

Modèles alternatifs (8) La levure modèle et outil... aussi pour la recherche thérapeutique

Stéphane Bach^{1,2}, Pierre Colas¹, Marc Blondel^{3,4}

> La levure a été utilisée de façon empirique pendant des millénaires pour la panification et la fermentation des sucres en alcool. C'est seulement à partir de 1857 que Louis Pasteur décrit le microorganisme à l'origine de ces deux activités agroalimentaires majeures. Dès lors, les souches de levure ont pu être sélectionnées et modifiées sur une base rationnelle pour optimiser leurs usages agroalimentaires, permettant ainsi l'essor de la levure comme modèle biologique eucaryote. Cette utilisation a conduit à de très nombreuses découvertes de biologie cellulaire fondamentale. Depuis une vingtaine d'années, la levure est également utilisée comme modèle et outil pour la santé humaine. Ces approches s'étendent de la production de molécules thérapeutiques à la recherche de candidats-médicaments et de sondes chimiques, en passant par la mise au point de tests diagnostiques et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette utilisation de la levure en chémobiologie fait l'objet de la présente revue. <



¹Sorbonne Université, CNRS, UMR8227, Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins, Station Biologique de Roscoff, place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France.

²Sorbonne Université, CNRS, FR2424, Plateforme de criblage KISSf, Station Biologique de Roscoff, place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France.

³Univ Brest, Inserm, EFS, UMR1078, GGB, F-29200 Brest, France.

⁴CHRU Brest, service de génétique clinique et de biologie de la reproduction, F-29200 Brest, France.

marc.blondel@univ-brest.fr

du musée du Louvre, dans laquelle des scènes de brasserie ou encore des pains fossilisés sont exposés, suffit à s'en persuader. Récemment les traces d'une brasserie de la période

Natoufienne¹ ont été découvertes en Israël, ce qui repousserait les premiers signes de l'utilisation de la levure à plus de 13 000 ans [1]. Jusqu'aux travaux de Louis Pasteur, la théorie de la génération spontanée, défendue principalement par des chimistes, prédominait. Selon cette théorie, la fermentation était un processus chimique catalytique et, même si différents naturalistes avaient observé au microscope et décrit la présence de nombreuses levures associées à la fermentation alcoolique, l'hypothèse communément admise était que ces levures n'étaient rien d'autre que des substances chimiques complexes mais inertes, agissant comme des catalyseurs pour la conversion des sucres en alcool. Si cette vision de la levure était partagée par les plus éminents chimistes de l'époque, tels que l'allemand Justus von Liebig (1803-1873), dès 1837, une hypothèse alternative, notamment défendue par Charles Cagniard-Latour (1777-1859), commençait déjà à émerger : les levures seraient en fait des cellules vivantes se multipliant pendant le processus de fermentation. Cette hypothèse reposait sur l'observation que la fermentation commençait avec l'apparition des levures, progressait en parallèle de leur multiplication et s'arrêtait en même temps que leur croissance [2]. C'est dans

En 1991, se tenait à l'Institut Pasteur de Paris le premier colloque francophone « Levure Modèle et Outil » (LMO) dont une des caractéristiques principales était de mêler, dans un même congrès, ces deux utilisations de la levure : tant comme outil que comme modèle biologique. Depuis, ces conférences sont organisées tous les deux à trois ans et se tiennent maintenant en anglais, mais toujours avec ce même fil conducteur fondé sur sa dualité d'utilisation, dont il est frappant de constater qu'elle est à l'origine même du développement du modèle levure. En effet, les premières traces de l'utilisation empirique par l'espèce humaine de la levure pour fermenter les sucres en alcool, ou comme agent de levage pour la panification, remontent à plus de 5 000 ans. Une simple visite dans la section égyptienne

Vignette (Brancolelevure - Photo © Marie-Louise Jung).

¹ Le Natoufien est une culture de transition entre l'Épipaléolithique et le Néolithique, comprise entre - 14 500 et - 11 500 ans.

ce contexte que Louis Pasteur, alors en poste à Lille où il avait été sollicité par des brasseurs locaux afin qu'il les aide à comprendre et solutionner les difficultés régulières qu'ils rencontraient dans leurs fermentations des sucres en alcool, commença à s'intéresser à cette question. En 1857, il publia la première [3] d'une série d'études qui non seulement confirmèrent que la levure correspondait effectivement à un organisme vivant, mais également servirent de fondement à la microbiologie et à la pasteurisation. Dès lors, il devint possible, sur des bases rationnelles et scientifiques, d'optimiser le processus de fermentation, par exemple en éliminant les bactéries contaminantes, mais aussi en sélectionnant et modifiant les souches de levure elles-mêmes. L'utilisation de la levure comme modèle pouvait alors commencer à se développer, sur la base même de son utilisation comme outil agroalimentaire.

À ce stade, une précision sémantique est nécessaire. En effet, la plupart des biologistes, cédant à l'abus de langage courant, nomment « levure » la levure de boulanger (ou de brasseur) *Saccharomyces cerevisiae*. En réalité, il existe de très nombreuses espèces de levures qui sont des champignons unicellulaires. Citons par exemple une autre levure très utilisée comme organisme modèle (et aussi pour la fermentation alcoolique, notamment en Afrique) : la levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* qui est ainsi parfois appelée « l'autre levure ». La levure *S. cerevisiae*, tout comme l'autre levure *S. pombe*, est un organisme unicellulaire eucaryote. Malgré sa simplicité (elle ne contient qu'environ 6 200 gènes et l'épissage alternatif y est peu développé, ce qui limite également son répertoire protéique [4]), elle n'en représente pas moins un prototype de cellule eucaryote dans lequel sont présents la plupart des grands mécanismes régissant la vie mais aussi la mort [5] des cellules des eucaryotes supérieurs. Cet aspect essentiel, combiné à la grande facilité de manipulation de cet organisme (la levure est un eucaryote aussi facile à manipuler qu'une bactérie prototype telle qu'*Escherichia coli*), a conduit à son essor comme l'un des organismes modèles eucaryotes majeurs. *S. cerevisiae* fut ainsi le premier eucaryote dont le génome a été intégralement séquencé et la divulgation de cette séquence, en 1996, a permis le développement de la plupart des techniques globales (de « -omique ») largement utilisées chez la levure, et dont la plupart des résultats sont accessibles librement². La levure a ainsi permis des découvertes et avancées majeures dans la compréhension du fonctionnement général de la cellule eucaryote, comme en atteste la présence régulière de « levuristes » dans la liste des récipiendaires des prix Nobel (en particulier de physiologie ou médecine) : citons, par exemple, Roger Kornberg, prix Nobel de chimie 2006 pour ses travaux sur les bases moléculaires de la transcription chez la levure [6] ; Paul Nurse et Lee Hartwell, co-réceptaires du prix Nobel de physiologie ou médecine 2001 pour la découverte des complexes CDK (*cyclin-dependent kinase*)/cyclines, les régulateurs centraux du cycle cellulaire eucaryote, respectivement chez *S. pombe* et *S. cerevisiae* [7] ; ou, plus récemment, Randy Schekman et Yoshinoro Ohsumi, tous deux lauréats du prix Nobel de physiologie ou médecine, en 2013 pour le premier et 2016 pour le second, pour leurs travaux séminaux, respectivement sur le trafic

