

Université de Montréal

**L'acide valproïque inhibe la progression dans le cycle
cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae***

par Kristelle Desfossés-Baron

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en biologie moléculaire

Avril, 2016

© Kristelle Desfossés-Baron, 2016

Résumé

L'acétylation est une modification post-traductionnelle des protéines essentielles. Elle est impliquée dans bon nombre de processus cellulaires importants comme la régulation de la structure de la chromatine et le recrutement de protéines. Deux groupes d'enzymes, soient les lysines acétyltransférases et les lysines désacétylases, régulent cette modification, autant sur les histones que sur les autres protéines. Au cours des dernières années, de petites molécules inhibitrices des désacétylases ont été découvertes. Certaines d'entre elles semblent prometteuses contre diverses maladies telles le cancer. L'acide valproïque, un inhibiteur de deux des trois classes des désacétylases, a un effet antiprolifératif chez plusieurs organismes modèles. Toutefois, les mécanismes cellulaires sous-jacents à cet effet restent encore méconnus. Ce mémoire met en lumière l'effet pH dépendant de l'acide valproïque sur différentes voies cellulaires importantes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il démontre que ce composé a la capacité d'inhiber la transition entre les phases G1 et S par son action sur l'expression des cyclines de la phase G1. De plus, il inhibe l'activation de la kinase principale de la voie activée suite à un stress à la paroi cellulaire. L'acide valproïque occasionne également un arrêt dans la réplication de l'ADN sans y causer de dommage. Il s'agit là d'un effet unique qui, à notre connaissance, n'est pas observable avec d'autres agents qui inhibent la progression en phase S.

Mots clés : Acétylation, Acide valproïque, Cyclines, Inhibiteur de désacétylase d'histone, Lysine désacétylases, Micafungine, Point de contrôle des dommages à l'ADN, Recombinaison homologue, Réplication de l'ADN, Transition G1/S.

Abstract

Acetylation is an essential post-translational modification involved in many important cellular processes such as regulation of chromatin structure and proteins interactions. Two enzyme families, lysine acetyltransferases and lysine deacetylases, allow proper regulation of this modification both on histones and non-histones proteins. In recent years, the discovery of small deacetylase inhibitors has led to promising novel therapy in the treatment against various diseases such as cancer. Valproic acid, a class I and II deacetylase inhibitor, has been shown to have antiproliferative effects in various models. However, the cellular mechanisms underlying this effect remain unknown. This thesis highlights the pH-dependent effects of VPA on numerous important cellular pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Our results demonstrate that VPA inhibits the transition from G1 to S phase of the cell cycle by its action on the expression of G1 cyclins. Moreover, VPA inhibits the activation of the main kinase involved in the cell wall integrity pathway. Furthermore, VPA exposure also leads to DNA replication arrest in a DNA damage-independent manner. This is a unique effect that, to our knowledge, is not observable with other agents that inhibit S phase progression.

Keywords: Acetylation, Cyclins, DNA damage checkpoint, DNA replication, Histone deacetylase inhibitors, Homologous recombination, Lysine deacetylases, Micafungin, Transition G1/S, Valproic acid.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
1. Introduction.....	1
1.1 La chromatine	1
1.2 Les modifications post-traductionnelles aux histones	2
1.2.1 L'acétylation	4
1.3 Les enzymes régulatrices de l'acétylation	5
1.3.1 La famille des lysines acétyltransférases	5
1.3.2 La famille des lysines désacétylases	7
1.4 Les inhibiteurs de désacétylases d'histones	12
1.5 Le cycle cellulaire	14
1.5.1 Les cyclines.....	16
1.5.2 La spécificité d'action des cyclines	17
1.5.3 La transition de la phase G1 à la phase S.....	18
1.6 Les points de contrôle	19
1.6.1 Le point de contrôle des dommages à l'ADN.....	20

1.7 La recombinaison homologue et le changement de matrice	23
1.8 Voies de signalisation affectées par le VPA	26
1.8.1 La voie des phéromones.....	26
1.8.2 La voie de l'intégrité de la paroi cellulaire	29
1.8.3 La régulation osmotique	31
1.9 Les KDACi, des régulateurs synthétiques de la prolifération cellulaire.....	32
Contribution de l'étudiant.....	34
2. Valproate inhibits MAP kinase signalling and cell cycle progression in <i>S. cerevisiae</i>	35
2.1 ABSTRACT.....	36
2.2 INTRODUCTION	37
2.3 METHODS	40
2.4 RESULTS	45
2.4.1 VPA inhibits cell proliferation in a pH-dependent manner in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
2.4.2 VPA induces a complex transcriptional response in <i>S. cerevisiae</i>	45
2.4.3 VPA causes influx of extracellular calcium in <i>S. cerevisiae</i>	51
2.4.4 VPA inhibits activation of the Slt2 cell wall integrity MAP kinase in yeast.....	52
2.4.5 VPA inhibits the mating pheromone pathway in yeast.....	58
2.4.6 VPA inhibits cell cycle progression in yeast.	64
2.4.7 VPA inhibits DNA replication in <i>S. cerevisiae</i>	67
2.4.8 VPA does not compromise the integrity of DNA replication forks.....	73
2.5 DISCUSSION.....	77
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	81
2.7 AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT	81
2.8 ADDITIONAL INFORMATION.....	81

2.9 REFERENCES	82
3. Discussion	89
3.1 Effet pH dépendent du VPA	89
3.2 La prolifération cellulaire	91
3.3 Les désacétylases d'histones	92
3.4 La voie d'un mauvais repliement des protéines («Unfolded Protein Response»)	93
3.5 Les MAPK	94
3.6 Le cycle cellulaire	97
3.6.1 La transition G1/S	97
3.6.2 La réplication de l'ADN	98
3.7 La biosynthèse de l'inositol	99
4. Conclusion	101
5. Bibliographie	103
Appendice 1	i
Appendice 2	ii
Appendice 3	iii
Appendice 4	iv

Liste des tableaux

Tableau I : Les complexes des différentes lysines acétyltransférases chez la levure	7
Tableau II : Les complexes des différentes lysines désacétylases chez la levure.....	8
Tableau III : Inhibiteurs de désacétylases.....	13

Tableaux de l'article

Table I : Go-term analysis (cellular processes) of up- and down-regulated genes in presence of VPA	49
Supplementary Table II: VPA-induced change in expression of genes involved in the pheromone and cell wall integrity pathways	57
Supplementary Table III: Diploid-specific genes whose expression level is modulated by VPA	60

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la chromatine.....	1
Figure 2 : Structure du nucléosome	2
Figure 3 : Modifications post-traductionnelles des histones.....	3
Figure 4 : Mécanismes régissant l'acétylation des lysines	4
Figure 5 : Cycle cellulaire.....	15
Figure 6 : Le cycle des cyclines.....	16
Figure 7: La transition G1 vers S.....	19
Figure 8 : Point de contrôle des dommages à l'ADN.....	23
Figure 9 : Voie de réparation par recombinaison homologue.....	25
Figure 10 : «mating».....	27
Figure 11: La voie de signalisation des phéromones.....	28
Figure 12 : La voie de signalisation d'intégrité à la paroi cellulaire	30
Figure 13 : la voie de la régulation osmotique.....	32

Figures de l'article

Figure 1: VPA inhibits cell proliferation in a pH-dependent manner in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
Figure 2: VPA elicits a complex transcriptional response in <i>S. cerevisiae</i>	48
Figure 3: VPA-induced growth inhibition does not result from the induction of UPR or from Cch1/Mid1-mediated elevation of cytoplasmic Ca ²⁺	52
Figure 4: VPA inhibits phosphorylation of the Slk2 cell wall integrity MAP kinase.....	55
Supplementary Fig S1: Supplementary Fig S1: Diploid-specific vs VPA-induced genes.....	59
Figure 5: VPA inhibits the mating pheromone signaling pathway.....	63
Figure 6: VPA inhibits the G1-S and G2/M-G1 transitions.....	66
Figure 7: VPA inhibits S phase progression.....	69
Supplementary Fig S2: VPA-mediated DNA replication inhibition does not require Hog1....	71

Supplementary Fig S3: VPA inhibits DNA replication in the presence of EGTA.....71
Supplementary Fig S4: VPA-mediated inhibition of DNA replication does not require the
Mid1-Cch1 calcium channel.....72
Supplementary Fig S5: VPA-mediated inhibition of DNA replication does not require genes
of the autophagy pathway.....72
Figure 8: VPA does not induce a DNA damage response.....75

Liste des sigles et abréviations

Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ATP	Adénosine triphosphate
Ca ²⁺	Calcium
C-terminal	Carboxy-terminal
Cdk	Kinase dépendante des cyclines
CPT	Camptothécine
CWI	Intégrité à la paroi cellulaire
DAG	Diacylglycérol
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange de guanosine triphosphate
GNAT	Amino-acétyltransférases reliées à Gcn5
GTP	Guanosine triphosphate
HAT	Histones acétyltransférase
HDAC	Histone désacétylase
HR	Recombinaison homologue
HU	Hydroxyurée
IP ₃	Inositol triphosphate
K	Lysine
KAT	Lysine acétyltransférase
KDAC	Lysine désacétylase
M	Mitose
MAPK	MAP Kinase
MMS	Méthanesulfonate de méthyle
MPTs	Modifications post-traductionnelles
MRX	Complexe Mre11-Rad50-Xrs2

N-terminal	Amino-terminal
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
PBA	Phénylbutyrate de sodium
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol phosphate
PKC	Protéine kinase C
S	Synthèse d'ADN
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
SAHA	Acide hydroxamique suberoylanilide
TSA	Trichostatin A
UV	Ultra-violet
UPR	Réponse au mauvais repliement des protéines
VPA	Acide valproïque

Remerciements

Je tiens à remercier avant tous mon directeur de recherche, le Dr Hugo Wurtele, qui m'a permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Il m'a guidé de ses judicieux conseils et ses idées tout au long de ces années pour l'avancement du projet fascinant sur lequel j'ai travaillé. Je tiens également à remercier particulièrement mon collègue et ami Jean-Philippe, sans qui je n'aurais probablement pas poursuivi mes études au deuxième cycle. Il a su me transmettre sa passion pour la recherche. C'est également grâce à lui que j'ai pu travailler sur le projet présenté dans ce document en me mettant en contact avec le Dr Wurtele. Merci à mes collègues pour leurs conseils techniques éclairés. Je remercie la fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont et la fondation Cole pour leur soutien financier.

Je remercie aussi ma famille d'avoir cru en moi et m'avoir soutenue durant mes études. Un merci particulier à ma sœur Mélanie qui a toujours su trouver les mots justes pour me permettre de me dépasser et persévérer, même si ce n'était pas toujours en douceur. Merci à Edlie de m'avoir aidée à rester saine d'esprit dans les moments de folies des garçons. Finalement, je remercie tous mes amis pour ces innombrables moments formidables de détente et de rires. Sans vous, je n'aurais pas su garder un esprit équilibré, bien qu'à nous entendre dans la plupart des cas, on pourrait penser le contraire.

