



**HAL**  
open science

# Etude des mutants synthétiques létaux avec l'AICAR chez la levure et conservation chez l'Homme

Delphine Albrecht

► **To cite this version:**

Delphine Albrecht. Etude des mutants synthétiques létaux avec l'AICAR chez la levure et conservation chez l'Homme. Génétique. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0134 . tel-01895256

**HAL Id: tel-01895256**

**<https://theses.hal.science/tel-01895256v1>**

Submitted on 15 Oct 2018

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

# DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé

Spécialité Génétique

Par Delphine ALBRECHT

---

## ETUDE DES MUTANTS SYNTHÉTIQUES LETAUX AVEC L'AICAR CHEZ LA LEVURE ET CONSERVATION CHEZ L'HOMME

---

Sous la direction de Bertrand DAIGNAN-FORNIER

Soutenue le 14 octobre 2016

### Membres du jury

M. Jean Paul JAVERZAT	Directeur de Recherche, Bordeaux	Président
Mme Valérie BORDE	Directeur de recherche, Paris	Rapporteur
M. Olivier GADAL	Directeur de recherche, Toulouse	Rapporteur
M. Bertrand DAIGNAN-FORNIER	Directeur de recherche, Bordeaux	Directeur de thèse

## **ETUDE DES MUTANTS SYNTHETIQUES LÉTAUX AVEC L'AICAR CHEZ LA LEVURE ET CONSERVATION CHEZ L'HOMME**

L'identification d'interactions synthétiques létales (SL) apparaît aujourd'hui comme une approche prometteuse, qui permet de cibler directement les cellules cancéreuses. Dans cette étude, nous avons utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* en tant qu'organisme modèle simple pour cribler des mutations SL avec une drogue, l'AICAR (5-Amino-4-Imidazole CARboxamide Ribonucleoside). L'AICAR est une molécule connue pour inhiber spécifiquement la prolifération de multiples lignées cancéreuses. Ici, nous montrons que la perte d'ubiquitination de l'histone H2B ou de méthylation de l'histone H3K4 est SL avec l'AICAR. Nos résultats pointent sur l'AICAR causant une accumulation de cellules en G1 due à ses effets sur la localisation subcellulaire de la cycline Cln3, tandis que la perte d'ubiquitination d'H2B ou de méthylation de H3K4 affectent l'expression des deux autres cyclines de G1, CLN1 et CLN2. Ainsi, l'AICAR et la perte d'ubiquitination de l'histone H2B ou de méthylation de l'histone H3K4 affectent les trois cyclines simultanément, conduisant à une condition connue pour être SL. De plus, cette interaction chemo-génétique s'est révélée être conservée chez les cellules humaines HCT116. En effet, le knock down de RNF40, ASH2L ou MLL2 conduit à une sensibilité à l'AICAR exacerbée. Or, on sait que MLL2 est muté dans de nombreux cancers, ce qui rend cette interaction SL très intéressante dans le cadre d'une approche thérapeutique.

Mots clés : Levure, Génétique, Modification d'histones, Cancer, Létalité synthétique

### **CHEMO-GENETIC INTERACTIONS BETWEEN HISTONE MODIFICATION AND THE ANTI-PROLIFERATION DRUG AICAR ARE CONSERVED IN YEAST AND HUMANS**

Identifying synthetic lethal interactions has emerged as a promising new therapeutic approach that aims to directly target the cancer cells. Here, we used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a simple eukaryotic model to screen for mutations resulting in a synthetic lethality with 5-Amino-4-Imidazole CARboxamide Ribonucleoside (AICAR) treatment. Indeed, AICAR has been reported to specifically inhibit the proliferation of multiple cancer cell lines. Here, we found that loss of two several histone-modifying enzymes, including Bre1 (histone H2B ubiquitination) and Set1 (histone H3 lysine 4 methylation), greatly enhanced AICAR inhibitory effects on growth. Our results point to AICAR causing a significant accumulation of G1 cells due to its impact on Cln3 subcellular localization, while bre1 or set1 deletion impacts on the two other G1 cyclins, by affecting CLN1 and CLN2 expression. As a consequence, AICAR and bre1/set1 deletions jointly affect all three G1 cyclins, leading to a condition that is known to result in synthetic lethality. Most importantly, these chemo-genetic synthetic interactions were conserved in human HCT116 cells. Knock-down of RNF40, ASH2L or KMT2D induced a highly significant increased sensitivity to AICAR. As KMT2D is mutated at high frequency in a variety of cancers, this synthetic lethal interaction has an interesting therapeutic potential.

Keywords: Yeast, Genetics, Histone Modifications, Cancer, Synthetic Lethality

# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur Jean Paul Javerzat pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, ainsi que Madame Valérie Borde et Monsieur Olivier Gadal pour avoir accepté de faire partie des membres de ce jury en la qualité de rapporteurs.

Je tiens aussi à remercier mon directeur de thèse, Monsieur Bertrand Daignan-Fornier, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité, ses qualités scientifiques, sa franchise et l'autonomie qu'il m'a donnée. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Johanna Ceschin qui fut pour moi un pilier et un moteur au cours de ma thèse et qui m'a vraiment beaucoup aidé, tant sur le plan scientifique que personnel. Merci pour tes conseils, ton enthousiasme et ta bonne humeur.

Il me faut aussi remercier Chloé Philippe, Stéphane Puyo et Laure Jimenez sur qui j'ai pu compter tout au long de des années que nous avons partagées. Merci pour leur soutien et leur bienveillance.

Enfin, je remercie tous les membres de l'équipe qui m'ont soutenu ou aidé pendant cette thèse, ainsi que tous les membres de ma famille



# Table des matières

<b>ETUDE DES MUTANTS SYNTHETIQUES LETAUX AVEC L'AICAR CHEZ LA LEVURE ET CONSERVATION CHEZ L'HOMME.....</b>	<b>0</b>
<b>I. Table des illustrations .....</b>	<b>8</b>
<b>II. Tables des abréviations.....</b>	<b>10</b>
<b>III. Résumés.....</b>	<b>12</b>
<b>IV. Introduction .....</b>	<b>14</b>
1. Métabolites, plus que de simples intermédiaires .....	14
2. ZMP : un métabolite aux nombreuses facettes.....	16
a) Voie de biosynthèse des purines.....	16
b) ZMP, pas uniquement un activateur de l'AMPK.....	16
c) AICAR/ZMP en tant que molécule anticancéreuse.....	18
3. Modifications d'histones .....	19
a) Nucléosomes, chromatines et modification d'histones.....	19
b) Ubiquitination de l'histone H2B .....	19
c) H2Bub : un signal de trans-activation .....	22
4. Cycle cellulaire .....	28
a) Le cycle cellulaire chez la levure.....	30
b) Le cycle cellulaire chez les eucaryotes supérieurs .....	34
<b>V. Travail de thèse.....</b>	<b>39</b>

1.	Avantages et inconvénients de l'approche utilisée dans l'article .....	90
2.	H3K4me2/3, KAT et KDAC .....	92
a)	<i>Readers</i> de la méthylation d'H3K4me3 .....	92
b)	<i>Reader</i> d'H3K4me2 et KAT/KDAC.....	97
c)	Conclusion.....	97
3.	Crible de suppresseurs par surexpression.....	100
a)	Démarche du crible avec <i>set1 ade3 ade16 ade17 ade8 his1</i> .....	100
b)	Conclusion.....	103
4.	Crible de mutants suppresseurs .....	103
a)	Démarche du crible avec <i>bre2 ade16 ade17 ade8 his1</i> .....	103
b)	DPP1 .....	105
c)	Lien avec COMPASS .....	108
5.	Colonne de ZMP, protéomique.....	110
a)	Principe de l'approche et résultats.....	110
b)	Candidats .....	110
6.	Transport nucléaire et ZMP .....	112
a)	Transport nucléaire .....	112
b)	Surexpression de Kap123.....	114
c)	Kap123 et cyclines .....	114
d)	Kap123 et protéomique .....	118
e)	AICAR et transport nucléaire.....	125

7.	AICAR et PTM dans les cellules humaines HCT116 .....	128
a)	HCT116 et modifications d'histones .....	128
b)	Conclusion.....	133
<b>VI.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>134</b>
1.	ZMP et cycle cellulaire .....	134
2.	ZMP, modification d'histones et cycle cellulaire .....	137
3.	L'AICAR et son potentiel thérapeutique .....	139
4.	Conclusion.....	141
<b>VII.</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>142</b>
1.	Milieus et souches .....	142
a)	Milieus de culture .....	142
b)	Transformations .....	142
c)	Construction des souches .....	143
2.	Analyses .....	144
a)	Analyse du profil métabolomique .....	144
b)	Analyse du profil lipidomique .....	145
c)	Analyse protéomique des extractions enrichies en protéines nucléaires.....	145
d)	Cycloheximide et extraction protéique .....	145
3.	Chromatographie d'affinité.....	146
4.	Cellules de mammifère .....	146

<b>VIII. Bibliographie .....</b>	<b>147</b>
<b>IX. Annexe.....</b>	<b>156</b>

# I. Table des illustrations

Figure 1 : Régulations par des métabolites, focus sur les pyrimidines .....	15
Figure 2 : Métabolisme et modifications d'histones .....	15
Figure 3: Voie de biosynthèse <i>de novo</i> des purines et voie de recyclage .....	17
Figure 4 : Interconnexions entre les modifications d'histones .....	20
Figure 5 : Voie de l'ubiquitination .....	20
Figure 6 : <i>Reader, Writer et Eraser</i> .....	23
Figure 7 : Trans-activation de Dot1 et COMPASS par H2Bub .....	25
Figure 8 : La famille COMPASS .....	27
Figure 9 : Gènes dont la fréquence de mutation est plus élevée que celle attendue .....	29
Figure 10 : Cyclines de levure .....	31
Figure 11 : Transition G1/S .....	31
Figure 12 : Séquestration de Cln3-Cdc28 .....	33
Figure 13 : Effets des délétions d' Protéomique réalisée sur les extraits enrichis en protéines nucléaires <i>ydj1</i> ou <i>ssa1/2</i> sur la localisation de Cln3 .....	33
Figure 14 : Comparaison de la G1 .....	36
Figure 15 : Cycle cellulaire chez les cellules de mammifères .....	36
Figure 16 : Dommages à l'ADN et p53 .....	38
Figure 17 : SL et cellules cancéreuses .....	91
Figure 18 : Crible pour trouver des mutants SL avec l'AICAR .....	91
Figure 19 : Le complexe Nua3 .....	93
Figure 20 : Le complexe Nua4 .....	93
Figure 21 : Les complexes Rpd3(S) et Rpd3(L) .....	95
Figure 22 : Délétions des membres du complexe Rpd3(L) et (S) .....	95
Figure 23 : Profils métaboliques et délétions de KAT/KDAC .....	96
Figure 24 : Le complexe SAGA .....	98
Figure 25 : Délétions des membres du complexe SAGA .....	98
Figure 26 : Effet de l'accumulation endogène de ZMP .....	99
Figure 27 : Crible pour trouver des supprimeurs permettant de supprimer la SL entre AICAR et <i>set1</i> .....	101
Figure 28 : Plasmides obtenus dans le crible de surexpression .....	102
Figure 29 : La délétion de <i>dpp1</i> rend résistant à l'AICAR .....	104
Figure 30 : Voie de biosynthèse des lipides, localisation et conséquences .....	106
Figure 31 : Régulation de la transcription d' <i>INO1</i> par le PA .....	106
Figure 32 : Délétion de <i>dgk1</i> , <i>pah1</i> , <i>dpp1</i> et <i>lpp1</i> .....	107
Figure 33 : Surexpression de <i>PAH1</i> , <i>LPP1</i> , <i>DPP1</i> et <i>DGK1</i> .....	107
Figure 34 : Expression d' <i>INO1</i> en présence d'AICAR et/ou de Dpp1 .....	109
Figure 35 : Résultats des expériences de chromatographie sur couche mince (CCM) .....	109
Figure 36 : Chromatographie d'affinité au ZMP et binders .....	111
Figure 37 : Expérience d'épistasie entre <i>dpp1</i> et <i>set1</i> .....	111
Figure 38 : Chromatographie d'affinité avec Kap123-myc et Yrb1-myc .....	113

Figure 39 : Principes du transport nucléaire .....	113
Figure 40 : Surexpression de <i>KAP123</i> .....	115
Figure 41 : Surexpression de <i>KAP123</i> , <i>KAP121</i> , <i>KAP114</i> et <i>YRB1</i> .....	115
Figure 42 : Constructions <i>KAP123</i> , expression et suppression .....	116
Figure 43 : Structure de <i>KAP123</i> .....	116
Figure 44 : Chromatographie d'affinité au ZMP réalisée avec les fragments de Kap123 .....	117
Figure 45 : Délétions de <i>CLN1</i> , <i>CLN2</i> et/ou <i>CLN3</i> .....	117
Figure 46 : Expérience de cycloheximide avec Cln1, Cln2 et Cln3.....	119
Figure 47 : Délétion de cyclines et <i>KAP123</i> .....	120
Figure 48 : Gel d'argent sur des extraits nucléaires .....	120
Figure 49 : Protéines qui diminuent en présence d'AICAR et réaugmentent en présence de <i>KAP123</i> .....	124
Figure 50 : Protéomique réalisée sur les extraits enrichis en protéines nucléaires .....	126
Figure 51 : Taf1.....	126
Figure 52 : Mutants de transport nucléaire .....	127
Figure 53 : Kap121, Kap123 et modifications d'histone.....	127
Figure 54 : Deuxième siARN anti ASH2L.....	129
Figure 55 : AICAR et gamma-H2AX.....	129
Figure 56 : Cycle cellulaire, apoptose et décollement .....	131
Figure 57 : Transcriptomique sur des cellules murines traitées au shRNF40 versus shNT .....	132
Figure 58 : <i>kcs1</i> et cycle cellulaire .....	135
Figure 59 : Sextuple <i>bre1 kcs1</i> et AICAR.....	135
Figure 60 : Variation de la concentration de ZMP avec l'adénine .....	138
Figure 61 : H2Bub, H3K4me, H3K79me et AICAR.....	138

## II. Tables des abréviations

AICAR	5-Amino-4-Imidazole CARboxamide Ribonucleoside
AMPK	Adénosine MonoPhosphate activated Protein Kinase
CDK	Cyclin Dependent Kinase
COMPASS	COMPLex Associated with Set1
DAG	DiAcylGlycerol
DGPP	DiacylGlycerol PyroPhosphate
DHO	DiHydroOrotate
H2A	Histone H2A
H2B	Histone H2B
H2Bub	Histone H2B ubiquitinilé
H3	Histone H3
H3K4me1, me2, me3	Histone H3 mono (me1), di (me2) ou triméthylé (me3) sur la lysine 4
H3K79me2, me3	Histone H3 di (me2) ou triméthylé (me3) sur la lysine 79
H4	Histone H4
HCT116	Human colon carcinoma
IMP	Inosine MonoPhosphate
KAT	Lysine Acetyl Transferase
KDAC	Lysine DéAcétylase
OA	Acide orotique
PA	Acide Phosphatidique
PC	PhosphatidylCholine
PE	PhosphatidylEthanolamine
PRPP	5-PhosphoRibosyl- $\alpha$ -1-PyroPhosphate
PS	Phosphatidylsérine
PTM	Modifications Post Transcriptionnelles
Q	Quadruple mutant <i>ade16 ade17 ade8 his1</i>

RanGAP	Ran GTPase-Activating Protein
RanGDP	RAs-related Nuclear protein GDP
RanGEF	Ran Guanine nucleotide Exchange Factor
RanGTP	RAs-related Nuclear protein GTP
RE	Reticulum Endoplasmique
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAM	S-AdénosylMéthionine
shARN	ARN en épingle à cheveux
siARN	Small Interference RNA
S.L	Synthétique Létale
sZMP	Succinyl-ZMP
TAG	TriAcylGlycerol
WT	Wild Type, Sauvage
ZMP	5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxamide
$\alpha$ KG	acide $\alpha$ -CétoGlutarique

### III. Résumés

L'identification d'interactions synthétiques létales (SL) apparaît aujourd'hui comme une approche prometteuse, qui permet de cibler directement les cellules cancéreuses. Dans cette étude, nous avons utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* en tant qu'organisme modèle simple pour cribler des mutations SL avec une drogue, l'AICAR (5-Amino-4-Imidazole CARboxamide Ribonucleoside). L'AICAR est une molécule connue pour inhiber spécifiquement la prolifération de multiples lignées cancéreuses. Ici, nous montrons que la perte d'ubiquitination de l'histone H2B ou de méthylation de l'histone H3K4 est SL avec l'AICAR. Nos résultats pointent sur l'AICAR causant une accumulation de cellules en G1 due à ses effets sur la localisation subcellulaire de la cycline Cln3, tandis que la perte d'ubiquitination d'H2B ou de méthylation de H3K4 affectent l'expression des deux autres cyclines de G1, *CLN1* et *CLN2*. Ainsi, l'AICAR et la perte d'ubiquitination de l'histone H2B ou de méthylation de l'histone H3K4 affectent les trois cyclines simultanément, conduisant à une condition connue pour être SL. De plus, cette interaction chemo-génétique s'est révélée être conservée chez les cellules humaines HCT116. En effet, le *knock down* de *RNF40*, *ASH2L* ou *MLL2* conduit à une sensibilité à l'AICAR exacerbée. Or, on sait que *MLL2* est muté dans de nombreux cancers, ce qui rend cette interaction SL très intéressante dans le cadre d'une approche thérapeutique.

Identifying synthetic lethal interactions has emerged as a promising new therapeutic approach that aims to directly target the cancer cells. Here, we used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a simple eukaryotic model to screen for mutations resulting in a synthetic lethality with 5-Amino-4-Imidazole CARboxamide Ribonucleoside (AICAR) treatment. Indeed, AICAR has been reported to specifically inhibit the proliferation of multiple cancer cell lines. Here, we found that loss of two several histone-modifying enzymes, including Bre1 (histone H2B ubiquitination) and Set1 (histone H3 lysine 4 methylation), greatly enhanced AICAR inhibitory effects on growth. Our results point to AICAR causing a significant accumulation of G1 cells due to its impact on Cln3 subcellular localization, while *bre1* or *set1* deletion impacts on the two other G1 cyclins, by affecting *CLN1* and *CLN2* expression. As a consequence, AICAR and *bre1/set1* deletions jointly affect all three G1 cyclins, leading to a condition that is known to result in synthetic lethality. Most importantly, these chemo-genetic synthetic interactions were conserved in human HCT116 cells. Knock-down of *RNF40*, *ASH2L* or *KMT2D* induced a highly significant increased sensitivity to AICAR. As *KMT2D* is mutated at high frequency in a variety of cancers, this synthetic lethal interaction has an interesting therapeutic potential.



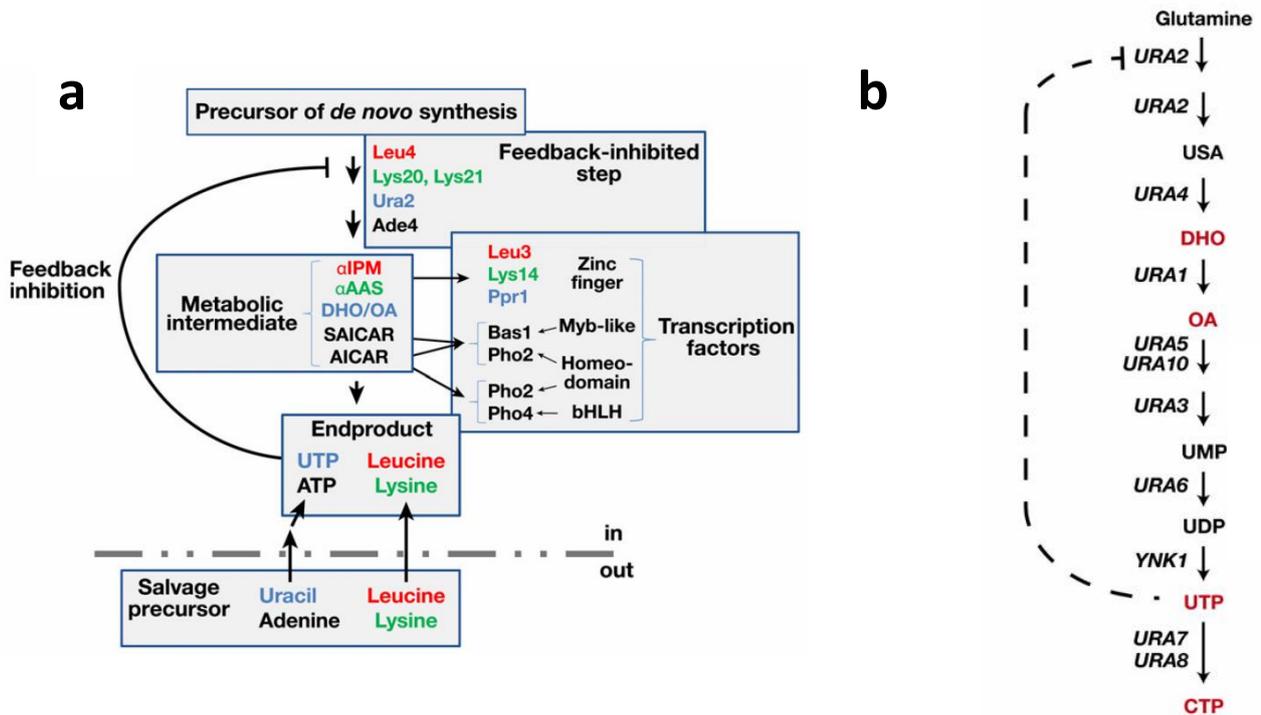
## IV. Introduction

### 1. Métabolites, plus que de simples intermédiaires

Le “métabolisme” est un terme utilisé pour décrire toutes les réactions chimiques impliquées dans la survie de la cellule et/ou de l'organisme. En effet, afin de maintenir son homéostasie, la cellule doit en permanence faire varier ces flux métaboliques en fonction des *stimuli* externes et internes. Ces réactions génèrent de multiples intermédiaires métaboliques, appelés métabolites, qui contribuent à la diversité des espèces biochimiques au sein de la cellule. Au cours de l'évolution, la cellule a su tirer parti de cette abondance de métabolites variés. Et ainsi, un certain nombre d'entre eux jouent aujourd'hui des rôles cruciaux dans la régulation de l'homéostasie cellulaire.

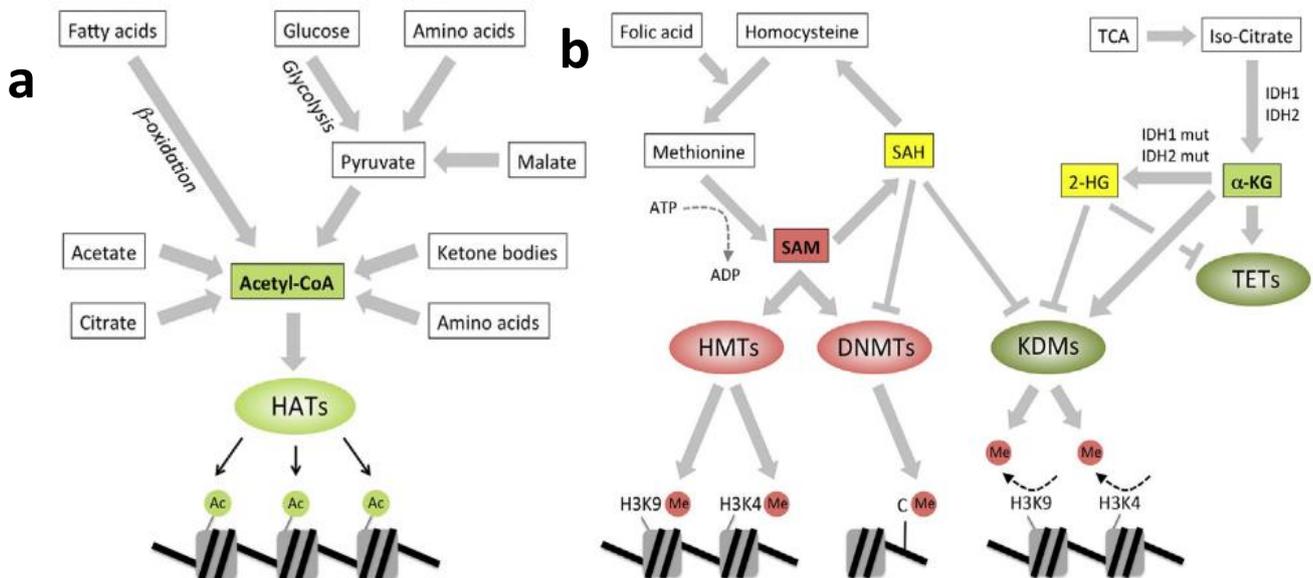
Bien souvent, les flux métaboliques sont régulés par leurs produits finaux [1]. C'est le cas chez la levure pour les voies de biosynthèse de la lysine, de la leucine, des pyrimidines ou des purines, où respectivement la lysine, la leucine, l'UTP ou l'ATP vont venir inhiber enzymatiquement la première étape de la voie (Figure 1A). A ce premier niveau de régulation s'ajoute parfois un deuxième niveau, *via* des facteurs de transcription qui sont eux même régulés, non pas par les produits finaux de la voie, mais cette fois par des intermédiaires métaboliques. Par exemple, le facteur de transcription Ppr1 va directement répondre à la quantité d'acide orotique (OA) et de dihydroorotate (DHO), deux métabolites intermédiaires de la voie de biosynthèse des pyrimidines, et ainsi moduler au niveau transcriptionnel la synthèse des enzymes de la voie pour réguler son flux ([2] Figure 1B). Ainsi, grâce à ces deux niveaux de régulation, la cellule régule à la fois la production des produits finaux, mais aussi le flux des voies de biosynthèse. De plus, dans certains cas, ces intermédiaires métaboliques permettent de co-réguler des voies de biosynthèse liées, comme c'est le cas par exemple pour le ZMP. Sa concentration influe sur la voie de biosynthèse dont il est issu (les purines) et la voie d'utilisation du phosphate [3]. Je reviens plus en détail sur ce métabolite, le ZMP, et ses propriétés étonnantes dans la deuxième partie de cette introduction.

Il est intéressant de constater que les métabolites ne régulent pas seulement des réactions métaboliques, mais aussi parfois d'autres processus très variés ([4] Figure 2). Par exemple, l'acétylation des histones est très dépendante de l'abondance du substrat de la réaction, l'acétyl-CoA, qui est lui-même un métabolite [5]. Le NAD<sup>+</sup> est un cofacteur obligatoire pour l'activité de deux déacétylases, Sirt1 et Sirt6, qui déacétylent H3K9/K14 et H3K9/K56 [4]. De même, un autre métabolite, l'acide alpha-cétoglutarique ( $\alpha$ -KG), va influencer sur la méthylation des histones en tant que cofacteur des réactions de déméthylation [6]. Enfin, la S-adénosylméthionine (SAM) est un intermédiaire clé du métabolisme des acides aminés soufrés, qui est utilisé en tant que substrat de toutes les réactions de méthylation en tant que donneur de méthyle [7]. Il est intéressant de mettre cela en perspective avec le fait que la concentration de ces métabolites va être affectée par l'environnement extracellulaire de la cellule (tel que l'abondance en nutriment, le stress ...) ce qui aura un impact direct sur les réactions de modifications d'histones décrites ci-dessus. Ainsi, il apparaît de plus en plus évident que ces métabolites permettent d'établir des connections directes entre le statut métabolique de la cellule et d'autres processus cellulaires variés, tels que les modifications de la chromatine qui vont-elles-mêmes influencer sur l'expression des gènes.



**Figure 1 : Régulations par des métabolites, focus sur les pyrimidines**

(a) L'expression des gènes codant les enzymes catalytiques de la voie de biosynthèse de leucine (rouge), la lysine (vert), pyrimidine (bleu) et purine (noir) est contrôlée par des facteurs de transcription spécifiques. Ces facteurs de transcription sont induits lors de la liaison de métabolites intermédiaires. (b) Lorsque le DHO et le OA sont abondants, ils activent la transcription des gènes de la voie, cela va avoir pour conséquence d'augmenter le flux et donc le produit final de la voie, l'UTP. Une fois, l'UTP abondant, il va venir exercer un *feedback* négatif pour diminuer le flux de la voie. Illustration tirée de la revue de Per O. Ljungdahl et Bertrand Daignan-Fornier [1].



**Figure 2 : Métabolisme et modifications d'histones**

(a) Des voies métaboliques variées conduisent à la formation d'acétyl-CoA, qui va ensuite être utilisé en tant que donneur d'acétyl par les lysines acétyl-transférases (KAT). (b) La S-Adenosylméthionine (SAM) est générée via la voie de biosynthèse de la méthionine et est le donneur de méthyle de la cellule. L'acide alpha-cétoglutarique (α-KG) est un cofacteur essentiel dans de nombreuses réactions de déméthylation. Illustration tirée de la revue de Etchegaray J-P et Mostoslavsky R [4].

Au laboratoire, un métabolite en particulier est étudié depuis de nombreuses années, le ZMP. L'équipe a montré que ce métabolite est un régulateur essentiel de plusieurs voies de biosynthèse. Cette fonction pourrait potentiellement ne pas être la seule attribuable au ZMP, qui est lui-même d'ailleurs un métabolite très conservé au sein des organismes. C'est dans cette perspective que s'inscrit mon travail de thèse. En effet, j'ai étudié les effets du ZMP sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ce qui m'a conduit à m'intéresser aux modifications d'histones, puis au cycle cellulaire. Ce sont ces trois éléments que je développe au court de cette introduction.

## 2. ZMP : un métabolite aux nombreuses facettes

### a) Voie de biosynthèse des purines

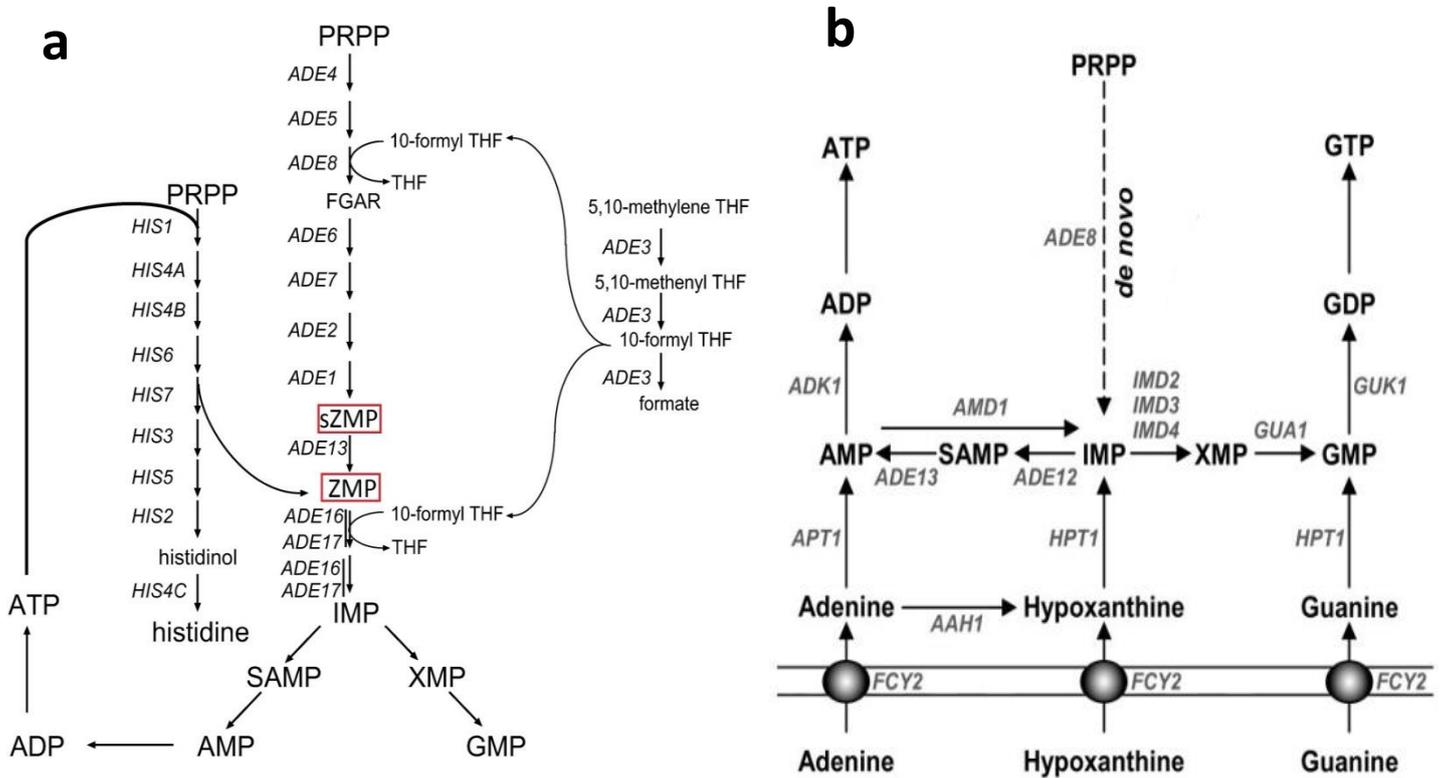
Les purines regroupent deux bases nucléiques, l'adénine (A) et la guanine (G). Les deux autres bases nucléiques, la cytosine (C) et la thymine (T) font partis des pyrimidines. Ces quatre bases composent l'acide désoxyribonucléique (ADN), en partie l'acide ribonucléique (ARN) et sont donc essentielles pour la survie de tout organisme. A ce titre, leurs voies de biosynthèse sont très régulées et conservées [2]. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), la voie de biosynthèse *de novo* (Figure 3A) permet de convertir le PRPP (5-phosphoribosyl- $\alpha$ -1-pyrophosphate) en IMP (inosine monophosphate), le premier nucléotide purique [8]. L'IMP est ensuite utilisé pour produire de l'AMP (adénosine monophosphate) et du GMP (guanosine monophosphate), qui pourront eux même être convertis en ATP (adénosine triphosphate) et GTP (guanosine triphosphate). Il existe aussi une voie de recyclage, qui permet de récupérer les bases puriques de l'environnement extracellulaire (Figure 3B). On peut noter que le pool de nucléotides contenant de l'adénine peut être converti en guanine, afin de mieux répondre aux besoins de la cellule.

La voie de biosynthèse *de novo* des purines est régulée par son produit final, l'ATP [9]. A ceci s'ajoute la régulation de la voie par deux de ses intermédiaires, le ZMP (5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxamide) et le sZMP (succinyl-ZMP) [3]. En effet, ces métabolites régulent l'interaction entre différents facteurs de transcriptions en réponse au niveau d'abondance des purines. Plus précisément, le ZMP et le sZMP stimulent l'interaction de Pho2 avec Bas1, ce qui va augmenter la transcription des gènes de la voie de biosynthèse *de novo* des purines. En parallèle, le ZMP va aussi stimuler l'interaction de Pho2 avec Pho4, ce qui va augmenter la transcription des gènes de la voie de biosynthèse du phosphate. Cela conduit ainsi à une activation concertée et finement régulée de ces deux voies [3].

De façon intéressante, ces régulations semblent être au moins en partie conservées, puisque le ZMP régule aussi la voie de biosynthèse *de novo* des purines chez la bactérie [10]. Le mécanisme est par contre très différent, cette fois, ce sont directement les ARN codant certaines enzymes de la voie de biosynthèse des purines qui vont être fixés par le ZMP ou le ZTP. Cela va provoquer un changement de conformation de l'ARN, un « riboswitch », qui va directement impacter sur l'expression de ces gènes.

### b) ZMP, pas uniquement un activateur de l'AMPK

Chez les cellules de mammifères, il n'existe pour l'instant aucun rôle connu du ZMP, mis à part celui de métabolite. Par contre, lorsqu'il s'accumule à forte concentrations dans la cellule (ajout externe),



**Figure 3: Voie de biosynthèse *de novo* des purines et voie de recyclage**

(a) Représentation schématique de la voie de biosynthèse *de novo* des purines. La voie de biosynthèse des purines est liée à celle de l'histidine. La présence de 10-formyl tétrahydrofolate (THF) est nécessaire pour permettre certaines réactions de la voie. On retrouve une double régulation avec deux intermédiaires entourés en rouge, le sZMP et le ZMP, qui régulent certains facteurs de transcription liés à la voie et le produit final, l'ATP/ADP qui inhibe la première enzyme de la voie. Illustration tirée de l'article de Karine Rébora, Benoît Laloo et Bertrand Daignan-Fornier [9] (b) Représentation schématique de la voie de recyclage des purines. Les purines peuvent être internées sous trois formes, l'adénine, l'hypoxanthine et la guanine. Des échanges peuvent avoir lieu, du pool d'adénine vers le pool de guanine.

du fait de sa ressemblance structurale avec l'AMP, il va agir en tant qu'AMP mimétique, ce qui va avoir de multiples conséquences sur la cellule. Ainsi, l'accumulation de ZMP est utilisée pharmacologiquement comme activateur de l'AMPK (Adénosine MonoPhosphate activated Protein Kinase) depuis plus de 20 ans [11]. En effet, le ZMP est capable d'activer les deux isoformes catalytiques de l'AMPK *via* son interaction avec les sous-unités régulatrices  $\gamma$  où se fixe habituellement l'AMP [12]. Une fois activée, cette kinase va venir phosphoryler de nombreuses cibles résultant globalement en une inhibition des flux anaboliques et une augmentation des flux cataboliques. Bien que beaucoup d'effets du ZMP soient attribués à son action sur l'AMPK, de plus en plus d'études montrent que de nombreux effets du ZMP sont aussi AMPK indépendants [13]. Par exemple, notre laboratoire a récemment démontré que les effets antiprolifératifs de l'AICAR n'étaient pas affectés dans des fibroblastes embryonnaires murins AMPK<sup>-/-</sup> comparés aux mêmes cellules AMPK<sup>+/+</sup> [14]. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par d'autres [15] et soulignent l'importance de l'identification de nouvelles cibles du ZMP permettant de mieux appréhender ses effets globaux sur la cellule.

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'orthologue de l'AMPK, appelé Snf1, ne semble pas être affecté par l'accumulation de ZMP [3]. Cela reflète *a priori* le fait que Snf1 est activé non pas par l'AMP, mais par l'ADP [16]. Pour cette raison, la levure est un très bon modèle pour identifier de nouvelles cibles du ZMP, AMPK indépendantes.

### c) AICAR/ZMP en tant que molécule anticancéreuse

Un autre aspect du ZMP est son potentiel en tant que molécule anticancéreuse. En effet, il a été montré qu'un traitement à l'AICAR (5-Amino-4-Imidazole CARboxamide Ribonucleoside), son précurseur, affectait particulièrement la prolifération de cellules aneuploïdes, c'est-à-dire contenant un nombre anormal de chromosomes, sans avoir d'effets majeurs à la même concentration sur les mêmes cellules euploïdes, c'est à dire contenant un nombre de chromosomes normal [17]. L'aneuploïdie étant retrouvée dans près de 90 % des tumeurs solides [18], l'AICAR est aujourd'hui considéré comme un agent anti-tumoral potentiel.

De plus, l'AICAR inhibe aussi la prolifération de nombreux types cellulaires cancéreux: des cellules cancéreuses du sein [19], de la prostate, de la moelle osseuse ou encore de nombreux type cellulaire provenant de « childhood acute lymphoblastic leukemia » (ALL) [20]. Pour finir, *in vivo*, l'AICAR combiné au 17-AAG, un inhibiteur d'Hsp90, inhibe très fortement la prolifération de différentes cellules cancéreuse de colon dans des xénogreffes chez la souris [17].

Ainsi, l'AICAR a un grand potentiel en tant qu'agent anti-tumoral. De ce fait, il est nécessaire de mieux comprendre tous ses mécanismes d'action et ses cibles, afin de mieux appréhender cette molécule avant d'envisager son éventuelle utilisation sur l'Homme.

Pour ces différentes raisons, j'ai cherché au cours de ma thèse à identifier de nouveaux mécanismes d'action du ZMP. Mes recherches m'ont amenée à faire le lien entre accumulation de ZMP et modifications d'histones.

### 3. Modifications d'histones

#### a) Nucléosomes, chromatines et modification d'histones

La chromatine est composée d'ADN et de protéines d'histones. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, qui contient 147 paires de base d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones : H2A, H2B, H3 et H4 [21]. De chaque histone sort une queue d'acides aminés qui est sujette, tout comme le corps de l'histone lui-même, à de multiples modifications post transcriptionnelles (PTM) par les enzymes de modifications d'histones (*writers*). Ces PTMs vont être lues par des *readers* qui les reconnaissent spécifiquement et qui vont à leur tour modifier la chromatine directement ou recruter des enzymes de modifications ([22] Figure 4). Cela va avoir des répercussions sur la stabilité des nucléosomes en affectant à la fois les interactions histone-ADN et histone-histone. Cela va ensuite permettre ou non l'accessibilité à différentes régions d'ADN régulant ainsi de multiples processus, tels que la transcription, la réparation de l'ADN ou la réplication [23]. C'est pourquoi, les PTMs sont apposées ou enlevées de manière dynamique et très régulée.

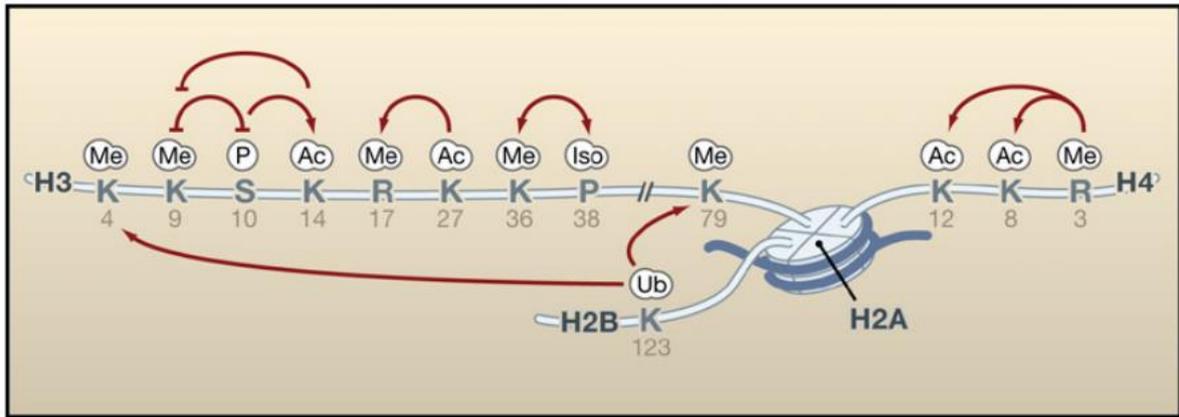
Il existe au moins 8 PTMs différents : l'acétylation sur des lysines, la méthylation sur des lysines ou des arginines, la phosphorylation sur des sérines ou thréonines, l'ubiquitination sur des lysines, la sumoylation sur des lysines, l'ADP ribosylation sur des acides glutamiques, la déamination et l'isomérisation de prolines [23]. En ce qui concerne la méthylation, elle est trouvée sous trois formes, mono-, di- ou tri-méthylée. De plus, ces PTMs ne sont pas présents forcément sur le même nucléosome, ni même apposées au même moment. Ainsi, ce vaste catalogue de PTMs représente un outil de réponse très sophistiqué pour la cellule afin de répondre au mieux à ses besoins. Bien que les premiers PTMs aient été découverts il y a de nombreuses années, le rôle exact de ces modifications reste obscur du fait de leur complexité. De nombreuses questions restent donc en suspens, malgré l'importance démontrée des PTMs dans des fonctions essentielles de la cellule. A ce titre, leur étude est donc primordiale pour mieux appréhender les régulations cellulaires.

#### b) Ubiquitination de l'histone H2B

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à l'ubiquitination de l'histone H2B. L'ubiquitination nécessite plusieurs étapes pour aboutir *in fine* à la fixation covalente d'une ubiquitine, petite protéine de 8.5 kDa très ubiquitaire ([24] Figure 5). Tout d'abord la E1, aussi appelée «ubiquitin-activating enzyme» va venir activer une ubiquitine pour la transférer sur la E2, aussi appelée «ubiquitin-conjugating enzyme». Les E2 vont catalyser le transfert d'ubiquitine sur une protéine substrat ou une E3, aussi appelée « ubiquitin-ligase enzyme ». Dans ce cas, c'est les E3 qui vont ensuite ubiquitiner la cible. Chez la levure, il n'existe qu'une seule E1, Uba1, et chez l'Homme il en existe deux, Uba1 et Uba6 [24]. La cascade se ramifie au niveau des E2 avec 11 E2 chez la levure et 40 E2 chez l'Homme. Enfin, la complexité s'agrandit encore avec les E3, où il en existe une multitude que ce soit chez la levure (42) ou chez l'Homme (~600) [25].

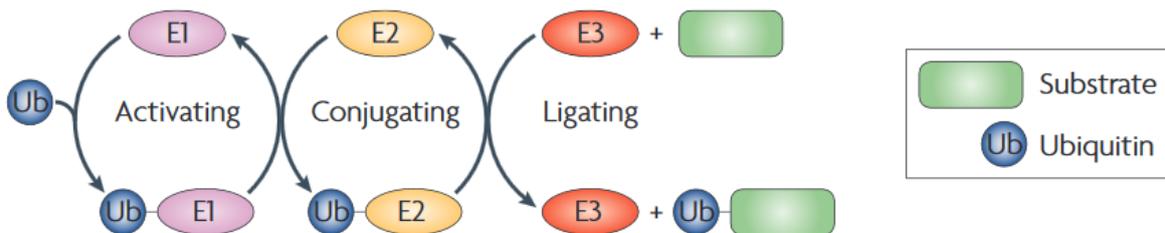
##### 1) Chez la levure *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, l'ubiquitination d'H2B (H2Bub) a lieu au niveau de la lysine K123. Il s'agit de la seule ubiquitination d'histone connue chez la levure. Bien que découverte il y a plus de 25 ans ([26, 27]), toutes les implications de cette modification n'ont pas encore été élucidées. H2Bub nécessite la E2, Rad6, en complexe avec la E3, Bre1 [28–30]. On sait que la présence du complexe Paf1 est aussi



**Figure 4 : Interconnexions entre les modifications d'histones**

Les histones, et principalement leur queue, sont sujettes à de multiples modifications post-transcriptionnelles (PTMs). On ne peut pas véritablement considérer séparément chaque PTM puisqu'en réalité, c'est plutôt leur combinaison qui va avoir un impact sur la cellule.



**Figure 5 : Voie de l'ubiquitination**

L'ubiquitination se fait sous forme de cascade avec tout d'abord la E1, la E2 puis éventuellement la E3. C'est la E2 et la E3 qui vont donner la spécificité en reconnaissant directement leur cible. On associe habituellement l'ubiquitination à la poly-ubiquitination, qui est un signal de dégradation. Pour l'ubiquitination des histones, c'est une mono-ubiquitination qui va avoir lieu et qui va avoir de vastes conséquences sur la cellule. Illustration tirée de l'article de Clague M, Heride C et Urbé S [37].

essentielle pour permettre l'ubiquitination d'H2B [31]. Or, Paf1 est une protéine nucléaire qui s'associe à l'ARN polymérase II et qui est requise pour l'expression correcte de certains gènes impliqués dans la synthèse de protéines, des lipides, des acides nucléiques ou du cycle cellulaire [32], ce qui établit un lien étroit entre H2Bub et l'élongation de la transcription. Pourtant les conséquences exactes d'H2Bub sur la transcription restent énigmatiques. En effet, par exemple, en l'absence d'H2Bub, la transcription d'un certain nombre de gènes fortement inductibles (*GAL1* et *SUC2*, tous les deux impliqués dans le métabolisme des sucres) est affectée [33]. A l'inverse, en absence d'H2Bub, il a été constaté une dépression de *ARG1*, gène qui code pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'arginine [34] ou encore une perte du *silencing* des télomères [31]. En fonction des gènes étudiés, on observe donc des rôles opposés d'H2Bub sur la transcription des gènes. On ne peut donc pas donner de modèle simple permettant de lier H2Bub et expression des gènes, puisqu'il semble que ses effets soient gènes spécifiques. De plus, on peut noter que malgré les multiples fonctions qu'on leur prête, ni *rad6* ni *bre1* ne sont essentiels pour la survie.

L'H2Bub peut être déubiquitiné par deux "ubiquitin specific protease" (USP ou DUB), Ubp8 et Ubp10 [33, 35]. Ubp8 est un composant du complexe Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) et son absence engendre une augmentation de H2Bub [35]. Ubp10 est une protéine qui interagit avec Sir4 pour faciliter le *silencing* de certaines régions de la chromatine, son absence engendre elle aussi une augmentation de H2Bub [35]. La combinaison des délétions d'*ubp8* et *ubp10* engendre une augmentation massive de l'ubiquitination d'H2B.

## 2) Chez les cellules de mammifères

Chez les cellules de mammifères, deux histones sont ubiquitinées : H2A, au niveau de la lysine 119, et H2B, au niveau de la lysine K120 [36]. Il est intéressant de noter que 5 à 15 % de l'histone H2A est ubiquitiné, ce qui en fait la protéine ubiquitinilée la plus abondante du noyau [37] et pour H2B, cela représente typiquement 1 à 2 % [38]. L'ubiquitination des histones nécessite donc l'utilisation d'une part non négligeable du pool d'ubiquitine.

Chez l'Homme, il existe deux orthologues de *RAD6*, *HR6A* et *HR6B* [39], et deux orthologues de *BRE1*, *RNF20* et *RNF40* [40]. Leur *silencing* simultané réduit de façon très importante l'ubiquitination d'H2B [41]. En ce qui concerne le *silencing* de chacun d'eux séparément, le résultat est moins tranché : un siARN dirigé contre *RNF20* (*siRNF20*) diminue fortement H2Bub, alors que les auteurs n'observent aucun effet sur H2Bub avec un siARN contre *RNF40* (*siRNF40*) dans des cellules HeLa (cellules humaines) (data not shown [40]). A l'inverse, le *silencing* de *RNF40* ou *RNF20* engendre une forte diminution de H2Bub dans des cellules RIF-1 (cellules murines) [42] ou de même dans des cellules U2OS (cellules humaines) [43]. En 2009, un article très complet a montré que Rnf40 et Rnf20 formaient en réalité un complexe et que la formation de ce complexe était essentielle pour la stabilité de ces deux protéines (en particulier RNF40) [44]. C'est ce complexe qui, associé à Rad6 (en particulier à HR6A), est entièrement responsable de l'ubiquitination d'H2B dans les cellules 293T ou HCT116 (cellules humaines). Globalement, il semble donc que le *silencing* de *RNF40* ou *RNF20* résulte dans les deux cas à une diminution globale d'H2Bub. Les différences observées par rapport à l'étude de Kim *et al.* pourraient potentiellement être due aux nombreuses mutations propres aux cellules HeLa.

Le lien entre H2Bub et transcription est aussi complexe chez les mammifères que chez la levure. Il a été montré que l'ubiquitination d'H2B K120 nécessite, comme chez la levure, la présence d'acteurs majeurs de la transcription, notamment le complexe PAF, pour avoir lieu [44]. Cette modification va

stimuler l'efficacité d'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II. Bien qu'H2Bub soit largement associée aux gènes fortement transcrits, la transcription d'uniquement une partie d'entre eux est affectée par le *silencing* de *RNF20* [45]. De plus, à l'inverse, la transcription de certains gènes est fortement augmentée par le silencing de *RNF20*. A nouveau, on ne peut pas établir de modèle simple permettant de rendre compte globalement de l'effet d'H2Bub sur l'expression des gènes.

Ces effets spécifiques pourraient être un avantage pour la cellule. En effet, Rnf20 active la transcription de p53, un suppresseur de tumeur bien connu, et inhibe celle de nombreux proto-oncogène [45]. Cette propriété en fait un potentiel suppresseur de tumeur. De plus, il est intéressant de remarquer que l'expression de *RNF20* est diminuée dans de nombreux cancers, tels que ceux de la prostate [46] ou des testicules [42]. De même, ce gène est fréquemment muté dans les cancers colorectaux [47, 48].

Ainsi, un lien a pu être établi entre ubiquitination d'H2B et développement de cancers [49]. La perte globale d'ubiquitination d'H2B, détectée par immunohistochimie, a aussi été retrouvée dans de nombreux cancers : cancer du sein [50], colorectal [51], de la langue [51] et parathyroïde [52]. Pour ce dernier, il a été montré que cette perte d'H2Bub était due à la mutation de *CDC73*, conduisant à la désorganisation du complexe PAF qui est lui-même nécessaire pour l'ubiquitination d'H2B [52]. Si l'on considère que Rnf20 est bien un suppresseur de tumeur, cela suggère que USP22, l'enzyme qui catalyse la réaction inverse, pourrait être une oncoprotéine. Cette hypothèse est en adéquation avec le fait qu'une expression élevée d'*USP22* est un indicateur d'un mauvais pronostic dans différents cancers dont le cancer du sein [53], le carcinome colorectal [54], de l'œsophage [55], du carcinome parathyroïde [56], gastrique [57], des cervicales [57] ...

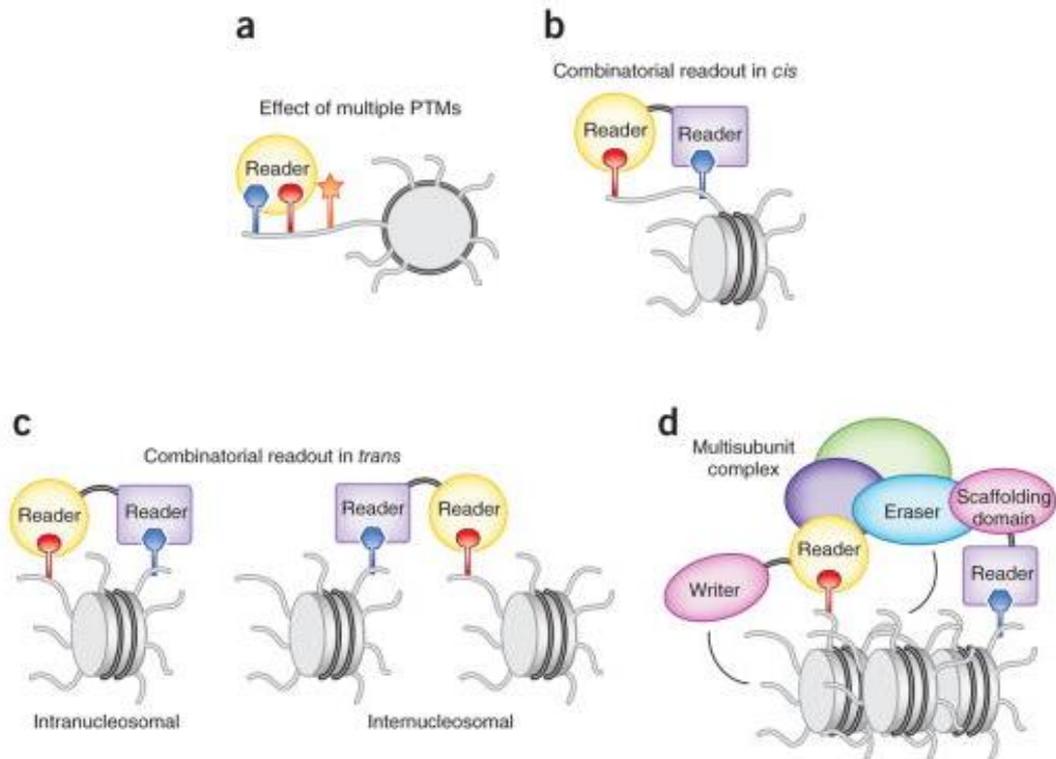
L'ubiquitination d'H2B joue donc des rôles complexes dans la régulation de la transcription ou du développement tumoral. La complexité de ces réponses peut probablement être due en partie à la cascade de modifications d'histones/de protéines qui suit l'apposition d'H2Bub.

### c) H2Bub : un signal de trans-activation

En effet, certaines modifications d'histone vont être de véritable point d'ancrage sur lesquels vont venir se fixer des *readers* qui vont, soit recruter des protéines impliquées directement dans des processus cellulaires, tel que la réparation, la transcription ou la réplication, soit lire ces marques et en apposer (*writer*) ou enlever (*eraser*) à leur tour (Figure 6). Il existe ainsi un *cross talk* entre les modifications d'histones. Un exemple particulièrement étudié est la trans-activation de deux lysines méthyltransférases par H2Bub.

#### 1) Chez la levure *S. cerevisiae*

En 2002, il a été montré par deux équipes, de façon indépendante, que la méthylation correcte de l'histone H3 en position de la lysine 4 requiert l'ubiquitination préalable d'H2B ([58, 59] Figure 7). En effet, la délétion de *bre1* ou *rad6* engendre une perte de la di- et triméthylation de H3K4 [60]. Le fait que la perte d'H2Bub n'inhibe que la di- et triméthylation d'H3K4 suggère qu'H2Bub pourrait réguler la processivité de la lysine méthyltransférase qui appose la mono-, di- et triméthylation de H3K4. Cette méthylation est réalisée par le complexe COMPASS, « COMplex of Proteins ASSociated with Set1 », qui a pour sous-unité catalytique Set1. Ce complexe est composé de sept sous unités, dont Set1, Sdc1, Swd2, Swd3, Swd1, Bre2 et Spp1 qui permettent de catalyser la mono-, di- et triméthylation de H3K4 [60].



**Figure 6 : Reader, Writer et Eraser**

(a) La reconnaissance des PTMs par les *readers* est influencée par les PTMs adjacents. (b) Ainsi, il peut y avoir des actions combinées de *readers* au niveau d'une même histone ou (c) de plusieurs histones. (d) Au sein d'un complexe, plusieurs sous unités peuvent être impliquées dans la lecture et la liaison aux PTMs. Ces complexes peuvent contenir eux mêmes des enzymes qui vont à leur tour apposer (*writer*) ou enlever (*eraser*) d'autres PTMs. Illustration tirée de l'article de Catherine A Musselman, Marie-Eve Lalonde, Jacques Côté et Tatiana G Kutateladze [22].

Chaque sous unité possède un rôle spécifique au sein du complexe :

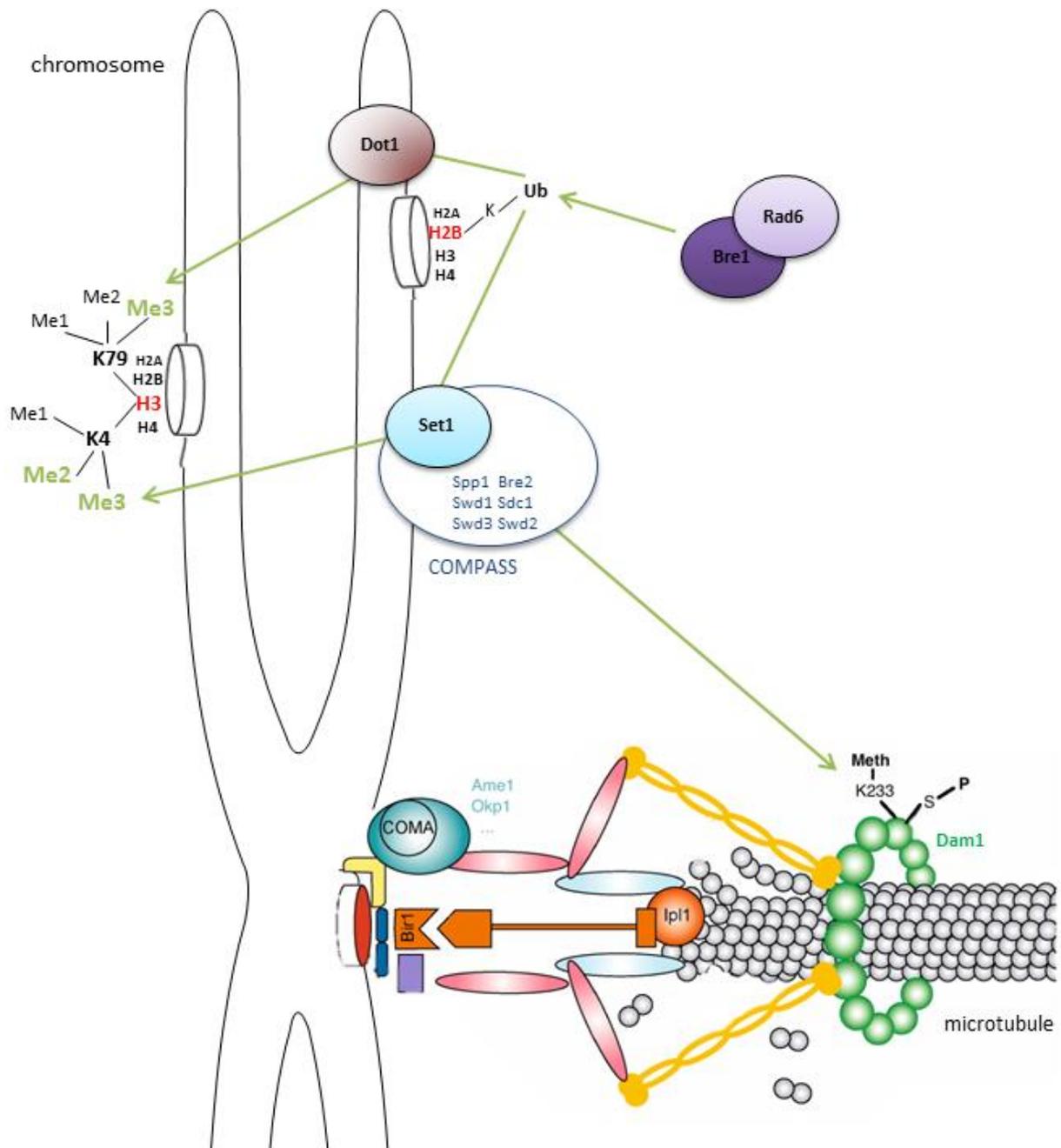
- Set1, Swd1 et Swd3 sont nécessaires pour la formation et la stabilité du complexe et leur délétion conduit à la perte de mono-, di- et triméthylation de H3K4.
- Swd2 est la seule sous-unité essentielle à la survie de la cellule et est partagée avec d'autres complexes, comme par exemple le « cleavage and polyadenylation factor » qui est important pour la terminaison de la transcription des gènes des « snoRNA » (small nucleolar RNA) [61–63].
- L'absence de Spp1 provoque une diminution de 80 % de la triméthylation de H3K4 et n'a par contre que peu d'effet sur la mono- et diméthylation de H3K4.
- Enfin, Sdc1 et Bre2 sont requis pour la di- et triméthylation de H3K4 et non pour la monométhylation.

Le fait qu'H2Bub active la méthylation de l'histone H3K4 est caractéristique d'une « trans » activation. Il ne s'agit pas de la seule qu'on puisse attribuer à H2Bub, en effet, cette marque est aussi nécessaire pour la transactivation d'une seconde histone méthyltransférase, Dot1 ([58, 64] Figure 7). En l'absence d'H2Bub, on perd globalement la triméthylation de H3K79, avec en particulier une perte de triméthylation de H3K79 au niveau des promoteurs ayant perdu H2Bub [65].

L'ubiquitination d'H2B n'est donc que le premier signal d'une cascade de modifications d'histone. Il n'est pour l'instant pas encore établi la distance à laquelle se fait cette régulation. Est-ce uniquement au niveau du nucléosome ou du gène ou aussi au niveau du génome entier? Par exemple, la triméthylation de H3K4 est uniquement associée au promoteur, alors que H2Bub est retrouvé sur l'ensemble du gène [65].

La di- et triméthylation d'H3K4 sont des marques abondantes qui corrélient avec une transcription active [66]. Pourtant leur influence réelle sur la transcription n'est que peu connue. Une étude transcriptomique réalisée en 2012, révèle qu'étonnamment la perte de triméthylation d'H3K4 n'a que très peu d'effet sur la transcription [67]. De même, la perte combinée de H3K4 di- et triméthylé n'engendre une augmentation de la transcription que d'une centaine de gènes, qui sont les mêmes lorsque l'on perd en plus la monométhylation d'H3K4. Des conclusions similaires ont été obtenues chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* [68], où la perte de méthylation d'H3K4 n'augmente la transcription que de certains gènes. Il semble donc qu'on ne puisse pas avancer de modèle simple pour résumer l'effet des modifications d'H3K4, mais que leurs effets soient à nouveau très gène spécifique.

De plus en plus d'études montrent que les lysines méthyltransférases ont aussi des cibles qui ne sont pas des protéines d'histones, ce qui leur a valu d'être renommées « lysine méthyltransférases » au lieu de « histone méthyltransférases » en 2007 [69]. Typiquement, Set1 au sein du complexe COMPASS est connue pour venir méthyler la protéine Dam1 ([70] Figure 7). Dam1, en complexe avec huit autres protéines, va former un cercle autour des microtubules lors de la mitose [71]. Cette protéine est essentielle car elle permet une ségrégation correcte des chromosomes et le maintien de l'intégrité du fuseau [72]. La méthylation de cette protéine a lieu au niveau de lysine K233 et affecte directement la phosphorylation des sérines environnantes [73]. En effet, en plus d'être méthylée, cette protéine est aussi phosphorylée par Ipl1, l'orthologue d'Aurora B, une kinase essentielle en mitose [74, 75]. La méthylation de Dam1 par Set1 permet ainsi d'inhiber la phosphorylation incorrecte des sérines 232 et 234 environnantes et de maintenir la fonction de Dam1 intacte [73]. Il est intéressant de constater que cette méthylation est Bre1 dépendante. En plus de leurs rôles dans l'expression des gènes, les modifications post-transcriptionnelles apposées au niveau d'une histone



**Figure 7 : Trans-activation de Dot1 et COMPASS par H2Bub**

L'ubiquitination d'H2B est un signal de transactivation pour deux lysines méthyltransférases, Dot1 et Set1 au sein du complexe COMPASS. Cela va permettre la triméthylation de K3K79, la di-/triméthylation de H3K4 ainsi que la méthylation d'une protéine non histone, Dam1. Dam1 fait partie d'un complexe qui forme un cercle autour des microtubules au cours de la mitose. Elle permet ainsi le bon attachement du kinétochore aux microtubules et la ségrégation correcte des chromosomes.

peuvent donc aussi avoir des conséquences directes sur des fonctions cellulaires complexes comme la mitose.

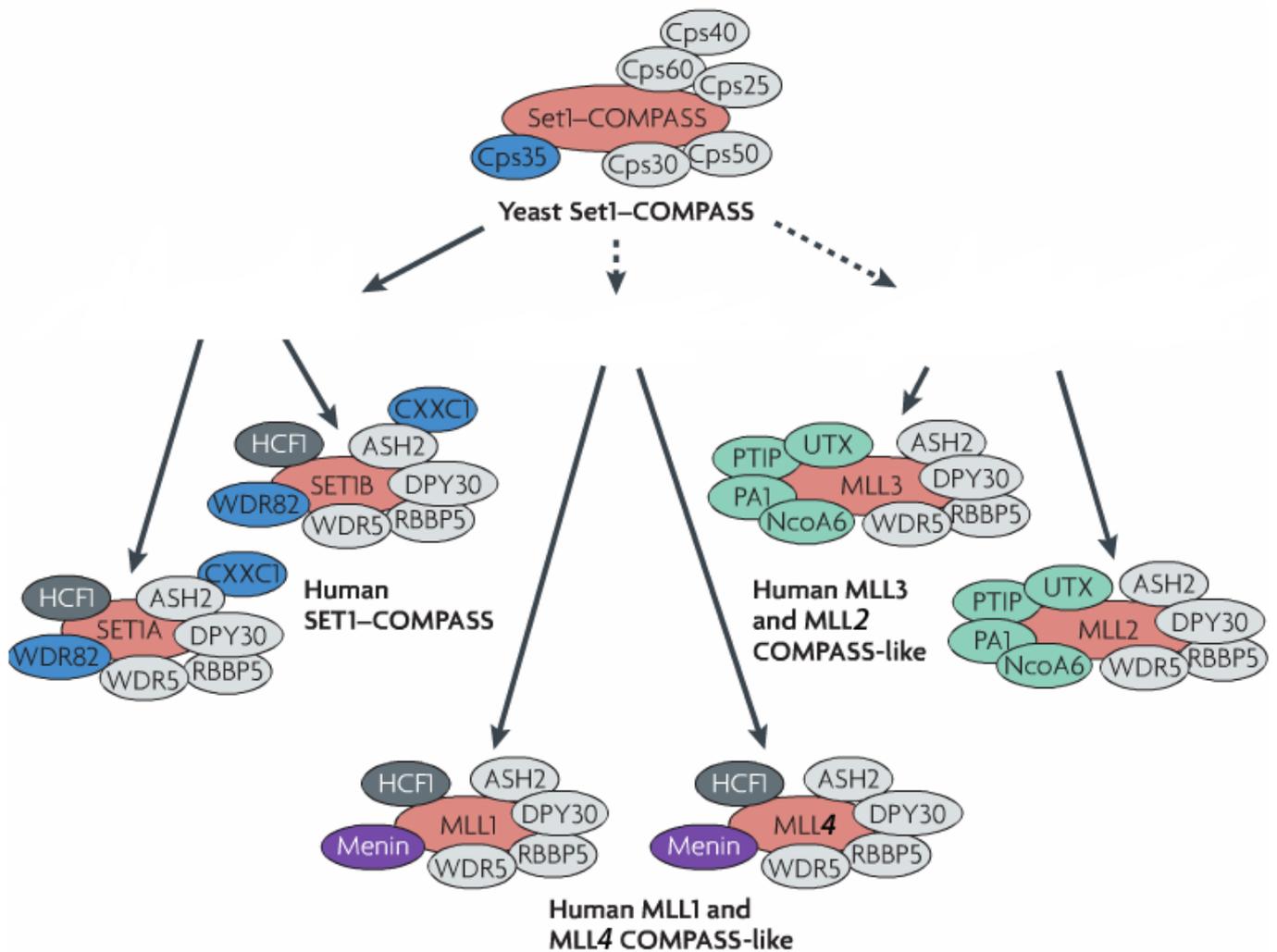
## 2) Chez l'Homme

Chez l'Homme, l'existence de cette trans-activation n'est pas encore parfaitement établie. En effet, certaines études ont montré que le niveau d'ubiquitination d'H2B corrélait très précisément avec la méthylation de H3K79 et la di- et triméthylation d'H3K4 [44, 76]. Dans une autre étude, il a été montré que la perte d'H2Bub n'engendrait qu'une perte de 50% de la triméthylation de H3K4 [45]. Enfin, durant la différenciation musculaire, l'ubiquitination d'H2B est perdue, sans que cela n'ait d'effet sur la triméthylation de H3K4 [77]. Cela s'explique probablement par le fait que la méthylation est une marque très stable contrairement à l'ubiquitination.

