.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10946>
- Gale, E.F., Wayman, F., Orlean, P.A.Y. 1984, 1984. The Action of 2-Deoxy-d-glucose on the Incorporation of Glucose into (1→3)- β -Glucan in Stationary Phase Cultures of *Candida albicans*. *Microbiology* 130, 3303–3311.
<https://doi.org/10.1099/00221287-130-12-3303>
- Gancedo, J.M., 2008. The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 673–704. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x>
- Gao, M., Huang, X., Song, B.-L., Yang, H., 2019. The biogenesis of lipid droplets: Lipids take center stage. *Prog. Lipid Res.* 75, 100989.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100989>
- García-Molinero, V., García-Martínez, J., Reja, R., Furió-Tarí, P., Antúnez, O., Vinayachandran, V., Conesa, A., Pugh, B.F., Pérez-Ortín, J.E., Rodríguez-Navarro, S., 2018. The SAGA/TREX-2 subunit *Sus1* binds widely to transcribed genes and affects mRNA turnover globally. *Epigenetics Chromatin* 11, 13.
<https://doi.org/10.1186/s13072-018-0184-2>
- Gatta, A.T., Wong, L.H., Sere, Y.Y., Calderón-Noreña, D.M., Cockcroft, S., Menon, A.K., Levine, T.P., 2015. A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport. *eLife* 4.
<https://doi.org/10.7554/eLife.07253>
- Geladé, R., Van de Velde, S., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., 2003. Multi-level response of the yeast genome to glucose. *Genome Biol.* 4, 233.
<https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-11-233>
- Gitan, R.S., Eide, D.J., 2000. Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast *ZRT1* zinc transporter. *Biochem. J.* 346 Pt 2, 329–336.
- Gitan, R.S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M., Eide, D., 1998. Zinc-induced inactivation of the yeast *ZRT1* zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J. Biol. Chem.* 273, 28617–28624.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.44.28617>
- Gournas, C., Gkionis, S., Carquin, M., Twyffels, L., Tyteca, D., André, B., 2018. Conformation-dependent partitioning of yeast nutrient transporters into starvation-protective membrane domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115,

- E3145–E3154. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719462115>
- Gournas, C., Saliba, E., Krammer, E.-M., Barthelemy, C., Prévost, M., André, B., 2017. Transition of yeast Can1 transporter to the inward-facing state unveils an α -arrestin target sequence promoting its ubiquitylation and endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 28, 2819–2832. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0104>
- GPMDB Proteome Database [WWW Document], n.d. . GPMDB. URL <https://gpmdb.thegpm.org> (accessed 8.17.21).
- Graschopf, A., Stadler, J.A., Hoellerer, M.K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S.D., Schweyen, R.J., 2001. The Yeast Plasma Membrane Protein Alr1 Controls Mg²⁺ Homeostasis and Is Subject to Mg²⁺-dependent Control of Its Synthesis and Degradation *. *J. Biol. Chem.* 276, 16216–16222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101504200>
- Guo, S., Skala, W., Magdolen, V., Brandstetter, H., Goettig, P., 2014. Sweetened kallikrein-related peptidases (KLKs): glycan trees as potential regulators of activation and activity. *Biol. Chem.* 395, 959–976. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0140>
- Gupta, R., Kus, B., Fladd, C., Wasmuth, J., Tonikian, R., Sidhu, S., Krogan, N.J., Parkinson, J., Rotin, D., 2007. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3, 116. <https://doi.org/10.1038/msb4100159>
- Hager, N.A., Krasowski, C.J., Mackie, T.D., Kolb, A.R., Needham, P.G., Augustine, A.A., Dempsey, A., Szent-Gyorgyi, C., Bruchez, M.P., Bain, D.J., Kwiatkowski, A.V., O'Donnell, A.F., Brodsky, J.L., 2018. Select α -arrestins control cell-surface abundance of the mammalian Kir2.1 potassium channel in a yeast model. *J. Biol. Chem.* 293, 11006–11021. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001293>
- Haguenauer-Tsapis, R., André, B., 2004. Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. *Top. Curr. Genet.* 273–323. <https://doi.org/10.1007/b97215>. hal-00007691
- Hariri, H., Rogers, S., Ugrankar, R., Liu, Y.L., Feathers, J.R., Henne, W.M., 2018. Lipid droplet biogenesis is spatially coordinated at ER-vacuole contacts under nutritional stress. *EMBO Rep.* 19, 57–72. <https://doi.org/10.15252/embr.201744815>
- Hatakeyama, R., Kamiya, M., Takahara, T., Maeda, T., 2010. Endocytosis of the Aspartic Acid/Glutamic Acid Transporter Dip5 Is Triggered by Substrate-Dependent Recruitment of the Rsp5 Ubiquitin Ligase via the Arrestin-Like Protein Aly2. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5598–5607. <https://doi.org/10.1128/MCB.00464-10>
- Hedbacker, K., Carlson, M., 2008. SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 2408–2420. <https://doi.org/10.2741/2854>
- Hedbacker, K., Carlson, M., 2006. Regulation of the Nucleocytoplasmic Distribution of Snf1-Gal83 Protein Kinase. *Eukaryot. Cell* 5, 1950–1956. <https://doi.org/10.1128/EC.00256-06>
- Hein, C., Springael, J.Y., Volland, C., Haguenauer-Tsapis, R., André, B., 1995. NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol Microbiol* 18, 77–87. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18010077.x
- Hein, Catherine, Springael, J.Y., Volland, C., Haguenauer-Tsapis, R., André, B., 1995. NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* 18. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18010077.x