vésiculaire [8] et sur les mécanismes de l'autophagie [9]. Une autre illustration spectaculaire de cette forte conservation de la levure à l'homme des mécanismes de biologie cellulaire et de leurs acteurs clés provient de la tentative de remplacer de façon systématique une partie (414) des quelques 2 000 gènes essentiels de levure, par leurs homologues humains : près de la moitié de ces 414 gènes essentiels de levure peuvent ainsi être « humanisés », et ce pourcentage est même encore plus important pour certains complexes tels que le protéasome 26S pour lequel 21 des 28 sous-unités humaines testées se sont avérées capables de remplacer leur équivalent chez la levure [10]. Suite à la publication, en 1996, du génome de la levure *S. cerevisiae*, il avait été estimé qu'au moins 30 % des gènes humains impliqués dans des maladies présentaient un homologue fonctionnel chez la levure [11]. Toutes ces observations ont rapidement conduit à considérer que la levure, notamment *S. cerevisiae*, pouvait représenter à la fois un modèle et un outil alternatifs et pertinents pour la recherche thérapeutique.

La levure : un modèle pour la recherche thérapeutique

La forte conservation des mécanismes cellulaires de la levure à l'espèce humaine, ainsi que la capacité de nombreux gènes humains à compléter la fonction de gènes de levure homologues mutés, ont rapidement été exploitées. En effet, la fonctionnalité, par rapport à l'allèle sauvage, de mutations suspectées être la cause de différentes maladies humaines peut être déterminée en réalisant des tests de complémentation dans des levures déficientes pour le gène correspondant (Figure 1). Parmi les premiers exemples, se trouve l'analyse de mutations du gène *CBS* humain codant la cystathionine bêta-synthase et responsables d'une maladie métabolique rare (l'homocystinurie, également facteur de risque pour des athéroscléroses prématurées). Cette étude a été effectuée dans une souche de levure dont le gène *CYS4*, l'homologue de *CBS*, est inactivé [12]. Dans la lignée de cette méthode, l'une des premières utilisations de la levure à des fins de diagnostic médical est le test *FASAY* (*functional analysis of separated alleles in yeast*) qui vise à déterminer le degré de fonctionnalité des très nombreux allèles mutants du gène suppresseur de tumeur *P53* [13]. Une adaptation de ce test a récemment été développée afin de déterminer la dominance éventuelle des allèles mutés de *P53* les plus couramment retrouvés dans les cancers (mutants *hotspot*), ainsi que de certaines des isoformes principales de *p53* et de deux protéines apparentées, *p63* et *p73*. Les résultats ont suggéré

² Voir notamment le site du *Saccharomyces Genome Database* (<https://www.yeastgenome.org/>).

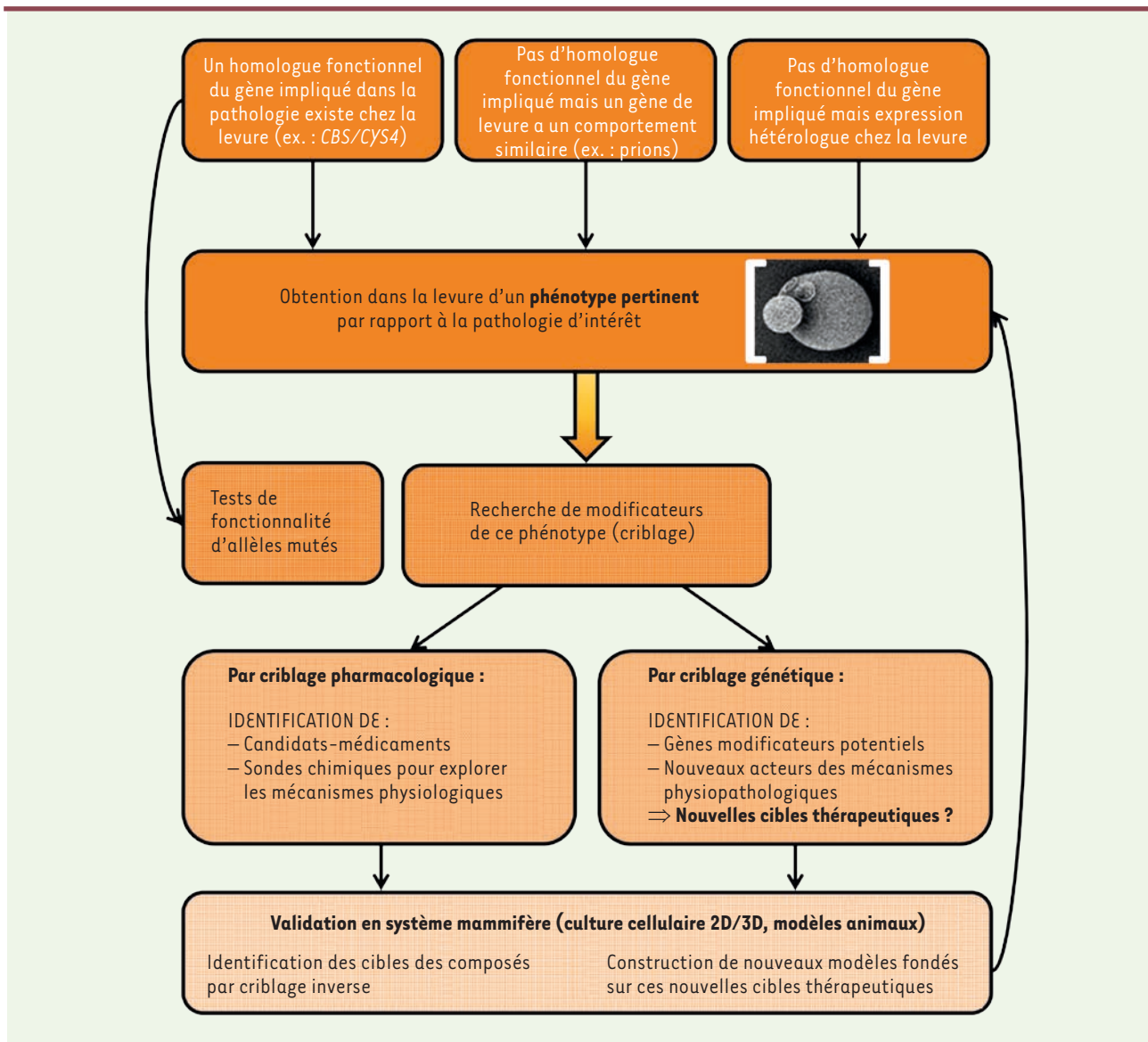


Figure 1. Vue d'ensemble de l'utilisation de la levure comme modèle de maladies humaines. Le point crucial est d'obtenir un modèle levure présentant un phénotype pertinent par rapport à la pathologie d'intérêt. Des modificateurs de ce phénotype peuvent ensuite être recherchés par des criblages tant pharmacologiques que génétiques.

que la plupart de ces mutants et certaines de ces isoformes étaient dominants, ce qui expliquerait le maintien d'hétérozygotie observé pour le locus *P53* chez de nombreux patients porteurs de ces mutations *hotspot* [14]. La levure a également servi de modèle pour des aspects inattendus de la biologie des eucaryotes supérieurs, tels que les prions ou le vieillissement.