Ces résultats suggèrent que le signal de transactivation d'H2Bub vers les lysines méthyltransférases concernées est probablement plus complexe chez les cellules de mammifères que chez la levure. Cela est très certainement lié à la variabilité des orthologues des lysines méthyltransférases associées.

En effet, Set1 possède six orthologues chez les cellules humaines, *SET1A/B (KMT2F/KTM2G)* et *MLL1/2/3/4 (KMT2A/D/C/B)* ([78] Figure 8). Ces six orthologues sont retrouvés dans au moins six complexes composés chacun de protéines communes ou non aux autres complexes. Ainsi, les complexes contenant Set1A et Set1B sont considérés comme étant les H3K4 méthyltransférases majeures, alors que Mll1-4 auraient des fonctions plus gène spécifique [79]. Cette idée est cohérente avec les résultats obtenus par Ortega-Molina *et al.*, qui montrent que le *silencing* de MLL2 ne conduit pas à une perte globale de H3K4 mono- ou diméthylé [80], mais à une diminution de ces marques au niveau de certains *enhancers*. Ils montrent aussi que les gènes sous l'influence de ces *enhancers* sont d'ailleurs fréquemment surexprimés dans les tumeurs mutées pour MLL2. D'autres sous unités, communes aux six complexes sont aussi impliquées dans la processivité de l'enzyme. Ainsi, le knock-down d'*ASH2L* engendre une perte globale de la triméthylation de H3K4 sans avoir d'effet majeur sur la di- ou monométhylation [81].

Dans une étude de 2007, il a été montré que globalement la répartition des méthylations au niveau du génome dépendait fortement du niveau de transcription des gènes [82]. Ainsi, la monométhylation de H3K27, H3K9, H4K20, H3K79, H2BK5 ainsi que la mono-, di- et triméthylation de H3K4 est liée à l'activation de la transcription des gènes, alors que la triméthylation de H3K27, H3K9 et H3K79 est liée aux gènes réprimés. Il existe donc des profils bien distincts de répartition de la méthylation des histones en fonction de l'activité du gène. En ce qui concerne H3K4, il y a donc une corrélation forte entre méthylation de H3K4 et la transcription active. Pourtant, *in vitro*, la triméthylation de H3K4 n'a pas d'effet sur la transcription [83]. Cela est très certainement dû au fait que H3K4 triméthylé va être à son tour lu par des *readers* et ceux sont ces marques-là qui vont potentiellement activer la transcription des gènes [84]. Néanmoins, H3K4 triméthylé peut être à la fois lu par des complexes qui vont apposer des modifications associées aux gènes fortement transcrits, mais aussi parfois aux gènes réprimés. Cela illustre à nouveau la complexité des interactions entre les modifications d'histones où les effets *locus* spécifiques doivent être pris en



**Figure 8 : La famille COMPASS**

Chez la levure, il n'existe qu'un seul complexe COMPASS. De la levure à l'Homme, la famille COMPASS se divise en six qui sont tous capables de méthyler H3K4. On constate que certaines sous-unités sont communes (ASH2, WDR5, RBBP5, DPY30) et d'autres sont plus ou moins spécifiques. La sous-unité catalytique de chaque complexe est représentée en rouge. Illustration inspirée de la revue d'Ali Shilatifard [78].

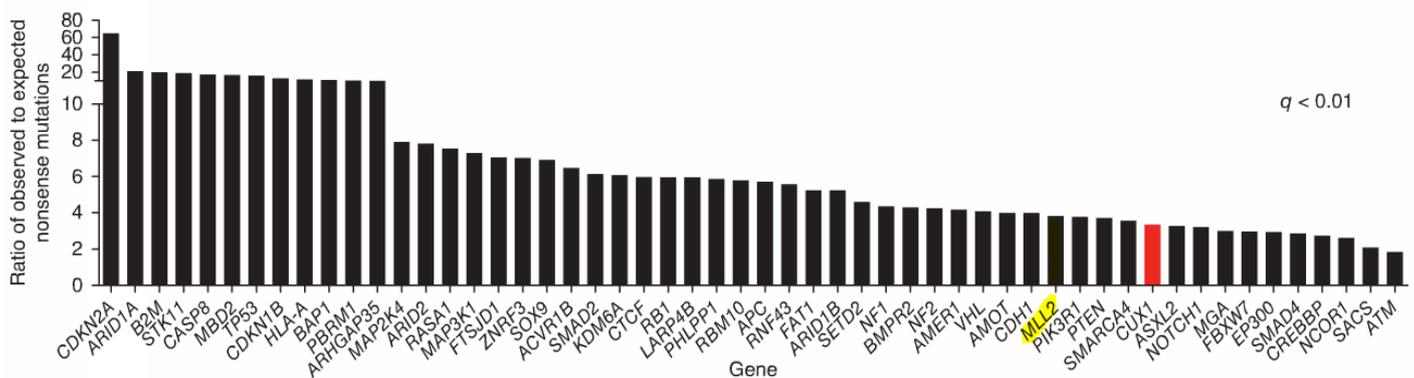
compte. Nous sommes donc encore très loin de comprendre l'effet réel de ces modifications d'histones et de leurs conséquences sur la transcription. Pourtant, l'importance de ces modifications est attestée par le fait que les orthologues de *SET1* sont très fréquemment mutés dans les cancers. Par exemple, *MLL1/KMT2A* est sujet à de fréquentes translocations chromosomiques, qui conduisent à des transcriptions aberrantes et finalement induisent le développement de leucémies (« acute myeloid leukemia » AML et « acute lymphoid leukemia » ALL) [85, 86]. De façon intéressante, *MLL2/KMT2D* a été identifié comme étant un gène muté à une fréquence très importante parmi plus de 7 500 cancers divers ([87] Figure 9).

Cela est retrouvé dans divers études qui montrent que *MLL2/KMT2D* est fréquemment muté dans les hépatocarcinomes [88], dans les médulloblastomes infantiles [89] et dans les lymphomes folliculaires (89 % des tumeurs séquencées mutées) et des cellules B (32 % des tumeurs séquencées mutées) [90]. Cette fréquence de mutation ne peut pas être due au hasard et pointe *MLL2* comme suppresseur de tumeur. En effet, sa délétion engendre le développement de lymphomes chez la souris [80]. Bien que la mono- et diméthylation de H3K4 ne soient globalement pas affectées dans les souris *KMT2D*<sup>-/-</sup>, les auteurs observent des pertes totales de ces marques au niveau de locus spécifiques justement impliqués dans le développement des lymphomes. Les auteurs obtiennent le même résultat en analysant de grands échantillons de cellules provenant de patients atteints de lymphomes et en comparant ceux mutés ou non pour *MLL2*. Ces résultats suggèrent un lien direct entre modifications d'histone et développement tumoral.

Bien qu'identifiées il y a de nombreuses années, les modifications d'histones/protéines ont encore bien souvent des rôles très peu clairs. Il apparaît de plus en plus évident que le « code des histones » est beaucoup plus compliqué à déchiffrer que ce qui avait été initialement espéré. Il est néanmoins certains que ces modifications jouent des rôles importants, notamment puisque les gènes, qui codent pour ces enzymes de modifications, sont mutés à des fréquences qui ne peuvent être incombées au hasard dans des cellules cancéreuses très variées. De plus, il est aujourd'hui établi que leurs fonctions sont importantes dans la régulation de multiples processus cellulaires. Je reviendrai sur l'une d'entre elle en particulier, qui concerne le rôle des modifications d'histone dans la régulation du cycle cellulaire dans la fin de cette introduction.

## 4. Cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire est fondamentale pour la croissance, le développement et la reproduction de tous les organismes vivants. Le cycle cellulaire eucaryote est contrôlé par un ensemble de protéines qui forment un réseau d'interactions et d'intégration de signaux, qui sont globalement conservés de la levure à l'Homme. A ce titre, l'utilisation d'organismes modèles pour mieux appréhender la complexité de ces réseaux régulateurs est un atout qui a fait ses preuves. En effet, la découverte des cyclines, des cyclines dépendantes kinases (CDK), des *checkpoints* ou encore des voies de dégradation des acteurs du cycle cellulaire ont souvent été découverts tout d'abord dans des organismes modèles, puis leurs principes ont pu être généralisés. C'est pourquoi dans cette quatrième partie, je vais tout d'abord développer les grandes caractéristiques du cycle cellulaire chez la levure, en me concentrant particulièrement sur la G1, puis élargir ces principes aux eucaryotes supérieurs.



**Figure 9 : Gènes dont la fréquence de mutation est plus élevée que celle attendue**

Cet histogramme montre les gènes qui sont plus fréquemment mutés que le taux de mutation. C'est-à-dire, les gènes dont la mutation ne peut pas être due au hasard, car trop fréquente. Cette étude bio-informatique a été réalisée sur 7651 séquences de génome provenant de 28 types tumoraux différents. Uniquement 54 gènes ont été retrouvés comme mutés à une fréquence plus importante que celle attendue si elle était due au hasard. On retrouve parmi eux, *MLL2* qui est muté 3,5 fois plus fréquemment que le taux mutation. On retrouve aussi p53 en bonne position avec une fréquence de mutation multipliée par environ 20. Figure tirée de Chi C Wong *et al.*, 2014 [87].

## a) Le cycle cellulaire chez la levure

### 1) G1, S, G2/M

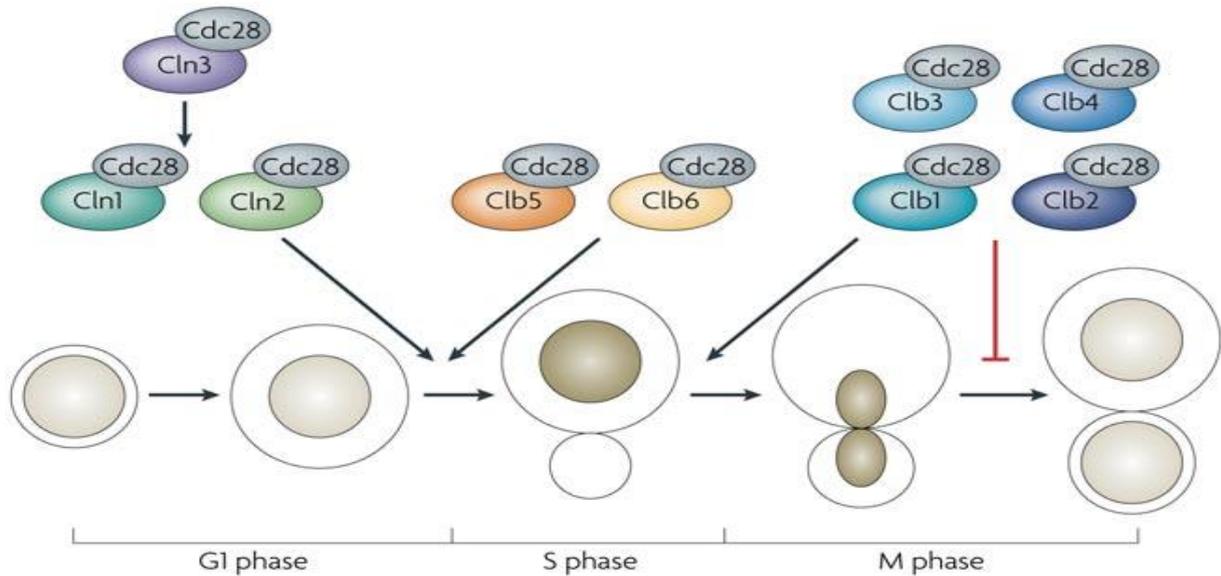
Le cycle cellulaire représente l'ensemble des processus qui conduisent à l'obtention de deux cellules à partir d'une cellule mère. La première phase du cycle est la G1, pour « *Gap 1 phase* », au cours de laquelle la cellule va intégrer les signaux extérieurs et décider d'entrer ou non dans un nouveau cycle de division. S'en suit ensuite la phase S, pour « *DNA synthesis* », au cours de laquelle la cellule va, entre autres, dupliquer son génome. L'on finit avec les phases G2, pour « *Gap 2 phase* », et M, pour « *mitosis* » qui vont aboutir à la ségrégation des chromosomes et l'obtention de deux cellules filles. La plupart de ces événements cellulaires sont dépendants de l'activité de la principale cycline dépendante kinase de levure, Cdk1 aussi appelée Cdc28, qui a été découverte dans les années 1970 par Leland H. Hartwell [91]. Cdc28 est une sérine thréonine protéine kinase qui, comme toutes les CDK, est dépendante pour son activité de sa liaison à des cyclines [92]. Les premières cyclines de G1 ont été découvertes chez la levure du fait que leur mutation affectait la taille et la prolifération cellulaire [93]. En 1990, la découverte de l'association de Cdc28 à différentes cyclines au cours du cycle a marqué un tournant dans la compréhension de la régulation du cycle cellulaire ([94] Figure 10).

Au début de la G1, Whi5 inhibe la transcription des gènes permettant l'avancée dans le cycle cellulaire ([95] Figure 11). Cela est dû au fait qu'il lie et inactive les deux complexes de facteurs de transcription, Swi4/Swi6 (SBF) et Mbp1/Swi6 (MBF) [96, 97], nécessaires à la transcription d'environ 200 gènes impliqués dans la transition G1/S [98]. Cette inhibition va être levée par la première cycline de G1, Cln3 pour « *cyclin 3* » [99] qui, en complexe avec Cdc28 (Cln3-Cdc28), va entrer dans le noyau et phosphoryler Whi5 [100]. Cette phosphorylation va engendrer la sortie d'une partie des protéines Whi5 du noyau vers le cytoplasme et permettre ainsi la transcription des gènes de G1/S. Parmi eux, les deux autres cyclines de G1, Cln1 et Cln2, ainsi que les cyclines de la phase S, Clb5 et Clb6, vont être exprimées et certaines d'entre elles (Cln1- et Cln2-Cdc28) vont à leur tour venir phosphoryler Whi5 pour permettre sa sortie complète du noyau [101]. Clb5 et Clb6 sont maintenus inactifs par Sic1 durant la G1 [102]. À l'entrée de S, Cln1, Cln2, Cln3 et Sic1 sont dégradés, ce qui va permettre à Clb5- et Clb6-Cdc28 de venir phosphoryler leurs cibles pour permettre la réplication du génome. Enfin, les cyclines de mitose, Clb1-4, vont permettre la progression en G2 et mitose [103] et ainsi à l'obtention de deux cellules filles.

Il est important de réaliser que l'avancée dans le cycle est en réalité beaucoup plus intégrée et complexe. Par exemple, dans ce modèle, Cln3 est le premier acteur de la G1 et paraît être essentiel, puisqu'il est le plus en amont, pour la progression du cycle. Pourtant, *CLN3* n'est pas un gène essentiel pour la survie cellulaire. Globalement, mis à part *CDC28*, aucun des gènes codant les acteurs du cycle mentionnés plus haut ne sont essentiels. Cela s'explique en partie par la redondance des cyclines entre elles. En effet, seul le triple mutant *cln1 cln2 cln3* est létal [104] et ce mutant peut être sauvé par la surexpression de n'importe laquelle des cyclines de G1 (*CLN1*, *CLN2* ou *CLN3*), mais aussi de la phase S (*CLB5* ou *CLB6*) [105]. De même, alors que Whi5 apparaît comme un régulateur essentiel de la G1, sa délétion n'est pas létale. Il existe donc une vraie plasticité qui doit être prise en compte dans l'analyse des résultats.

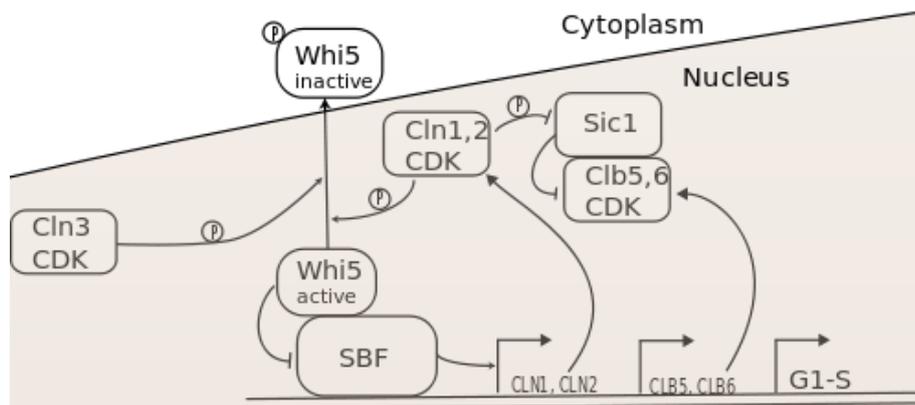
### 2) Checkpoint de G1

Le START est un checkpoint majeur de la G1 chez la levure, qui est appelé « *restriction point* » chez les cellules de mammifères. Il correspond à la sortie de Whi5 du noyau et ainsi à la levée de l'inhibition de transcription des gènes de G1/S. C'est lors de ce checkpoint que la décision de



**Figure 10 : Cyclines de levure**

Les cyclines de levure se partagent principalement une seule « cycline-dépendante kinase », Cdc28. Les cyclines de G1 (Cln1, Cln2 et Cln3) promeuvent l'émergence du bourgeon, la duplication du *spindle pole body* ainsi que l'activation des cyclines de la phase S. Clb5 et Clb6 permettent l'avancée de la réplication et Clb1-4 la mitose. Les cyclines mitotiques inhibent la sortie de mitose tant que la ségrégation des chromosomes n'est pas terminée. Illustration tirée de J.Bloom et F.Cross 2007 [95].



**Figure 11 : Transition G1/S**

Cln3-Cdc28 va venir phosphoryler Whi5, déclenchant sa sortie du noyau et la transcription des gènes de G1/S. Parmi eux, Cln1 et Cln2, qui vont à leur tour phosphoryler Whi5 pour permettre la levée complète de l'inhibition de la transcription. Clb5 et Clb6, cyclines de S, sont maintenues inactives par Sic1. En fin de G1, c'est Cln1 et Cln2-Cdc28 qui vont phosphoryler Sic1 et induire sa dégradation, libérant ainsi Clb5/6.

s'engager ou non dans un nouveau cycle de division est prise en fonction des conditions environnementales [106]. L'activateur le plus en amont du START étant Cln3 [107], c'est lui qui est généralement régulé par les variations du milieu extérieur:

- Le glucose régule positivement le niveau d'ARN messagers de *CLN3* en se liant à son promoteur [108].
- En absence d'une source d'azote, Cln3 est dégradé, sa transcription est inhibée et cela engendre un arrêt en G1 [109].
- En conditions limitantes en phosphate, on observe une baisse de la transcription de *CLN3* et un arrêt en G1 [110].

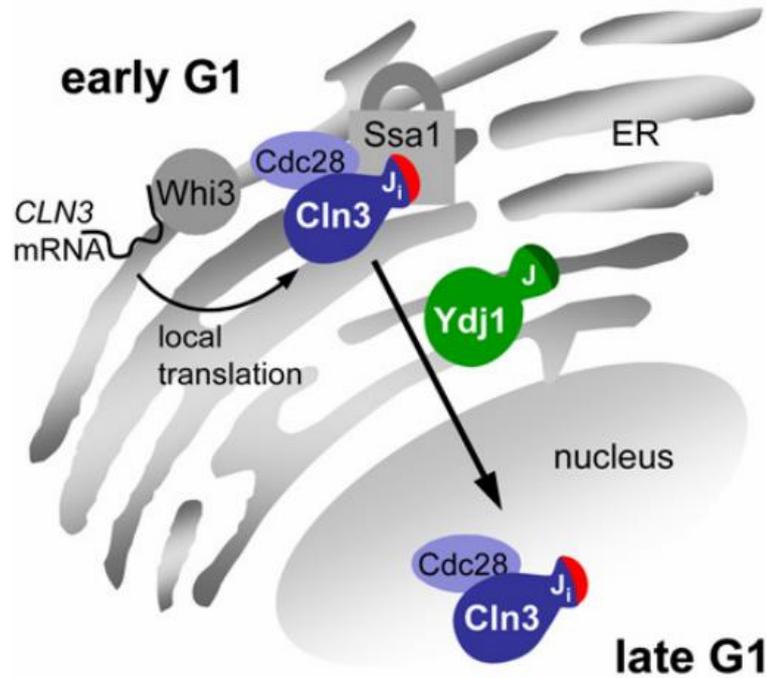
Ces régulations sont facilitées par le fait que Cln3 est une protéine peu abondante et très instable [111, 112], dont le niveau répond rapidement à des changements nutritionnels, permettant à la cellule de s'adapter rapidement à des variations environnementales.

Lorsque les nutriments ou les autres signaux extérieurs sont maintenus constants, l'expression de *CLN3* n'est que peu régulée et Cln3 est présente dès le début de la G1 [111]. Or, on sait qu'en condition sauvage les cellules atteignent une taille minimale avant de passer le START [113]. Des mécanismes additifs existent donc pour restreindre l'activation de Cln3-Cdc28 à la fin de la G1. En 2007, il a été montré qu'en début de G1, Cln3-Cdc28 est en fait maintenu à l'extérieur du noyau par sa liaison au réticulum endoplasmique (RE) via les chaperonnes, Ssa1/2 [100] et que son relargage se fait de manière cycle cellulaire spécifique en fin de G1. Ils concluent que c'est la chaperonne Ydj1 qui est limitante au cours du cycle cellulaire et que lorsqu'elle devient suffisamment abondante, elle permet d'abolir la liaison Cln3-Cdc28-Ssa1/2 et de permettre ainsi le relargage de Cln3-Cdc28 vers le noyau (Figure 12). Ainsi, ils proposent que cela soit l'abondance des chaperonnes qui soit à la base de la signalisation permettant de restreindre l'activation de Cln3, via sa séquestration hors du noyau, jusqu'à avoir atteint la taille requise. La régulation subcellulaire de Cln3 au cours du cycle est très convaincante dans cet article, néanmoins leur modèle ne semble pas pouvoir rendre totalement compte du phénomène. Par exemple, la délétion combinée de *ssa1 ssa2* engendre une diminution de la fréquence de Cln3 dans le noyau, alors que c'est le résultat inverse auquel on pourrait s'attendre (Figure 13). De même, c'est la surexpression combinée d'Ydj1 et Ssa1 qui engendre une forte augmentation de la proportion de cellules avec Cln3 dans le noyau. On s'attendrait pourtant à ce que cela soit la surexpression seule d'Ydj1 qui ait cet effet sur la localisation subcellulaire de Cln3, puisque cette protéine est considérée dans leur modèle comme étant limitante. Il reste donc encore des acteurs à découvrir afin de pouvoir pleinement appréhender ce nouveau mécanisme.

En plus d'être régulée au niveau transcriptionnel et protéique, Cln3 est donc aussi régulée *via* sa localisation subcellulaire. A ces trois niveaux de contrôle, on commence à en ajouter peu à peu un quatrième, qui est la régulation de la chromatine. De plus en plus d'études montrent un lien fonctionnel, plus ou moins réciproque, entre régulation de la chromatine et cycle cellulaire.

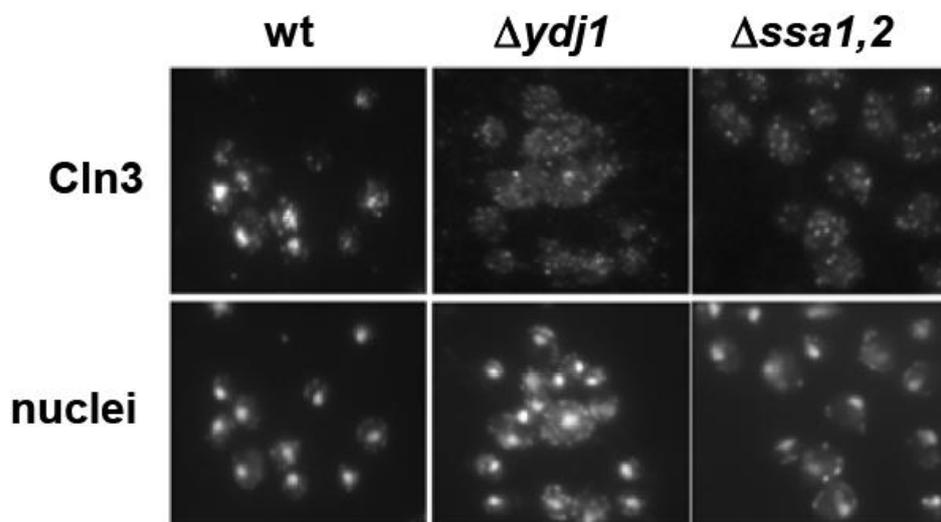
### 3) Cycle cellulaire et chromatine

Un premier lien évident, connu depuis très longtemps, entre cycle cellulaire et chromatine, est la mitose. En effet, lors de cette phase du cycle cellulaire les chromosomes vont se compacter, *via* des changements de leur chromatine, ce qui va permettre la ségrégation des chromosomes et donc le bon déroulement de la mitose [114]. Par exemple, l'histone H3 est phosphorylée au niveau de sa sérine 10 durant la mitose et cette modification est liée très fortement à la bonne condensation des chromosomes des levures [115] aux cellules de mammifères [116].



**Figure 12 : Séquestration de Cln3-Cdc28**

Dans ce modèle, la rétention de Cln3 au niveau du RE se fait *via* son domaine J qui est fixé et bloqué par les chaperonnes Ssa1/Ssa2. Cela empêche ainsi l'import de Cln3 prématuré. En fin de G1, lorsque Ydj1 est disponible, car ayant fini ses autres activités de « *fold*ing », il vient entrer en compétition avec Cln3 pour la liaison à Ssa1/Ssa2. Permettant ainsi la libération de Cln3-Cdc28 et son entrée dans le noyau. Illustration de Vergés *et al.*, 2007 [100].



**Figure 13 : Effets des délétions d'*ydj1* ou *ssa1/2* sur la localisation de Cln3**

Les auteurs ont réalisé des expériences d'immunofluorescence dirigées contre Cln3. Dans la souche sauvage, le signal de Cln3 est retrouvé sous forme de spots qui co-localisent avec le noyau dans certaines cellules et d'autres non. On constate que lorsqu'*ydj1* est délété, la proportion de cellules contenant Cln3 sous forme de spot dans le noyau chute, ce qui est globalement attendu. De même, la délétion de *ssa1 ssa2* engendre une forte diminution de la fréquence de Cln3 dans le noyau. Ce résultat est moins attendu si l'on considère le modèle de la figure 12. Figure de Vergés *et al.*, 2007 [100].

Un autre exemple de la contribution des modifications de la chromatine à l'expression de gènes dont l'expression varie en fonction du cycle cellulaire, est celui des gènes *HO* et *CLN2* [117]. Ces deux gènes sont activés par le même facteur de transcription, SBF. *HO* code pour une endonucléase qui clive le locus *MAT* permettant les changements de signe de la levure. A ce titre, *HO* est fortement réprimée puisque son expression inappropriée pourrait engendrer des dommages à l'ADN non souhaités. De plus, *HO* n'est exprimé que dans la cellule mère. A l'inverse, *CLN2* est transcrit, comme nous l'avons vu, en fin de G1 et est exprimée lors de chaque cycle cellulaire. Donc, bien que régulées par le même facteur de transcription, leur expression est très peu semblable grâce à des structures chromatiniennes au niveau de leur promoteur qui sont très différentes. En effet, la transcription du gène *HO* est difficile à activer car elle demande l'éviction des nucléosomes présents au niveau son promoteur. A l'inverse, le promoteur de *CLN2* se trouve dans une région NDR pour « *nucleosome depleted region* » ce qui favorise sa transcription par le SBF sans que cela ne nécessite l'intervention de facteurs additionnels. Cet exemple nous montre bien le rôle essentiel que joue la chromatine dans la régulation des gènes, afin de favoriser ou non leur induction.

On peut ainsi trouver des études multiples impliquant régulation des cyclines et chromatine :

- l'activation de la transcription de *CLB2*, cycline de mitose, commence par une première étape d'acétylation des histones H4 adjacent au promoteur de *CLB2*, permise grâce à l'éviction du complexe histone déacétylase (HDAC) Rpd3 [118]. Puis, d'autres acteurs interviennent pour finalement permettre la transcription correcte de *CLB2* en G2.
- Plus surprenant, il a été montré que la surexpression des histones H2A et H2B induisait une diminution de la transcription de *CLN3* et conduisait à un fort ralentissement en G1 [119]. Ce résultat indique cette fois un lien possible entre la régulation du cycle cellulaire et la dynamique de formation de la chromatine.

Tous ces exemples pointent plutôt vers une régulation de l'expression des gènes du cycle cellulaire par la chromatine et non l'inverse. Toutefois, l'interaction entre chromatine et cycle cellulaire peut probablement être considérée comme un mécanisme réciproque. En effet, une étude publiée par Schulze *et al.*, a montré que la délétion de *swi4* ou *swi6* induisait une perte de la diméthylation de H3K79, sans affecter la triméthylation de cette même lysine [65], suggérant ainsi un lien fort entre cette marque et le cycle cellulaire. Et en effet, la diméthylation de H3K79 diminue en G1 et pique en G2/M, alors que la triméthylation de H3K79 est constante au cours du cycle. De plus, une grande partie des promoteurs des gènes exprimés en fin de mitose/début de G1 sont enrichis uniquement en H3K79 diméthylés. Ainsi, ils proposent un modèle où la diméthylation de H3K79 serait liée au maintien de l'inactivation des gènes de M/G1 en dehors de ces phases du cycle. Puisque la délétion de *swi4* ou *swi6* engendre une perte de diméthylation de H3K79, on peut légitimement penser que le cycle influe réciproquement sur l'apposition de ces marques.

Le rôle de la chromatine dans le contrôle de l'expression des gènes exprimés de façon cycle cellulaire dépendante, ainsi que la relation entre chromatine et les facteurs de transcriptions qui régulent ces sets de gènes commence petit à petit à être mieux appréhender. Néanmoins, il reste beaucoup à apprendre dans ce domaine qui a assurément beaucoup de potentiel.

## b) Le cycle cellulaire chez les eucaryotes supérieurs

### 1) Conservation des mécanismes de base

Chez les cellules de mammifères, il existe contrairement à la levure, plusieurs CDK utilisées durant le

cycle cellulaire. Chacune des cyclines possède aussi plusieurs isoformes, mais globalement les mécanismes de base d'avancée dans le cycle sont maintenus. En effet, au début de la G1, la protéine de rétinoblastome (Rb), globalement assimilable à Whi5, inhibe la transcription des gènes de G1/S par sa liaison au facteur de transcription E2F, globalement assimilable au SBF/MBF ([120] Figure 14). Lors de l'avancée dans le cycle, la cycline D, globalement assimilable à la cycline 3 de levure, va s'associer à Cdk4 ou Cdk6 et vont venir phosphoryler Rb. Cela engendre la dissociation de Rb de E2F et ainsi la transcription des gènes impliqués dans l'avancée du cycle cellulaire, tels que la cycline E et sa CDK, Cdk2 ([121] Figure 15). La cycline E peut être assimilée aux cyclines 1 et 2 et va, comme chez la levure, venir à son tour phosphoryler Rb afin de l'inactiver entièrement [122]. Une fois la transition G1/S franchie, Cdk2 s'associe à la cycline A, formant ainsi un complexe assimilable aux complexes Clb5-Cdc28 ou Clb6-Cdc28, ce qui va permettre le passage de la phase de synthèse. Pour finir, la mitose se déroule globalement grâce à la formation de deux complexes partageant la même kinase, Cdk1, associé à la cycline A ou la cycline B. Tout comme chez la levure, ce modèle est à relativiser. Par exemple, la cycline E n'est pas essentielle pour le développement de la souris [123], tout comme Cdk2 [124]. On peut donc conclure que globalement les principes de base du cycle sont bien conservés. Et cela est confirmé par le fait que n'importe quelle cycline de G1 de mammifère permet de supprimer la létalité synthétique du triple mutant *cln1cln2cln3* [125].

Néanmoins, l'on se rend compte que de nombreux mécanismes additionnels de régulation sont apparus au cours de l'évolution chez les eucaryotes supérieurs. Par rapport aux résultats que j'ai obtenu lors de ma thèse, qui concernent principalement la G1, je vais dans la suite de cette introduction me focaliser à décrire plus en détail la régulation de cette phase du cycle chez les cellules de mammifères.

## 2) G1 et complexité du signal

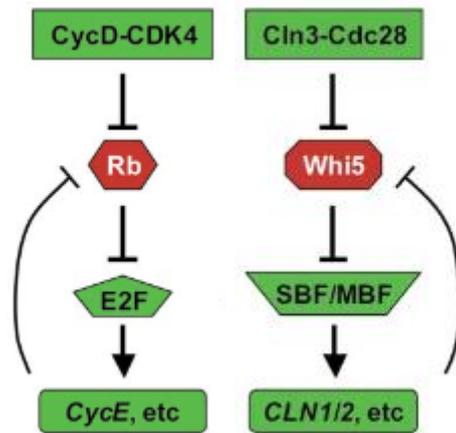
Un point qu'il faut prendre en compte chez les cellules de mammifères est que la progression en G1 va, comme chez la levure, dépendre du contexte environnemental, mais aussi d'un second facteur qui est le type cellulaire. On sait, par exemple, que le niveau de la cycline E est constamment élevé dans les cellules précoces embryonnaires, permettant ainsi d'initier la phase S dès la fin de la phase M [126], sans passer par la G1.

Il existe chez les cellules de mammifères, des inhibiteurs de cycline kinase (CKI) qui vont avoir un rôle opposé à celui des CDK. Ils sont classés en deux grandes familles :

- la famille « INK4 » qui inclue : p16 INK4A, p15 INK4B, p18 INK4C et p19 INK4D [127]. En fin de G1, les protéines de la famille INK4 entrent en compétition avec la cycline D pour la liaison aux CDK, Cdk4 et Cdk6 ([128] Figure 15).
- la famille « Cip/Kip » qui inclue : p21 CIP, p27 KIP1 et p57 KIP2 qui sont des inhibiteurs de Cdk2 (Figure 16).

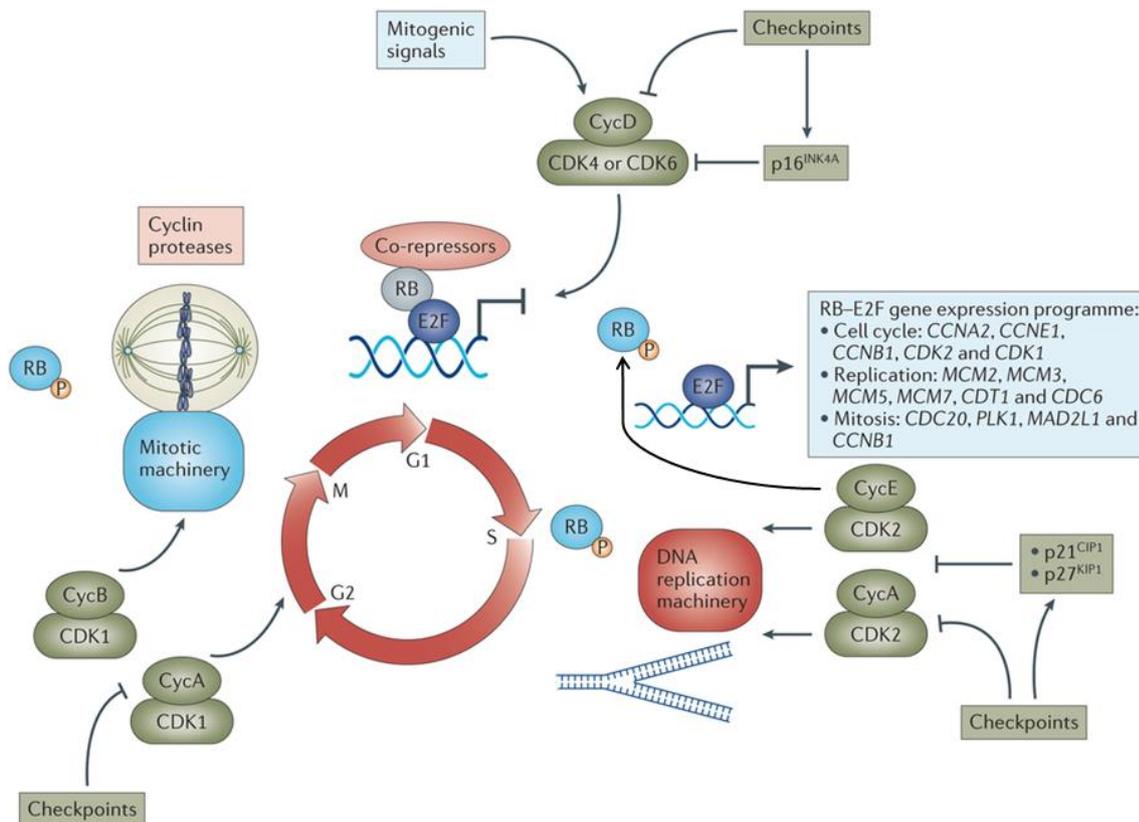
Ces protéines vont jouer un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire que cela soit en condition normale ou de stress.

Une autre différence majeure entre levure et cellules de mammifères est l'existence de la protéine p53. p53 est un facteur de transcription qui joue un rôle crucial dans les organismes multicellulaires en tant que suppresseur de tumeur. En effet, en cas de dommages à l'ADN, p53 permet d'arrêter les



**Figure 14 : Comparaison de la G1**

A gauche, une représentation schématique des acteurs de la G1 chez les cellules de mammifères. A droite, la même pour la levure. On constate l'existence d'une équivalence fonctionnelle pour chaque étape, la conservation de leurs interactions et de la boucle de rétroaction.



**Figure 15 : Cycle cellulaire chez les cellules de mammifères**

Les signaux mitotiques stimulent CDK4 et CDK6 pour promouvoir l'entrée en G1, à l'inverse des inhibiteurs de CDK (INK4A). Une fois activés, Cdk4/Cdk6 en complexe avec la cycline D vont phosphoryler Rb. Cela permet l'induction de la transcription des gènes E2F dépendants. A nouveau un *feedback* permet à la cycline E de venir elle aussi phosphoryler Rb. Les cyclines E et A en complexe avec Cdk2 vont permettre l'avancée dans la phase S. A la fin de la réplication, les cyclines A et B en complexe avec Cdk1 vont phosphoryler leurs cibles de G2. En absence de dommages à l'ADN, la progression en mitose va être activée par la cycline B. Sa dégradation subséquente est requise pour la progression en anaphase et la production de deux cellules filles. Durant la transition M/G1, Rb est déphosphorylée et le cycle recommence. Illustration inspirée de Asghar *et al.* 2015 [121].

cellules en G1/S ou G2 pour permettre la réparation des dommages ou l'induction de l'apoptose si les dommages sont irréparables [129].

Tout d'abord, les dommages à l'ADN vont être perçus par les protéines kinases ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) ou ATR (*ATM-related*) en fonction du type de dommages. ATM et ATR activent les *checkpoints* kinases CHK2 et CHK1 respectivement (Figure 16). CHK1 induit la dégradation de la phosphatase Cdc25, conduisant l'inhibition des CDKs. CHK2 et ATM signalent, *via* p53, l'induction de l'expression de p21, ce qui va, entre autres, engendrer une diminution de l'expression de la cycline E et un arrêt en G1 [130]. Lorsque p53 est mutée, ce qui est extrêmement fréquent dans les cellules tumorales (Figure 9), p21 n'est plus induit en cas de dommages à l'ADN et il n'y a donc plus d'arrêt du cycle.

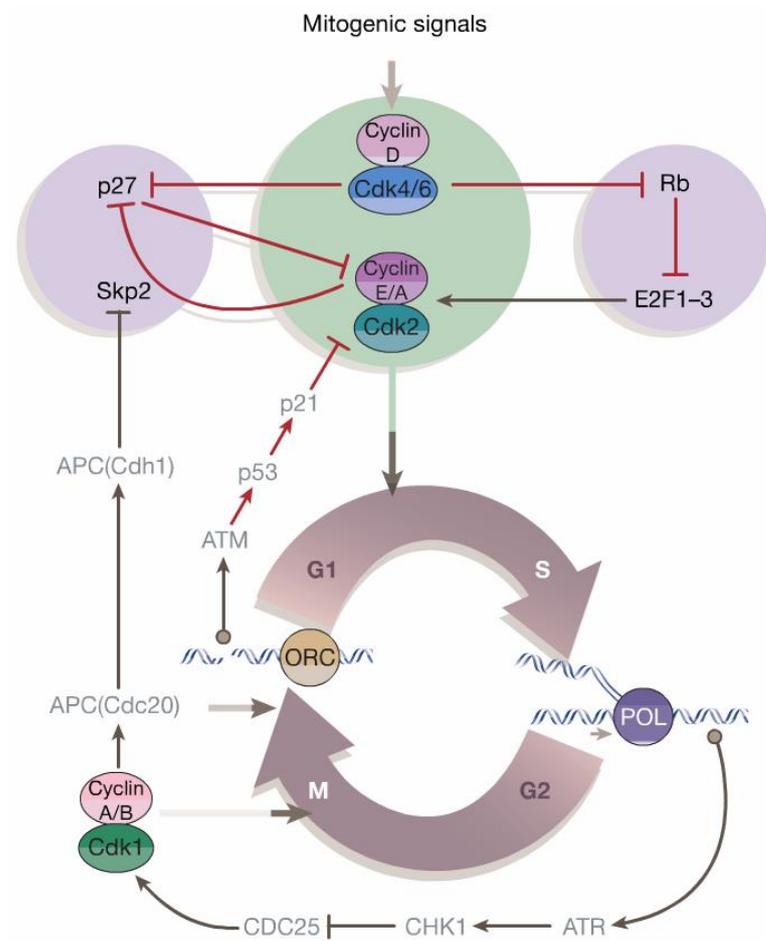
Globalement, beaucoup de protéines impliquées dans la transition G1/S sont mutées dans les cellules cancéreuses [131], avec une surexpression des CDK/Cyclines et une inhibition des CKI. Malgré leurs rôles essentiels à la fois en condition normale et tumorales, leur régulation exacte n'est pas encore appréhendée. Notamment, le rôle des modifications épigénétiques dans cette régulation et le lien entre ces modifications et la régulation du cycle cellulaire est un champ de recherche encore peu étudié.

### 3) Cycle cellulaire et modification d'histone

En 2015, un lien a été fait entre p53 et régulation de la chromatine par l'équipe de Shelley Berger [132]. p53 est mutée dans environ 50 % des cellules cancéreuses et ces mutations engendrent invariablement la perte de l'activité normale de p53. De façon intéressante, elles s'accompagnent aussi souvent de gains de fonctions de p53 (GOF p53) qui vont promouvoir le développement tumoral [133] en permettant par exemple sa liaison anormale à des facteurs de transcriptions induisant l'expression d'oncogènes variés. Les auteurs ont étudié l'interactome de GOF p53 dans un panel de lignées cancéreuses du sein. De façon très claire, GOF p53 se lie et engendre la surexpression de *MLL1*, *MLL2* et de l'acétyltransférase *MOZ*. L'inhibition de *MLL1* dans ces cellules engendre une forte diminution de la prolifération cellulaire. Il est intéressant de mettre en parallèle cette étude à celle de Ansari *et al.*, où ils montrent que le knock-down de *MLL1* dans des lignées cellulaires variées impacte directement sur l'abondance de certaines cyclines [134]. Ainsi, on peut envisager un modèle dans lequel GOF p53 active la transcription de *MLL1* qui a son tour promeut l'expression des cyclines pour augmenter la prolifération cellulaire.

Ce modèle pourrait potentiellement être élargi à d'autres enzymes de modifications des histones. Par exemple, le *knock-down* de *MLL4* affecte fortement l'expression de la cycline D1 et E1 [135]. D'autre part, la délétion de *RAD6* dans des cellules HeLa engendre une diminution de la cycline D1 alors que sa surexpression a l'effet inverse [136]. De même, dans des cellules HeLa, la délétion de *RFN20* engendre une diminution de près de huit fois de la transcription de la cycline D1 et de quatre fois celle de la cycline B1 [45]. Toutes ces études pointent donc sur un lien potentiel, mais encore très peu étudié, entre cycle cellulaire et modification d'histone.

Lors de ma thèse, j'ai pu tout d'abord établir un lien entre la sensibilité à l'AICAR et certaines modifications d'histones. Par des approches génétiques, biochimiques et d'imagerie, j'ai ensuite pu établir que ce lien était dû à un effet additif de l'AICAR et de ces modifications d'histones sur les cyclines de G1. Les orthologues de ces enzymes dans des cellules HCT116 humaines se sont eux aussi révélés être liés à la sensibilité à l'AICAR. Ces résultats sont développés dans l'article ci-dessous.



**Figure 16 : Dommages à l'ADN et p53**

Des dommages à l'ADN vont activer la voie ATM-p53, ce qui empêche l'activation des CDK grâce à p21. En effet, p21 va venir se fixer à Cdk2, inhibant ainsi son interaction avec la cycline E. Ainsi, on perd la boucle de rétroaction de la cycline E-Cdk2, qui ne va plus venir phosphoryler Rb, ce qui empêche la bonne transcription des gènes E2F dépendants, dont la cycline E et Cdk2 eux-même. On arrive ainsi à une diminution de l'expression de la Cycline E-Cdk2 et à un arrêt en G1. Un autre checkpoint a lieu avant la mitose : tant que l'ADN n'est pas entièrement répliqué, la voie ATR-CHK1 est activée pour empêcher l'entrée prématurée en mitose. Illustration tirée de Massagué 2004 [130].

## V. Travail de thèse

# “Conserved chemo-genetic synthetic interactions between AICAR and loss of histone-modifying enzymes in yeast and human cells”

### Résumé de l'article :

Beaucoup de molécules anti-tumorales ont pour inconvénients leur manque de spécificité, conduisant à des effets secondaires non désirés. Il devient de plus en plus important aujourd'hui d'identifier de nouvelles molécules ayant pour propriété d'inhiber spécifiquement la croissance des cellules cancéreuses sans avoir d'effet à la même concentration sur les cellules saines. Qu'est-ce qui différencie une cellule cancéreuse d'une cellule saine ? Lors du développement tumoral, les cellules vont acquérir des mutations qui seront propres aux cellules cancéreuses et absentes des cellules saines. L'on peut se servir de cette propriété et chercher à identifier une drogue qui inhibe spécifiquement la croissance des cellules cancéreuses porteuses de ces mutations spécifiques. Le terme employé pour qualifier cette approche est la recherche d'interactions synthétiques létales (SL). Habituellement la SL est décrite entre deux gènes, dont la délétion individuelle n'a pas d'effet, contrairement à leur délétion combinée qui inhibe fortement la croissance voire peut être létale. Ici, il s'agit d'une démarche de chemo-génétique, puisque l'interaction SL que l'on cherche à identifier est entre une drogue et une mutation.

La drogue que nous avons étudiée est l'AICAR. Il s'agit d'une molécule connue pour inhiber de nombreuses cellules cancéreuses [17-20] sans que son mode d'action exact n'ait pu être clairement établi. Nous avons choisi, dans un premier temps, de réaliser la recherche de mutants SL avec l'AICAR chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, puis avons testé la conservation de ces interactions chez des cellules humaines, HCT116. L'utilité de la levure est qu'elle permet de réaliser des cribles, donc une démarche sans hypothèse préalable, ce qui a pour avantage de ne pas restreindre les candidats. Notre crible nous a permis d'identifier un mutant, *bre1*, dont la délétion était SL avec l'AICAR, sans que cela ne soit lié à la métabolisation de l'AICAR. Il s'agit d'une E3 ubiquitine ligase qui a pour rôle principal l'ubiquitination de l'histone H2B. Il s'est avéré que de même, la délétion de sa E2 *rad6* était SL avec l'AICAR, tout comme celles du complexe *set1/COMPASS* (*reader* de H2Bub). Nous avons ensuite souhaité établir les causes de ces SL. Des expériences de FACS nous ont permis de révéler que l'AICAR provoque une accumulation de cellules en G1 et que celle-ci est très largement exacerbée dans tous les mutants SL avec l'AICAR. Notre étude a montré que les effets de l'AICAR sur la G1 étaient dus à son impact sur le transport intracellulaire d'une des cyclines de G1, Cln3. En parallèle, nous avons montré que les mutants *bre1*, *rad6*, *htbK123R* ou *set1* engendraient une forte

diminution de l'expression des deux autres cyclines de G1, *CLN1* et *CLN2*. Or, le triple mutant *cln1 cln2 cln3* est létal, contrairement à la délétion simultanée de deux cyclines ou de chaque cycline séparément. Ainsi, la combinaison de l'AICAR et des mutants a un impact simultané sur les trois cyclines nécessaires pour l'avancement en G1, condition amenant à l'inhibition de la croissance.

Une fois ce mécanisme identifié, nous avons souhaité savoir si les interactions SL établies chez la levure étaient conservées chez l'Homme. Nos siARNs dirigés contre un des orthologues de Bre1, Rnf40, contre un des orthologues de Set1, Mll2, ou contre un des orthologues de Bre2, Ash2l, ont révélés une conservation de l'interaction négative préalablement montrée chez la levure. Cette interaction est particulièrement intéressante, puisqu'elle concerne des gènes qui sont très fréquemment mutés dans les cellules cancéreuses. Par exemple, *MLL2* est muté, mutation qui engendre une perte de fonction, à haute fréquence dans les lymphomes folliculaires (89 % des tumeurs séquencées mutées) et des cellules B (32 % des tumeurs séquencées mutées) (voir introduction). Il existe donc un véritable potentiel thérapeutique dans les interactions négatives identifiées ici. Nous avons ensuite voulu savoir si cela était dû, comme chez la levure, à des effets combinés des mutations et de la drogue sur les cyclines de G1. Nos analyses ont révélé que l'AICAR n'a pas d'effet sur la cycline D1 (équivalent fonctionnel de Cln3), mais fait diminuer l'expression de la cycline E1 (équivalent fonctionnel de Cln1/2), ce qui est relativement proche des effets observés chez la levure. De même, les siARNs dirigés contre *RNF40*, *ASH2L* ou *MLL2* engendrent une diminution de l'expression de la cycline E1 ce qui est à nouveau similaire aux résultats obtenus chez la levure. Par contre, la combinaison de l'AICAR et des *knock downs* n'a pas l'effet additif observé chez la levure, c'est-à-dire que cette combinaison ne provoque pas de diminution massive de la cycline E1. On ne peut donc pas superposer parfaitement les deux modèles, bien que certains aspects semblent être bien conservés.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence des interactions SL entre l'AICAR et des mutants de modifications d'histone, conservées chez la levure et l'Homme. Ces mutations étant très fréquemment retrouvées dans de nombreuses cellules tumorales, l'AICAR apparait ici comme une molécule anti-cancéreuse potentielle. De plus, cette étude a aussi permis de révéler que des modifications d'histones impactent directement sur l'expression de certaines cyclines et ce de façon relativement conservée aussi. Cela pointe vers l'émergence d'un nouveau champ de recherche encore peu appréhendé, qui est la régulation du cycle cellulaire par les modifications d'histones [65].

1

2 **Chemo-genetic interactions between histone modification**  
3 **and the anti-proliferation drug AICAR are conserved in**  
4 **yeast and humans**

5

6 **Delphine ALBRECHT<sup>\*§</sup>, Johanna CESCHIN<sup>\*§</sup>, Jim DOMPIERRE<sup>\*§</sup>, Florian**  
7 **GUENIOT<sup>\*§</sup>, Benoît PINSON<sup>\*§</sup>, Bertrand DAIGNAN-FORNIER<sup>\*§#</sup>**

8 From <sup>\*</sup>Université de Bordeaux and the <sup>§</sup>Centre National de la Recherche Scientifique,  
9 IBGC UMR 5095, 1 rue Camille Saint-Saëns F-33077 Bordeaux 2 France

10 # Corresponding author: Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS  
11 UMR 5095, 1 rue C. Saint-Saëns CS 61390 F-33077 Bordeaux France. Tel: +33-  
12 556-999-001; Fax: +33-556-999-059; E-mail: [b.daignan-fornier@ibgc.cnrs.fr](mailto:b.daignan-fornier@ibgc.cnrs.fr)

13

14

15

16

17

18

19

20 Running title: **Chemo-genetic interactions between AICAR and loss of PTM**

21 Key words: Synthetic lethality, histone modification, cell cycle, yeast, cancer cells

22 Corresponding author: Bertrand Daignan-Fornier, Institut de Biochimie et

23 Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, 1 rue C. Saint-Saëns CS 61390 F-33077

24 Bordeaux France. Tel: +33-556-999-001; Fax: +33-556-999-059; E-mail: [b.daignan-](mailto:b.daignan-)

25 [fornier@ibgc.cnrs.fr](mailto:fornier@ibgc.cnrs.fr)

26

27 **ABSTRACT**

28 Identifying synthetic lethal interactions has emerged as a promising new therapeutic  
29 approach aimed at targeting cancer cells directly. Here, we used the yeast  
30 *Saccharomyces cerevisiae* as a simple eukaryotic model to screen for mutations  
31 resulting in a synthetic lethality with 5-Amino-4-Imidazole CarboxAmide  
32 Ribonucleoside (AICAR) treatment. Indeed, AICAR has been reported to inhibit the  
33 proliferation of multiple cancer cell lines. Here, we found that loss of several histone-  
34 modifying enzymes, including Bre1 (histone H2B ubiquitination) and Set1 (histone H3  
35 lysine 4 methylation), greatly enhanced AICAR inhibition on growth *via* combined-  
36 effects of both the drug and the mutations on G1 cyclins. Our results point to AICAR  
37 impacting on Cln3 subcellular localization and Cln1 protein level, while *bre1* or *set1*  
38 deletion affected *CLN1* and *CLN2* expression. As a consequence, AICAR and  
39 *bre1/set1* deletions jointly affected all three G1 cyclins, Cln1, Cln2 and Cln3, leading  
40 to a condition known to result in synthetic lethality. Significantly, these chemo-genetic  
41 synthetic interactions were conserved in human HCT116 cells. Indeed, knock-down  
42 of *RNF40*, *ASH2L* or *KMT2D/MLL2* induced a highly significant increase in AICAR  
43 sensitivity. Given that *KMT2D/MLL2* is mutated at high frequency in a variety of  
44 cancers, this synthetic lethal interaction has an interesting therapeutic potential.

45

## 46 INTRODUCTION

47 During malignant progression, cancer cells acquire multiple mutations, including loss  
48 of function of tumor suppressors and gain of functions of proto-oncogenes (Hanahan  
49 and Weinberg 2011). These mutations are specific to cancer cells and absent in  
50 normal tissues. These changes can be exploited to specifically target and kill tumors  
51 while sparing the surrounding healthy cells. The identification of compounds causing  
52 a synthetic lethality with particular mutations associated with cancer cells, have thus  
53 emerged as a promising new therapeutic approach (Thompson *et al.* 2015).  
54 Synthetic lethality is defined as the interaction between co-essential genes. As such,  
55 inhibition of their individual function has no effects on cell survival, while their co-  
56 inhibition results in decreased cell proliferation or even cell death. Loss of gene  
57 function can be due to a mutation or achieved by chemical means. The combination  
58 of genetic and chemical inhibition by a specific drug is known as chemo-genetic.  
59 Here, by using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we searched for mutations  
60 leading to synthetic lethality with the prodrug 5-Amino-4-Imidazole CarboxAmide  
61 Ribonucleoside (AICAR).

62 In cells, AICAR is metabolized into the monophosphate nucleotide form, ZMP  
63 (Figure S1A), a natural intermediate of the purine biosynthesis pathway (Daignan-  
64 Fournier and Pinson 2012) which is present in all cells, except a few parasites lacking  
65 this pathway. In yeast cells, ZMP has been shown to play important regulatory roles,  
66 at physiological concentrations (Rébora *et al.* 2001, 2005). Indeed, ZMP can directly  
67 promote the interaction between two pairs of transcriptions factors, Bas1-Pho2 and  
68 Pho4-Pho2, resulting in finely concerted activation of the purine biosynthesis and  
69 phosphate utilization pathways (Pinson *et al.* 2009). In mammalian cells, AICAR is

70 widely used as a pharmacological AMP-mimetic to stimulate the AMP-activated  
71 protein kinase (AMPK) (Sullivan *et al.* 1994). AICAR has also been shown to be a  
72 potential anti-tumor drug (Rattan *et al.* 2005; Tang *et al.* 2010). Indeed, AICAR  
73 treatment selectively inhibits the proliferation of aneuploid cells *in vitro* and affects  
74 tumor cell growth in xenograft models (Tang *et al.* 2010). Moreover, a phase I/II  
75 open-label clinical study was successfully conducted to determine the safety and  
76 tolerability of AICAR to treat patients with chronic lymphocytic leukemia (Neste *et al.*  
77 2012). Although many effects of ZMP are at least partially dependent on AMPK, in  
78 many cases the effects of ZMP are AMPK-independent (Daignan-Fornier and Pinson  
79 2012) suggesting the existence of additional ZMP targets. Importantly, our recent  
80 results demonstrate that the anti-proliferative effects of AICAR are not affected in  
81 AMPK $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 KO embryonic fibroblasts (Ceschin *et al.* 2014). Thus, these effects are  
82 AMPK-independent. This result is in agreement with recently published work by  
83 others (Liu *et al.* 2014) and uncovers the acute necessity to identify the ZMP targets  
84 that are critical for its anti-proliferative effects. To search for new ZMP-targets, we  
85 took advantage of the yeast model in which the AMPK-homolog Snf1 appears  
86 unaffected by ZMP accumulation (Pinson *et al.* 2009). This likely reflects the fact that  
87 Snf1, contrarily to its mammalian counterparts, is activated by ADP and not AMP  
88 (Mayer *et al.* 2011). Yeast is therefore a very convenient model to identify new ZMP  
89 targets and decipher the molecular mechanisms connecting ZMP accumulation to its  
90 cytotoxic and antiproliferative effects. Finally, AICAR is also considered as a potential  
91 doping agent as sedentary mice fed with AICAR show increased endurance (Narkar  
92 *et al.* 2008). For all these reasons, AICAR effects on normal and cancer cells require  
93 further understanding.

94 A body of evidence over the past two decades demonstrates that key post-  
95 translational modifications (PTMs) are found on histones (Tessarz and Kouzarides  
96 2014). These histone PTMs occur at specific amino acids and include acetylation,  
97 ADP ribosylation, deamination, methylation, phosphorylation, proline isomerisation,  
98 monoubiquitination and sumoylation (Kouzarides 2007). Furthermore they have  
99 fundamental roles for numerous key processes, such as transcription, replication or  
100 DNA repair (Groth *et al.* 2007; Li *et al.* 2007). The only known ubiquitinated histone in  
101 yeast cells is H2B (ubH2B) on lysine K123 (Robzyk *et al.* 2000). Various roles for this  
102 specific histone mark have been reported although no clear picture has emerged yet.  
103 For example, in the absence of ubiquitinated H2B, the transcription of several highly  
104 inducible genes was found to be impaired (Henry *et al.* 2003). By contrast, ubH2B  
105 has also been implicated in gene repression and gene silencing (Turner *et al.* 2002).  
106 At the molecular level, H2B ubiquitination has been shown to be a transactivation  
107 signal for two methyltransferases, Dot1, responsible for histone H3K79 methylation  
108 (Ng *et al.* 2002; Briggs *et al.* 2002), and Set1/COMPASS responsible for histone  
109 H3K4 methylation (Sun and Allis 2002; Dover *et al.* 2002). Thus, ubH2B function is  
110 complex and certainly gene specific. In mammalian cells, H2B ubiquitination is also  
111 involved in various processes including DNA damage repair (Nakamura *et al.* 2011),  
112 regulation of DNA replication (Trujillo and Osley 2012) or maintenance of stem cell  
113 multipotency (Karpiuk *et al.* 2012). ubH2B is even considered as a potential tumor  
114 suppressor (Espinosa 2008) and is reported to be lost in various cancer cell types  
115 such as breast, lung, parathyroid or colorectal cancers (Espinosa 2008; Prenzel *et al.*  
116 2011; Urasaki *et al.* 2012; Hahn *et al.* 2012). Hence, it is important to better  
117 understand all the implications of H2B ubiquitination and its consequences on the cell  
118 regulation.

119 Here, taking advantage of yeast genetics, we found that AICAR treatment is  
120 synthetic lethal with specific histone-modification defects including *bre1* deletion, loss  
121 of H2B ubiquitination, COMPASS-subunit deletions or loss of H3K4 methylation. We  
122 showed that AICAR affects G1 progression, impacts on Cln1 protein level and on  
123 Cln3 localization and thereby impacts on *CLN1* and *CLN2* transcription. In parallel we  
124 found that *bre1* deletion, H2B ubiquitination loss, *set1* deletion or loss of H3K4  
125 methylation also led to G1 cyclins expression default. Thus, by affecting  
126 simultaneously the three G1 cyclins, AICAR and *bre1/H2B/set1/H3K4* deletions are  
127 synthetic lethal. Remarkably, these chemo-genetic synthetic interactions were  
128 conserved in human cells.

## 129 MATERIAL AND METHODS

### 130 ***Media, strains and plasmids***

131 SD is a synthetic minimal medium containing 0.5% ammonium sulfate, 0.17% yeast  
132 nitrogen base (Difco), 2% glucose. SDcasaW is SD medium supplemented with 0.2%  
133 casamino acids (Difco) and tryptophan (0.2 mM). When indicated, adenine (0.3 mM)  
134 and/or uracil (0.3 mM) were added in SDcasaW medium resulting in media named  
135 SDcasaWAU (+ adenine + uracil) or SDcasaWA (+ adenine). SC medium was  
136 prepared as described by Sherman *et al.* (Sherman 1991). AICAR was obtained from  
137 Toronto Research Chemicals (A611700). Yeast strains (Table S1) belong to or are  
138 derived from a set of disrupted strains isogenic to BY4741 or BY4742 purchased  
139 from Euroscarf. Plasmids used in this study are listed in Table S2 and cloning details  
140 are available upon request.

### 141 ***Deep sequencing of pooled segregants***

142 Identification of the *bre1-1* mutation resulting in AICAR sensitivity in the Y7322  
143 mutant was done as previously described (Ceschin *et al.* 2014). After meiosis,  
144 AICAR sensitivity segregated 2:2 indicating that AICAR sensitivity of the mutant  
145 matched to a monogenic trait. Genomic DNA was then extracted from a mix of 13  
146 AICAR hypersensitive spores and sequenced. In parallel, the genomes of a mix of 14  
147 spores showing unaffected AICAR sensitivity were sequenced. Comparison of these  
148 genome sequences to S288c reference genome  
149 ([http://downloads.yeastgenome.org/sequence /S288C\\_reference/](http://downloads.yeastgenome.org/sequence/S288C_reference/)) allowed us to  
150 identify single nucleotide polymorphisms next to each other in chromosome IV  
151 (deletion of two A at position 324287 and 324290 respectively) associated to the  
152 AICAR hypersensitivity phenotype. These small deletions resulted in a frame shift at  
153 codon 80 of *BRE1*.

#### 154 ***Metabolite Extraction and Separation by Liquid Chromatography***

155 Metabolite extraction and separation for nucleotide determinations were performed  
156 as described in Hürlimann *et al.* 2011. Strains were grown in exponential phase at  
157 30°C during 24 hours in liquid SD casa WAU medium. Cells were supplemented or  
158 not with 0.5 mM AICAR during 24 hours before extraction.

#### 159 ***FACS analysis***

160 Strains were grown in exponential phase at 30°C during 24 hours in liquid SD casa  
161 WAU medium. Cells were shifted to 37°C for 30 minutes and then either  
162 supplemented or not with 1 mM AICAR. Cells were harvested 2 hours later with  
163 fixation in ethanol 70 %. After one night at 4°C, DNA content was measured by flow  
164 cytometry using Sytox Green staining. 100 000 events were counted using a BD  
165 Accuri C6 cytometer.

166 **Microscopy**

167 For live cell imaging with *WHI5-GFP*, strains were grown in exponential phase at  
168 30°C during 24 hours in liquid SD casa WAU medium. Cells were shifted to 37°C  
169 during 30 minutes and then either supplemented or not with 1 mM AICAR during 1 or  
170 2 hours. Cultures (2–2.5 µL) were spotted onto a glass slide and immediately imaged  
171 at room temperature.

172 **Northern blot**

173 Northern Blots were performed as described in (Denis *et al.* 1998) . Oligonucleotides  
174 sequences used for *CLN1*, *CLN2*, *CLN3* or *ACT1* probe constructions were: CLN1up  
175 5'-CCTCATCAAACCTAGAGAAGC-3', CLN1rev 5'-CCTTTCTTCTAGCATCATAT-3',  
176 CLN2up 5'-ATGGCTAGTGCTGAACCAAG-3', CLN2rev 5'-  
177 CTATATTAATTGGGTATTGCC-3', CLN3up 5'-ATGGCCATATTGAAGGATAC-3',  
178 CLN3rev 5'-TCAGCGAGTTTTCTTGAGGTTG-3', ACT1up 5'-  
179 ATGGATTCTGGTATGTTCTAG-3' and ACT1rev 5'-GTGTTCTTCTGGGGCAACTCT-  
180 3'. Cells were grown in exponential phase at 30°C during 24 hours in liquid  
181 SDcasaWAU medium and then shifted to 37°C for 30 minutes. After 1 or 2 hours of  
182 AICAR treatment (as indicated),  $2 \times 10^7$  cells were harvested for RNA extraction and  
183 northern blotting.

184 **Western blot**

185 For protein extraction from yeast cells, strains were grown in exponential phase at  
186 30°C during 24 hours in liquid SD casa WAU medium. Cells were shifted to 37°C for  
187 30 minutes and then either supplemented or not with 1 mM AICAR during 2 hours.  
188 For mammalian cells, after siRNA treatment, 0.5 mM AICAR was added for 72 hours.

189 Protein extracts, separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes,  
190 were probed with antibodies against c-Myc 9E10 (purchased from Thermo Scientific  
191 (1/500)), Rnf40 (purchased from Sigma Aldrich (1/2,000)), Ash2l (purchased from  
192 Millipore 7E1 (1/2,000)), Mll2 (purchased from Sigma Aldrich (1/2000)),  
193 CCND1/CCNE1 (both purchased from Cell Signaling (1/2,000)), p53 (purchased from  
194 Cell Signaling (1/2,000)) and p21 (purchased from Cell Signaling (1/500)).

#### 195 ***β-galactosidase assay***

196 For βGal assays, cells were transformed with a plasmid carrying the *CLN1*-, *CLN2*-  
197 or *CLN3-lacZ* promoter fusions (p5488, p5489, p5496) and for Figure 4D with an  
198 empty plasmid or a *CLN3* overexpressing plasmid (p2637, p5462). Two clones from  
199 each transformation were grown 24 hours in exponential phase in SDcasaWA  
200 medium/SC-U-L and then transferred at 37°C for 30 minutes. Then AICAR was  
201 added (1 mM) or not during 2 hours. βGal assays were done using the method of  
202 Kippert with N-lauroyl sarcosine as a permeabilization agent (Kippert 1995). Units of  
203 β-galactosidase activity were calculated by the formula (1000 × reaction mix  
204 OD<sub>420</sub>)/(culture OD<sub>600</sub> × volume of culture × minutes of assay).

#### 205 ***Immunofluorescence***

206 Cells were grown in exponential phase during 24 hours at 30°C, then placed 30  
207 minutes at 37°C. AICAR was added (1 mM) or not to the cell cultures for 2 hours.  
208 Cells were fixed (10 mL) with paraformaldehyde 2 % during 20 minutes, spheroplasts  
209 were obtained by treating cells with zymolyase (5.5 mg/mL) during 10-15 minutes.  
210 Spheroplasts were resuspended in 1 mL PEMS (0.1 M PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM  
211 MgSO<sub>4</sub>, pH 6.9) containing 0.1 % Triton X100 and incubated during 5 minutes at  
212 room temperature. After 4 washes with PEMS, cells were incubated during 2 hours at

213 37°C with c-Myc antibody purchased from Thermo Scientific (1/100). Cells were  
214 washed 3 times in PEMS with 1 % BSA and incubated with secondary antibodies  
215 (Thermo Scientific A-21422) at 1/200 during 1 hour at 37°C. After three washes with  
216 PEMS, cells were mounted on Poly-L-lysine coated slides before imaging. Z stack  
217 images were taken and 50 unbudded cells were analyzed. A threshold was set to  
218 divide cells in a binary distribution, “detectable” or “not detectable” Cln3 in the  
219 nucleus (as defined by the DAPI staining).