- Henne, W.M., reese, M.L., Goodman, J.M., 2018. The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *EMBO J.* 37, e98947. <https://doi.org/10.15252/emboj.201898947>
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.-S., Duggan, L.J., Emre, N.C.T., Kao, C.-F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A., Berger, S.L., 2003. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* 17, 2648–2663. <https://doi.org/10.1101/gad.1144003>
- Herrador, A., Herranz, S., Lara, D., Vincent, O., 2010. Recruitment of the ESCRT machinery

- to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol. Cell. Biol.* 30, 897–907.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00132-09>
- Hicke, L., Riezman, H., 1996. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277–287.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80982-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80982-4)
- Ho, H.-C., MacGurn, J.A., Emr, S.D., 2017. Deubiquitinating enzymes Ubp2 and Ubp15 regulate endocytosis by limiting ubiquitination and degradation of ARTs. *Mol. Biol. Cell* 28, 1271–1283. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0008>
- Hoepfner, D., Helliwell, S.B., Sadlish, H., Schuierer, S., Filipuzzi, I., Brachat, S., Bhullar, B., Plikat, U., Abraham, Y., Altorfer, M., Aust, T., Baeriswyl, L., Cerino, R., Chang, L., Estoppey, D., Eichenberger, J., Frederiksen, M., Hartmann, N., Hohendahl, A., Knapp, B., Krastel, P., Melin, N., Nigsch, F., Oakeley, E.J., Petitjean, V., Petersen, F., Riedl, R., Schmitt, E.K., Staedtler, F., Studer, C., Tallarico, J.A., Wetzel, S., Fishman, M.C., Porter, J.A., Movva, N.R., 2014. High-resolution chemical dissection of a model eukaryote reveals targets, pathways and gene functions. *Microbiol. Res.* 169, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.11.004>
- Holzer, H., 1976. Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 1, 178–181.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(76\)80018-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(76)80018-7)
- Hong, S.-P., Carlson, M., 2007. Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.* 282, 16838–16845.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700146200>
- Hong, S.-P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., Carlson, M., 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8839–8843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533136100>
- Horak, J., Wolf, D.H., 1997. Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J. Bacteriol.* 179, 1541–1549.
<https://doi.org/10.1128/jb.179.5.1541-1549.1997>
- Horisberger, M., Rouvet-Vauthey, M., 1985. Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* 41, 748–750.
<https://doi.org/10.1007/BF02012578>
- Hovsepian, J., 2017. L'arrestine CSR2/ART8 régule l'endocytose des transporteurs d'hexoses lors d'une carence en glucose chez *Saccharomyces cerevisiae*. Université Paris Diderot - Paris 7, Paris.
- Hovsepian, J., Albanèse, V., Becuwe, M., Ivashov, V., Teis, D., Léon, S., 2018. The yeast arrestin-related protein Bul1 is a novel actor of glucose-induced endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 29, 1012–1020. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-07-0466>
- Hovsepian, J., Defenouillère, Q., Albanèse, V., Váchová, L., Garcia, C., Palková, Z., Léon, S., 2017. Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. *J. Cell Biol.* 216, 1811–1831.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201610094>
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691. <https://doi.org/10.1038/nature02026>
- Ivashov, V., Zimmer, J., Schwabl, S., Kahlhofer, J., Weys, S., Gstir, R., Jakschitz, T., Kremser, L., Bonn, G.K., Lindner, H., Huber, L.A., Leon, S., Schmidt, O., Teis, D., 2020. Complementary α -arrestin-ubiquitin ligase complexes control nutrient transporter endocytosis in response to amino acids. *eLife* 9.
<https://doi.org/10.7554/eLife.58246>
- Jiang, R., Carlson, M., 1997. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2099–2106. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.4.2099>
- Johnson, B.F., 1968. Lysis of Yeast Cell Walls Induced by 2-Deoxyglucose at Their Sites of Glucan Synthesis. *J. Bacteriol.* 95, 1169–1172.
<https://doi.org/10.1128/jb.95.3.1169-1172.1968>

- Jones, G.M., Stalker, J., Humphray, S., West, A., Cox, T., Rogers, J., Dunham, I., Prelich, G., 2008. A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Methods* 5, 239–241. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1181>
- Jouhten, P., Ponomarova, O., Gonzalez, R., Patil, K.R., 2016. *Saccharomyces cerevisiae* metabolism in ecological context. *FEMS Yeast Res.* 16, fow080. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow080>
- Juhnke, H., Krems, B., Kötter, P., Entian, K.D., 1996. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol. Gen. Genet. MGG* 252, 456–464. <https://doi.org/10.1007/BF02173011>
- Jung, S., Smith, J.J., von Haller, P.D., Dilworth, D.J., Sitko, K.A., Miller, L.R., Saleem, R.A., Goodlett, D.R., Aitchison, J.D., 2013. Global analysis of condition-specific subcellular protein distribution and abundance. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 12, 1421–1435. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.019166>
- Kahlhofer, J., Leon, S., Teis, D., Schmidt, O., 2021. The α -arrestin family of ubiquitin ligase adaptors links metabolism with selective endocytosis. *Biol. Cell* 113, 183–219. <https://doi.org/10.1111/boc.202000137>
- Kaliszewski, P., Zoładek, T., 2008. The role of Rsp5 ubiquitin ligase in regulation of diverse processes in yeast cells. *Acta Biochim. Pol.* 55, 649–662.