Les prions ont, en fin de compte, été initialement découverts chez la levure, par des expériences de génétique classique réalisées dans les années 1960-1970 (donc longtemps avant la connaissance de la séquence des gènes et des protéines concernées, et surtout bien avant la définition même du concept prion de protéine infectieuse !), et astucieusement interprétées [15, 16]. Les résultats de ces expériences

ont ensuite été revisités par Reed Wickner qui, peu de temps après l'émergence du concept prion, suivant une intuition brillante, a démontré que ces éléments « bizarres » d'hérédité cytoplasmique non mendélienne chez la levure correspondaient en fait à des prions [17]. Un nouveau champ d'étude extrêmement actif fondé sur la levure pour étudier la biologie des prions et élucider ses mystères, venait ainsi d'être créé. Les apports majeurs à mettre au crédit de ces études ont été la découverte du rôle crucial de chaperons de protéines dans le maintien et la propagation des prions [18], ou encore parmi les premières démonstrations

formelles de l'hypothèse « protéine seule » à la base du modèle prion [19, 20]. S'agissant du vieillissement, il a longtemps été perçu comme spécifique des organismes pluricellulaires avant qu'il ne soit démontré que ce phénomène concernait également les microorganismes unicellulaires, comme les bactéries ou la levure *S. cerevisiae*, cette dernière présentant clairement des éléments génétiques et physiologiques de contrôle du vieillissement communs avec les eucaryotes supérieurs, tels que l'accumulation de cercles d'ADN ribosomique ou l'effet anti-vieillesse de la restriction calorique [21].

Dans la lignée des tests d'analyse fonctionnelle, des modèles et des outils chémobiologiques fondés sur l'utilisation de la levure (principalement *S. cerevisiae*, mais aussi *S. pombe*) et permettant des approches thérapeutiques innovantes, voient régulièrement le jour depuis une vingtaine d'années. Ces approches reposent le plus souvent sur la mise au point d'un modèle levure présentant un phénotype pertinent pour une pathologie considérée (Figure 1). Pour ce type de modélisation, différents cas de figure sont envisageables : du plus simple et direct (existence d'un homologue fonctionnel), au plus artificiel (expression hétérologue d'un gène humain ou de pathogène sans homologue chez la levure), en passant par des situations intermédiaires (dans lesquelles un gène de levure sert de prototype). Ce modèle peut alors servir pour différents criblages phénotypiques afin d'identifier des modificateurs capables de supprimer ou d'exacerber le phénotype préalablement obtenu. Ces modificateurs peuvent être n'importe quels objets biologiques (gènes, anticorps, etc.) ou chimiques (petites molécules, oligonucléotides, etc.) qui pourront représenter des pistes pour développer des candidats-médicaments et/ou des outils originaux pour sonder des mécanismes biologiques et physiopathologiques nouveaux ou mal connus. Dans le cas de criblages pharmacologiques, puisqu'il s'agit de criblages phénotypiques, des criblages « inverses » nécessiteront d'être réalisés, afin d'identifier les cibles cellulaires des composés actifs isolés. Ils permettront non seulement d'appréhender le mécanisme d'action de la « touche » (ou *hit* en anglais) obtenue, mais aussi ses effets secondaires potentiels. Il existe de nombreuses façons de réaliser ces criblages inverses, notamment par des méthodes biochimiques, telles que la chromatographie d'affinité sur drogues immobilisées [22, 23]. Des méthodes génétiques utilisant la levure elle-même, telles que les cribles d'haplo-insuffisance³, de surexpression ou encore de létalité synthétique⁴ (pour revue voir [24]), ainsi que le triple-hybride (voir plus loin), ont également été développées (Figure 2). Ces méthodes sont toutes automatisables et exploitent la puissance génétique du modèle levure. Ainsi, outre le fait qu'elles offrent la possibilité d'identifier d'éventuels candidats-médicaments, les approches de chémobiologie qui utilisent la levure peuvent également permettre la découverte de leurs cibles cellulaires, et donc potentiellement définir de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les maladies correspondantes.

³ Situation dans laquelle le produit d'un seul allèle, bien qu'actif, est synthétisé en quantité insuffisante pour permettre le fonctionnement optimal de la cellule.

⁴ La létalité synthétique est la mort cellulaire due à la déficience simultanée de 2 gènes.

Maladies à prions

Parmi les tout premiers exemples de criblages pharmacologiques à visée thérapeutique pour des maladies humaines s'appuyant sur la levure, se trouve une méthode de criblage de molécules antiprion [25, 26]. L'hypothèse à l'origine de cette approche était que les mécanismes de « prionisation » pouvaient être conservés de la levure à l'homme.

Ce pari s'est avéré validé puisque les petites molécules actives contre les prions de levure [*PSI*⁺] et [*URE2*] [61] (→) dont cette méthode a permis l'identification, se sont par la suite révélées actives contre le prion de mammifère *in cellulo* [25] mais également *in vivo* dans un modèle murin de maladies à prion [27, 28]. Ainsi, non seulement ce modèle fondé sur les deux prions les plus étudiés de la levure permettait d'isoler des molécules actives contre le prion de mammifère, mais il apportait en plus la preuve qu'au moins certains des mécanismes de « prionisation » étaient conservés de la levure à l'homme. Ces mécanismes conservés ont ensuite été identifiés par une approche de criblage inverse qui a montré que le domaine V du grand ARN ribosomique (ARNr 25S chez la levure, 28S chez l'homme) possédait une activité chaperon de protéine, ciblée par les molécules antiprions isolées chez la levure, et qui est impliquée dans le maintien et la propagation des prions, au moins chez la levure [23, 29].

(→) Voir la Synthèse de Cécile Voisset et Marc Blondel, *m/s* n° 12, décembre 2014, page 1161

Autres maladies neurologiques

Un certain nombre de modèles levure ont été développés pour d'autres maladies neurodégénératives, telles que les maladies de Parkinson [30] ou de Huntington [31]. Dans ces deux exemples, respectivement l' α -synucléine et la huntingtine mutée, deux protéines humaines dépourvues d'homologues chez *S. cerevisiae*, ont été surexprimées chez la levure dans laquelle elles s'agrègent et induisent une toxicité qui emprunte des mécanismes similaires à celle observée dans les neurones de patients. Ces modèles ont, là encore, permis d'identifier des molécules actives dans des modèles animaux pour ces pathologies chroniques, validant une fois de plus ces approches de chémobiologie utilisant la levure. Ils ont également permis de découvrir de nouvelles voies, et donc de nouvelles cibles thérapeutiques, le plus souvent insoupçonnées, pour combattre ces maladies pour lesquelles peu ou pas de traitements efficaces n'ont encore été découverts. Ainsi, un criblage génétique réalisé en utilisant un modèle levure de maladie de Huntington a identifié la kynurénine 2,3-monooxygénase, une enzyme conservée de la levure