#### 220 ***Human-cell culture***

221 The cell line HCT116 was obtained from the American Type Culture Collection  
222 (Manassas, VA, USA). Cells were routinely grown in Dubelcco's Minimal Eagle  
223 Medium (DMEM, Life Technologies, Waltham, USA) supplemented with 10 % fetal  
224 bovine serum (Dutscher, France) and maintained at 37 °C in a humidified  
225 atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>. Experiments were performed using exponentially  
226 growing cells.

#### 227 ***siRNA and proliferation assay***

228 HCT116 cells were seeded at 9000 or 2500 cells per cm<sup>2</sup> onto 96-well plates  
229 (purchased from Falcon) and cultured in a 100 µL final volume of fresh complete  
230 medium for 24 h. Cells were transiently transfected during 6 to 24 hours with  
231 Lipofectamine RNAimax reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's  
232 protocol, with 2 to 15 nmol of targeting siRNA or non-targeting siRNA (CellSignaling,  
233 #6568S) as control, in 100 µL of complete medium before AICAR treatment. The  
234 siRNA duplexes with a 3'-dTdT overhang were synthesized by Sigma-Aldrich. The  
235 siRNA sequences were as follow: RNF40 5'- UGAGGACAUGCAGGAACAGAA-3',  
236 ASH2L 5'- GGAACACCCGUUUUAACAA-3' and MLL2 5'-

237 GCAGUUUGUGCACUCCAAG-3'. 6 to 48 hours later, AICAR treatment was  
238 achieved. After 72 hours of AICAR treatment, proliferation was measured by the  
239 colorimetric assay WST-1 at 1/30 (Roche).

## 240 RESULTS

### 241 Mutations preventing H2B ubiquitination are synthetic lethal with AICAR 242 treatment

243 To get an insight into the mode of action of the anti-proliferative drug AICAR, we  
244 searched for AICAR-sensitive mutants. This was done in a quadruple *ade16 ade17*  
245 *ade8 his1* (referred as "control") mutant strain which cannot synthesize nor  
246 metabolize ZMP and thus only accumulates ZMP when AICAR, its riboside  
247 precursor, is provided in the medium (Ceschin *et al.* 2014) (metabolic pathway is  
248 shown on Figure S1A). The control strain was plated, mutagenized with UV light for  
249 20 sec and the resulting colonies (30 % survival) were replica plated on AICAR  
250 medium. This screen allowed isolation of several AICAR-sensitive mutants (Ceschin  
251 *et al.* 2014).

252 One of these mutants (Figure 1A) was further studied. It should be noticed that  
253 the AICAR-sensitivity of this mutant was strongly enhanced at high temperature  
254 (Figure 1A) and thus most of the experiments presented herein were performed at  
255 37°C. Importantly, this mutant showed no major difference in its metabolic profile  
256 compared to the parental strain (Figure 1B), indicating that it did not affect  
257 intracellular ZMP concentration (as did *pdz2-1* for example, Figure 1B) nor the  
258 ATP/ZMP ratio that we previously found to be critical for yeast cells to cope with  
259 AICAR (Ceschin *et al.* 2014, 2015). The mutation was identified as a frameshift at  
260 codon 80 in the *BRE1* gene on chromosome IV by deep sequencing of pooled

261 segregants (Birkeland *et al.* 2010) and named *bre1-1*. The presence of this mutation  
262 was confirmed in 13 individual AICAR-sensitive spores and shown to be absent in  
263 the 14 AICAR-resistant spores (examples are shown in Figure S1B). This mutation  
264 was recessive (Figure S1C) and was complemented by the wild-type gene carried on  
265 a centromeric plasmid (Figure S1D). Finally, we could show that a complete deletion  
266 of the *BRE1* coding region led to a similar sensitivity to AICAR (Figure S1E).  
267 Together these results establish that the phenotype is due to a *BRE1* loss of function.

268 *BRE1* encodes an ubiquitin ligase (E3) that, together with the Rad6 ubiquitin-  
269 conjugating enzyme, is responsible for histone H2B ubiquitination (Robzyk *et al.*  
270 2000). Accordingly, *bre1* and *rad6* knock-out mutations similarly reduced the ability of  
271 yeast cells to grow in the presence of AICAR (Figure 1C). In addition to Bre1, Rad6  
272 was found associated with three other E3s (Rad18, Ubr1 and Ubr2) to transfer  
273 ubiquitin to target proteins. In contrast to *bre1* and *rad6* mutants, *rad18*, *ubr1* and  
274 *ubr2* knock-out mutants behaved just as the control strain (Figure 1C-D). We  
275 conclude that the synthetic lethal interaction with AICAR is highly specific to Rad6-  
276 Bre1 complex impairment.

277 A well-characterized role of Bre1-Rad6 is to ubiquitinate histone H2B at position  
278 K123 (Hwang *et al.* 2002; Wood *et al.* 2003). We found that a H2B K123R mutant,  
279 preventing H2B K123 ubiquitination, was also synthetic lethal with AICAR treatment  
280 (Figure 1E), hence fully phenocopying the *rad6* and *bre1* mutants. Consistent with  
281 this synthetic interaction, all three *bre1*, *rad6* and H2B K123R mutants showed  
282 growth defects in an *ade16 ade17* background in which ZMP accumulates  
283 constitutively (Figure S1F). Furthermore, the *bre1 ade16 ade17* synthetic sickness  
284 could be suppressed by expressing *PHO13-1* (Figure S1G), a dominant mutation

285 known to detoxify ZMP (Hürlimann *et al.* 2011). Together these results establish that  
286 these mutants are exquisitely sensitive to ZMP independently of its exogenous  
287 (AICAR) or endogenous (*de novo* pathway) origin. We conclude that ubiquitination of  
288 H2B K123 is critical for yeast cells to cope with ZMP accumulation resulting from  
289 AICAR treatment.

290 ***Mutations affecting H3K4 methylation result in severe growth impairment in the***  
291 ***presence of AICAR***

292 Ubiquitination of H2B is a transactivation signal for di- and tri-methylation of histone  
293 H3 at positions 4 and for tri-methylation of histone H3 at position 79 (Nakanishi *et al.*  
294 2009). Dot1 is the H3K79 methyl transferase (Ng *et al.* 2002; Briggs *et al.* 2002)  
295 while Set1, which is the catalytic subunit of the COMPASS complex, methylates  
296 H3K4 (Sun and Allis 2002; Dover *et al.* 2002). Clearly, the knock-out of *DOT1* did not  
297 enhance sensitivity to AICAR (Figure 2A). By contrast, in the absence of any of the  
298 COMPASS subunits tested (*SET1*, *SWD1* and *SWD3*), a severe growth defect was  
299 found specifically in the presence of AICAR (Figure 2B) without affecting intracellular  
300 ZMP levels, as determined by metabolic profiling. A similar growth defect was found  
301 for a mutant carrying a point mutation (*SET1G951S*) specifically affecting the methyl  
302 transferase catalytic activity of Set1 (Zhang *et al.* 2005), indicating that the absence  
303 of the Set1 methyltransferase activity is responsible for AICAR-sensitivity (Figure  
304 2C). Two main targets for Set1-mediated methylation have been identified so far:  
305 Dam1 a component of the kinetochore (Latham *et al.* 2011) and the histone H3 on  
306 position K4 (Sun and Allis 2002; Dover *et al.* 2002). A Dam1K233R mutation,  
307 resulting in a non-methylable form of Dam1 (Latham *et al.* 2011), did not affect  
308 growth in the presence of AICAR (Figure 2D). By contrast, the non-methylable form  
309 of H3K4 (H3K4Q) resulted in an AICAR-sensitivity comparable to that of the *set1*

310 mutant (Figure 2E). Of note, in our strain background the H3K4R mutation was not  
311 viable. Together our results show that H3K4 modification is critical for growth in the  
312 presence of AICAR. We conclude that AICAR treatment results in synthetic growth  
313 defects with all tested mutants in the Rad6/Bre1/COMPASS histone modification  
314 pathway.

#### 315 ***AICAR treatment affects G1 cyclins***

316 To further understand how AICAR impairs proliferation of the  
317 *rad6/bre1/H2B/set1/H3K4* pathway mutants, we examined the impact of AICAR  
318 treatment on cell cycle progression. FACS analysis revealed that AICAR treatment  
319 increased the proportion of G1 cells in the control strain (27.82%  $\pm$  8.13 of G1-  
320 increase) (Figure 3A). Interestingly, G1 increase was exacerbated in AICAR sensitive  
321 mutants: 75.88%  $\pm$  6.02 (*rad6*), 63.56%  $\pm$  1.55 (*bre1*), 60.16%  $\pm$  6.12 (*htbK123R*) and  
322 45.55%  $\pm$  3.88 (*set1*) (Figure 3A). Altogether, these results point to a specific defect  
323 in G1 progression associated with AICAR treatment and we thus investigated the  
324 AICAR contribution to this effect.

325 In G1, at the beginning of the cell cycle, Whi5, the yeast equivalent of  
326 Retinoblastoma protein (Rb), inhibits the transcription of various G1/S transition  
327 genes (Bertoli *et al.* 2013) (Figure 3B). This inhibition ends when Whi5 exits from the  
328 nucleus in late G1, upon phosphorylation by Cdc28, the major cyclin dependent  
329 kinase, in complex with Cln3 (Vergés *et al.* 2007). This leads to the transcription of  
330 hundreds of genes, including the two other G1 cyclin genes, *CLN1* and *CLN2* (Bertoli  
331 *et al.* 2013). Cln1 and Cln2 in turn contribute to a positive feedback loop resulting in  
332 Whi5 phosphorylation and its exclusion from the nucleus (Dirick and Nasmyth 1991).  
333 To elucidate how AICAR impacts on G1 progression, we evaluated the effects of  
334 AICAR treatment on G1 cyclin expression at the transcriptional and post-

335 transcriptional levels. Northern blot experiments revealed a major impact of AICAR  
336 on the amount of *CLN1* mRNA, a weaker effect on *CLN2* transcripts and no impact  
337 on *CLN3* (Figure 3C). At the protein level, we found that Cln1 steady-state level was  
338 severely lowered after 2 hours of AICAR treatment, while Cln2 and Cln3 protein  
339 levels were not affected (Figure 3D). Of note, Cdc28/Cdk1 protein levels were not  
340 altered by AICAR treatment (Figure 3D).

341 The low expression of Cln1 upon AICAR treatment suggested that this protein  
342 might become limiting for cell cycle progression. We thus overexpressed *CLN1*,  
343 *CLN2* and *CLN3* under a constitutive heterologous promoter to circumvent feedback  
344 loop effects on their own transcription. While, in the presence of AICAR, *CLN2*  
345 overexpression had no impact on growth of the control strain, *CLN1* overexpression  
346 slightly improved growth and astonishingly *CLN3* overexpression had the most  
347 drastic effect, by robustly suppressing the effects of AICAR on growth (Figure 4A). Of  
348 note, the same results were obtained with *CLN1*, *CLN2* or *CLN3* overexpression  
349 under their own promoter (Figure S2). Together, our results suggest that somehow  
350 AICAR affects Cln3 independently of its expression level and thereby slows down  
351 exit from G1. Indeed, it is rather intriguing that the only G1 cyclin unaffected at the  
352 protein or the mRNA level is the one that suppresses AICAR sensitivity when  
353 overexpressed. One possibility was that the subcellular localization of Cln3 might be  
354 affected by AICAR. Immunofluorescence labeling experiments revealed that AICAR  
355 affected the subcellular localization of Cln3, with a significant decrease of the  
356 percentage of G1 cells containing Cln3 in the nucleus upon AICAR treatment (Figure  
357 4B). In fact, at the beginning of G1, Cln3 is retained in the endoplasmic reticulum by  
358 a chaperone, Ssa1, and later on, assisted by Ydj1, Cln3 is released to enter the  
359 nucleus ((Vergés *et al.* 2007) and Figure 3B). Concomitant overexpression of *SSA1*

360 and *YDJ1*, a condition known to stimulate Cln3 translocation to the nucleus (Vergés  
361 *et al.* 2007), improved growth of yeast cells upon AICAR treatment (Figure 4C).  
362 These results also implied that the decrease of *CLN1* transcription could be a  
363 consequence rather than a cause for accumulation of G1 cells after AICAR  
364 treatment. We found that Cln3 overexpression efficiently attenuated the decrease of  
365 Cln1 without restoring completely Cln1 protein level (40% diminution instead of 80%  
366 in the control) (Figure 4D). Using a *CLN1* promoter fused to *LacZ*, we found that  
367 *CLN3* overexpression fully suppressed the effects of AICAR on *CLN1* expression  
368 (Figure 4E). These results imply that AICAR effects are complex, impacting both on  
369 *CLN1* transcription, *via* Cln3, but also on Cln1 protein level by other means. Indeed,  
370 Cln1 half-life, following a cycloheximide block, was estimated at 8.0 minutes without  
371 AICAR treatment and at 4.2 minutes after 90 minutes of AICAR treatment (1 mM).  
372 Under the same conditions, Cln2 and Cln3 half-lives were not affected. Finally, in  
373 good agreement with an important role of Cln3 subcellular localization in AICAR-  
374 dependent cell cycle effect, the increased proportion of unbudded cells with nuclear  
375 Whi5-GFP observed upon AICAR treatment was abolished by *CLN3* overexpression  
376 (Figure 4F). Accordingly, we observed that *WHI5* overexpression was deleterious in  
377 the presence of AICAR, further indicating that exit of Whi5 from the nucleus is a  
378 limiting step upon AICAR treatment (Figure 4G). Based on these results, we propose  
379 that AICAR treatment by affecting Cln1 abundance and Cln3 subcellular localization  
380 results in accumulation of G1 cells with nuclear Whi5.

381 ***Synthetic lethality of AICAR with loss of specific histone modifications is due***  
382 ***to additive effects on G1 cyclins***

383 Why should an H2B ubiquitination defect exacerbate sensitivity to AICAR? It was  
384 reported that the absence of Bre1 or Rad6 affects *CLN2* expression and causes a

385 delay in G1 entry (Raboy *et al.* 1999; Zimmermann *et al.* 2011). Indeed, our  
386 experiments with *CLN1* and *CLN2* promoters fused to *LacZ* confirmed that *bre1*  
387 deletion caused a decrease of *CLN2*, but also of *CLN1* expression (Figure 5A). By  
388 contrast, *bre1* had no effect on *CLN3* expression (Figure 5A). Moreover, we now  
389 established that these effects on G1 cyclin transcription were also found in the H2B  
390 K123R mutant and in the *set1* or H3K4Q mutants, thus showing that it is dependent  
391 on the whole *rad6/bre1/H2B/set1/H3K4* pathway (Figure 5A). Since we previously  
392 showed that AICAR also affected *CLN1* and *CLN2* transcription, we reasoned that  
393 combined with deletions in the *rad6/bre1/H2B/set1/H3K4* pathway, also causing a  
394 decrease in G1 cyclins, AICAR should have an additive effect that might cause the  
395 drastic synthetic phenotype observed. Indeed the combination of the *bre1*,  
396 htbK123R, *set1* or H3K4Q mutants with AICAR treatment caused a clear additive  
397 effect on *CLN2* expression, some on *CLN1* and, as expected, had no impact on  
398 *CLN3* expression (Figure 5A). The effects of AICAR treatment combined with *bre1*  
399 deletion were also analyzed at the protein level by western blot. As previously shown  
400 (Figure 3D), AICAR treatment had no major impact on Cln2 protein abundance  
401 (Figure 5B). In the same way, *bre1* deletion alone did not impact in a significant  
402 manner on Cln2 protein level but strikingly, the combination of both, AICAR treatment  
403 and *bre1* deletion, led to a synthetic effect with a clear Cln2 decrease (58 %).  
404 Concerning Cln3, AICAR or *bre1* deletion alone had no impact on Cln3 protein level  
405 and the combination of both had a weak synthetic effect. Hence, western blot  
406 analyses reinforced the conclusions based on beta-galactosidase experiments.

407 To further establish the central role of G1 cyclins in the synthetic lethality between  
408 *rad6/bre1/H2B/set1/H3K4* pathway and AICAR, we over-expressed *CLN1*, *CLN2* and  
409 *CLN3* in these mutants (Figure 5C-D). We found that not only *CLN3*, but also *CLN1*

410 and *CLN2* over-expression restored growth on AICAR supplemented medium in a  
411 *bre1*, *rad6*, *htbK123R*, *set1* or *H3K4Q* mutants, as expected if the synthetic lethality  
412 is due to combined effects on several cyclins. From these over-expression  
413 experiments, combined with the previous results on G1 cyclins expression, we  
414 conclude that the synthetic lethality of AICAR treatment with the mutants from the  
415 *rad6/bre1/H2B/set1/H3K4* pathway is due to their cumulative effects on G1 cyclins  
416 expression/function. Indeed, it is well known that the single G1 cyclin mutants (*cln1*,  
417 *cln2* or *cln3*) and all the combinations of double G1 cyclins mutants are viable,  
418 whereas the triple *cln1 cln2 cln3* mutant is lethal (Richardson *et al.* 1989). Thus, a  
419 combination of conditions affecting the three G1 cyclins simultaneously would lead to  
420 a synthetic phenotype. Here, we showed that ZMP accumulation affected both Cln1  
421 protein level and Cln3 subcellular localization. In parallel, *bre1/rad6/H2B/set1/H3K4*  
422 mutations caused a significant decrease of *CLN1* and *CLN2* transcription. Based on  
423 these results, we propose a model (Figure 6) in which the combination of conditions  
424 affecting Cln3 (AICAR treatment) and Cln1/Cln2 (*bre1/rad6/H2B/set1/H3K4*  
425 mutations and AICAR treatment) phenocopies the synthetic lethality observed when  
426 the three G1 cyclins are absent.

427 Several mutant combinations were tested to further validate this model. Since the  
428 deletion of *rad6*, *bre1* or *set1* led to a decrease of *CLN1* and *CLN2* expression, their  
429 combination with a *cln3* null mutation should affect proliferation. Indeed, as seen on  
430 Figure 7A and Figure S3A-C, *cln3 bre1*, *cln3 rad6* or *cln3 set1* double mutants all  
431 showed a highly reproducible growth defect compared to the WT or the single mutant  
432 strains. By contrast, the double mutants combining *bre1* or *set1* with *cln1* or *cln2*  
433 showed almost no growth defect. The *rad6 cln1* strain showed a growth defect  
434 although less pronounced than the one observed for *rad6 cln3* (Figure S3C).

435 We next tested the effect of G1-cyclin deletions on AICAR sensitivity. *Cln1*  
436 deletion alone had no impact on AICAR sensitivity (Figure S3D). It could reflect the  
437 fact that, Cln1 steady-state levels being strongly affected by AICAR treatment (Figure  
438 3D); the complete deletion of the gene has no additional phenotype. By contrast, the  
439 two other deletions *cln2* and *cln3* exacerbated sensitivity to AICAR. We explain these  
440 results as a consequence of two intertwined levels of complexity: first, the fact that  
441 AICAR both affects Cln3 subcellular localization and Cln1 protein level and second,  
442 the well-known G1 cyclin redundancy and their functional compensatory properties.  
443 In any case, although these loss-of-function experiments should be interpreted  
444 cautiously, they undoubtedly confirm a strong link between AICAR and G1 cyclins.

445 Finally, at the beginning of G1, *CLN1* and *CLN2* transcription is inhibited by Whi5  
446 (Bertoli *et al.* 2013). We thus asked whether a deletion of *whi5* could suppress some  
447 of the AICAR effects on growth, as overexpression of individual cyclin did (Figure  
448 4A). Indeed, *whi5* deletion increased resistance to AICAR of the control strain (Figure  
449 7B). This result is in good agreement with our model where AICAR inhibits *CLN1* and  
450 *CLN2* expression through its impact on Cln3 subcellular localization, and as such  
451 maintains Whi5 in the nucleus. Moreover, *whi5* deletion robustly suppressed the  
452 effects of AICAR on growth of the *bre1* and *set1* mutants (Figure 7B), pointing to  
453 Whi5 exit from the nucleus as the limiting step for growth under AICAR treatment.

454 ***Knock-down of RNF40, ASH2L or MLL2/KMT2D results in an exacerbated***  
455 ***sensitivity to AICAR***

456 Since a global loss of H2B ubiquitination (Espinosa 2008; Prenzel *et al.* 2011;  
457 Urasaki *et al.* 2012; Hahn *et al.* 2012) or mutations in *SET1* orthologues are  
458 frequently found in various cancers (Parsons *et al.* 2011; Morin *et al.* 2011), this

459 genetic interaction with AICAR, if conserved, would have a real therapeutic potential,  
460 thus we examined this possibility.

461 In mammalian cells, *RNF20/RNF40* are Bre1 orthologs and knock-down of either  
462 subunit is sufficient to abolish H2B ubiquitination (Kim *et al.* 2009). Knock-down of  
463 *RNF40* in HCT116 cancer cells significantly increased sensitivity to AICAR treatment,  
464 while having little effect on proliferation in the absence of AICAR treatment (Figure  
465 8A) and significantly reducing Rnf40 protein level (Figure 8B). As for yeast cells, H2B  
466 ubiquitination at position K120 in mammalian cells has been linked to methylation of  
467 H3K4 (Kim *et al.* 2009). There are several COMPASS complexes in mammalian cells  
468 with six different catalytic subunits, Set1A-B and Mll1-4 (Wong *et al.* 2014). To  
469 establish whether the effects observed in yeast were conserved in human cells, we  
470 first knocked-down the *ASH2L* COMPASS subunit that is common to all identified  
471 complexes (Shilatifard 2012). The *ASH2L* knock-down induced an increased  
472 sensitivity to AICAR similar to the one obtained for *RNF40* knock-down (Figures 8C-  
473 D). We conclude that affecting the COMPASS complexes in human cells strongly  
474 enhances AICAR anti-proliferative effects. Finally, we investigated more specifically  
475 the MLL2 COMPASS complex, by knocking-down its catalytic subunit *MLL2/KMT2D*,  
476 which has been shown to be highly frequently mutated in a wide variety of cancers  
477 (Wong *et al.* 2014) and is now considered as a tumor suppressor (Ortega-Molina *et*  
478 *al.* 2015). As seen on Figure 8E-F, a *MLL2* knock-down also resulted in a significant  
479 increase of AICAR anti-proliferative effects on HCT116. Taken together, these results  
480 show that the chemo-genetic interaction between AICAR and the  
481 *rad6/bre1/H2B/set1/H3K4* pathway is conserved in human cells.

482           We next asked whether the exacerbated effect of AICAR on *RNF40*, *ASH2L*  
483 and *MLL2* knocked-down cells were associated with G1 cyclins, as it is in yeast cells.  
484 In mammalian cells, Cyclin D serves as a key sensor and integrator of extracellular  
485 signals in early to mid-G1 (Massagué 2004). When Cyclin D becomes sufficiently  
486 abundant, in complex with Cdk4 or Cdk6, it phosphorylates the Retinoblastoma  
487 protein (Rb) leading to the transcription of G1-S genes (Connell-Crowley *et al.* 1997).  
488 Indeed, Rb silences specific genes such as Cyclin E, the second G1 cyclin needed  
489 for cell cycle progression, through active repression of E2F transcriptional activity. Rb  
490 can also be phosphorylated by Cyclin E associated with Cdk2, creating a positive  
491 feedback loop (Weinberg 1995). We thus monitored Cyclin D and Cyclin E  
492 abundance in human cells treated with AICAR. In the non-targeting (NT) condition,  
493 AICAR treatment led to a slight increase of Cyclin D1 and to a decrease of Cyclin E1  
494 (Figure 8G). These results parallel those found in yeast cells where Cln3, most  
495 closely corresponding to Cyclin D1, was not impacted by AICAR treatment, in  
496 contrast to Cln1 and Cln2, most closely corresponding to Cyclin E1, which decreased  
497 after AICAR treatment. This result was expected since cyclin E1 protein level is  
498 decreased when p53, a major actor of cell cycle, is activated (Rank *et al.* 2000), a  
499 condition that is known to be reached under AICAR treatment (Imamura *et al.* 2001;  
500 Igata *et al.* 2005). Indeed, we found that the steady state levels of p53 and p21, one  
501 of its effectors, increased after AICAR treatment in the non-targeting condition  
502 (Figure 8G).

503           In the three knocked-down conditions, AICAR treatment caused a slight increase  
504 of Cyclin D1. However, in contrast to the non-targeting condition, silencing of *RNF40*,  
505 *ASH2L* or *MLL2* caused an increase of Cyclin E1 (Figure 8G). Analysis of p53 and  
506 p21 expression showed that these two proteins increased after AICAR treatment as

507 they did in the non-targeting condition (Figure 8G). We conclude that differential  
508 expression of p53 and p21 in response to AICAR cannot account by itself for the  
509 opposite expression of Cyclin E1 observed under the various knock-down conditions.  
510 This suggests that the *RNF40*, *ASH2L* or *MLL2* knocked-down cells do not respond  
511 correctly anymore to the downstream signal mediated by p53 under AICAR  
512 treatment.

513 Taken together these results made us conclude that the mechanism implied in the  
514 exacerbated sensitivity to AICAR of human cells treated with si*RNF40*, *ASH2L* or  
515 *MLL2* is apparently more complex than the one elucidated here for yeast cells. This  
516 could in part be due to the critical role of p53 in mammalian cells which has no  
517 ortholog in yeast. Indeed, our western blot analysis suggests a defective response to  
518 p53 checkpoint in the presence of AICAR under knock-down conditions. This is in  
519 good agreement with another study published by Kari *et al.*, which concludes that  
520 *RNF40* expression is essential for the induction and maintenance of cell cycle  
521 checkpoint activation (Kari *et al.* 2011). Alternatively, AICAR activating effect on  
522 human AMPK, which does not occur on yeast AMPK, could account for some of the  
523 differences found here. Beside these differences between the two species, it is  
524 noteworthy that independently of AICAR, the three siRNAs *RNF40*, *ASH2L* or *MLL2*  
525 resulted in an important decrease of the steady state protein level of Cyclin E1  
526 (Figure 7G). Since *bre1*, H2B ubiquitination, *set1* or H3K4 methylation yeast mutants  
527 also affected the corresponding cyclins, Cln1 and Cln2, these results argue for the  
528 existence of a conserved epigenetic regulation of G1 cyclins in yeast and mammalian  
529 cells.

## 530 DISCUSSION

531 In this study, we used the yeast *S. cerevisiae* as a tool to find mutations causing a  
532 specific synthetic lethality with AICAR treatment. Indeed, in recent years, targeting  
533 synthetic lethal interactions has emerged as a promising anti-cancer therapeutic  
534 approach, which guarantees minimal side effects while greatly affecting growth of  
535 mutated tumor cells. Here, we found that the loss of function of several histone-  
536 modifying enzymes led to synthetic lethality with AICAR treatment in yeast cells.  
537 Interestingly, the corresponding genes are known to be frequently mutated in a wide  
538 range of tumor cells (Espinosa 2008; Parsons *et al.* 2011; Morin *et al.* 2011; Prenzel  
539 *et al.* 2011; Urasaki *et al.* 2012; Hahn *et al.* 2012; Wong *et al.* 2014) and were thus of  
540 particular interest. Our experiments on human HCT116 cells, revealed a conserved  
541 negative genetic interaction between the knock-down of three of these genes and the  
542 drug, AICAR. Thus, this study further validates the use of yeast as a potent model to  
543 screen for synthetic lethal interactions possibly conserved in human cells. The  
544 synthetic interactions revealed here by knock-down in the HCT116 cell line could be  
545 potentially expanded to cancer cells that are mutated or down-regulated for *RNF40*,  
546 *AHS2L* or *MLL2*; although one should keep in mind that, in cancer cells, cell cycle  
547 regulators are often mutated, thus affecting expression of critical players such as  
548 cyclins, cyclin-dependent kinase, cyclin-kinase inhibitors or retinoblastoma protein  
549 (Malumbres and Barbacid 2001) that could antagonize the drug effects. Nonetheless,  
550 the synthetic effect found in HCT116 cells between AICAR and knock-down of the  
551 RAD6/BRE1/SET1 pathway provides a first clue to identify tumor cells that are more  
552 likely to be sensitive to the drug based on their genotype or expression profile.

553 In yeast cells, we found that the synthetic lethal interaction between AICAR and  
554 loss of *bre1*, H2B ubiquitination, *set1* or H3K4 methylation, is due to their additive  
555 effects on G1 cyclins. Interestingly, the passage through START (or restriction point)

556 during G1 is one of the most crucial step during cell cycle progression and is tightly  
557 regulated by cyclins (Dirick and Nasmyth 1991). Here, we found that AICAR  
558 treatment, and thus potentially ZMP, impacted on Cln3 localization. Importantly,  
559 Ssa1, a key player in Cln3 localization, is a purine nucleotide binding protein and was  
560 identified as a potential ZMP-binder in an affinity chromatography experiment (B.P.  
561 and B.D.-F.; to be published elsewhere), it is thus a good candidate-protein to  
562 mediate some of the effects of ZMP. As ZMP is naturally present in cells of almost all  
563 organisms, we can speculate that this metabolite might impact on G1 cyclins even at  
564 physiological concentrations. Indeed, multiple pieces of evidence have pointed to  
565 specific metabolites as major regulators of cellular functions including chromatin  
566 remodeling (Shen *et al.* 2003; Steger *et al.* 2003), as well as the ability of  
567 transcription factors to activate transcription (Sze *et al.* 1992; Flynn and Reece  
568 1999). ZMP itself varies with purine synthesis in response to intracellular ATP and  
569 has been shown to be critical for the concerted transcriptional regulation of the purine  
570 and phosphate metabolic pathways (Pinson *et al.* 2009). Thus, the idea that ZMP by  
571 physiologically signaling purine nucleotide availability could modulate cell cycle  
572 progression is appealing. Indeed, G1 is the cell cycle stage where multiple nutritional  
573 signals are integrated although the underlying mechanisms are largely unknown.

574 In addition, we show that epigenetic modifying-enzymes play important roles in  
575 the G1 cyclin expression regulation. In fact, *bre1*, *H2BK123R*, *set1* or *H3K4Q*  
576 mutants showed a highly significant decrease in *CLN1* and *CLN2* expression  
577 independently of AICAR treatment. It had previously been found that Rad6 and Bre1  
578 cooperate with Cdc28 to induce cell cycle entry (Zimmermann *et al.* 2011). Here, we  
579 show that this regulation can be extended to the downstream-induced signals that  
580 are the modification of H2B, the transactivation of COMPASS and the resulting

581 modification of H3K4 methylation pattern. Thus, these transcriptional effects can now  
582 be directly linked to their effects on chromatin. Interestingly, this regulation might be  
583 conserved in mammalian cells, as we found that *RNF40*, *ASH2L* or *MLL2* knock-  
584 down led to a diminution of Cyclin E1 protein level. This sheds light on an emerging  
585 new function of histone modifications that is cell cycle regulation. Indeed, a recent  
586 study in yeast cells has shown that H3K79me2 marks cell cycle-specific genes during  
587 G2/M (Schulze *et al.* 2009). Here, we show an impact of H2B ubiquitination and  
588 H3K4 methylation on G1 cyclins. Thus, the whole cell cycle might be modulated by  
589 specific histone modifications. Since many diseases, including cancer, involve  
590 deregulation in cell cycle progression, it is of major importance to get insights into the  
591 interplay between chromatin modifications and cell-cycle control.

## 592 **ACKNOWLEDGMENTS**

593 We thank Pr. Jacques Robert from Bergonié Institute (Bordeaux, France) who kindly  
594 provided the HCT116 cell line, Pr Michel Moenner for his help with mammalian cell  
595 experiments, Dr Antonin Morillon for the *set1* mutant strain, Dr Sharon Dent for the  
596 *SET1G951S* and the *DAM1K233R* mutant strains, Dr Mary Miller for the pCLN3-  
597 3HA-9Myc, Damien Laporte for his advices for immunofluorescence staining and  
598 discussions and José Eduardo Gomes for advices and comments on the manuscript.  
599 This work was supported by grants to B.D.-F. from Fondation ARC  
600 #SF120121205915 and Ligue Contre le Cancer Dordogne 2015.

601

## 602 **FIGURES AND TABLE**

603 **Figure 1.** Mutations affecting H2B ubiquitination are synthetic lethal with AICAR  
604 treatment.

605 (A) The *bre1-1* mutation leads to AICAR sensitivity. Tenfold serial dilutions of Y6986  
606 and Y7322 were grown on SDcasaWAU medium at 30°C or 37°C in the presence, or  
607 not (No AICAR), of AICAR (4 mM, + AICAR) . Plates were imaged after 3 days. (B)  
608 The *bre1-1* mutation does not result in an increased ZMP accumulation. Metabolite  
609 content of the indicated yeast strains (Y6986, Y7322, Y7314) was determined from at  
610 least three independent metabolite extractions and the standard deviations are  
611 presented. (C) Deletion of *RAD6* leads to AICAR sensitivity. The following strains  
612 were spotted on SDcasaWAU medium supplemented or not with AICAR (3 mM):  
613 Y9217, Y2950, Y9516, Y10449, and Y9927. Plates were imaged after 2 days at  
614 37°C. (D) Deletion of *UBR2* has no impact on AICAR sensitivity. The strains Y2950  
615 and Y10747 were spotted on SDcasaWAU medium supplemented or not with AICAR  
616 (2 mM). Plates were imaged after 1 day at 37°C. (E) The non-ubiquitinable form of  
617 H2B leads to synthetic lethality with AICAR treatment. The strains Y2950 and  
618 Y10056 were spotted on SDcasaWAU supplemented or not with AICAR (2 mM).  
619 Plates were imaged after 3 days at 37°C.

620 **Figure 2.** Mutations affecting H3K4 modification are synthetic lethal with AICAR  
621 treatment.

622 (A-E) *set1* and *H3K4Q* mutants are synthetic lethal with AICAR treatment. Strains  
623 deleted for the indicated genes were serial diluted (ten-fold) and spotted on  
624 SDcasaWAU medium containing or not AICAR (2 mM (A-B), 4 mM (E) or 6 mM (C-  
625 D)). The strains Y6986, Y9304, Y9168, Y9478, Y9430, Y10287, Y10285 and Y10332  
626 are shown. Plates were incubated at 37°C for 2 (A and E) or 3 (B-D) days before  
627 imaging.

628 **Figure 3.** AICAR treatment induces an accumulation of cells in G1 accompanied by a  
629 decrease of Cln1.

630 (A) AICAR treatment causes an accumulation of G1 cells. The strains Y2950, Y9143,  
631 Y9516, Y10056 and Y9168 were submitted to FACS analysis. (B) Schematic  
632 representation of the inhibitory role of Whi5 on transcription of *CLN1* and *CLN2*  
633 genes upon G1 progression. (C) AICAR treatment causes a decrease of *CLN1* and  
634 *CLN2* mRNA levels. The control strain Y2950 was treated as described for Northern  
635 blot analysis. Quantification of blots is presented on the right panel and was  
636 normalized to 0 mM 1 hour. \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$  \*  $p < 0.05$ ; two-way ANOVA. (D) AICAR  
637 treatment causes a decrease of Cln1 protein level. The Y10448, Y10636 and Y10608  
638 strains were treated as described for western blotting analysis. Quantification of the  
639 western blot signals is presented on the right panel and was normalized to 0 mM 1  
640 hour. \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$ ; two-way ANOVA. All values are presented as mean  
641 +/- SEM (N=2).

642 **Figure 4.** AICAR affects Cln3 subcellular localization

643 (A) *CLN3* overexpression (O.E) suppresses the effects of AICAR on growth. The  
644 control strain Y2950 was transformed with plasmids p2717, p5430, p5422 or p5424.  
645 Transformants were serial diluted on SD<sub>case</sub>WA supplemented or not with AICAR  
646 (10 mM) and plates were imaged after 3 days at 37°C. (B) AICAR affects Cln3  
647 subcellular localization. The endogenously tagged *CLN3-9Myc ade16 ade17 ade8*  
648 *his1* strain (Y10608) and an untagged strain (Y2950) were treated as described for  
649 immunofluorescence analysis. \*\*  $p < 0.01$ ; two-way ANOVA. (C) *SSA1* and *YDJ1*  
650 overexpression suppresses AICAR effects on growth. The control strain Y2950 was  
651 transformed either with p339 and p338 or p5469 and p5483. Transformants were  
652 spotted on SC-U-L supplemented or not with AICAR (6 mM) and incubated for 3 days

653 at 37°C before imaging. (D) *CLN3* overexpression attenuates Cln1 decrease after  
654 AICAR treatment. The *CLN1-13Myc ade16 ade17 ade8 his1* strain (Y10448) was  
655 transformed either with p339 or p4742 and treated as described for western blotting  
656 analysis. (E) *CLN3* overexpression suppresses the effects of AICAR on *CLN1*  
657 expression. The control strain (Y2950) was transformed with p5488 and p5462 or  
658 p5488 and p2637. Transformants were grown in SC-U-L medium and treated as  
659 described for beta-galactosidase assay. \*\*  $p < 0.01$ ; two-way ANOVA. (F) *CLN3*  
660 overexpression suppresses the effects of AICAR on Whi5 dynamic. The Whi5-GFP  
661 *ade16 ade17 ade8 his1* strain (Y10369) was transformed with p339 or p4742. Cells  
662 were treated as described for microscopy analysis. \*  $p < 0.05$ ; two-way ANOVA. (G)  
663 *WHI5* overexpression exacerbates AICAR effects on growth. The control strain  
664 (Y2950) was transformed either with p339 or p4726. Cells were spotted on  
665 SDcasaWA supplemented or not with AICAR (4 mM) at 37°C. Plates were imaged  
666 after 3 days. All values are presented as mean +/- SEM ( $N \geq 2$ ).

667 **Figure 5.** Additivity between histone modification mutants and AICAR on *CLN1* and  
668 *CLN2* expression.

669 (A) Additive effects of AICAR and *bre1*, *rad6*, *htbK123R*, *set1*, *H3K4Q* mutations on  
670 *CLN1* and *CLN2* expression. The strains Y9516, Y9217, Y10056, Y9168 and Y10332  
671 were transformed with p5488, p5489 or p5496 and then treated as described for  
672 beta-galactosidase analysis. \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$  \*  $p < 0.05$ ; two way ANOVA.

673 (B) *bre1* and AICAR effects on Cln2 are additive. The strains Y10636, Y10608,  
674 Y10741 and Y10752 were treated as described for western blot analysis. (C) *rad6*,

675 *bre1* and *htbK123R* synthetic lethality with AICAR is suppressed by *CLN1*, *CLN2* or  
676 *CLN3* overexpression. The strains Y9217, Y9516, Y10056 were transformed with  
677 p2717, p5430, p5422) or p5424. Transformants were spotted on SDcasaWA

678 supplemented or not with AICAR (0.5 mM). Plates were imaged after 3 days at 37°C.  
679 (D) *Set1* and *H3K4Q* synthetic lethality with AICAR is suppressed by G1 cyclins  
680 overexpression. The strains Y9168 and Y10332 were transformed with the plasmids  
681 used in (C). Transformants were spotted on SD<sub>cas</sub>WA supplemented or not AICAR  
682 (1 mM). Plates were imaged after 3 days at 37°C. All values are presented as mean  
683 +/- SEM (N = 2).

684 **Figure 6.** Model for synthetic lethality between *bre1Δ* and AICAR due to their  
685 combined effects on G1 cyclin transcription

686 (A) In wild type conditions, Bre1, H2B ubiquitination (Ub-H2B), Set1 and H3K4 mono,  
687 di- and trimethylation (Me<sub>1/2/3</sub>-H3K4) positively impact on *CLN1* and *CLN2*  
688 transcription. During G1 progression, Cln3 enters the nucleus, phosphorylates Whi5  
689 allowing the correct expression of *CLN1* and *CLN2* through the transcription factor  
690 complex SBF. Phosphorylated Whi5 is excluded from the nucleus. (B) AICAR  
691 treatment affects Cln3 subcellular localization. This directly impacts on Whi5  
692 localization and results in lower *CLN1* and *CLN2* transcription. (C) In a strain deleted  
693 for *bre1*, H2B ubiquitination is lost. This leads to the loss of the transactivation signal  
694 induced by this histone mark and thus the loss of H3K4 di- and trimethylation.  
695 Consequently, their positive effects on *CLN1* and *CLN2* expression are lost, leading  
696 to a severe decrease of *CLN1* and *CLN2* transcription. When combined with AICAR  
697 treatment, this leads to a synthetic lethal phenotype due to simultaneous effects on  
698 the three G1 cyclins.

699 **Figure 7.** Whi5 is pivotal for AICAR sensitivity in yeast

700 (A) *cln3* knock-out is synthetic sick with *set1* deletion. For each cross a tetatype is  
701 presented (more tetrads are shown in Fig. S3A). Cells were serial diluted and spotted

702 on YPDA. Plates were imaged after 2 days at 25°C. (B) Whi5 is central in AICAR  
703 sensitivity. The following strains were spotted on SDcasaWAW medium  
704 supplemented or not with AICAR (2 or 4 mM): Y2950, Y10444, Y9516, Y9168,  
705 Y10825 and Y10826. Plates were imaged after 2 days at 37°C.

706 **Figure 8.** Knock-down of *RNF40*, *ASH2L* or *KMT2D/MLL2* leads to an exacerbated  
707 sensitivity to AICAR treatment in HCT116 cells

708 (A) *RNF40* knock-down exacerbates sensitivity to AICAR treatment. HCT116 cells  
709 were treated as described for siRNA and proliferation assay. (B) *RNF40* knock-down  
710 effectively diminishes Rnf40 protein level. HCT116 cells were treated as described  
711 for siRNA and extracts were harvested for western blotting. (C) *ASH2L* knock-down  
712 exacerbates sensitivity to AICAR treatment. HCT116 cells were treated as described  
713 for siRNA and proliferation assay. (D) *ASH2L* knock-down effectively diminishes  
714 Ash2l protein level. HCT116 cells were treated as described for siRNA and extracts  
715 were harvested for western blotting. (E) *MLL2* knock-down exacerbates sensitivity to  
716 AICAR treatment. HCT116 cells were treated as described for siRNA and  
717 proliferation assay. (F) *MLL2* knock-down effectively diminishes Mll2 protein level.  
718 HCT116 cells were treated as described for siRNA and extracts were harvested for  
719 western blotting. (G) Effects of AICAR and knock-down on different actors of cell  
720 cycle. HCT116 cells were treated as described for siRNA and 0 or 0.5 mM AICAR  
721 was added. 3 days later, extracts were harvested for western blotting. All results from  
722 WST1 assays are represented as a ratio of the 0 mM AICAR siNT and thus are not  
723 normalized individually.

#### 724 LITERATURE CITED

725 Bertoli, C., J. Skotheim, and R. de Bruin, 2013 Control of cell cycle transcription during G1  
726 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **14**(8):518-28

727  
728 Birkeland, S. R., N. Jin, A. C. Ozdemir, R. H. Lyons, L. S. Weisman *et al.*, 2010 Discovery of  
729 mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by pooled linkage analysis and whole-genome  
730 sequencing. *Genetics* **186**: 1127–37.  
731  
732 Briggs, S. D., T. Xiao, Z.-W. W. Sun, J. A. Caldwell, J. Shabanowitz *et al.*, 2002 Gene silencing:  
733 trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**: 498.  
734  
735 Ceschin, J., H. C. Hürlimann, C. Saint-Marc, D. Albrecht, T. Violo *et al.*, 2015 Disruption of  
736 Nucleotide Homeostasis by the Antiproliferative Drug 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -  
737 d-ribofuranoside Monophosphate (AICAR). *J. Biol. Chem.* **290**: 23947–59.  
738  
739 Ceschin, J., C. Saint-Marc, J. Laporte, A. Labriet, C. Philippe *et al.*, 2014 Identification of yeast  
740 and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -d-ribofuranoside (AICAR) transporters. *J.*  
741 *Biol. Chem.* **289**: 16844–54.  
742  
743 Connell-Crowley, L., J. W. Harper, and D. W. Goodrich, 1997 Cyclin D1/Cdk4 regulates  
744 retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol. Biol.*  
745 *Cell* **8**: 287–301.  
746  
747 Daignan-Fornier, B., and B. Pinson, 2012 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-  
748 ribofuranosyl 5'-Monophosphate (AICAR), a Highly Conserved Purine Intermediate with  
749 Multiple Effects. *Metabolites* **2**: 292–302.  
750  
751 Denis, V., H. Boucherie, C. Monribot, and B. Daignan-Fornier, 1998 Role of the myb-like  
752 protein bas1p in *Saccharomyces cerevisiae*: a proteome analysis. *Mol. Microbiol.* **30**: 557–66.  
753  
754 Dirick, and Nasmyth, 1991 Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature*  
755 754–7.  
756  
757 Dover, J., J. Schneider, M. A. Tawiah-Boateng, A. Wood, K. Dean *et al.*, 2002 Methylation of  
758 histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J. Biol. Chem.* **277**:  
759 28368–71.  
760  
761 Espinosa, J. M. M., 2008 Histone H2B ubiquitination: the cancer connection. *Genes Dev.* **22**:  
762 2743–9.  
763  
764 Flynn, P. J., and R. J. Reece, 1999 Activation of transcription by metabolic intermediates of  
765 the pyrimidine biosynthetic pathway. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 882–8.  
766  
767 Groth, A., W. Rocha, A. Verreault, and G. Almouzni, 2007 Chromatin challenges during DNA  
768 replication and repair. *Cell* **128**: 721–33.  
769  
770 Hahn, M. A., K.-A. A. Dickson, S. Jackson, A. Clarkson, A. J. Gill *et al.*, 2012 The tumor  
771 suppressor CDC73 interacts with the ring finger proteins RNF20 and RNF40 and is required  
772 for the maintenance of histone 2B monoubiquitination. *Hum. Mol. Genet.* **21**: 559–68.  
773

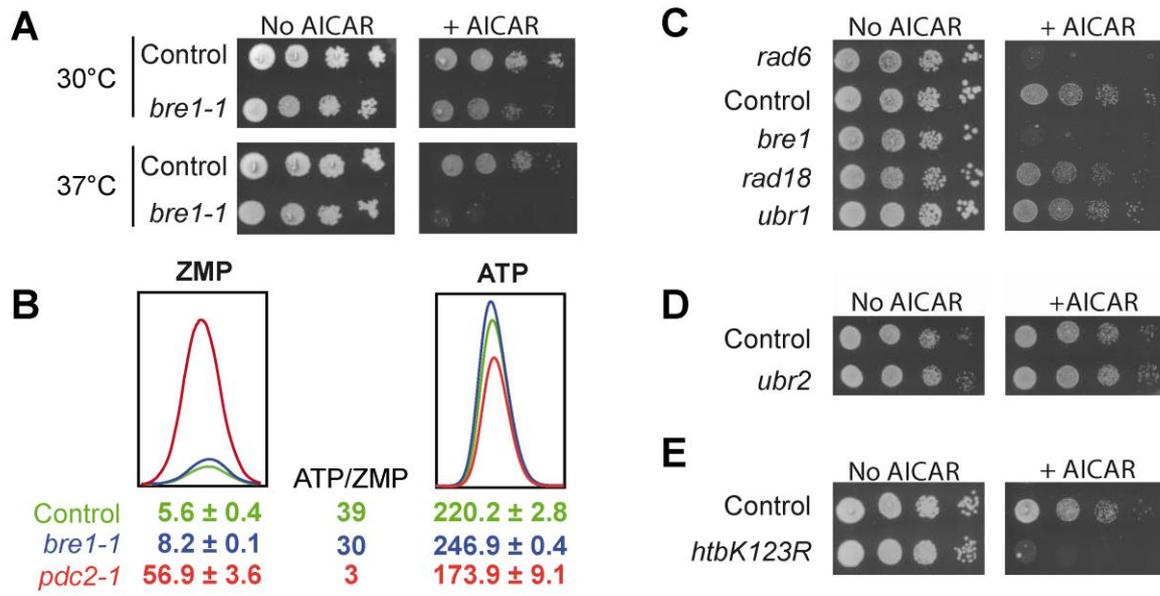
774 Hanahan, D., and R. A. Weinberg, 2011 Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**:  
775 646–74.  
776  
777 Henry, K. W., A. Wyce, W.-S. S. Lo, L. J. Duggan, N. C. Emre *et al.*, 2003 Transcriptional  
778 activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by  
779 SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* **17**: 2648–63.  
780  
781 Hwang, W., S. Venkatasubrahmanyam, A. Ianculescu, A. Tong, C. Boone *et al.*, 2002 A  
782 Conserved RING Finger Protein Required for Histone H2B Monoubiquitination and Cell Size  
783 Control. *Mol. Cell* **11**(1):261-6  
784  
785 Hürlimann, H. C., B. Laloo, B. Simon-Kayser, C. Saint-Marc, F. Coulpier *et al.*, 2011  
786 Physiological and toxic effects of purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide  
787 ribonucleotide (AICAR) in yeast. *J. Biol. Chem.* **286**: 30994–1002.  
788  
789 Igata, M., H. Motoshima, K. Tsuruzoe, K. Kojima, T. Matsumura *et al.*, 2005 Adenosine  
790 monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell  
791 proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circ. Res.* **97**: 837–44.  
792  
793 Imamura, K., T. Ogura, A. Kishimoto, M. Kaminishi, and H. Esumi, 2001 Cell cycle regulation  
794 via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-  
795 4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line.  
796 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**: 562–7.  
797  
798 Kari, V., A. Shchebet, H. Neumann, and S. A. Johnsen, 2011 The H2B ubiquitin ligase RNF40  
799 cooperates with SUPT16H to induce dynamic changes in chromatin structure during DNA  
800 double-strand break repair. *Cell Cycle* **10**: 3495–504.  
801  
802 Karpiuk, O., Z. Najafova, F. Kramer, M. Hennion, C. Galonska *et al.*, 2012 The histone H2B  
803 monoubiquitination regulatory pathway is required for differentiation of multipotent stem  
804 cells. *Mol. Cell* **46**: 705–13.  
805  
806 Kim, J., M. Guermah, R. K. McGinty, J.-S. S. Lee, Z. Tang *et al.*, 2009 RAD6-Mediated  
807 transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human  
808 cells. *Cell* **137**: 459–71.  
809  
810 Kippert, F., 1995 A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination  
811 of  $\beta$ -galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiology Letters* 201–206.  
812  
813 Kouzarides, T., 2007 Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705.  
814  
815 Latham, J., R. Chosed, S. Wang, and S. Dent, 2011 Chromatin Signaling to Kinetochores:  
816 Transregulation of Dam1 Methylation by Histone H2B Ubiquitination. *Cell* **146**(5):709-19  
817  
818 Li, B., M. Carey, and J. L. Workman, 2007 The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**:  
819 707–19.  
820

821 Liu, X., R. R. Chhipa, S. Pooya, M. Wortman, S. Yachyshin *et al.*, 2014 Discrete mechanisms of  
822 mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc. Natl. Acad.*  
823 *Sci. U.S.A.* **111**: E435–44.  
824  
825 Malumbres, M., and M. Barbacid, 2001 To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer.  
826 *Nat. Rev. Cancer* **1**: 222–31.  
827  
828 Massagué, J., 2004 G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**: 298–306.  
829  
830 Mayer, F. V., R. Heath, E. Underwood, M. J. Sanders, D. Carmena *et al.*, 2011 ADP regulates  
831 SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.*  
832 **14**: 707–14.  
833  
834 Morin, R. D., M. Mendez-Lago, A. J. Mungall, R. Goya, K. L. Mungall *et al.*, 2011 Frequent  
835 mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* **476**: 298–303.  
836  
837 Nakamura, K., A. Kato, J. Kobayashi, H. Yanagihara, S. Sakamoto *et al.*, 2011 Regulation of  
838 homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol. Cell* **41**: 515–28.  
839  
840 Nakanishi, S., J. S. Lee, K. E. Gardner, J. M. Gardner, Y. H. Takahashi *et al.*, 2009 Histone  
841 H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation  
842 by COMPASS and Dot1. *J. Cell Biol.* **186**: 371–7.  
843  
844 Narkar, V. A., M. Downes, R. T. Yu, E. Embler, Y.-X. X. Wang *et al.*, 2008 AMPK and PPARdelta  
845 agonists are exercise mimetics. *Cell* **134**: 405–15.  
846  
847 Neste, E., B. Cazin, A. Janssens, E. González-Barca, M. Terol *et al.*, 2012 Acadesine for  
848 patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase  
849 I/II study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**: 581–591.  
850  
851 Ng, H., R.-M. Xu, Y. Zhang, and K. Struhl, 2002 Ubiquitination of Histone H2B by Rad6 Is  
852 Required for Efficient Dot1-mediated Methylation of Histone H3 Lysine 79. *J. Biol. Chem.*  
853 **277**: 34655–34657.  
854  
855 Ortega-Molina, A., I. W. Boss, A. Canela, H. Pan, Y. Jiang *et al.*, 2015 The histone lysine  
856 methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell  
857 lymphoma development. *Nat. Med.* **21**: 1199–208.  
858  
859 Parsons, D. W., M. Li, X. Zhang, S. Jones, R. J. Leary *et al.*, 2011 The genetic landscape of the  
860 childhood cancer medulloblastoma. *Science* **331**: 435–9.  
861  
862 Pinson, B., S. Vaur, I. Sagot, F. Culpier, S. Lemoine *et al.*, 2009 Metabolic intermediates  
863 selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine  
864 pathways. *Genes Dev.* **23**: 1399–407.  
865

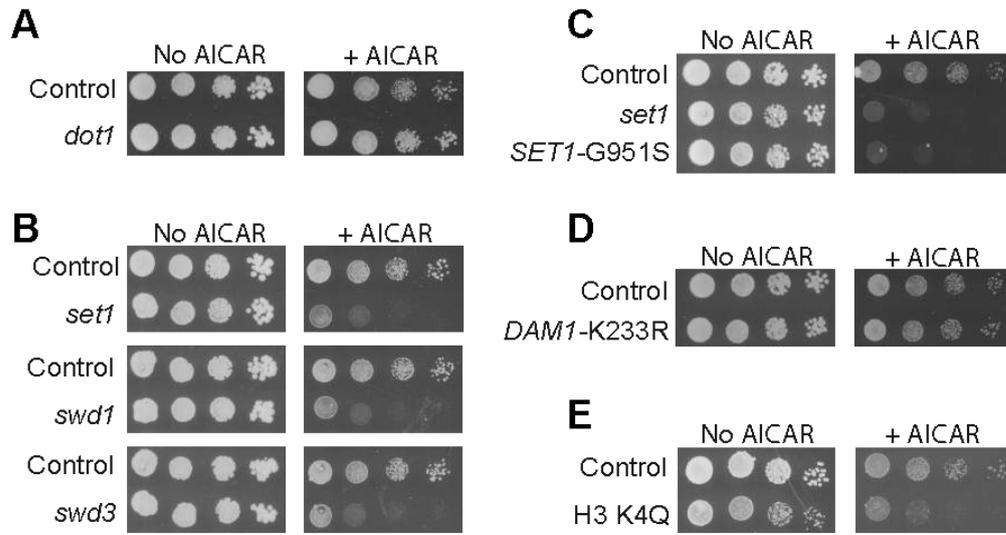
866 Prenzel, T., Y. Begus-Nahrman, F. Kramer, M. Hennion, C. Hsu *et al.*, 2011 Estrogen-  
867 dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-  
868 dependent monoubiquitination of histone H2B. *Cancer Res.* **71**: 5739–53.  
869  
870 Raboy, B., A. Marom, Y. Dor, and R. G. Kulka, 1999 Heat-induced cell cycle arrest of  
871 *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the RAD6/UBC2 and WSC2 genes in its reversal.  
872 *Mol. Microbiol.* **32**: 729–39.  
873  
874 Rank, K. B., D. B. Evans, and S. K. Sharma, 2000 The N-terminal domains of cyclin-dependent  
875 kinase inhibitory proteins block the phosphorylation of cdk2/Cyclin E by the CDK-activating  
876 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 469–73.  
877  
878 Rattan, R., S. Giri, A. K. Singh, and I. Singh, 2005 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-  
879 ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein  
880 kinase. *J. Biol. Chem.* **280**: 39582–93.  
881  
882 Richardson, H. E., C. Wittenberg, F. Cross, and S. I. Reed, 1989 An essential G1 function for  
883 cyclin-like proteins in yeast. *Cell* **59**: 1127–33.  
884  
885 Robzyk, K., J. Recht, and M. A. Osley, 2000 Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in  
886 yeast. *Science* **287**: 501–4.  
887  
888 Rébora, K., C. Desmoucelles, F. Borne, B. Pinson, and B. Daignan-Fornier, 2001 Yeast AMP  
889 pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate.  
890 *Mol. Cell. Biol.* **21**: 7901–12.  
891  
892 Rébora, K., B. Laloo, and B. Daignan-Fornier, 2005 Revisiting purine-histidine cross-pathway  
893 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule. *Genetics* **170**:  
894 61–70.  
895  
896 Schulze, J. M., J. Jackson, S. Nakanishi, J. M. Gardner, T. Hentrich *et al.*, 2009 Linking cell  
897 cycle to histone modifications: SBF and H2B monoubiquitination machinery and cell-cycle  
898 regulation of H3K79 dimethylation. *Mol. Cell* **35**: 626–41.  
899  
900 Shen, X., H. Xiao, R. Ranallo, W.-H. H. Wu, and C. Wu, 2003 Modulation of ATP-dependent  
901 chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* **299**: 112–4.  
902  
903 Sherman, F., 1991 Getting started with yeast. *Meth. Enzymol.* **194**: 3–21.  
904  
905 Shilatifard, A., 2012 The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of  
906 regulation in development and disease pathogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **81**: 65–95.  
907  
908 Steger, D. J., E. S. Haswell, A. L. Miller, S. R. Wentz, and E. K. O’Shea, 2003 Regulation of  
909 chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* **299**: 114–6.  
910

911 Sullivan, J. E., K. J. Brocklehurst, A. E. Marley, F. Carey, D. Carling *et al.*, 1994 Inhibition of  
912 lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of  
913 AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett.* **353**: 33–6.  
914  
915 Sun, Z.-W., and C. Allis, 2002 Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and  
916 gene silencing in yeast. *Nature* **418**: 104–108.  
917  
918 Sze, J. Y., M. Woontner, J. A. Jaehning, and G. B. Kohlhaw, 1992 In vitro transcriptional  
919 activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-  
920 isopropylmalate. *Science* **258**: 1143–5.  
921  
922 Tang, Y.-C., B. Williams, J. Siegel, and A. Amon, 2010 Identification of Aneuploidy-Selective  
923 Antiproliferation Compounds. *Cell* **144**(4):499-512  
924  
925 Tessarz, P., and T. Kouzarides, 2014 Histone core modifications regulating nucleosome  
926 structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**: 703–8.  
927  
928 Thompson, J. M., Q. H. Nguyen, M. Singh, and O. V. Razorenova, 2015 Approaches to  
929 identifying synthetic lethal interactions in cancer. *Yale J Biol Med* **88**: 145–55.  
930  
931 Trujillo, K. M., and M. A. Osley, 2012 A role for H2B ubiquitylation in DNA replication. *Mol.*  
932 *Cell* **48**: 734–46.  
933  
934 Turner, S. D., A. R. Ricci, H. Petropoulos, J. Genereaux, I. S. Skerjanc *et al.*, 2002 The E2  
935 ubiquitin conjugase Rad6 is required for the ArgR/Mcm1 repression of ARG1 transcription.  
936 *Mol. Cell. Biol.* **22**: 4011–9.  
937  
938 Urasaki, Y., L. Heath, and C. W. Xu, 2012 Coupling of glucose deprivation with impaired  
939 histone H2B monoubiquitination in tumors. *PLoS ONE* **7**: e36775.  
940  
941 Vergés, E., N. Colomina, E. Garí, C. Gallego, and M. Aldea, 2007 Cyclin Cln3 is retained at the  
942 ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol. Cell* **26**:  
943 649–62.  
944  
945 Weinberg, R., 1995 The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 323–330.  
946  
947 Wong, C. C., I. Martincorena, A. G. Rust, M. Rashid, C. Alifrangis *et al.*, 2014 Inactivating  
948 CUX1 mutations promote tumorigenesis. *Nat. Genet.* **46**: 33–8.  
949  
950 Wood, A., N. J. Krogan, J. Dover, J. Schneider, J. Heidt *et al.*, 2003 Bre1, an E3 ubiquitin ligase  
951 required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol. Cell* **11**: 267–  
952 74.  
953  
954 Zhang, K., W. Lin, J. A. Latham, G. M. Riefler, J. M. Schumacher *et al.*, 2005 The Set1  
955 methyltransferase opposes Ipl1 aurora kinase functions in chromosome segregation. *Cell*  
956 **122**: 723–34.  
957

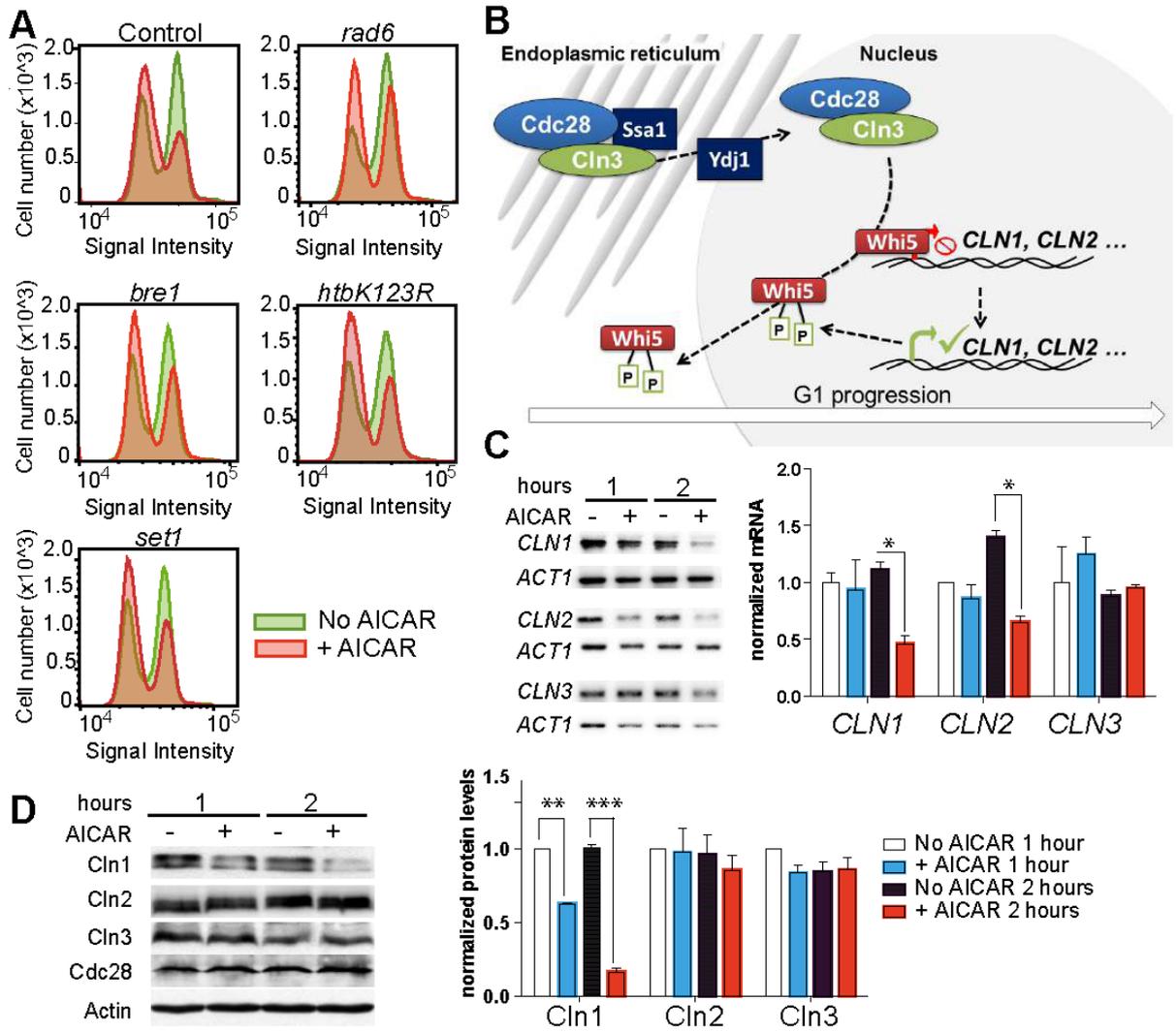
958 Zimmermann, C., P. Chymkowitch, V. Eldholm, C. D. Putnam, J. M. Lindvall *et al.*, 2011 A  
959 chemical-genetic screen to unravel the genetic network of CDC28/CDK1 links ubiquitin and  
960 Rad6-Bre1 to cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 18748–53.  
961  
962



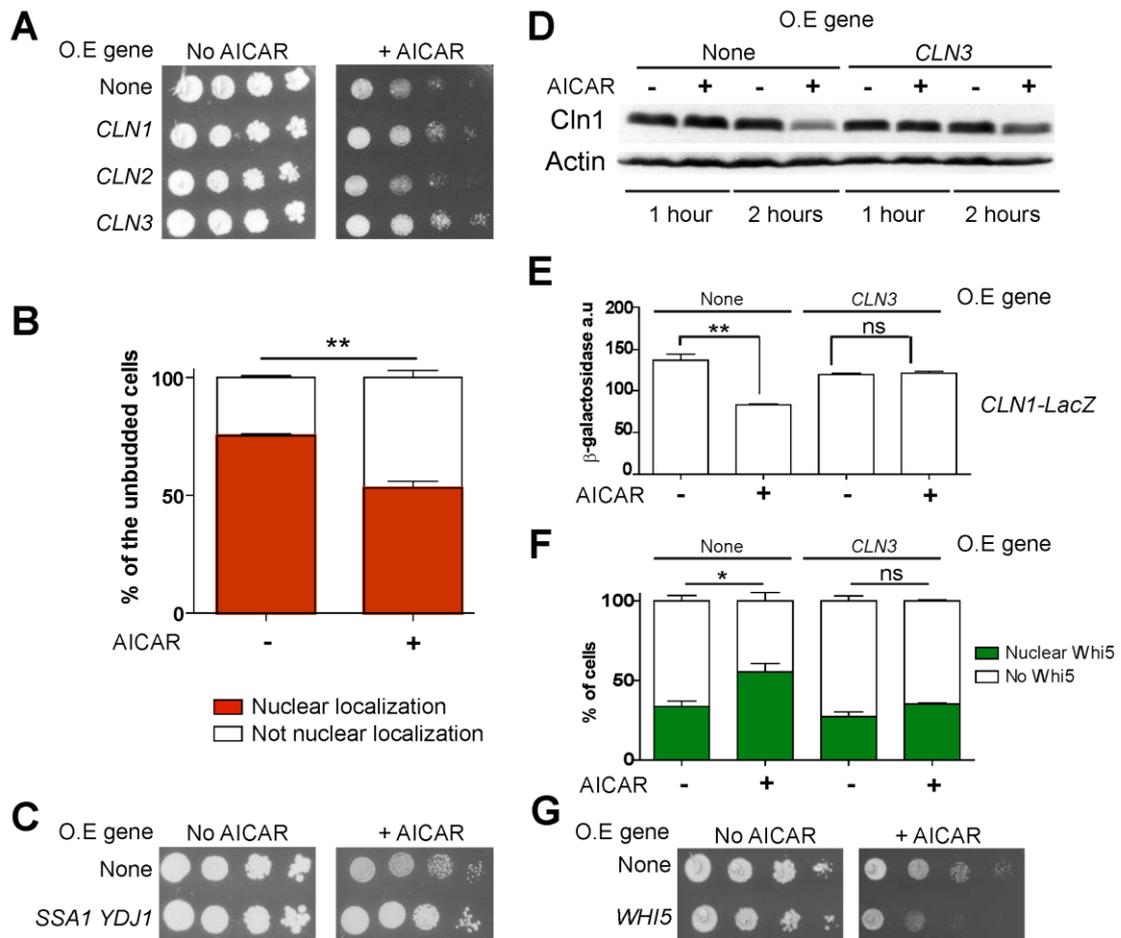
**Figure 1**



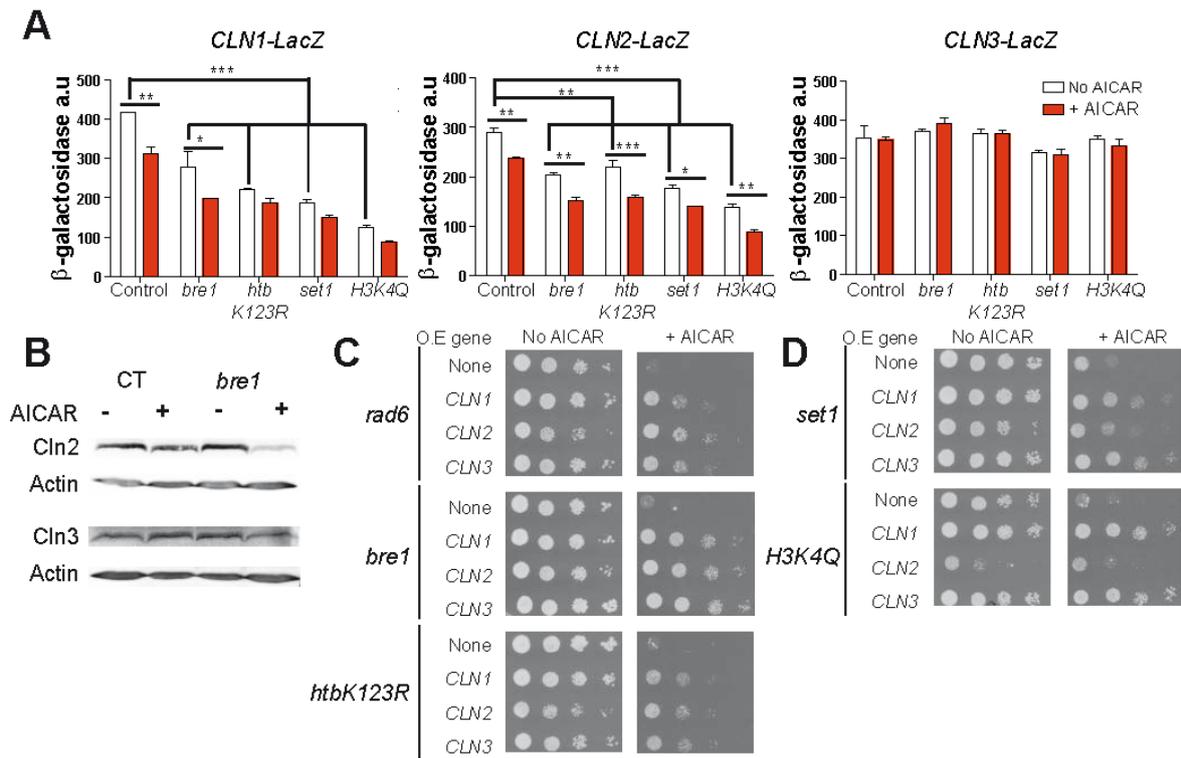
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