1. Introduction

1.1 La chromatine

L'ADN encode l'information génétique nécessaire à la production d'ARN et de protéines responsables du bon fonctionnement des cellules. L'ADN chez les eucaryotes est compacté en une structure appelée chromatine (Figure 1). Cette dernière est composée d'octamères de protéines (les histones H3, H4, H2A et H2B) autour desquels l'ADN s'enroule pour former les nucléosomes, soit les unités fondamentales de la chromatine.¹

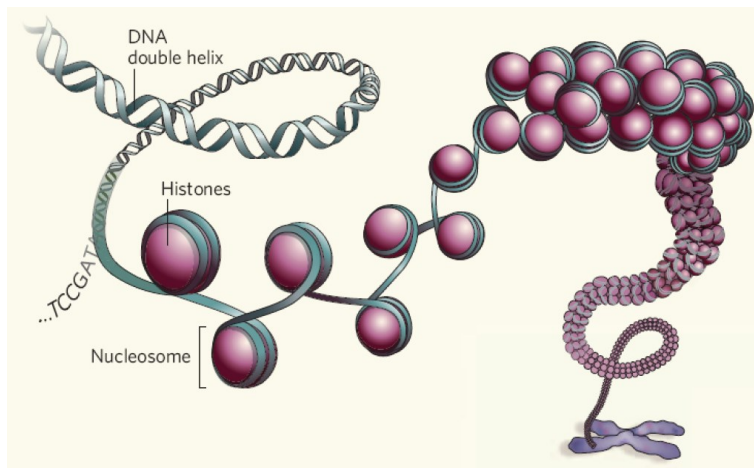


Figure 1 : Structure de la chromatine

Schématisation de la chromatine. La double hélice d'ADN s'enroule autour d'octamères d'histones (en mauve), se compacte et forme la chromatine. Figure modifiée de Baylin SB. Et al., Genomic biology: the epigenomic era opens, Nature (2007).

La formation de la chromatine commence par la mise en place d'un tétramère composé de deux histones H3 et de deux histones H4. Vient par la suite s'ajouter deux dimères composés chacun d'une histone H2A et H2B formant alors un octamère de protéines. Ce

dernier se lie à la double hélice d'ADN par des interactions ADN-protéines spécifiques, telles que des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes, ce qui forme un nucléosome (Figure 2).^{2,3} Une étude par cristallographie du nucléosome montre que 146 paires de bases de l'ADN s'enroulent autour des octamères d'histones en une superhélice.² Une cinquième histone, H1 chez les mammifères, se lit à proximité du nucléosome et interagit avec l'ADN les reliant, de manière à la protéger d'éventuelles nucléases. Elle sert également à la compaction de l'ADN.⁴⁻⁷ Une protéine similaire, hho1, existe chez *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Toutefois, sa délétion n'occasionne pas de phénotypes dans la structure de la chromatine et ses rôles biologiques demeurent mal connus chez cet organisme.^{8,9}

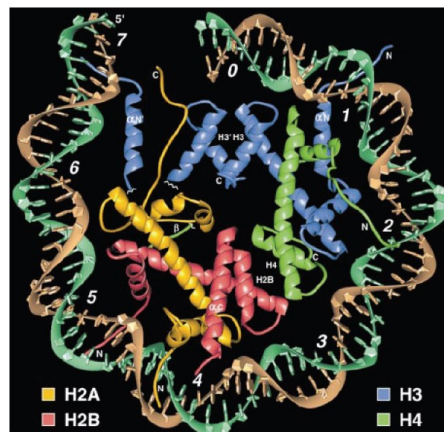


Figure 2 : Structure du nucléosome

Structure du nucléosome générée après cristallographie. Le nucléosome est composé de deux histones H3 (en bleu), de deux histones H4 (en vert), de deux histones H2A (en jaune) et de deux histones H2B (en rose). Figure obtenue de Luger K. et al., Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, Nature (1997).

1.2 Les modifications post-traductionnelles aux histones

Les histones, au même titre que d'autres protéines dans la cellule, subissent des modifications post-traductionnelles (MPTs). Des enzymes ont pour fonction d'ajouter ou de retirer divers groupements chimiques sur des résidus spécifiques de ces protéines afin de

réguler leurs fonctions (voir la section sur l'acétylation). Parmi ces MPTs, on retrouve la méthylation (ajout d'un groupement méthyle sur les lysines (K) et les arginines), la phosphorylation (ajout d'un groupement phosphate sur les sérines et thréonines), l'ubiquitination (ajout d'une petite protéine appelée ubiquitine sur les lysines) et l'acétylation (ajout d'un groupement acétyle également sur les lysines).¹⁰⁻¹² Chez *S. cerevisiae*, les histones comptent entre 103 et 136 acides aminés (11-15 kilodaltons)¹³⁻¹⁸, et la majorité des MPTs se retrouvent au niveau de leurs extrémités amino-terminale (N-terminale; Figure 3).^{19,20} Cependant, certaines modifications sont aussi présentes dans le domaine globulaire des histones, telles qu'au niveau de la lysine 56 de l'histone H3 et la lysine 91 de l'histone H4.^{21,22} Bien que toutes les modifications mentionnées plus haut soient importantes pour la cellule, l'acétylation sera le thème principal de la suite du mémoire.

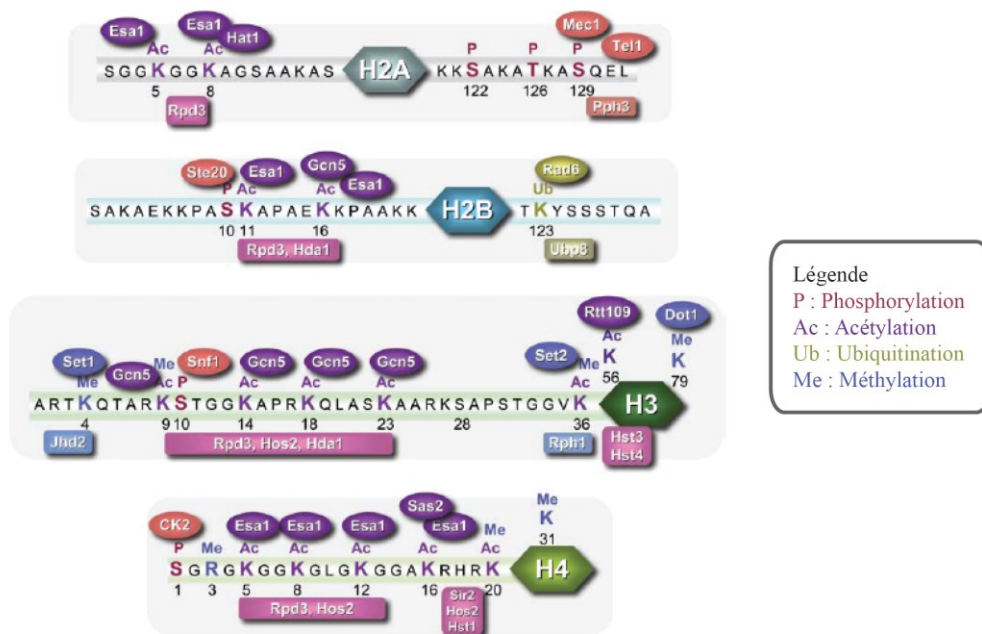


Figure 3 : Modifications post-traductionnelles des histones

Représentation des modifications post-traductionnelles présentes au niveau des histones chez la levure. Figure modifiée de Krebs JE. et al, *Moving marks : dynamic histone modifications in yeast*, *Mol Biosyst* (2007).

1.2.1 L'acétylation

Comme mentionnée précédemment, l'acétylation des protéines est un processus durant lequel des enzymes spécifiques ajoutent un groupement acétyle sur des lysines. Ces enzymes transfèrent un groupement acétyle présent sur une molécule appelée acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) vers la lysine ciblée (Figure 4). Le processus inverse est assuré par d'autres enzymes spécifiques (voir la prochaine section Les enzymes régulatrices de l'acétylation).^{23,24}

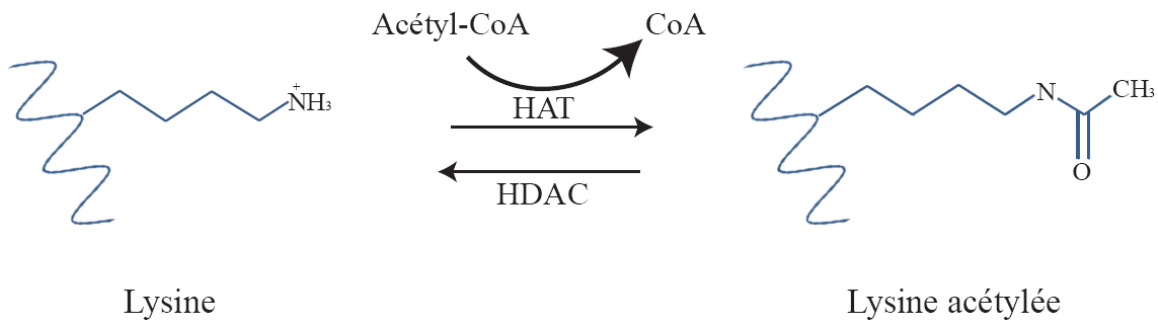


Figure 4 : Mécanismes régissant l'acétylation des lysines

Schématisation de l'acétylation et de la déacétylation des lysines, autant au niveau des histones que des autres protéines de la cellule.

L'acétylation joue deux rôles majeurs au niveau de la chromatine. En premier lieu, elle influence la stabilité des interactions présentes dans le nucléosome. L'acétylation de résidus spécifiques au niveau des histones entraîne une décompaction de l'ADN.²⁵ La lysine 16 sur l'histone H4 joue un rôle important dans ce processus. Il a été montré que son acétylation constitutive inhibe la formation de la fibre de chromatine compacte.^{26,27} Selon certaines études, ce phénomène est causé par la neutralisation de la charge positive de la lysine après le transfert du groupement acétyle.²⁸ Le second rôle majeur de l'acétylation des histones consiste au recrutement de protéines comportant des bromodomains. Au niveau de la chromatine, l'acétylation permet de recruter certaines protéines ayant un tel domaine dans le but de modifier la chromatine, soient les complexes de remodelage de la chromatine. Ces derniers utilisent l'énergie de l'adénosine triphosphate (ATP) pour déplacer les histones le long de l'ADN, modifiant ainsi la structure de la chromatine.²⁹ Un second domaine d'interaction avec

les lysines acétylées a été récemment découvert, soit le domaine homologie (PH).^{30,31} Jusqu'à ce jour, il semble que seule la protéine Rtt106, qui reconnaît spécifiquement l'acétylation au niveau de la lysine 56 sur l'histone H3, soit pourvue de ce domaine chez *S. cerevisiae*.