- Kaluza, G., Schmidt, M.F.G., Scholtissek, C., 1973. Effect of 2-deoxy-d-glucose on the multiplication of semliki forest virus and the reversal of the block by mannose. *Virology* 54, 179–189. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90127-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90127-X)
- Katju, V., Farslow, J.C., Bergthorsson, U., 2009. Variation in gene duplicates with low synonymous divergence in *Saccharomyces cerevisiae* relative to *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 10, R75. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-7-r75>
- Katzmann, D.J., Sarkar, S., Chu, T., Audhya, A., Emr, S.D., 2004. Multivesicular Body Sorting: Ubiquitin Ligase Rsp5 Is Required for the Modification and Sorting of Carboxypeptidase S. *Mol. Biol. Cell* 15, 468–480. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-07-0473>
- Kavaliauskiene, S., Skotland, T., Sylvänne, T., Simolin, H., Klock, T.I., Torgersen, M.L., Lingelem, A.B.D., Simm, R., Ekroos, K., Sandvig, K., 2015. Novel actions of 2-deoxy-D-glucose: protection against Shiga toxins and changes in cellular lipids. *Biochem. J.* 470, 23–37. <https://doi.org/10.1042/BJ20141562>
- Kawai, K., Moriya, A., Uemura, S., Abe, F., 2014. Functional implications and ubiquitin-dependent degradation of the peptide transporter Ptr2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 13, 1380–1392. <https://doi.org/10.1128/EC.00094-14>
- Kayikci, Ö., Nielsen, J., 2015. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 15. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>
- Kellis, M., Birren, B.W., Lander, E.S., 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428, 617–624. <https://doi.org/10.1038/nature02424>
- Kew, O.M., Douglas, H.C., 1976. Genetic co-regulation of galactose and melibiose utilization in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* 125, 33–41. <https://doi.org/10.1128/jb.125.1.33-41.1976>
- Klein, C.J.L., Olsson, L., Nielsen, J., 1998, 1998. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of MIG1 in metabolic functions. *Microbiology* 144, 13–24. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-1-13>
- Klionsky, D.J., 2011. For the last time, it is GFP-Atg8, not Atg8-GFP (and the same goes for LC3). *Autophagy* 7, 1093–1094. <https://doi.org/10.4161/auto.7.10.15492>
- Kock, C., Arlt, H., Ungermann, C., Heinisch, J.J., 2016. Yeast cell wall integrity sensors form specific plasma membrane microdomains important for signalling. *Cell. Microbiol.* 18, 1251–1267. <https://doi.org/10.1111/cmi.12635>
- Kölling, R., Hollenberg, C.P., 1994. The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13, 3261–3271.
- Kotyk, A., Alonso, A., 1985. Transport of ethanol in baker's yeast. *Folia Microbiol. (Praha)*

- 30, 90–91. <https://doi.org/10.1007/BF02922503>
- Koutelou, E., Hirsch, C.L., Dent, S.Y.R., 2010. Multiple faces of the SAGA complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.03.005>
- Kozubowski, L., Panek, H., Rosenthal, A., Bloecher, A., DeMarini, D.J., Tatchell, K., 2003. A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol. Biol. Cell* 14, 26–39. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0373>
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W., Donaton, M.C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J.H., Thevelein, J.M., 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32, 1002–1012. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01413.x>
- Krampe, S., Boles, E., 2002. Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Lett.* 513, 193–196. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02297-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02297-4)
- Krátký, Z., Biely, P., Bauer, S., 1975. Mechanism of 2-deoxy-D-glucose inhibition of cell-wall polysaccharide and glycoprotein biosyntheses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 54, 459–467. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb04157.x>
- Kruckeberg, A.L., 1996. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 166, 283–92. <https://doi.org/10.1007/s002030050385>
- Kurtoglu, M., Gao, N., Shang, J., Maher, J.C., Lehrman, M.A., Wangpaichitr, M., Savaraj, N., Lane, A.N., Lampidis, T.J., 2007. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol. Cancer Ther.* 6, 3049–3058. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0310>
- Kuznetsova, E., Nocek, B., Brown, G., Makarova, K.S., Flick, R., Wolf, Y.I., Khusnutdinova, A., Evdokimova, E., Jin, K., Tan, K., Hanson, A.D., Hasnain, G., Zallot, R., de Crécy-Lagard, V., Babu, M., Savchenko, A., Joachimiak, A., Edwards, A.M., Koonin, E.V., Yakunin, A.F., 2015. Functional Diversity of Haloacid Dehalogenase Superfamily Phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*: BIOCHEMICAL, STRUCTURAL, AND EVOLUTIONARY INSIGHTS*. *J. Biol. Chem.* 290, 18678–18698. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657916>
- Laidlaw, K.M.E., Bisinski, D.D., Shashkova, S., Paine, K.M., Veillon, M.A., Leake, M.C., MacDonald, C., 2021. A glucose-starvation response governs endocytic trafficking and eisosomal retention of surface cargoes in budding yeast. *J. Cell Sci.* 134. <https://doi.org/10.1242/jcs.257733>
- Landau, B.R., Lubs, H.A., 1958. Animal Responses to 2-Deoxy-D-Glucose Administration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99, 124–127. <https://doi.org/10.3181/00379727-99-24268>
- Larson, J.R., Bharucha, J.P., Ceaser, S., Salamon, J., Richardson, C.J., Rivera, S.M., Tatchell, K., 2008. Protein phosphatase type 1 directs chitin synthesis at the bud neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 19, 3040–3051. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-02-0130>
- Laussel, C., Léon, S., 2020. Cellular toxicity of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose and associated resistance mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 182, 114213. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114213>