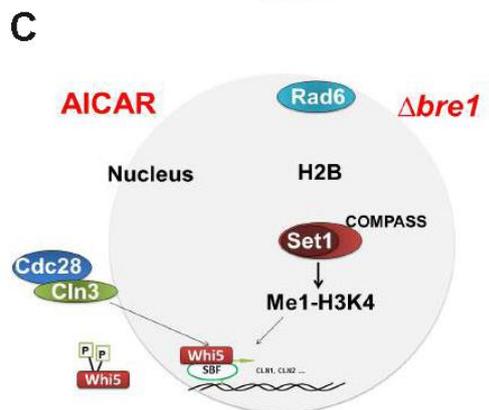
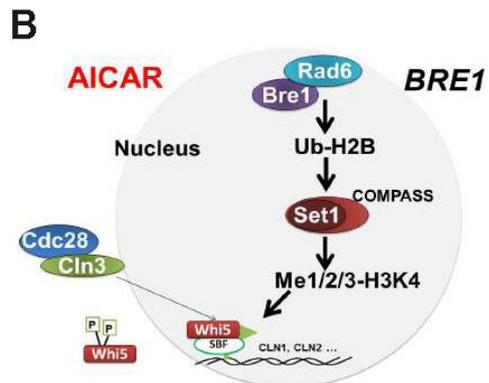
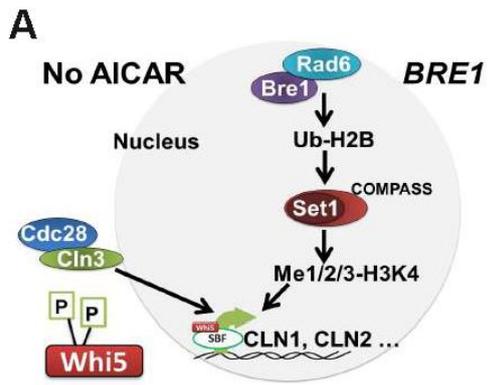
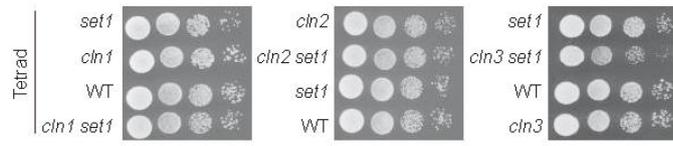
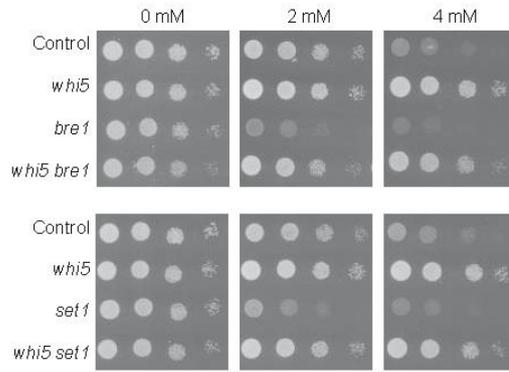
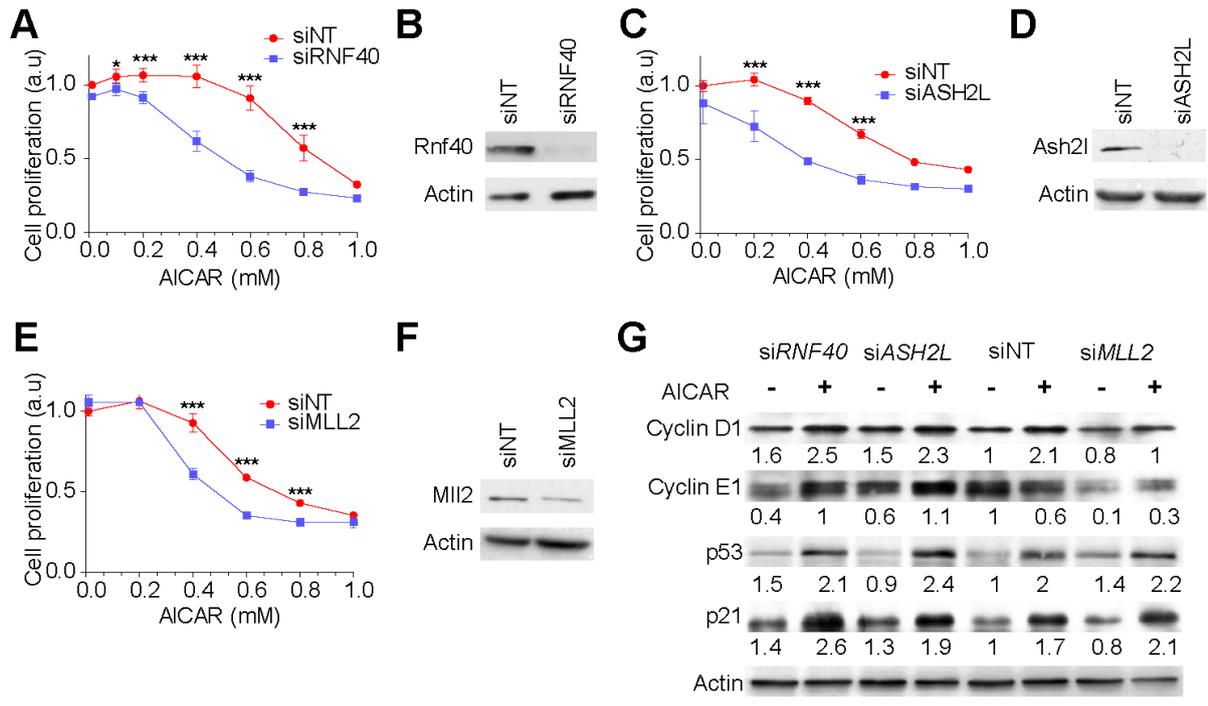
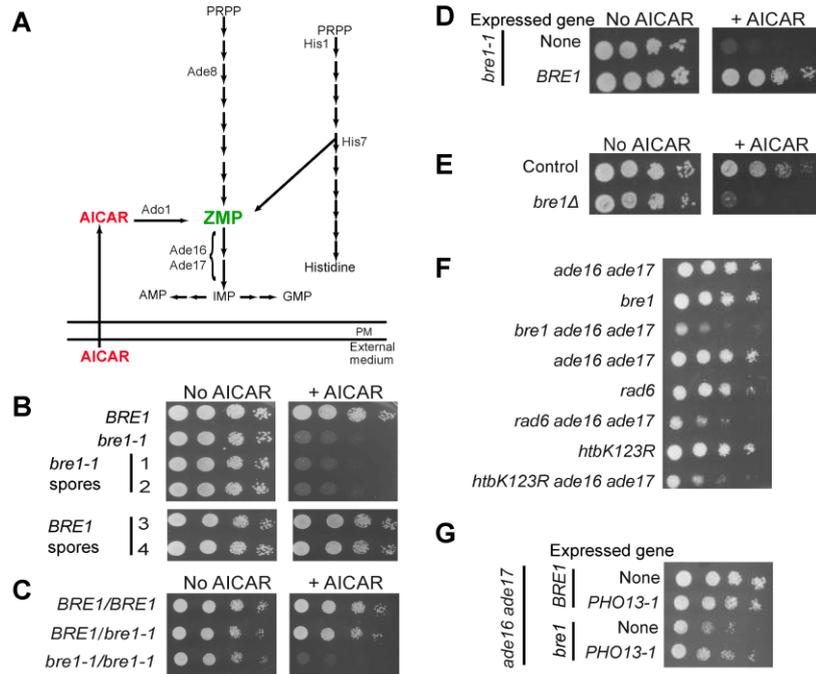


Figure 6

**A****B****Figure 7**

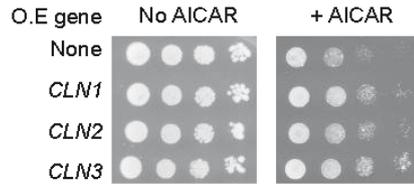


**Figure 8**



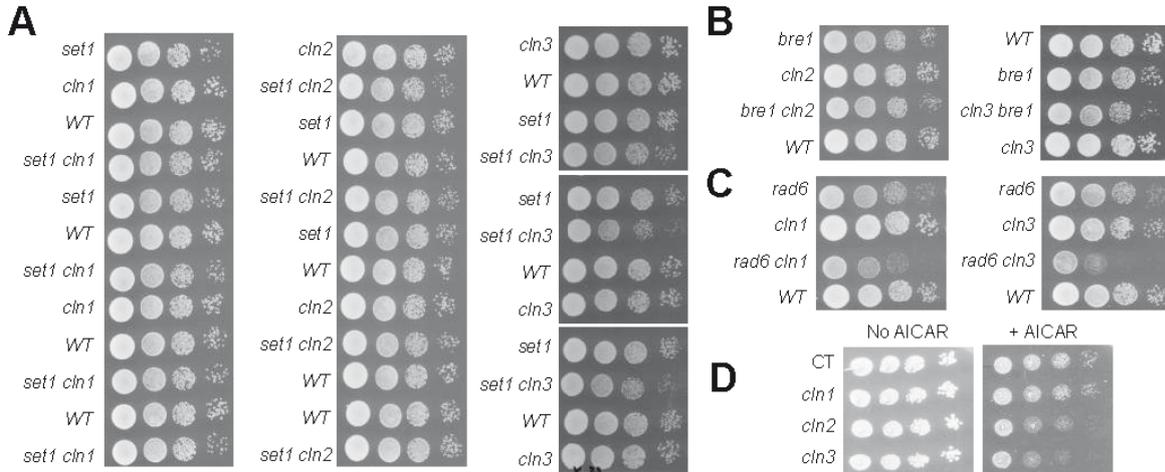
**Figure S1: Mutation in *BRE1* is synthetic lethal with AICAR treatment.**

(A) Schematic representation of purine and histidine pathways in yeast. PM, plasma membrane; PRPP, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; IMP, inosine monophosphate. (B) The *bre1-1* mutation is genetically linked to AICAR sensitivity. Cells were grown overnight on SDcasaWU medium, serially diluted, and spotted on the same medium containing (2 mM) or not AICAR. The strains, Y7322, Y6986 and four representative derived spores are shown (*BRE1* or *bre1-1* status was determined by Sanger sequencing). Plates were imaged after 1 day at 37°C. (C) The *bre1-1* mutation is recessive. Diploid strains (*ade16/ade16 ade17/ade17 ade8/ade8 his1/his1*) carrying the indicated combinations of *BRE1* alleles either mutated (*bre1-1*) or not (*BRE1*) were spotted on SDcasaWU medium supplemented or not with AICAR (2 mM). Plates were imaged after 2 days at 37°C. (D) AICAR sensitivity of the *bre1-1* allele is complemented by the wild-type *BRE1* gene. The strain Y7322 was transformed with p344 or p4864. Transformants were spotted on SDcasaWA medium. Plates were imaged after 2 days at 37°C. (E) Deletion of *BRE1* leads to AICAR sensitivity. The strains Y2950 and Y9516 were spotted on SDcasaWU medium supplemented or not with AICAR (2 mM). Plates were imaged after 3 days at 37°C. (F) *bre1* synthetic lethality with ZMP is independent of its external or internal origin. Strains were spotted on SDcasaWU medium for 2 days at 37°C before imaging: Y2948, Y8910, Y9100, Y1367, Y9143, Y9921 and Y10058. (G) *PHO13-1* expression suppresses the growth defect of the *bre1 ade16 ade17* strain. The strains Y2948 and Y9100 were transformed with p798 or p3438. Transformants were spotted on SDcasaWA medium for 2 days.



**Figure S2: CLN3 overexpression suppresses the effects of AICAR on growth.**

The control strain Y2950 was transformed with multicopy plasmids (O.E: overexpression) p339, p5323, p5325 or p4742. Transformants were serially diluted on SD<sub>case</sub>WA supplemented or not with AICAR (10 mM) and plates were imaged after 3 days at 37°C.



**Figure S3: *cln3* deletion is synthetic sick with *set1*, *bre1* or *rad6* deletions.**

(A) *set1* deletion is synthetic sick with *cln3* deletion and not *cln1* or *cln2* deletions. Several spores derived from individual tetrads were serially diluted and spotted on YPDA medium during 2 days at 25°C. (B) *bre1* is synthetic sick with *cln3* deletion and not *cln1* deletion. The following strains were diluted and spotted on YPDA at 25°C during 2 days: Y9322, Y8910, Y9045, Y10830, Y1351 and Y10694. (C) *rad6* is highly synthetic sick with *cln3* deletion and less with *cln1* deletion. The following strains were diluted and spotted on YPDA at 25°C during 2 days: Y9322, Y1367, Y8693, Y10832, Y1351 and Y10834.

Strain	Genotype	Sources
Y2950	<i>MAT α ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	Lab collection
Y6986	<i>MAT α ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; HIS3-LEU2</i>	Lab collection
Y7322	<i>MAT α bre1-1; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; HIS3-LEU2</i>	This study
Y7314	<i>MAT α pdc2-1; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; HIS3-LEU2</i>	Lab collection
Y9516	<i>MAT α bre1::KanR; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	This study
Y9217	<i>MAT α rad6::KanR; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	This study
Y10499	<i>MAT α rad18::KanR; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	This study
Y 9927	<i>MAT α ubr1::URA3; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y10747	<i>MAT α ubr2::URA3; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y10056	<i>MAT α htb1K123R-HIS3; htb2::KanMX4; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y2948	<i>MAT α ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	Lab collection
Y8910	<i>MAT α bre1::KanR; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y9100	<i>MAT α bre1::KanMX4; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y1367	<i>MAT α rad6::KanR; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y9143	<i>MAT α rad6::KanMX4; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y9921	<i>MAT α htb1K123R-HIS3 htb2::KanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brandl CJ
Y10058	<i>MAT α htb1K123R-HIS3; htb2::KanMX4; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y9304	<i>MAT α dot1::KanR; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	This study
Y9104	<i>MAT α set1::KanR; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	Morillon A
Y9168	<i>MAT α set1::KanR; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	This study
Y9478	<i>MAT α swd1::KanR; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	This study
Y9430	<i>MAT α swd3::KanR; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	This study
Y10159	<i>MAT α set1G951S his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	Dent S
Y10287	<i>MAT α set1G951S ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4 his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	This study
Y10160	<i>MAT α dam1K233R his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	Dent S
Y10285	<i>MAT α dam1K233R ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4 his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	This study
Y10332	<i>MAT α H3K4Q-HHF2 hht1-hhf1::NatMX4; ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4 his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3</i>	This study
Y10369	<i>MAT α WHI5-GFP-HIS3 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 met15Δ0</i>	This study
Y10448	<i>MAT α CLN1-13Myc-TRP1 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 trp1::LEU2</i>	This study
Y10636	<i>MAT α CLN2-13Myc-TRP1 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 trp1::LEU2</i>	This study

Y10608	<i>MAT α CLN3-3HA-9Myc-TRP1 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 trp1::LEU2</i>	This study
Y10741	<i>MAT α bre1::KanMX4 CLN2-13Myc-TRP1 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 trp1::LEU2</i>	This study
Y10752	<i>MAT α bre1::KanMX4 CLN3-13Myc-TRP1 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 trp1::LEU2</i>	This study
Y9322	<i>MAT α his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	Boeke JD
Y10830	<i>MAT α bre1::KanMX4 cin2::KanMX4 his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y10694	<i>MAT α bre1::KanMX4 cin3::KanMX4 his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i>	This study
Y10832	<i>MAT α rad6::KanMX4 cin1::KanMX4 his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 lys2Δ0</i>	This study
Y10834	<i>MAT α rad6::KanMX4 cin3::KanMX4 his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	This study
Y10835	<i>MAT α set1::KanMX4 cin1::KanMX4 his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	This study
Y10836	<i>MAT α set1::KanMX4 cin2::KanMX4 his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y10837	<i>MAT α set1::KanMX4 cin3::KanMX4 his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y8693	<i>MAT α cin1::KanR his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	Lab collection
Y9045	<i>MAT α cin2::KanR his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0</i>	Lab collection
Y1351	<i>MAT α cin3::KanR his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0</i>	Lab collection
Y10470	<i>MAT α cin1::KanMX4 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 lys2Δ0</i>	This study
Y10472	<i>MAT α cin2::KanMX4 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0</i>	This study
Y10452	<i>MAT α cin3::KanMX4 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 lys2Δ0</i>	This study
Y10444	<i>MAT α whi5::KanMX4 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 lys2Δ0</i>	This study
Y10825	<i>MAT α whi5::KanMX4 bre1::KanMX4 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 lys2Δ0</i>	This study
Y10826	<i>MAT α whi5::KanMX4 set1::KanMX4 ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; ade8::KanMX4; his1::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0 lys2Δ0</i>	This study

Table S1: Strains used in this study

Plasmid	Characteristics	Sources
P344	CEN ARS EMPTY <i>URA3</i> AmpR	Lab collection
p4868	CEN ARS BRE1 <i>URA3</i> AmpR	This study
p798	CEN ARS tetEMPTY <i>URA3</i> AmpR	Lab collection
p3438	CEN ARS tet <i>PHO13-1</i> <i>URA3</i> AmpR	Lab collection
p2717	CEN ARS tet myc EMPTY <i>URA3</i> AmpR	Lab collection
p5430	CEN ARS tet myc <i>CLN1</i> <i>URA3</i> AmpR	This study
p5422	CEN ARS tet myc <i>CLN2</i> <i>URA3</i> AmpR	This study
p5424	CEN ARS tet myc <i>CLN3</i> <i>URA3</i> AmpR	This study
p339	2 micron EMPTY <i>URA3</i> AmpR	Lab collection
p5324	2 micron <i>CLN1</i> <i>URA3</i> AmpR	This study
p5325	2 micron <i>CLN2</i> <i>URA3</i> AmpR	This study
p4742	2 micron <i>CLN3</i> <i>URA3</i> AmpR	This study
p5488	2 micron <i>CLN1</i> promoter-LacZ <i>URA3</i> AmpR	This study
p5489	2 micron <i>CLN2</i> promoter-LacZ <i>URA3</i> AmpR	This study
p5496	2 micron <i>CLN3</i> promoter-LacZ <i>URA3</i> AmpR	This study
p2637	CEN ARS tet myc EMPTY LEU2 AmpR	Lab collection
p5462	CEN ARS tet myc <i>CLN3</i> LEU2 AmpR	This study
P4726	2 micron <i>WHI5</i> <i>URA3</i> AmpR	This study
p338	2 micron EMPTY <i>LEU2</i> AmpR	Lab collection
p5483	2 micron <i>YDJ1</i> <i>LEU2</i> AmpR	This study
p5469	2 micron <i>SSA1</i> <i>URA3</i> AmpR	This study
P5374	Integrative <i>CLN3</i> -3HA-9myc <i>TRP1</i> AmpR	Miller M

**Table S2: Plasmids used in this study**

## 1. Avantages et inconvénients de l'approche utilisée dans l'article

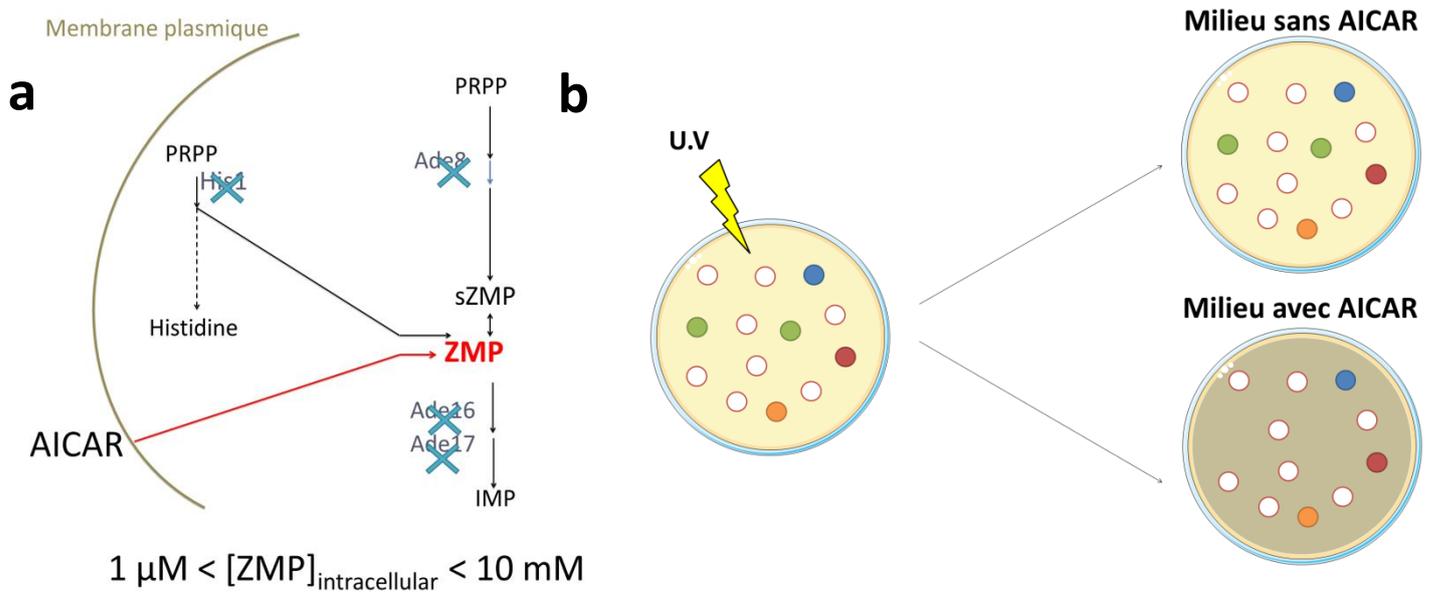
Dans cet article, nous avons donc choisi d'étudier les effets de l'AICAR chez la levure *S. cerevisiae* en cherchant des mutations synthétiques létales avec un traitement à l'AICAR. La létalité synthétique (SL) est définie comme l'interaction entre des gènes coessentiels, ainsi l'inhibition de chacun d'eux séparément n'a pas ou peu d'effet, alors que leur inhibition conjointe engendre un fort ralentissement voir un arrêt de la prolifération [137]. Ici, l'inhibition se fait *via* l'AICAR, qui va venir inhiber certaines fonctions, et des mutations qui vont en inhiber d'autres, c'est ce que l'on appelle de la chemo-génétique.

Les avantages de cette approche sont tout d'abord techniques. Il est relativement aisé chez la levure de réaliser des cribles, donc une approche à l'aveugle, pour trouver des mutants hypersensibles. La démarche est résumée sur la figure 17 et permet de cribler de multiples mutants très facilement. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux mutants qui ne présentaient pas de profils métaboliques affectés par rapport à la souche sauvage. L'idée était d'identifier des mutants affectant une fonction cellulaire particulière qui étaient SL avec l'AICAR. En effet, l'inconvénient lorsque l'on utilise une drogue est qu'une partie des mutants obtenus vont être liés au transport ou à la métabolisation de la drogue elle-même. Cela peut être un avantage lorsque l'on cherche à identifier ses transporteurs [14] ou un inconvénient lorsque l'on cherche des fonctions affectées par la drogue. Ici, un seul mutant s'est révélé avoir un phénotype très marqué tout en maintenant un profil métabolique très similaire à la souche sauvage, *bre1*.

Cette approche est aussi extrêmement intéressante dans une démarche dont la finalité est thérapeutique. Au cours de la progression tumorale, les cellules acquièrent de nombreuses mutations. Du fait de leur mode d'apparition, elles sont propres aux cellules cancéreuses et absentes des cellules saines. Pouvoir identifier une mutation spécifique aux cellules malades qui soit SL avec une drogue est idéal, puisqu'ainsi à une même concentration de drogue, les cellules saines seront épargnées par la molécule contrairement aux cellules tumorales mutées (Figure 18).

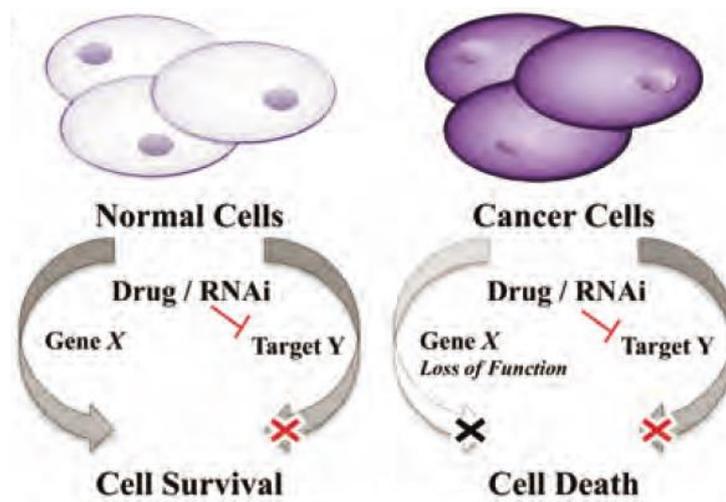
Par contre, l'inconvénient non négligeable de cette approche est qu'elle permet de mettre en évidence une fonction qui est essentielle pour survivre en présence de la drogue, sans révéler celle affectée par la drogue directement. Sur le principe, ces fonctions sont connectées par la SL, ce qui est un point de départ pour trouver la cible directe de la drogue. Néanmoins, les indices procurés par la découverte de ces interactions SL ne sont pas toujours évidents à déchiffrer. Par exemple, dans le cas présent, c'est le mutant *bre1* qui a été obtenu. Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, les fonctions liées à Bre1 sont à la fois multiples et peu élucidées, ce qui ne facilite pas l'identification des fonctions impliquées dans la SL. Plusieurs questions restent ainsi en suspens à la fin de cet article, auxquels nous avons tenté de répondre par la suite.

## Souche *ade16 ade17 ade8 his1*



**Figure 17 : Crible pour trouver des mutants SL avec l'AICAR**

(a) Le ZMP ne peut pas directement être internalisé par la cellule, à l'inverse de sa forme riboside, l'AICAR. L'AICAR va entrer dans la cellule, puis être phosphorylé en ZMP grâce à l'adénosine kinase Ado1. Afin d'inhiber la métabolisation du ZMP, les gènes codant les enzymes Ade16 et Ade17 sont délétés. De même, nous avons choisi de déléter *HIS1* et *ADE8* afin d'inhiber la synthèse *de novo* de ZMP. Ainsi, la concentration intracellulaire de ZMP est finement régulée par l'apport d'AICAR au milieu extérieur. (b) Juste après avoir étalé les levures sur un milieu sans AICAR, elles sont irradiées aux UV sur des temps courts. Une fois les colonies formées, la boîte est répliquée sur un milieu sans AICAR et avec AICAR. Les clones capables de pousser normalement sur le milieu sans AICAR, mais ne proliférant pas sur le milieu avec AICAR (exemple clones verts) sont sélectionnés.



**Figure 18 : SL et cellules cancéreuses**

Les interactions SL permettent de protéger les cellules saines tout en tuant les cellules cancéreuses. Par exemple, lors de leur développement tumoral, les cellules cancéreuses vont perdre la fonction d'un gène X (mutations, délétions, modifications épigénétiques..), contrairement aux cellules saines. Ce gène X va avoir une interaction SL avec un gène Y. Si l'on peut inhiber l'expression du gène Y (avec un siARN par exemple) ou la fonction de la protéine codée par ce gène Y (avec une drogue), cela va induire la mort des cellules mutées pour le gène X, donc des cellules cancéreuses, sans avoir d'effet sur la survie des cellules saines. Illustration tirée de la revue de Thompson *et al.* 2015 [137].

## 2. H3K4me2/3, KAT et KDAC

Une des premières questions que l'on peut se poser est : quels sont les acteurs (*readers, writer, erasers*) qui sont impliqués dans la régulation de l'expression des cyclines 1 et 2 ? En effet, dans l'article, nous avons pu montrer que la perte d'ubiquitination d'H2B ou de méthylation de H3K4 conduisait à une forte diminution de l'expression des cyclines 1 et 2. Or, l'on sait que cette cascade ne s'arrête pas à la méthylation de H3K4, puisque cette modification va être elle-même lue par des *readers* qui sont aussi des *writers/erasers* [22]. Nous avons donc cherché à savoir si la délétion de ces acteurs avait ou non les mêmes conséquences que la délétion du mutant initial *bre1*, sur la sensibilité à l'AICAR. Le but étant de se rapprocher du mécanisme impliqué dans cette régulation épigénétique de l'expression des cyclines.

### a) Readers de la méthylation d'H3K4me3

En fonction de l'état de méthylation de H3K4, différents *readers* vont venir interagir. Lorsque H3K4 est triméthylé, quatre complexes principaux sont connus pour venir s'y fixer :

- Le complexe Nua3 est composé de cinq sous unités (Figure 19), dont Yng1 qui possède un *PHD finger* lui permettant de reconnaître et de fixer H3K4 triméthylé (H3K4me3) [138].
- Le complexe Nua4 est composé de 13 sous unités (Figure 20), dont Yng2 qui possède un *PHD finger* lui permettant de reconnaître et fixer H3K4me3 [139].
- Le complexe Rpd3(L) est composé de 12 sous unités (Figure 21), dont Pho23 qui possède un *PHD finger* lui permettant de reconnaître et de fixer H3K4me3 [139].
- Le complexe SAGA est composé de 19 sous unités (Figure 22), dont Sgf29 qui possède un domaine *tandem Tudor* lui permettant de reconnaître et fixer H3K4me2/3 [140].

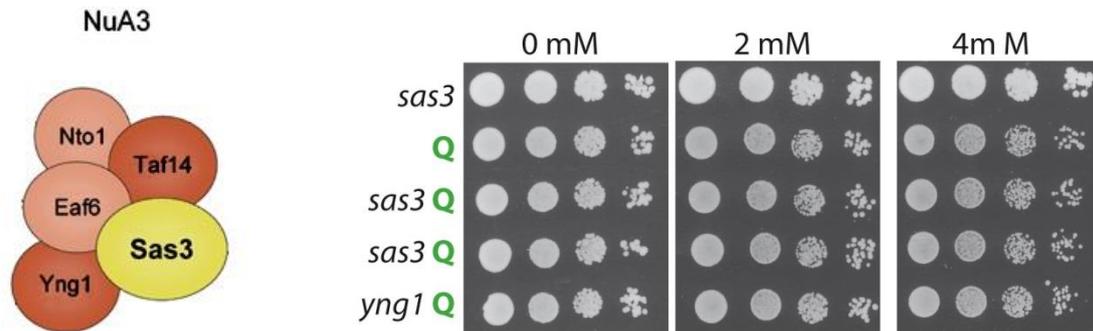
Nua3, Nua4 et SAGA sont des lysine acétyltransferases (KAT), aux multiples cibles, alors que Rpd3(L) est une lysine deacétylase (KDAC). Nous avons donc évalué l'effet de la délétion de certaines sous unités de ces complexes (en essayant de déléter de préférence le gène codant la protéine fixant H3K4me3 et/ou la sous unité catalytique) sur la sensibilité à l'AICAR.

#### 1) Nua3

Sans entrer dans les détails, Nua3 est une KAT qui va venir fixer H3K4me3, puis acétyler localement H3K14 [138]. Cette acétylation est associée à la transcription active. Comme on peut le voir sur la figure 19, ni la délétion d'*yng1* qui fixe H3K4me3, ni la délétion de *sas3*, la sous unité catalytique, n'ont d'effet sur la sensibilité à l'AICAR. On en conclut que ce n'est pas la perte de la liaison de Nua3 qui est responsable de l'interaction SL entre l'AICAR et la perte de méthylation d'H3K4.

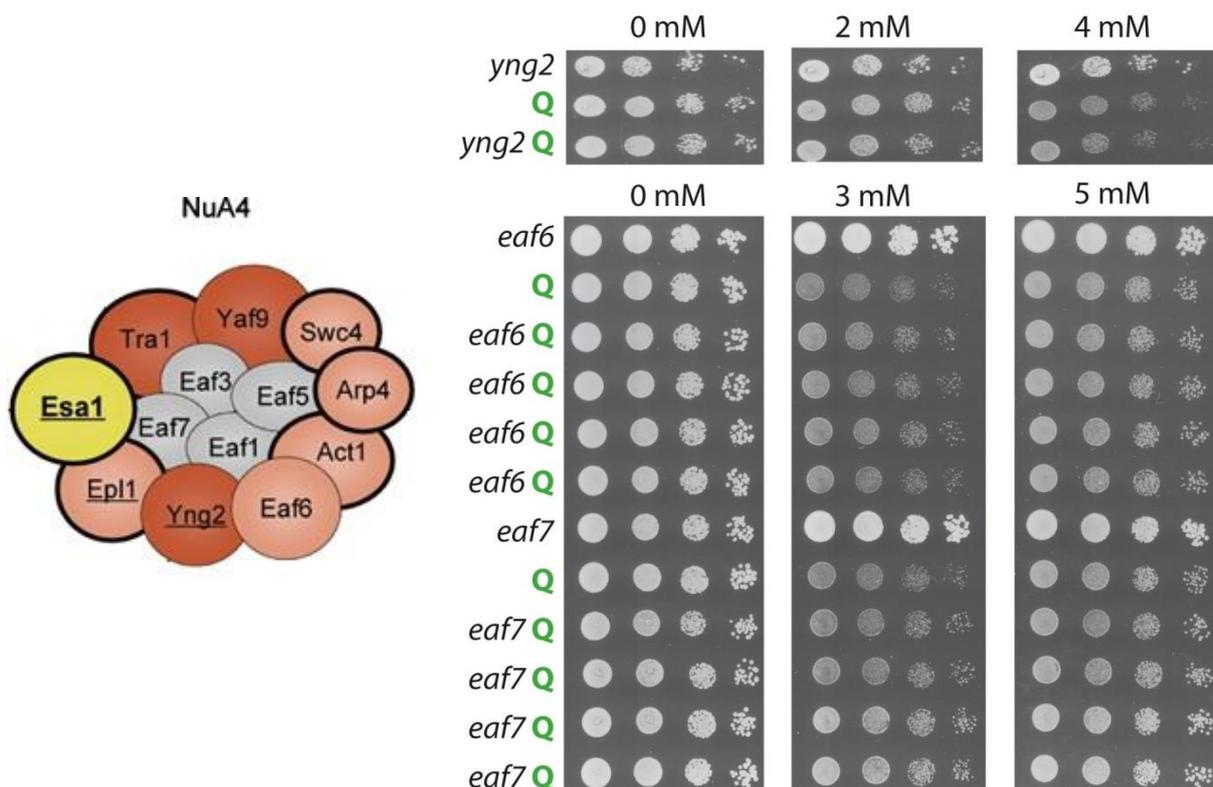
#### 2) Nua4

Contrairement à Nua3, le gène codant la sous unité catalytique de Nua4 est essentiel. Nous avons donc choisi de déléter le *reader, yng2*, et deux autres sous unités du complexe, *eaf6* et *eaf7*. On constate que leurs délétions n'ont aucun impact sur la sensibilité à l'AICAR (Figure 20). Ce n'est donc, à nouveau, pas la perte de liaison du complexe Nua4 à H3K4 qui est à la base de la SL entre l'AICAR et le mutant H3K4Q.



**Figure 19 : Le complexe Nua3**

Le complexe Nua3 est composé de Nto1, Taf14, Eaf6, Sas3 et Yng1. Le test en goutte est réalisé avec 0, 2 ou 4 mM d'AICAR. La première ligne est une délétion de *sas3* uniquement, dans ce mutant, le ZMP ne va pas d'accumuler car il sera directement métabolisé. A l'inverse dans la souche indiquée **Q** pour « quadruple *ade16 ade17 ade8 his1* », le ZMP va s'accumuler si de l'AICAR est ajouté au milieu extérieur. Ainsi pour tester la sensibilité à l'AICAR de chaque mutant, il faut construire des quintuples mutants, tels que *sas3* **Q** ou *yng1* **Q**.



**Figure 20 : Le complexe Nua4**

Le complexe Nua4 est composé de Tra1, Yaf9, Swc4, Arp4, Act1, Eaf6, Esa1, Epl1, Eaf1, Eaf3, Eaf5, Eaf7 et Yng2. Le test en goutte a été réalisé avec 0, 2 ou 4 mM d'AICAR pour *yng2* et 0, 3 ou 5 mM d'AICAR pour *eaf6/7*. Plusieurs quintuple mutants *eaf6* **Q** et *eaf7* **Q** ayant été obtenus, ils ont tous été testés.

### 3) Rpd3

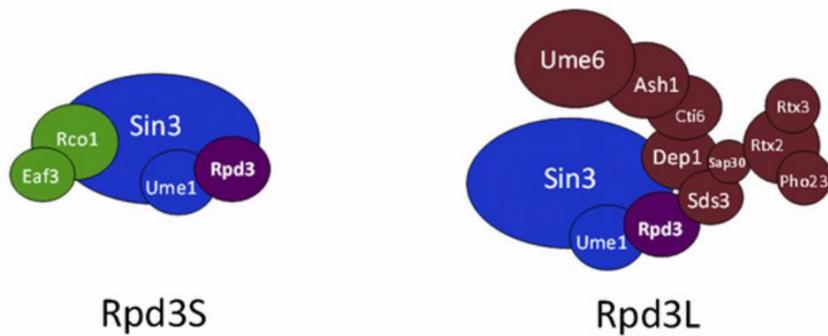
Contrairement aux autres complexes, Rpd3 n'est pas un *writer*, mais un *eraser* puisqu'il s'agit d'une KDAC [141]. Rpd3 est retrouvée dans principalement deux complexes, Rpd3(L) et Rpd3(S) (Figure 21). Seul Rpd3(L) possède la sous unité Pho23 qui est capable de reconnaître H3K4me3 [139]. Pour cette raison, nous avons choisi de déléter la sous unité catalytique *RPD3* elle-même, le *reader PHO23*, mais aussi des sous unités spécifiques à chaque complexe (*SDS3*, *RCO1*) ou communes (*UME1*, *SIN3*) (Figure 22). On observe que la perte de la sous unité catalytique *RPD3* rend hypersensible à l'AICAR. A l'inverse, la perte de *PHO23* rend au contraire plutôt résistant. Cette hétérogénéité est retrouvée sur l'ensemble du complexe :

- Délétion des sous unités communes : la délétion de *SIN3* rend hypersensible à l'AICAR contrairement à celle de *UME1* qui rend résistant.
- Délétion des sous unités spécifiques à un complexe : qu'elles soient spécifiques à Rpd3(L) ou Rpd3(S) toutes les délétions testées rendent plutôt résistant à l'AICAR.

Il ne ressort donc pas d'image claire. Néanmoins, la perte de la sous unité catalytique *RPD3* est SL avec l'accumulation d'AICAR, ce qui pourrait correspondre à l'effet attendu si ce phénomène est lié à la perte de H3K4me3. Nous avons donc ensuite souhaité savoir si ces effets étaient bien indépendants du transport d'AICAR comme c'est le cas pour *bre1*. On constate que mis à part *SIN3*, toutes les délétions induisant une résistance ont moins de ZMP et à l'inverse celle induisant une sensibilité en ont plus (Figure 23). Globalement, les délétions de ce complexe ne semblent pas avoir les mêmes effets que celles de *bre1*, *set1* ou H3K4Q, mais semblent affecter le métabolisme de la drogue.

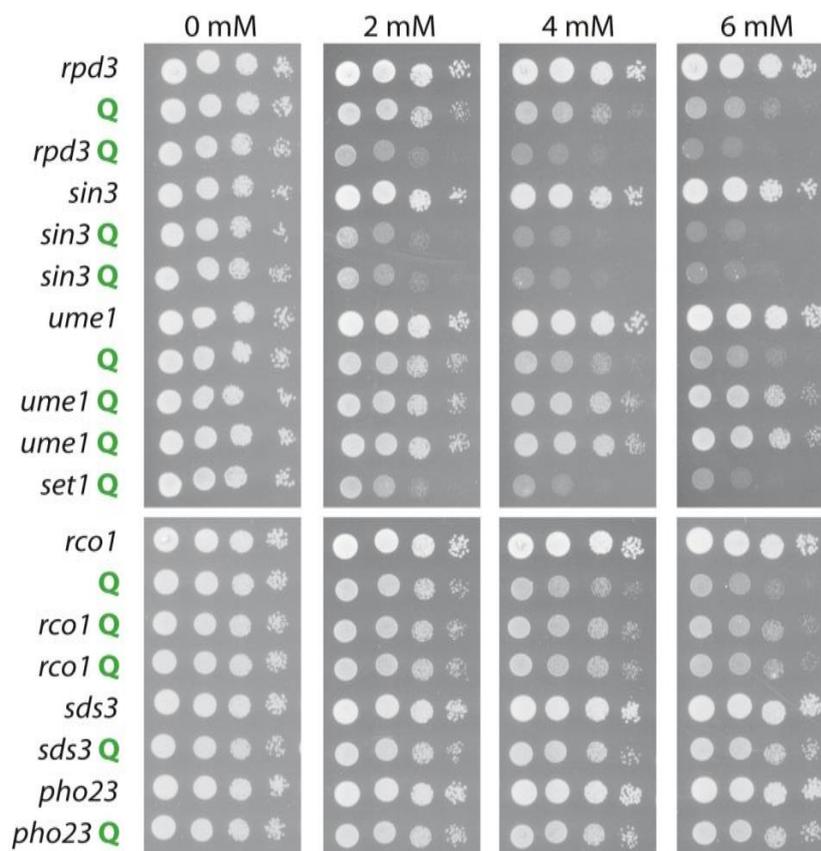
### 4) SAGA

SAGA est une des KAT les plus étudiée chez la levure. En plus de son activité de KAT, procurée par Gcn5, elle possède aussi une activité de déubiquitineuse, puisqu'elle contient Ubp8 [142]. SAGA forme un complexe composé de plusieurs modules : acétylation (Gcn5, Ada2, Ada3, Sgf29), transcription (Spt3, Spt8), déubiquitination (Ubp8, sus1, Sgf11, Sgf73), recrutement (Tra1) et architectural (Spt7, Spt20, Ada1, TAF5, TAF6, TAF9, TAF12) ([143] Figure 24). C'est Sgf29 qui permet de reconnaître H3K4me2 et H3K4me3 avec une préférence pour H3K4me3 [144]. Comme on peut le voir sur la figure 25, la délétion de *sgf29*, *ada3* ou *ubp8* conduit à une légère augmentation de la sensibilité à l'AICAR, celle de *spt8* n'a pas d'effet, celle de *sgf11* est moins claire et enfin la délétion de *gcn5* augmente fortement la sensibilité à l'AICAR. Contrairement au cas précédent, ici on a une cohérence entre les délétions des sous unités, puisque parmi les différents modules, ce sont les délétions du module impliqué dans l'acétylation (Gcn5, Ada3, Sgf29) qui rendent toutes plus sensibles à l'AICAR. A nouveau, nous avons dans un premier temps réalisé des analyses des profils métaboliques de ces souches (Figure 23). On constate que les souches délétées pour *gcn5* et *sgf29* ont tendance à accumuler plus de ZMP, alors que *ada3* en accumule à la même concentration que le sauvage. Les trois souches étant plus sensibles à l'AICAR, mais n'ayant pas le même profil métabolomique, nous nous sommes dit que ces différences d'accumulation d'AICAR n'étaient peut-être pas seules responsables des phénotypes observés. Pour tester cette hypothèse, nous avons construits des souches accumulant du ZMP de façon constitutive, pour ne plus avoir de problème de transport d'AICAR, en mutant les gènes *ade16* *ade17* (voie page 18). On observe sur la figure 26 que la délétion de *sgf29* n'a aucun effet sur la croissance dans une souche accumulant du ZMP, ce qui suggère que sa sensibilité était effectivement uniquement due à des effets sur le transport d'AICAR. Par contre,



**Figure 21 : Les complexes Rpd3(S) et Rpd3(L)**

Rpd3(S) pour « small Rpd3 complex » n'est composé que de 5 sous unités. Ce complexe ne peut pas se fixer à H3K4me3, contrairement à Rpd3(L) pour « large Rpd3 complex », qui possède Pho23. Ces deux complexes sont des KDAC et sont impliqués dans le contrôle de la régulation de la transcription.



**Figure 22 : Délétions des membres du complexe Rpd3(L) et (S)**

Pour ce test en goutte, 0, 2, 4 ou 6 mM d'AICAR ont été ajoutés au milieu. A nouveau les simples mutants ne sont pas capables d'accumuler du ZMP contrairement aux mutants Q en présence d'AICAR.

		ZMP	ATP	
	Délétion	Ratio mutant/WT	Ratio mutant/WT	Sensibilité à l'AICAR
WT		1	1	WT
Nua3	<i>yng1</i>			WT
	<i>sas3</i>			WT
Nua4	<i>yng2</i>			WT
	<i>eaf7</i>			WT
	<i>eaf6</i>			WT
RPD3	<i>pho23</i>	0,28	1,26	résistant +++
	<i>sds3</i>	0,32	1,22	résistant +++
	<i>rpd3</i>	1,30	0,80	sensibilité +++
	<i>ume1</i>	0,55	1,04	résistant +++
	<i>rco1</i>			WT
	<i>sin3</i>	0,6	0,8	sensibilité +++
SAGA	<i>gcn5</i>	1,82	0,94	sensibilité +++
	<i>sgf29</i>	1,93	0,80	sensibilité +
	<i>ada3</i>	1,19	1,08	sensibilité +
	<i>spt8</i>			WT
	<i>sgf11</i>			WT
	<i>ubp8</i>			WT
Set3C	<i>set3</i>	1,35	0,73	résistant +
	<i>hst1</i>	1,54	1,27	sensibilité ++
	<i>hos2</i>	0,50	0,93	résistant +
	<i>hos1</i>			WT
	<i>hos3</i>			WT
	<i>hst2</i>			WT
	<i>hst3</i>			WT
	<i>sas2</i>			WT
	<i>sas4</i>			WT
	<i>sas5</i>			WT
	<i>hat1</i>			WT
	<i>hat2</i>			WT
	<i>hda1</i>	2,38	0,61	sensibilité ++

Figure 23 : Profils métaboliques et délétions de KAT/KDAC

Des analyses métabolomiques des souches ont été réalisées après les avoir traitées pendant 1h avec 1 mM d'AICAR. La deuxième colonne indique le ratio de l'air de pic de ZMP du mutant/ l'air de pic de ZMP de la souche sauvage de référence (Q). De même, la troisième colonne indique le ratio de l'air de pic d'ATP du mutant sur celui du sauvage. Leur niveau de sensibilité à l'AICAR est indiqué dans la dernière colonne.

les délétions de *gcn5* ou *ada3* sont SL avec le ZMP à des niveaux similaires à ceux des délétions de *bre1*, *rad6* ou *htbK123R*. Pour conclure sur SAGA, la délétion de *gcn5* ou *ada3* est SL avec l'accumulation de ZMP, que son apport soit endogène ou exogène. Par contre, la délétion de *sgf29*, le *reader* d'H3K4me3, n'a pas d'effet sur la croissance lorsque le ZMP s'accumule de façon endogène. Ici, nous cherchions à trouver si c'est la perte de lecture d'H3K4me3 et ainsi la perte de ses effets subséquents (acétylation) qui est impliquée dans la SL du mutant non méthylable H3K4Q avec l'AICAR. Puisque la perte du *reader* lui-même n'a pas d'effet sur la sensibilité au ZMP, il est difficile de conclure si oui ou non la SL du mutant *gcn5* avec l'AICAR est due à la même raison que celle du mutant H3K4Q.

### b) *Reader* d'H3K4me2 et KAT/KDAC

On ne connaît pour l'instant aucun *reader* de H3K4 monométhylé (H3K4me1) et un seul *reader* de H3K4 diméthylé (H3K4me2), Set3 [145]. Set3 fait partie du complexe Set3C qui contient deux KDAC, Hos2 et Hst1 [146]. Comme résumé sur la figure 23, à nouveau on ne peut pas tirer de conclusions claires sur les résultats obtenus, ni sur leur lien avec la voie *bre1/htbK123/set1/H3K4Q*.

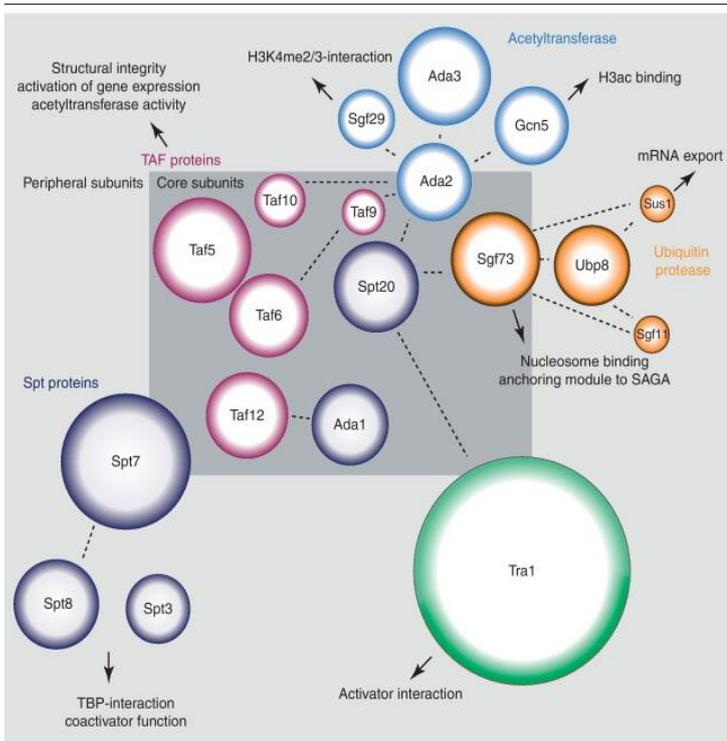
Enfin, nous avons délété un ensemble de KAT et KDAC diverses, qui se sont toutes révélées avoir une sensibilité à l'AICAR similaire à la souche sauvage, mis à part pour le mutant *hda1* (Figure 23). L'effet de *hda1* sur la sensibilité à l'AICAR peut très probablement être attribué à son impact sur le transport d'AICAR.

### c) Conclusion

La perte de méthylation de H3K4 est SL avec l'AICAR. Or, le niveau de méthylation de H3K4 va être lu par des *readers*. On peut donc envisager que ce n'est pas la perte de méthylation de H3K4 en elle-même qui est SL avec l'AICAR, mais la perte subséquente de la lecture de cette marque par son *reader*. L'ensemble des *readers* testés ici n'a pas permis de pointer sur l'un d'entre eux en particulier.

Plusieurs éléments pourraient permettre d'expliquer ce résultat. Premièrement, nous n'avons testé que les *readers* connus de H3K4me2/3, mais rien n'indique que cette liste soit exhaustive. Deuxièmement, l'hypothèse de départ était peut-être trop simpliste. En effet, certes la perte de H3K4me2/3 va engendrer la perte de sa lecture, mais ce n'est peut-être pas cet événement-là qui est à la base de la SL avec l'AICAR. En effet, les différentes PTMs sont en compétition au sein de la chromatine pour l'accessibilité à leur substrat. On peut ainsi envisager que ce n'est pas la perte de méthylation de H3K4 en elle-même qui est responsable de la SL avec l'AICAR, mais l'augmentation subséquente d'une autre PTM permise grâce à l'absence de H3K4me. Troisièmement, on pourrait envisager que le *reader* ne soit pas une enzyme de modification d'histones, mais soit directement l'effecteur (polymérase, facteur de transcription ...).

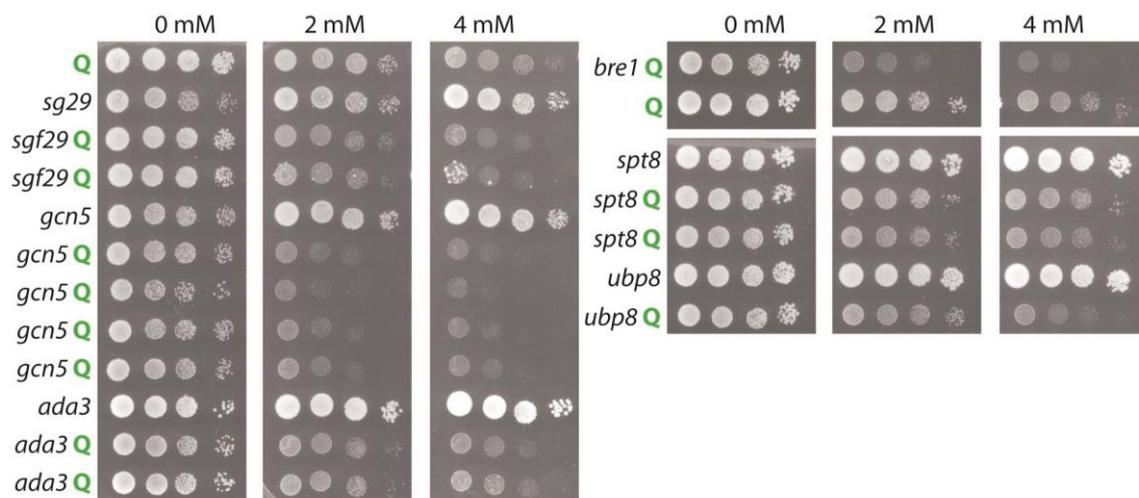
La démarche proposée ici n'a donc pas permis d'élucider le mécanisme exact impliqué dans la sensibilité à l'AICAR des mutants *bre1/htbK123R/set1/H3K4Q*. Cela peut s'expliquer en partie par l'augmentation croissante du nombre d'acteurs mis en jeu à mesure que l'on descend la voie. De plus, les effets dus au transport et à la métabolisation de la drogue en eux-mêmes, ne permettent pas de tirer des conclusions réellement solides. Pour cette raison, nous avons choisi de ne pas continuer à creuser cet aspect du projet. Des suggestions d'expériences complémentaires qui pourraient être menées sont apportées dans la discussion.



**Figure 24 : Le complexe SAGA**

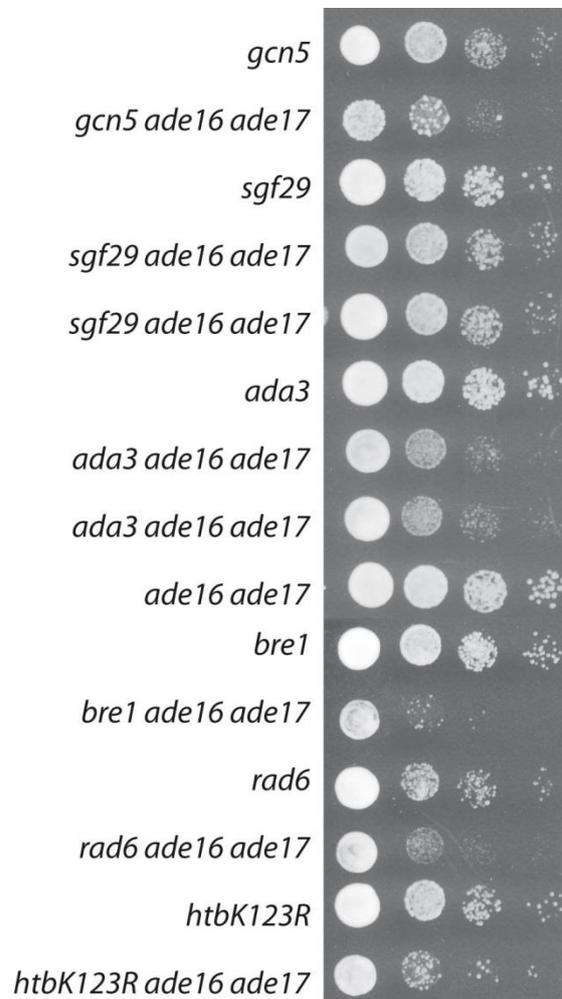
Le complexe SAGA est composé de différents modules :

- Spt7, Spt8, Spt3 qui vont interagir avec des acteurs majeurs de la transcription (TBP)
- Tra1 qui est un activateur de transcription
- Les protéines Taf12, Taf6, Taf5, Taf10, Taf9, Ada1, Spt20, Sgf73 et Ada2 impliquées dans le maintien de l'intégrité du complexe pour permettre les activités KAT et le contrôle de la transcription
- Ubp8, Sgf11 et Sus1 sont liés à l'activité DUB du complexe
- Ada3 et Gcn5 permettent de réaliser l'acétylation
- Enfin, Sgf29 permet de reconnaître H3K4me2/3



**Figure 25 : Délétions des membres du complexe SAGA**

Sur ce test en goutte, 0, 2 ou 4 mM d'AICAR ont été ajoutés au milieu. Des quintuples mutants *sgf29* **Q**, *gcn5* **Q**, *ada3* **Q**, *bre1* **Q**, *spt8* **Q** ou *ubp8* **Q** ont été construits. Leur croissance est à comparer à celle du **Q**.



**Figure 26 : Effet de l'accumulation endogène de ZMP**

Cette fois, l'accumulation de ZMP n'est pas due à l'ajout d'AICAR au milieu extérieur, mais aux délétions d'ADE16 et ADE17 qui inhibent sa métabolisation. Ainsi le ZMP va s'accumuler, mais à des concentrations plus modérées que lorsque l'AICAR est ajouté au milieu extérieur. Ainsi, la souche *gcn5*, par exemple, n'accumule pas de ZMP contrairement à la souche *gcn5 ade16 ade17*. Leur croissance est à comparer à la souche *ade16 ade17*.

### 3. Crible de supresseurs par surexpression

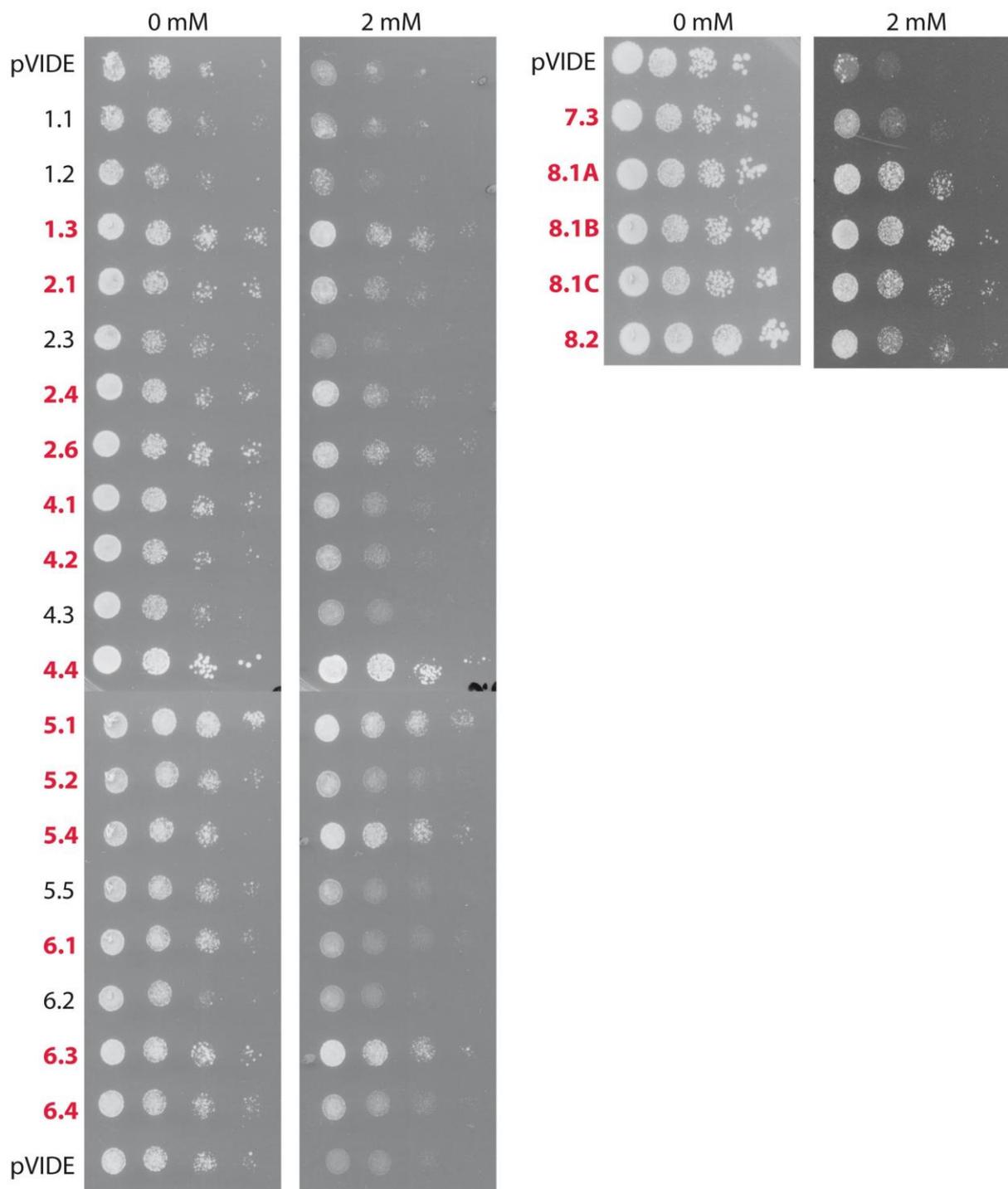
Dans l'article, nous avons donc pu mettre en évidence la SL entre la délétion de *bre1* et l'AICAR. Celle-ci est vraisemblablement due à un effet additif de la délétion et de l'AICAR sur les cyclines de G1. Par contre, le mécanisme exact par lequel *bre1* ou l'AICAR agissent sur ces cyclines reste à élucider. Pour cette raison, nous avons réalisé un crible pour trouver des gènes dont la surexpression permette de supprimer les effets combinés de l'AICAR et de la délétion.

#### a) Démarche du crible avec *set1 ade3 ade16 ade17 ade8 his1*

Le crible de surexpression consiste à transformer une souche avec une banque de plasmides de surexpression contenant des fragments variés du génome de levure. Il s'en suit une sélection positive, puisque l'on va rechercher des clones contenant un plasmide leur permettant de proliférer dans des conditions où ce n'est pas le cas de la souche contenant un plasmide vide. Dans notre situation, il s'agit donc de transformer un mutant de la voie *bre1/rad6/htbK123R/set1/H3K4Q* avec cette banque, puis de réaliser des répliques sur un milieu avec AICAR.

Nous avons choisi de réaliser le crible sur le mutant *set1*. En effet, c'est lui qui se situe le plus en aval dans la voie de modification des histones. Nous aurions aussi pu choisir le mutant H3K4Q, mais il présente des défauts de croissance même en absence d'AICAR sûrement dû au fait qu'il ne possède qu'une copie des gènes d'histone H3 et H4. Nous avons ajouté une sixième délétion, *ade3*, au mutant *set1 ade16 ade17 ade8 his1*, afin de bloquer la réaction de dégradation de ZMP via deux mécanismes. Ainsi, même si la souche est transformée avec un plasmide permettant la surexpression d'*ADE16* ou *ADE17*, elle accumulera toujours du ZMP car ces deux enzymes ne pourront dégrader leur substrat à cause de l'absence du cofacteur nécessaire à la réaction, le 10 formyl-THF dont la synthèse dépend de Ade3 (voie page 18). Cela permet ainsi de ne pas sélectionner de clones dont la croissance sur AICAR n'est permise que par l'absence de ZMP via sa métabolisation en IMP.

Un certain nombre de transformants ont été choisis après croissance en présence d'AICAR, leur(s) plasmide(s) a été extrait, puis ils ont été retransformés et re-testés (Figure 27). Cela permet de s'assurer que l'effet sur la croissance est bien dû au plasmide et non à une mutation qui serait apparue durant la croissance de la colonie. Les plasmides conférant effectivement des effets supresseurs ont ensuite été séquencés : ce sont les bornes de l'insert qui sont séquencées et qui permettent à elles seules d'identifier tous les gènes compris sur le fragment inséré (Figure 28). On constate que les suppressions les plus convaincantes sont causées par la surexpression de *SET1* lui-même. Cela confirme que c'est bien cette délétion qui est à la base du phénotype. Mis à part cela, beaucoup des supresseurs n'ont des effets que très modérés. De plus, l'interprétation des résultats est délicate du fait de la présence de plusieurs gènes sur chaque plasmide de surexpression. Nous avons choisi de tester l'effet de la surexpression individuelle d'un certain nombre d'entre eux, en les choisissant sur la base du niveau de suppression du plasmide et de leur lien plus ou moins probable avec notre phénotype. Nous avons choisi *PCL5* et *PCL9* car il s'agit de cyclines et *LPP1* pour son lien avec *DPP1* (c.f prochain paragraphe). Aucun d'entre eux ne s'est révélé avoir un effet supresseur robuste.



**Figure 27 : Crible pour trouver des supresseurs permettant de supprimer la SL entre AICAR et *set1***

Sur ce test en goutte 0 ou 2 mM d'AICAR ont été ajoutés. Sur la première ligne, on retrouve le contrôle avec la souche *set1 ade3* Q transformée par le plasmide VIDE. Sur les lignes suivantes, les plasmides ré-extraits après le crible ont été retransformés dans la souche et sont donc numérotés car ils ne sont pas encore identifiés. Ceux soulignés en rouge ont été séquencés car ils présentaient des niveaux, même faible, de suppression.

Plasmide	Gènes situés sur le fragment
1.3	[RRP3]*-SSF1 -HTD2-DYS1-RRP4-YHR069C-A-TRM5-YHR070C-A- <b>PCL5</b> -tF(GAA)H1-[YHR071C-A]&[ERG7]*
2.1, 5.2	[tY(GUA)M1]-YML053C SUR7-GAL80-YML050W-RSE1-GSF2-YML047W-A-[PRM6]
2.4, 8.1A, 8.1C	<b>LPP1</b> -SPG3-PSP1-YDR506C-tL(CAA)D-[GIN4]&
2.6	[PBP4]*-SLC1-LHP1-YDL050C-KNH1-STP4-SIT4-NPC2-MRP10-FAD1-[MTF2]&
4.1	[LYS20]&-INH1-YDL180W- <b>PCL9</b> -DLD2-YDL177C-YDL176W-[AIR2]&
4.2	[SLK19]&-LIP5-[MCA1]*
5.2	[MOT1]*-RPS9A-YPL080C-RPL21B-ATP4-YPL077C-GPI2--[GCR1]*
6.1	[THI11]*-YJR157W-[HXT16]*-ARS1023
6.4, 8.2	[YKL027W]&-GPX1-PAN3-URA6-YKL023W-CDC16-[MAK11]&
7.3	[SEN1]&-ATG23-IMD3-CNA1-YLR434C-TSR2-[ECM30]&
8.1B	[REB1]*-REG2-YBR051W-YBR052C-YBR053C-YRO2-[PRP6]&
4.4, 5.1, 5.4, 6.3	SET1

### Figure 28 : Plasmides obtenus dans le crible de surexpression

Le résultat du séquençage des plasmides obtenus après le crible sont présentés dans le tableau ci-dessus. Ici, nous avons utilisé une banque contenant des fragments longs de génome, car nous souhaitons ne pas biaiser le résultat en contre sélectionnant les gènes de grande taille. Les gènes surlignés en gras ont été re-testés et n'ont pas présenté de suppression particulière du phénotype.