L'acétylation cause donc un changement dans la structure de la chromatine, autant par son rôle sur la compaction de l'ADN que par le recrutement des complexes de remodelage de la chromatine. La réorganisation des nucléosomes est impliquée dans bon nombre de processus cellulaires, tels la transcription et la réparation de l'ADN.²⁹ Il a en effet été démontré que les nucléosomes sont réorganisés au niveau des promoteurs suite à une perturbation causant un changement dans la transcription des gènes.³²⁻³⁵ La régulation de cette MPT s'effectue grâce à des enzymes qui seront détaillées dans la prochaine section.

1.3 Les enzymes régulatrices de l'acétylation

L'acétylation est régulée par deux groupes d'enzymes, soit les lysines acétyltransférases (KAT) et les lysines désacétylases (KDAC). Historiquement, ces enzymes sont plus connues sous les noms d'histones acétyltransférases (HAT) et désacétylases d'histones (HDAC) puisque l'acétylation a été initialement observée et caractérisée sur les histones. La découverte récente de cette MPT sur des protéines autre que les histones a entraîné leur changement de nom.³⁶

1.3.1 La famille des lysines acétyltransférases

Les lysines acétyltransférases utilisent l'acétyl-CoA comme substrat afin d'ajouter un groupement acétyle sur le groupement amine des lysines.^{23,24} Suite aux premières recherches effectuées sur les KAT, les enzymes ont été séparées en deux classes selon leur localisation cellulaire et leur fonction. La classe B regroupait alors les enzymes agissant au niveau du cytoplasme et catalysant les événements d'acétylation menant au transport des nouvelles histones vers le noyau afin d'être déposées au niveau de l'ADN nouvellement synthétisé. La classe A, quant à elle, regroupait les enzymes nucléaires catalysant les événements reliés à la

transcription des gènes.³⁷ Bien que de nombreuses études utilisent encore cette classification, la découverte de nouvelles KAT et de leur action sur plusieurs cibles différentes rend cette classification parfois désuète. L'enzyme la plus connue et étudiée de la classe B, soit Hat1, peut également agir à l'intérieur du noyau.^{38,39} De plus, de nombreuses études ont montré un effet des KAT sur des protéines autres que les histones, appuyant donc le fait que la classification des KAT selon les classes A/B n'est pas vraiment bien définie.^{40,41}

Les KAT se trouvent donc de plus en plus souvent regroupés selon leur homologie de séquence. Plusieurs d'entre elles partagent en effet des domaines similaires, permettant ainsi de les diviser en deux groupes majeurs. Le premier groupe, appelé « Gcn5-related N-acetyltransferases » (GNAT), est composé d'enzyme ayant des domaines similaires à la KAT Gcn5.⁴² Chez *S. cerevisiae*, on compte quatre principales KAT faisant parties du groupe des GNAT, soit Gcn5, Hat1, Hpa2 et Elp3. Le second groupe, composé des enzymes Esa1, Sas2 et Sas3, est connu sous l'appellation de MYST, nommé en fonction de ses membres fondateurs : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60 où MOZ et Tip60 sont d'origine humaine (Tableau I)^{43,44}. Une dernière acétyltransférase présente chez *S. cerevisiae* n'est souvent pas classée dans ces groupes. Rtt109 ne semble en effet pas avoir d'homologie de séquence avec les autres KAT connues chez la levure.⁴⁵ Elle compte en fait plus de similarité au niveau structurel avec la KAT p300/CBP, une enzyme présente dans d'autres organismes que la levure et se distinguant également des GNAT et des MYST.^{45,46} On retrouve un plus grand nombre de KAT chez l'humain que chez la levure. Une grande partie se retrouve classée dans les mêmes groupes que ceux présents chez *S. cerevisiae*, soit GNAT et MYST, signifiant ainsi qu'ils ont une homologie de séquence avec les KAT de levure.⁴⁷

Tableau I : Les complexes des différentes lysines acétyltransférases chez la levure

Complexe	Famille GNAT					Famille MYST					Rtt109
	SAGA	SLIK	ADA	HAT-A2	Hpa2	NuA4	NuA3	SAS-I	HAT1/2	Elongator	
Histones cibles*	H2B, H3, H4	H2B, H3, H4	H2B, H3	H2A, H3, H4	H3, H4	H2A, H3, H4	H3, H4	H3, H4	H2A, H4	H2A, H2B, H3, H4	H3
Sous-unité catalytique	Gcn5	Gcn5	Gcn5	Gcn5	Hpa2	Esa1	Sas3	Sas2	Hat1	Elp3	Rtt109
Autres sous-unités	Ada2 Ada3 Ada5 Chd1 Sgf11 Sgf29 Sgf73 Spt3 Spt7 Spt8 Spt20 Sus1 Taf5 Taf6 Taf9 Taf10 Taf12 Tra1 Ubp8	Ada2 Ada3 Ada5 Spt3 Spt7 Taf5 Taf6 Taf9 Taf10 Taf12 Tra1 Rtg2 Ubp8	Ada2 Ada3 Ahc1	Ada2 Ada3		Act1 Arp4 Epl1 Eaf1 Eaf2 Eaf3 Eaf4 Eaf5 Eaf7 Ing1 Tra1 Yaf9	Taf30 Yng1	Sas4 Sas5	Hat2 Hif1	Elp1 Elp2 Elp4 Elp5 Elp6	Vps75
Références	48-55	56,57	58	59	60	61-66	67,68	69,70	71,72	73,74	75,76

*Les cibles constituent soit des histones libres ou celles liées aux nucléosomes.

1.3.2 La famille des lysines désacétylases

Les lysines désacétylases, à l'inverse des KAT, ont pour fonction d'inverser la modification en hydrolysant les groupements acétyles présents sur les groupements amines des lysines (Figure 4). Chez *S. cerevisiae*, il existe trois classes de KDAC (voir les sous-sections qui suivent). Les deux premières classes regroupent les KDAC dites classiques qui comprennent un atome de zinc dans leur site catalytique. La troisième classe se démarque des

autres par son absence de zinc et son activité catalytique dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Les dix KDAC présentes chez *S. cerevisiae* sont regroupées dans ces classes selon leur homologie de séquence.⁷⁷ Tel que nous le verrons dans les prochaines sous-sections, beaucoup de KDAC, au même titre que les KAT (voir la section précédente Les lysines acétyltransférases), ont la capacité de se retrouver *in vivo* sous forme de complexes. Les complexes et les cibles des KDAC sont résumés dans le Tableau II.

Tableau II : Les complexes des différentes lysines désacétylases chez la levure

	Classe I				Classe II		Classe III				
Sous-unité catalytique	Rpd3 (S)	Rpd3 (L)	Hos2	Hos1	Hda1	Hos3	Sir2	Hst1	Hst2	Hst3	Hst4
Autres sous-unités	Sin3	Sin3	Set3		Hda2		Sir3				
	Ume1 Rco1 Eaf3 Sds3 Cti6 Rxt2/3 Dep1 Ume6 Ash1	Ume1 Pho23 Sap30	Snt1 Hos4 Sif2 Cpr1 Hst1		Hda3		Sir4				
Lysines ciblées	H2AK7 H2BK11,16 H3K9/18,14,23 H3K27 H4K5,8,12	H3 H4 H4K12 H4K16	H4K12		H2BK11 H2BK16 H3K9/18 H3K14 H4K5,8,12 H4K16	H2AK17 H2BK11 H2BK16; H3K14,23 H4K5,8 H4K12,16	H2B H3 H4 H4K16		H4K16	H3K56	H3K56
Références	78-80	81	82		79,83	82,84	85-91				

Première classe

La première classe regroupe les enzymes ayant une homologie de séquence avec la KDAC de levure Rpd3.^{77,92} Chez l'humain, cette classe compte les HDAC 1, 2, 3 et 8 dont plusieurs domaines furent conservés au cours de l'évolution des eucaryotes.⁹² Il est donc possible d'étudier les KDAC chez les organismes modèles tels la levure. Chez *S. cerevisiae*, cette classe comprend, en plus de Rpd3, les enzymes Hos1 et Hos2.⁷⁷

Rpd3 est impliquée dans deux complexes, soit Rpd3L et Rpd3S. Les deux complexes partagent des sous-unités identiques, telles que Rpd3, Sin3 et Ume1. Ils comptent toutefois bon nombre de protéines différentes, soit Rco1 et Eaf3 pour Rpd3S, ou encore Pho23, Sap30, Sds3, Cti6, Rxt2/3, Dep1, Ume6 et Ash1 pour Rpd3L.^{93,94} Au niveau de la chromatine, Rpd3 est connu pour affecter la régulation de plusieurs gènes. Sa délétion provoque une diminution de la transcription de 40 % des gènes localisés près des régions télomériques.⁷⁸ Rpd3 a également la capacité de déacétyler plusieurs lysines de diverses histones (H2A, H2B, H3 et H4), entre autres les lysines en position 5 et 12 sur les histones H4 liées à la chromatine et la lysine 9 sur les histones H3.^{79,80} La diversité des protéines composant chacun des deux complexes leur permet de jouer des rôles qui leur sont propres.⁹⁵ Il a été démontré que Rpd3L affecte la réponse à divers stress environnementaux.⁹⁶ Rpd3S est quant à lui recruté aux promoteurs des gènes de réponse aux stress thermiques, au même titre que Rpd3L, bien qu'ils soient recrutés à des moments différents.^{97,98} Les deux sous-unités sont aussi impliquées dans la coordination du départ des fourches de réplication de l'ADN.^{99,100} De plus, Rpd3 influence la durée de vie des cellules en exerçant une répression génique sur plusieurs locus impliqués dans ces mécanismes.¹⁰¹

Hos2 se trouve également présent dans les cellules sous forme d'un complexe. Ce dernier est composé des protéines Set3, Snt1, Hos4, Sif2, Cpr1 ainsi que des deux désacétylases Hos2 et Hst1 (KDAC de classe III).¹⁰² Au niveau de la chromatine, hos2 déacétyle principalement les lysines localisées sur les queues N-terminales des histones H3 et H4, incluant les lysines 12 et 16 sur les histones H4.⁸¹ Ce complexe protéique est impliqué, entre autres, dans la répression des gènes de sporulation.¹⁰² De plus, Hos2 est nécessaire dans l'activation de la réponse à un stress survenant suite à une perturbation des fonctions sécrétoires de la cellule.¹⁰³ Cette désacétylase est également impliquée dans des voies de réponses aux dommages à l'ADN puisqu'elle colocalise avec Cmr1, une protéine capable de se lier à l'ADN, préférentiellement lors de dommages causés par les rayonnements ultraviolets (UV).^{104,105}

Hos1 est la désacétylase de classe I la moins documentée. Cette enzyme ne semble pas faire partie d'un complexe. Au niveau de la chromatine, Hos1 entraîne la déacétylation de la

lysine 12 sur l'histone H4.⁸² Plusieurs KDAC, comprenant Hos1, sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle de HAP1, encodant une protéine impliquée dans la régulation de nombreux gènes.¹⁰⁶ De plus, des études ont montré que Hos1 a la capacité de déacétyler Smc3, une protéine impliquée dans la cohésion des chromatines sœurs durant la mitose.^{107,108} Cette KDAC est également connue pour interagir avec le complexe répresseur Tup1-Ssn6.¹⁰⁹ Hos1 pourrait potentiellement intervenir dans la régulation de la transcription en phase G1, bien que dans une faible mesure.¹¹⁰