- Lauwers, E., Jacob, C., André, B., 2009. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *J. Cell Biol.* 185, 493–502. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810114>
- Lazar, Z., Gamboa, H., Crutz - Le Coq, A.-M., Neuvéglise, C., Nicaud, J.-M., 2015. Awakening the endogenous Leloir pathway for efficient galactose utilization by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Biofuels* 8. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0370-4>
- Lee, J., Colwill, K., Aneliunas, V., Tennyson, C., Moore, L., Ho, Y., Andrews, B., 1998. Interaction of yeast Rvs167 and Pho85 cyclin-dependent kinase complexes may link the cell cycle to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol. CB* 8, 1310–1321. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00561-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00561-1)
- Lee, S., Ho, H.-C., Tumolo, J.M., Hsu, P.-C., MacGurn, J.A., 2019. Methionine triggers Ppz-mediated dephosphorylation of Art1 to promote cargo-specific endocytosis. *J.*

- Cell Biol. 218, 977–992. <https://doi.org/10.1083/jcb.201712144>
- Lee, Y.J., Jeschke, G.R., Roelants, F.M., Thorner, J., Turk, B.E., 2012. Reciprocal phosphorylation of yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenases in adaptation to distinct types of stress. *Mol. Cell Biol.* 32, 4705–4717. <https://doi.org/10.1128/MCB.00897-12>
- Lei, H., Li, H., Mo, F., Zheng, L., Zhao, H., Zhao, M., 2013. Effects of Lys and His supplementations on the regulation of nitrogen metabolism in lager yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8913–8921. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5137-x>
- Lemaire, K., Van de Velde, S., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., 2004. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 16, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.004>
- Léon, S., Erpapazoglou, Z., Haguenuer-Tsapis, R., 2008. Ear1p and Ssh4p Are New Adaptors of the Ubiquitin Ligase Rsp5p for Cargo Ubiquitylation and Sorting at Multivesicular Bodies. *Mol. Biol. Cell* 19, 2379–2388. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0068>
- Li, Y., Zong, W.-X., Ding, W.-X., 2017. Recycling the danger via lipid droplet biogenesis after autophagy. *Autophagy* 13, 1995–1997. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1371394>
- Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., Emr, S.D., 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.025>
- Lipke, P.N., Ovalle, R., 1998. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J. Bacteriol.* 180, 3735–3740.
- Liti, G., 2015. The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05835>
- Liu, H., Savaraj, N., Priebe, W., Lampidis, T.J., 2002. Hypoxia increases tumor cell sensitivity to glycolytic inhibitors: a strategy for solid tumor therapy (Model C). *Biochem. Pharmacol.* 64, 1745–1751. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01456-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01456-9)
- Liu, J., Sitaram, A., Burd, C.G., 2007. Regulation of Copper-Dependent Endocytosis and Vacuolar Degradation of the Yeast Copper Transporter, Ctr1p, by the Rsp5 Ubiquitin Ligase. *Traffic* 8, 1375–1384. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00616.x>
- Lobo, Z., Maitra, P.K., 1977. Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 639–645. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90544-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90544-6)
- Lu, R., Drubin, D.G., Sun, Y., 2016. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 1531–1536. <https://doi.org/10.1242/jcs.182303>
- Lucero, P., Lagunas, R., 1997. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 273–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10253.x>
- Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O., Johnston, M., 1998. Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 1377–1391.
- Ma, H., Bloom, L.M., Zhu, Z.M., Walsh, C.T., Botstein, D., 1989. Isolation and characterization of mutations in the *HXK2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 9, 5630–5642. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.12.5630-5642.1989>
- MacGurn, J.A., Hsu, P.-C., Smolka, M.B., Emr, S.D., 2011. TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell* 147, 1104–1117. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.054>
- Maeda, Y., Oku, M., Sakai, Y., 2017. Autophagy-independent function of Atg8 in lipid droplet dynamics in yeast. *J. Biochem. (Tokyo)* 161, 339–348. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw078>
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., Tanner, W., 2004. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J. Cell Sci.* 117, 6031–6041. <https://doi.org/10.1242/jcs.01493>

- Malínská, K., Malínský, J., Opekarová, M., Tanner, W., 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 4427–4436. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-04-0221>
- Marqués, M.C., Zamarbide-Forés, S., Pedelini, L., Llopis-Torregrosa, V., Yenush, L., 2015. A functional Rim101 complex is required for proper accumulation of the Ena1 Na⁺-ATPase protein in response to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 15, fov017. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov017>
- Marques, W.L., Raghavendran, V., Stambuk, B.U., Gombert, A.K., 2016. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast Res.* 16. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov107>
- Maschek, G., Savaraj, N., Priebe, W., Braunschweiger, P., Hamilton, K., Tidmarsh, G.F., De Young, L.R., Lampidis, T.J., 2004. 2-Deoxy-d-glucose Increases the Efficacy of Adriamycin and Paclitaxel in Human Osteosarcoma and Non-Small Cell Lung Cancers In Vivo. *Cancer Res.* 64, 31–34.