## b) Conclusion

Les résultats de ce crible sont plutôt décevants, du fait de l'absence de supresseurs robustes. De plus, certains supresseurs forts que nous avons mis en évidence dans l'article (*CLN1*, *CLN2* et *CLN3*) n'ont pas été obtenus. Cela laisse penser qu'il doit y avoir un biais dans cette approche probablement dû à la façon dont le crible est réalisé (réplique ? concentration d'AICAR ? transformation ? banque ?). Nous avons donc décidé de réaliser un deuxième crible avec une approche différente.

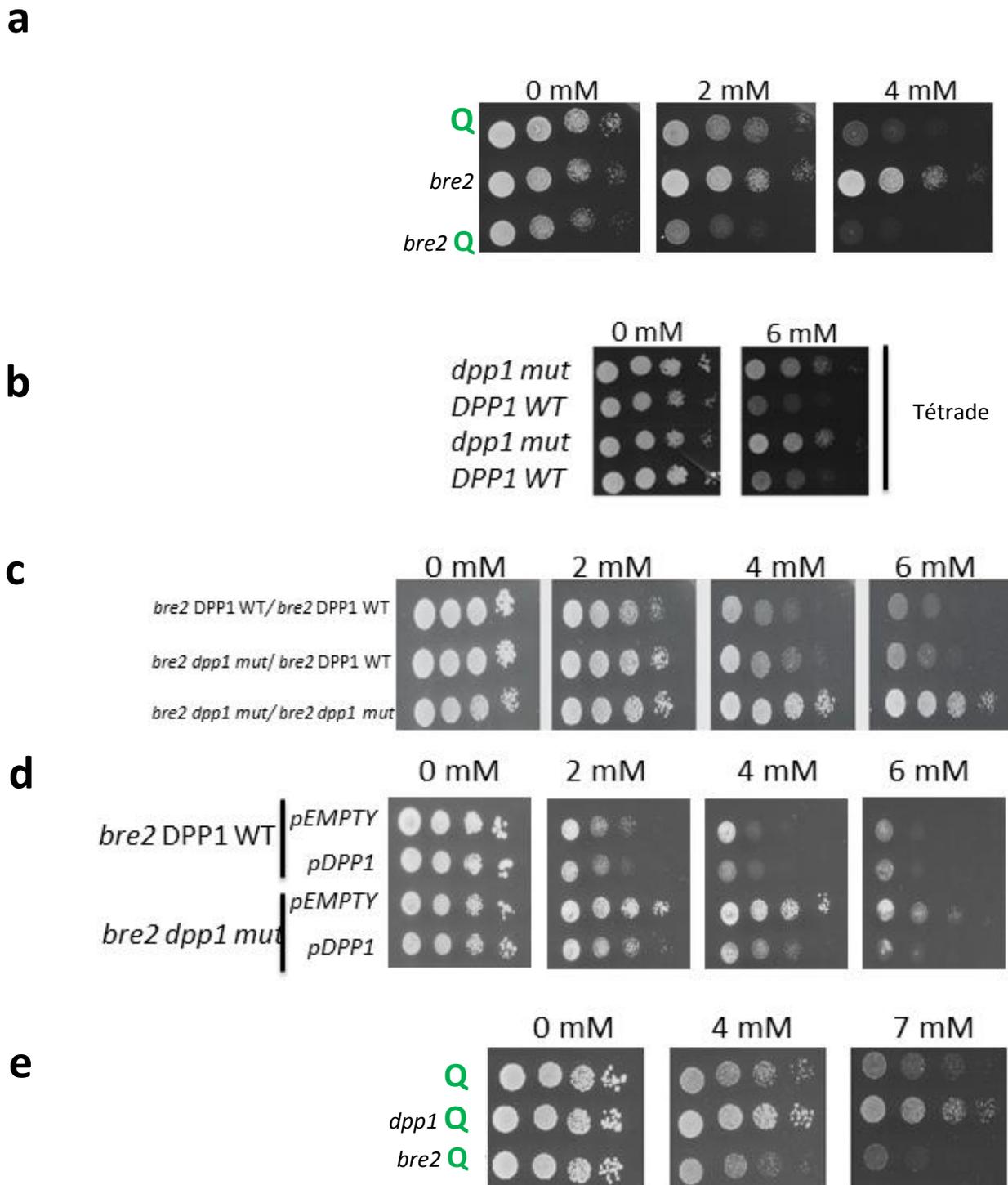
## 4. Crible de mutants supresseurs

### a) Démarche du crible avec *bre2 ade16 ade17 ade8 his1*

Pour cette deuxième approche, nous avons réalisé un crible par mutagenèse UV. Cette approche consiste à étaler une souche délétée pour un gène de la voie *bre1/rad6/htbK123R/set1/H3K4Q* sur un milieu avec AICAR et à la mutagéniser aux UV juste après. Seules les souches contenant une mutation leur permettant de *bypasser* ou supprimer les effets de l'AICAR, de la délétion ou des deux effets combinés, pourront proliférer et former des colonies. La contrainte dans ce genre d'approche est qu'il faut *backcrosser* les mutants obtenus, afin de sélectionner ceux dont la résistance ségrège de façon monogénique. Or les souches diploïdes homozygotes *bre1/bre1* ou *set1/set1* ne sporulent pas et ne peuvent donc pas être utilisées dans ce type de crible. Il faut donc utiliser une souche de départ capable de sporuler même à l'état homozygote. Pour cette raison, nous avons choisi de réaliser le crible sur un mutant en particulier au sein du complexe COMPASS, *bre2*. En effet, nous avons constaté que ce mutant était capable de sporuler même à l'état homozygote et qu'il avait une sensibilité robuste, bien que modeste, à l'AICAR (Figure 29 a).

L'inconvénient de ce crible est que des mutants liés au transport ou à la métabolisation de l'AICAR peuvent être obtenus. Pour cette raison, le profil métabolique de chaque mutant résistant a été étudié en HPLC. Sur les 117 mutants testés, un seul s'est avéré avoir une accumulation de ZMP similaire au sauvage. Cela suggère que la plus forte pression de sélection a lieu au niveau de la métabolisation du ZMP et/ou qu'il s'agit de la façon la plus efficace/simple d'aboutir à une résistance. Le mutant obtenu a été *backcrossé* avec la souche *bre2* non mutagénisée de départ et après sa sporulation, la résistance à l'AICAR s'est avérée ségréger 2:2, donc *a priori* être due à la mutation d'un seul gène (Figure 29 b). Cette mutation s'est révélée être récessive (Figure 29 c).

Afin d'identifier la mutation impliquée, l'ADN génomique d'un mélange de huit spores résistantes a été séquencé et comparé à la séquence de l'ADN génomique d'un mélange de huit spores sensibles. Il s'est avéré que la mutation était une substitution d'un T en C au niveau du nucléotide 308 du gène *DPP1*, résultant en la substitution d'une leucine en sérine en position 103. C'est bien cette mutation qui est à la base du phénotype puisque sa complémentation permet de restaurer la sensibilité à l'AICAR (Figure 29 d). Enfin, afin de déterminer si cette mutation engendrait une perte de fonction de Dpp1 ou un effet plus spécifique, nous avons testé l'effet de la délétion de *dpp1* sur la sensibilité à l'AICAR. Il s'avère que sa délétion rend résistant à l'AICAR même en présence de *BRE2* (Figure 29 e).



**Figure 29 : La délétion de *dpp1* rend résistant à l'AICAR**

(a) La délétion de *bre2* **Q** rend plus sensible à l'AICAR comparé au **Q**. (b) La mutation ségrège 2 :2, deux spores résistantes et deux spores sensibles. (c) Les souches diploïdes, toutes *bre2 ade16 ade17 ade8 his1*, ont été testées. La première est la souche de départ croisée avec elle-même. La seconde est la souche mutante obtenue croisée avec la souche de départ. La troisième est la souche mutante obtenue croisée avec elle-même. On constate que la mutation est récessive. (d) L'expression d'une copie sauvage du gène DPP1 permet de rétablir un niveau de sensibilité à l'AICAR proche de la souche *bre2* **Q** de départ, dans le mutant résistant. (e) La délétion complète du gène *dpp1* rend résistante à l'AICAR.

## b) DPP1

DPP1 est une diacylglycerol pyrophosphate (DGPP) phosphatase. Elle permet de déphosphoryler le DGPP en phosphatidate (PA) ([147] Figure 30 a). Le PA peut être à son tour déphosphorylé pour former du diacylglycérol (DAG) qui pourra lui-même servir dans la biosynthèse de multiples lipides, tels que la phosphatidylcholine (PC) ou la phosphatidyléthanolamine (PE). Ces lipides composent de nombreuses membranes au sein de la cellule, telles que celle du noyau, du RE, des mitochondries ou encore du golgi [148]. En plus de leur rôle au niveau structural, certains de ces intermédiaires sont connus en tant que molécule signal.

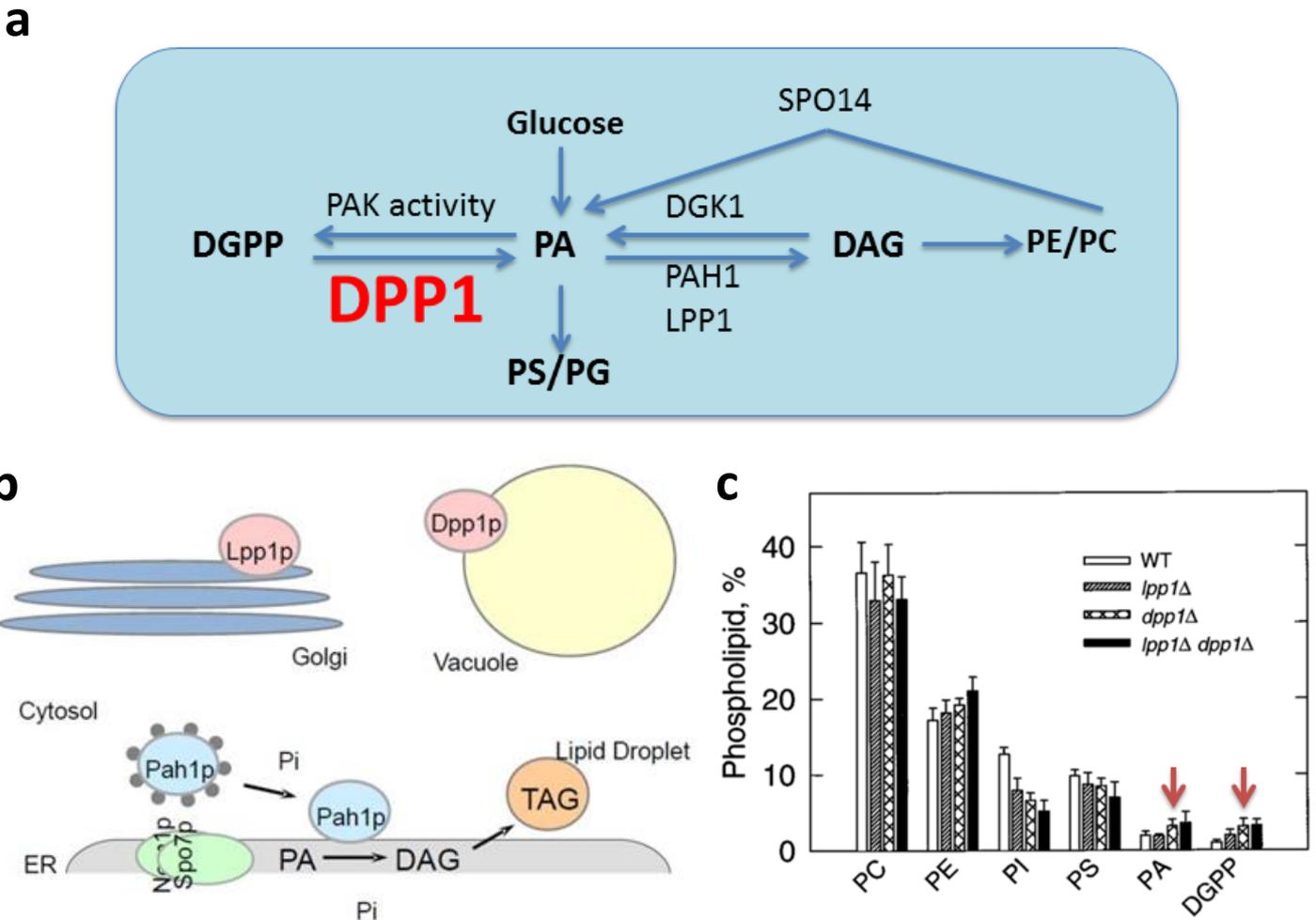
Par exemple, le PA situé au niveau du RE se lie directement au facteur de répression de la transcription, Opi1, pour le garder inactif en le maintenant à l'extérieur du noyau ([149] Figure 31). Lors de l'ajout d'inositol, le précurseur nécessaire à la synthèse des lipides, le PA est consommé, permettant le relargage d'Opi1 du RE vers le noyau. Ainsi, Opi1 va venir se fixer sur ses gènes cibles pour inhiber leur transcription. Parmi eux, on trouve par exemple *INO1*, le gène codant l'enzyme permettant d'obtenir de l'inositol à partir de glucose. Il s'agit d'un autre exemple qui montre à nouveau que les métabolites sont bien souvent plus que de simples intermédiaires.

Il a été suggéré que la conversion du PA en DGPP pourrait permettre de pouvoir faire varier la concentration de PA rapidement pour répondre aux besoins de la cellule [150]. Mais, le DGPP pourrait aussi être la molécule signal en elle-même. En effet, chez les plantes, le niveau de DGPP augmente rapidement en réponse à des stress variés [151–153]. Le gène codant pour l'enzyme permettant la conversion du PA en DGPP n'a pas encore été identifié chez la levure.

Une des particularités de Dpp1 est que cette enzyme est membranaire au niveau de la vacuole ([154] Figure 30b). Sa délétion n'a pas d'effet globalement sur la synthèse des lipides. Par contre, elle engendre une augmentation du DGPP, puisqu'il s'agit de son substrat, mais aussi du PA ([155] Figure 30c). Ce qui suggère que ces métabolites seraient impliqués dans la signalisation plutôt que la synthèse *de novo* des lipides.

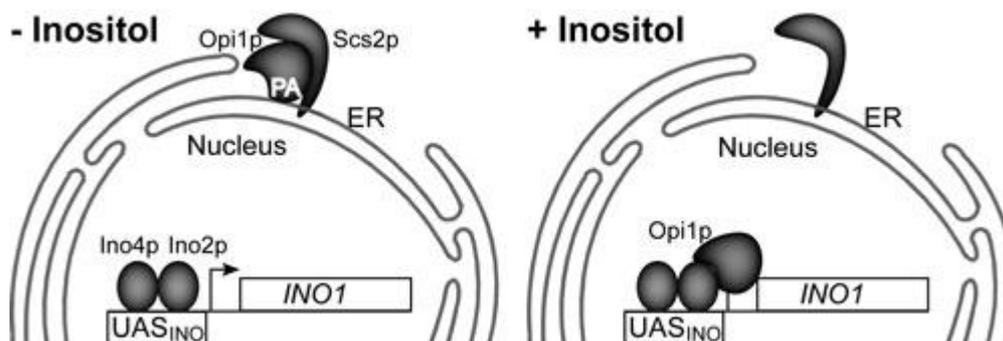
Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier l'effet de la délétion ou de la surexpression des gènes majeurs de cette voie, *DPP1*, *LPP1*, *PAH1* et *DGK1* sur la sensibilité à l'AICAR. Aucune des surexpressions n'a d'effet sur la croissance en présence d'AICAR (Figure 32) et seule la délétion de *dpp1* rend résistant à l'AICAR (Figure 33). On en conclut qu'il y a une forte spécificité.

Nous avons ensuite fait appel à la plateforme de lipidomique de l'INRA afin d'analyser l'effet de l'AICAR sur la composition globale en lipides et dérivés. Nous avons choisi de réaliser l'expérience avec des temps de traitement à l'AICAR variés, 24h ou 1h, à 30°C et 37°C. Après extraction, les lipides ont été séparés par deux chromatographies sur couche mince (CCM), l'une permettant de séparer les lipides neutres et l'autre les lipides polaires. Des standards ont été co-migrés afin d'établir la position de chacun des composés étudiés (Figure 34). Malheureusement, cette approche ne permet pas de détecter le DGPP, mais uniquement le PA.



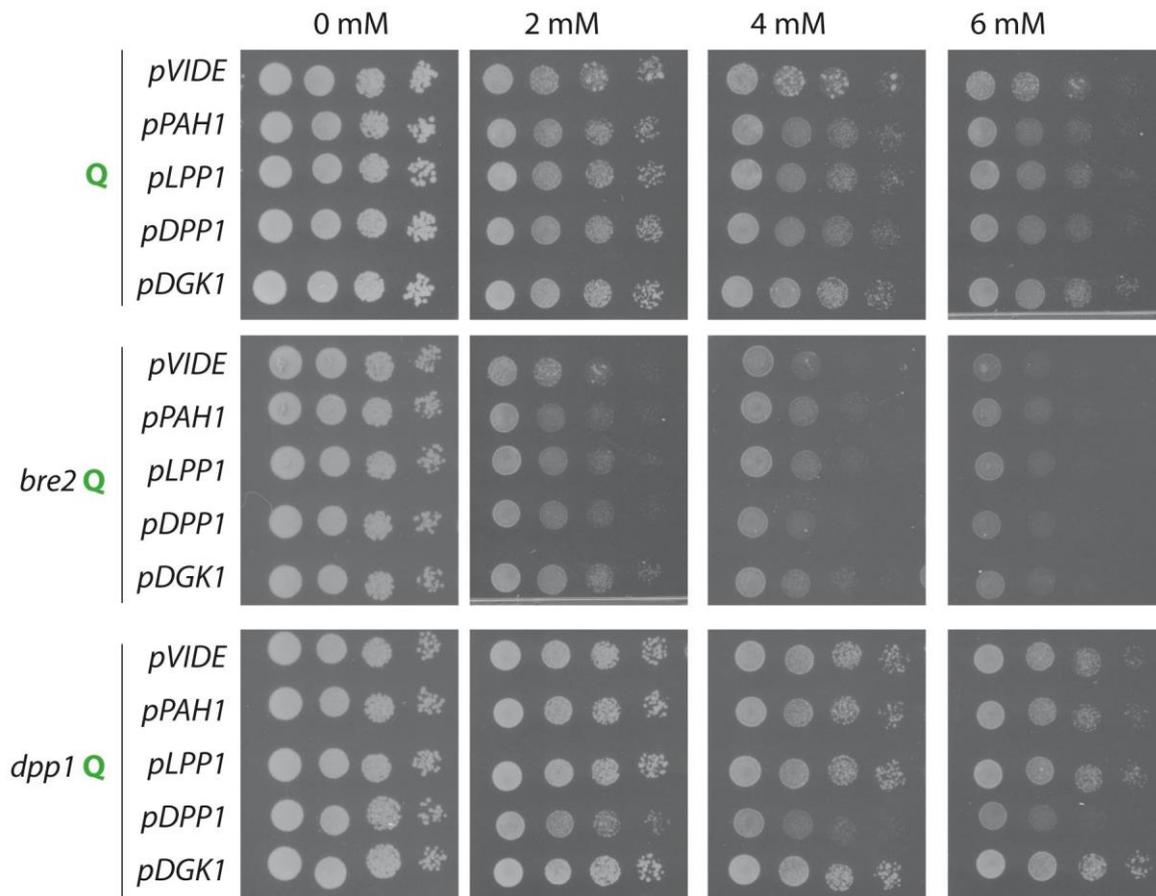
**Figure 30 : Voie de biosynthèse des lipides, localisation et conséquences**

(a) Dpp1 permet la déphosphorylation du DGPP en PA, qui lui-même est transformé en DAG par Pah1 ou Lpp1. Ces métabolites sont utilisés dans la formation de la plupart des lipides (PC, PE, PS, PG). Dgk1 va venir phosphoryler le DAG pour reformer du PA. On sait aussi qu'il existe une enzyme capable de phosphoryler le PA en DGPP, mais elle n'a pas encore été identifiée. (b) Ces enzymes sont réparties au sein de la cellule sur différents compartiments, Dpp1 se trouve sur la membrane vacuolaire, Lpp1 sur la membrane du Golgi et Pah1 est plutôt cytosolique, mais son substrat est lié au RE. (c) La délétion de *dpp1* engendre une augmentation du PA et du DGPP. Figure tirée de l'article de Toke DA 1998 [155].



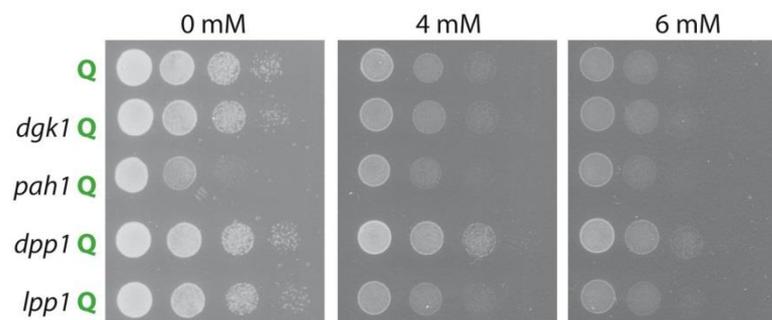
**Figure 31 : Régulation de la transcription d'*INO1* par le PA**

En absence d'inositol, le PA est abondant et la transcription d'*INO1* a lieu afin de synthétiser de l'inositol à partir de glucose. La synthèse de phosphatidylinositol va ainsi pouvoir être réalisée à partir de l'inositol formé et de DAG provenant de la métabolisation du PA. En présence d'inositol, le PA va être très fortement consommé pour cette réaction, ce qui va aboutir à la libération d'Opi1. Opi1 une fois entré dans le noyau va venir inhiber la synthèse d'*INO1*.



**Figure 32 : Surexpression de *PAH1*, *LPP1*, *DPP1* et *DGK1***

Le test en goutte est réalisé avec 0, 2, 4 ou 6 mM d'AICAR ajoutés au milieu. Trois souches ont été transformées avec les plasmides de surexpression de *PAH1*, *LPP1*, *DPP1* et *DGK1* ainsi qu'un plasmide vide, il s'agit du quadruple mutant **Q** (*ade16 ade17 ade8 his1*) et des quintuple mutants *bre2* **Q** et *dpp1* **Q**.



**Figure 33 : Délétion de *dgk1*, *pah1*, *dpp1* et *lpp1***

Le test en goutte est réalisé avec 0, 4 ou 6 mM d'AICAR. On constate que *pah1* **Q** a un fort défaut de croissance même sans AICAR.

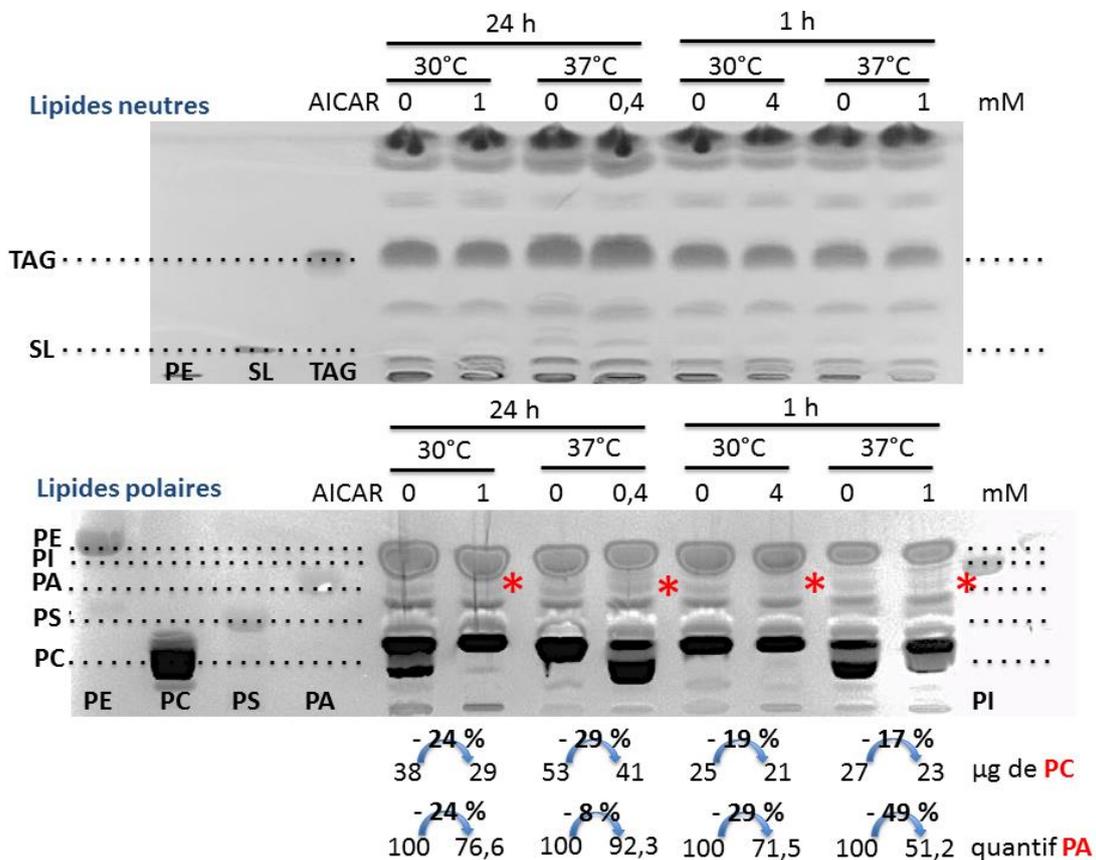
Globalement, l'AICAR n'a pas d'effet sur la quantité de PE, PS (phosphatidylserine) ou TAG (triacylglycerol). L'analyse de la PC est plus difficile car sa migration n'est pas homogène. C'est pourquoi, après avoir gratté la zone correspondante, nous l'avons analysée par spectrométrie de masse. On constate une diminution constante d'environ 20 % des PC en présence d'AICAR. D'après Sébastien Mongrand, qui s'est occupé de ces analyses, cette différence n'est pas significative. Globalement, il semble donc que l'AICAR n'a pas d'effet sur la composition lipidique de la cellule. Par contre, on constate une diminution de la quantité de PA en présence d'AICAR et ce particulièrement dans les conditions que nous utilisons habituellement, 1h 37°C.

Ainsi, lors d'un traitement à l'AICAR, il y a une chute du PA et aussi potentiellement du DGPP. Lorsque *DPP1* est muté, on a une augmentation du PA et du DGPP. Dans cette condition la cellule est résistante à l'AICAR. Si on met cela en parallèle, on peut émettre l'hypothèse que c'est la diminution du PA ou du DGPP qui affecte la prolifération en présence d'AICAR. Si cette chute est compensée par la délétion de *dpp1*, alors l'on devient résistant à l'AICAR. Pour tester cette idée, nous avons utilisé une fusion *INO1-LacZ*. En effet, l'expression de ce gène va être, dans une certaine mesure, proportionnelle à la quantité de PA [149]. Lorsqu'il y a beaucoup de PA, *INO1* est fortement transcrit. A l'inverse, en absence de PA, *INO1* est inhibé (Figure 31). On constate qu'en présence d'AICAR, dans la souche sauvage, on a effectivement une diminution de l'expression d'*INO1* qu'on peut associer à la diminution de PA observée (Figure 35). Lorsque *dpp1* est délété, on observe une augmentation de l'expression d'*INO1*, ce qui correspond bien avec le fait que la délétion de *dpp1* induit une augmentation de la quantité de PA. Par contre, en absence de *dpp1* et en présence d'AICAR, on constate toujours une forte diminution de l'expression d'*INO1*. La délétion de *dpp1* ne permet donc pas de compenser les effets de l'AICAR sur la quantité de PA. Ce ne serait donc *a priori* pas le PA qui serait à la base des différences de sensibilité à l'AICAR entre la souche sauvage et *dpp1*. On peut envisager qu'il pourrait s'agir du DGPP lui-même. A ce titre, une collaboration avec une équipe capable de mesurer le DGPP serait idéale afin de pouvoir tester cette hypothèse.

### c) Lien avec COMPASS

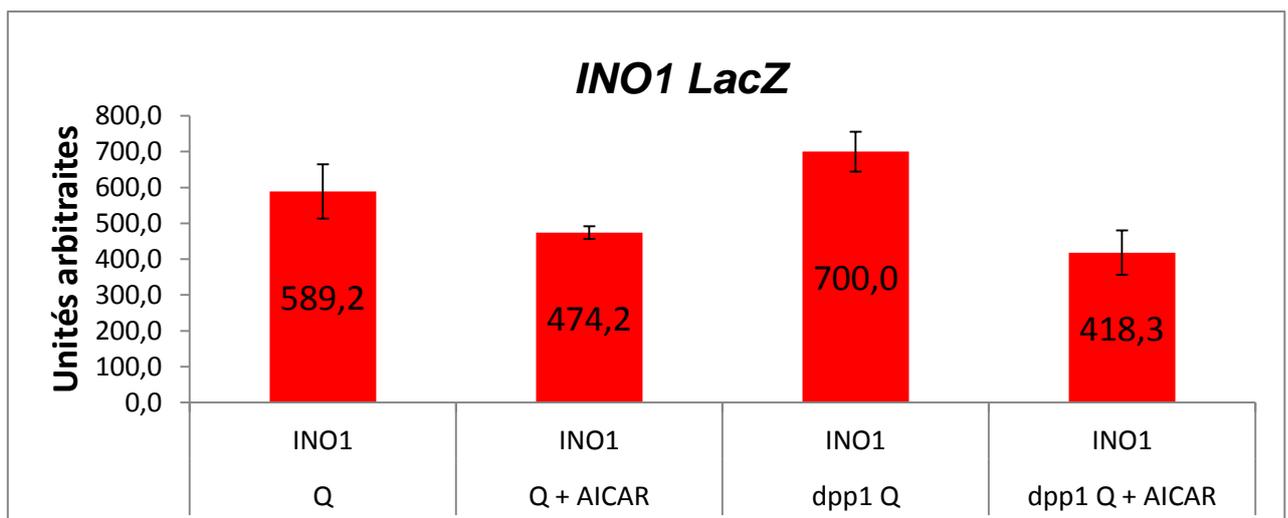
A la base, nous avons effectué le crible dans une souche délétée pour *bre2*, afin de mieux appréhender la SL entre l'AICAR et la délétion des sous unités du complexe COMPASS. Pour cette raison, nous avons ensuite voulu savoir si la délétion de *dpp1* permettait de rendre un mutant d'une autre sous unité de COMPASS, comme par exemple *set1*, lui aussi résistant à l'AICAR ou non. Il s'avère que non, puisque le mutant *set1 dpp1* est toujours particulièrement sensible à l'AICAR à des niveaux similaires au mutant *set1* seul (Figure 36). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les contraintes du crible nous ont poussé à choisir un mutant (*bre2*) qui n'aggrave que très peu la sensibilité à l'AICAR par rapport au sauvage et que donc ce n'est pas à ce niveau qu'a eu lieu la plus forte pression de sélection pendant le crible. Par rapport à la relation d'épistasie mise en avant, si Set1 et Dpp1 font parties d'une voie de régulation strictement linéaire, on en conclut que Set1 est en amont de Dpp1 dans cette voie. Néanmoins, dans la cellule, les voies sont souvent branchées et interconnectées ce qui complique l'interprétation de l'épistasie.

Ce crible n'a donc pas permis d'apporter de nouveaux éléments de réponse concernant les causes de la SL entre *set1/COMPASS* et un traitement à l'AICAR. Ici, nous cherchions à identifier les acteurs directement impliqués dans cette interaction. Parmi eux, il nous manque toujours la cible directe du



**Figure 34 : Résultats des expériences de chromatographie sur couche mince (CCM)**

Huit conditions ont été testées : 24 heures à 30°C avec 0 ou 1 mM d'AICAR, 24 heures à 37°C avec 0 ou 0,4 mM d'AICAR, 1 heure à 30°C avec 4 mM d'AICAR et enfin 1 heure à 37°C avec 1 mM d'AICAR. La première CCM permet de séparer les lipides neutres tels que les TAG. La seconde CCM permet de séparer les lipides polaires tels que le PE, PI, PA, PS ou PC. La quantification du PC par spectrométrie de masse est indiquée en dessous, ainsi que celle du PA par analyse d'image.



**Figure 35 : Expression d'INO1 en présence d'AICAR et/ou de Dpp1**

Une fusion entre le promoteur d'INO1 et la bêta-galactosidase a été transformée dans les souches **Q** ou **dpp1 Q**. 0 ou 1 mM d'AICAR ont été ajoutés pendant 2h à 37°C. L'expérience est réalisée en triplicats.

ZMP engendrant un effet sur la localisation subcellulaire de Cln3. C'est pourquoi nous avons choisi de passer à une approche plus biochimique permettant d'identifier les protéines liant le ZMP.

## 5. Colonne de ZMP, protéomique

### a) Principe de l'approche et résultats

Afin de rechercher des protéines liant le ZMP (*binders*), une chromatographie d'affinité a été réalisée. Cette colonne contient des billes sur lesquelles est fixée le ZMP. L'on va ensuite faire passer un extrait protéique de levure (*input*) sur cette colonne. Les premières fractions obtenus sont appelées « *flow through* », il s'agit de la fraction non retenue. Ensuite, on va laver la colonne afin d'évacuer toutes les protéines non retenues. Ensuite, l'élution se fait avec du ZMP. Ainsi, on va spécifiquement décrocher les protéines liant le ZMP. Cela a été réalisé par Hans Hürlimann avant mon arrivée au laboratoire. Sur la figure 37 a, il a déposé sur le premier puit l'extrait protéique total de départ, dans le deuxième puit il s'agit du *flow through* et enfin dans la dernière, il s'agit des protéines spécifiquement éluées au ZMP. Ce gel a ensuite été coloré à l'argent afin de pouvoir visualiser la composition globale protéique de chaque extrait. On constate que le profil de la piste éluée au ZMP est très différent de l'*input*.

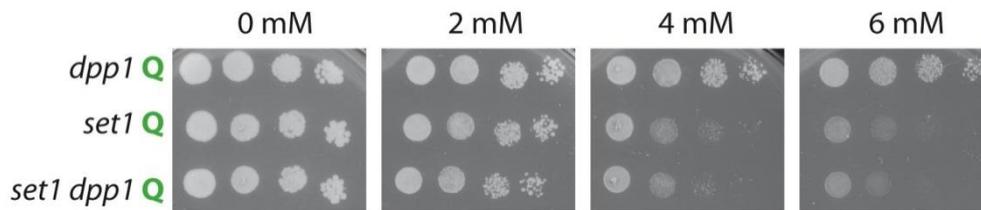
Cette colonne a été refaite cinq fois, puis les échantillons obtenus dans l'élution au ZMP ont été analysés par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines les composant. En tout, 62 protéines ont été retrouvées dans au moins 4 sur 5 manipulations (figure 37 b), ce qui représente 1 % du protéome de levure.

### b) Candidats

Dans l'article que nous avons écrit, il ressort que l'AICAR affecte la localisation subcellulaire de Cln3. Or, ici, deux acteurs impliqués dans le transport nucléaire sont retrouvés sur la colonne, Kap123 et Yrb1. On peut ainsi imaginer que le ZMP en liant ces deux cibles pourrait affecter le transport nucléaire, de façon plus ou moins globale, résultant de l'effet observé sur Cln3. Pour cette raison, nous avons creusé ces deux candidats en particulier.

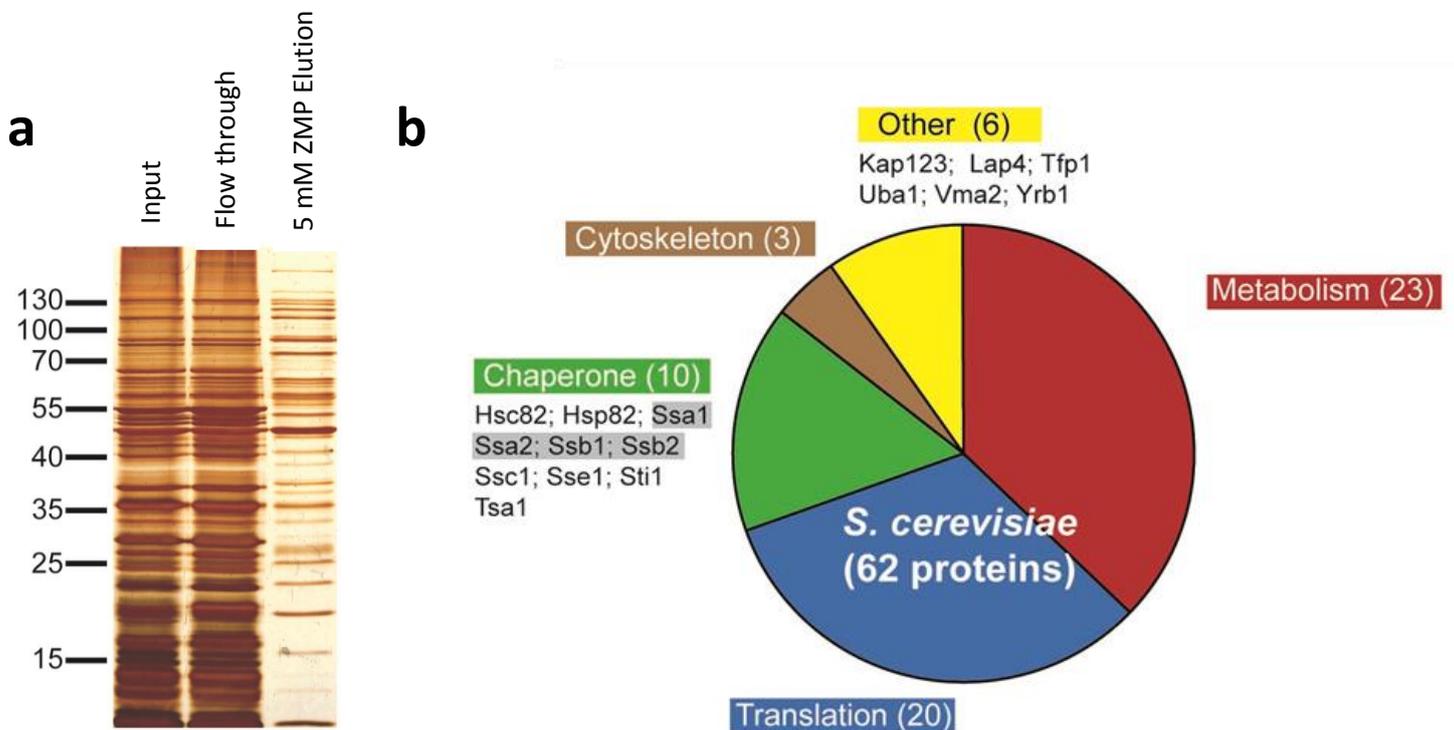
Tout d'abord, nous avons vérifié les résultats obtenus par spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons tagué Kap123 et Yrb1 avec Myc afin de pouvoir les révéler en utilisant un anticorps anti-Myc. Nous avons ensuite passé cet extrait protéique sur une colonne de ZMP, mais aussi une colonne d'AMP, afin d'évaluer la spécificité d'interaction. On observe sur la figure 38, que Kap123 est effectivement retenu sur la colonne de ZMP et absent de la colonne d'AMP. Il s'agit donc d'un bon *binder* du ZMP. Par contre, pour Yrb1, on devine peut être une bande très fine dans la piste correspondant à l'élution au ZMP, sans signal franc. On peut émettre l'hypothèse qu'Yrb1 est bien retenu sur la colonne, mais qu'il a une affinité pour le ZMP qui serait beaucoup moins importante que celle de Kap123.

Par la suite, nous nous sommes donc focalisés particulièrement sur Kap123, afin d'étudier son lien avec l'AICAR ainsi que COMPASS.



**Figure 36 : Expérience d'épistasie entre *dpp1* et *set1***

Le test en goutte a été réalisé avec 0, 2, 4 ou 6 mM d'AICAR. On constate que le mutant *set1 dpp1* Q a la même sensibilité à l'AICAR que le mutant *set1* Q. *set1* est donc épistatique sur *dpp1* concernant la réponse à l'AICAR.



**Figure 37 : Chromatographie d'affinité au ZMP et binders**

(a) Les extraits obtenus de l'*input*, du *flow through* et de l'éluion ont été déposés sur gel et migrés, puis colorés à l'argent. (b) 62 protéines ont été retrouvées dans au moins 4 sur 5 expériences. Celles surlignées en gris sont les protéines retrouvées dans beaucoup d'expériences de chromatographie d'affinité pour des molécules diverses et sont donc considérées comme étant des contaminants potentiels.

## 6. Transport nucléaire et ZMP

### a) Transport nucléaire

Les cellules eucaryotes possèdent de multiples structures membranaires internes qui permettent une compartimentalisation au sein de la cellule, utilisées par la cellule pour la régulation de multiples processus cellulaires. Une de ces grandes structures internes est le noyau qui permet de séquestrer le matériel génétique au sein de l'enveloppe nucléaire. A sa surface, on retrouve des pores nucléaires qui permettent de sélectionner les protéines qui vont pouvoir entrer dans le noyau [156]. En effet, les molécules de plus de 40-50 kDa ne pourront, la plupart du temps, traverser les pores nucléaires que si elles sont transportées par des karyophérines. Généralement, les protéines qui vont entrer dans le noyau possèdent une séquence d'adressage à celui-ci, la « *nuclear localization sequence* » (NLS) [157]. A l'inverse, une séquence NES, « *nuclear export signal* », est retrouvée sur la plupart des protéines sortant du noyau. Certaines séquences NLS ont été identifiées :

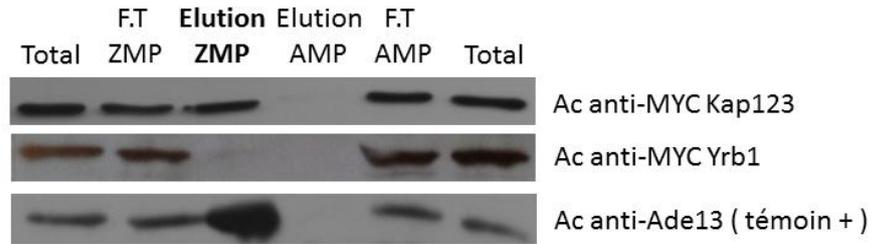
- La NLS classique, composée de cinq acides aminés KKKRK découverte en 1986 [157].
- La NLS bipartite composée de deux séquences d'acides aminés séparés par un dix acides aminés non spécifiques [158].

On ne connaît pas encore la totalité des séquences reconnues comme étant des NLS ni les transporteurs exacts impliqués pour chaque séquence signal. En plus de la séquence elle-même, d'autres paramètres vont entrer en compte tel que l'accessibilité à la NLS.

Chez la levure, il existe 14 karyophérines qui, pour la plupart, lient leur cargo directement [159]. Elles possèdent un domaine de liaison au cargo, un domaine de liaison au pore nucléaire, des répétitions HEAT et un site de liaison au RanGTP [156]. En effet, le transport à travers le pore, ainsi que le relargage du cargo, puis l'export sont dépendants du gradient de RanGTP (Figure 39). Ce gradient est créé grâce à Srm1/Rcc1, la RanGEF pour « *Ran guanine nucleotide exchange factor* », qui est liée à H2A-H2B et donc séquestrée dans le noyau. A l'inverse, Rna1, la RanGAP pour « *Ran GTPase activating protein* », est liée à un filament cytoplasmique du pore nucléaire. Ainsi, au sein du noyau il y a une très forte concentration de RanGTP, alors qu'à l'extérieur du noyau il y en a très peu [160]. Ainsi, lorsque la karyophérine liée à son cargo entre dans le noyau, une molécule de RanGTP va venir s'y fixer, engendrant le relargage du cargo. Afin de recycler ces transporteurs, la sortie du noyau des karyophérines liées à l'import, appelées les importines, nécessite leur liaison à l'exportine Crm1. Une fois dans le cytoplasme, Yrb1 va faciliter l'hydrolyse du RanGTP par la RanGAP, ce qui conduit à la dissociation du complexe [161].

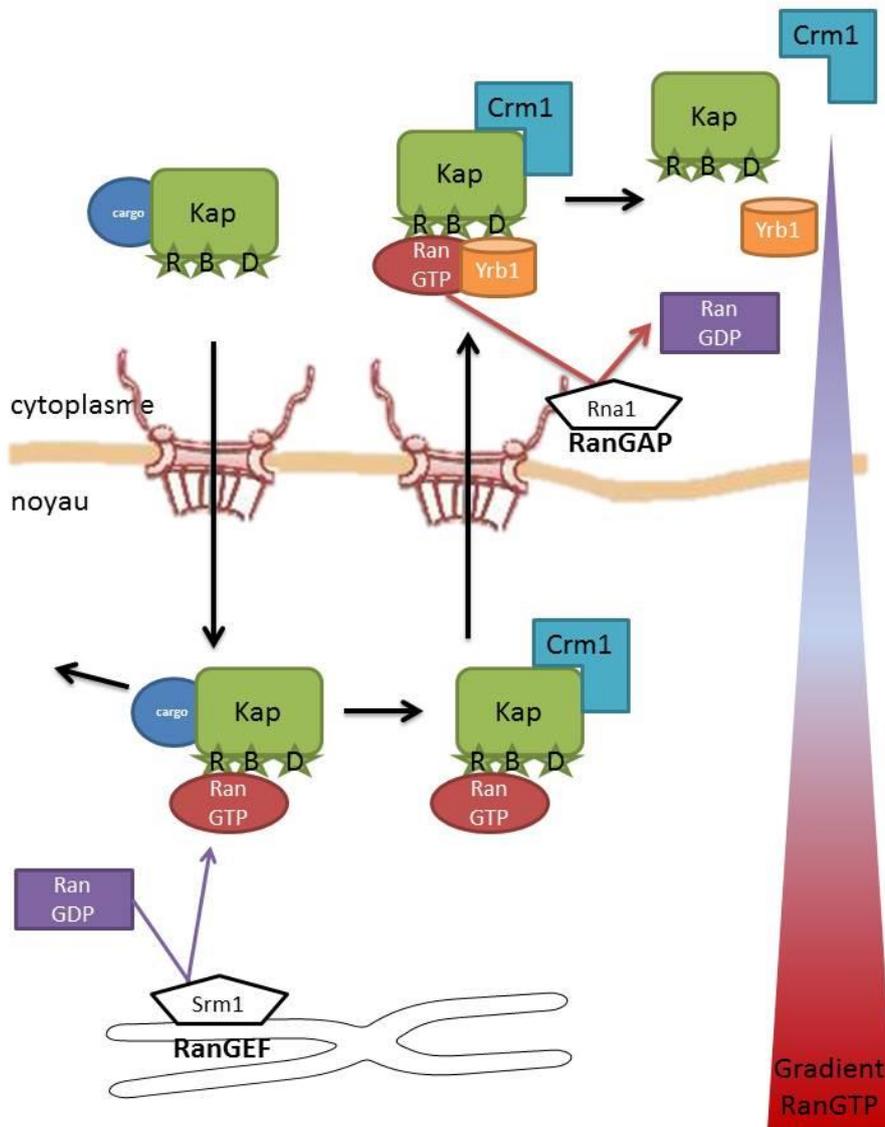
Des études protéomiques ont évalué que 40 % des protéines de levure entrent dans le noyau [162]. Cela implique que chaque importine pourrait reconnaître des centaines de cargos. Pourtant, le nombre de cargos identifiés pour chacune d'entre elles se situe aux alentours des dizaines, ce qui implique que beaucoup de choses restent à découvrir dans ce domaine. De plus, beaucoup de questions se posent encore quant au rôle exact de la multiplicité des karyophérines. Cela permet-il une régulation fine ou est-ce uniquement une redondance fonctionnelle ? Il paraît peu probable d'imaginer que ces karyophérines sont strictement redondantes, puisque certaines d'entre elles sont essentielles pour la survie, telle que Kap95 ou Kap121.

Lors de ma thèse, nous avons cherché à établir précisément si Kap123 était ou non impliquée dans la sensibilité à l'AICAR.



**Figure 38 : Chromatographie d'affinité avec Kap123-myc et Yrb1-myc**

Des extraits des colonnes de ZMP et d'AMP ont été déposés : les extraits totaux, ceux flow through (FT) et des éluions. Kap123 et Yrb1 ont été révélés avec un anticorps anti-Myc, Ade13 sert de témoin positif puisqu'il s'agit de l'enzyme métabolisant le ZMP.



**Figure 39 : Principes du transport nucléaire**

Les explications précises de cette représentation schématique du transport nucléaire sont développées dans le texte.

## b) Surexpression de Kap123

Kap123 est une importine relativement peu caractérisée. L'ensemble des cargos qui lui sont attribués (Egd1, H3, H4, HO, Sas2...) peuvent aussi être transportés par Kap121 dont elle possède une structure très proche [163]. Néanmoins, alors que *KAP121* est un gène essentiel, *KAP123* ne l'est pas, soulignant d'ores et déjà que ces karyophérines ne sont pas interchangeable. Kap121 et Kap123 reconnaissent un motif NLS riche en acides aminés basiques et d'une longueur de plus de 25 acides aminés [164]. Pour autant, aucune séquences consensus n'a pu être véritablement déterminée jusqu'à maintenant.

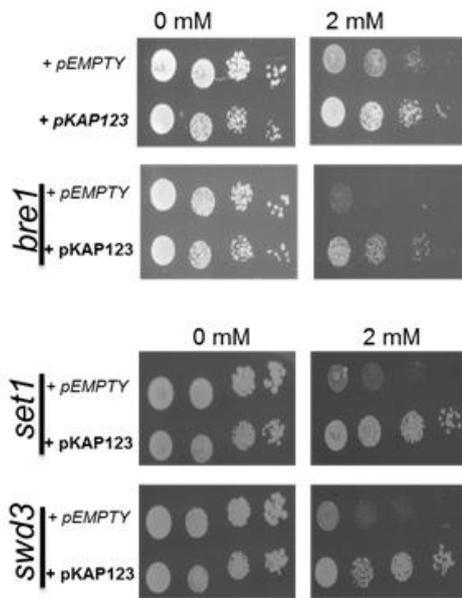
Kap123 étant retrouvée sur la colonne de ZMP, nous nous sommes demandés si cette liaison ne pouvait pas avoir un effet inhibiteur sur la fonction de Kap123 et ainsi la rendre limitante pour la croissance. Pour tester cette hypothèse, nous avons surexprimé *KAP123* (Figure 40). On constate que la surexpression de *KAP123* dans la souche sauvage permet de sauver une partie de la sensibilité à l'AICAR. De façon encore plus impressionnante, la surexpression de *KAP123* supprime une grande partie des effets de l'AICAR dans les mutants *bre1*, *set1* ou *swd3*.

Nous avons ensuite souhaité savoir si cet effet était spécifique à Kap123 ou non (Figure 41). La surexpression de *KAP121* n'a que peu d'effet sur la croissance en présence d'AICAR, celle de *KAP114* ou d'*YRB1* n'ont, quant à elles, aucun effet. Il semble donc qu'il y ait une véritable spécificité de suppression par Kap123. Nous nous sommes ensuite demandés si cet effet était dû à la fonction connue d'importine de Kap123 ou potentiellement à une autre fonction encore non établie de cette protéine. Pour cela, nous avons construit des délétions N et C terminales de Kap123, en ajoutant aussi un tag Myc, afin d'identifier la séquence suffisante et nécessaire pour la suppression (Figure 42-43). Malgré des niveaux d'expression similaire à la protéine entière, aucune des constructions n'a permis de supprimer les effets de l'AICAR. Nous avons ensuite transformé une souche avec ces constructions et passé l'extrait sur une colonne de ZMP (Figure 44). Il s'avère qu'aucune des constructions tronquées ne maintient sa capacité à lier le ZMP. On peut envisager le fait qu'en réalité, ces constructions font perdre la structure 3D de la protéine, résultant en une protéine non fonctionnelle et qui n'est plus fixée par le ZMP. De ce fait, il faudrait potentiellement réaliser des chimères, peut être avec Kap121, afin de déléter certaines régions de la protéine tout en la maintenant repliée de façon correcte. Nous avons choisi de ne pas réaliser ce type d'expérience qui aurait été très chronophage.

## c) Kap123 et cyclines

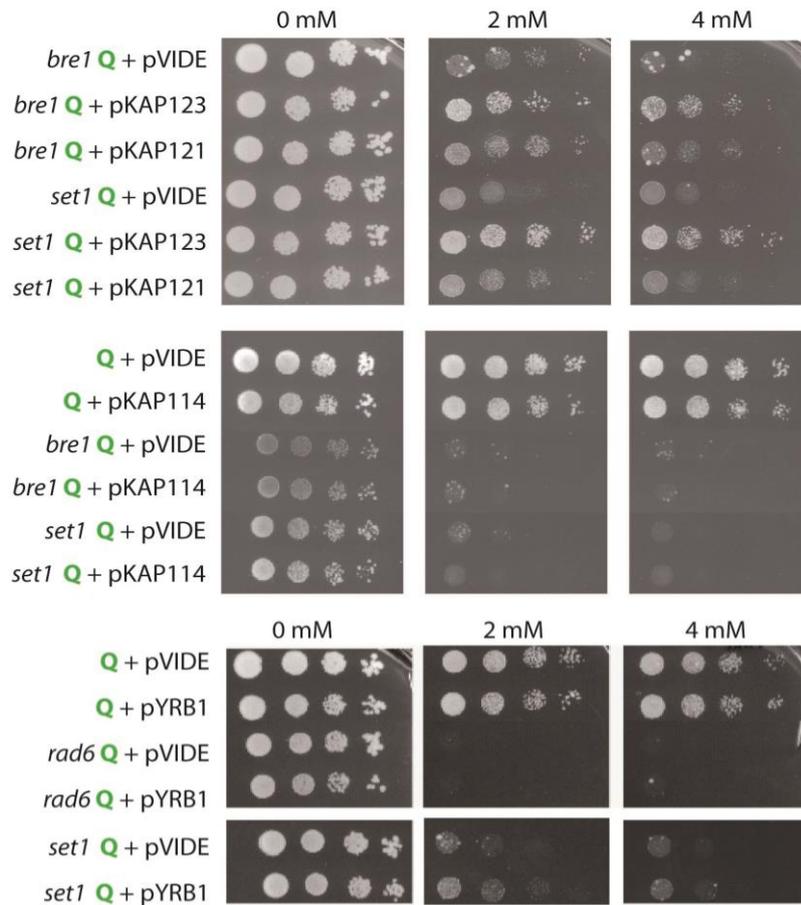
Puisque la surexpression de *KAP123* permet de supprimer la SL entre l'AICAR et *bre1/set1*, tout comme la surexpression de *CLN1*, *CLN2* ou *CLN3*, nous nous sommes demandé si Kap123 ne pouvait pas faciliter le transport d'une de ces cyclines directement. Pour tester cette hypothèse, nous avons construit des mutants capables d'accumuler du ZMP (donc *ade16 ade17 ade8 his1*) et délétés pour chacune des cyclines ou des combinaisons de cyclines. En effet, seule le triple mutant *cln1 cln2 cln3* est létal. Ainsi, on va pouvoir surexprimer *KAP123* dans des conditions où une seule des cyclines est maintenue.

Tout d'abord en ce qui concerne l'effet des délétions des cyclines de G1 sur la sensibilité à l'AICAR (Figure 45).



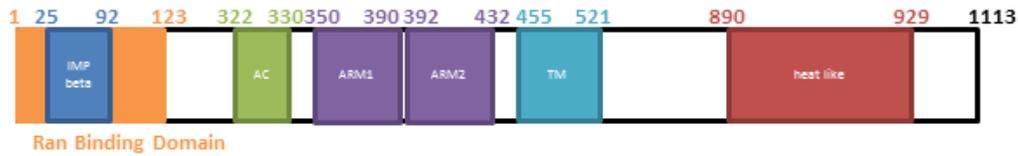
**Figure 40 : Surexpression de *KAP123***

Le test en goutte a été réalisé avec 0 ou 2 mM d'AICAR. Toutes les souches utilisées sont *ade16 ade17 ade8 his1*. Elles ont été transformées avec un plasmide vide ou un plasmide permettant la surexpression de *KAP123*.



**Figure 41 : Surexpression de *KAP123*, *KAP121*, *KAP114* et *YRB1***

Le test en goutte a été réalisé avec 0, 2 ou 4 mM d'AICAR. Les souches ont été transformées avec un plasmide VIDE ou des plasmides permettant la surexpression de *KAP123*, *KAP121*, *KAP114* ou *YRB1*.



### Ran Binding domain

IMP beta : domaine similaire à l'importine beta

AC : acidic cluster

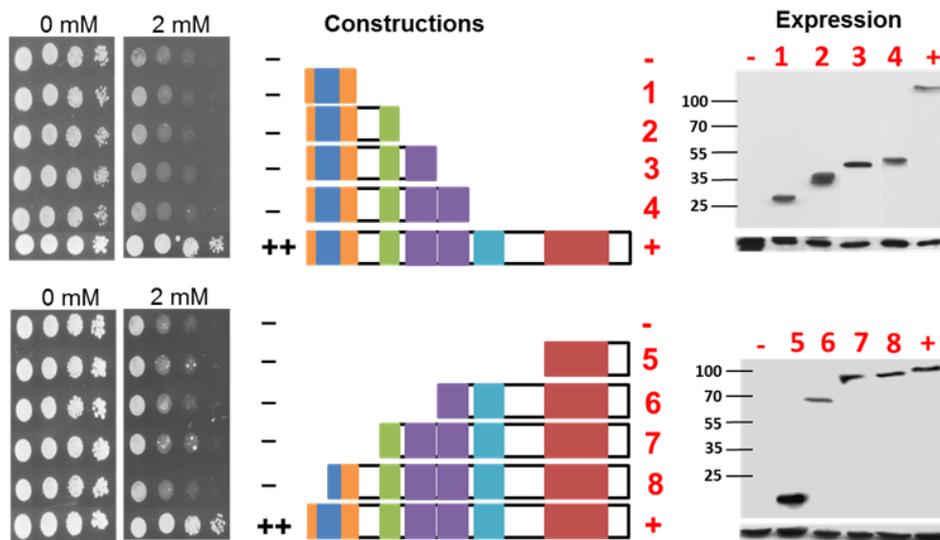
ARM : armadillo, structure incurvée, avec 2 NLS-binding domain

TM : transmembranaire

HEAT like : transport dans le pore nucléaire

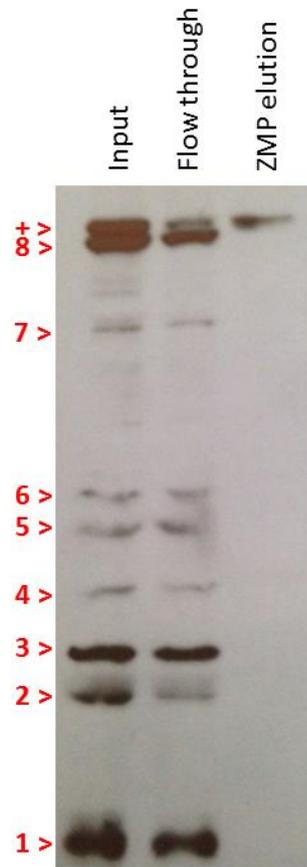
**Figure 42 : Structure de KAP123**

Par homologie de séquence, on peut identifier un certain nombre de domaines dans le gène *KAP123*. Un « *Ran Binding Domain* » ce qui est similaire au domaine « *Importine beta* », un « *acidic cluster* », deux domaines potentiels de liaison au cargo, un domaine défini comme « *transmembranaire* » et un « *heat like domain* » nécessaire à l'avancé dans le pore.



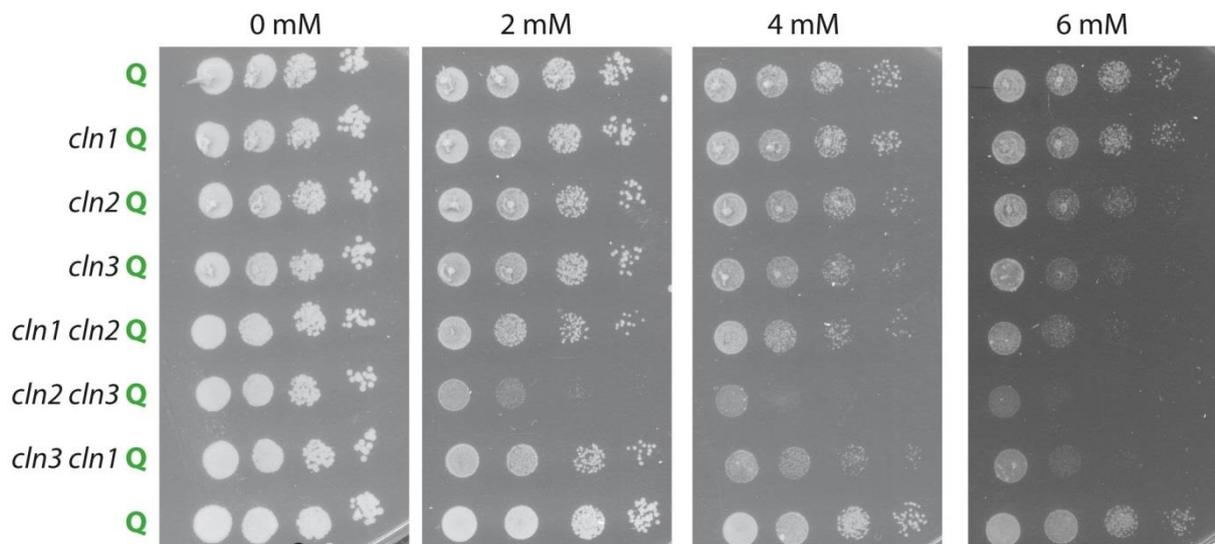
**Figure 43 : Constructions KAP123, expression et suppression**

La souche *set1 Q* a été transformée avec les constructions représentées au centre de l'image. Le code couleur des constructions est le même que pour la figure 42. Des western blots ont été réalisés afin d'évaluer le niveau d'expression de ces constructions (à droite de l'image).



**Figure 44 : Chromatographie d'affinité au ZMP réalisée avec les fragments de Kap123**

Dans la première colonne, l'*input* ou total a été chargé, dans la seconde le *flow through* et dans la dernière l'élué au ZMP. Le western blot a été révélé avec un anticorps anti-Myc. La taille des bandes permet de distinguer les différentes constructions, qui sont annotées de 1 à 8 comme dans la figure 43.



**Figure 45 : Délétions de *CLN1*, *CLN2* et/ou *CLN3***

Le test en goutte a été réalisé avec 0, 2, 4 ou 6 mM d'AICAR. Toutes les combinaisons viables de délétions de cyclines ont été testées afin de déterminer leur sensibilité à l'AICAR.

On constate que :

- La délétion de *cln2* ou *cln3* seule rend plus sensible à l'AICAR
- Les délétions combinées de deux cyclines rendent plus sensible à l'AICAR
- La délétion de *cln1* n'a pas d'effet sur la sensibilité à l'AICAR
- A l'inverse lorsque *cln1* est la seule cycline restante, cela engendre une SL avec l'AICAR

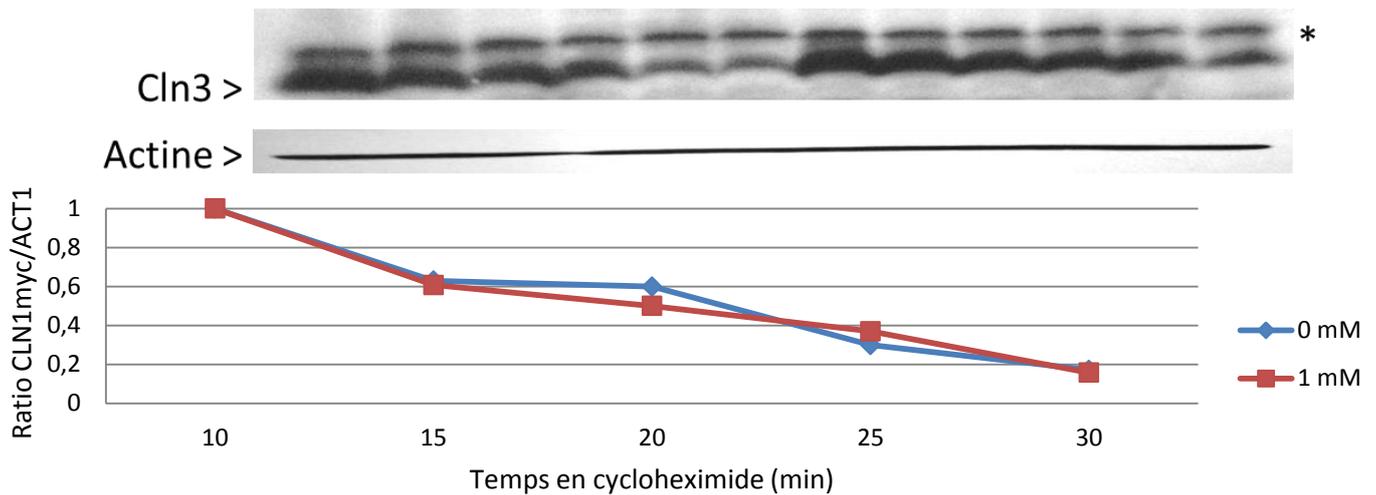
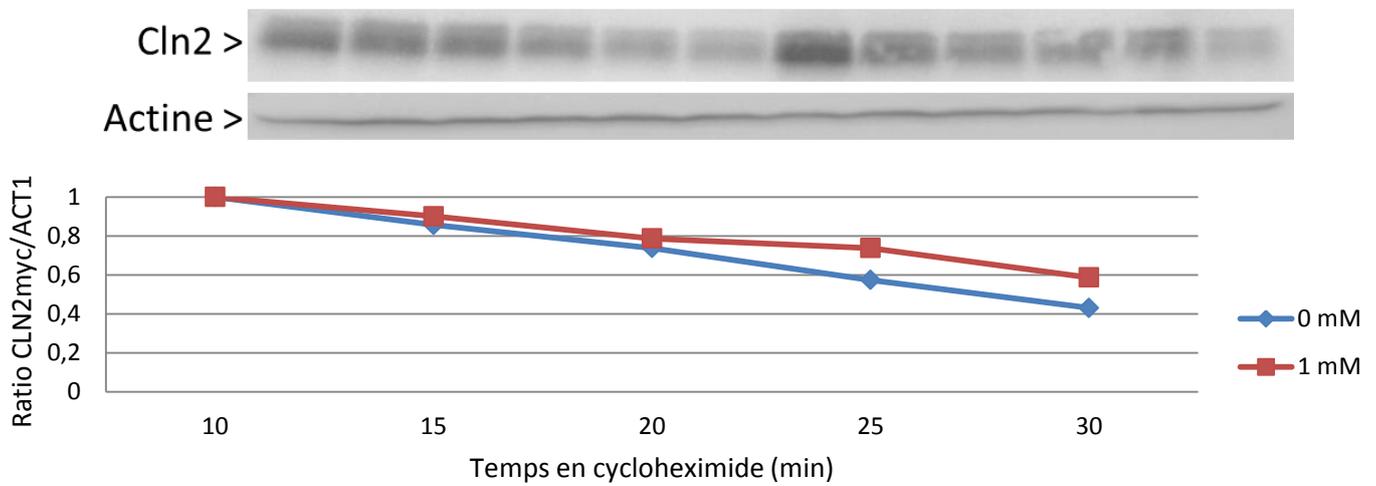
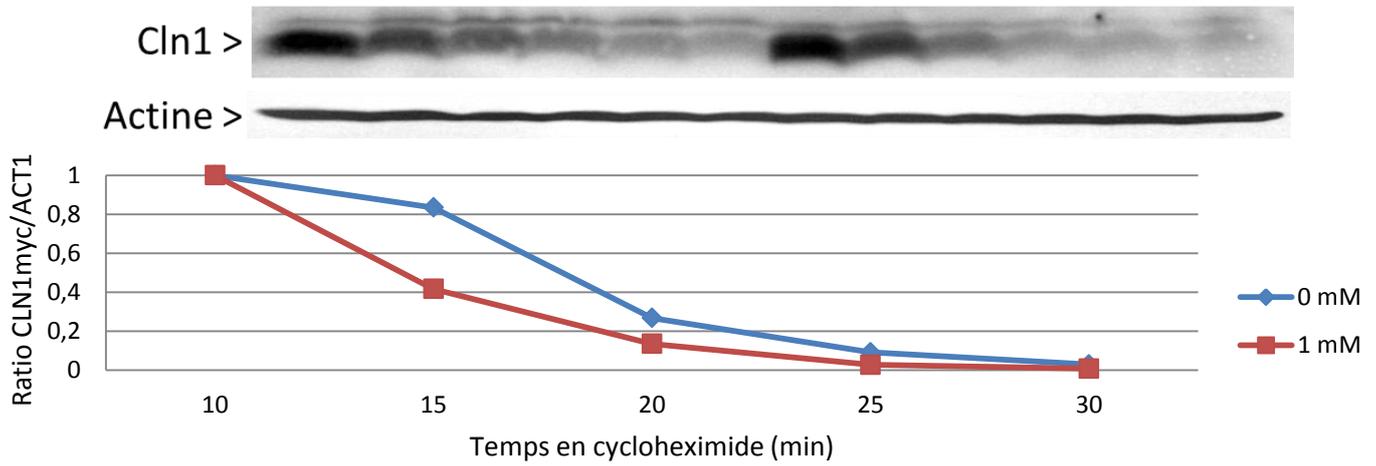
Il semble donc que l'expression des cyclines est bien limitante pour la prolifération en présence d'AICAR. Comment expliquer les différences observées spécifiquement avec Cln1 ? Nous avons émis l'hypothèse que l'AICAR pourrait avoir, en plus de son effet sur la transcription de *CLN1* (cf. article), aussi un effet sur sa dégradation. Pour tester cette idée, nous avons fait des expériences permettant d'estimer le temps de demi-vie de chacune de ces cyclines en présence ou en absence d'AICAR. Pour cela, après 1h30 de traitement ou non à l'AICAR, de la cycloheximide, inhibiteur de synthèse protéique, a été ajoutée, puis toutes les 5 minutes des extraits ont été récupérés. Ainsi, on va pouvoir suivre l'extinction de la protéine au cours du temps. La figure 46 représente la quantification des western blots réalisés à partir de ces extraits. On constate que la présence d'AICAR n'a que peu ou pas d'effet sur le temps de demi-vie de Cln2 et Cln3. A l'inverse, l'AICAR affecte le temps de demi-vie de Cln1, qui passe d'environ 18 minutes à 14 minutes. Cette différence peut permettre d'expliquer les résultats obtenus vis-à-vis des délétions :

Lorsque l'on délète Cln1, cela n'a que peu de conséquences sur la sensibilité à l'AICAR car l'expression de cette protéine est déjà fortement affectée par l'AICAR lui-même. De même, lorsque l'on délète les deux autres cyclines, *cln2* et *cln3*, la cellule ne s'appuie plus que sur la cycline restante, Cln1, pour proliférer. Or, en présence d'AICAR celle-ci est fortement affectée, d'où un arrêt de la prolifération dès 2 mM d'AICAR.