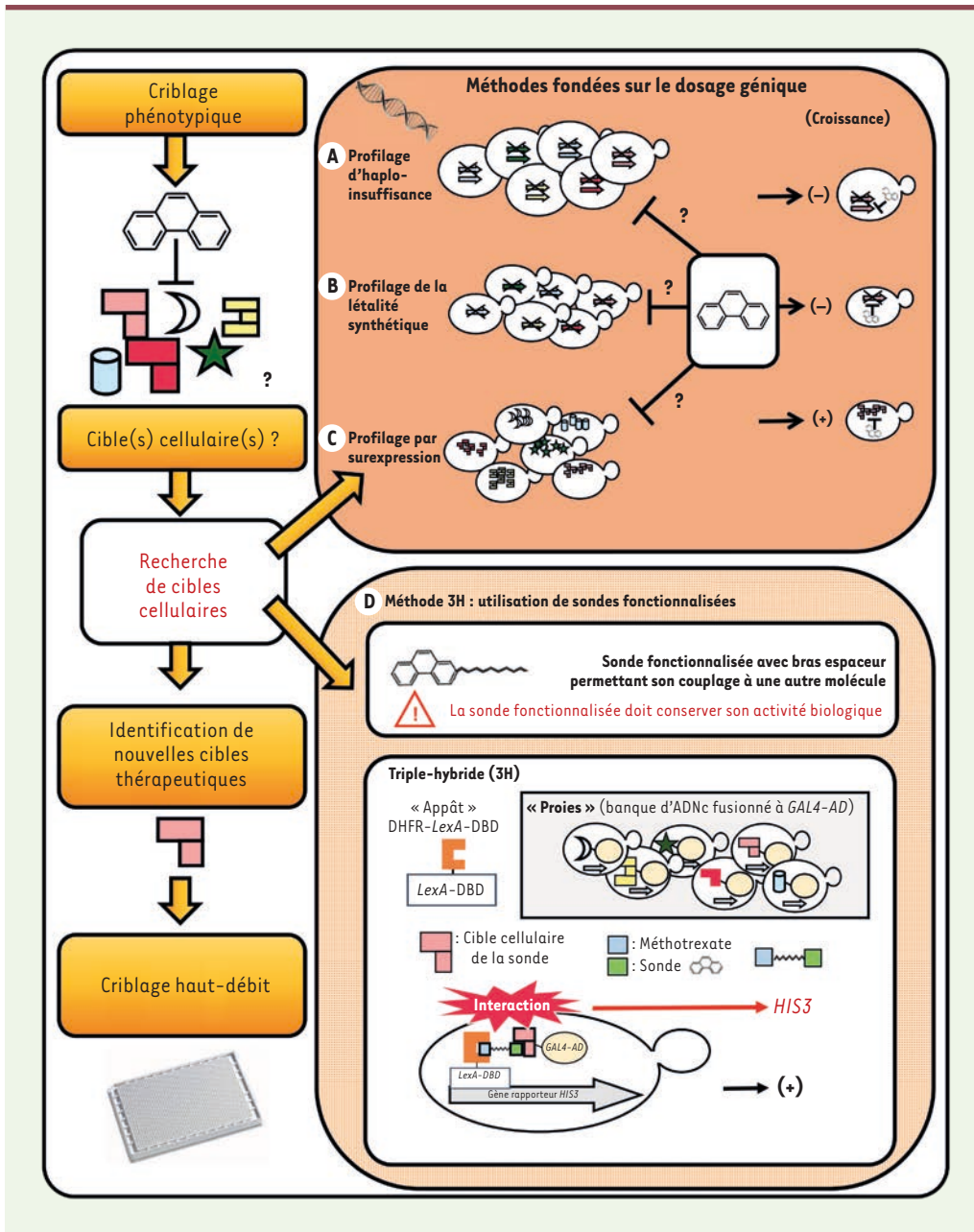


Figure 2. Méthodes fondées sur la levure d'identification des cibles de composés (sondes) isolés dans des criblages pharmacologiques phénotypiques. Quatre méthodes génétiques de profilage de composés actifs sont présentées dans cette figure. **A.** Profilage de souches diploïdes haplo-insuffisantes chacune pour un des ~ 2 000 gènes de levure qui sont essentiels (donc pour lesquelles le dosage génétique pour le gène considéré est d'environ 50 %). Cette méthode permet de repérer les gènes essentiels dont l'haplo-insuffisance conduit à une hypersensibilité au composé étudié, donc codant probablement des cibles de ce dernier. **B.** Profilage de souches haploïdes chacune délétée d'un des ~ 4 000 gènes de levure non-essentiels (donc pour lesquelles le dosage génétique pour le gène considéré est de 0 %). Cette méthode permet l'identification de tous les gènes non-

essentiels dont l'inactivation totale conduit à une sensibilité accrue au composé d'intérêt, donc potentiellement impliqués dans la résistance à ce dernier. **C.** Profilage de souches de levure surexprimant chacune un des ~ 6 000 gènes de levure (donc pour lesquelles le dosage génétique pour le gène considéré est >100 %). Cette méthode permet d'identifier tous les gènes dont la surexpression confère une résistance au composé étudié et donc codant des cibles potentielles de ce dernier. Il est important de noter que ces trois méthodes sont fondées sur la toxicité générale de la molécule considérée pour la levure (puisque le paramètre mesuré est l'effet du composé sur la croissance des souches de levures), et donc sur l'inférence que son effet toxique implique les mêmes cibles cellulaires que sa capacité à modifier le phénotype pathologique, ce qui n'est pas nécessairement le cas. **D.** L'approche triple-hybride (3H) est fondée sur la création d'une chimère entre la sonde étudiée et une autre petite molécule dont la cible est connue (par exemple l'interaction méthotrexate/dihydrofolate réductase, DHFR). Une étude structure-activité préalable est nécessaire afin de contrôler si la sonde fonctionnalisée est toujours biologiquement active. L'approche triple-hybride est fondée sur l'utilisation de banques de levure exprimant des fusions protéiques entre un domaine d'activation de la transcription (AD) et les protéines cibles à tester d'une part, et, d'autre part, la fusion entre la DHFR et un domaine de liaison à l'ADN (DBD) d'un facteur de transcription. Les levures sont ensuite traitées avec la sonde fonctionnalisée. Seules les levures exprimant la cible de la sonde pourront se développer sur un milieu dépourvu d'histidine (+), dans cet exemple de gène rapporteur.

à l'homme, dont l'inactivation contrecarre la toxicité de la huntingtine mutée, tant chez la levure que dans des cellules humaines ou dans des modèles animaux [31]. Plus récemment, un modèle levure pour le retard mental lié à la trisomie 21 a été créé. Ce modèle est fondé sur la surexpression du gène *CBS*, qui fait partie, avec *DYRK1a* (*dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*)⁵, des principaux gènes du chromosome 21 dont la surexpression, du fait de la triplification de ce chromosome, serait responsable du déficit cognitif observé chez les patients trisomiques. Il a permis d'identifier le disulfirame, un principe actif médicamenteux déjà administré depuis des décennies pour le traitement de l'alcoolisme, qui s'est avéré capable de supprimer le phénotype lié à la surexpression de *CBS* chez la levure, mais également les troubles cognitifs de souris modèles pour la trisomie 21 [32], faisant de ce composé un candidat à un repositionnement thérapeutique pour améliorer les troubles cognitifs des patients trisomiques.