- Mathews Samuel, S., Satheesh, N.J., Ghosh, S., Büsselberg, D., Majeed, Y., Ding, H., Triggler, C.R., 2019. Treatment with a Combination of Metformin and 2-Deoxyglucose Upregulates Thrombospondin-1 in Microvascular Endothelial Cells: Implications in Anti-Angiogenic Cancer Therapy. *Cancers* 11, E1737. <https://doi.org/10.3390/cancers11111737>
- Matsunami, K., Kawashima, T., 1995. Radioactive 2-DG incorporation patterns in the mesial frontal cortex of task-performing monkeys. *Neurosci. Res.* 23, 365–375. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00964-U](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00964-U)
- Matsuzawa, T., Fujita, Y., Tohda, H., Takegawa, K., 2012. Snf1-like protein kinase Ssp2 regulates glucose derepression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* 11, 159–167. <https://doi.org/10.1128/EC.05268-11>
- McCartney, R.R., Chandrashekarappa, D.G., Zhang, B.B., Schmidt, M.C., 2014. Genetic analysis of resistance and sensitivity to 2-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 198, 635–646. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169060>
- Megnet, R., 1965. Effect of 2-Deoxyglucose on *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 90, 1032–1035. <https://doi.org/10.1128/jb.90.4.1032-1035.1965>
- Merhi, A., André, B., 2012. Internal Amino Acids Promote Gap1 Permease Ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-Dependent Control of the Bul Arrestin-Like Adaptors. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4510–4522. <https://doi.org/10.1128/MCB.00463-12>
- Michaillat, L., Mayer, A., 2013. Identification of genes affecting vacuole membrane fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8, e54160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054160>
- Mizunuma, M., Tsubakiyama, R., Ogawa, T., Shitamukai, A., Kobayashi, Y., Inai, T., Kume, K., Hirata, D., 2013. Ras/cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulates multiple aspects of cellular events by phosphorylating the Whi3 cell cycle regulator in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 288, 10558–10566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402214>
- Moreno, F., Herrero, P., 2002. The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 83–90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00600.x>
- Nakamura, K., Compans, R.W., 1978. Effects of glucosamine, 2-deoxyglucose, and tunicamycin on glycosylation, sulfation, and assembly of influenza viral proteins. *Virology* 84, 303–319. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90250-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90250-7)
- Nath, N., McCartney, R.R., Schmidt, M.C., 2003. Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3909–3917. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.11.3909-3917.2003>
- Neigeborn, L., Carlson, M., 1987. Mutations Causing Constitutive Invertase Synthesis in Yeast: Genetic Interactions with snf Mutations. *Genetics* 115, 247–253. <https://doi.org/10.1093/genetics/115.2.247>
- Nikko, E., Pelham, H.R.B., 2009. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic Cph. Den.* 10, 1856–1867. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00990.x>
- Nikko, E., Sullivan, J.A., Pelham, H.R.B., 2008. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination

- and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* 9, 1216–1221. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.199>
- Nishimura, A., Tanikawa, T., Takagi, H., 2020. Inhibitory effect of arginine on proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* 37, 531–540. <https://doi.org/10.1002/yea.3504>
- Notario, V., Gale, E.F., Kerridge, D., Wayman, F. 1982, 1982. Phenotypic Resistance to Amphotericin B in *Candida albicans*: Relationship to Glucan Metabolism. *Microbiology* 128, 761–777. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-4-761>
- Novak, S., D'Amore, T., Stewart, G.G., 1990. 2-Deoxy-D-glucose resistant yeast with altered sugar transport activity. *FEBS Lett.* 269, 202–204. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81154-g](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81154-g)
- Novoselova, T.V., Zahira, K., Rose, R.-S., Sullivan, J.A., 2012. Bul Proteins, a Nonredundant, Antagonistic Family of Ubiquitin Ligase Regulatory Proteins. *Eukaryot. Cell* 11, 463–470. <https://doi.org/10.1128/EC.00009-12>
- O'Donnell, A.F., Apffel, A., Gardner, R.G., Cyert, M.S., 2010. Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell* 21, 3552–3566. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-07-0636>
- O'Donnell, A.F., Huang, L., Thorner, J., Cyert, M.S., 2013. A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α -arrestin Aly1/Art6. *J. Biol. Chem.* 288, 24063–24080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478511>
- O'Donnell, A.F., McCartney, R.R., Chandrashekarappa, D.G., Zhang, B.B., Thorner, J., Schmidt, M.C., 2015. 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and α -arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. *Mol. Cell. Biol.* 35, 939–955. <https://doi.org/10.1128/MCB.01183-14>
- O'Donnell, A.F., Schmidt, M.C., 2019. AMPK-Mediated Regulation of Alpha-Arrestins and Protein Trafficking. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 515. <https://doi.org/10.3390/ijms20030515>
- Ozcan, S., Dover, J., Johnston, M., 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 2566–2573. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2566>
- Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wölfel, S., Johnston, M., 1996. 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.* 93, 12428–12432. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12428>
- Pählman, A.-K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., Adler, L., 2001. The Yeast Glycerol 3-Phosphatases Gpp1p and Gpp2p Are Required for Glycerol Biosynthesis and Differentially Involved in the Cellular Responses to Osmotic, Anaerobic, and Oxidative Stress *. *J. Biol. Chem.* 276, 3555–3563. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007164200>
- Paiva, S., Kruckeberg, A.L., Casal, M., 2002. Utilization of green fluorescent protein as a marker for studying the expression and turnover of the monocarboxylate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 363, 737–744. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630737>
- Paiva, S., Vieira, N., Nondier, I., Haguenaer-Tsapis, R., Casal, M., Urban-Grimal, D., 2009. Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter: role of lysine 63-linked ubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* 284, 19228–19236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008318>
- Palomino, A., Herrero, P., Moreno, F., 2006. Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. *Nucleic Acids Res.* 34, 1427–1438. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl028>
- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Nelissen, B., Goffeau, A., Saier, M.H., 1998. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 430, 116–125. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00629-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00629-2)
- Payne, G.S., 1990. Genetic analysis of clathrin function in yeast. *J. Membr. Biol.* 116, 93–105. <https://doi.org/10.1007/BF01868668>
- Phelps, M.E., 2000. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J.*

- Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. 41, 661–681.