Ceci étant mis en place, nous avons ensuite surexprimé *KAP123* dans les différentes combinaisons de délétion de cyclines (Figure 47). On constate que lorsque Cln1 ou Cln3 sont les seules cyclines restantes, *KAP123* ne permet pas de supprimer les effets de l'AICAR. Au contraire, dans le cas où Cln3 est la seule cycline restante, l'effet de la surexpression de *KAP123* semble même être délétère. Il semble donc que les effets de l'AICAR sur le défaut d'import de Cln3 ne soient pas directement liés à *KAP123*, puisqu'il ne sauve pas de la sensibilité à l'AICAR lorsque Cln3 est la seule cycline présente. Par contre, lorsque Cln2 est la seule cycline restante, on observe une suppression. Potentiellement, on peut envisager qu'en présence d'AICAR, ce ne serait pas seulement l'import de Cln3, mais aussi celui de Cln1 et Cln2 qui pourrait être limitant. Ainsi, la surexpression de Kap123 pourrait permettre de faciliter l'import de Cln2. Néanmoins, cette conclusion est certainement à relativiser. En effet, lorsque Cln1, Cln2 ou Cln3 sont les seules cyclines présentes, elles vont compenser le rôle des deux autres cyclines. Dans quelle mesure cette compensation est-elle complète ? Qu'en est-il de leur régulation ? Afin de mieux appréhender les effets de Kap123 dans une souche sauvage, nous avons réalisé des expériences de protéomique afin d'identifier les cargos de *KAP123* en absence ou en présence d'AICAR.

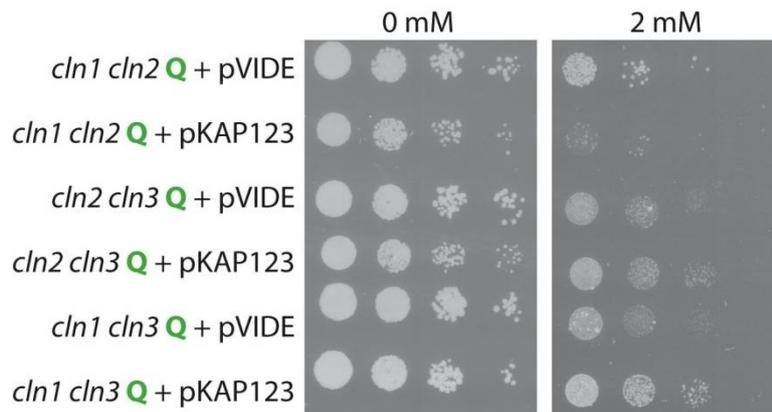
#### d) Kap123 et protéomique

Dans l'idée où le ZMP fixerait *in vivo* Kap123 et induirait son inhibition, donc des défauts de transport, on s'attend à avoir un impact de l'AICAR sur la composition en protéines nucléaires de la cellule. Pour tester cela, nous avons utilisé un kit permettant une extraction fortement enrichie en



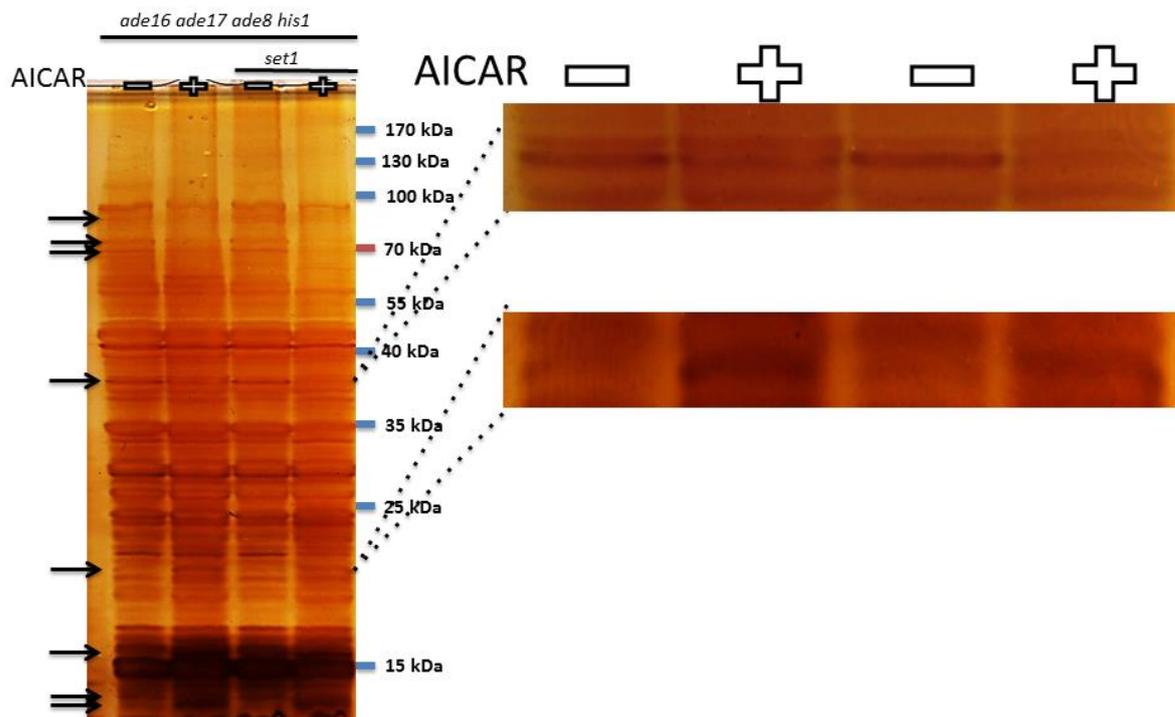
**Figure 46 : Expérience de cycloheximide avec Cln1, Cln2 et Cln3**

Après 1h30 de traitement avec 0 ou 1 mM d'AICAR, de la cycloheximide a été ajoutée. Dix minutes après, les premiers extraits ont été récupérés, puis toutes les cinq minutes. Un western blot a été réalisé à partir de ces extraits, révélé avec un anticorps anti-Myc et la quantification de chaque point par rapport à l'actine a été faite. Afin de pouvoir comparer au mieux l'effet de l'AICAR sur le temps de demi-vie, le point 10 minutes a servi de point de normalisation à 1.



**Figure 47 : Délétion de cyclines et *KAP123***

Le test en goutte a été réalisé avec 0 ou 2 mM d'AICAR. Les différentes combinaisons de délétions de cyclines Q ont été transformées avec un plasmide vide ou un plasmide permettant la surexpression de *KAP123*.



**Figure 48 : Gel d'argent sur des extraits nucléaires**

La souche Q et la souche *set1* Q ont été traitées ou non à l'AICAR pendant 2h puis des échantillons ont été récupérés et extraits pour avoir un enrichissement fort en protéines nucléaires. Les extraits ont été passés sur gel (puit 1 Q sans AICAR, puit 2 Q avec AICAR, puit 3 *set1* Q sans AICAR, puit 4 *set1* Q avec AICAR). Le gel a ensuite été coloré à l'argent. Chaque flèche indique des bandes qui ne sont pas présentes à la même intensité dans les quatre pistes. Un zoom sur deux d'entre-elles a été réalisé.

protéines nucléaires. Ainsi, nous avons déposé sur gel des extraits provenant de culture traitées ou non à l'AICAR (Figure 48). On constate qu'en présence d'AICAR, certaines protéines sont fortement enrichies et d'autres, à l'inverse, disparaissent des extraits enrichis en protéines nucléaires. Ces résultats étant prometteurs, nous avons donc décidé de réaliser des extraits enrichis en protéines nucléaires et de comparer quatre conditions :

- Une souche *ade16 ade17 ade8 his1* contenant un plasmide vide non traitée à l'AICAR
- Une souche *ade16 ade17 ade8 his1* contenant un plasmide vide traitée avec 1 mM d'AICAR
- Une souche *ade16 ade17 ade8 his1* contenant un plasmide KAP123 non traitée à l'AICAR
- Une souche *ade16 ade17 ade8 his1* contenant un plasmide KAP123 traitée avec 1 mM d'AICAR

Tous ces extraits ont été réalisés en triplicats puis analysés à la plateforme de génomique fonctionnelle (PGF) afin d'identifier leur composition protéique par spectrométrie de masse.

Ainsi, 2000 protéines ont été identifiées en moyenne par extrait, avec une très bonne reproductibilité entre les monoplicats. Ces protéines étaient effectivement enrichies en protéines nucléaires, puisque près de la moitié en était. On peut noter par contre que les cyclines de G1, Cln1, Cln2 ou Cln3 n'ont pas pu être détectées du fait de leur faible abondance. Certains éléments nous ont permis de confirmer que l'expérience s'était bien déroulée, puisque par exemple, en présence d'AICAR les gènes de la voie ADE étaient bien surexprimés ou encore Kap123 était bien surexprimée dans 2 conditions sur 4.

Par rapport à la question posée, nous avons ensuite comparé les protéines qui diminuaient en présence d'AICAR dans le noyau par rapport à celles qui augmentaient même en présence d'AICAR, lors de la surexpression de *KAP123* (Figure 49). 104 protéines ont ainsi été identifiées, la plupart annotées comme étant nucléaires (Figure 50). L'une d'entre elle nous a paru particulièrement intéressante, puisqu'il s'agit du facteur de transcription Taf1, qui provoque un arrêt en G1 lorsqu'il est délété [165]. D'autant qu'il s'agissait de la protéine sur laquelle l'effet de l'AICAR était le plus marquant avec une diminution de près de 16 fois de la protéine en présence d'AICAR. L'hypothèse étant que lors d'un traitement à l'AICAR, on va fortement diminuer la translocation de Taf1 du cytoplasme vers le noyau, engendrant ainsi un ralentissement en G1.

Nous avons tout d'abord voulu vérifier les données obtenues en protéomique en ajoutant une GFP ou un tag Myc au gène *TAF1* afin de pouvoir le révéler. A partir de la souche tagguée *TAF1-Myc*, nous avons réalisé une extraction dans les mêmes conditions que la protéomique. Le western blot révèle qu'effectivement Taf1 diminue en présence d'AICAR et ré-augmente lorsque *KAP123* est surexprimé, mais dans des proportions beaucoup plus faible que celles attendues (Figure 51), avec une diminution de Taf1 que de 30 %. De même, les résultats de microscopie nous ont indiqué que l'AICAR n'avait pas d'effet flagrant sur la localisation ou l'abondance de Taf1-GFP. Ce résultat est troublant et pourrait s'expliquer par plusieurs raisons. Les tags en C terminal, Myc ou GFP, pourraient affecter la fonction et la localisation de la protéine, par exemple en la stabilisant. Pour cette raison, nous avons ensuite testé l'effet d'un mutant thermosensible (Ts) *taf1* sur la sensibilité à l'AICAR. On constate qu'effectivement dans un mutant Ts *taf1*, on a une légère augmentation de la sensibilité à l'AICAR sans que cela semble être un effet majeur. De plus, la souche TAF1-GFP ayant potentiellement une copie stabilisée de Taf1, a la même sensibilité à l'AICAR que la souche sauvage. Globalement, TAF1 ne semble donc pas être un bon candidat et les résultats de protéomique semblent être potentiellement biaisés par un facteur non déterminé. Pour ces raisons, nous avons choisi de laisser

Nom du gène	(pVIDE AICAR+)/(pV AICAR-)	(pKAP123 AICAR+)/(pVIDE AICAR+)
CRZ1, HAL8, TCN1	0,25	8,7
RPO31, RPC1, RPC160	0,32	8,11
CBF1, CEP1, CP1, CPF1	0,12	6,11
HTA1, H2A1, SPT11	0,33	5,87
HTA2, H2A2	0,33	5,87
YTM1, YOR272W	0,66	5,69
RPC82, RPC3, YPR190C	0,44	5,18
HHF1, YBR009C, YBR0122	0,26	4,79
HHF2, YNL030W, N2752		
VPS72, SWC2, YDR485C	0,2	4,42
IOC3, YFR013W	0,39	3,69
HSP42, YDR171W, YD9395.04	0,56	3,65
HTZ1, H2AZ, YOL012C	0,31	3,59
RTG3, YBL103C, YBL0810	0,25	3,56
HTB2, H2B2, YBL002W, YBL0104	0,26	3,45
HTB1, H2B1, SPT12, YDR224C	0,26	3,45
SNU13, YEL026W	0,25	3,4
ABF2, HIM1, YMR072W	0,3	3,21
ISW1, YBR245C, YBR1633	0,31	3,19
NHP6A, NHPA, YPR052C	0,43	3,07
SRM1, MTR1, YGL097W	0,35	2,96
ULS1, DIS1, YOR191W	0,28	2,96
ABF1, BAF1, OBF1	0,32	2,8
BUD22, YMR014W, YM9711.01	0,33	2,8
TRI1, YMR233W, YM9959.15	0,43	2,76
SWC4, EAF2, GOD1	0,5	2,72
RAP1, GRF1, TUF1	0,43	2,69
TFC3, TSV115, YAL001C	0,45	2,67
PMA1, YGL008C	0,58	2,66
SDS3, YIL084C	0,21	2,64
YLR455W	0,4	2,64
FPR4, YLR449W, L9324.3	0,51	2,49
ARP5, YNL059C, YNL2430C	0,43	2,47
SPC110, NUF1, XCM1	0,32	2,46
RGD1, YBR260C, YBR1728	0,5	2,45
GAR1, YHR089C	0,4	2,45
MOT1, YPL082C, LPF4C	0,39	2,43
<b>TAF1, TAF130, TAF145</b>	<b>0,06</b>	<b>2,42</b>
SLM1, LIT2, YIL105C	0,65	2,41
MAK5, YBR142W, YBR1119	0,48	2,39
TOP1, MAK1, YOL006C	0,53	2,36
ARP4, ACT3, YJL081C, J1012	0,49	2,36
FPR3, NPI46, YML074C	0,44	2,35

ISW2, YOR304W	0,34	2,33
SEN1, YLR430W, L9576.1	0,49	2,29
RGC1, YPR115W	0,81	2,28
CHD1, YER164W, SYGP-ORF4	0,5	2,27
SIN3, CPE1, GAM2	0,55	2,26
PET127, YOR017W, OR26.07	0,68	2,24
REB1, GRF2, YBR049C	0,28	2,22
MPD1, YOR288C	0,55	2,21
INO80, YGL150C, G1880	0,53	2,21
MPP10, YJR002W, J1411	0,4	2,2
SPT5, YML010W, YM9571.08	0,57	2,19
NOP1, LOT3, YDL014W	0,54	2,18
NOC2, YOR206W, YOX001	0,49	2,18
MIP1, YOR330C	0,47	2,12
ENP1, MEG1, YBR247C	0,69	2,11
ITC1, YGL133W, G2842	0,46	2,11
TFC7, YOR110W	0,54	2,09
NHP2, YDL208W, D1045	0,45	2,09
NOP56, SIK1, YLR197W	0,43	2,08
NOP58, NOP5, YOR310C	0,42	2,08
NOP8, YOL144W	0,4	2,06
RPB2, RPB150, RPO22	0,53	2,06
TOP2, TOR3, YNL088W	0,56	2,03
RVB1, TIH1, TIP49A	0,62	2,03
URB1, NPA1, YKL014C	0,51	1,94
GLC7, CID1, DIS2	0,61	1,94
UTP13, YLR222C	0,54	1,93
UTP4, YDR324C	0,6	1,93
ENP2, YGR145W, G6623	0,6	1,89
CBF5, YLR175W, L9470.11	0,55	1,89
MAK21, NOC1, YDR060W	0,55	1,87
BDF1, YLR399C, L8084.18	0,47	1,82
YJL171C, J0512	0,68	1,81
HHO1, YPL127C, LPI17C	0,37	1,8
ERB1, YMR049C, YM9796.02C	0,64	1,79
UTP23, YOR004W	0,55	1,78
HCR1, YLR192C, L8167.11	0,58	1,73
UTP22, YGR090W	0,61	1,73
RPD3, MOF6, REC3	0,55	1,73
RPO26, RPB6, YPR187W	0,4	1,71
HAS1, YMR290C	0,69	1,7
RPB5, RPA7, RPC9	0,57	1,69
RLP7, RPL7, YNL002C	0,54	1,68
PUF6, YDR496C, D9719.2	0,52	1,68
NOP7, RRP13, YPH1	0,46	1,67

NOP14, UTP2, YDL148C	0,64	1,59
RRP1, YDR087C, D4478	0,62	1,55
BRX1, YOL077C	0,67	1,54
RRP5, FMI1, YMR229C	0,75	1,53
NAN1, UTP17, YPL126W	0,65	1,53
NOP12, YOL041C	0,66	1,53
UTP10, YJL109C, J0808	0,62	1,5
NOP2, YNA1, YNL061W	0,75	1,49
RPA135, RPA2, RRN2	0,58	1,49
UTP15, YMR093W, YM9582.18	0,66	1,47
UTP21, YLR409C, L8084.22	0,57	1,46
UTP8, YGR128C	0,73	1,44
PWP2, UTP1, YCR057C	0,66	1,39
UTP20, YBL004W, YBL0101	0,62	1,39
SOF1, YLL011W, L1339	0,63	1,31

**Figure 49 : Protéines qui diminuent en présence d'AICAR et réaugmentent en présence de KAP123**

Les 104 protéines qui diminuent en présence d'AICAR et qui ré-augmentent lors de la surexpression de *KAP123* sont répertoriées dans ce tableau. Dans la deuxième colonne, le ratio entre la quantité de protéine mesurée en présence d'AICAR par rapport à la condition en absence d'AICAR est indiqué. Dans la troisième colonne, le ratio entre la quantité de protéine mesurée en présence de la surexpression de *KAP123* par rapport à un plasmide vide, avec dans les deux cas la présence d'AICAR, est indiqué.

ces résultats de côté pour l'instant. Pour continuer à creuser le lien entre AICAR et transport nucléaire, nous avons ensuite voulu tester les effets de la délétion de certains acteurs du transport nucléaire, tel que *KAP123* lui-même, sur la sensibilité à l'AICAR.

### e) AICAR et transport nucléaire

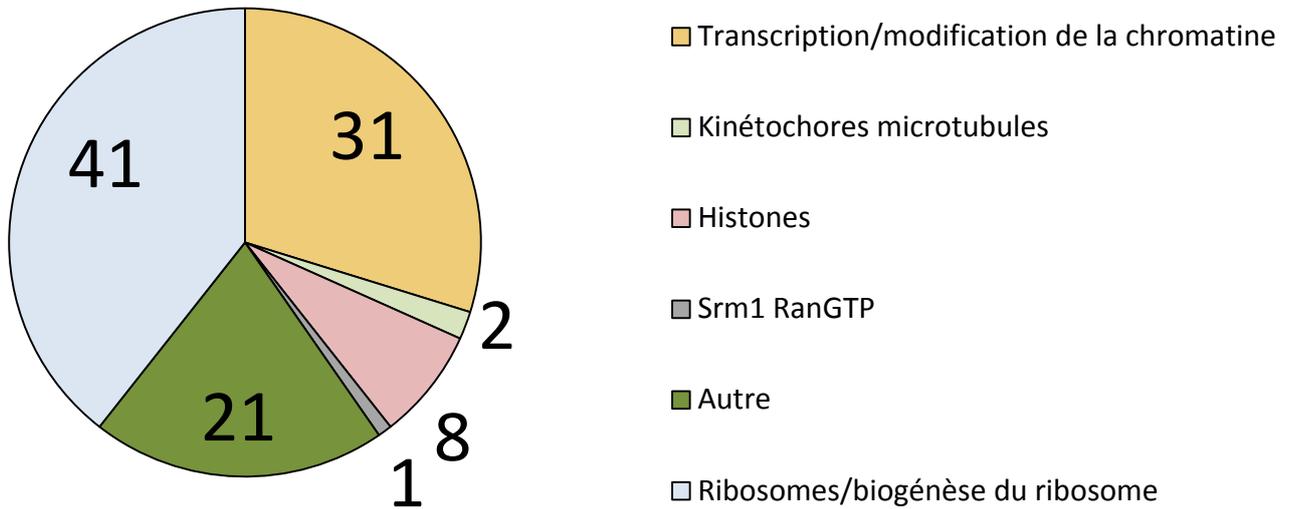
L'hypothèse que nous avons émise est que le ZMP pourrait fixer Kap123 et que cette fixation serait inhibitrice. Si tel est le cas, en absence d'AICAR, la délétion de *kap123* devrait phénotypier les effets du ZMP. Or, la délétion de *kap123* n'a pas d'effet sur la croissance en absence d'AICAR (Figure 52 0 mM). L'effet de l'AICAR sur Kap123 ne peut donc pas être une simple inhibition de cette protéine. On peut envisager plusieurs possibilités :

- Le ZMP pourrait ne pas agir seulement sur Kap123. On sait par exemple que Kap121 a une structure très proche de Kap123 et cette karyophérine pourrait potentiellement elle aussi être fixée par le ZMP.
- En se fixant à Kap123, le ZMP pourrait modifier l'affinité de Kap123 pour ses cargos, modifiant tout son interactome et le rendant ainsi essentiel pour la sensibilité à l'AICAR.

Pour tester cela, nous avons dans un premier temps délété *kap123* lui-même. On constate que sa délétion augmente la sensibilité à l'AICAR (Figure 52). Or si c'est bien Kap123 la seule cible directe du ZMP, on s'attendrait à ce que sa délétion rende les cellules plus résistantes. De même, le mutant Ts de *CRM1* est SL avec l'AICAR à température semi-permissive. Crm1 est l'exportine principale de levure, ce qui pointe une nouvelle fois sur le transport comme étant crucial dans la sensibilité à l'AICAR. La délétion de *msn5*, une exportine plus spécialisée, n'a pas d'effet sur la sensibilité à l'AICAR. D'autre part, un mutant particulier de *KAP95*, *Kap95Leu65Ser*, est SL avec l'AICAR. Sa sensibilité peut être supprimée par la surexpression d'*YRB1* (et non de *KAP123*). Enfin, dans un mutant Ts de *KAP121*, l'accumulation endogène de ZMP a un effet très prononcé sur la prolifération à températures semi-permissives.

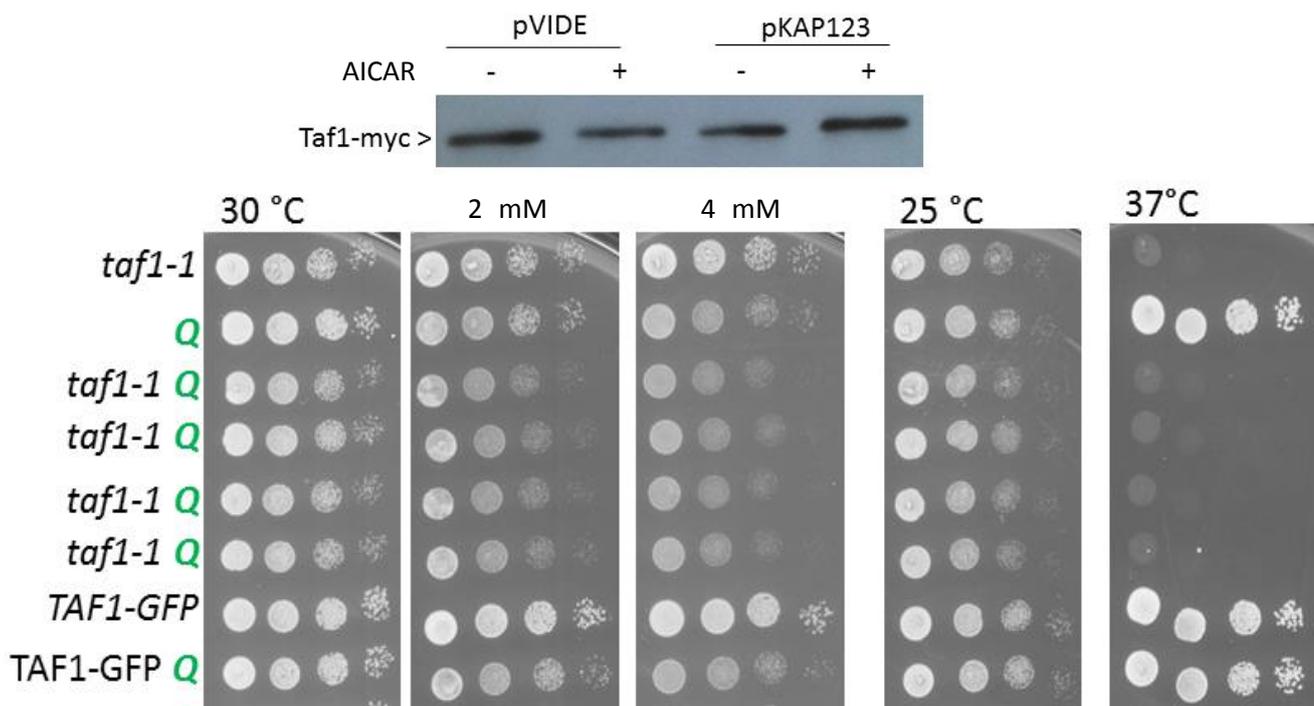
Nos conclusions par rapport à ces résultats sont les suivantes : la délétion de *KAP123* rendant les cellules plus sensibles à l'AICAR, il pourrait donc ne pas s'agir de la seule karyophérine fixée par le ZMP. De plus, on sait qu'en absence de Kap123, c'est Kap121 qui est responsable du transport de la plupart des cargos de Kap123. Or, dans un triple mutant Ts *kap121 ade16 ade17*, on retrouve un très clair effet inhibiteur de croissance à température semi-permissive. Notre hypothèse est donc que la cible du ZMP responsable de la sensibilité à l'AICAR pourrait être en réalité Kap121 et/ou Kap123. Pourquoi dans ce cas-là, est-ce la surexpression de *KAP123* et non celle de *KAP121* qui supprime les effets de l'AICAR ? Cela pourrait être dû au fait que Kap123 est la karyophérine la plus abondante avec une concentration plus de 20 fois supérieure à Kap121 [166]. Ainsi, les surexpressions de *KAP123* et de *KAP121* sous leur propre promoteur ne conduisent certainement pas aux mêmes niveaux d'expression. Si c'est l'inhibition de Kap121 par le ZMP qui est responsable de la SL avec *bre1* ou *set1*, alors le double mutant *kap121 bre1* ou *kap121 set1* devrait être SL. Effectivement, on observe que les doubles mutants présentent des défauts de croissance et ce particulièrement pour le double mutant Ts *kap121 set1*, contrairement au double *kap123 set1* (Figure 53).

Pour conclure, par des approches génétiques ou biochimiques, nous avons donc essayé d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la sensibilité à l'AICAR et tout particulièrement ceux liés à la SL avec les mutants décrits dans l'article. Le premier crible pour trouver des supprimeurs en surexpression n'a pas donné de résultats exploitables.



**Figure 50 : Protéomique réalisée sur les extraits enrichis en protéines nucléaires**

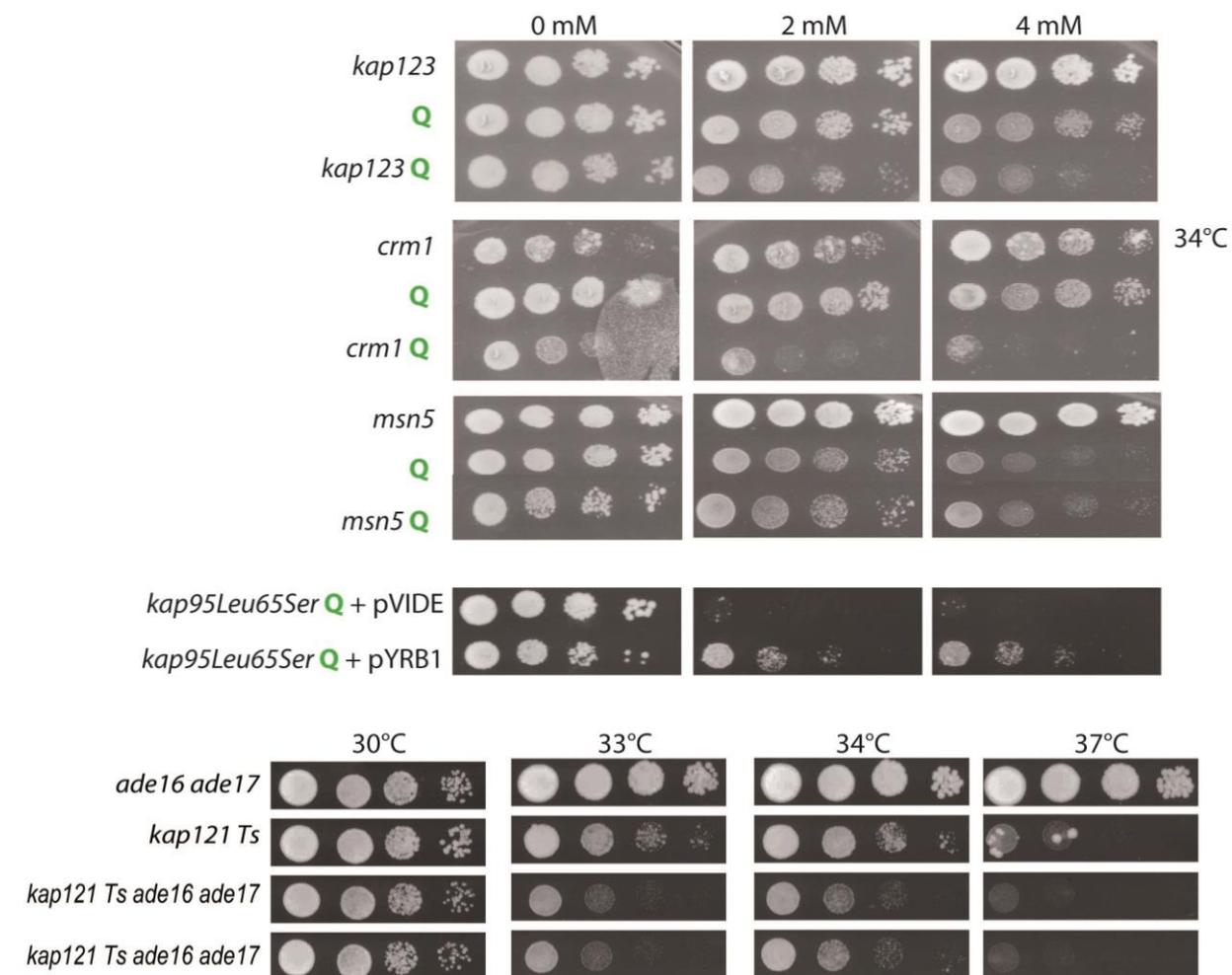
Ce graphique représente la répartition des protéines qui diminuent dans les extraits nucléaires en présence d'AICAR et ré-augmentent en présence de *KAP123*.



**Figure 51 : Taf1**

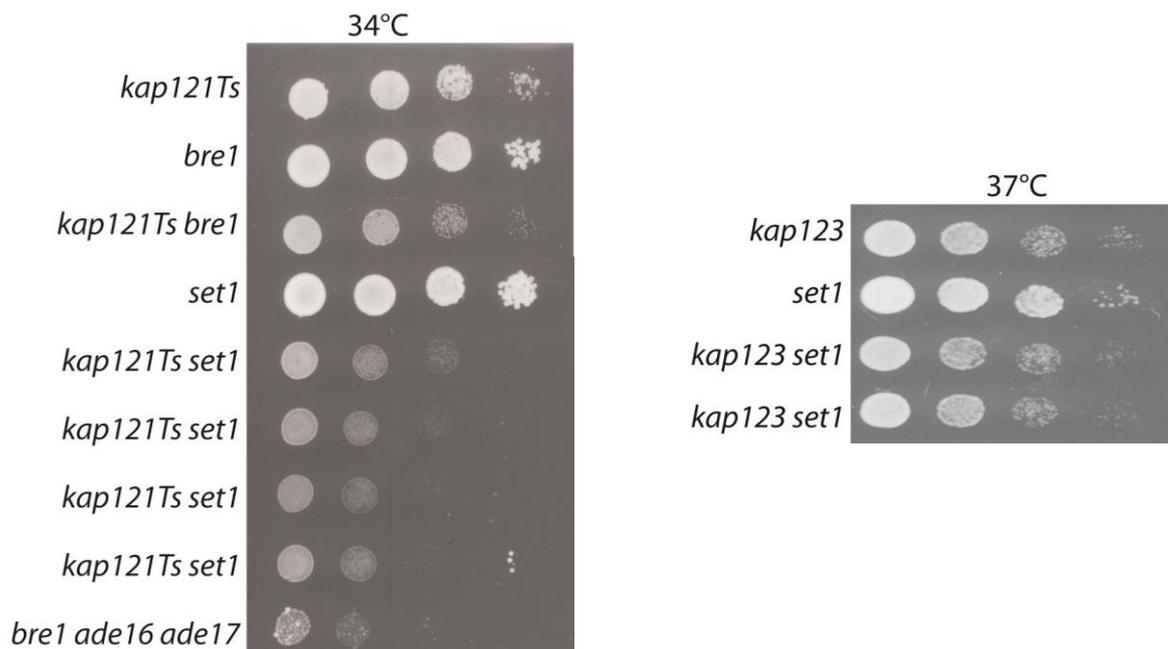
Une souche *TAF1-Myc* a été transformée avec un plasmide vide ou un plasmide de surexpression de *KAP123*. Après 2 heures de traitement ou non à l'AICAR, des échantillons ont été récupérés et extraits avec la méthode permettant l'enrichissement en protéines nucléaires. Le western blot est révélé avec un anticorps anti Myc. La quantification révèle qu'il y a une diminution de 30 % de Taf1 avec AICAR, qui n'est plus retrouvée lorsque *KAP123* est surexprimé.

Le test en goutte a été réalisé avec 0, 2 ou 4 mM d'AICAR à 30°C, mais aussi à 25 et 37°C. Quatre *taf1-1 Q* ont été testés.



**Figure 52 : Mutants de transport nucléaire**

Le test en goutte a été réalisé avec 0, 2 ou 4 mM d'AICAR pour *kap123* Q, *crm1* Q, *msn5* Q et *kap95Leu65Ser* Q. *Kap121* Ts est conjugué à des délétions d'*ade16 ade17*. *Crm1* est aussi une souche Ts et le test de croissance a été réalisé à 34°C. *Kap95Leu65Ser* a aussi été transformée avec un plasmide vide ou une surexpression d'*YRB1*.



**Figure 53 : Kap121, Kap123 et modifications d'histone**

Le test en goutte de gauche a été réalisé à 34°C. Ici, seule la dernière souche *bre1 ade16 ade17* accumule du ZMP. L'idée étant que si le ZMP a pour cible *Kap121* et qu'il l'inhibe, alors la mutation inhibitrice de *Kap121* (Ts) devrait avoir le même effet SL avec *bre1* ou *set1*. Le test en goutte à droite a été réalisé à 37°C. La délétion de *kap123* combinée à celle de *set1* n'a que peu d'effet sur la croissance.

Dans le second nous avons pu identifier un gène dont la délétion permettait de rendre résistant à l'AICAR, *dpp1*. Par contre, ce mutant s'est révélé être en aval de *set1* dans la sensibilité à l'AICAR, ne permettant pas de pointer sur une cible directe du ZMP.

L'analyse des données de la colonne d'affinité au ZMP a permis de mettre en évidence un *binder*, Kap123, dont la surexpression permet de supprimer les effets de l'AICAR et ce même dans des mutants *bre1* ou *set1*. Les résultats de protéomique, effectuée pour identifier la cible de *KAP123* dont le transport nucléaire serait affecté par l'AICAR et rétabli par la surexpression de *KAP123*, méritent d'être analysés plus en détail. En effet, nous n'avons étudié qu'un candidat potentiel, ce qui est bien évidemment trop peu. De plus, le fait d'étudier uniquement les protéines potentiellement moins importées en présence d'AICAR, puis rétablies par la surexpression de *KAP123* est certainement trop simpliste. On peut facilement envisager le cas inverse où l'AICAR pourrait inhiber l'export de certaines protéines et Kap123 pourrait par exemple augmenter l'import de protéines induisant la sortie de ces protéines du noyau. De plus, seules les protéines les plus abondantes sont détectées dans cette analyse, ce qui biaise son interprétation. En effet, aucun des acteurs majeurs de la progression de G1 n'a été détecté (Cln1, Cln2, Cln3, Whi5, Swi4, Swi6, Mbp1...).

Enfin, la délétion de certains acteurs majeurs du transport nucléaires pourrait apporter certains éléments de réponse. La délétion de *KAP123* rend les cellules plus sensibles à l'AICAR, ce qui laisse supposer qu'il ne peut pas s'agir de la cible unique du ZMP. De plus, la perte partielle de fonction de Kap121 induit une très forte sensibilité à l'AICAR, laissant supposer que cette karyophérine pourrait être aussi une cible du ZMP. Dans cette idée, nous avons construit des doubles mutants Ts *kap121 bre1* ou Ts *kap121 set1*. On constate que le Ts *kap121* phénocopie les effets de l'AICAR vis-à-vis de *bre1* ou *set1*. L'hypothèse que nous émettons est que le ZMP pourrait fixer Kap123, mais aussi Kap121, et que c'est cet effet combiné qui pourrait être à la base de la sensibilité à l'AICAR. Il serait certainement intéressant de creuser cette idée par la suite.

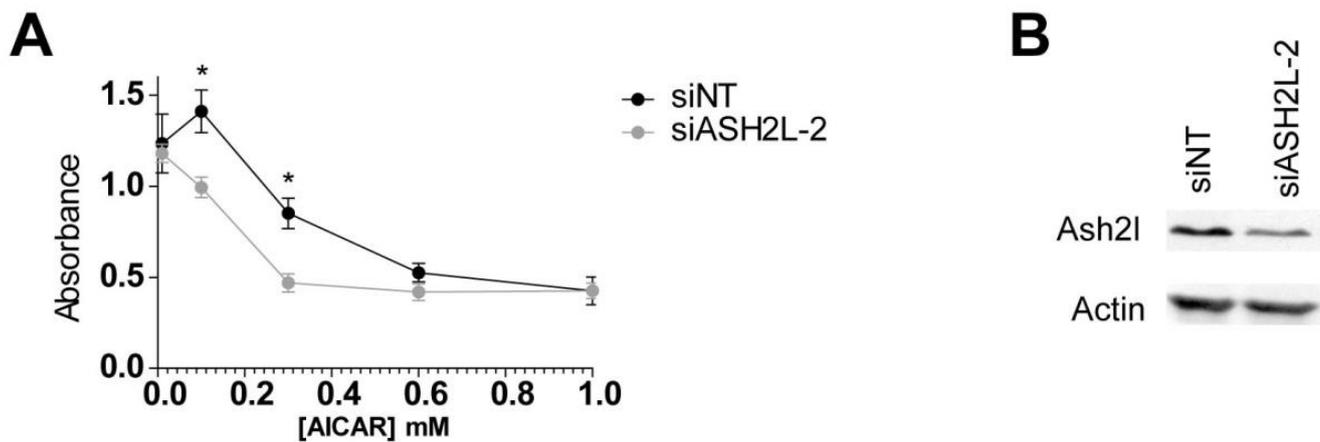
Lors de cette thèse, nous avons donc identifié une interaction SL entre l'AICAR et les mutants de la voie *bre1/H2Bub/COMPASS/H3K4*. Dans l'article, nous avons pu montrer que cette interaction synthétique était conservée. Cet aspect est développé dans la dernière partie de ces résultats.

## 7. AICAR et PTM dans les cellules humaines HCT116

La recherche de SL est souvent utilisée dans une perspective thérapeutique. Comme nous l'avons vu au début des résultats, elle a pour avantage de mettre en évidence des interactions qui peuvent être ciblées afin de tuer spécifiquement les cellules malades tout en épargnant les cellules saines. Pour cette raison, nous avons naturellement souhaité savoir si les interactions SL entre AICAR et *bre1/set1* étaient conservées chez l'Homme.

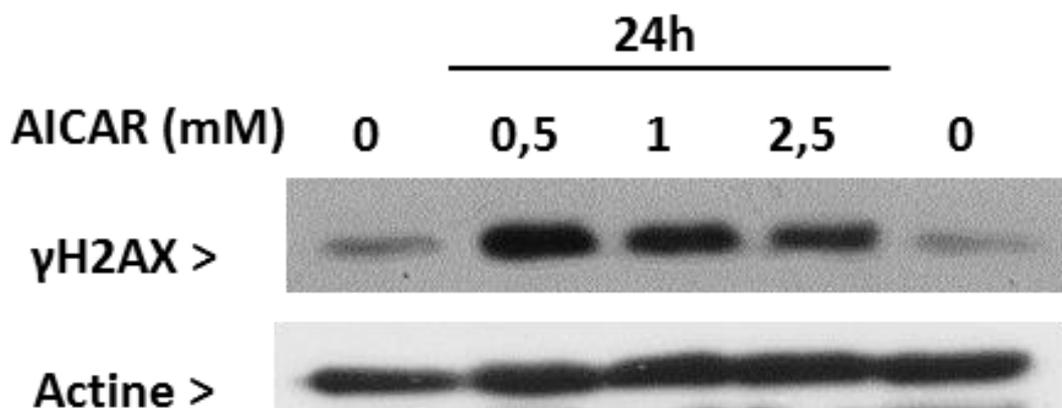
### a) HCT116 et modifications d'histones

Nous avons choisi de tester la conservation de ces interactions dans des cellules HCT116, qui est une lignée tumorale humaine de colon. Il s'agit d'un modèle très couramment utilisé et qui a plusieurs avantages/caractéristiques :



**Figure 54 : Deuxième siARN anti ASH2L**

(A) Après 72 heures de traitement à l'AICAR, une analyse de la viabilité a été réalisée. Les courbes ne sont pas normalisées. Il s'agit directement de l'absorbance du WST1 mesurée. (B) Un western blot a été réalisé afin de vérifier l'efficacité du siARN sur l'expression de la protéine Ash2l.



**Figure 55 : AICAR et gamma-H2AX**

Lors de l'apparition de cassures double brin, l'histone H2AX va être phosphorylée durant le processus de réparation des cassures. L'histone H2AX phosphorylée est appelé gamma-H2AX ( $\gamma$ H2AX). Résultats obtenus par Stéphane Puyo au laboratoire.

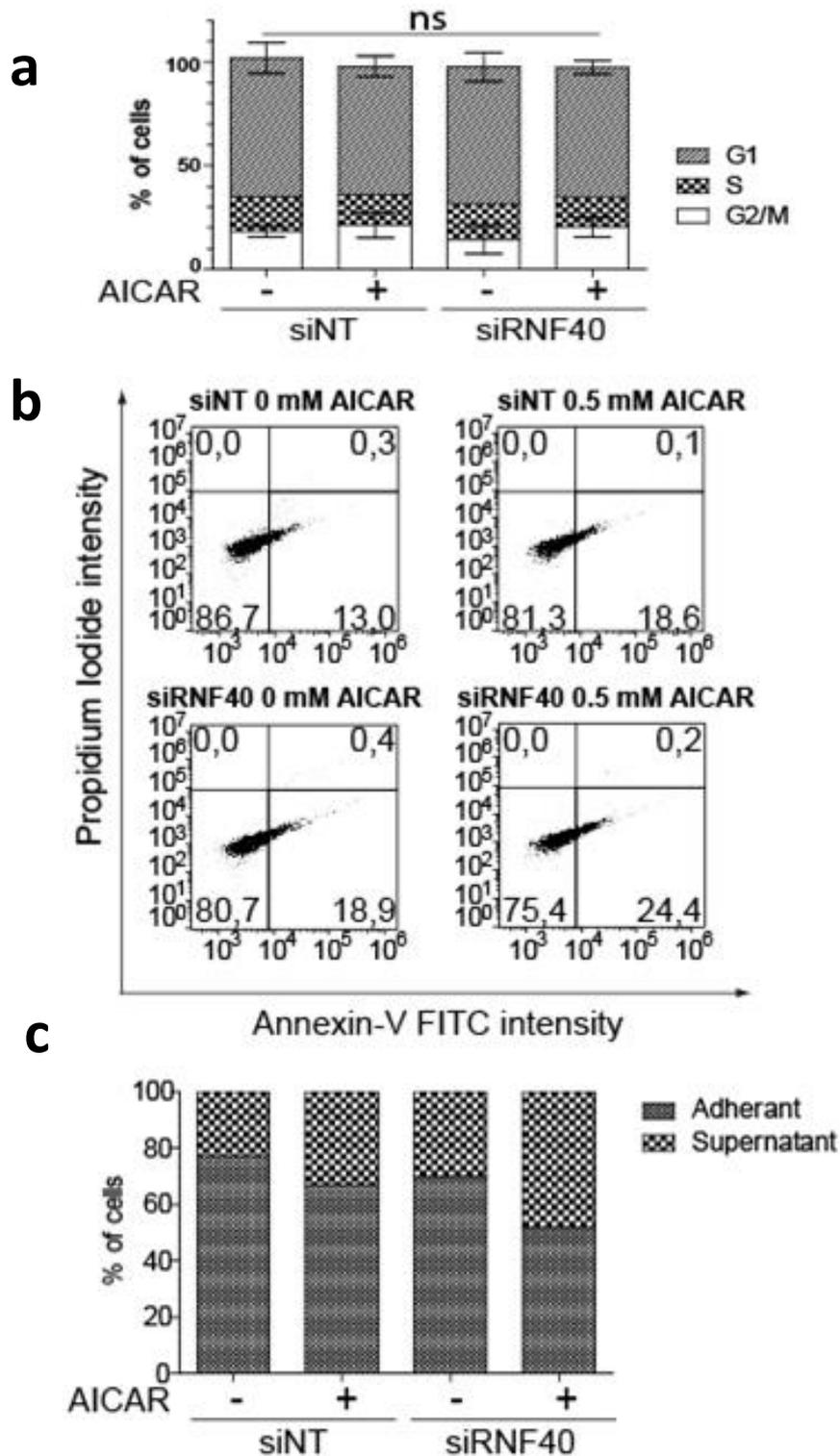
- Ce modèle est très bien caractérisé.
- Ces cellules sont facilement cultivables avec un temps de génération court.
- Ces cellules sont adhérentes.
- Les HCT116 ne sont pas mutées dans les gènes p53 ou p21, contrairement à beaucoup de lignées tumorales.
- Ces cellules sont utilisées au laboratoire en routine, leur sensibilité à l'AICAR est donc bien caractérisée, ainsi que les effets métaboliques de l'AICAR sur ces cellules.

Dans l'article, il apparaît que des siARN dirigés contre *RNF40*, *ASH2L* ou *MLL2* augmentent la sensibilité à l'AICAR.

Nous avons réalisé un deuxième siARN anti *ASH2L* afin de vérifier la spécificité du siARN. Tout comme dans l'article, la concentration de siARN a été ajustée afin d'avoir le plus d'effet possible sur l'abondance de la protéine, tout en n'ayant aucun effet sur la prolifération sans AICAR. Dans la figure 54, les résultats qui sont représentés ne sont pas normalisés. L'interprétation des résultats est ainsi plus simple, puisqu'ici on s'intéresse uniquement aux effets synergiques (AICAR et *siASH2L*). On constate que les résultats obtenus pour ce deuxième siARN sont les mêmes que dans l'article.

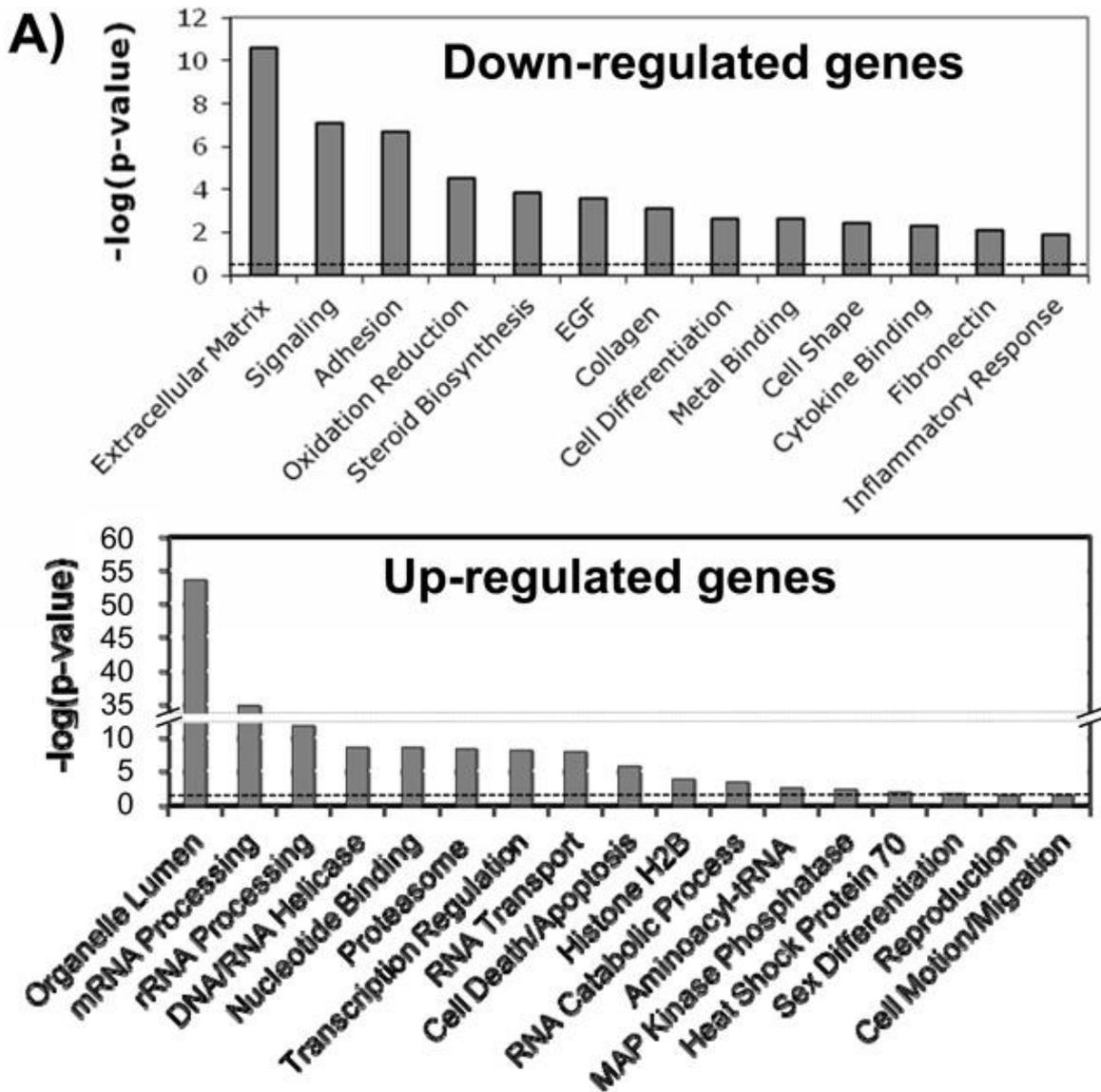
Ensuite, nous avons souhaité savoir si l'augmentation des effets antiprolifératifs de l'AICAR dans les cellules *knock down* pour *RNF40*, *ASH2L* ou *MLL2* étaient liées aux mêmes causes que celles mises en évidence chez la levure. On montre dans l'article que pour les cellules traitées avec un siARN contrôle, le traitement à l'AICAR n'a que peu d'effet sur l'abondance de la cycline D1 (équivalent fonctionnel de *Cln3*), mais provoque une diminution de la cycline E1 (équivalent fonctionnel de *Cln2*), ce qui est assez proche des résultats obtenus chez la levure. Par contre, l'AICAR engendre au contraire une augmentation de la cycline E1 dans les cellules traitées au *siRNF40*, *siASH2L* ou *siMLL2*. Le mécanisme de SL entre ces *silencings* et l'AICAR semble donc être différent de la levure. Comment expliquer ces différences ?

Un régulateur majeur du cycle cellulaire humain qui n'est pas présent que chez la levure est p53. Or, il a été montré qu'un traitement à l'AICAR conduisait à une stabilisation de p53 [167, 168]. On peut donc facilement envisager que cet acteur clé pourrait avoir un impact sur la réponse à l'AICAR qui soit à la base des différences observées. En effet, comme nous l'expliquons dans l'article, dans toutes les conditions testées (*siNT*, *siRNF40*, *siASH2L*, *siMLL2*), l'AICAR provoque une augmentation de p53, ainsi que de son effecteurs p21. Ces acteurs sont activés principalement lorsque des dommages à l'ADN apparaissent ou que l'AMPK est activée. Dans ces cas, p53 est stabilisée, ce qui active p21, qui va venir se fixer à la cycline E1-Cdk2, inhibant la *feedback loop* sur la phosphorylation de Rb (c.f introduction) et engendrant une diminution de l'expression de la cycline E1 et de *CDK2*. Ici, on ne peut pas savoir si l'activation de p53 est due à la formation de dommages à l'ADN ou à l'activation de l'AMPK par l'AICAR ou des deux. En effet, l'AICAR est connu et utilisé depuis les années 1990 comme activateur de l'AMPK, mais on sait aussi que l'ajout d'AICAR sur des cellules HCT116 provoque une augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX, associée aux cassures doubles brins (Figure 55). Dans tous les cas, cette stabilisation de p53 est censée engendrer une diminution de l'expression de la cycline E1, chose que l'on retrouve bien dans le contrôle, mais pas dans les *siRNF40*, *siASH2L* ou *siMLL2*. On peut donc imaginer que potentiellement, les cellules où *Rnf40*, *Ash2L* ou *Mll2* sont diminuées ne répondent plus correctement au *checkpoint* p53 et c'est cette absence de réponse qui pourrait être à la base de la sensibilité accrue à l'AICAR de ces cellules.



**Figure 56 : Cycle cellulaire, apoptose et décollement**

(a) Les cellules ont été traitées avec le siNT (*non targeting*) ou siRNF40. Puis, après 72 heures de traitement à l'AICAR, les cellules adhérentes ont été récupérées et analysées en cytométrie en flux. Leur contenu en ADN est déterminé grâce à un marquage à l'iodure de propidium. L'histogramme représente la quantification de deux expériences indépendantes. (b) A nouveau, les cellules ont été traitées au siNT ou siRNF40 et après 72 heures de traitement à l'AICAR, les cellules adhérentes ont été analysées. Les cellules dans le carré en bas à gauche sont des cellules non apoptotiques, dans le carré en bas à droite elles sont en pré-apoptose et enfin dans le carré en haut à droite elles sont considérées comme étant en apoptose. (c) Le nombre de cellules présentes dans le surnageant (*Supernatant*) ou adhérentes (*Adherent*) a été mesuré après 72 heures de traitement à l'AICAR (0,5 mM) avec ou sans siRNF40. L'expérience n'a été réalisée qu'une fois.



**Figure 57 : Transcriptomique sur des cellules murines traitées au sh*RNF40* versus shNT**

Les résultats sont tirés de l'étude de Chernikova *et al.* 2012 [42]. Ils ont étudié l'effet d'un sh*RNF20* ou *RNF40* sur la transcription des gènes. Le résultat est représenté sous la forme des gènes qui sont moins transcrits en haut (*down-regulated genes*) ou plus transcrits en bas (*up-regulated genes*). Il s'agit des gènes retrouvés comme ayant des changements de leur niveau de transcription lors d'un sh*RNF20* ou *RNF40* comparé à un shRNA contrôle.

Nous nous sommes ensuite demandés quels étaient les effets de l'AICAR sur l'avancée dans le cycle cellulaire en cas de traitement au *siRNF40*. Globalement, on constate que l'AICAR n'a pas d'effet majeur sur l'avancée du cycle cellulaire que ce soit avec ou sans le *knock down* de *RNF40* (Figure 56a). De même, il n'y a globalement que peu d'effet sur l'induction de l'apoptose dans ces quatre conditions (Figure 56b). Comment expliquer alors les effets antiprolifératifs de l'AICAR (puisqu'ils ne semblent ni être dus à un effet sur le cycle, ni à l'induction de l'apoptose) et ceux particulièrement dans la condition avec le *siRNF40* ? Lors de ces expériences nous avons constaté visuellement de façon très flagrante, qu'il y avait un nombre de cellules dans le surnageant qui était beaucoup plus important dans la condition *siRNF40* + AICAR, que dans toutes les autres conditions et les comptages que nous avons réalisés vont largement dans ce sens (Figure 56c). On peut donc envisager qu'en condition de *siRNF40*, l'AICAR provoquerait un décollement massif des cellules, à la base de son effet sur la viabilité. De plus, des données de transcriptomique avec des shARN dirigés contre *RNF20* ou *RNF40* révèlent que de nombreux gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire ou de l'adhésion sont justement fortement sous exprimés dans ces conditions ([42] Figure 57). Ainsi, le point faible des cellules *siRNF40* pourrait être leur prédisposition à se décoller. On peut envisager que l'AICAR pourrait justement induire ce décollement, peut être *via* p53.

L'autre aspect intéressant que nous soulignons dans cet article est le lien entre modifications épigénétiques et cycle cellulaire. En effet, concernant la partie levure, en accord avec d'autres études publiées [169, 170], nous avons montré que la perte de H2Bub ou H3K4me conduisait à une forte diminution de l'expression des cyclines 1 et 2. Ici, le *knock-down* de *RNF40*, *AHS2L* ou *MLL2* induit une diminution de l'expression de la cycline E1 qui est l'équivalent le plus proche des cyclines 1 et 2 de levure. Bien que ces résultats soient très préliminaires, ils indiquent une potentielle conservation de la régulation de certaines cyclines de G1 par des modifications épigénétiques. Cet axe serait bien évidemment très intéressant à creuser par la suite. Des expériences en ce sens sont proposées dans la discussion.

## b) Conclusion

Ainsi, nous avons montré une conservation de l'effet synthétique entre l'AICAR et le *knock-down* de certaines enzymes de modifications d'histone chez la levure et chez l'Homme dans les cellules HCT116. Par contre, le mécanisme sous-jacent ne semble pas pouvoir être parfaitement superposable. Néanmoins, nous ne pensons pas que l'approche soit à remettre en question pour autant. En effet, de nombreux exemples de conservation fonctionnelle existent sans que le mécanisme à la base de ces effets soit parfaitement conservé. Par exemple, le ZMP régule les voies de biosynthèse des purines chez la levure, mais aussi chez la bactérie. Pourtant, chez la levure cette régulation a lieu à travers l'interaction directe du ZMP à certains facteurs de transcription, alors que chez la bactérie cela passe par la liaison du ZMP aux ARNs codants les enzymes de la voie (c.f introduction). Il s'agit là d'un exemple typique où la fonction régulatrice du ZMP a été conservée sans que son mécanisme d'action ne le soit.

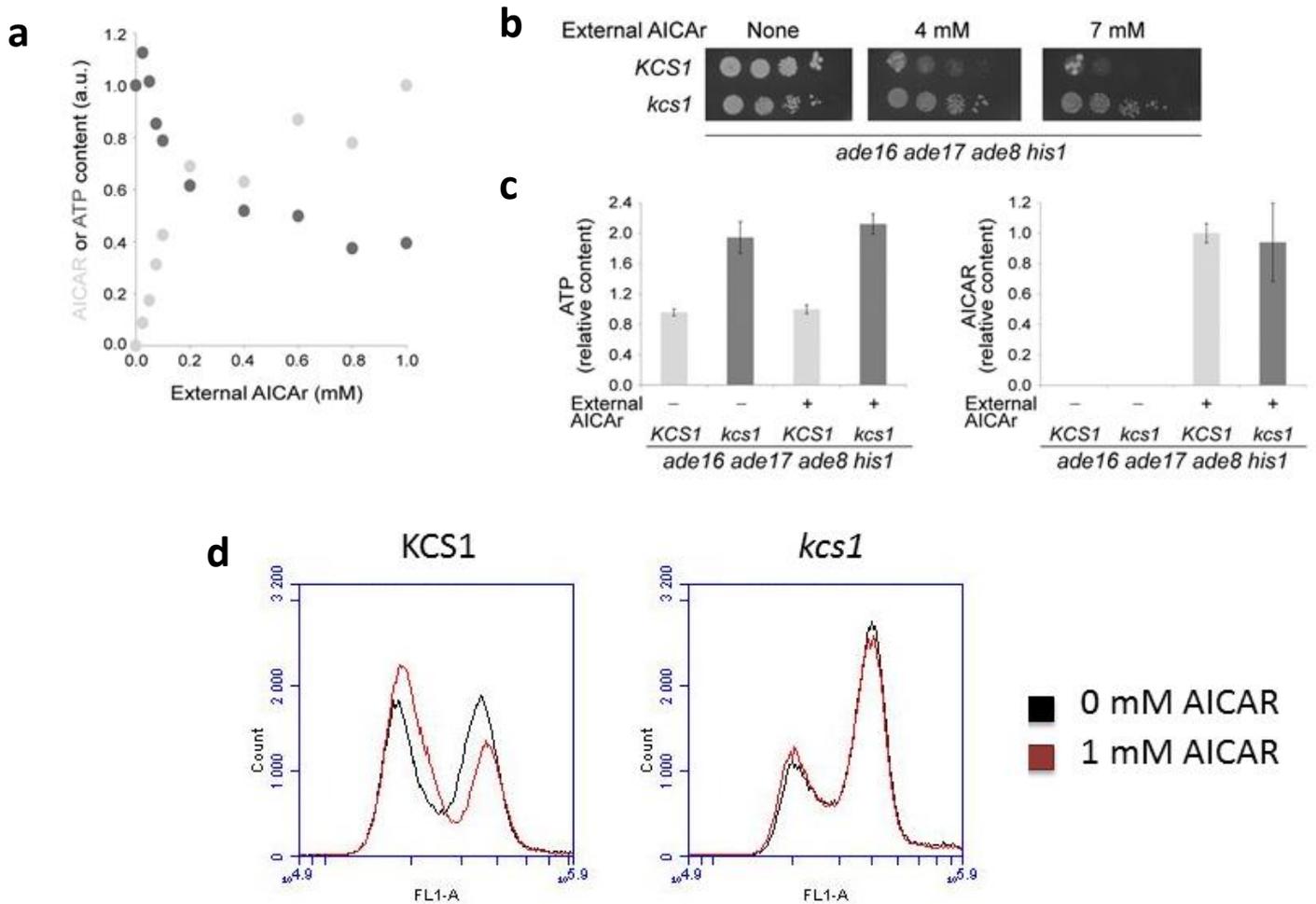
Les résultats qui me semblent les plus intéressants ou étonnants sont repris dans la discussion.

# VI. Discussion

## 1. ZMP et cycle cellulaire

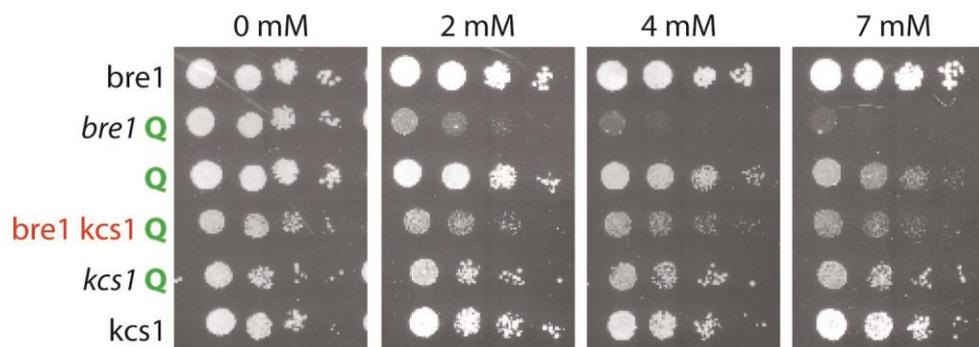
Dans cette étude, nous avons vu que l'AICAR affecte le cycle cellulaire en induisant une accumulation de cellules en G1. La question que l'on peut se poser est : est-ce que cet effet est lié au contrôle nutritionnel ? Généralement, la régulation de l'entrée en G1 par les nutriments se fait en régulant l'expression de *CLN3* (c.f introduction). Lorsque les conditions environnementales ne sont pas adéquates, la cellule va inhiber l'expression de *CLN3* en inhibant sa transcription, en dégradant son ARNm ou en dégradant Cln3. Ici, l'AICAR n'affecte ni la quantité de transcrits de *CLN3* ni l'abondance de la protéine Cln3, mais l'entrée de Cln3 dans le noyau. Il pourrait potentiellement s'agir d'un nouveau mode de régulation encore peu connu.

Le contrôle nutritionnel est lié à la régulation de la taille. En effet, en condition où l'on a une abondance de nutriments et une souche sauvage, la cellule ne va passer le START qu'après avoir atteint une taille critique. Cette régulation-ci pourrait impliquer directement le contrôle de la régulation subcellulaire de Cln3. En effet, comme nous l'avons vu, l'abondance d'Ydj1 et Ssa1 contrôle l'entrée de Cln3 dans le noyau [100]. Or, leur expression varie très peu au cours du cycle [98]. Ainsi on peut envisager un modèle dans lequel, en début de G1, la cellule contient une certaine quantité d'Ydj1 et Ssa1. Au cours du temps, cette quantité va augmenter jusqu'à atteindre un niveau suffisant pour permettre l'entrée de Cln3 du RE vers le noyau. On peut imaginer que, dans des conditions de croissance normales, ce soit l'abondance de Ssa1 et Ydj1 qui contrôle passivement le passage du START qu'une fois la cellule ayant passé suffisamment de temps en G1. Dans ce modèle, l'abondance des chaperonnes est importante, mais aussi leur disponibilité. En début de G1, la cellule va produire de la biomasse pour atteindre sa taille critique, cela nécessite la production de protéines qui doivent être correctement repliées, processus dans lequel interviennent Ydj1 et Ssa1. Ainsi, ce n'est qu'une fois une biomasse suffisante atteinte, Ydj1/Ssa1 devenus assez abondants et disponibles, que Cln3 va entrer dans le noyau. En tant que chaperonnes, Ydj1 et Ssa1 sont des protéines qui vont consommer beaucoup d'ATP à chacun de leur cycle de liaison aux protéines pas encore ou mal repliées [171] et l'on sait que l'hydrolyse d'ATP est l'étape limitante dans ces processus [172]. Or, un traitement à l'AICAR induit une très forte diminution d'ATP [173]. De ce fait, on peut envisager que la baisse d'ATP induite par l'AICAR pourrait être à la base du ralentissement de la G1, en rendant ce métabolite limitant pour les chaperonnes. Cette hypothèse est en bonne adéquation avec les résultats obtenus avec le mutant *kcs1*. Ce mutant accumule de forte concentration d'ATP, même en présence d'AICAR, et est résistant à l'AICAR ([173] Figure 58). Est-ce lié au cycle ? Il s'avère que dans le mutants *kcs1*, l'AICAR n'a plus d'effet sur le cycle cellulaire (Figure 58), ce qui est en accord avec le modèle proposé : l'AICAR, en affectant la concentration d'ATP, impacterait sur la disponibilité en chaperonnes Ssa1/Ydj1 et ainsi ralentirait le passage du START sans affecter l'abondance de Cln3. Néanmoins, ce modèle reste uniquement corrélatif. Est-ce vraiment la concentration élevée d'ATP du mutant *kcs1* qui est à la base de la résistance à l'AICAR ? Ou est-ce dû à d'autres conséquences de cette mutation sur la cellule ? L'idéal serait de pouvoir faire diminuer la concentration en ATP de cette souche pour tester si cela rétablit un niveau de sensibilité à l'AICAR sauvage ou non. Nos essais pour diminuer l'ATP dans cette souche n'ont pas été fructueux.