Deuxième classe

La seconde classe des KDAC regroupe les enzymes ayant une homologie de séquence avec la KDAC Hda1. Chez l'humain, elle regroupe les enzymes HDAC4, 5, 7 et 9 dans une sous-classe (Classe IIa) et HDAC6 et 10 dans une autre (Classe IIb). Encore une fois, ces enzymes sont conservées à travers les eucaryotes.⁹² Chez *S. cerevisiae*, la classe II ne compte que deux désacétylases, soit Hda1 et Hos3.⁷⁷

Hda1 est la seule enzyme de cette classe à se retrouver sous forme de complexe *in vivo* et elle lie deux autres protéines, soit Hda2 et Hda3.¹¹¹ Elle forme en fait un tétramère composé de deux sous-unités Hda1, ainsi que des sous-unités Hda2 et Hda3. La formation de ce tétramère est essentielle à l'activité enzymatique de Hda1.¹¹² Au niveau de la chromatine, Hda1 déacétyle la lysine 14 de la variante d'histone Htz1.¹¹³ L'acétylation de cette dernière par Gcn5 et Esa1 permet sa déposition au niveau de différents promoteurs de gènes actifs lors de l'assemblage des nucléosomes.¹¹⁴ Hda1 joue donc ici un rôle de suppresseur de la transcription, avec une activité prédominante au niveau des régions télomériques.⁸² De plus, Hda1 régule l'acétylation de plusieurs lysines, principalement au niveau des histones H2B, H3 (K9) et H4 (K5, K12 et K16).^{79,83} Hda1 déacétyle également des protéines non-histones. Elle permet, au même titre que Rpd3, de réguler la fonction de Hsp90, une protéine jouant plusieurs rôles importants, notamment en réponse à un stress thermique.¹¹⁵ Hda1 interagit aussi avec Tup1, un répresseur général de la transcription de plusieurs protéines impliquées dans diverses voies de signalisation.⁸³

Au contraire de sa consœur de la classe II, Hos3 n'est pas présente sous forme de complexe à l'intérieur des cellules. Elle agit au niveau de la chromatine en acétylant certains résidus présents sur tous les types histones (H2A, H2B, H3 et H4), dont les lysines 5 et 12 sur les histones H4.^{82,84,116} Bien que peu documentée, des études ont montré que cette désacétylase est impliquée dans la cascade de signalisation activée suite à un dysfonctionnement de l'orientation du fuseau mitotique. Elle permet de contrôler la transition mitose/G1.¹¹⁷ Chez *Saccharomyces pombe* (*S. pombe*), Hos3 a été démontré comme étant impliquée dans la croissance cellulaire sous un stress osmotique, ce qui pourrait laisser penser qu'elle jouerait possiblement un rôle similaire chez la levure *S. cerevisiae*.^{118,119} Elle est aussi impliquée dans l'épissage.¹²⁰ Au même titre que Rpd3, Hos3 joue un rôle dans la transcription des gènes durant la phase G1 du cycle cellulaire.¹¹⁰

Troisième classe

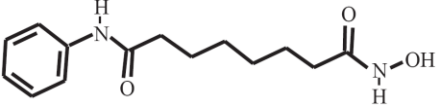
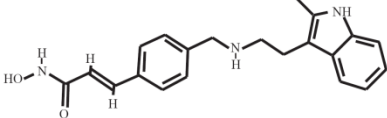
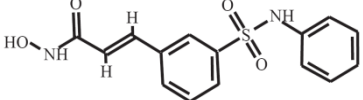
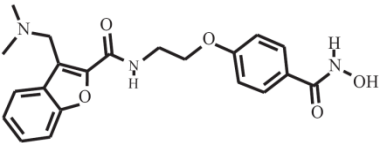
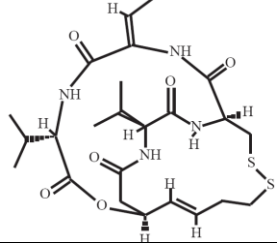
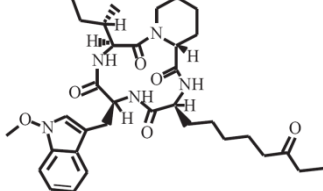
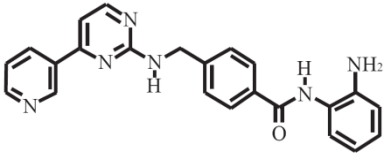
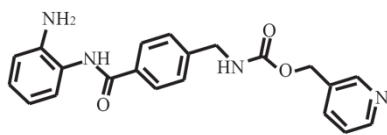
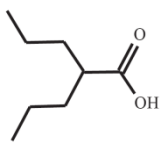
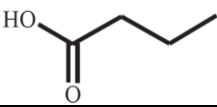
La troisième et dernière classe des KDAC regroupe cinq enzymes, soit Sir2, Hst1, Hst2, Hst3 et Hst4, également appelées sirtuins. Ces enzymes se trouvent être conservés des bactéries aux mammifères.¹²¹ Elles constituent une catégorie distincte des deux premières de par son activité dépendante du NAD.¹²² Sir2, l'enzyme fondatrice de ce groupe, est impliquée dans le modelage de la chromatine au niveau de l'ADN ribosomal et des télomères.^{123,124} Les sirtuins jouent le même rôle au niveau des locus HML et HMR.¹²⁵ Hst1 est également impliquée dans le contrôle de la répression des gènes de sporulation.^{102,126} Elles jouent aussi un rôle dans la progression de la réplication de l'ADN.¹²⁷ De plus, Sir2 est impliquée dans la longévité de la cellule.^{128,129} En somme, les sirtuins sont impliquées dans bon nombre de voies et mécanismes cellulaires importants. Toutefois, de par son mécanisme catalytique différent des deux premières classes, la classe III ne sera pas plus abordée dans ce mémoire, ce dernier se concentrant essentiellement sur les deux premières classes et ses inhibiteurs.

1.4 Les inhibiteurs de désacétylases d'histones

Au cours des dernières années, de multiples recherches ont fait état de nouvelles molécules capables d'inhiber les désacétylases d'histones. Ces composés pouvant potentiellement être utilisés dans la médecine moderne, entre autres pour le traitement de la leucémie¹³⁰ ou divers cancer¹³¹, de nombreuses études se sont attardées à comprendre la base moléculaire de leurs effets. De par leur différence au niveau de leur activité catalytique, les KDAC de classe I et II ne peuvent être inhibées par les mêmes molécules que celles de classe III. Puisque notre étude concerne un inhibiteur des classes I et II (l'acide valproïque), la présente section ne traitera que de ce type d'inhibiteur.

Plusieurs inhibiteurs ont été utilisés chez la levure pour comprendre le rôle des KDAC ou évaluer leur potentiel comme agent complémentaire à la chimiothérapie. Plusieurs d'entre eux ciblent spécifiquement les KDAC des classes I et II (Tableau III), et influencent l'activité de plusieurs voies cellulaires. Le Trichostatin A (TSA) affecte la progression dans le cycle cellulaire en causant un retard durant la mitose chez *S. pombe*.¹³² Cet inhibiteur prévient aussi la désacétylation des histones¹³³ en ciblant les KDAC Hda1 et Rpd3 spécifiquement.^{78,84,134} Le vorinostat, également connu sous le nom d'acide hydroxamique suberoylanilide (SAHA), intervient également au niveau des histones en ciblant, entre autres, la KDAC Rpd3 chez *S. cerevisiae*. Le phénylbutyrate de sodium (PBA) influence la réponse au stress au réticulum endoplasmique¹³⁵, affecte négativement la voie de transport du tryptophane¹³⁶, cause un arrêt dans la croissance cellulaire¹³⁷ et inhibe la voie de réparation par recombinaison homologue induite par le méthanesulfonate de méthyle (MMS) ou la camptothécine (CPT).¹³⁸ Le sodium butyrate inhibe la prolifération cellulaire dans des cellules cancéreuses.¹³⁹ Une étude à grande échelle effectuée chez *S. pombe* montre plusieurs gènes qui, lorsque mutés, entraîne une sensibilité à cette drogue. Ces gènes sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires importants, incluant le métabolisme des ARN et la régulation de cascades de phosphorylation.¹⁴⁰

Tableau III : Inhibiteurs de désacétylases

Groupe	Composé	Structure ¹⁴¹	Classe ciblée	État actuel	Références
Acide hydroxamique	Vorinostat (SAHA, Zolinza)		Classe I et II	Approuvé FDA	142-145
	Panobinostat		Classe I et II	Approuvé FDA	146-148
	Belinostat		Classe I et II	Approuvé FDA	149-152
	Abexinostat		Classe I et II	Phase I et II	153-155
Tétrapeptide cyclique	Romidepsin		Classe I	Approuvé FDA	156,157
	Apicidin		Classe I et II		158,159
Benzamide	Mocetinostat		Classe I	Phase II	160-162
	Entinostat		Classe I	Phase III	163-165
Acide aliphatique	Acide valproïque (VPA)		Classe I et II	Phase II	166,167
	Butyrate		Classe I et II	Phase II	168-171

Notre étude se penche sur les bases moléculaires de l'effet biologique de l'acide valproïque (VPA), inhibiteur de KDAC des classes I et II (Tableau III). Ce dernier est un acide gras de courte chaîne présentant une faible toxicité chez l'humain. Il est aujourd'hui le médicament le plus prescrit pour traiter, entre autres, les convulsions épileptiques généralisées ou partielles, les troubles schizoaffectifs et les migraines.^{172,173} Des études effectuées chez la levure ont identifié un nombre important de protéines qui, lorsqu'absentes dans la cellule, provoquent une sensibilité au VPA.^{140,174} Il a été démontré, entre autres, que le VPA perturbe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose.^{175,176} Chez *S. pombe*, le VPA affecte également le transport membranaire et provoque une augmentation cytoplasmique du calcium (Ca^{2+}) via le complexe de canal calcique Cch1-Yam8.^{140,177} L'exposition au VPA occasionne des perturbations au niveau du transport membranaire, en plus de sensibiliser les cellules aux enzymes de digestion de la paroi cellulaire.¹⁷⁸ Finalement, les cellules traitées avec l'inhibiteur présentent une réponse inappropriée aux dommages à l'ADN qui surviennent après un stress génotoxique, en plus d'induire l'autophagie de protéines impliquées dans les voies de réparation de l'ADN.^{179,180} Toutes ces données suggèrent donc que le VPA pourrait affecter la prolifération en modulant l'activité de protéines impliquées dans d'importantes voies cellulaires. Les prochaines sections détailleront donc plusieurs mécanismes impliqués dans la prolifération cellulaire sur lesquels nous avons étudié l'effet du VPA.