Maladies métaboliques

Des modèles levures pour différentes maladies métaboliques d'origine génétique, en particulier mitochondriales, ont également été développés avec succès chez *S. cerevisiae* mais aussi chez *S. pombe* [33-35]. La levure *S. cerevisiae* s'avère en effet particulièrement pertinente pour modéliser les maladies mitochondriales liées à des mutations dans l'ADN de cet organite, en raison de la possibilité de réaliser de la mutagenèse dirigée sur le génome mitochondrial du champignon [36]. Des approches de criblage inverse ont, là encore, permis d'identifier les cibles de certaines molécules potentiellement actives contre ces maladies [37].

Infections virales et parasitaires

La levure a également été très utilisée pour explorer le monde des virus et leur impact sur les espèces animales et végétales (pour revue, voir [38]), en particulier dans le domaine des cancers viro-induits, notamment liés à l'oncovirus d'Epstein-Barr (EBV) (pour revue, voir [39]). Ainsi a été développé un modèle levure reproduisant le mécanisme qui permet à l'EBV d'échapper au système immunitaire [40, 41]. Ce modèle a non seulement permis d'isoler, grâce à un criblage pharmacologique, des molécules candidates permettant au système immunitaire de cibler les cancers liés à ce virus [41], mais également, grâce à un criblage génétique, des gènes de la cellule infectée impliqués dans la furtivité d'EBV au système immunitaire [42]. De la sorte, a été identifiée la nucléoline, une protéine humaine très conservée chez la levure, qui représente une nouvelle cible moléculaire potentielle pour le traitement des cancers liés à l'EBV. Cette cible a elle-même permis d'isoler de nouvelles molécules actives [42, 43].

Un autre type d'approche très fructueuse fait appel à l'expression de cibles thérapeutiques (humaines ou parasitaires par exemple) dans une souche de levure délétée du gène homologue et complétée par le (ou les) gène(s) hétérologue(s). Citons pour exemple l'utilisation d'une souche de levure délétée de son gène *AURI* (*aureobasidin resistance*) codant l'inositol phosphorylcéramide synthase (IPS) et complétée

par l'expression du gène homologue *LmjIPBCS* des parasites du genre *Leishmania*, responsables de la leishmaniose, ou, comme contrôle, par le gène *AURI* lui-même. Des composés affectant spécifiquement l'enzyme parasitaire, donc *a priori* moins susceptibles de présenter des effets secondaires chez les patients, ont ainsi été isolés [44]. Une telle approche avait déjà été utilisée pour rechercher des inhibiteurs affectant spécifiquement l'une ou l'autre des kinases dépendant des cyclines, CDK1 ou CDK2, humaines, en tirant profit du fait que chacune d'entre elle est capable de compléter l'absence de croissance d'une souche de levure délétée pour le gène *CDC28* qui code la principale CDK de la levure *S. cerevisiae* [45]. Notons que de telles approches fondées sur la complémentation d'un mutant de levure par l'un ou l'autre gène homologue de parasites ou humain peuvent être multiplexées, de façon à identifier, en un seul criblage, des molécules spécifiquement actives sur la cible d'intérêt, tout en ne présentant pas (ou peu) d'activité sur un gène proche dont l'inactivation pourrait induire des effets secondaires qui limiteraient l'application thérapeutique de tels composés.

Tous ces exemples ne représentent qu'une fraction minime de toutes les utilisations réalisées ou possibles de la levure comme modèle pour des maladies humaines. Ils illustrent néanmoins la polyvalence de tels modèles et leur intérêt, dès lors qu'ils présentent un phénotype pertinent par rapport à la pathologie étudiée : le fait de pouvoir réaliser, le plus souvent en parallèle, des criblages pharmacologiques et génétiques qui se nourrissent mutuellement. Il faut toutefois garder en tête les limites de la levure qui ne représente qu'un modèle eucaryote simplifié (notamment du fait de son unicellularité). Il est ainsi nécessaire de valider tous les modificateurs de phénotypes identifiés dans des systèmes eucaryotes supérieurs, tels que des cultures en deux ou trois dimensions de cellules de mammifères, ou dans des modèles animaux, lorsque ceux-ci existent. Enfin, la possibilité de pouvoir réaliser, relativement aisément, des criblages inverses (notamment par des approches génétiques utilisant la levure) pour identifier les cibles des molécules actives, représente un autre argument fort en faveur d'approches de chimobiologie intégrée fondées sur la levure (Figure 2).

La levure : un outil pour la recherche thérapeutique

Si la levure offre des modèles pertinents pour de nombreuses pathologies humaines, elle est également très utilisée en tant qu'outil au service de la recherche thérapeutique. Elle est couramment exploitée pour la

⁵ Qui code une kinase impliquée dans le développement du système nerveux.

production de molécules d'intérêt, que ce soient des protéines recombinantes ou différentes molécules d'intérêt prophylactique ou thérapeutique, telles que des vaccins, l'hormone de croissance humaine ou encore l'hydrocortisone. La production de cette dernière molécule d'intérêt majeur pour l'industrie pharmaceutique mais très compliquée à synthétiser, dans une souche de levure *S. cerevisiae* multi-modifiée génétiquement et à partir d'un substrat peu onéreux (le glucose ou l'éthanol), représente un magnifique et spectaculaire exemple de l'incroyable polyvalence de la levure [46]. Dans le domaine des vaccins, non seulement la levure est utilisée depuis longtemps pour la production de protéines antigéniques, mais elle est également, depuis peu, utilisée comme adjuvant du fait de la forte immunogénicité de certains sucres de sa paroi, absents chez les mammifères. Certaines approches très récentes visent ainsi à combiner les deux avantages de la levure (polyvalence pour la production de protéines recombinantes antigéniques et immunogénicité inhérente de sa paroi) en l'utilisant directement (sous forme vivante ou inactivée par chauffage) comme vaccin pour un usage, pour le moment, uniquement vétérinaire (pour revue, voir [47]). Toutes ces approches dans lesquelles la levure est utilisée comme « usine » de production de molécules thérapeutiques sont d'autant plus facilitées que la levure appartient à la catégorie des organismes inoffensifs, dits GRAS (*generally recognized as safe*), un concept créé en 1958 par la FDA (*food and drug administration*) américaine [48]. Enfin, notons que l'utilisation de la levure en tant qu'outil a régulièrement été enrichie par les découvertes fondamentales obtenues grâce à son utilisation en tant que modèle. C'est, par exemple, le cas pour la production de protéines recombinantes hétérologues dont le rendement peut être grandement amélioré par des mutations altérant le ratio entre les deux sous-unités du ribosome [49].