**Figure 58 : *kcs1* et cycle cellulaire**

(a) Plus la concentration d'AICAR ajoutée au milieu extérieure augmente, plus la concentration intracellulaire de ZMP augmente, plus la concentration intracellulaire d'ATP diminue. (b) Le test en goutte a été réalisé avec 0, 4 ou 7 mM d'AICAR. On constate que le mutant *kcs1* est résistant à l'AICAR. (c) La concentration intracellulaire en ATP du mutant *kcs1* est 2 fois plus élevée que celle du sauvage, et reste constante même en présence d'AICAR. (d) Analyses de FACS réalisées sur un sauvage (*KCS1*) et un mutant *kcs1*, tous les deux *ade16 ade17 ade8 his1*, après 2 heures de traitement (rouge) ou non (noir) à l'AICAR.



**Figure 59 : Sextuple *bre1 kcs1* et AICAR**

Le test en goutte a été réalisé avec 0, 2, 4 ou 7 mM d'AICAR. En orange, la sextuple mutant *kcs1 bre1 ade16 ade17 ade8 his1* est représenté.

Ainsi, les résultats obtenus avec la chromatographie d'affinité au ZMP sont à analyser avec précautions. Est-ce le ZMP qui lie des cibles qui sont directement impliquées dans le contrôle de l'entrée en G1 ? ou est-ce que le ZMP lie des cibles qui sont impliquées dans la diminution d'ATP et que du coup ce n'est non pas le ZMP directement, mais son effet sur l'ATP qui engendre un ralentissement en G1? Il serait peut-être trop simpliste de penser que tous les effets de l'AICAR peuvent se résumer à un seul mécanisme. Pour cause, le modèle dans lequel c'est l'ATP qui serait seul à la base de tous les effets de l'AICAR sur la G1 est séduisant, mais vraisemblablement faux. En effet, si tel était le cas, une souche *kcs1 bre1* devrait, tout comme la souche *kcs1*, être résistante à l'AICAR. Or, comme on peut le voir sur la figure 59, le sextuple mutant *kcs1 bre1 ade16 ade17 ade8 his1* a un phénotype intermédiaire. Cela signifie que *kcs1* ne supprime pas tous les effets de l'AICAR et en particulier pas tous ceux liés aux effets SL avec *bre1*.

Un candidat intéressant qui pourrait être ciblé par le ZMP est Kap123. En effet, il a été identifié grâce à la chromatographie d'affinité et sa surexpression permet de supprimer certains effets de l'AICAR sur la croissance dans la souche sauvage, mais aussi dans les mutants *bre1* ou *set1*. Les effets du ZMP ne peuvent pas se résumer à une inhibition simple de Kap123, puisque la délétion complète de *KAP123*, qui devrait dans ce cas mimer les effets de l'AICAR, n'a aucun effet sur la croissance. On peut donc envisager que soit le ZMP affecte Kap123 et lui confère un effet dominant négatif (DN) soit que Kap123 n'est pas la seule cible du ZMP. La délétion de *KAP123* rendant les cellules plus sensibles à l'AICAR, l'hypothèse selon laquelle le ZMP conférerait un effet DN sur Kap123 est à éliminer. Ce résultat suggère, par contre, que c'est bien au niveau d'une fonction portée entre autre par Kap123 que l'effet a lieu. Or, Kap123 possède beaucoup de fonctions redondantes avec Kap121, dont la structure est très similaire. Contrairement à Kap123, Kap121 est un gène essentiel. Le mutant thermosensible de Kap121 est hypersensible à l'AICAR. Ainsi, on peut envisager deux hypothèses : soit le ZMP a pour cible Kap123 et Kap121 et c'est la combinaison de leur inhibition qui conduit aux effets de l'AICAR sur la croissance, soit le ZMP pourrait avoir pour cible uniquement Kap121 *in vivo*. Comment expliquer que seul Kap123 est retrouvé sur la colonne ? Cela pourrait être dû au fait que Kap123 est beaucoup plus abondant que Kap121 *in vivo*. Ce n'est pas parce qu'une protéine n'est pas retrouvée sur la colonne, qu'elle n'est pas fixée, puisque cela dépend de leur abondance et de leur affinité relative au ZMP. Il faut donc interpréter les résultats obtenus avec précautions, ce n'est pas parce qu'une protéine est retrouvée sur la colonne que cela signifie que la liaison a lieu *in vivo* ni que la liaison est directe puisque ce sont des extraits totaux qui sont passés sur la colonne. Quoi qu'il en soit, si l'effet majeur du ZMP est l'inhibition de Kap121, un mutant Ts *kap121* devrait, à température semi permissive, mimer les effets de l'AICAR. Ainsi, puisque *set1* et *bre1* sont SL avec l'AICAR, le double mutant Ts *kap121 bre1* ou *kap121 set1* devrait présenter de forts défauts de croissance à température semi-permissive, ce qui est effectivement le cas. On en conclut que Kap121, et peut être Kap123, est une candidate très prometteuse en tant que cible du ZMP.

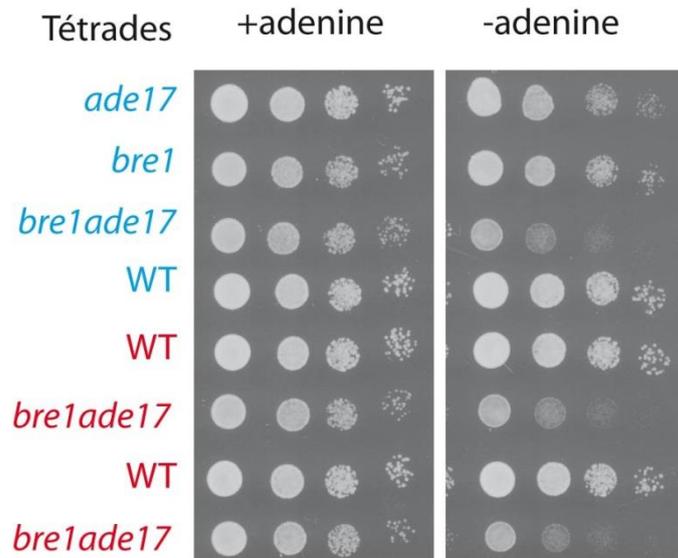
Il apparaît globalement que les fonctions portées par Kap123 sont limitantes pour la croissance en présence d'AICAR. Les fonctions principales de cette protéine sont le transport de cargos du cytoplasme vers le noyau. Au cours de ma thèse, nous ne sommes pas parvenus à identifier formellement le(s) cargo(s) dont le défaut de transport est à la base des défauts de croissance induits par l'AICAR. Les résultats obtenus avec la surexpression de *KAP123* dans les doubles mutants de cyclines (Figure 47) suggèrent que ni le transport de Cln3 ni celui de Cln1 ne semblent être liés à la suppression des effets de l'AICAR sur la croissance par la surexpression *KAP123*. Par contre, Cln2

pourrait être un candidat intéressant. Pour tester cela, de l'immunofluorescence sur Cln2 en sur exprimant ou non *KAP123* avec ou sans AICAR permettrait de répondre à la question posée.

Globalement, l'AICAR semble avoir des effets multiples qui rendent son analyse complexe. Une question essentielle qui persiste est de savoir si les effets que nous observons de l'AICAR, et donc potentiellement du ZMP, en tant que régulateur du cycle cellulaire à forte concentration pourraient être aussi retrouvés à concentration physiologique. En effet, le ZMP est présent naturellement dans presque tous les organismes. Comme nous l'avons vu, on lui connaît un rôle à concentration physiologique en tant que régulateur des voies de biosynthèse des purines [3, 10]. Il semble possible qu'il puisse aussi avoir d'autres rôles au sein de la cellule. Pour tester ce genre d'hypothèse, on pourrait dans un premier temps envisager de faire varier les concentrations de ZMP physiologiquement en changeant uniquement la concentration du milieu en adénine. En effet, lorsqu'il y a de l'adénine dans le milieu, la concentration de ZMP est de 1.6  $\mu\text{M}$ , alors qu'elle passe à 21.8  $\mu\text{M}$  en absence d'adénine. Puisque les effets du ZMP sont SL avec *bre1* (S1 Fig1 article), nous avons choisi de tester les effets de variations physiologiques de ZMP dans ce mutant (afin d'exacerber potentiellement les effets sur la prolifération). Comme on peut le voir sur la figure 60, la présence ou l'absence d'adénine n'a aucun effet sur la croissance de la souche sauvage (WT) ou *bre1*. Par contre, si on ajoute la délétion d'*ade17* qui ne permet plus qu'une métabolisation partielle du ZMP, on observe un défaut de croissance important de la souche *bre1 ade17* présent uniquement sans adénine. Dans ces conditions, on est plus proche des concentrations physiologiques de ZMP (environ 300  $\mu\text{M}$  de [ZMP] intracellulaire en moins adénine dans la souche *ade17* (soit 13 fois plus que dans une souche sauvage en moins adénine), contre des concentrations aux alentours de 6000  $\mu\text{M}$  de ZMP dans les expériences réalisées dans l'article (soit 273 fois plus que dans la souche sauvage en moins adénine)), mais on reste à des concentrations toujours très élevées. Je ne pense pas que l'on puisse conclure avec ces expériences si oui ou non le ZMP a un rôle à concentration physiologique sur la régulation du cycle cellulaire. En effet, pour ce genre d'analyse, le test en goutte n'est peut-être pas l'outil idéal puisqu'il permet de visualiser uniquement des effets drastiques conduisant à des défauts de croissance. On pourrait envisager d'utiliser un rapporteur plus spécifique. Dans l'article, nous avons utilisé des fusions *CLN1* et *CLN2*-beta-galactosidase et constaté que l'ajout d'AICAR avait un effet sur leur expression. On peut imaginer utiliser ces outils, pour comparer le niveau d'expression des cyclines de G1 en plus ou moins adénine, par exemple.

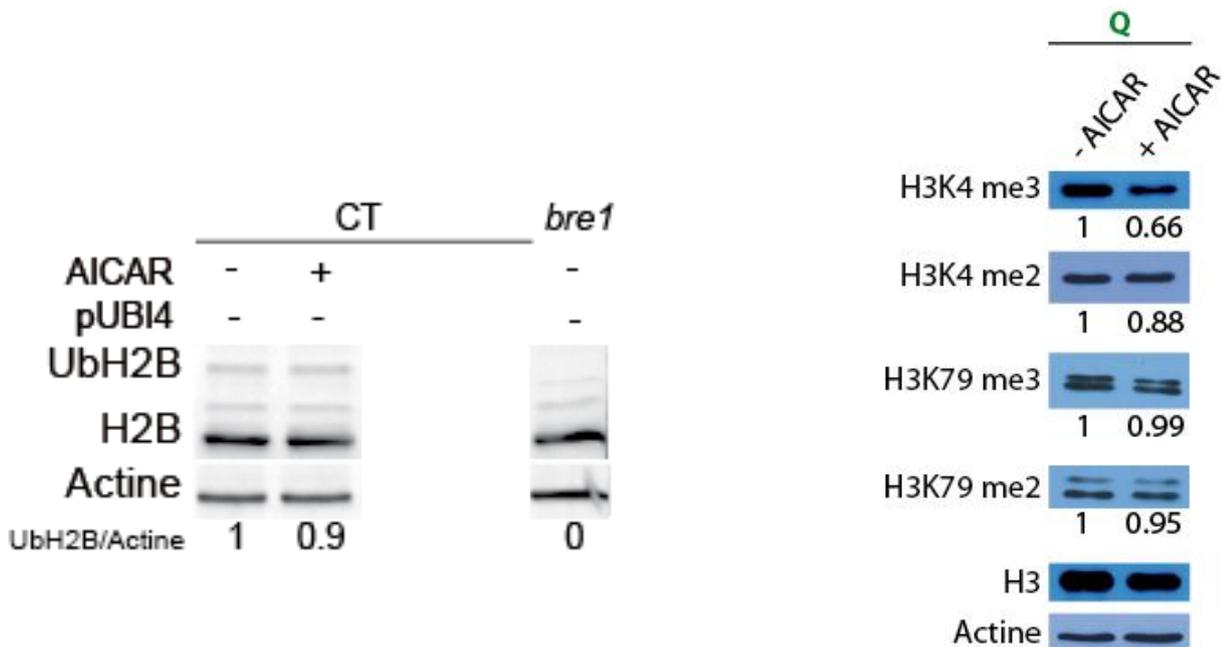
## 2. ZMP, modification d'histones et cycle cellulaire

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence un lien étroit entre l'AICAR et certaines modifications d'histones. En effet, la perte d'ubiquitination d'H2B ou de méthylation de H3K4 est SL avec l'AICAR. Donc la perte de certaines PTMs influe sur la sensibilité à l'AICAR. La question qu'on peut se poser est si cette relation est réciproque, c'est-à-dire est-ce que l'AICAR influe sur ces PTM ? On constate sur la figure 61 que l'AICAR n'a pas d'effet sur l'ubiquitination d'H2B. De même, l'AICAR n'a pas d'effet sur la diméthylation de H3K79 ou H3K4 ni sur la triméthylation de H3K79. Par contre, une baisse de 30 % de la triméthylation de H3K4 est observée après un traitement à l'AICAR. Cela signifie, qu'en plus d'avoir une interaction synthétique avec une perte de triméthylation de H3K4 (c'est le cas du mutant *bre2*), dans une souche sauvage, l'AICAR pourrait lui-même avoir des effets similaires. La question que l'on se pose est bien évidemment de connaître les conséquences de cette diminution de méthylation sur la transcription et notamment si cette diminution contribue aux effets



**Figure 60 : Variation de la concentration de ZMP avec l'adénine**

Des spores issues de deux tétrades ont été utilisées pour ce test en goutte. Ainsi, des combinaisons de mutants *bre1*, *ade17* ou *bre1 ade17* sont testées et comparées aux spores sauvages. A gauche, le milieu est supplémenté en adénine (comme habituellement), à droite il ne l'est pas.



**Figure 61 : H2Bub, H3K4me, H3K79me et AICAR**

Dans le western blot à gauche, un quadruple mutant *ade16 ade17 ade8 his1* a été traité ou non à l'AICAR pendant 2 heures. L'hybridation se fait avec un anticorps anti H2B qui reconnaît l'histone H2B, mais aussi sa forme monoubiquitinée (H2Bub). En contrôle, un extrait de souche *bre1* a été déposé afin d'identifier la bande correspondant à H2Bub. A droite, le quadruple mutant a été traité ou non à l'AICAR pendant 12 heures.

observés de l'AICAR la transcription de *CLN1* ou *CLN2*. Ainsi, en plus d'inhiber la transcription de *CLN1* et *CLN2* en affectant le transport de Cln3 vers le noyau, l'AICAR pourrait aussi affecter la transcription de *CLN1* et *CLN2* en affectant leur statut de méthylation, puisque comme nous l'avons montré dans l'article, la perte de di- et triméthylation de H3K4 (mutant *htbK123R*) entraîne une forte diminution de la transcription de *CLN1* et *CLN2*. Une des questions qui reste en suspens est d'ailleurs de savoir par quel mécanisme la perte d'ubiquitination d'H2B ou de méthylation d'H3K4 diminue la transcription des cyclines. Des réponses à cette question sont apportées par un article publié par Zimmerman *et al.* [170] où ils montrent, eux aussi, une forte diminution de la transcription de *CLN2* en absence de *bre1* ou *rad6*. Sur des cellules synchronisées en G1, ils montrent par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) que durant les 30 premières minutes du cycle, Bre1 et surtout Rad6 sont retrouvés fixés au gène *CLN2*. Ils en concluent que Rad6 et Bre1 sont nécessaires pour l'activation de la transcription de *CLN2* et que cette activation de la transcription se ferait grâce à la fixation directe des enzymes de modification d'histone au gène régulé. Il serait intéressant de réaliser ce même type d'expérience avec des anticorps anti H2Bub, H3K4me2 ou H3K4me3 afin de savoir si la fixation de Bre1/Rad6 engendre une modification effective de ces gènes. De plus, la question sous-jacente est de savoir : Y a-t-il une apposition dynamique de PTMs au cours du cycle cellulaire régulant sa progression ?

Pour l'instant il n'existe qu'un seul exemple décrit de modifications d'histone qui sont apposées de manière dynamique de façon cycle cellulaire dépendante. Il s'agit de la méthylation de H3K79 dont nous avons déjà parlé dans l'introduction. Chez la levure, H3K79me2 est peu présente en G1, commence à augmenter en S et atteint son summum en G2/M, alors que le niveau de H3K79me3 reste constant [65]. On a donc une régulation dynamique d'apposition de cette marque au cours du cycle. Nos résultats, mis en perspectives avec ceux de Zimmerman *et al.* [170], suggèrent que l'H2Bub et la méthylation d'H3K4 pourraient eux aussi faire parties de ce mécanisme de régulation du cycle cellulaire par les PTMs, encore peu étudié.

Ainsi, de plus en plus d'éléments suggèrent une intrication forte entre PTM et régulation du cycle cellulaire. De même, il existe une relation déjà établie entre PTM et métabolite. Il semble donc assez naturel aujourd'hui de se demander si les métabolites ne pourraient pas réguler, même en conditions normales de croissance, l'avancée dans le cycle cellulaire et pas seulement avant le START. En effet, au cours de l'avancée dans le cycle cellulaire, de nombreuses réactions ont lieu qui engendrent des métabolites variés qui vont apparaître séquentiellement au cours du temps [174] et pourraient potentiellement servir de censeurs pour la cellule, mais aussi eux-mêmes influencer sur l'avancée dans le cycle. Cela pourrait se faire notamment *via* un impact dynamique sur les PTMs, mais cela reste bien sûr uniquement spéculatif pour l'instant.

### 3. L'AICAR et son potentiel thérapeutique

Comme nous avons pu le voir dans l'article, l'interaction entre l'AICAR et certaines modifications d'histone est conservée chez les cellules humaines HCT116. Un point auquel il faut faire attention dans l'analyse des résultats obtenus chez les cellules humaines est que, contrairement aux levures, il s'agit non pas de *knock out*, mais de *knock down*. C'est-à-dire qu'ici l'abondance de la protéine cible, Rnf40/Ash21/Mll2, est fortement diminuée, mais ce de manière transitoire et sans que cela soit total. Il reste donc de la protéine cible au sein de la cellule. Par exemple, chez la levure dans la souche

délétée pour *bre1*, l'ubiquitination d'H2B n'a plus lieu, peu importe les effets qu'aurait pu avoir l'AICAR sur Bre1 en condition sauvage. Ici, même lorsque *RNF40* est *silencé*, l'AICAR peut potentiellement toujours venir affecter l'activité résiduelle de Rnf40. Pour cette raison, il pourrait être intéressant dans un premier temps d'analyser les effets de l'AICAR sur H2Bub. En effet, il a été montré par Xu *et al.*, que l'AICAR induisait une très forte diminution de l'ubiquitination d'H2B, de façon AMPK dépendante sans affecter Rnf20 ou Rnf40 [175]. Cette étude a été réalisée sur des cellules murines (MEF), il serait donc intéressant de voir si cet effet est aussi obtenu ou non dans des cellules HCT116. De plus, si tel est le cas, cela signifie que les effets de l'AICAR combinés à un *siRNF40* aboutissent certainement à une perte quasi-totale d'H2Bub. C'est-à-dire qu'avec le *siRNF40*, on ne ferait peut être qu'aggraver un des effets de l'AICAR. Pour tester cette hypothèse, on pourrait envisager de surexprimer Rnf20 par exemple, ce qui conduit à une augmentation de l'H2Bub [41], pour voir si cela fait diminuer la sensibilité à l'AICAR ou non.

Dans l'article, après avoir étudié l'effet du *siRNF40*, nous nous sommes intéressés aux effets de siARNs dirigés contre le complexe COMPASS. Cela est dû au fait que dans de nombreux types cellulaires, il a été montré que l'H2Bub était liée à la méthylation de H3K4 (c.f introduction). Néanmoins, je n'ai pas trouvé d'article où cela aurait été testé chez les cellules HCT116 en particulier. Ainsi, le lien entre les Rnf40 et COMPASS dans ce contexte est pour l'instant uniquement bibliographique. On ne peut pas affirmer s'il s'agit véritablement ou non de la même histoire. C'est-à-dire qu'on ne sait pas si les raisons pour lesquels un *siRNF40* et un *siASH2L* rendent les cellules plus sensibles à l'AICAR sont les mêmes ou non.

Nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser un *siASH2L*. Ce siARN est connu pour affecter uniquement la triméthylation de H3K4 dans des cellules HeLa [81]. Il serait intéressant de voir si la spécificité du *siASH2L* sur la perte de H3K4me3 est la même dans les cellules HCT116 ou non. Le fait de cibler une sous unité commune aux six complexes COMPASS permet d'engendrer des effets sur la méthylation des histones qui sont *a priori* globaux. A l'inverse, en utilisant un *siMLL2*, spécifique d'un seul des six complexes, on peut s'attendre à provoquer des effets gènes spécifiques. Or, il a été montré que dans des cellules HCT116, ce siARN provoque en réalité une perte globale de la monométhylation de H3K4 sans effet sur la di ou triméthylation [176]. Ainsi, de la même manière que précédemment, on ne peut pas être sûr que les effets dus au *siASH2L* soit les mêmes que ceux dus au *siMLL2*. D'autant que leurs effets sur la méthylation de H3K4 semblent être différents, mais c'est quelque chose qu'il faudrait certainement vérifier dans nos conditions.

Un autre point que l'on pourrait souligner est le fait que l'étude n'a été réalisée que dans un seul type cellulaire. Savoir si oui ou non l'effet SL de l'AICAR avec les *knock down* cités ci-dessus est généralisable, est essentiel notamment dans une perspective thérapeutique. En effet, la perte d'H2Bub ou de fonction de *MLL2* est retrouvée dans de nombreux types cellulaires cancéreux différents (c.f introduction), il serait donc intéressant de savoir si tous ces types cellulaires pourraient ou non répondre à l'AICAR. Dans cette perspective, tester directement sur un de ces types de cellules cancéreuses, ayant perdu H2Bub ou muté pour *MLL2*, s'il y a un effet antiprolifératif spécifique de l'AICAR serait la prochaine étape envisageable. La difficulté serait d'avoir des cellules saines comparables en contrôle. Si ces cellules présentent des sensibilités exacerbées à l'AICAR, on pourrait ensuite envisager de réaliser des expériences de greffes chez la souris. Par exemple, on pourrait imaginer greffer des souris avec soit des cellules mutées pour *MLL2* soit des cellules contenant *MLL2* sauvages, puis de comparer les effets de l'AICAR sur leur développement.

Une des dernières questions qui restent en suspens est de savoir si les effets exacerbés de l'AICAR, lorsque *RNF40*, *ASH2L* ou *MLL2* sont *silencés*, sont dépendant ou non de p53. Pour tester cela, on peut envisager d'utiliser des cellules HCT116 p53<sup>-/-</sup>, qui existent d'ores et déjà, et de tester leur sensibilité à l'AICAR avec les si*RNF40*, *ASH2L* ou *MLL2*. Ce résultat est primordial dans l'idée d'utiliser l'AICAR en tant que molécule thérapeutique. En effet, dans plus de la moitié des cancers, p53 est muté. Si les effets de l'AICAR sont p53 dépendants, il serait bien évidemment inutile de traiter des patients dont la tumeur est mutée pour p53.

## 4. Conclusion

En utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* en tant qu'organisme modèle, nous avons pu mettre en évidence une interaction SL entre l'AICAR et la perte d'ubiquitination d'H2B ou de méthylation de H3K4. Cette interaction chemo-génétique a ensuite pu être généralisée aux cellules humaines HCT116. Chez la levure, des approches génétiques nous ont permis d'identifier les causes de cette SL, qui sont exposées dans l'article. Néanmoins, de nombreux points restent en suspens, comme l'identification de la cible directe du ZMP, l'identification de tous les acteurs impliqués dans la régulation des cyclines de G1 ... Points sur lesquels nous apportons des éléments de réponse dans cette thèse. Globalement, il apparaît évident que l'AICAR est une molécule à fort potentiel, mais aux effets multiples, qui rendent son analyse complexe.

Le fait que l'AICAR affecte de multiples cibles au sein de la cellule pourrait être considéré comme un inconvénient. En effet, lors de la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques, le paradigme de « *one gene, one drug, one disease* » est encore très présent. L'idée étant que ces molécules très spécifiques seront plus sûres, car ne ciblant qu'un ligand et n'ayant ainsi potentiellement que peu d'effets non désirés. Néanmoins, cette notion commence à être de plus en plus remise en question. Aujourd'hui la recherche se focalise petit à petit sur l'identification de molécules qui vont affecter non pas une cible, mais tout un ensemble de cibles. Cela peut aussi être réalisé avec des combinaisons de molécules, c'est le cas pour le VIH, où le traitement par un seul antirétroviral n'est pas efficace à cause du développement de résistances virales. A l'inverse, le traitement avec plusieurs molécules ciblant divers protéines a montré une véritable efficacité. Cet exemple résume le problème principal des traitements mono-cible, qui est l'échappement. C'est particulièrement le cas pour les cellules cancéreuses qui, de par leur caractère souvent très instable et mutagène, vont rapidement développer des résistances aux traitements. Avec une approche dite « polypharmacologique », plusieurs cibles sont atteintes, ce qui rend l'échappement beaucoup plus difficile. Dans cette étude, par exemple, nous montrons que le *knock down* de *RNF40*, qui induit *a priori* une diminution d'H2Bub, rend les cellules HCT116 hypersensibles à l'AICAR. Or, l'AICAR lui-même semble affecter l'ubiquitination d'H2B. Ainsi, le fait que l'AICAR affecte à la fois des cibles SL avec la diminution d'H2bub et l'ubiquitination d'H2B lui-même potentialise ses effets. C'est tout l'intérêt des molécules aux effets multiples qui apparaissent comme de plus en plus prometteuses.

## VII. Matériel et méthodes

Dans cette partie, je développerai uniquement le matériel et les méthodes qui ne sont pas présentés dans l'article ou pas suffisamment détaillés.

### 1. Milieux et souches

#### a) Milieux de culture

**YPDAUW** : milieu riche contenant 1 % d'extrait de levure, 2 % de peptone, 2 % de glucose, 0,3 mM d'adénine, 0,3 mM d'uracile et 0,2 mM de tryptophane. Les milieux solides sont complétés avec 2 % d'agar.

**YPGAL** : milieu YPD où le galactose remplace le glucose

**SD** : milieu synthétique minimum contenant 5 % de sulfate d'ammonium, 0,67 % de « yeast nitrogen base » (Difco) additionné de soit 0,2 % d'hydrolysats de caséine (**casa**), 0,3 mM adénine (**A**), 0,3 mM uracile (**U**) et 0,2 mM tryptophane (**W**), soit 0,3 mM d'adénine (**A**) et/ou 0,4 mM de leucine (**L**) et/ou 0,3 mM d'uracile (**U**) et/ou 0,06 mM d'histidine (**H**) et/ou 0,2 mM de méthionine (**met**). Les milieux solides sont complétés avec 2,5 % d'agar.

**SC-U-L** : milieu synthétique complet contenant 0,67 % de « yeast nitrogen base », 2 % de glucose, 0,2 % d'un mélange d'acides aminés et de bases mais dépourvu d'uracile et de leucine

**Pré-sporulation** : de même que YPDAUW mais avec 10 % de glucose et 2 % d'agar

**Sporulation** : 1 % d'acétate de potassium, 0,25 % d'extraits de levures et 2 % d'agar

**LB** : milieu riche contenant 10 g/L Bactotryptone, 5 g/L Extrait de Levure et 5 g/L NaCl. De l'ampicilline ou de la kanamycine sont ajoutées pour permettre les sélections.

La stérilisation est effectuée à 120 °C pendant 20 min. Les milieux solides sont obtenus par addition avant stérilisation de 20 g/l d'agar.

#### b) Transformations

##### 1) Transformation de levures

Les cellules sont cultivées une nuit à 30°C sur milieu solide YPD. Environ  $5 \times 10^7$  cellules sont re-suspendues dans 90 µl de tampon "One step": 0.2 N acétate de lithium, 40 % (w/v) PEG 3350 (Sigma), pH 5.0 ; additionné extemporanément de 10 µl de DDT 1 M. L'ADN transformant (500 à 1000 ng) ainsi que 50 µg d'ADN entraîneur (ADN de sperme de saumon soniqué) sont ajoutés à la suspension. Après avoir été très brièvement vortexée, la suspension est incubée 30 min. à 45 °C, puis finalement étalée sur milieu sélectif.

## 2) Transformation de bactéries

Entre 5 et 15 µg de plasmide sont ajoutés à de 100 µL de bactéries thermo-compétentes, puis incubés 30 minutes à 4°C. La transformation se fait par un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. On ajoute ensuite 1 mL de milieu LB qu'on laisse agiter pendant 1 heure à 37°C afin de permettre aux cellules d'exprimer le gène de résistance à l'antibiotique. Après centrifugation, le culot est récupéré dans un volume de 100 µL et étalé sur une de boîte LB contenant les antibiotiques nécessaires à la sélection des bactéries transformées.

## c) Construction des souches

### 1) Croisement, sporulation et dissection

Les souches à croiser sont mise en contact sur une boîte d'YPD sur la nuit. Les diploïdes sont ensuite soit sélectionnés génétiquement soit sélectionnés grâce à leur taille en utilisant le « cell sizer Beckman Coulter ». Ensuite, la sporulation est induite par une carence en azote, en absence d'une source de carbone non-fermentescible. Ainsi, les cellules sont placées sur la journée sur un milieu riche à 30°C, milieu de pré-sporulation, puis repiquées sur un milieu pauvre en azote, milieu de sporulation et placées à 25°C. L'incubation est maintenue jusqu'à l'obtention d'asques (de 4 jours à 1 mois). Pour isoler les spores, la paroi des asques est digérée par incubation à 30 °C dans une solution de glucanex (5 mg/ml) pendant au 12 min. Les cellules sont ensuite déposées sur une boîte de YPD et les spores sont isolées et alignées par tétrade à l'aide d'un micromanipulateur. La sélection des spores se fait ensuite par réplique lorsque le gène est associé à un phénotype (auxotrophie, résistance à une drogue, coloration...) ou par PCR sur colonie.

### 2) PCR sur colonie

Une petite quantité de levure directement récupérée sur boîte est placée dans 20µL de NaOH à 20mM, puis placé 10min à 95°C. Après centrifugation, 2 µL de la solution sont utilisés pour la PCR sur colonie. Cette préparation peut être gardée au frigo sur des temps longs (plus de 24 heures). Le mélange est le suivant : 2.5 µL de tampon green fermentas 10x, 1 µL d'oligo1, 1 µL d'oligo2, 2.5 µL de dNTP, 0.125 µL de Taq, 2 µL d'extrait de levure, qsp 25µL H<sub>2</sub>O. L'appareil à PCR est ensuite programmé comme suit : 95°C 5 min, 95°C 30 sec, 52°C 30 sec, 72°C 1 min, les étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois et l'on finit par une étape à 72°C 6 min, pour désactiver la polymérase.

Pour les PCR réalisées dans le cadre d'un génotypage, identification des spores contenant les délétions des gènes souhaités, l'oligo1 est généralement choisi 500 nucléotides avant l'ATG du gène en question et l'oligo2 se trouve généralement (banque Euroscarf) dans KanMX4 (5'-CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT-3').

### 3) Changement de signe

Par exemple, une souche MAT α est transformée par un plasmide (p23) contenant l'endonucléase HO (*homothallic switching endonuclease*) sous le contrôle d'un promoteur inductible par le galactose et répressible par le glucose, *GAL1*. La souche est ensuite inoculée dans 2mL de YPGal pendant 4h pour induire l'expression de l'endonucléase HO. Cette enzyme clive près du locus MAT et la réparation de cette cassure se fait ensuite par recombinaison homologue en utilisant soit le locus HMLα soit le locus HMRA. Pour réprimer l'induction, 1000 cellules sont étalées sur un milieu YPDAUW qui contient du glucose et donc éteint le promoteur *GAL1*. Afin de déterminer le type sexuel obtenu, les boîtes sont répliquées sur deux souches testrices l'une MAT a et l'autre MAT α. Généralement, on sélectionne ensuite les souches ayant perdu le plasmide, donc auxotrophe pour l'uracile.

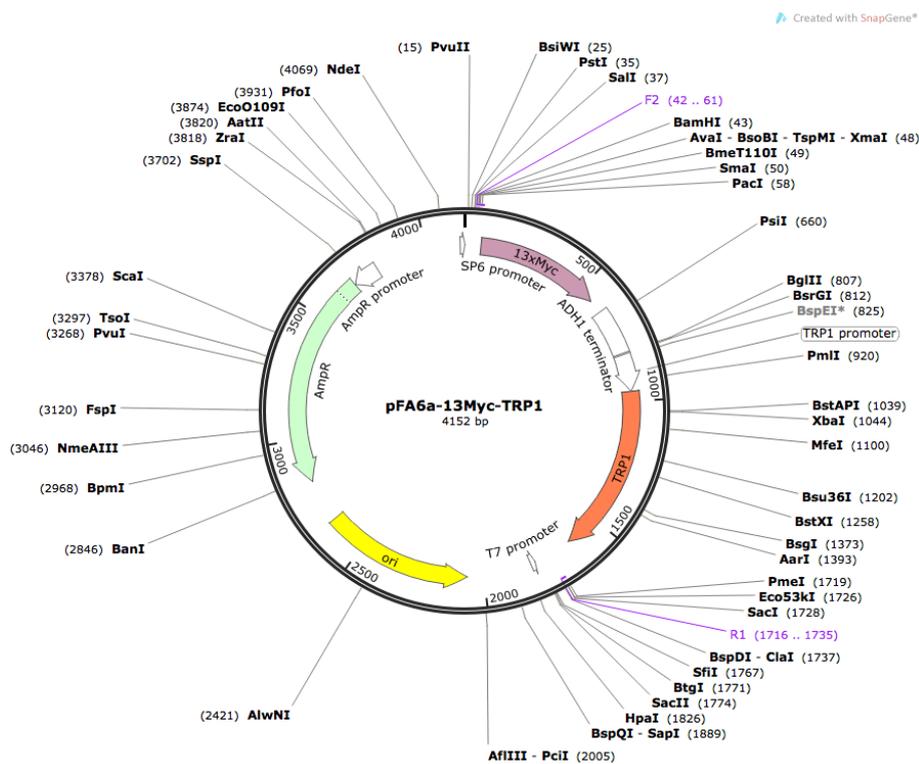
#### 4) Ajout d'un TAG 13Myc endogène

Afin de tagguer de façon endogène un gène, des oligonucléotides sont dessinés : ils recouvrent les 25 derniers nucléotides avant le stop du gène d'intérêt (il faut penser à enlever le stop ou le remplacer) et comportent **10 nucléotides** permettant la liaison de l'oligo à sa matrice, le plasmide pFA6a-13Myc-TRP1 (p2536). Pour l'oligo reverse, les 25 nucléotides sont pris après le stop et à nouveau **10 nucléotides** permettant la liaison à la matrice sont ajoutés. Par exemple, voici les oligos utilisés pour tagger le gène *CLN1*:

CLN1up: 5'-GATATCGCTATCGTTAAGGAACCAATAGCTCTCAACTGTGCCAGCTGAAGCTTCGTACGCT-3'

CLN1rev : 5'-CAGGTGAAGAATATTGAGGCTAGATGTTTGTAGGTGGGCCGACTCACTATAGGGAGACC-3'

La PCR est réalisée avec la DreamTaq avec la matrice p2526 dilué au 1/100 (environ 20 ng/μL). La température d'hybridation est fixée à 50°C et le temps d'élongation est de 2 minutes. 100 μL de PCR sont réalisées puis précipités pour chaque transformation. La sélection des clones se fait ici vis-à-vis du tryptophane. Les clones positifs sont ensuite vérifiés par PCR sur colonie avec un oligonucléotide dans le gène TRP1 (4017) et un oligonucléotide spécifique au gène d'intérêt situé à 200 ou 300 paires de base de son codon stop.



## 2. Analyses

### a) Analyse du profil métabolomique

Afin de mesurer la concentration de ZMP dans les différentes souches de levure et conditions de culture, le laboratoire dispose d'une station de chromatographie permettant de réaliser des chromatographies ioniques à haute performance (HPIC). Les métabolites ont été obtenus par une

méthode d'extraction à l'éthanol à chaud (5 mL d'Hepes 10 mM pH 7.2, 75 % éthanol à 80°C). Pour cela, les cultures sont cultivées pendant 24 heures en phase exponentielle de croissance, puis transférées à 37°C pendant 30 minutes avant d'ajouter 1 mM d'AICAR pendant 1 heure.  $5 \times 10^8$  cellules sont utilisées pour l'extraction. Une fois séché, le culot a été repris dans 500  $\mu$ L d'eau ultra-pure, centrifugé à 21 000 g deux fois 45 minutes et le surnageant a été utilisé pour la suite de l'analyse. La séparation des métabolites a été faite par HPIC sur une colonne carbopacPA1 (DIONEX). Les pics ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et de leur spectre d'absorption aux ultraviolets. Les quantités de métabolites ont été déterminées grâce à l'utilisation de gammes étalons. Pour finir, la concentration d'AICAR a été calculée en tenant compte du volume cellulaire mesuré grâce à un « cell sizer Beckman Coulter ». La méthode est détaillée dans l'article suivant [177].

## **b) Analyse du profil lipidomique**

### **1) Broyage des cellules dans le solvant organique**

Des culots de  $10^9$  cellules sont récoltés, lavés deux fois, et peuvent ensuite être congelés avant l'analyse. 4 mL de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCl}$  (100/50/1) sont ajoutés au culot, ainsi que des billes de verre. Les cellules sont broyées en les vortexant 6 fois 30 secondes, entrecoupées de 30 secondes dans la glace entre chaque agitation.

### **2) Déphasage avec la phase aqueuse**

2 mL d'eau distillée contenant 0,9 % de NaCl sont ajoutés et vortexés 30 secondes, suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 50 % du régime maximum de la centrifugeuse. La phase organique inférieure est récoltée à l'aide d'une pipette pasteur. 2 mL de chloroforme sont ajoutés à la phase supérieure restante, vortexés et centrifugés avant de prélever à nouveau la phase inférieure et la combiner avec l'extrait organique précédent. L'évaporation se fait à sec avec un évaporateur de solvant à aiguille. Enfin, 70  $\mu$ L du mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCl}$  (100/50/1) sont ajoutés et mélangés au culot. Pour l'analyse CCM, 30  $\mu$ L ont été déposés.

## **c) Analyse protéomique des extractions enrichies en protéines nucléaires**

La souche Y2950 transformée avec le p339 ou le p4983 (*KAP123*) ont été cultivées en SDcasaWA pendant 24 heures en phase exponentielle de croissance, puis transférées à 37°C pendant 30 minutes avant d'ajouter 0 ou 1 mM d'AICAR pendant 2 heures. L'extraction est ensuite réalisée à partir de 50 mL de culture à  $\text{DO } 2 \times 10^7$  en utilisant le kit « Yeast Nuclei Isolation Kit » de chez Abnova. Le culot final est repris dans 40  $\mu$ L. 20  $\mu$ L ont été utilisés pour l'analyse protéomique subséquente réalisée à la Plateforme de Génomique Fonctionnelle en collaboration avec Marc Bonneu et Stéphane Claverol.

## **d) Cycloheximide et extraction protéique**

Les souches tagguées Cln1-13Myc, Cln2-13Myc ou Cln3-13Myc ont été cultivées pendant 24 heures en phase exponentielle de croissance, puis transférées à 37°C pendant 30 minutes avant l'ajout de 0 ou 1 mM d'AICAR. Au bout de 1h30 de traitement, 0,6 mg/mL de cycloheximide ont été ajoutées, 10 minutes après (temps nécessaire pour arrêter la traduction), des  $10^8$  cellules ont été récupérées toutes les cinq minutes pour la réalisation de western blots.

Le culot est re-suspendu dans 500 µL de solution 1 (1.85 N de NaOH et 7 % de mercaptoethanol) et incubé 10 minutes à 4°C. 500 µL de TCA 50% sont ajoutés et incubés 10 minutes à 4°C. 3 centrifugation de 5 minutes à froid à 15 000 rpm sont réalisées avec l'élimination du surnageant entre chaque centrifugation. Le culot est repris dans 50 µL de SDS 5% et neutralisé avec 9 µL de Tris 3 M pH 8,9. Le tout est incubé 15 minutes à 42°C puis centrifugé 10 minutes à 15 000 rpm. 50 µL de surnageant sont prélevés. De 5 à 15 µL de cette solution sont déposés sur gel, le reste peut-être congelé à -20°C.

### 3. Chromatographie d'affinité

Les plasmides contenant les constructions Myc (Kap123-Myc et Yrb1-Myc) sont transformés dans une souche sauvage. Puis, après 24 heures en phase exponentielle de croissance avec pression de selection, les cultures sont diluée à DO=0,2 en YPD et cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent une DO égale à 2 dans 1 litre de culture chacune. Ensuite, les cultures sont centrifugées et placées à -80°C.

A partir de cette étape, tout se fait dans la glace ou à 4°C. Le culot est repris dans 2 mL du tampon de lyse (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-HCl<sub>2</sub> 20 mM pH 7.2, NaCl 1 M avec une pastille d'anti protéase) et est ensuite amené à la plateforme de génomique fonctionnelle pour être cassé. Une fois broyées, le culot est centrifugé à 21000 g 10 minutes à 4°C. Puis le surnageant est à son tour centrifugé à 21000 g 1 heure à 4°C. Le surnageant obtenu est dialysé sur la nuit dans du tampon de dialyse (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-HCl<sub>2</sub> 20 mM pH 7.2, NaCl 10 mM). Le lendemain, le dialysat est centrifugé 1 heure à 4°C. Pendant ce temps, la colonne de chromatographie doit être équilibrée : éliminer le tampon de conservation, faire passer 15 mL de tampon de dialyse à 10 mM NaCl par fraction de 5mL, faire passer 4 mL de tampon de dialyse à 1M NaCl en une fois, faire passer 10 mL de tampon de dialyse à 500 mM NaCl et finir par faire passer 20 mL de tampon de dialyse à 10 mM NaCl. Ensuite, boucher la colonne en bas et ajouter le dialysat avant de refermer la colonne en haut. La colonne doit agiter pendant 1 heure à 4°C sur une roue qui tourne.

La colonne est placée à la verticale et débouchée par le haut puis le bas, ce qui sort par gravitation est le *flow through*. Les lavages sont effectués avec 20 mL de tampon de dialyse par fraction de 1mL. Enfin, l'élution est réalisée avec 5 mL de ZMP 5 mM dilué dans du tampon de dialyse par fraction de 500 µL récupérée une à une. Pour finir, on peut éluer avec du NaCl 500mM afin d'identifier les fractions dans lesquelles se trouvent la majorité des protéines éluées au ZMP par analogie, cela permet aussi de nettoyer la colonne. Les fractions de l'élution au ZMP contenant des protéines sont mélangées et concentrées à l'aide d'un centricon.

A la fin, la résine doit être nettoyée: 1-2 mL de tampon de dialyse NaCl 1 M sont passés sur la colonne, puis 20-30 mL de tampon de dialyse 10 mM NaCl par fraction de 10 mL sont passés et enfin, 10 mL tampon de dialyse 10 mM NaCl contenant 20 % d'éthanol absolu sont passés sur la colonne avant de la placer au frigo.

### 4. Cellules de mammifère

Les mesures de cycle cellulaire ont été réalisées à l'aide du kit « BD Cycletest™ Plus DNA Kit » de chez BD Biosciences avec des cellules HCT116 en phase exponentielle de croissance. Les mesures d'apoptose ont été réalisées à l'aide du kit « ApoAlert® Annexin V-FITC Apoptosis Kit » de chez Clontech.

## VIII. Bibliographie

1. Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B (2012) Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190:885–929
2. Lacroute F (1968) Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 95:824–832
3. Pinson B, Vaur S, Sagot I, Coulpier F, Lemoine S, Daignan-Fornier B (2009) Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. *Genes Dev* 23:1399–407
4. Etchegaray J-P, Mostoslavsky R (2016) Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. *Molecular Cell* 62:695–711
5. Galdieri L, Vancura A (2012) Acetyl-CoA carboxylase regulates global histone acetylation. *J Biol Chem* 287:23865–76
6. Klose RJ, Zhang Y (2007) Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:307–18
7. Igarashi K, Katoh Y (2013) Metabolic aspects of epigenome: coupling of S-adenosylmethionine synthesis and gene regulation on chromatin by SAMIT module. *Subcell Biochem* 61:105–18
8. Rolfes RJ (2006) Regulation of purine nucleotide biosynthesis: in yeast and beyond. *Biochem Soc Trans* 34:786–90
9. Rébora K, Desmoucelles C, Borne F, Pinson B, Daignan-Fornier B (2001) Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol Cell Biol* 21:7901–12
10. Kim PB, Nelson JW, Breaker RR (2015) An ancient riboswitch class in bacteria regulates purine biosynthesis and one-carbon metabolism. *Mol Cell* 57:317–28
11. Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK (1994) Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 353:33–6
12. Foretz M, Nellie , Guigas B, Sandrine , Christophe , Fabrizio , Luc , Benoît (2006) Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK. *medecine science INSERM*
13. Daignan-Fornier B, Pinson B (2012) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-Monophosphate (AICAR), a Highly Conserved Purine Intermediate with Multiple Effects. *Metabolites* 2:292–302
14. Ceschin J, Saint-Marc C, Laporte J, Labriet A, Philippe C, Moenner M, Daignan-Fornier B, Pinson B (2014) Identification of yeast and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-d-ribofuranoside (AICAR) transporters. *J Biol Chem* 289:16844–54
15. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, et al (2014) Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E435–44
16. Mayer FV, Heath R, Underwood E, et al (2011) ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 14:707–14
17. Tang Y-C, Williams B, Siegel J, Amon A (2010) Identification of Aneuploidy-Selective Antiproliferation Compounds. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.017
18. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW (2003) Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34:369–76
19. Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I (2005) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280:39582–93
20. Sengupta T, Leclerc G, Hsieh-Kinser T, Leclerc G, Singh I, Barredo J (2007) Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. *Mol Cancer*. doi: 10.1186/1476-4598-6-46

21. Tessarz P, Kouzarides T (2014) Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:703–8
22. Musselman CA, Lalonde M-EE, Côté J, Kutateladze TG (2012) Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol* 19:1218–27
23. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705
24. Clague M, Heride C, Urbé S (2015) The demographics of the ubiquitin system. *Trends Cell Biol* 25:417–426
25. Lee W-CC, Lee M, Jung JW, Kim KP, Kim D (2008) SCUD: *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitination database. *BMC Genomics* 9:440
26. Swerdlow PS, Schuster T, Finley D (1990) A conserved sequence in histone H2A which is a ubiquitination site in higher eucaryotes is not required for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10:4905–11
27. Nickel BE, Allis CD, Davie JR (1989) Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin. *Biochemistry* 28:958–63
28. Robzyk K, Recht J, Osley M (2000) Rad6-Dependent Ubiquitination of Histone H2B in Yeast. *Science* 287:501504
29. Wood A, Krogan NJ, Dover J, et al (2003) Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* 11:267–74
30. Hwang W, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu A, Tong A, Boone C, Madhani H (2002) A Conserved RING Finger Protein Required for Histone H2B Monoubiquitination and Cell Size Control. *Mol Cell*. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00826-2
31. Wood A, Schneider J, Dover J, Johnston M, Shilatifard A (2003) The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J Biol Chem* 278:34739–42
32. Betz JL, Chang M, Washburn TM, Porter SE, Mueller CL, Jaehning JA (2002) Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. *Mol Genet Genomics* 268:272–85
33. Henry KW, Wyce A, Lo W-SS, Duggan LJ, Emre NC, Kao C-FF, Pillus L, Shilatifard A, Osley MA, Berger SL (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17:2648–63
34. Turner SD, Ricci AR, Petropoulos H, Genereaux J, Skerjanc IS, Brandl CJ (2002) The E2 ubiquitin conjugase Rad6 is required for the ArgR/Mcm1 repression of ARG1 transcription. *Mol Cell Biol* 22:4011–9
35. Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling DE (2005) Ubp10/Dot4p regulates the persistence of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Mol Cell Biol* 25:6123–39
36. Zhang Y (2003) Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev* 17:2733–40
37. Clague MJ, Coulson JM, Urbé S (2008) Deciphering histone 2A deubiquitination. *Genome Biol* 9:202
38. Thorne AW, Sautiere P, Briand G, Crane-Robinson C (1987) The structure of ubiquitinated histone H2B. *EMBO J* 6:1005–10
39. Koken MH, Reynolds P, Jaspers-Dekker I, Prakash L, Prakash S, Bootsma D, Hoeijmakers JH (1991) Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8865–9
40. Kim J, Hake SB, Roeder RG (2005) The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Mol Cell* 20:759–70
41. Zhu B, Zheng Y, Pham A-DD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2005) Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* 20:601–11

42. Chernikova SB, Razorenova OV, Higgins JP, et al (2012) Deficiency in mammalian histone H2B ubiquitin ligase Bre1 (Rnf20/Rnf40) leads to replication stress and chromosomal instability. *Cancer Res* 72:2111–9
43. Kari V, Shchebet A, Neumann H, Johnsen SA (2011) The H2B ubiquitin ligase RNF40 cooperates with SUPT16H to induce dynamic changes in chromatin structure during DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* 10:3495–504
44. Kim J, Guermah M, McGinty RK, Lee J-SS, Tang Z, Milne TA, Shilatifard A, Muir TW, Roeder RG (2009) RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* 137:459–71
45. Shema E, Tirosch I, Aylon Y, et al (2008) The histone H2B-specific ubiquitin ligase RNF20/hBRE1 acts as a putative tumor suppressor through selective regulation of gene expression. *Genes Dev* 22:2664–76
46. Varambally S, Yu J, Laxman B, et al (2005) Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cancer Cell* 8:393–406
47. Barber TD, McManus K, Yuen KW, et al (2008) Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3443–8
48. Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, et al (2014) Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. *Gastroenterology* 146:530–38.e5
49. Cole AJ, Clifton-Bligh R, Marsh DJ (2015) Histone H2B monoubiquitination: roles to play in human malignancy. *Endocr Relat Cancer* 22:T19–33
50. Prenzel T, Begus-Nahrmann Y, Kramer F, et al (2011) Estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-dependent monoubiquitination of histone H2B. *Cancer Res* 71:5739–53
51. Urasaki Y, Heath L, Xu CW (2012) Coupling of glucose deprivation with impaired histone H2B monoubiquitination in tumors. *PLoS ONE* 7:e36775
52. Hahn MA, Dickson K-AA, Jackson S, Clarkson A, Gill AJ, Marsh DJ (2012) The tumor suppressor CDC73 interacts with the ring finger proteins RNF20 and RNF40 and is required for the maintenance of histone 2B monoubiquitination. *Hum Mol Genet* 21:559–68
53. Zhang Y, Yao L, Zhang X, Ji H, Wang L, Sun S, Pang D (2011) Elevated expression of USP22 in correlation with poor prognosis in patients with invasive breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:1245–53
54. Liu Y-LL, Yang Y-MM, Xu H, Dong X-SS (2011) Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 103:283–9
55. Li J, Wang Z, Li Y (2012) USP22 nuclear expression is significantly associated with progression and unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 138:1291–7
56. Wang H, Li Y-PP, Chen J-HH, et al (2013) Prognostic significance of USP22 as an oncogene in papillary thyroid carcinoma. *Tumour Biol* 34:1635–9
57. Yang D-DD, Cui B-BB, Sun LY, Zheng HQ, Huang Q, Tong J-XX, Zhang Q-FF (2011) The co-expression of USP22 and BMI-1 may promote cancer progression and predict therapy failure in gastric carcinoma. *Cell Biochem Biophys* 61:703–10
58. Sun Z-W, Allis C (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418:104–108
59. Dover J, Schneider J, Tawiah-Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, Shilatifard A (2002) Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem* 277:28368–71
60. Schneider J, Wood A, Lee J-SS, Schuster R, Dueker J, Maguire C, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Shilatifard A (2005) Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Mol Cell* 19:849–56

61. Nedeá E, Nalbant D, Xia D, Theoharis NT, Suter B, Richardson CJ, Tatchell K, Kislinger T, Greenblatt JF, Nagy PL (2008) The Glc7 phosphatase subunit of the cleavage and polyadenylation factor is essential for transcription termination on snoRNA genes. *Mol Cell* 29:577–87
62. Nedeá E, He X, Kim M, Pootoolal J, Zhong G, Canadien V, Hughes T, Buratowski S, Moore CL, Greenblatt J (2003) Organization and function of APT, a subcomplex of the yeast cleavage and polyadenylation factor involved in the formation of mRNA and small nucleolar RNA 3'-ends. *J Biol Chem* 278:33000–10
63. Cheng H, He X, Moore C (2004) The essential WD repeat protein Swd2 has dual functions in RNA polymerase II transcription termination and lysine 4 methylation of histone H3. *Mol Cell Biol* 24:2932–43
64. Ng H, Xu R-M, Zhang Y, Struhl K (2002) Ubiquitination of Histone H2B by Rad6 Is Required for Efficient Dot1-mediated Methylation of Histone H3 Lysine 79. *J Biol Chem* 277:34655–34657
65. Schulze JM, Jackson J, Nakanishi S, Gardner JM, Hentrich T, Haug J, Johnston M, Jaspersen SL, Kobor MS, Shilatifard A (2009) Linking cell cycle to histone modifications: SBF and H2B monoubiquitination machinery and cell-cycle regulation of H3K79 dimethylation. *Mol Cell* 35:626–41
66. Vermeulen M, Mulder KW, Denisov S, Pijnappel WW, van Schaik FM, Varier RA, Baltissen MP, Stunnenberg HG, Mann M, Timmers HT (2007) Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131:58–69
67. Margaritis T, Oreal V, Brabers N, et al (2012) Two distinct repressive mechanisms for histone 3 lysine 4 methylation through promoting 3'-end antisense transcription. *PLoS Genet* 8:e1002952
68. Lorenz DR, Meyer LF, Grady PJ, Meyer MM, Cam HP (2014) Heterochromatin assembly and transcriptome repression by Set1 in coordination with a class II histone deacetylase. *Elife* 3:e04506
69. Allis CD, Berger SL, Cote J, et al (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131:633–6
70. Latham J, Chosed R, Wang S, Dent S (2011) Chromatin Signaling to Kinetochores: Transregulation of Dam1 Methylation by Histone H2B Ubiquitination. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.025
71. Westermann S, Drubin DG, Barnes G (2007) Structures and functions of yeast kinetochore complexes. *Annu Rev Biochem* 76:563–91
72. Courtwright AM, He X (2002) Dam1 is the right one: phosphoregulation of kinetochore biorientation. *Dev Cell* 3:610–1
73. Zhang K, Lin W, Latham JA, Riefler GM, Schumacher JM, Chan C, Tatchell K, Hawke DH, Kobayashi R, Dent SY (2005) The Set1 methyltransferase opposes Ipl1 aurora kinase functions in chromosome segregation. *Cell* 122:723–34
74. Chan CS, Botstein D (1993) Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* 135:677–91
75. Francisco L, Chan CS (1994) Regulation of yeast chromosome segregation by Ipl1 protein kinase and type 1 protein phosphatase. *Cell Mol Biol Res* 40:207–13
76. Wang E, Kawaoka S, Yu M, Shi J, Ni T, Yang W, Zhu J, Roeder RG, Vakoc CR (2013) Histone H2B ubiquitin ligase RNF20 is required for MLL-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3901–6
77. Vethantham V, Yang Y, Bowman C, Asp P, Lee J-HH, Skalnik DG, Dynlacht BD (2012) Dynamic loss of H2B ubiquitylation without corresponding changes in H3K4 trimethylation during myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 32:1044–55
78. Shilatifard A (2012) The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu Rev Biochem* 81:65–95
79. Wu M, Wang PF, Lee JS, Martin-Brown S, Florens L, Washburn M, Shilatifard A (2008) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by Wdr82, a component of human Set1/COMPASS. *Mol Cell Biol* 28:7337–44
80. Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, et al (2015) The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med* 21:1199–208

81. Steward MM, Lee J-SS, O'Donovan A, Wyatt M, Bernstein BE, Shilatifard A (2006) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13:852–4
82. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-YY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129:823–37
83. Pavri R, Zhu B, Li G, Trojer P, Mandal S, Shilatifard A, Reinberg D (2006) Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125:703–17
84. Sims RJ, Reinberg D (2006) Histone H3 Lys 4 methylation: caught in a bind? *Genes Dev* 20:2779–86
85. Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, Bell S, McKenzie AN, King G, Rabbitts TH (1996) An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* 85:853–61
86. Rowley JD (1998) The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* 32:495–519
87. Wong CC, Martincorena I, Rust AG, et al (2014) Inactivating CUX1 mutations promote tumorigenesis. *Nat Genet* 46:33–8
88. Cleary SP, Jeck WR, Zhao X, et al (2013) Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology* 58:1693–702
89. Parsons DW, Li M, Zhang X, et al (2011) The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science* 331:435–9
90. Morin RD, Mungall K, Pleasance E, et al (2013) Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood* 122:1256–65
91. Hartwell LH, Mortimer RK, Culotti J, Culotti M (1973) Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of *cdc* Mutants. *Genetics* 74:267–86
92. Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131–4
93. Sudbery PE, Goodey AR, Carter BL (1980) Genes which control cell proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 288:401–4
94. Wittenberg C, Sugimoto K, Reed SI (1990) G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell* 62:225–37
95. Bloom J, Cross FR (2007) Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:149–60
96. Nasmyth K, Dirick L (1991) The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* 66:995–1013
97. Koch C, Moll T, Neuberg M, Ahorn H, Nasmyth K (1993) A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* 261:1551–7
98. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 9:3273–97
99. De Bruin RA, McDonald WH, Kalashnikova TI, Yates J, Wittenberg C (2004) Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* 117:887–98
100. Vergés E, Colomina N, Garí E, Gallego C, Aldea M (2007) Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol Cell* 26:649–62
101. Cross FR, Tinkelenberg AH (1991) A potential positive feedback loop controlling CLN1 and CLN2 gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* 65:875–83
102. Schwob E, Nasmyth K (1993) CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 7:1160–75
103. Mendenhall MD, Hodge AE (1998) Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1191–243

104. Richardson HE, Wittenberg C, Cross F, Reed SI (1989) An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* 59:1127–33
105. Basco RD, Segal MD, Reed SI (1995) Negative regulation of G1 and G2 by S-phase cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15:5030–42
106. Hartwell LH (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev* 38:164–98
107. Cross FR, Blake CM (1993) The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol Cell Biol* 13:3266–71
108. Parviz F, Hall DD, Markwardt DD, Heideman W (1998) Transcriptional regulation of CLN3 expression by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180:4508–15
109. Gallego C, Garí E, Colomina N, Herrero E, Aldea M (1997) The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J* 16:7196–206
110. Menoyo S, Ricco N, Bru S, Hernández-Ortega S, Escoté X, Aldea M, Clotet J (2013) Phosphate-activated cyclin-dependent kinase stabilizes G1 cyclin to trigger cell cycle entry. *Mol Cell Biol* 33:1273–84
111. Tyers M, Tokiwa G, Nash R, Futcher B (1992) The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J* 11:1773–84
112. Yaglom J, Linskens MH, Sadis S, Rubin DM, Futcher B, Finley D (1995) p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol Cell Biol* 15:731–41
113. Jorgensen P, Tyers M (2004) How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14:R1014–27
114. Koshland D, Strunnikov A (1996) Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:305–33
115. Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H (1995) Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81:95–105
116. Ajiro K, Yoda K, Utsumi K, Nishikawa Y (1996) Alteration of cell cycle-dependent histone phosphorylations by okadaic acid. Induction of mitosis-specific H3 phosphorylation and chromatin condensation in mammalian interphase cells. *J Biol Chem* 271:13197–201
117. Stillman DJ (2013) Dancing the cell cycle two-step: regulation of yeast G1-cell-cycle genes by chromatin structure. *Trends Biochem Sci* 38:467–75
118. Veis J, Klug H, Koranda M, Ammerer G (2007) Activation of the G2/M-specific gene CLB2 requires multiple cell cycle signals. *Mol Cell Biol* 27:8364–73
119. Morillo-Huesca M, Maya D, Muñoz-Centeno MC, Singh RK, Oreal V, Reddy GU, Liang D, Géli V, Gunjan A, Chávez S (2010) FACT prevents the accumulation of free histones evicted from transcribed chromatin and a subsequent cell cycle delay in G1. *PLoS Genet* 6:e1000964
120. Connell-Crowley L, Harper JW, Goodrich DW (1997) Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol Biol Cell* 8:287–301
121. Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES (2015) The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 14:130–46
122. Rank KB, Evans DB, Sharma SK (2000) The N-terminal domains of cyclin-dependent kinase inhibitory proteins block the phosphorylation of cdk2/Cyclin E by the CDK-activating kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 271:469–73
123. Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JEE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P (2003) Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114:431–43
124. Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M (2003) Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 35:25–31
125. Lew DJ, Dulić V, Reed SI (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66:1197–206
126. Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221–34
127. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501–12

128. Jeffrey PD, Tong L, Pavletich NP (2000) Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev* 14:3115–25
129. Pietenpol JA, Stewart ZA (2002) Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182:475–81
130. Massagué J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432:298–306
131. Santo L, Siu KT, Raje N (2015) Targeting Cyclin-Dependent Kinases and Cell Cycle Progression in Human Cancers. *Semin Oncol* 42:788–800
132. Zhu J, Sammons MA, Donahue G, et al (2015) Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature* 525:206–11
133. Muller PA, Vousden KH (2014) Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25:304–17
134. Ansari K, Kasiri S, Mandal S (2012) Histone methylase MLL1 has critical roles in tumor growth and angiogenesis and its knockdown suppresses tumor growth in vivo. *Oncogene* 32:3359–3370
135. Ansari K, Kasiri S, Mishra B, Mandal S (2012) Mixed lineage leukaemia-4 regulates cell-cycle progression and cell viability and its depletion suppresses growth of xenografted tumour in vivo. *Br J Cancer* 107:315–324
136. Cai F, Chen P, Chen L, et al (2014) Human RAD6 promotes G1-S transition and cell proliferation through upregulation of cyclin D1 expression. *PLoS ONE* 9:e113727
137. Thompson JM, Nguyen QH, Singh M, Razorenova OV (2015) Approaches to identifying synthetic lethal interactions in cancer. *Yale J Biol Med* 88:145–55
138. Taverna SD, Ilin S, Rogers RS, et al (2006) Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol Cell* 24:785–96
139. Shi X, Kachirskaia I, Walter KL, et al (2007) Proteome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* identifies several PHD fingers as novel direct and selective binding modules of histone H3 methylated at either lysine 4 or lysine 36. *J Biol Chem* 282:2450–5
140. Bian C, Xu C, Ruan J, et al (2011) Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *EMBO J* 30:2829–42
141. Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14503–8
142. Rodríguez-Navarro S (2009) Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Rep* 10:843–50
143. Koutelou E, Hirsch CL, Dent SY (2010) Multiple faces of the SAGA complex. *Curr Opin Cell Biol* 22:374–82
144. Vermeulen M, Eberl HC, Matarese F, et al (2010) Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* 142:967–80
145. Kim T, Xu Z, Clauder-Münster S, Steinmetz LM, Buratowski S (2012) Set3 HDAC mediates effects of overlapping noncoding transcription on gene induction kinetics. *Cell* 150:1158–69
146. Pijnappel WW, Schaft D, Roguev A, Shevchenko A, Tekotte H, Wilm M, Rigaut G, Séraphin B, Aasland R, Stewart AF (2001) The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev* 15:2991–3004
147. Van Schooten B, Testerink C, Munnik T (2006) Signalling diacylglycerol pyrophosphate, a new phosphatidic acid metabolite. *Biochim Biophys Acta* 1761:151–9
148. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–24
149. Loewen CJ, Gaspar ML, Jesch SA, Delon C, Ktistakis NT, Henry SA, Levine TP (2004) Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science* 304:1644–7
150. Munnik T, Arisz SA, De Vrije T, Musgrave A (1995) G Protein Activation Stimulates Phospholipase D Signaling in Plants. *Plant Cell* 7:2197–2210

151. Den Hartog M, Musgrave A, Munnik T (2001) Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant J* 25:55–65
152. Van der Luit AH, Piatti T, van Doorn A, Musgrave A, Felix G, Boller T, Munnik T (2000) Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol* 123:1507–16
153. De Jong CF, Laxalt AM, Bargmann BO, de Wit PJ, Joosten MH, Munnik T (2004) Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction. *Plant J* 39:1–12
154. Pascual F, Carman GM (2013) Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1831:514–22
155. Toke DA, Bennett WL, Oshiro J, Wu WI, Voelker DR, Carman GM (1998) Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* LPP1 gene encoding a Mg<sup>2+</sup>-independent phosphatidate phosphatase. *J Biol Chem* 273:14331–8
156. Wente SR, Rout MP (2010) The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000562
157. Goldfarb DS, Gariépy J, Schoolnik G, Kornberg RD (1986) Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 322:641–4
158. Dingwall C, Robbins J, Dilworth SM, Roberts B, Richardson WD (1988) The nucleoplasmic nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J Cell Biol* 107:841–9
159. Pemberton LF, Paschal BM (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6:187–98
160. Kalab P, Weis K, Heald R (2002) Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295:2452–6
161. Aitchison JD, Rout MP (2012) The yeast nuclear pore complex and transport through it. *Genetics* 190:855–83
162. Huh W-KK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O’Shea EK (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425:686–91
163. Chook YM, Süel KE (2011) Nuclear import by karyopherin- $\beta$ s: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta* 1813:1593–606
164. Leslie DM, Zhang W, Timney BL, Chait BT, Rout MP, Wozniak RW, Aitchison JD (2004) Characterization of karyopherin cargoes reveals unique mechanisms of Kap121p-mediated nuclear import. *Mol Cell Biol* 24:8487–503
165. Walker SS, Shen WC, Reese JC, Apone LM, Green MR (1997) Yeast TAF(II)145 required for transcription of G1/S cyclin genes and regulated by the cellular growth state. *Cell* 90:607–14
166. Mosammaparast N, Guo Y, Shabanowitz J, Hunt DF, Pemberton LF (2002) Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem* 277:862–8
167. Imamura K, Ogura T, Kishimoto A, Kaminishi M, Esumi H (2001) Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5’-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 287:562–7
168. Igata M, Motoshima H, Tsuruzoe K, et al (2005) Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circ Res* 97:837–44
169. Raboy B, Marom A, Dor Y, Kulka RG (1999) Heat-induced cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the RAD6/UBC2 and WSC2 genes in its reversal. *Mol Microbiol* 32:729–39
170. Zimmermann C, Chymkowitch P, Eldholm V, Putnam CD, Lindvall JM, Omerzu M, Bjørås M, Kolodner RD, Enserink JM (2011) A chemical-genetic screen to unravel the genetic network of CDC28/CDK1 links ubiquitin and Rad6-Bre1 to cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18748–53
171. Doyle SM, Genest O, Wickner S (2013) Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:617–29

172. Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670–84
173. Ceschin J, Hürlimann HC, Saint-Marc C, Albrecht D, Violo T, Moenner M, Daignan-Fornier B, Pinson B (2015) Disruption of Nucleotide Homeostasis by the Antiproliferative Drug 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -d-ribofuranoside Monophosphate (AICAR). *J Biol Chem* 290:23947–59
174. Cai L, Tu BP (2012) Driving the cell cycle through metabolism. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:59–87
175. Xu Q, Yang C, Du Y, et al (2014) AMPK regulates histone H2B O-GlcNAcylation. *Nucleic Acids Res* 42:5594–604
176. Hu D, Gao X, Morgan MA, Herz H-MM, Smith ER, Shilatifard A (2013) The MLL3/MLL4 branches of the COMPASS family function as major histone H3K4 monomethylases at enhancers. *Mol Cell Biol* 33:4745–54
177. Hürlimann HC, Laloo B, Simon-Kayser B, Saint-Marc C, Couplier F, Lemoine S, Daignan-Fornier B, Pinson B (2011) Physiological and toxic effects of purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide (AICAR) in yeast. *J Biol Chem* 286:30994–1002

## **IX. Annexe**

En tant que co-auteur de l'article « Disruption of Nucleotide Homeostasis by the Antiproliferative Drug 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -d-ribofuranoside Monophosphate (AICAR). », j'ai réalisé la Figure 7A. L'article complet se trouve ci-dessous.

# Disruption of Nucleotide Homeostasis by the Antiproliferative Drug 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside Monophosphate (AICAR)\*

Received for publication, March 31, 2015, and in revised form, July 19, 2015. Published, JBC Papers in Press, August 17, 2015, DOI 10.1074/jbc.M115.656017

Johanna Ceschin<sup>†§</sup>, Hans Caspar Hürlimann<sup>†§1</sup>, Christelle Saint-Marc<sup>†§</sup>, Delphine Albrecht<sup>†§</sup>, Typhaine Violo<sup>†§</sup>, Michel Moenner<sup>†§</sup>, Bertrand Daignan-Fornier<sup>†§2,3</sup>, and Benoît Pinson<sup>†§2</sup>

From the <sup>†</sup>Université de Bordeaux and the <sup>§</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires UMR 5095, Saint-Saëns, F-33077 Bordeaux, France

**Background:** AICAR is a potent anti-proliferative compound, but the basis of its cytotoxicity is poorly understood.

**Results:** AICAR affects NTP homeostasis in a carbon source-dependent way, in both yeast and human cells.

**Conclusion:** AICAR balance with nucleotides triphosphate is critical for its *in vivo* effects.

**Significance:** AICAR is significantly more cytotoxic on glucose and thus potentially targets cells prone to Warburg effect.