- Prosser, D.C., Drivas, T.G., Maldonado-Báez, L., Wendland, B., 2011. Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J. Cell Biol.* 195, 657–671. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104045>
- Prosser, D.C., Pannunzio, A.E., Brodsky, J.L., Thorner, J., Wendland, B., O'Donnell, A.F., 2015. α -Arrestins participate in cargo selection for both clathrin-independent and clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Sci.* 128, 4220–4234. <https://doi.org/10.1242/jcs.175372>
- Raez, L.E., Papadopoulos, K., Ricart, A.D., Chiorean, E.G., Dipaola, R.S., Stein, M.N., Rocha Lima, C.M., Schlesselman, J.J., Tolba, K., Langmuir, V.K., Kroll, S., Jung, D.T., Kurtoglu, M., Rosenblatt, J., Lampidis, T.J., 2013. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71, 523–530. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2045-1>
- Ralsler, M., Wamelink, M.M., Struys, E.A., Joppich, C., Krobitsch, S., Jakobs, C., Lehrach, H., 2008. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17807–17811. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803090105>
- Randez-Gil, F., Blasco, A., Prieto, J.A., Sanz, P., 1995a. DOGR1 and DOGR2: two genes from *Saccharomyces cerevisiae* that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed. *Yeast Chichester Engl.* 11, 1233–1240. <https://doi.org/10.1002/yea.320111303>
- Randez-Gil, F., Prieto, J.A., Sanz, P., 1995b. The expression of a specific 2-deoxyglucose-6P phosphatase prevents catabolite repression mediated by 2-deoxyglucose in yeast. *Curr. Genet.* 28, 101–107. <https://doi.org/10.1007/BF00315774>
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K.-D., Prieto, J.A., 1998. Carbon Source-Dependent Phosphorylation of Hexokinase PII and Its Role in the Glucose-Signaling Response in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2940–2948.
- Reggiori, F., Pelham, H.R., 2001. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J.* 20, 5176–5186. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.18.5176>
- Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M., 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245, 324–333. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00324.x>
- Reifenberger, E., Freidel, K., Ciriacy, M., 1995. Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* 16, 157–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02400.x>
- Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P., Moreno, F., 2001. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 355, 625–631. <https://doi.org/10.1042/bj3550625>
- Rowbottom, L., Munro, C.A., Gow, N.A.R., 2004. *Candida albicans* mutants in the BNI4 gene have reduced cell-wall chitin and alterations in morphogenesis. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 3243–3252. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27167-0>
- Roy, A., Dement, A.D., Cho, K.H., Kim, J.-H., 2015. Assessing glucose uptake through the yeast hexose transporter 1 (Hxt1). *PloS One* 10, e0121985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121985>
- Roy, A., Kim, Y.-B., Cho, K.H., Kim, J.-H., 2014. Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2878–2885. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.004>
- Ruiz-García, A.B., Sendra, R., Pamblanco, M., Tordera, V., 1997. Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS Lett.* 403, 186–190. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00049-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00049-5)
- Saleh, A., Lang, V., Cook, R., Brandl, C.J., 1997. Identification of native complexes

- containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J. Biol. Chem.* 272, 5571–5578. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5571>
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A., Carlson, M., 2000. Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1321–1328. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1321-1328.2000>
- Sanz, P., Randez-Gil, F., Prieto, J.A., 1994. Molecular characterization of a gene that confers 2-deoxyglucose resistance in yeast. *Yeast Chichester Engl.* 10, 1195–1202. <https://doi.org/10.1002/yea.320100907>
- Savocco, J., Nootens, S., Afokpa, W., Bausart, M., Chen, X., Villers, J., Renard, H.-F., Prévost, M., Wattiez, R., Morsomme, P., 2019. Yeast α -arrestin Art2 is the key regulator of ubiquitylation-dependent endocytosis of plasma membrane vitamin B1 transporters. *PLoS Biol.* 17, e3000512. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000512>
- Sen, A., Hsieh, W.-C., Hanna, C.B., Hsu, C.-C., Pearson, M., Tao, W.A., Aguilar, R.C., 2020. The Na⁺ pump Ena1 is a yeast epsin-specific cargo requiring its ubiquitylation and phosphorylation sites for internalization. *J. Cell Sci.* 133, jcs245415. <https://doi.org/10.1242/jcs.245415>
- Séron, K., Blondel, M.O., Haguenaer-Tsapis, R., Volland, C., 1999. Uracil-induced down-regulation of the yeast uracil permease. *J. Bacteriol.* 181, 1793–1800. <https://doi.org/10.1128/JB.181.6.1793-1800.1999>
- SIB Swiss Institute of Bioinformatics | Expasy [WWW Document], n.d. URL <https://www.expasy.org/> (accessed 7.29.21).
- Smardon, A.M., Kane, P.M., 2014. Loss of vacuolar H⁺-ATPase activity in organelles signals ubiquitination and endocytosis of the yeast plasma membrane proton pump Pma1p. *J. Biol. Chem.* 289, 32316–32326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574442>
- Smith, A., Ward, M.P., Garrett, S., 1998. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17, 3556–3564. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3556>
- Smith, J.J., Sydorsky, Y., Marelli, M., Hwang, D., Bolouri, H., Rachubinski, R.A., Aitchison, J.D., 2006. Expression and functional profiling reveal distinct gene classes involved in fatty acid metabolism. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0009. <https://doi.org/10.1038/msb4100051>
- Snowdon, C., van der Merwe, G., 2012. Regulation of Hxt3 and Hxt7 turnover converges on the Vid30 complex and requires inactivation of the Ras/cAMP/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7, e50458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050458>
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Rosiers, M.H.D., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O., Shinohara, M., 1977. The [¹⁴C]deoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization: Theory, Procedure, and Normal Values in the Conscious and Anesthetized Albino Rat1. *J. Neurochem.* 28, 897–916. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10649.x>
- Sols, A., Crane, R.K., 1954. SUBSTRATE SPECIFICITY OF BRAIN HEXOKINASE. *J. Biol. Chem.* 210, 581–595. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65384-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65384-0)
- Soncini, S.R., Chandrashekarappa, D.G., Augustine, D.A., Callahan, K.P., O'Donnell, A.F., Schmidt, M.C., 2020. Spontaneous mutations that confer resistance to 2-deoxyglucose act through Hxk2 and Snf1 pathways to regulate gene expression and HXT endocytosis. *PLoS Genet.* 16, e1008484. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008484>
- Springael, J.Y., André, B., 1998. Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 1253–1263. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.6.1253>
- Springael, J.Y., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., André, B., 1999. NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 9), 1375–1383.