La levure : un outil pour la recherche sur les interactions protéine-protéine

Terminons par l'un des principaux apports de la levure en tant qu'outil pour l'étude des interactions protéine-protéine (IPP), notamment grâce aux méthodes dites de double-hybride ou de bioluminescence. Les fondements de la méthode double-hybride ont été établis en 1989 par la démonstration qu'une IPP pouvait être détectée en co-exprimant dans la levure deux protéines chimériques (ou hybrides), obtenues en fusionnant aux deux partenaires participant à l'interaction, des modules impliqués dans la transcription génique : un domaine de liaison à l'ADN, pour « l'appât », et un domaine activateur de transcription, pour « la proie ». L'interaction entre les deux partenaires protéiques reconstitue alors un facteur de transcription actif, capable de transcrire un gène rapporteur conférant à la levure un phénotype facilement détectable [50]. La méthode double-hybride a rapidement connu un succès et des évolutions considérables. Elle représente encore aujourd'hui une approche de premier choix pour découvrir et caractériser des interactions protéiques. Il n'est pas exagéré de considérer que le double-hybride compte parmi les méthodes ayant produit le plus fort impact sur la biologie de l'ère génomique

et post-génomique [51]. La méthode double-hybride transcriptionnelle et ses nombreuses évolutions offrent de nombreuses applications à la recherche thérapeutique (Figure 3) (pour revue, voir [52]). La découverte facilitée de partenaires d'interaction de protéines, dont le dysfonctionnement provoque des pathologies, permet notamment d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, qu'il s'agisse du partenaire de l'interaction ou de l'interaction elle-même. Des ligands protéiques combinatoires (tels que des aptamères peptidiques), sélectionnés par double-hybride pour leur capacité à reconnaître spécifiquement une protéine cible donnée, représentent des outils de choix permettant de valider des cibles thérapeutiques. Ils introduisent en effet des perturbations similaires à celles produites par des petites molécules thérapeutiques, contrairement aux approches de génétique inverse plus communément utilisées. Ces molécules combinatoires peuvent également guider la découverte de petites molécules bioactives [53].

De nombreuses variantes de la méthode double-hybride transcriptionnelle ont permis le développement d'essais de criblage à haut débit dans le but de découvrir des petites molécules inhibitrices d'IPP. Ces variantes portent essentiellement sur la mise en œuvre de gènes rapporteurs différents, codant, par exemple, des luciférases, qui permettent de suivre les levures dans lesquelles a eu lieu l'interaction, ou des protéines toxiques, ce qui permet une sélection positive des inhibiteurs d'IPP (pour revue, voir [52]). Des méthodes de type « triple-hybride » ont été développées afin d'identifier les cibles de petites molécules bioactives (voir la méthode de criblage inverse présentée sur la Figure 2). Le principe consiste à coupler de façon covalente la molécule d'intérêt à une autre molécule capable de reconnaître une protéine « appât ». Des banques d'ADN complémentaires, exprimés comme « proies », sont alors criblées afin d'identifier les cibles potentielles du composé exposé par l'« appât » [52].

L'approche double-hybride s'avère également très puissante pour caractériser des formes mutantes de protéines associées à des pathologies humaines. Ainsi a récemment été développé l'« *edgotypage* », une approche qui consiste à déterminer la capacité d'une protéine mutée à interagir, ou non, avec l'ensemble des partenaires d'interaction connus pour la forme sauvage de la protéine. La pertinence de cette approche repose sur le fait que : 1) plus de la moitié des mutations responsables de pathologies mendéliennes sont des mutations faux-sens (provoquant des substitutions d'acides aminés), et une grande proportion d'autres types de mutations peuvent permettre l'expression de formes protéiques tronquées ;

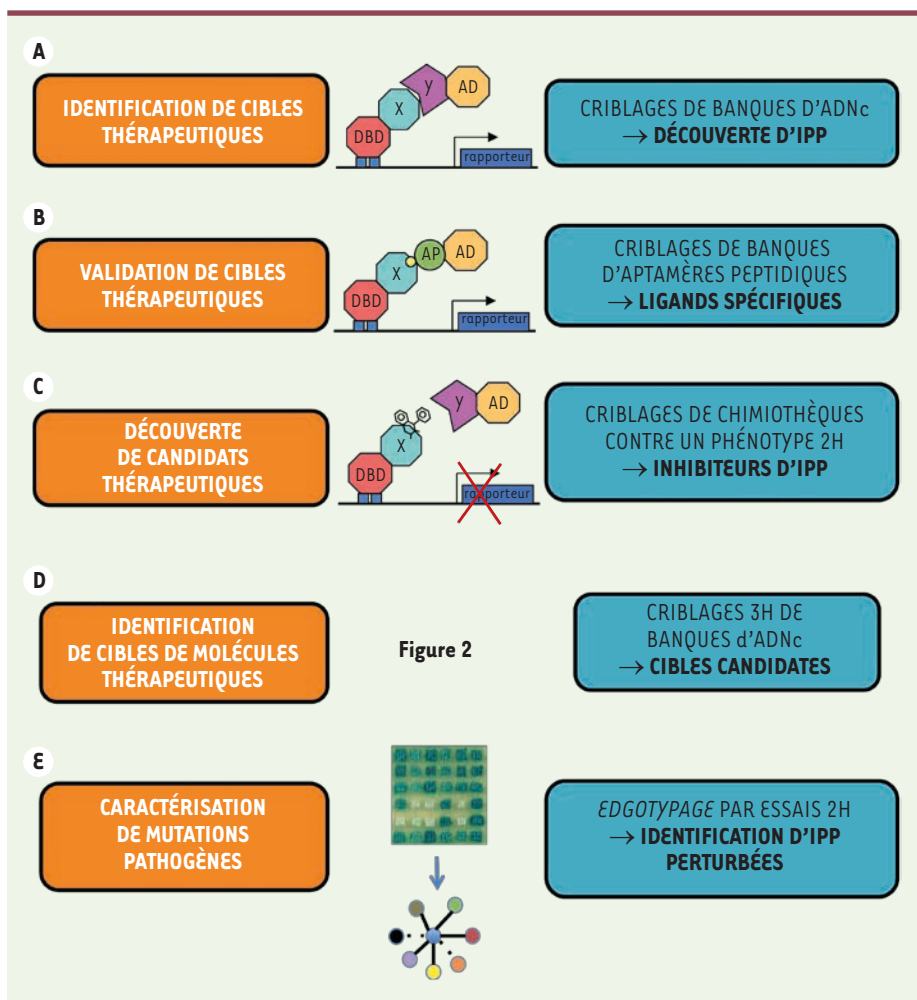


Figure 3. Le double-hybride (2H) et ses évolutions au service de la recherche thérapeutique. **A.** Représentation schématique du 2H classique qui permet de découvrir de nouvelles interactions protéine-protéine (IPP) par criblages systématiques de banques d'ADN complémentaire (ADNc) (DBD : domaine de liaison à l'ADN ; AD : domaine d'activation de la transcription). **B.** Le 2H permet d'identifier des aptamères peptidiques (AP) interagissant spécifiquement avec une protéine d'intérêt, qui permettent parfois de la valider en tant que cible thérapeutique. **C.** Le 2H permet également de rechercher des inhibiteurs d'IPP sur la base de leur capacité à empêcher la formation du complexe 2H. **D.** Le triple-hybride (3H) permet d'identifier des cibles potentielles d'un composé actif. **E.** L'*edgotypage*, qui est souvent basé sur le 2H, permet, au sein d'un réseau d'IPP, l'identification des interactions (*edges*) spécifiquement affectées par des mutations pathogènes.