1.5 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire de la levure *S. cerevisiae* est divisé en quatre phases au même titre que chez la plupart des autres organismes. Il comprend les phases de gap 1 (G1), de synthèse d'ADN (S), de gap 2 (G2) et de mitose (M) (Figure 5). Les mécanismes impliqués durant la phase G1 servent essentiellement à préparer la cellule à la réplication de l'ADN. Au départ, la cellule perçoit tous changements survenant dans son environnement, tel que le niveau de nutriments ou la présence d'hormone, et de ses propres signaux internes, tels que l'état de sa machinerie métabolique. Suite à ces variations, elle entrera soit dans un cycle cellulaire normal soit dans une voie alternative comme la sporulation ou la sénescence.^{181,182} La phase S

est la phase de réplication de l'ADN. Une cascade d'événement précise va mener à la formation des complexes de réplication chargés de dupliquer l'ADN.¹⁸³ D'autres sont chargés de contrôler et réparer d'éventuels dommages ou erreur de réplication (voir la section Les points de contrôles). Finalement, les phases G2 et M sont celles où la cellule divise son génome dupliqué entre la cellule mère et la cellule fille, pour ensuite se séparer et former deux cellules distinctes.¹⁸⁴

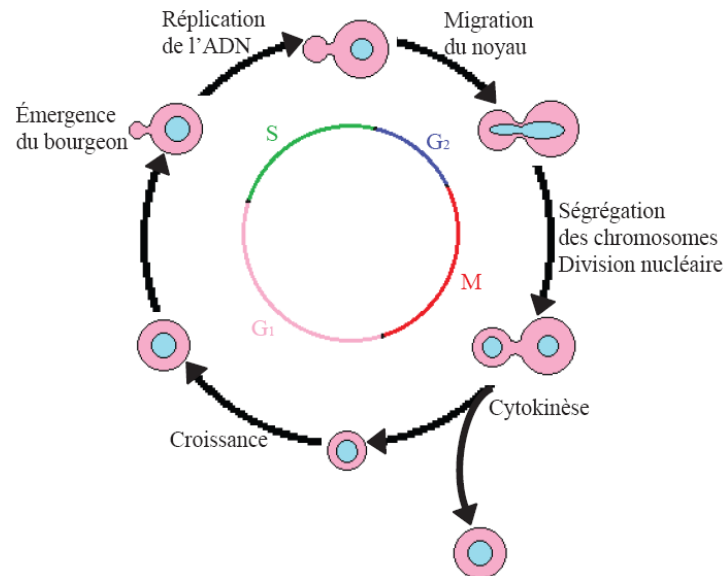


Figure 5 : Cycle cellulaire

Schématisation du cycle cellulaire chez les levures dont le cycle de division comprend la formation d'un bourgeon.

Chez les eucaryotes, la progression à travers le cycle cellulaire implique l'action de kinases dépendantes des cyclines (Cdk). De par leur nom, ces kinases, spécifiques pour les résidus de sérines et de thréonines¹¹, ont une action dépendante de sous-unités activatrices, les cyclines.¹⁸⁵ Il existe cinq Cdk chez *S. cerevisiae*, soit Cdc28, Pho85, Kin28, Ssn3 et Ctk1, chacune étant impliquées dans des mécanismes différents. Kin28, Ssn3 et Ctk1 jouent essentiellement un rôle dans la transcription par l'ARN polymérase II.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Pho85 est essentielle la transition entre les phases G1 et S uniquement en cas de délétion de Cdc28. En dehors de ce rôle, il régule essentiellement le métabolisme du glycogène.^{189,190} Cdc28 est donc

la Cdk principale dans la régulation du cycle cellulaire.¹⁸⁵ Cette dernière a la capacité de se lier à différentes cyclines, et ce, à des moments précis du cycle (Figure 6).

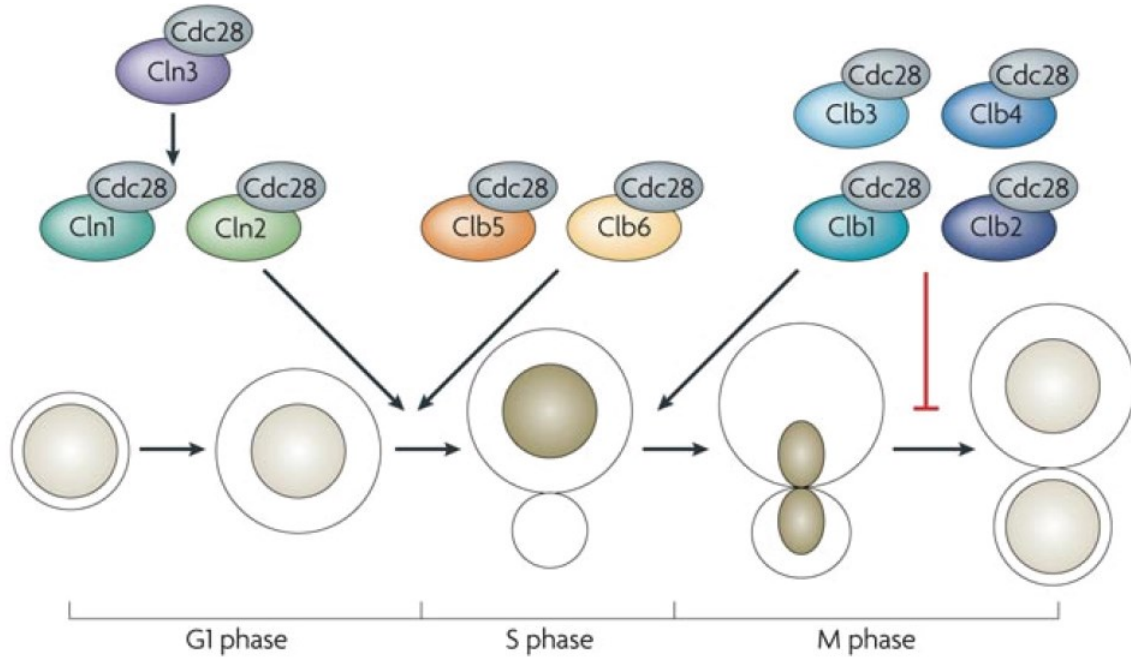


Figure 6 : Le cycle des cyclines.

Schématisation des complexes Cdc28-cyclines à travers le cycle cellulaire chez la levure dont la division présente un bourgeon. Figure obtenue de Bloom J. and Cross F.R. , Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control, Nat Rev Mol Cell Biol (2007).

1.5.1 Les cyclines

Chez la levure, il existe neuf cyclines jouant des rôles précis. Les cyclines Cln1, Cln2 et Cln3 sont chargées de la progression en phase G1.¹⁹¹ L'absence d'une de ces protéines provoque un arrêt dans la première phase du cycle cellulaire. Elles promeuvent, entre autres, la polymérisation de l'actine nécessaire à la formation du bourgeon (bud) qui deviendra à terme la cellule fille.¹⁹² Elles sont également impliquées dans le relâchement des cyclines de phase S (voir section La transition entre les phases G1 et S). Les cyclines Clb5 et Clb6 sont les sous-unités activatrices de la phase S. Elles sont impliquées dans la transition entre les

phases G1 et S (voir section sur la transition entre ces phases) et permettent l'initiation de la réplication de l'ADN en début de phase. Des études montrent que Clb6 est rapidement dégradée alors que Clb5, plus stable, reste présente durant la phase S afin de jouer un rôle dans le départ des fourches de réplication tardives.^{193,194} Il s'agit de la seule cycline dont la délétion crée un ralentissement dans la progression en phase S.¹⁹⁵ Il semble également que Clb5 a un rôle dans la formation du fuseau mitotique, bien qu'il ne soit pas suffisant, à lui seul, pour assurer cette fonction.¹⁹⁶ Bien que classée dans les cyclines de la phase G2/M, Clb3 et Clb4 sont en fait exprimées tôt en phase S et perdure jusqu'à la fin de la division nucléaire.¹⁹⁷ Au même titre que Clb1 et Clb2, Clb3/4 jouent un rôle essentiel dans la transition entre la phase G2 et celle de la mitose. Les quatre cyclines sont importantes pour la formation et le maintien du fuseau mitotique.^{197,198}

1.5.2 La spécificité d'action des cyclines

Tel que vu précédemment, Cdc28 a la capacité de se lier à neuf cyclines différentes qui ont leur propre rôle.^{185,199} Il faut donc une bonne régulation des cyclines afin que la progression dans le cycle cellulaire ne soit pas perturbée. Plusieurs mécanismes importants s'assurent de la régulation et de la spécificité d'action des complexes Cdc28-cyclin. En premier lieu, les cyclines sont régulées au niveau transcriptionnel. Le facteur de transcription SBF active la transcription de Cln1 et Cln2 en phase G1.^{200,201} La transcription de Clb5 et Clb6 se fait plutôt grâce à MBF.¹⁹⁶ Un second mécanisme de régulation est la dégradation des cyclines médiée par leur ubiquitination. Le complexe SCF enclenche la dégradation des cyclines Cln1, Cln2 et Clb6.^{193,202,203} La dégradation de Clb5 est, quant à elle, médiée par le complexe APC couplé à la protéine Cdc20.²⁰⁴ Lorsque lié à Cdh1, le complexe APC entraîne plutôt la dégradation de Clb2 en mitose.²⁰⁵ Les cyclines sont également régulées par la présence d'inhibiteurs. En G1, les cyclines Clb5/6 sont inhibées par la protéine Sic1 (voir section La transition entre les phases G1 et S).²⁰⁶ Il a été également démontré que les cyclines de phases S comprennent un motif spécifique, appelé RXL, qui permet de cibler des gènes spécifiques nécessaires à la progression en phase S. La mutation de ces sites entraîne une diminution dans la phosphorylation des cibles de Cdc28-Clb5.²⁰⁷ Tous ces mécanismes

permettent donc de réguler les cyclines à travers le cycle cellulaire afin qu'elles agissent dans la bonne phase, au bon moment.

1.5.3 La transition de la phase G1 à la phase S

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'effet du VPA sur les cyclines. Nous avons observé un effet de cette molécule sur les cyclines permettant la transition entre les phases G1 et S (voir section Résultats). Cinq des neuf cyclines présentent chez *S. cerevisiae* y jouent un rôle. Une cascade d'événements précis et coordonnés permet le passage de la première phase du cycle vers celle de réplication (Figure 7). La cascade débute en G1 avec l'association de Cln3 à Cdc28, ce qui entraîne l'activation des médiateurs de transcription SBF et MBF. Ces derniers pourront alors permettre la transcription de Cln1 et Cln2, nécessaire à la formation du bourgeon, l'entrée en phase S et la duplication des corps mitotiques.²⁰⁸ Les deux cyclines entraînent la phosphorylation de Sic1, une protéine connue pour inhiber Clb5/6, et sa dégradation par le complexe d'ubiquitine ligase SCF.^{209,210} Une étude récente montre toutefois que Clb5/6 phosphorylent également Sic1 pour permettre leur propre libération. La phosphorylation de Sic1 par Cln1/2-Cdc28 permet en fait d'affaiblir suffisamment l'inhibition de Clb5/6 par Sic1 pour permettre aux cyclines de la phase S de multiphosphoryler à leur tour Sic1. L'ajout de six groupements phosphates entraîne alors la dégradation de la protéine, et la libération totale des cyclines Clb5/6.²¹¹ Ce faisant, elles se lient à leur tour à Cdc28 pour enclencher le départ des fourches de réplication de l'ADN en début de phase S.