- Stamenova, S.D., Dunn, R., Adler, A.S., Hicke, L., 2004. The Rsp5 ubiquitin ligase binds to and ubiquitinates members of the yeast CIN85-endophilin complex, Sla1-Rvs167. *J. Biol. Chem.* 279, 16017–16025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313479200>

- Stanbrough, M., Magasanik, B., 1995. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 94–102.
- Starr, M.L., Fratti, R.A., 2019. The Participation of Regulatory Lipids in Vacuole Homotypic Fusion. *Trends Biochem. Sci.* 44, 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.12.003>
- Stauffer, B., Powers, T., 2015. Target of rapamycin signaling mediates vacuolar fission caused by endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 26, 4618–4630. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-06-0344>
- Stohrer, R., Hunter, E., 1979. Inhibition of Rous sarcoma virus replication by 2-deoxyglucose and tunicamycin: identification of an unglycosylated env gene product. *J. Virol.* 32, 412–419. <https://doi.org/10.1128/jvi.32.2.412-419.1979>
- Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J.R., Schmidt, M.C., Hardie, D.G., 2003. Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr. Biol. CB* 13, 1299–1305. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00459-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00459-7)
- Suzuki, A., Mochizuki, T., Uemura, S., Hiraki, T., Abe, F., 2013. Pressure-induced endocytic degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* low-affinity tryptophan permease Tat1 is mediated by Rsp5 ubiquitin ligase and functionally redundant PPxY motif proteins. *Eukaryot. Cell* 12, 990–997. <https://doi.org/10.1128/EC.00049-13>
- Talaia, G., Gournas, C., Saliba, E., Barata-Antunes, C., Casal, M., André, B., Diallinas, G., Paiva, S., 2017. The α -Arrestin Bul1p Mediates Lactate Transporter Endocytosis in Response to Alkalinization and Distinct Physiological Signals. *J. Mol. Biol.* 429, 3678–3695. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.09.014>
- Tevzadze, G.G., Pierce, J.V., Esposito, R.E., 2007. Genetic Evidence for a SPO1-Dependent Signaling Pathway Controlling Meiotic Progression in Yeast. *Genetics* 175, 1213–1227. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.069252>
- Thibault, G., Ng, D.T.W., 2012. The Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Pathways of Budding Yeast. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013193>
- Timson, D., 2007. Galactose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. undefined.
- Tolsma, T.O., Cuevas, L.M., Pietro, S.M.D., 2018. The Sla1 adaptor-clathrin interaction regulates coat formation and progression of endocytosis. *Traffic* 19, 446–462. <https://doi.org/10.1111/tra.12563>
- Torggler, R., Papinski, D., Kraft, C., 2017. Assays to Monitor Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells* 6. <https://doi.org/10.3390/cells6030023>
- Tower, D.B., 1958. The effects of 2-Deoxy-d-Glucose on metabolism of slices of cerebral cortex incubated in vitro. *J. Neurochem.* 3, 185–205. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1958.tb12625.x>
- Treibs, A., Kreuzer, F.-H., 1968. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 718, 208–223. <https://doi.org/10.1002/jlac.19687180119>
- Tschopp, J.F., Emr, S.D., Field, C., Schekman, R., 1986. GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 166, 313–318. <https://doi.org/10.1128/jb.166.1.313-318.1986>
- Tu, J., Carlson, M., 1994. The GLC7 type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6789–6796. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.10.6789>
- Van Steveninck, J., 1968. Transport and transport-associated phosphorylation of 2-deoxy-d-glucose in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 163, 386–394. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(68\)90123-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(68)90123-5)
- Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., Moreno, F., 2016. Hexokinase 2 Is an Intracellular Glucose Sensor of Yeast Cells That Maintains the Structure and Activity of Mig1 Protein Repressor Complex. *J. Biol. Chem.* 291, 7267–7285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711408>
- Vida, T.A., Emr, S.D., 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* 128, 779–792. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.5.779>

- Volland, C., Urban-Grimal, D., Géraud, G., Haguenauer-Tsapis, R., 1994. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* 269, 9833–9841.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C., Walter, P., 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998–1003. <https://doi.org/10.1038/nature04472>
- Wang, G., Yang, J., Huibregtse, J., 1999. Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* 19. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.1.342>
- Warburg, O., Wind, F., Negelein, E., 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>
- Warren, D.T., Andrews, P.D., Gourlay, C.W., Ayscough, K.R., 2002. Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J. Cell Sci.* 115, 1703–1715.