2) différentes mutations affectant un gène donné peuvent produire des effets pathologiques très différents. Une étude magistrale faisant appel à la méthode double-hybride a été menée sur près de 3 000 formes mutantes faux-sens concernant plus de 1 100 gènes associés à des pathologies mendéliennes variées. Les deux tiers de ces mutations ont présenté un *edgotype* perturbé (c'est-à-dire présentant des altérations d'interaction avec les partenaires de la forme sauvage), de façon seulement partielle pour la moitié d'entre elles [54]. De telles analyses permettent ainsi de mieux comprendre les effets biologiques de certaines mutations, ce qui pourrait conduire à une meilleure prise en charge des patients concernés.

L'utilisation du BRET (transfert d'énergie de bioluminescence par résonance) a également été développée chez la levure pour y étudier des IPP. Le BRET dérive des méthodes fondées sur le transfert de fluorescence (appelées FRET) initiées par Theodor Förster en 1946. Il s'agit d'un phénomène de bioluminescence naturelle, telle que celle produite par la pensée de mer (*Renilla reniformis*)⁶. L'identification puis le clonage des acteurs moléculaires à l'origine de cette luminescence (tels que

l'enzyme donneuse d'énergie, Renilla Luciférase, RLuc, et la *Green Fluorescent Protein*, GFP) ont permis d'ouvrir le champ d'application du BRET à l'étude des IPP. Dans cette méthode, l'utilisation d'une enzyme « donneuse » d'énergie qui est transférée par résonance à un fluorophore « accepteur » spatialement proche (moins de 10 nm), évite les conséquences néfastes de l'excitation du donneur qui est utilisée dans les méthodes FRET. Le donneur et l'accepteur sont fusionnés aux deux protéines d'intérêt dont l'interaction peut ainsi être détectée. C'est en 1999 que ce potentiel a, pour la première fois, été exploité pour l'étude de protéines clés du rythme circadien chez la cyanobactérie *Synechococcus* sp. (pour revue voir [55]). Le BRET sera mis en œuvre l'année suivante dans des cellules de mammifères pour l'étude de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) [55]. Le BRET a ensuite été employé pour mettre en évidence des molécules d'intérêt thérapeutique par criblage (par exemples des ligands de récepteurs de neuropeptides Y) [55]. C'est en 2006 que le BRET est utilisé pour la première fois chez la levure pour caractériser l'oligo-

⁶ La bioluminescence est la production active de lumière par des organismes vivants. La luciférase est à l'origine de la bioluminescence suite à l'activation d'un ensemble de processus biochimiques.

mérisation du RCPG de la phéromone α [56]. En tenant compte des avantages qu'offre le champignon, le BRET a ensuite été utilisé pour le criblage d'inhibiteurs d'IPP [57]. C'est principalement l'utilisation d'une levure mutante *erg6* (*Delta(24)-sterol C-methyltransferase*), rendue hyper-perméable par altération de sa membrane due à un défaut d'ergostérol, et le criblage effectué sur des complexes protéiques non préformés (la molécule à tester est mise en contact avec la chimère protéique « acceptrice » avant l'induction de l'expression de la chimère « donneuse ») qui ont contribué au succès de cette approche. Le suivi de l'activité luciférase permet aussi d'évaluer la cytotoxicité des molécules analysées. Plusieurs criblages ont été mis en œuvre afin d'identifier des inhibiteurs de l'interaction CDK5/p25, une protéine kinase impliquée notamment dans divers troubles neurodégénératifs [58, 59] et de nouveaux antibactériens, inhibiteurs de l'interaction entre la sous-unité β^3 et le facteur d'initiation σ^{70} de l'ARN polymérase bactérienne [60]. L'utilisation de nouveaux substrats de luciférase, de la NanoLuc® et de nouveaux couples donneur/ accepteur (mutants de la luciférase et de l'accepteur, tels que la mVenus ou encore la mTurquoise) permettront d'augmenter la sensibilité et l'usage du BRET dans la levure pour y étudier de nouvelles IPP [57].

Conclusions

La levure est utilisée tant comme modèle que comme outil depuis de très nombreuses années. Cette grande polyvalence a permis de multiples développements au service de la recherche thérapeutique. Ainsi, longtemps après sa découverte et sa description par Louis Pasteur, ces deux facettes de l'utilisation de la levure continuent de se fertiliser mutuellement. La levure représente aujourd'hui un modèle précieux pour la chémiobiologie, en particulier pour les maladies rares et/ou pour lesquelles aucun modèle mammifère n'existe encore. ♦

SUMMARY

Budding yeast, a model and a tool... also for biomedical research

Yeast has been used for thousands of years as a leavening agent and for alcoholic fermentation, but it is only in 1857 that Louis Pasteur described the microorganism at the basis of these two tremendously important economic activities. From there, yeast strains could be selected and modified on a rational basis to optimize these uses, thereby also allowing the development of yeast as a popular eukaryotic model system. This model led to a cornucopia of seminal discoveries in cell biology. For about two decades yeast has also been used as a model and a tool for therapeutic research, from the production of therapeutics and the development of diagnostic tools to the identification of new therapeutic targets, drug candidates and chemical probes. These diverse chemobiological applications of yeast are presented and discussed in the present review article. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

- Liu L, Wang J, Rosenberg D, et al. Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: investigating natufian ritual feasting. *J Archaeol Sci Rep* 2018 ; 21 : 783-93.
- Cagniard-Latour C. Mémoire sur la fermentation vineuse. *Ann Chimie Physique* 1838 ; 68 : 206-22.
- Pasteur L. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *CR Acad Sci* 1857 ; 45 : 1032-6.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, et al. Life with 6000 genes. *Science* 1996 ; 274 : 63-7.
- Carmona-Gutierrez D, Bauer MA, Zimmermann A, et al. Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. *Microb Cell* 2018 ; 5 : 4-31.
- Kornberg R. The molecular basis of eukaryotic transcription (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2007 ; 46 : 6956-65.
- Nurse PM. Nobel lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Biosci Rep* 2002 ; 22 : 487-99.
- Schekman R. Charting the secretory pathway in a simple eukaryote. *Mol Biol Cell* 2010 ; 21 : 3781-4.
- Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res* 2014 ; 24 : 9-23.
- Kachroo AH, Laurent JM, Yellman CM, et al. Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science* 2015 ; 348 : 921-5.
- Bassett DE Jr, Boguski MS, Hieter P. Yeast genes and human disease. *Nature* 1996 ; 379 : 589-90.
- Kruger WD, Cox DR. A yeast assay for functional detection of mutations in the human cystathionine beta-synthase gene. *Hum Mol Genet* 1995 ; 4 : 1155-61.
- Ishioaka C, Frebourg T, Yan YX, et al. Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet* 1993 ; 5 : 124-9.
- Billant O, Leon A, Le Guellec S, et al. The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73: a family affair. *Oncotarget* 2016 ; 7 : 69549-64.
- Cox BS, Tuite MF, McLaughlin CS. The psi factor of yeast: a problem in inheritance. *Yeast* 1988 ; 4 : 159-78.
- Lacroute F. Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *J Bacteriol* 1971 ; 106 : 519-22.
- Wickner RB. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1994 ; 264 : 566-9.
- Wickner RB, Shewmaker FP, Bateman DA, et al. Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2015 ; 79 : 1-17.
- King CY, Diaz-Avalos R. Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 2004 ; 428 : 319-23.
- Tanaka M, Chien P, Naber N, et al. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 2004 ; 428 : 323-8.
- Longo VD, Shadel GS, Kaerberlein M, Kennedy B. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab* 2012 ; 16 : 18-31.
- Guiffant D, Tribouillard D, Gug F, et al. Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnol J* 2007 ; 2 : 68-75.
- Tribouillard-Tanvier D, Dos Reis S, Gug F, et al. Protein folding activity of ribosomal RNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs. *PLoS One* 2008 ; 3 : e2174.
- Hoon S, St Onge RP, Giaever G, Nislow C. Yeast chemical genomics and drug discovery: an update. *Trends Pharmacol Sci* 2008 ; 29 : 499-504.
- Bach S, Talarek N, Andrieu T, et al. Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 1075-81.
- Bach S, Tribouillard D, Talarek N, et al. A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods* 2006 ; 39 : 72-7.
- Oumata N, Nguyen PH, Beringue V, et al. The toll-like receptor agonist imiquimod is active against prions. *PLoS One* 2013 ; 8 : e72112.
- Tribouillard-Tanvier D, Beringue V, Desban N, et al. Antihypertensive drug guanabenz is active in vivo against both yeast and mammalian prions. *PLoS One* 2008 ; 3 : e1981.
- Blondel M, Soubigou F, Evrard J, et al. Protein folding activity of the ribosome is involved in yeast prion propagation. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 32117.
- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, et al. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 2006 ; 313 : 324-8.