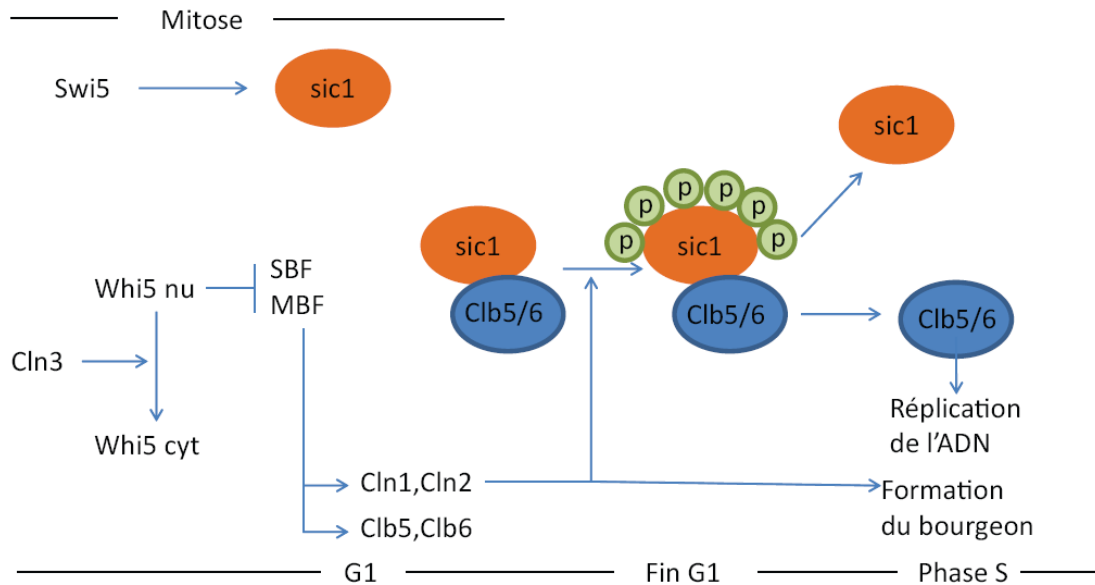


Figure 7: La transition G1 vers S

*Mécanisme permettant la transition entre les phases G1 et S chez *S. cerevisiae*. La transcription de *Sic1* est effectuée durant la mitose. Elle inhibe alors *Clb5/6* jusqu'en début S où elle sera phosphorylée par *Cdc28-Cln1/2* et finalement dégradée.*

1.6 Les points de contrôle

Puisque le VPA est connu pour inhiber la prolifération cellulaire, nous nous sommes intéressés à différentes voies de signalisation qui pourraient être affectées par cette molécule (voir la section Voies de signalisation affectées par le VPA). Cela dit, avant de parler de ces voies, il est important de parler des mécanismes qui bloquent la progression dans le cycle cellulaire en réponse à divers stimuli, soit les points de contrôle. Il en existe plusieurs et leur rôle présumé consiste à permettre à la cellule de résoudre diverses anomalies survenues durant la prolifération cellulaire en bloquant les cellules à différentes phases du cycle. Toute d'abord, on retrouve le point de contrôle de la taille. Ce dernier survient durant la phase G1 et a pour rôle d'inhiber la prolifération cellulaire jusqu'à ce que la cellule ait atteint une taille adéquate pour permettre la division cellulaire.^{212,213} Un second point de contrôle rencontré dans le cycle cellulaire est celui activé suite à des dommages à l'ADN. Ce dernier fut particulièrement

étudié dans notre projet. Par conséquent, sa cascade de signalisation sera détaillée en profondeur dans la prochaine sous-section. Il a également été découvert un point de contrôle durant la phase G2. Il s'agit du point de contrôle de la morphogénèse. Ce mécanisme s'active lorsqu'il y a inhibition de la formation du bourgeon, et donc un défaut dans la polymérisation du cytosquelette.²¹⁴ L'activation de cette cascade occasionne un retard dans la division nucléaire après la réplication de l'ADN et l'assemblage du fuseau mitotique. Des études montrent que la prolifération cellulaire se trouve momentanément arrêté dû à l'inhibition de Cdc28, qui ne peut alors entraîner la dégradation de la protéine Swe1, un inhibiteur de l'entrée en phase M.²¹⁵⁻²¹⁷ Finalement, il existe deux points de contrôle durant la mitose, soit ceux de l'assemblage et de la position du fuseau mitotique. Ils sont chargés de s'assurer de la bonne mise en place du fuseau mitotique et que les chromatides sœurs sont bien attachées à chacun des pôles du fuseau. Une structure anormale des kinétochores ou une absence de tension à l'un d'entre eux (signifiant le fait qu'une chromatide n'est pas attachée), est suffisant pour les activer.²¹⁸⁻²²⁰ Les points de contrôle sont donc multiples et agissent dans des phases spécifiques du cycle cellulaire.

1.6.1 Le point de contrôle des dommages à l'ADN

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés au fait que le VPA pourrait potentiellement endommager l'ADN. Cela nous a menés à investiguer l'effet de cette molécule au niveau des protéines impliquées dans le point de contrôle des dommages à l'ADN. Il convient donc de détailler plus en profondeur ce mécanisme.

Il existe deux kinases principales à la base de ces points de contrôle, soit Mec1 et Tel1 (ATR et ATM respectivement chez les mammifères).²²¹ Toutefois, l'absence de sensibilité d'un mutant Tel1 aux agents génotoxiques, au contraire d'un mutant Mec1, laisse à penser que l'importance de cette kinase dans l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN est moindre que sa consœur.²²² Cela dit, son rôle serait possiblement plus important dans le cas d'une absence de la kinase majeure Mec1, puisqu'une surabondance de Tel1 dans une souche *mec1Δ* entraînerait une diminution de la sensibilité d'un tel mutant aux stress génotoxiques.^{222,223} La cascade de signalisation débute lorsqu'une plus grande concentration

de protéines RPA est détectée à une région ponctuelle de l'ADN. RPA est un complexe de trois protéines, composé de Rfa1-3, se liant à l'ADN simple brin lors de la réplication de l'ADN.²²⁴ Toutefois, en présence de bris ou de blocage des fourches de réplication de l'ADN, une plus grande quantité d'ADN simple brin est formé, ce qui entraîne une surabondance locale de RPA. L'augmentation de la quantité de RPA va entraîner deux événements majeurs (Figure 8). Chez *S. cerevisiae*, Mec1, complexée avec la protéine Ddc2 nécessaire pour son activité, interagit alors avec RPA de par son extrémité carboxy-terminale (C-terminal).²²⁵ L'activation de la kinase résultant de sa liaison au niveau de l'ADN entraîne la phosphorylation de la protéine Rad9.²²⁶ Cette dernière va alors servir d'adaptateur entre Mec1 et la seconde kinase la plus importante de cette voie de signalisation, Rad53.²²⁷ Ce processus serait aussi important pour l'activation de la kinase Chk1.²²⁶ RPA entraîne également le recrutement de l'un des trois complexes RFC alternatifs, soit celui contenant la protéine Rad24. RFC est un complexe de réplication formé normalement de 5 sous-unités (Rfc1-5) et est chargé d'installer l'anneau PCNA sur l'ADN.²²⁸ Dans certaines situations, d'autres protéines (Ctf18, Elg1 ou Rad24) s'ajoutent au complexe RFC, formant ainsi les complexes alternatifs. Ctf18 est requise pour la cohésion des chromatides sœurs chez *S. cerevisiae*.²²⁹ De nombreuses études démontrent en plus l'implication de Ctf18, Elg1 et Rad24 dans l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN.²³⁰⁻²³² Lorsque recruté par RPA, le complexe RFC-Rad24 charge un complexe hétérotrimérique composé des protéines Ddc1, Rad17 et Mec3, appelé l'anneau 9-1-1.²³³ L'anneau active également Mec1 qui phosphoryle Ddc1 en retour.²³⁴ Ddc1 recrute alors la protéine Dpb11 qui contribue à amplifier l'activation de Mec1.²³⁵⁻²³⁷ Il a été démontré également que Ddc1 peut activer directement Mec1 sans le recours de Dpb11.²³⁸ Une étude a rapporté l'existence d'une autre protéine capable d'activer Mec1, soit la nucléase Dna2, amenant ainsi le nombre de protéines activatrices de Mec1 à trois.²³⁹ Mec1, en combinaison avec Rad9 mentionnée précédemment, va par la suite activer les kinases effectrices Rad53 et Chk1.^{221,240-242} La protéine Mrc1 joue également un rôle dans l'activation de la kinase Rad53 suite à un stress réplcatif induit par hydroxyurée (HU).²⁴³ Une étude montre que la phosphorylation de Rad53 par Mec1 requière la présence de Mrc1, où cette dernière joue un rôle de protéine adaptatrice afin de faciliter la phosphorylation de Rad53.^{244,245}

Une fois activées, les kinases Rad53 et Chk1 vont affecter plusieurs mécanismes important pour le contrôle du cycle cellulaire et le redémarrage des fourches de réplication bloquées. Il a été démontré que Pds1 est phosphorylé en réponse à des dommages à l'ADN, ce qui retarde l'entrée en anaphase durant la mitose.²⁴⁶ Il a également été démontré que Rad53 stimule Bub2/Bfa1 de manière à inhiber la progression à travers la mitose.²⁴⁷ Durant cette phase du cycle cellulaire, les kinases permettent également de prévenir l'élongation des microtubules.²⁴⁸ En somme, le point de contrôle inhibe la séparation des chromosomes lorsqu'un dommage y est détecté. Il permet également d'augmenter la production de dNTP, ce qui favorise la réparation de la lésion par diverses polymérases d'ADN spécialisées.²⁴⁹ Durant la phase S, Mec1 et Rad53 permettent, à travers des mécanismes mal connus, de stabiliser les fourches de réplication arrêtés et éviter ainsi leur effondrement.²⁵⁰ De par son action sur Sld2 et Dpb4, deux protéines impliquées dans le départ des fourches de réplication, Rad53 empêche aussi le départ des origines tardives afin de préserver un groupe d'origine de réplication potentielles qui pourra être utilisé en cas d'effondrement des origines précoces.^{251,252} Les protéines du point de contrôle sont également impliquées dans la régulation des mécanismes de réparation de l'ADN. Entre autres, l'anneau 9-1-1 est une composante de l'une des voies de tolérance des dommages à l'ADN (voir la section La recombinaison homologe et le changement de matrice), en plus de contribuer à la résection des bris double-brins.²⁵³⁻²⁵⁵ Chez l'humain, Chk1 phosphoryle Rad51, une protéine impliquée dans la réparation par recombinaison homologe.²⁵⁶ En phase G1, Mec1 et Rad53 empêchent la progression vers la phase S.^{257,258} Rad53 est également impliquée dans la régulation des cyclines de phase G1, Cln1/2, en réponse aux dommages à l'ADN.²⁵⁹ Des protéines impliquées dans le point de contrôle des dommages à l'ADN, tels Rad9 et Rad53, jouent aussi un rôle dans la transition entre la phase S et la phase G2/M.^{260,261} Finalement, une étude à large échelle a montré que Mec1 était importante pour l'expression de plusieurs gènes dont l'expression pourrait contribuer à la réponse aux dommages à l'ADN.²⁶² En somme, le point de contrôle a pour rôle de donner aux cellules le temps de réparer les dommages à l'ADN.