- Wawrzycka, D., Sadlak, J., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wysocki, R., 2019. Rsp5-dependent endocytosis and degradation of the arsenite transporter Acr3 requires its N-terminal acidic tail as an endocytic sorting signal and arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1861, 916–925. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.02.004>
- Weinberg, J., Drubin, D.G., 2012. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol.* 22, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.001>
- Weinberg, J.S., Drubin, D.G., 2014. Regulation of clathrin-mediated endocytosis by dynamic ubiquitination and deubiquitination. *Curr. Biol. CB* 24, 951–959. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.038>
- Wick, A.N., Drury, D.R., Morita, T.N., 1955. 2-Deoxyglucose—A Metabolic Block for Glucose. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89, 579–582. <https://doi.org/10.3181/00379727-89-21881>
- Wick, A.N., Drury, D.R., Nakada, H.I., Wolfe, J.B., 1957. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J. Biol. Chem.* 224, 963–969. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64988-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64988-9)
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P., Boles, E., 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 464, 123–128. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01698-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01698-1)
- Wilson, W.A., Hawley, S.A., Hardie, D.G., 1996. Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol. CB* 6, 1426–1434. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(96\)00747-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(96)00747-6)
- Wilson, W.A., Roach, P.J., 2002. Nutrient-Regulated Protein Kinases in Budding Yeast. *Cell* 111, 155–158. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01043-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01043-7)
- Witt, I., Kronau, R., Holzer, H., 1966. Repression von alkoholdehydrogenase, malatdehydrogenase, isocitratlyase und malatsynthase in hefe durch glucose. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol. Biol. Oxid.* 118, 522–537. [https://doi.org/10.1016/S0926-6593\(66\)80094-2](https://doi.org/10.1016/S0926-6593(66)80094-2)
- Woodward, G.E., 1952. 2-desoxy-d-glucose as an inhibitor in the aerobic glucose metabolism of yeast. *J. Frankl. Inst.* 254, 553–555. [https://doi.org/10.1016/0016-0032\(52\)90177-4](https://doi.org/10.1016/0016-0032(52)90177-4)
- Woodward, G.E., Cramer, F.B., 1952. 2-Desoxy-D-glucose as an inhibitor of anaerobic glycolysis in tumor tissue. *J. Frankl. Inst.* 254, 259–260. [https://doi.org/10.1016/0016-0032\(52\)90482-1](https://doi.org/10.1016/0016-0032(52)90482-1)
- Woodward, G.E., Hudson, M.T., 1955. Phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose by yeast hexokinase: Competition between 2-deoxy-d-glucose and glucose. *J. Frankl. Inst.* 259, 543–547. [https://doi.org/10.1016/0016-0032\(55\)90108-3](https://doi.org/10.1016/0016-0032(55)90108-3)
- Woodward, G.E., Hudson, M.T., 1954. The effect of 2-desoxy-D-glucose on glycolysis and respiration of tumor and normal tissues. *Cancer Res.* 14, 599–605.
- Xi, H., Kurtoglu, M., Liu, H., Wangpaichitr, M., You, M., Liu, X., Savaraj, N., Lampidis, T.J., 2011. 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67, 899–910.

- <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1391-0>
- Xie, J., Ye, J., Cai, Z., Luo, Y., Zhu, X., Deng, Y., Feng, Y., Liang, Yingke, Liu, R., Han, Z., Liang, Yuxiang, Zheng, Y., Mo, R., Zhuo, Y., Wu, Y., Jiang, F., Zhu, J., Wu, C.-L., Zhong, W., 2020. GPD1 Enhances the Anticancer Effects of Metformin by Synergistically Increasing Total Cellular Glycerol-3-Phosphate. *Cancer Res.* 80, 2150–2162. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2852>
- Xie, X., Lipke, P.N., 2010. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast Chichester Engl.* 27, 479–488. <https://doi.org/10.1002/yea.1787>
- Xie, Z., Nair, U., Klionsky, D.J., 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell* 19, 3290–3298. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1292>
- Yamaguchi, R., Janssen, E., Perkins, G., Ellisman, M., Kitada, S., Reed, J.C., 2011. Efficient Elimination of Cancer Cells by Deoxyglucose-ABT-263/737 Combination Therapy. *PLOS ONE* 6, e24102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024102>
- Yang, H., Chen, H., Hao, G., Mei, T., Zhang, H., Chen, W., Chen, Y., 2016. Increased Fatty Acid Accumulation Following Overexpression of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase and Suppression of β -oxidation in Oleaginous Fungus *Mortierella alpina*: Effect of G3PD and oxidation in *M. alpina*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600113>
- Yang, X., Reist, L., Chomchai, D.A., Chen, L., Arines, F.M., Li, M., 2021. ESCRT, not intraluminal fragments, sorts ubiquitinated vacuole membrane proteins for degradation. *J. Cell Biol.* 220. <https://doi.org/10.1083/jcb.202012104>
- Yashiroda, H., Kaida, D., Toh-e, A., Kikuchi, Y., 1998. The PY-motif of Bul1 protein is essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various stress conditions. *Gene* 225, 39–46. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00535-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00535-6)
- Yashiroda, H., Oguchi, T., Yasuda, Y., Toh-e, A., Kikuchi, T., 1996. Bul1, a new protein that binds to the Rsp5 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3255–3263. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.7.3255>
- Yin, Z., Pascual, C., Klionsky, D., 2016. Autophagy: Machinery and regulation. *Microb. Cell* 3, 457–465. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D.J., 2006. Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Autophagy. *J. Biol. Chem.* 281, 30299–30304. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607007200>
- Young, E.T., Zhang, C., Shokat, K.M., Parua, P.K., Braun, K.A., 2012. The AMP-activated protein kinase Snf1 regulates transcription factor binding, RNA polymerase II activity, and mRNA stability of glucose-repressed genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 287, 29021–29034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380147>
- Zhang, S., Guha, S., Volkert, F.C., 1995. The *Saccharomyces* SHP1 gene, which encodes a regulator of phosphoprotein phosphatase 1 with differential effects on glycogen metabolism, meiotic differentiation, and mitotic cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2037–2050. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.2037>
- Zhou, H., Winston, F., 2001. NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet.* 2, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-2-5>
- Zimmermann, F.K., Scheel, I., 1977. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. *Mol. Gen. Genet. MGG* 154, 75–82. <https://doi.org/10.1007/BF00265579>