RÉFÉRENCES

31. Giorgini F, Guidetti P, Nguyen Q, et al. A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 526-31.
32. Marechal D, Brault V, Leon A, et al. Cbs overdosage is necessary and sufficient to induce cognitive phenotypes in mouse models of Down syndrome and interacts genetically with Dyrk1a. *Hum Mol Genet* 2019 ; 28 : 1561-77.
33. Couplan E, Aiyar RS, Kucharczyk R, et al. A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 11989-94.
34. Delerue T, Tribouillard-Tanvier D, Daloyau M, et al. A yeast-based screening assay identifies repurposed drugs that suppress mitochondrial fusion and mtDNA maintenance defects. *Dis Model Mech* 2019 ; 12. pii: dmm036558. doi: 10.1242/dmm.036558.
35. Lasserre JP, Dautant A, Aiyar RS, et al. Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech* 2015 ; 8 : 509-26.
36. Bonnefoy N, Fox TD. Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Cell Biol* 2001 ; 65 : 381-96.
37. Aiyar RS, Bohnert M, Duvezin-Caubet S, et al. Mitochondrial protein sorting as a therapeutic target for ATP synthase disorders. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 5585.
38. Zhao RY. Yeast for virus research. *Microb Cell* 2017 ; 4 : 311-30.
39. Lista MJ, Voisset C, Contesse MA, et al. The long-lasting love affair between the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the Epstein-Barr virus. *Biotechnol J* 2015 ; 10 : 1670-81.
40. Lista MJ, Martins RP, Angrand G, et al. A yeast model for the mechanism of the Epstein-Barr virus immune evasion identifies a new therapeutic target to interfere with the virus stealthiness. *Microb Cell* 2017 ; 4 : 305-7.
41. Voisset C, Daskalogianni C, Contesse MA, et al. A yeast-based assay identifies drugs that interfere with immune evasion of the Epstein-Barr virus. *Dis Model Mech* 2014 ; 7 : 435-44.
42. Lista MJ, Martins RP, Billant O, et al. Nucleolin directly mediates Epstein-Barr virus immune evasion through binding to G-quadruplexes of EBNA1 mRNA. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 16043.
43. Reznichenko O, Quillevere A, Martins RP, et al. Novel cationic bis(acylhydrazones) as modulators of Epstein-Barr virus immune evasion acting through disruption of interaction between nucleolin and G-quadruplexes of EBNA1 mRNA. *Eur J Med Chem* 2019 ; 178 : 13-29.
44. Norcliffe JL, Mina JG, Alvarez E, et al. Identifying inhibitors of the Leishmania inositol phosphorylceramide synthase with antiprotozoal activity using a yeast-based assay and ultra-high throughput screening platform. *Sci Rep* 2018 ; 8 : 3938.
45. Mayi T, Facca C, Anne S, et al. Yeast as a model system to screen purine derivatives against human CDK1 and CDK2 kinases. *J Biotechnol* 2015 ; 195 : 30-6.
46. Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 143-9.
47. Angrand G, Quillevere A, Loaec N, et al. Sneaking out for happy hour: yeast-based approaches to explore and modulate immune response and immune evasion. *Genes (Basel)* 2019 ; 10. pii: E667. doi: 10.3390/genes10090667.
48. Sewalt V, Shanahan S, Gregg L, et al. The generally recognized as safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Industrial Biotechnology* 2016 ; 12 : 295-302.
49. Bonander N, Darby RA, Grgic L, et al. Altering the ribosomal subunit ratio in yeast maximizes recombinant protein yield. *Microb Cell Fact* 2009 ; 8 : 10. doi: 10.1186/1475-2859-8-10.
50. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989 ; 340 : 245-6.
51. Vidal M, Fields S. The yeast two-hybrid assay: still finding connections after 25 years. *Nat Methods* 2014 ; 11 : 1203-6.
52. Hamdi A, Colas P. Yeast two-hybrid methods and their applications in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2012 ; 33 : 109-18.
53. Baines IC, Colas P. Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug Discov Today* 2006 ; 11 : 334-41.
54. Sahni N, Yi S, Taipale M, et al. Widespread macromolecular interaction perturbations in human genetic disorders. *Cell* 2015 ; 161 : 647-60.
55. Bacart J, Corbel C, Jockers R, et al. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* 2008 ; 3 : 311-24.
56. Gehret AU, Bajaj A, Naider F, Dumont ME. Oligomerization of the yeast alpha-factor receptor: implications for dominant negative effects of mutant receptors. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 20698-714.
57. Corbel C, Sartini S, Levati E, et al. Screening for protein-protein interaction inhibitors using a bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based assay in yeast. *SLAS Discov* 2017 ; 22 : 751-9.
58. Corbel C, Wang Q, Bousserouel H, et al. First BRET-based screening assay performed in budding yeast leads to the discovery of CDK5/p25 interaction inhibitors. *Biotechnol J* 2011 ; 6 : 860-70.
59. Corbel C, Zhang B, Le Parc A, et al. Tamoxifen inhibits CDK5 kinase activity by interacting with p35/p25 and modulates the pattern of tau phosphorylation. *Chem Biol* 2015 ; 22 : 472-82.
60. Sartini S, Levati E, Maccesi M, et al. New antimicrobials targeting bacterial RNA polymerase holoenzyme assembly identified with an in vivo BRET-based discovery platform. *ACS Chem Biol* 2019 ; 14 : 1727-36.
61. Voisset C, Blondel M. Chémobiologie à l'heure du levure comme modèle de criblage pharmacologique. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1161-8.

TIRÉS À PART

M. Blondel