5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside monophosphate (AICAR) is a natural metabolite with potent anti-proliferative and low energy mimetic properties. At high concentration, AICAR is toxic for yeast and mammalian cells, but the molecular basis of this toxicity is poorly understood. Here, we report the identification of yeast purine salvage pathway mutants that are synthetically lethal with AICAR accumulation. Genetic suppression revealed that this synthetic lethality is in part due to low expression of adenine phosphoribosyl transferase under high AICAR conditions. In addition, metabolite profiling points to the AICAR/NTP balance as crucial for optimal utilization of glucose as a carbon source. Indeed, we found that AICAR toxicity in yeast and human cells is alleviated when glucose is replaced by an alternative carbon source. Together, our metabolic analyses unveil the AICAR/NTP balance as a major factor of AICAR antiproliferative effects.

Purine nucleotides are key metabolites that are efficiently interconverted resulting in fine-tuned balances between adenylic and guanylic derivatives but also between mono-, di-, and triphosphate species. In particular, the AMP to ATP ratio is a major metabolic signal informing the cell about its energy state. When energy is required, ATP is consumed, and the resulting ADP is used to replenish the ATP pool in part via the adenylate kinase reaction that generates AMP and ATP from two molecules of ADP. This reaction does not require exogenous energy and can thus rapidly refill the ATP pool upon demand. However, this reaction is limited by the size of the AXP pool and rapidly leads to ADP depletion and AMP accumulation.

Increased AMP concentration is perceived as a low energy signal and contributes to redirect the metabolism to catabolism (energy providing reactions) notably via activation of the AMP-kinase (AMPK).<sup>4</sup> Metabolic transitions can therefore be experimentally triggered by modifying the AMP/ATP ratio. However, AMP accumulation is difficult to control experimentally, and an AMP mimic molecule named AICAR (Fig. 1A), which can be provided as a riboside precursor form (AICAR; Fig. 1A) in the growth medium, is often used as low energy mimetic. AICAR clearly activates AMPK *in vitro* and *in vivo* but also shows many effects that are not AMPK-dependent (1, 2). Whether these effects are the result of AMP mimicry or not is unknown. The yeast AMPK ortholog Snf1 is activated by ADP rather than AMP (3), and consistently the yeast AICAR transcriptional signature did not include genes described as strongly regulated by Snf1p (4). Yeast therefore is a good experimental system to study the effects of AICAR that are AMPK-independent. Identification of AMPK-independent targets of AICAR is crucial because it was recently established that the highly promising antiproliferative properties of AICAR are largely AMPK-independent (5, 6). Importantly, AICAR cytotoxic effects were higher on trisomic mouse embryonic fibroblasts than on their euploid counterpart (7). This property makes AICAR a promising anti-tumor molecule because most solid tumor cells are aneuploid, *i.e.* have an incorrect number of chromosomes.

As for mammalian cells, AICAR can be cytotoxic for yeast cells (8). Understanding the molecular basis of AICAR toxicity in yeast can thus give important clues on its effects in other eukaryotic cells. However, it should be stressed that, by opposition to mammalian cells, simple addition of AICAR to the growth medium does not result in AICAR monophosphate accumulation in yeast unless the *ADE16 ADE17* genes, encoding AICAR transformylase IMP-cyclohydrolase, are mutated (Fig. 1B) (5). This most probably reflects the fact that yeast

\* This work was supported by Association de la Recherche contre le Cancer Grant SFI-2012-120–5915 (to B. D.-F.) and Ligue contre le Cancer Project LARGE (to M. M.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

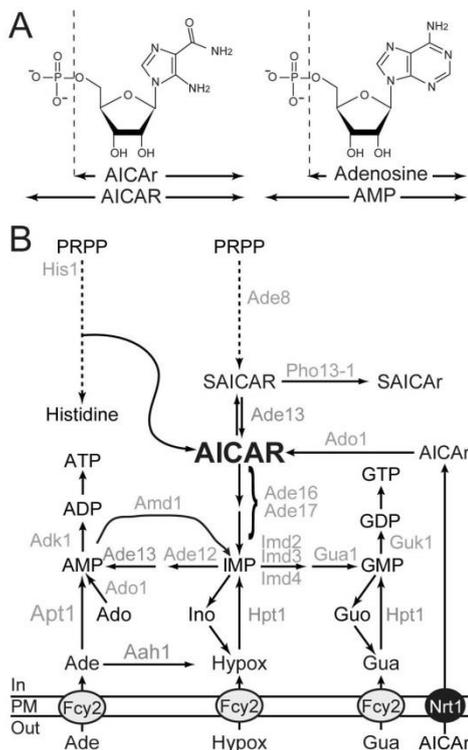
<sup>1</sup> Present address: Martin-Luther Universität, Genetik, Molekulargenetik, Weinbergweg 10, DE-06120 Halle, Germany.

<sup>2</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed: Inst. de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, 1 rue C. Saint-Saëns CS 61390, F-33077 Bordeaux, France. Tel.: 33-556-999-001; Fax: 33-556-999-059; E-mail: b.daignan-fornier@ibgc.cnrs.fr.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: AMPK, AMP-activated protein kinase; AdoMet, S-adenosylmethionine; AICAR, 5-amino-4-imidazole carboxamide ribonucleotide 5'-phosphate; AICAR, 5-amino-4-imidazole carboxamide ribonucleoside; SAH, S-adenosylhomocysteine; Adk, adenylate kinase.

## Metabolic Basis of AICAR Toxicity



**FIGURE 1. Schematic representation of purine and histidine pathways in yeast.** *A*, chemical structures of AICAR, AMP, and their riboside derivatives. *B*, only the enzymes mentioned in the text are indicated. *Ade*, adenine; *Ado*, adenosine; *Gua*, guanosine; *Hypox*, hypoxanthine; *Ino*, inosine; *PM*, plasma membrane; *PRPP*, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; *SAICAR*, succinyl-AICAR; *SAICAr*, succinyl-AICAR riboside; *S-AMP*, succinyl-AMP.

AICAR transformylase IMP-cyclohydrolase very efficiently metabolizes AICAR *in vivo* as discussed in Ref. 5. Thus, studies of AICAR effects in yeast necessitate adequate genetic backgrounds affecting synthesis and/or utilization of AICAR. We have previously shown that AICAR can be detoxified in its riboside form (AICAr) in an adenosine kinase mutant (*ado1*) unable to resynthesize AICAR from AICAr (9) (Fig. 1*B*). We also identified a mutant form of the phosphatase Pho13, named Pho13-1, which can detoxify succinyl-AICAR to succinyl-AICAR riboside and thereby diminish intracellular AICAR concentration (9) (Fig. 1*B*). Together, these results established that the riboside forms of AICAR and succinyl-AICAR are not toxic for yeast cells, a situation highly similar to what happens in mammalian cells where the vast majority of AICAR effects are abolished by adenosine kinase inhibitors (1). Thus, for both yeast and mammalian cells, it was concluded that AICAr riboside had to be metabolized to the monophosphate form to become active and cytotoxic. Transcriptomic analyses in yeast (4, 9) did not give any obvious key for AICAR toxicity, and thus the molecular mechanisms are still to be uncovered. To address this question, we took advantage of yeast genetics to isolate

mutants unable to grow under conditions where AICAR accumulates. Here, we describe such yeast mutants and connect their AICAR sensitivity to their metabolite profile. Our results point to the AICAR/NTP balance as a crucial feature of AICAR toxicity. Importantly, we established that AICAR toxicity is tightly linked to growth on glucose as a carbon source and can be largely alleviated by alternative carbon sources both in yeast and in mammalian cells. This glucose-specific toxicity of AICAR could potentially contribute to its antitumor properties because most cancer cells exclusively rely on glucose metabolism for energy production.

## Experimental Procedures

**Yeast Media, Strains, and Plasmids**—SD is a synthetic minimal medium containing 0.5% ammonium sulfate, 0.17% yeast nitrogen base (Difco), 2% glucose. SDcasaW is SD medium supplemented with 0.2% casamino acids (Difco) and tryptophan (0.2 mM). When indicated, adenine (0.3 mM), guanosine (1 mM), hypoxanthine (0.3 mM), inosine (1 mM), and/or uracil (0.3 mM) was added in SDcasaW medium, resulting in media named SDcasaWA (+ adenine), SDcasaWHypox (+ hypoxanthine), SDcasaWAU (+ adenine + uracil), and SDcasaWUHypox (+ hypoxanthine + uracil). Synthetic medium containing different carbon source correspond to SD medium in which glucose has been replaced by 2% of the indicated carbon source. SC medium was prepared as described by Sherman *et al.* (10). SC complete medium is SC medium supplemented with adenine (0.3 mM), uracil (0.3 mM), histidine (0.06 mM), leucine (0.4 mM), lysine (0.06 mM), and tryptophan (0.2 mM). YPD medium is a complete medium containing 1% yeast extract, 2% bacto-peptone, and 2% glucose. Yeast strains (Table 1) belong to, or are derived from, a set of disrupted strains isogenic to BY4741 or BY4742 purchased from Euroscarf. Multimutant strains were obtained by crossing, sporulation, and micromanipulation of meiosis progeny. Plasmids allowing overexpression of *AAH1* (p2088), *ADE12* (p1032), *ADE13* (p1971), *ADK1* (p2151 (11)), *AMD1* (p2479 (12)), *APT1* (p2091 (12)), *HPT1* (p2149 (13)), *GLU1* (p2141), *GUK1* (p1814), *IMD2* (p2093), *IMD3* (p2100), *IMD4* (p2102), and *PHO13-1* (p4291 (9)) were obtained by cloning in the pCM189 vector (*tet<sub>prom</sub>*, *CEN*, *URA3*) (14). Cloning details for the unpublished plasmids are available upon request.

**Isolation of AICAR-sensitive Mutants**—To obtain AICAR-sensitive mutants, an *ade16 ade17* strain (Y4999), transformed with a plasmid expressing the *PHO13-1* dominant allele under the control of a tetracycline-repressible promoter, was plated on SDcasaWA medium, mutagenized with UV-light for 40 s, and then grown for 48 h at 30 °C. The resulting clones were then transferred by replica-plating on the same medium alone or medium containing doxycycline (10 mg/liter) to repress *PHO13-1* expression. AICAR-sensitive mutants were isolated as clones unable to grow in the presence of doxycycline but growing in the absence of the antibiotic.

**Metabolite Extraction and Separation by Liquid Chromatography**—Extraction of yeast and mammalian cells metabolites was performed as described (5), and metabolite separation was performed on an ICS3000 chromatography station (Dionex, Sunnyvale, CA) using a carbo-pac PA1 column

**TABLE 1**  
List of yeast strains used in this study

Strain name	Genotype
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
Y178	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y1095	<i>MATα ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y1127	<i>MATa hpt1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
Y1759	<i>MATα apt1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y2080	<i>MATa aah1::kanMX4 amd1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
Y2340	<i>MATa aah1::kanMX4 ade8::kanMX4 his3Δ1 leu2 Δura3Δ0</i>
Y2950	<i>MATα ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y3578	<i>MATα adk1::kanMX4 amd1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y4479	<i>MATα his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y4499	<i>MATa ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y5864	<i>MATa hpt1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y5868	<i>MATα hpt1::kanMX4 ade16::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y5870	<i>MATα ade16::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y5873	<i>MATα hpt1::kanMX4 ade17::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y5876	<i>MATα ade17::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y6750	<i>MATa aah1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ ura3Δ0</i>
Y6986	<i>MATα ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y7205	<i>MATα aah1-308 ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0 [tet-PHO13-1]</i>
Y7314	<i>MATα pdc2 (L234S) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y7320	<i>MATα adel3 (G166S) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y7321	<i>MATα thi3 (S402F) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y8480	<i>MATa ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y8793	<i>MATa ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 aah1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y8845	<i>MATα thi80 (L90P) ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y9303	<i>MATα aah1-308 ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 his3Δ1::HIS3-LEU2 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y9798	<i>MATα aah1::kanMX4 ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
Y10314	<i>MATa APT1-GFP-HIS3 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>
Y10351	<i>MATa ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 APT1-GFP-HIS3 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>
Y10399	<i>MATa ade16::kanMX4 ade17::kanMX4 ade8::kanMX4 his1::kanMX4 kcs1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>

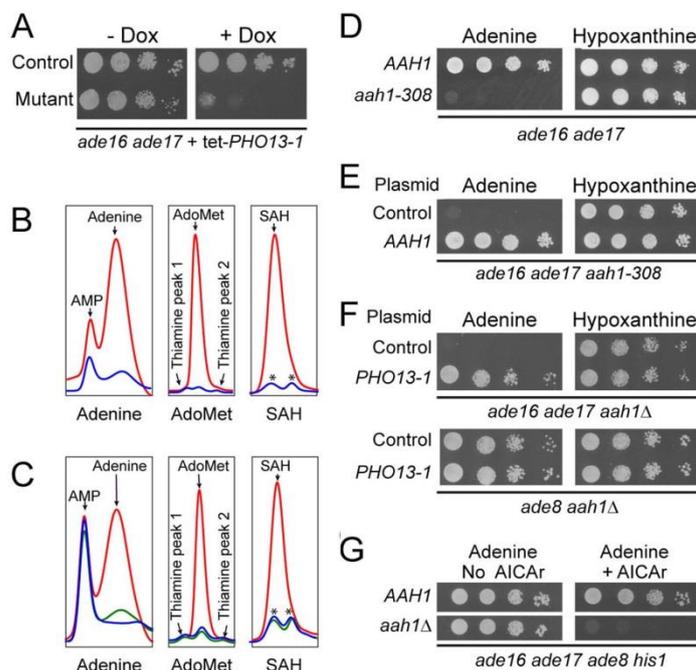
(250 × 2 mm; Dionex) with the 50–800 mM acetate gradient in 50 mM NaOH described in Ref. 15. Peaks were identified by their retention time, as well as by co-injection with standards and/or their UV spectrum signature.

**Mammalian Cells**—HeLa cells (ATCC, CCL-2) were propagated in DMEM, 4.5 g/liter glucose, 10% FCS, L-glutamine, and penicillin/streptomycin. Cells were then trypsinized and washed twice by centrifugation in glucose-free DMEM (Gibco Life Technologies catalog no. 11966-025) containing 10% dialyzed FCS and 1 mM pyruvate. They were then seeded at the density of 30,000 cells/cm<sup>2</sup> in culture dishes that have been precoated for 2 h with 5 μg/ml fibronectin (Sigma catalog no. F4759) in PBS. The growth medium consisted of DMEM without glucose supplemented either with 5 mM glucose or 5 mM galactose and containing 10% dialyzed FCS, 1 mM pyruvate, 5 μg/ml insulin, 10 ng/ml EGF, 2 ng/ml FGF-2, and penicillin/streptomycin. After 24 h, AICAR was added to the culture medium, and the cells were further allowed to grow for 48 h. AICAR toxicity was determined by counting cells with a MultiSizer 4 Coulter counter (Beckman).

**Enzymatic Activities**—For enzymatic activities, all measurements were done in initial rate conditions that were stable for at least 3 min at 30 °C for all enzymes tested. A potential effect of AICAR on enzymatic activities was tested by preincubating or not the protein extracts with AICAR (1 mM) for 2 min before substrate addition. Finally, all enzymatic reactions were stopped by boiling (3 min at 80 °C) a 100-μl aliquot of the reaction mix in 900 μl of ethanol/10 mM Hepes, pH 7 (4/1, v/v). Quantification of the reaction product(s) was done by liquid chromatography in the conditions described for intracellular metabolites determination. AMP deaminase enzymatic activity was measured by a method adapted from (16). Briefly, a total

yeast protein extract was obtained from *adk1 amd1* mutant cells (Y3578) overexpressing (p2479) or not (pCM189) *AMD1* and grown in SDcasaWA medium (100 ml, 5 × 10<sup>7</sup> cells/ml). After harvesting, cells were resuspended in 500 μl of buffer A (50 mM triethanolamine, pH 7, 0.1 M KCl, and 100 μM dithiothreitol) and were disrupted by vortexing with glass beads (1 min, three times). The extract was then dialyzed twice against 2 liters of buffer A containing 10% (m/v) glycerol. Enzymatic activity was measured in 500 μl of buffer A containing AMP (100 μM), ATP (100 μM), and the protein extract (250 μg, added at time 0). AMP deaminase specific activity corresponds to nmol IMP synthesized/min/mg of protein. No IMP synthesis was detected in a protein extract obtained from the strain containing the pCM189 empty vector. Adenine phosphoribosyl transferase activity was determined using a total protein extract from an *aah1 amd1* mutant strain (Y2080) containing a plasmid allowing overexpression of *APT1* (p2091), as described in Ref. 17 but with modifications. Yeast cells grown in SDcasaW medium were harvested (100 ml; 5 × 10<sup>7</sup> cells/ml) and disrupted in 500 μl of 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, and 10% glycerol (buffer B). The suspension was then centrifuged for 1 h at 21,000 × g and 4 °C, and the supernatant was dialyzed twice against 2 liters of buffer B. Enzymatic activity was measured in 500 μl of 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mg/ml BSA, 100 μM phosphoribosyl pyrophosphate, 10, 50 or 100 μM adenine, 0 or 1 mM AICAR, and 12 μg of protein extract (added at time 0). Adenine phosphoribosyl transferase specific activity was defined as nmol of AMP synthesized/min/mg of protein. No AMP synthesis was detected in the absence of phosphoribosyl pyrophosphate. Adenylate kinase (Adk) activity was measured on *Saccharomyces cerevisiae* purified protein (Merck Millipore

## Metabolic Basis of AICAR Toxicity



**FIGURE 2. AICAR toxicity is strongly increased in an adenine deaminase mutant using adenine as an external purine source.** *A*, the AICAR-sensitive mutant (Y7205) and the cognate reference strain (Y4499), both containing the Tet-OFF *PHO13-1* expression plasmid (P4291), were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWA medium with or without doxycycline (Dox, 10 mg/l). *B*, strains from Fig. 2*A* (wild type, blue line; mutant, red line) were kept in the exponential phase in SDcasaWA medium for 24 h and were then incubated with doxycycline (10 mg/liter) for 4 h prior to metabolite extraction and separation. Asterisks indicate unidentified peaks found in the control strain that do not correspond to SAH. *C*, metabolite content was determined from wild type (WT, Y178, blue line), *aah1* (Y6750, red line), and *apt1* (Y1759, green line) cells grown in SDcasaWU medium. *D*, the *ade16 ade17* (*AAH1*, Y4499) and *ade16 ade17 aah1-308* (*aah1-308*, Y9303) strains were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaW medium containing either adenine or hypoxanthine as an extracellular purine source. *E*, plasmids expressing (P2088) or not (control, pCM189) the *AAH1* gene were transformed in the *ade16 ade17 aah1-308* (*aah1-308*, Y9303) strain, and transformants were serially diluted and spotted on SDcasaW medium containing either adenine or hypoxanthine. *F*, the *ade16 ade17 aah1* (Y8793) and *ade8 aah1* (Y2340) strains were transformed with either the tet-*PHO13-1* expression plasmid (P4291) or the pCM189 empty vector (Control). Transformants were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaW medium supplemented with either adenine or hypoxanthine, as an external purine source. *G*, mutant cells (*ade16 ade17 ade8 his1* (Y2950); *aah1 ade16 ade17 ade8 his1* (Y9798)) were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWU medium with or without external AICAR (5 mM). In *A* and *D*–*G*, the plates were imaged after 2 days at 30 °C.

catalog no. 474951) with a method derived from Ref. 18. The reaction mixture (500  $\mu$ l) contained 100 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ADP, and 10 ng of purified Adk. Specific activity was defined as the amount of ATP synthesized/min/mg of purified protein.

**Miscellaneous Methods**—Yeast growth drop test were performed as described in Ref. 12.

### Results

**Mutations in the *AAH1* Gene Are Synthetically Lethal with *ade16 ade17* Mutations Resulting in AICAR Accumulation in Vivo**—To isolate mutants which are affected by AICAR accumulation, we started from an *ade16 ade17* double mutant that constitutively accumulates AICAR (~1 mM compared with ~1  $\mu$ M in the wild-type strain (4)). In this double mutant strain, we introduced a plasmid carrying the *PHO13-1* gene under control of a doxycycline repressible promoter. When expressed, *PHO13-1* decreases AICAR intracellular concentration (9). We then isolated mutants that grew when *PHO13-1* was expressed

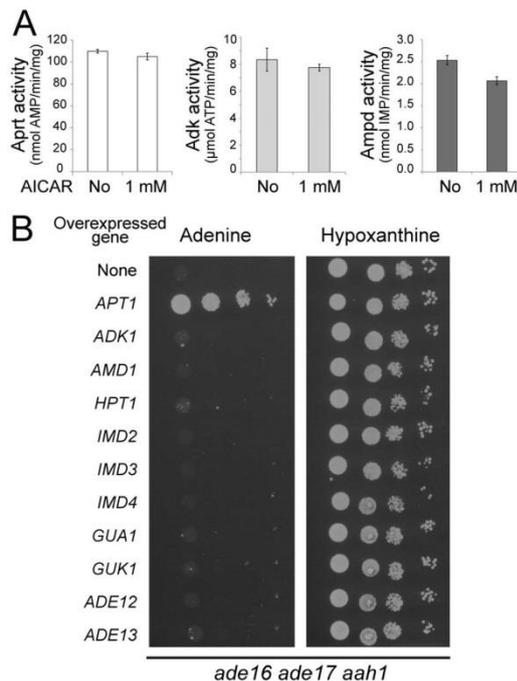
(low intracellular AICAR) but were unable to grow in the presence of doxycycline (high intracellular AICAR). One of these AICAR-sensitive mutants (Fig. 2*A*) was further studied. This mutant showed an atypical metabolite profile characterized by the massive intracellular accumulation of adenine, *S*-adenosylmethionine (AdoMet) and *S*-adenosylhomocysteine (SAH) (Fig. 2*B*). The intracellular adenine accumulation was particularly intriguing because this metabolite is usually hardly detectable, most probably as a result of its active utilization by adenine deaminase (Aah1) and adenine phosphoribosyltransferase (Apt1) (Fig. 1*B*). Adenine accumulation suggested that *APT1* or *AAH1* could be affected in this mutant strain. Metabolite profiling of *apt1* and *aah1* single knock-out mutants in the same conditions revealed that only the *aah1* mutant accumulates high levels of adenine, AdoMet, and SAH (Fig. 2*C*, red lines). Together, these results suggested that *AAH1* could be the mutated gene resulting in the synthetic lethality when combined with the *ade16 ade17* mutations. Accordingly, sequencing of the *AAH1* locus in this mutant revealed a stop codon at

position 308, resulting in a protein lacking the 39 C-terminal residues. As expected, the mutant could grow in the absence of the *tet-PHO13-1* plasmid on hypoxanthine (Fig. 2D), a purine source that bypasses the requirement for Aah1 (Fig. 1B), and the synthetic lethality of the mutant on adenine medium was complemented by the *AAH1* gene carried on a plasmid (Fig. 2E). Finally, a reconstituted *ade16 ade17 aah1* triple knock-out mutant was unable to grow on adenine but grew perfectly well on hypoxanthine (Fig. 2F), just as the original mutant from the screen (Fig. 2D). As expected, accumulation of adenine, SAH, and SAM was resumed in the reconstituted mutant (data not shown). In addition, we observed that this mutant had ATP and GTP pools lower by 30 and 60%, respectively (see next section). We conclude that *ade16 ade17* and *aah1* are synthetically lethal specifically on adenine-containing medium.

Importantly, this synthetic lethality of *ade16 ade17 aah1* on adenine was indeed caused by AICAR accumulation because an *ade8 aah1* mutant showed no growth impairment, and the overexpression of *PHO13-1* restored growth of the triple *ade16 ade17 aah1* mutant (Fig. 2F). Finally, an *aah1 ade16 ade17 ade8 his1* mutant, unable to produce endogenous AICAR, grew perfectly well on adenine unless AICAR riboside was added to the growth medium (Fig. 2G). Importantly, the *ade16 ade17 ade8 his1* strain carrying the wild-type *AAH1* allele was able to grow in the presence of AICAR (Fig. 2G). We conclude that AICAR accumulation enables proliferation when Aah1 is not functional.

**AICAR Affects ATP and GTP Intracellular Concentration**—The low ATP and GTP pools, found in the *aah1 ade16 ade17* mutant, suggested that AICAR affected the purine interconversion pathway. Because AICAR can act as an AMP mimetic on AMPK, we reasoned that it could affect enzymes responsible for synthesis (Apt1) or consumption (Adk1, Amd1) of AMP (Fig. 1B). However, *in vitro* enzymatic assays showed no major effect of AICAR on Apt1, Adk1, and Amd1 specific activities (Fig. 3A). Although Apt1 enzymatic activity was not affected by AICAR *in vitro*, we found that *APT1* overexpression robustly suppressed the *aah1 ade16 ade17* lethality on adenine (Fig. 3B). Importantly, none of the other purine salvage pathway genes could allow growth on adenine when overexpressed (Fig. 3B).

We next attempted to understand the basis of AICAR cytotoxicity by analyzing the metabolite profiles of both an *ade16 ade17 aah1* triple mutant and an *aah1* single mutant grown in various conditions. Among the eight combinations tested, a strong growth defect was only observed in the triple *ade16 ade17 aah1* mutant grown on adenine containing medium and not overexpressing *APT1* (condition marked by an arrow in Fig. 4A). The metabolite profiling first showed that accumulation of adenine, AdoMet, and SAH is unlikely to cause the growth defect, because levels of these metabolites were similar in the *aah1* and *aah1 ade16 ade17* strains (Fig. 4, B–D), which are respectively able and unable to grow in the presence of adenine (Fig. 4A). Second, we observed that the ATP and GTP intracellular concentrations were lowered in the *ade16 ade17 aah1* strain grown on adenine (Fig. 4, E and F). This result suggested that, in this strain, synthesis of AMP from adenine by Apt1 was not sufficient to satisfy cellular needs for GTP and ATP. Indeed, overexpression of Apt1 restored higher levels of both ATP and

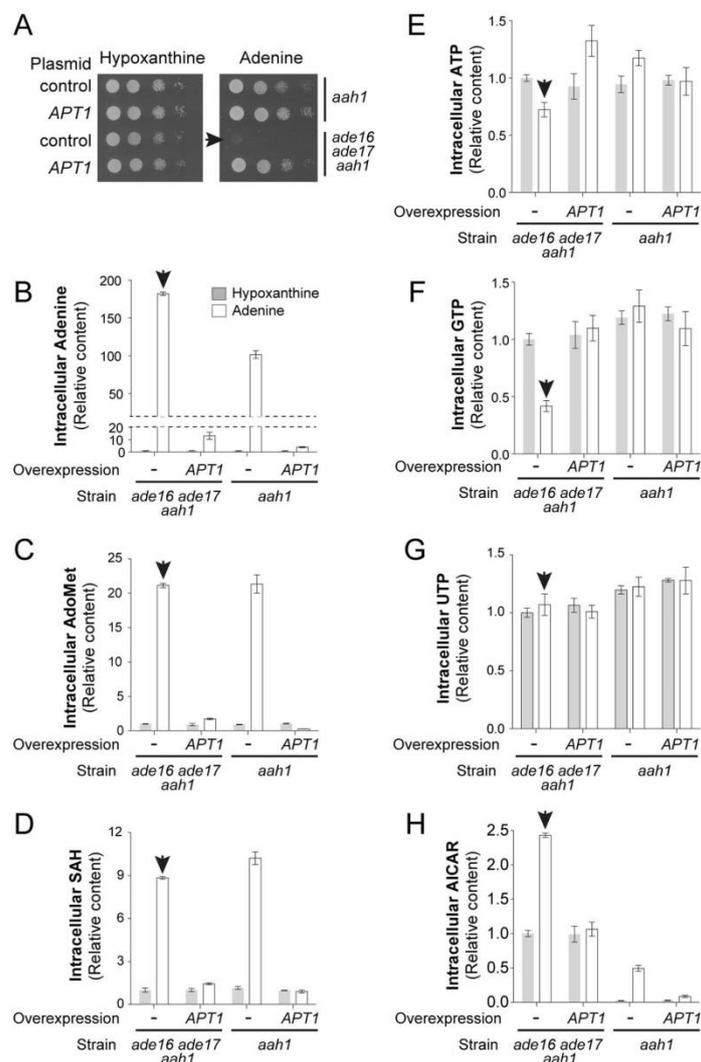


**FIGURE 3. AICAR does not affect enzymatic activities of AMP-metabolizing enzymes** *A*, adenine phosphoribosyl transferase (Apt1), Adk, and AMP deaminase (Ampd) enzymatic activities were determined as described under "Experimental Procedures." For each enzyme, specific activities were determined in the presence or the absence of AICAR. *B*, the *ade16 ade17 aah1* (Y8793) strain was transformed with plasmids allowing overexpression of the indicated genes or the pCM189 empty vector (none). Transformants were grown overnight, serially diluted, and spotted on SD<sub>cas</sub>W medium supplemented with either adenine or hypoxanthine as an external purine source.

GTP (Fig. 4, E and F) and allowed robust growth in the presence of adenine (Fig. 4A). In good agreement with a role of both ATP and GTP pools in AICAR sensitivity, overexpression of Adk1 or Hpt1 that only partially restored the ATP and GTP pools, respectively (Fig. 5, A and B), did not allow growth (Fig. 3B). Consistently, the growth defect of the mutant was much more efficiently rescued by inosine that can refuel the pathway for both ATP and GTP than by guanosine that only contributes to GTP synthesis (Figs. 1B and 5C). This effect on nucleotide triphosphate appears limited to purine nucleotides because UTP levels were not affected by the purine source or by overexpression of Apt1 (Fig. 4G). Finally and most importantly, overexpression of *APT1* significantly lowered the intracellular AICAR content (Fig. 4H). Thus, in the AICAR-sensitive condition, AICAR is overaccumulated, whereas purine nucleotide triphosphate levels are lowered.

**Mutations in the HPT1 and ADE13 Genes Are Synthetically Lethal with AICAR Accumulation**—We then asked whether this effect was Aah1-specific or whether blocking adenine utilization downstream of Aah1 would also result in AICAR-dependent lethality. We therefore mated a *hpt1* mutant that cannot transform hypoxanthine into IMP (Fig. 1B) with an *ade16*

## Metabolic Basis of AICAR Toxicity



**FIGURE 4. Impairment of growth and metabolite content of the *ade16 ade17 aah1* mutant is suppressed by *APT1* overexpression.** *A*, strains (*aah1*: Y6750; *ade16 ade17 aah1*: Y8793) were transformed with the *APT1* expressing plasmid (P2091) or the pCM189 empty vector (control). Transformants were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaW medium supplemented with either adenine or hypoxanthine. *B–H*, transformants from Fig. 4*A* were kept in exponential growth for 24 h in SDcasaW medium supplemented with either adenine or hypoxanthine, harvested by centrifugation, resuspended in SDcasaW medium supplemented with either adenine or hypoxanthine, and grown for 4 h at 30 °C prior to metabolite extraction and separation. Quantifications were determined from at least three independent metabolite extractions for each condition. *Error bars* indicate variations to the mean. In all panels, the no growth condition is highlighted by the arrowhead. Metabolite content of the *ade16 ade17 aah1* mutant strain containing the empty vector and grown in hypoxanthine medium was used as the reference and was set at 1.

*ade17* double mutant accumulating AICAR. The tetrads obtained from the resulting diploid were dissected on an adenine-containing medium. Strikingly, among 14 tetrads, no triple *ade16 ade17 hpt1* mutant was recovered (Fig. 6*A* and not shown). We conclude that *hpt1* is synthetically lethal in combination with *ade16 ade17*. Importantly, the knock-out of *hpt1* is

not synthetically lethal with other mutations in the *de novo* pathway such as *ade2* (13, 19). To circumvent the *ade16 ade17 hpt1* synthetic lethality, we used an *ade17 hpt1* double mutant that is viable but showed a growth defect (Fig. 6*A*, underlined). Of note, Ade17 is the AICAR transformylase IMP-cyclohydrolase isoform that contributes more than 90% of the

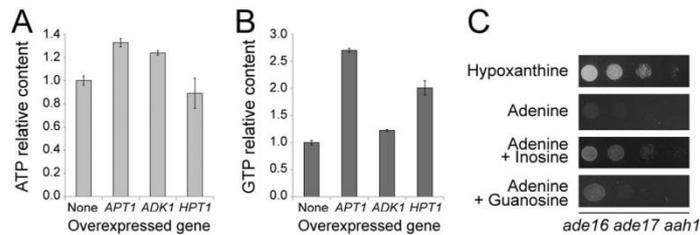


FIGURE 5. ATP and GTP are both limiting for growth of the *ade16 ade17 aah1* mutant on adenine. A and B, the *ade16 ade17 aah1* (Y8793) strain was transformed with plasmids allowing or not allowing (None, pCM189) overexpression of the indicated genes. Transformants were kept in exponential phase for 24 h in SDcasaW medium supplemented with hypoxanthine, harvested by centrifugation, resuspended in SDcasaWA medium, and grown for 4 h at 30 °C prior to metabolic extraction and separation. Quantifications were determined from at least three independent metabolite extractions. Error bars indicate variations to the mean. ATP and GTP contents in cells containing the empty vector were used as reference and were set at 1. C, the *ade16 ade17 aah1* mutant strain (Y8793) transformed with a plasmid expressing the hCNT3 nucleoside transporter was grown overnight in SDcasaWHypox medium, serially diluted, and spotted on SDcasaW medium supplemented with the indicated nucleobase and/or nucleoside used as purine sources.

enzymatic activity (20). This growth impairment was further enhanced when AICAR production was stimulated by growth in the absence of histidine (Fig. 6B) (9). Importantly, overexpression of *APT1* suppressed the growth impairment of the *hpt1 ade17* mutant in the absence of histidine (Fig. 6C). Metabolite profiling of the *ade17 hpt1* mutant revealed that this double mutant, grown in the absence of histidine, accumulated a significant amount of AICAR and that overexpression of *APT1* strongly reduced this AICAR accumulation (Fig. 6D). Importantly, in the *ade17 hpt1* mutant, overexpression of *APT1* also increased ATP and GTP levels, whereas it had little or no effect on UTP (Fig. 6D). Together, our results establish that accumulation of AICAR is highly toxic when yeast cells are unable to synthesize purine *de novo* and to utilize hypoxanthine.

This prompted us to search for mutants unable to use hypoxanthine as a purine source in our collection of AICAR-sensitive mutants (5). This was indeed the case for the *ahs15* mutant (Fig. 6E). Metabolite profiling of *ahs15* revealed massive accumulation of succinyl-AMP (Fig. 6F), the substrate of Ade13, the adenylosuccinate lyase (Fig. 1B). Accordingly, both hypoxanthine utilization defect and AICAR sensitivity were fully complemented by the *ADE13* gene carried on a plasmid (Fig. 6E). Furthermore, AICAR sensitivity co-segregated with the incapacity to use hypoxanthine in 10 tetrads (not shown). Sequencing of the *ADE13* locus in the *ahs15* mutant revealed a single mutation resulting in a glycine to serine substitution at position 166 in the protein. This mutation co-segregated with AICAR sensitivity and hypoxanthine auxotrophy in all 10 tetrads (not shown). We conclude that *ahs15* is allelic to *ADE13*. Finally, metabolite profiling of the *ahs15* mutant revealed that this mutant had higher levels of AICAR and lower levels of purine nucleotide triphosphate (Fig. 6F). Thus, as for the *aah1* mutant, AICAR sensitivity in the *hpt1* and *ade13* mutants is associated to high AICAR and low ATP and GTP levels.

We propose that ATP and AICAR exert a negative cross-effect on their reciprocal synthesis and that the AICAR/ATP balance is crucial for growth. This was confirmed by analyzing a set of 18 yeast strains (all derived from an *ade16 ade17 ade8 his1* background) accumulating various amounts of AICAR (Fig. 7A, gray dots). We indeed found a strong negative correlation between the concentrations of AICAR and ATP. In particular, mutants stimulating AICAR uptake (*thi3*, *thi80*, or *pdc2*

(4)) all strongly increased intracellular AICAR while severely decreasing ATP concentration (Fig. 7A, gray dots) compared with the *ade16 ade17 ade8 his1* control strain (Fig. 7A, black dot). Because these uptake mutants are not directly connected to purine metabolism, we conclude that the AICAR-ATP connection is a general phenomenon not restricted to a subset of specific mutants.

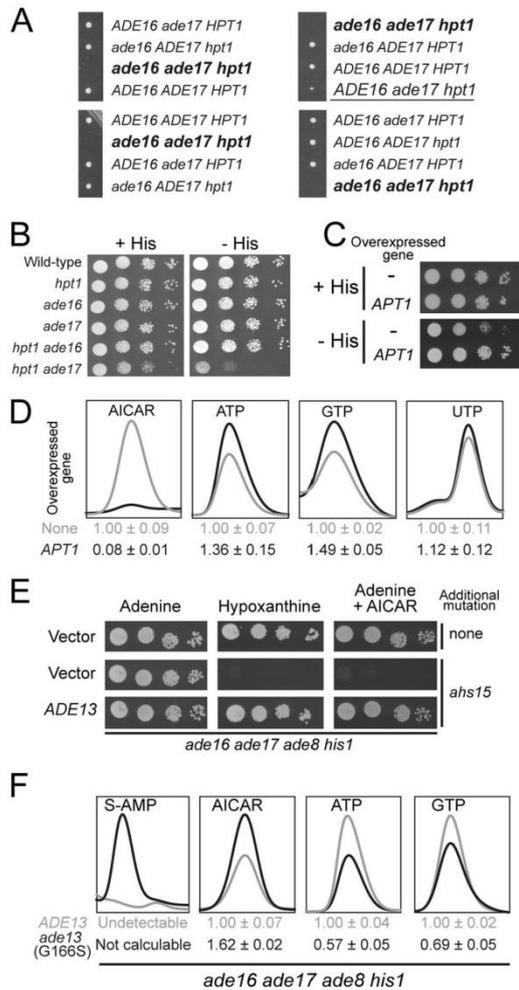
This was further established by studying the ATP/AICAR balance in the *ade16 ade17 ade8 his1* strain supplemented with various concentrations of AICAR. Once again, we found a strong inverse connection between the two metabolites (Fig. 7B).

Finally, we took advantage of a *kcs1* knock-out mutant previously shown to accumulate higher concentrations of ATP than the wild-type strain (21). The *kcs1* knock-out was combined with the *ade16 ade17 ade8 his1* mutations. As expected, the *kcs1* mutation resulted in increased intracellular ATP concentration (Fig. 7C), whereas AICAR was not significantly affected (Fig. 7D). Of note, in this mutant ATP accumulation does not impact on AICAR concentration because AICAR is provided from the medium in its riboside form and not from ATP-repressible *de novo* pathway. Most importantly, the *kcs1* mutation allowed a robust growth in the presence of AICAR, even though it showed reduced growth in the absence of AICAR (Fig. 7E).

Together, these results establish that AICAR impacts on the ATP concentration and that ATP affects AICAR toxicity. We conclude that disruption of nucleotide homeostasis by AICAR is critical for its effects on yeast cell proliferation.

**AICAR Affects Glucose Utilization and Slows Down Growth Recovery after Glucose Replenishment**—How does AICAR impact on ATP synthesis? Based on the suppression results, we reasoned that expression of Apt1 could be affected by AICAR. Indeed, the Apt1 steady state level was 4–5-fold lower in an AICAR accumulating strain (Fig. 8A). This could in part be due to the reduced transcription of *APT1* (1.7-fold) found in microarray experiments comparing an *ade16 ade17* strain accumulating AICAR to an isogenic wild-type strain (4). We conclude that down-expression of Apt1 in the presence of AICAR could limit AMP synthesis and contribute to the low purine nucleotide pools found in the AICAR-accumulating yeast cells. However, we found that overexpression of *APT1*

## Metabolic Basis of AICAR Toxicity



**FIGURE 6. AICAR accumulation is highly toxic for cells unable to use hypoxanthine as an external purine source.** *A*, the diploid strain obtained by crossing *ade16 ade17* (Y1095) and *hpt1* (Y1127) strains was sporulated, and spores were separated by micromanipulation on YPDAUW medium. The *ade17 hpt1* double mutant is *underlined*. Deduced genotype of lacking spores corresponding to the unviable triple mutant is shown in *bold type*. *B*, cells were grown overnight, serially diluted, and spotted on SC medium containing adenine and lacking (– His) or not (+ His) histidine. Wild type: Y4479; *hpt1*: Y5864; *ade16*: Y5870; *ade17*: Y5876; *ade16 ade17*: Y5868 and *hpt1 ade17*: Y5873. *C*, cells (*hpt1 ade17*: Y5873) were transformed with the *APT1* expressing plasmid (P2091) or the empty vector (pCM189). Transformants were grown overnight, serially diluted, and spotted on SC medium containing adenine and lacking (– His) or not (+ His) histidine. *D*, transformants from *C* were kept in exponential growth for 24 h in SC-U medium supplemented with histidine, harvested by centrifugation, resuspended in SC-U medium lacking histidine, and grown for 4 h at 30 °C prior to metabolite extraction. Quantifications were determined from at least three independent metabolite extractions, and the standard deviations are presented. Metabolite content of cells not overexpressing *APT1* were used as reference and set at 1. *E*, mutant cells (*ade16 ade17 ade8 his1* (Y6986); *ahs15 ade16 ade17 ade8 his1* (Y7320)) were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDCasaWU medium supplemented with either adenine or hypoxanthine and with or without external

could neither fully suppress the AICAR sensitivity of the *ade13* mutant nor increase the ability of a wild-type strain to grow in the presence of AICAR (Fig. 8*B*). We conclude that *Apt1* down-expression in the presence of AICAR contributes to AICAR sensitivity but does not account for all of it.

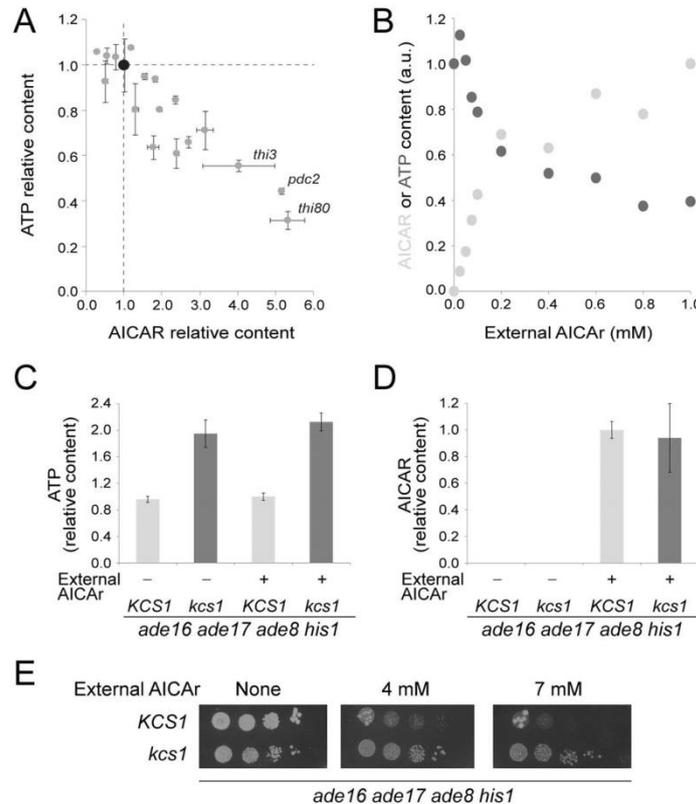
Then the question remains as to how AICAR impacts on ATP synthesis aside from its effects on the *Apt1* steady state level. One obvious possibility would be that AICAR affects ATP production from ADP, which in yeast mainly takes place via the glycolytic pathway when cells are grown on glucose as a carbon source. Should this be true, such AICAR effects would be lost on carbon sources that do not require the glycolytic pathway. To address this issue, we grew the *ahs15 ade16 ade17* triple mutant on various carbon sources in the presence of adenine or hypoxanthine as a purine source. Clearly the triple mutant could grow on all media containing hypoxanthine as a purine source (Fig. 9*A*), although growth was slower on strict respiratory media. When adenine was the purine source, the triple mutant did not grow on glucose or fructose but grew on galactose, lactate, and glycerol/ethanol media (Fig. 9, *A* and *B*). This result thus establishes that AICAR cytotoxicity is strongly modulated by the carbon source.

Importantly, metabolite profiling of the *ahs15 ade16 ade17* strain revealed that growth in galactose resulted in higher ATP and GTP levels, whereas AICAR levels were concomitantly significantly reduced (Fig. 9*C*). Thus, the growth phenotype (Fig. 9*A*) was once again strictly correlated to the AICAR balance with ATP and GTP (Fig. 9*C*). Of note, the UTP pool was reduced on galactose compared with glucose, possibly because of utilization of UTP for synthesis of UDP derivatives necessary for galactose utilization. These data showing that growth on galactose resulted in a much lower AICAR/ATP and AICAR/GTP ratios and allowed growth further support our assumption that the high AICAR/NTP ratio on glucose is detrimental for growth on this carbon source.

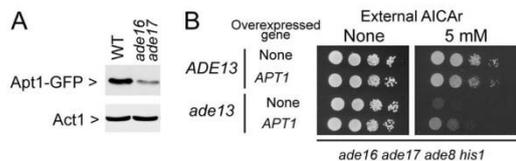
Consistently, we noticed that yeast strains accumulating AICAR, when shifted from post-diauxic growth conditions to fresh glucose medium, required a longer adaptation time before entry into exponential growth. During this adaptation period, known as “lag phase,” cell number remains relatively constant prior to rapid growth. The double *ade16 ade17* mutant, unable to metabolize AICAR and thus accumulating it, was compared with a wild-type strain and to a quadruple *ade16 ade17 ade8 his1* mutant that cannot synthesize nor metabolize AICAR. Clearly, the *ade16 ade17* AICAR-accumulating mutant had a much longer lag phase than the isogenic wild-type strain (Fig. 9*D*), although its doubling time during exponential growth was not increased (84 min compared with 89 min for the wild-type strain). Importantly, the longer lag-phase was not found in the *ade16 ade17 ade8 his1* mutant that does not accumulate AICAR (Fig. 9*D*), thereby indicating that AICAR and not the *ade16 ade17* block *per se* is responsible for this phenotype. Con-

AICAR (5 mM). The plates were imaged after 2 days at 30 °C. *F*, cells from Fig. 6*E* were kept in exponential growth for 24 h in SDCasaWU medium and subjected to metabolite extraction. Quantifications were determined from at least three independent metabolite extractions, and standard deviations are presented. Metabolite content in the *ADE13* cells was used as a reference and set at 1.

## Metabolic Basis of AICAR Toxicity



**FIGURE 7. AICAR/ATP balance is critical for AICAR toxicity.** *A*, strains were kept in exponential growth for 24 h in SDcasaWU medium at 30 °C and shifted at 37 °C for 30 min, and AICAr (1.72 mM) was added for 1 h prior to metabolite extraction. The *ade16 ade17 ade8 his1* (Y6986) control is shown in black, and the *thi3 ade16 ade17 ade8 his1* (Y7321), *thi80 ade16 ade17 ade8 his1* (Y8845), and *pdc2 ade16 ade17 ade8 his1* (Y7314) strains are indicated. The other mutants shown in gray correspond to unidentified AICAr-sensitive mutants. Quantifications were done on at least three independent metabolite extractions, and error bars indicate variation to the mean. AICAr and ATP contents of the control strain (black dot) were set at 1. *B*, the *ade16 ade17 ade8 his1* mutant strain (Y2950) was kept in exponential phase for 24 h in SDcasaWU medium containing the indicated concentrations of external AICAr prior to metabolite extraction and separation by liquid chromatography. AICAr (light gray dots) and ATP (dark gray dots) content was set at 1 for cells grown in medium containing either 1 mM or 0 mM of AICAr, respectively. *C* and *D*, ATP and AICAr content were determined on cells (*ade16 ade17 ade8 his1* (Y2950); light gray bars); *kcs1 ade16 ade17 ade8 his1* (Y10399), dark gray bars) exponentially grown for 24 h in SDcasaWU medium with (+) or without (–) AICAr (1 mM). ATP (*C*) and AICAr (*D*) contents were set at 1 for *KCS1* cells grown in the presence of AICAr. *E*, mutant cells (*ade16 ade17 ade8 his1* (Y2950); *kcs1 ade16 ade17 ade8 his1* (Y10399)) were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWU medium with or without external AICAr at the indicated concentration. The plates were imaged after 2 days at 30 °C.



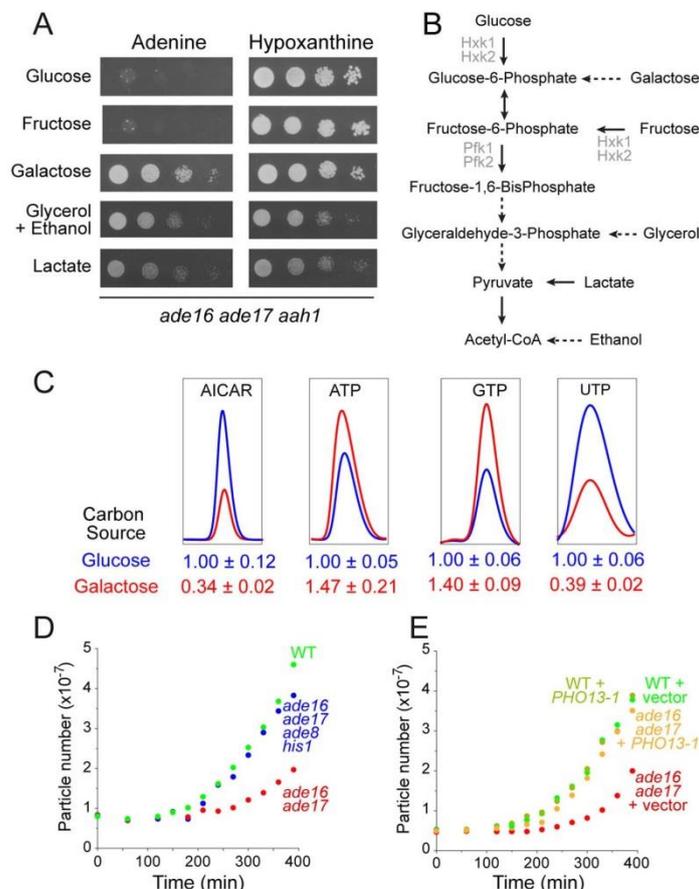
**FIGURE 8. The adenine phosphoribosyl transferase steady state level is affected by AICAR.** *A*, total protein extracts from cells that accumulated AICAr (*ade16 ade17 APT1-GFP*, Y10351) or that did not accumulate AICAr (*APT1-GFP*, Y10314) were separated by SDS-PAGE, and Apt1-Gfp (anti-GFP, Roche catalog no. 11814460001 dilution 1/1,000) and Act1 (anti-Act1, generous gift from I. Sagot (Bordeaux, France); 1/100,000) were detected by Western blotting. *B*, strains (*ade16 ade17 ade8 his1* (ADE13; Y6986) and *ade16 ade17 ade8 his1 ade13* (G166S) (*ade13*; Y7320) were transformed with the *APT1* expressing plasmid (P2091) or the cognate empty vector (pCM189). Transformants were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWU medium containing AICAr.

sistently, the lag-phase of the *ade16 ade17* mutant was shortened when these cells carried a plasmid expressing the Pho13-1 phosphatase that leads to decreased intracellular concentration of AICAr (9) (Fig. 9E). These results indicate that AICAr accumulation affects the capacity of yeast cells to adapt to the new glucose rich medium and initiate exponential growth.

All together these results reveal glucose utilization as an important basis of AICAr toxicity in yeast. We then asked whether this could also be the case in human cells.

**Growth on Galactose Allows to Bypass AICAr Toxicity in Human Cells**—We investigated the effect of AICAr on human HeLa cells propagated in glucose and galactose-containing medium. HeLa cells grown on galactose exhibited a lower mitotic index than in the presence of glucose (doubling times ~60 h versus 24 h, respectively) (Fig. 10, A and B), as previously

## Metabolic Basis of AICAR Toxicity

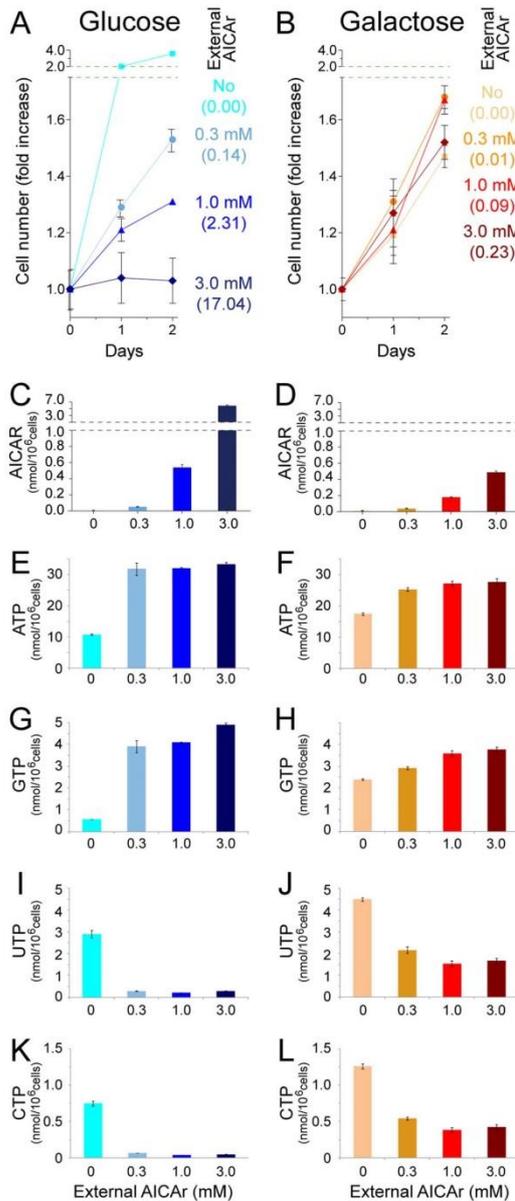


**FIGURE 9. AICAR affects ATP synthesis via alteration of glucose utilization.** *A*, cells (*aah1 ade16 ade17*; Y8793) were grown overnight, serially diluted, and spotted on SDcasaWU medium containing the indicated carbon source (2% w/v) and either adenine or hypoxanthine. The plates were imaged after 2 days (glucose, fructose, and galactose panels) or 3 days (lactate and glycerol + ethanol) at 30 °C. *B*, schematic representation of carbon source utilization in yeast. *Hxk*, hexokinase; *Pfk*, phosphofructokinase. *C*, cells (*aah1 ade16 ade17*; Y8793) were kept in the exponential growth phase for 24 h in ScasaWHypox containing either 2% glucose or 2% galactose as carbon source. The cells were then harvested by centrifugation, resuspended in the same two media but containing adenine instead of hypoxanthine, and grown for 4 h at 30 °C prior to metabolic extraction. Quantifications were determined from at least five independent metabolite extractions, and the standard deviation is indicated. *D*, cells grown for 48 h in SDcasaWA medium were then diluted in fresh SDcasaWA medium, and cell growth was followed for 6 h at 30 °C using a Multisizer IV (Beckman Coulter). WT: Y4479; *ade16 ade17*: Y6681 and *ade16 ade17 ade8 his1*: Y6986. *E*, AICAR accumulation is required for the lag phase delay of the *ade16 ade17* mutant. WT and *ade16 ade17* mutant strains were transformed with the plasmid expressing *PHO13-1* (P4291) (P4291) (P4291) or the empty vector (pCM189).

reported by others (22). AICAR seriously impaired the ability of HeLa cells to grow in the presence of glucose in a dose-dependent manner (Fig. 10A). In comparison, no significant inhibition of growth was obtained under AICAR treatment when substituting glucose with galactose (Fig. 10B). Indeed, the proliferation of HeLa cells was unaffected at higher doses (1 and 3 mM) of AICAR in the presence of galactose, whereas it was almost completely inhibited when using the glucose medium (Fig. 10, A and B). Comparison of metabolite profiles of HeLa cells grown on glucose and galactose revealed lower AICAR levels in cells grown in galactose compared with glucose (Fig. 10, C and D). In the absence of AICAR, cells grown in galactose

accumulated more of all four NTPs (Fig. 10, E–L). AICAR treatment resulted in an increased amount of purine nucleotides and a severe drop of pyrimidine triphosphate pools (Fig. 10, E–L). This effect was strongly reduced in cells grown on galactose compared with glucose, suggesting that it could at least in part account for AICAR toxicity. The differential effects of AICAR on proliferation depending on the carbon source could not be simply attributed to differences in AICAR nor pyrimidine nucleotide contents. Indeed, AICAR accumulation was analogous in glucose + 1 mM AICAR and galactose + 3 mM AICAR (Fig. 10, C and D), whereas pyrimidine nucleotide pools (Fig. 10, I–L) and proliferation (Fig. 10, A and B) were clearly

## Metabolic Basis of AICAR Toxicity



**FIGURE 10. Human cells grown in galactose instead of glucose are significantly more resistant to AICAR.** *A* and *B*, HeLa cells were seeded in 24-well plates in media containing 5 mM of either glucose (*A*) or galactose (*B*) and allowed to settle for 24 h. AICAR was then added (day 0) at the indicated concentrations, and cells were enumerated each day. The results are means of triplicate experiments, and the error bars represent standard deviation. The values in parentheses correspond to the intracellular ratios [AICAR]/([CTP] + [UTP]) at day 2. *C–L*, intracellular contents of AICAR and of NTPs (ATP, GTP, UTP, and CTP) at day 2 as a function of external AICAR concentrations and carbon sources.

differently affected. In addition, at lower AICAR concentration (0.3 mM) on glucose, pyrimidine nucleotides were severely reduced (Fig. 10, *I–K*), whereas proliferation was only slightly affected (Fig. 10*A*). However, by combining both parameters and considering the AICAR/(UTP + CTP) ratio, a strong negative correlation between this ratio and proliferation is found (Fig. 10, *A* and *B*, ratios are shown in parentheses).

### Discussion

This work addressed the toxicity of AICAR in eukaryotic cells. AICAR is known to disturb cellular functions through its well established AMP-mimetic properties and in particular through its activating effect on AMPK. However, a growing number of reports have established that the cellular effects of AICAR, initially thought to be mainly due to activation of AMPK, are proving to be much more complicated (1, 2). In particular, the recent demonstration that the antiproliferative effects of AICAR are AMPK-independent (5, 6) has stressed the necessity to identify new functions affected by AICAR.

**AICAR Strongly Interferes with NTPs Metabolism**—Our search for AICAR-synthetically lethal mutants revealed that adenine deaminase (*Aah1*) is critical for yeast cells to maintain adequate ATP levels when adenine is provided as a purine source and when AICAR accumulates. Our previous work indicated that the adenine deaminase route is the major adenine utilization route in yeast (23), and accordingly we found that *aah1* mutants accumulate much more adenine than the *apt1* mutant (Fig. 2*C*). In the course of this work, we observed that adenine accumulation was associated to accumulation of AdoMet and SAH and that this effect was AICAR-independent (Figs. 2 and 4). We propose that accumulation of AdoMet and SAH could be due to *in vivo* inhibition of SAH hydrolase by adenine because such an inhibition had been reported to occur *in vitro* (24). However, our data do not support a role for AdoMet and SAH accumulation in the AICAR synthetically lethal phenotype.

In the *aah1* mutant, AICAR accumulation was associated to a lower ATP and GTP concentration. Because ATP exerts an allosteric negative regulation on the purine pathway, lowering ATP results in increased concentration of AICAR as previously described (25). The decreased ATP and GTP levels would in part be due to the *aah1* mutation restraining AMP synthesis to the Apt1 route. This phenomenon was found to be amplified by low expression of Apt1 when AICAR accumulates. Consistently, overexpression of Apt1 allowed replenishing the ATP and GTP pools. However, because the NTP pools were not affected in the *aah1* single mutant grown with adenine, it is clear that AICAR accumulation, resulting from the *ade16 ade17* knock-out, contributes to lowering ATP and GTP levels (see “AICAR Affects Glucose Utilization *in Vivo*”). Under conditions restoring growth (hypoxanthine or overexpression of *APT1*), AICAR decreased and ATP + GTP increased, suggesting that the AICAR/(ATP + GTP) balance is crucial for AICAR toxicity.

Importantly, the effect of AICAR on nucleotide homeostasis, initially observed in the *aah1* mutant, was not restricted to this particular genetic background because it was also found in other mutants (*hpt1* and *ade13*). In addition, in a nonmutant

## Metabolic Basis of AICAR Toxicity

background, we could establish that AICAR strongly affected ATP concentration (Fig. 7B). Conversely, using the *kcs1* mutant, we could show that an increase of the ATP pool was sufficient to alleviate AICAR toxicity (Fig. 7, C–E). Together, our results establish that AICAR balance with nucleotides triphosphate is a critical factor contributing to its toxicity.

Our data establish that AICAR accumulation is synthetically lethal with the *hpt1* knock-out abolishing hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase activity. Strikingly, AICAR is accumulated in body fluids of patients suffering purine metabolism diseases, including hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient patients (15, 26). It should be stressed that the levels of AICAR accumulated by these patients (15) are way below those resulting in synthetic lethality in yeast cells (this work). However, should AICAR have similar effects in human cells than the ones observed in yeast, it could contribute to the phenotypic outcome of these complex developmental genetic diseases. Accordingly, we recently found that, in addition to AICAR accumulation, NTP levels were significantly lower in erythrocytes from a large cohort of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient patients (15).

**AICAR Affects Glucose Utilization in Vivo**—As mentioned previously, our results show that AICAR and ATP negatively impact on their reciprocal synthesis. The control exerted by ATP on AICAR synthesis is likely due to the fact that AICAR synthesis is modulated through feedback inhibition of the first step of the purine *de novo* pathway by ATP (25). How then does AICAR impact on ATP synthesis?

We found that AICAR quite specifically affects growth on glucose as a carbon source. Growth on fructose is also affected, but utilization of both carbon sources relies on hexokinase activity for the first step of glycolysis. Meanwhile, AICAR is far less toxic on galactose, which allows bypassing the hexokinase step and feeding the glycolytic pathway with glucose-6-phosphate (Fig. 9B). Importantly, this carbon source specific effect was found in both yeast and human cells, suggesting a possibly conserved mechanism of AICAR on glucose utilization, even though in mammalian cells AICAR mostly affected pyrimidine triphosphate nucleotides. The underlying mechanism leading to this difference between yeast and mammalian cells remains to be explored. *In vitro* inhibitory effects of AICAR on glycolysis have been documented on mammalian enzymes (27, 28), but the *in vivo* consequences had not been evaluated. Suppression of AICAR toxicity by galactose, but not by fructose, points to glucose-6-phosphate synthesis as a major step affected by AICAR. In hepatocytes, AICAR moderately affects glucokinase enzymatically (28) and inhibits glucokinase translocation (29). In yeast, we could not find any inhibitory effect of AICAR on glucose phosphorylation *in vitro*.<sup>5</sup> In tumor cells, the basis of AICAR effects on glucose utilization is to be established. Whatsoever the exact mechanism(s) involved *in vivo*, our work established that AICAR inhibition of glucose utilization can significantly contribute to its antiproliferative properties. AICAR effects on glucose utilization are likely to affect more specifically tumor cells that strictly rely on the glycolytic pathway because of the Warburg effect.

<sup>5</sup> J. Ceschin, B. Pinson, and B. Daignan-Fornier, unpublished results.

**Author Contributions**—B. D.-F. and B. P. conceived the study, participated in its design and coordination, and drafted the manuscript. J. C., H. C. H., C. S.-M., D. A., T. V., M. M., and B. P. carried out the experiments. All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgments**—We thank J. E. Gomes for helpful discussions and J. Tissot-Dupont for technical support.

## References

1. Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2012) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR), a highly conserved purine intermediate with multiple effects. *Metabolites* **2**, 292–302
2. Vincent, E. E., Coelho, P. P., Blagih, J., Griss, T., Viollet, B., and Jones, R. G. (2014) Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. *Oncogene* **34**, 3627–3639
3. Mayer, F. V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M. J., Carmena, D., McCartney, R. R., Leiper, F. C., Xiao, B., Jing, C., Walker, P. A., Haire, L. F., Ogrodowicz, R., Martin, S. R., Schmidt, M. C., Gamblin, S. J., and Carling, D. (2011) ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* **14**, 707–714
4. Pinson, B., Vaur, S., Sagot, I., Couplier, F., Lemoine, S., and Daignan-Fornier, B. (2009) Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. *Genes Dev.* **23**, 1399–1407
5. Ceschin, J., Saint-Marc, C., Laporte, J., Labriet, A., Philippe, C., Moenner, M., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2014) Identification of yeast and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) transporters. *J. Biol. Chem.* **289**, 16844–16854
6. Liu, X., Chhipa, R. R., Pooya, S., Wortman, M., Yachyshin, S., Chow, L. M., Kumar, A., Zhou, X., Sun, Y., Quinn, B., McPherson, C., Warnick, R. E., Kendler, A., Giri, S., Poels, J., Norga, K., Viollet, B., Grabowski, G. A., and Dasgupta, B. (2014) Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E435–E444
7. Tang, Y. C., Williams, B. R., Siegel, J. J., and Amon, A. (2011) Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds. *Cell* **144**, 499–512
8. Rébora, K., Laloo, B., and Daignan-Fornier, B. (2005) Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule. *Genetics* **170**, 61–70
9. Hürlimann, H. C., Laloo, B., Simon-Kayser, B., Saint-Marc, C., Couplier, F., Lemoine, S., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2011) Physiological and toxic effects of purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide (AICAR) in yeast. *J. Biol. Chem.* **286**, 30994–31002
10. Sherman, F., Fink, G. R., Hicks, J. B. (1986) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
11. Gauthier, S., Couplier, F., Jourden, L., Merle, M., Beck, S., Konrad, M., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2008) Co-regulation of yeast purine and phosphate pathways in response to adenylic nucleotide variations. *Mol. Microbiol.* **68**, 1583–1594
12. Saint-Marc, C., Pinson, B., Couplier, F., Jourden, L., Lisova, O., and Daignan-Fornier, B. (2009) Phenotypic consequences of purine nucleotide imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **183**, 529–538
13. Breton, A., Pinson, B., Couplier, F., Giraud, M. F., Dautant, A., and Daignan-Fornier, B. (2008) Lethal accumulation of guanylic nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae* HPT1-deregulated mutants. *Genetics* **178**, 815–824
14. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 837–848
15. Ceballos-Picot, I., Le Dantec, A., Brassier, A., Jais, J. P., Ledroit, M., Cahu, J., Ea, H. K., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2015) New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. *Orphanet J. Rare Dis.* **10**, 7
16. Merkle, D. J., Wali, A. S., Taylor, J., and Schramm, V. L. (1989) AMP

- deaminase from yeast. Role in AMP degradation, large scale purification, and properties of the native and proteolyzed enzyme. *J. Biol. Chem.* **264**, 21422–21430
17. Alfonzo, J. D., Sahota, A., and Taylor, M. W. (1997) Purification and characterization of adenine phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1341**, 173–182
  18. Konrad, M. (1988) Analysis and in vivo disruption of the gene coding for adenylate kinase (ADK1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**, 19468–19474
  19. Guetsova, M. L., Crother, T. R., Taylor, M. W., and Daignan-Fornier, B. (1999) Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* XPT1 gene encoding xanthine phosphoribosyl transferase. *J. Bacteriol.* **181**, 2984–2986
  20. Tibbetts, A. S., and Appling, D. R. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* expresses two genes encoding isozymes of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **340**, 195–200
  21. Szigyarto, Z., Garedew, A., Azevedo, C., and Saiardi, A. (2011) Influence of inositol pyrophosphates on cellular energy dynamics. *Science* **334**, 802–805
  22. Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J., and Capaldi, R. A. (2004) Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 985–993
  23. Guetsova, M. L., Lecoq, K., and Daignan-Fornier, B. (1997) The isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants that constitutively express purine biosynthetic genes. *Genetics* **147**, 383–397
  24. Knudsen, R. C., and Yall, I. (1972) Partial purification and characterization of *S*-adenosylhomocysteine hydrolase isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **112**, 569–575
  25. Rébora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B., and Daignan-Fornier, B. (2001) Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7901–7912
  26. Sidi, Y., and Mitchell, B. S. (1985) Z-nucleotide accumulation in erythrocytes from Lesch-Nyhan patients. *J. Clin. Invest.* **76**, 2416–2419
  27. Javaux, F., Vincent, M. F., Wagner, D. R., and van den Berghe, G. (1995) Cell-type specificity of inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside. Lack of effect in rabbit cardiomyocytes and human erythrocytes, and inhibition in FTO-2B rat hepatoma cells. *Biochem. J.* **305**, 913–919
  28. Vincent, M. F., Bontemps, F., and Van den Berghe, G. (1992) Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **281**, 267–272
  29. Guigas, B., Bertrand, L., Taleux, N., Foretz, M., Wiersperger, N., Vertommen, D., Andreelli, F., Viollet, B., and Hue, L. (2006) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* **55**, 865–874