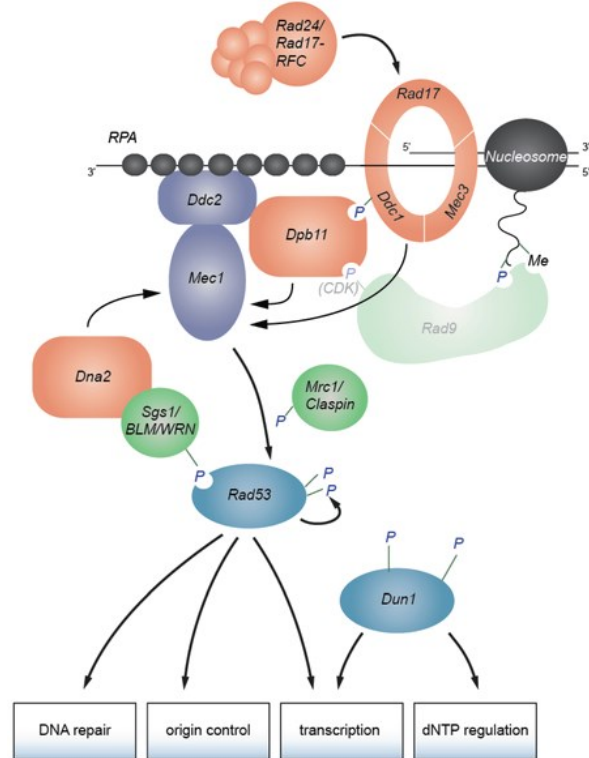


Figure 8 : Point de contrôle des dommages à l'ADN

Schéma des protéines majeures impliquées dans le point de contrôle des dommages à l'ADN chez la levure et de ses effets dans la cellule. Figure obtenue de Hustedt N. et al., Replication checkpoint: tuning and coordination of replication forks in S phase, Genes (Basel) (2013).

1.7 La recombinaison homologue et le changement de matrice

En plus de nous intéresser au point de contrôle activé suite à des dommages à l'ADN, nous avons étudié l'effet du VPA au niveau de protéines impliquées dans la voie de réparation par recombinaison homologue (HR). Plusieurs agents, tels que le HU et le MMS, activent cette cascade de signalisation.^{263,264} Cette section résume les principales étapes du mécanisme de HR schématisé dans la figure 9.

La recombinaison homologue est un type de mécanisme de réparation qui requiert deux principaux éléments pour l'enclenchement de la cascade. Il faut avant tout que l'ADN présente une lésion simple brin ou double brin.^{265,266} Comme son nom l'indique, il est également nécessaire d'avoir une séquence homologue à la séquence endommagée qui servira alors de matrice de synthèse. En général, la chromatide sœur est préférentiellement utilisée dans un tel processus. Lors de la détection d'un bris par la cellule, les extrémités au niveau de la lésion subissent, si nécessaire, ce qu'on appelle la résection. Il s'agit d'un processus exonucléolytique 5'-3' qui va générer une extrémité simple brin 3'. Ce processus est initié chez la levure par le complexe Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) et l'endonucléase Sae2. Une fois la résection commencée, elle sera prise en charge par deux autres nucléases, soit Exo1 et Dna2.²⁶⁷ L'ADN étant alors devenu simple brin, elle se couvre de protéines RPA, prévenant ainsi la formation de structures secondaires.²⁶⁸ Rad51 se lie ensuite à l'ADN en formant un filament nucléoprotéique en hélice pouvant s'étendre sur une centaine de nucléotides, délogeant ainsi RPA.²⁶⁹ Cette liaison est possible grâce à une protéine médiatrice, Rad52.²⁷⁰ Il y a alors invasion de l'extrémité simple brin dans la matrice de synthèse, hybridation entre les bases complémentaires et synthèse d'ADN.

Chez les eucaryotes, il existe un second mécanisme de réparation qui implique l'utilisation de matrices homologues. Il s'agit d'une des deux voies de tolérance des dommages à l'ADN, soit le changement de matrice (TS; «Template switching»²⁷¹). En plus des protéines mentionnées précédemment, RPA a également la capacité de recruter Rad18/Rad6 et Rad5 au site de la lésion. Ces dernières entraînent l'ajout respectivement d'une ou de plusieurs protéines ubiquitines au niveau de la lysine 164 de PCNA.²⁷² La poly-ubiquitination de PCNA entraîne l'activation de la voie de changement de matrice («Template switching») qui se manifeste par la formation de structures de recombinaison comparable à celles décrites pour la HR.²⁷³ Une étude montre également que l'anneau 9-1-1 est un composant important dans le mécanisme de TS et que son rôle est indépendant de sa fonction dans le point de contrôle des dommages à l'ADN.²⁷⁴ Toutefois, le mécanisme de TS n'est pas encore entièrement compris.

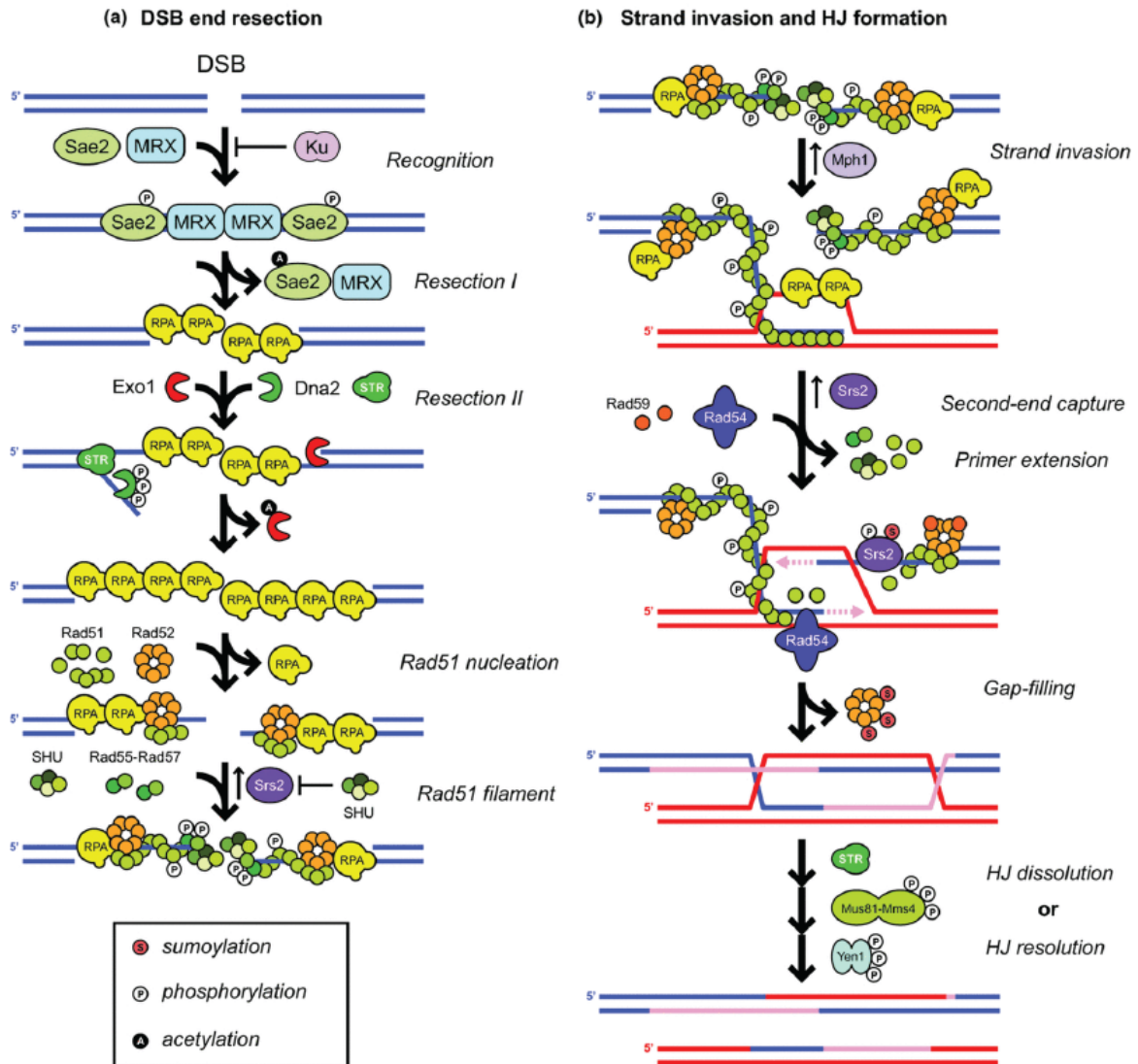


Figure 9 : Voie de réparation par recombinaison homologue

Mécanisme de la voie de réparation par recombinaison homologue chez S. cerevisiae. Figure obtenue de Mathiasen D.P. et al., Cell cycle regulation of homologous recombination in Saccharomyces cerevisiae, FEMS Microbiol Rev (2014).

1.8 Voies de signalisation affectées par le VPA

Au cours de notre étude, nous avons observé des effets du VPA sur plusieurs voies de signalisation importantes. Il convient donc de les décrire dans les prochaines sous-sections.

1.8.1 La voie des phéromones

Selon les résultats obtenus dans notre étude, le VPA a la capacité d'influencer la voie des phéromones (voir section Résultats), une cascade de signalisation qui active la protéine Far1, un inhibiteur des cyclines de phase G1.^{275,276} Dans la nature, la voie des phéromones est activée chez *S. cerevisiae* lorsqu'une cellule haploïde de type « a » (MATa) se combine avec une cellule haploïde de type « α » (MAT α), dans un processus appelé «mating» ou conjugaison, dans le but de devenir diploïde. Les deux types sexuels se distinguent par le type de phéromones qu'elles sécrètent. Ainsi, une cellule MAT α libère l'hormone sexuelle α afin d'attirer une cellule MATa. Cette dernière se déplacera en fonction du gradient de concentration de l'hormone jusqu'à la cellule MAT α pour fusionner avec elle et ainsi former une cellule diploïde (Figure 10).²⁷⁷

Il s'agit là d'un principe fortement utilisé en laboratoire. Lorsque la cellule est stimulée par l'hormone, elle inhibe sa progression dans le cycle cellulaire et reste en phase G1 le temps de fusionner avec la cellule de type sexuel opposé. En laboratoire, cela permet de synchroniser une population de cellules haploïdes en phase G1 grâce à l'ajout de l'hormone du type opposé. On observe alors ce qu'on appelle un « shmoo », soit une prolongation de la membrane cytoplasmique, aisément observable par microscopie (Figure 10). La cascade de la voie des phéromones est donc activable chimiquement de manière artificielle en laboratoire.

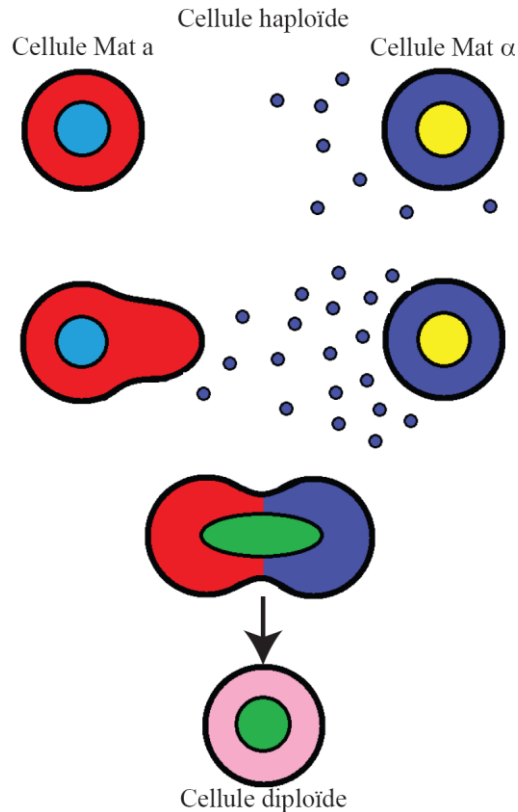


Figure 10 : «mating»

Schématisation de la fusion («mating») entre deux cellules haploïdes chez les levures dont la division cellulaire comprend la formation de bourgeon.

La cascade débute suite à la liaison de l'hormone à un récepteur situé à la surface des cellules, possédant sept segments transmembranaires et couplés à une protéine G. La sous-unité alpha ($G\alpha$; Gpa1 chez *S. cerevisiae*) de cette protéine va provoquer l'échange de la guanosine diphosphate (GDP) pour de la guanosine triphosphate (GTP). Il est connu dans la littérature que la liaison du GTP provoque la dissociation de l'hétérodimère composé des sous-unités bêta et gamma de la protéine G ($G\beta\gamma$; Ste4 et Ste18 respectivement chez *S. cerevisiae*). Toutefois, une étude montre que cette dissociation n'est pas toujours nécessaire à l'activation de la voie des phéromones, mais que celle-ci peut être activée uniquement par un changement de conformation dans le complexe hétérotrimérique que forment les sous-unités alpha, bêta et gamma.²⁷⁸ Peu importe qu'il y ait dissociation ou non, la suite de la cascade reste la même, à savoir l'autophosphorylation de la protéine Ste20.^{279,280} Il semblerait que

cette dernière ait besoin d'interagir avec les protéines Cdc42 et Bem1 pour s'activer, bien que leurs rôles dans la voie des phéromones ne soient pas encore bien définie.^{281,282} Gβγ compte un autre effecteur, à savoir la protéine d'échafaudage Ste5.^{283,284} Cette dernière ne possède pas d'activité catalytique, mais sert plutôt de plateforme aux kinases de la cascade.²⁸⁵ Elle permet avant tout d'attirer et d'ancrer la première « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) de la cascade, soit Ste11, près de la membrane. Ste20, liée à la protéine membranaire Cdc42, entrainera alors son activation, provoquant un effet de domino sur les autres kinases.²⁸⁶ Ste11 va donc phosphoryler Ste7 qui, à son tour, activera Fus3 et Kss1.^{287,288} Ces dernières comptent plusieurs effecteurs. Dans un premier temps, elles inhibent Dig1 et Dig2, deux répresseurs de Ste12, un facteur de transcription. Ce faisant, Ste12 entrainera l'activation de la transcription de plusieurs gènes importants pour la croissance invasive et la fusion entre deux cellules de types différents.²⁸⁹⁻²⁹¹ Un modèle propose le fait que Far1, activée par Fus3, soit un inhibiteur de l'une des trois cyclines de la phase G1, soit Cln2.²⁹² La cellule serait donc momentanément dans l'incapacité de progresser vers la phase S de par l'inactivation de Cln2, causant ainsi un arrêt dans la prolifération cellulaire.

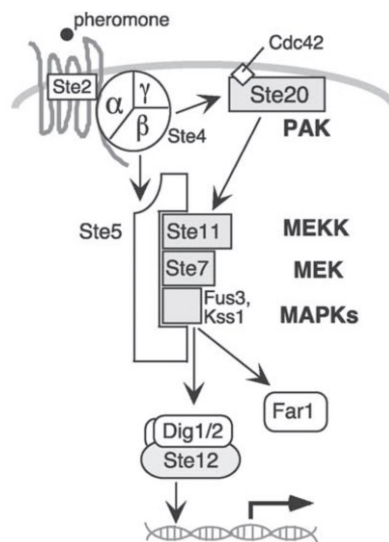


Figure 11: La voie de signalisation des phéromones

*Schématisme de la cascade de signalisation survenant suite à la liaison de l'hormone sexuelle chez *S. cerevisiae*. Figure modifiée de Bardwell L., *A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway*, Peptides (2004).*

1.8.2 La voie de l'intégrité de la paroi cellulaire

Une seconde voie de signalisation affectée par le VPA est la voie activée suite à un stress pouvant causer une perte de l'intégrité de la paroi cellulaire (« Cell wall integrity pathway »; CWI; voir section Résultats). La paroi est une structure essentielle à la résistance de la cellule au stress osmotique, en plus de jouer un rôle important dans la prolifération cellulaire.²⁹³ Elle se doit de capter tout changement dans son environnement susceptible d'entraîner des dommages à la cellule et d'enclencher les voies de signalisation adéquate pour y faire face. De multiples signaux peuvent entraîner l'activation de la voie CWI tels que les changements de température, les traitements aux facteurs α/α ou certaines drogues.^{294,295} Par exemple, il a été démontré que plusieurs agents, dont la caféine, le HU, le MMS ou les UV, activaient la principale kinase de cette voie de signalisation.²⁹⁶ Une augmentation du taux de sel dans l'environnement peut également engendrer l'activation de la cascade.²⁹⁷ Finalement, en plus de jouer un rôle face aux changements de l'environnement, il semblerait que la kinase Slt2 impliquée dans cette voie s'active également lors de processus internes, tels la polarisation cellulaire.²⁹⁸

La cascade commence généralement par la détection du changement environnemental par l'un des cinq récepteurs transmembranaires présents à la paroi cellulaire, soit Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 et Mtl1. Bien qu'il y ait parfois de la redondance entre ces différents récepteurs, il semblerait que chacun soit spécifique à certain type de stimuli.²⁹⁹ L'extrémité intracellulaire du récepteur recrute alors l'un des deux facteurs d'échange de guanosine triphosphate (GEF), Rom1 ou Rom2, qui catalyse l'échange du GDP en GTP sur la protéine Rho1.³⁰⁰ Cette dernière se lie et active par la suite la protéine kinase C (PKC) qui, à son tour, cible Bck1, la première MAPK de la cascade.^{301,302} Survient alors une suite d'activation de kinases, soit dans l'ordre Mkk1/2 et Slt2 (également nommé Mpk1).³⁰³ Cette dernière a la capacité d'activer deux facteurs de transcription connus, soit le complexe SBF et la protéine Rlm1, impliqués dans la synthèse des gènes liés à la réponse à cette cascade et dans la régulation du cycle cellulaire.^{304,305} Il existe plusieurs inhibiteurs naturels du CWI, notamment Msg5, Ptp2, Ptp3 et Sdp1 qui ciblent spécifiquement Slt2, permettant ainsi une régulation adéquate de la cascade (Figure 12).³⁰⁶⁻³⁰⁸

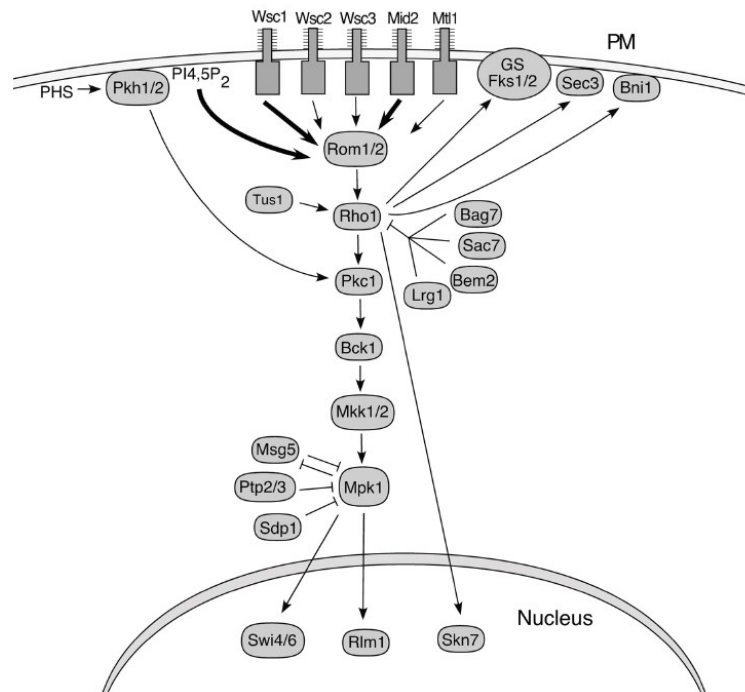


Figure 12 : La voie de signalisation d'intégrité à la paroi cellulaire

Schématisation de la voie de signalisation activée suite à un stress au niveau de la paroi cellulaire chez S. cerevisiae. Figure obtenue de Levin D.E., Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae Microbiol Mol Biol Rev (2005).

De par son rôle de réponse aux stress de tout type, la voie CWI est reliée à différentes voies cellulaires importantes. Il est intéressant de constater que Msg5 est également connu pour déphosphoryler Fus3, une importante protéine de la voie des phéromones.³⁰⁹ Ptp2/3 quant à eux, module l'activité de Hog1, une protéine impliquée dans une cascade s'activant suite à un stress osmotique.³¹⁰ D'ailleurs, les deux voies de signalisation sont étroitement reliées lors d'un stress membranaire causé par la zymolyase.³¹¹ De plus, la phosphorylation de Slt2 est inhibée par les kinases de la cascade du point de contrôle, de manière à arrêter la transcription de gènes lors de dommage à l'ADN afin de laisser le temps aux mécanismes de réparation d'agir.³¹² Cette kinase est également impliquée dans la polarisation cellulaire et dans la formation du bourgeon en partenariat avec Cdc28.²⁹⁸

1.8.3 La régulation osmotique

Tel que mentionné dans la section précédente, la voie de l'intégrité à la paroi cellulaire est liée à celle de la régulation osmotique. Une étude montre que les deux voies coopèrent pour l'adaptation cellulaire nécessaire suite à un stress généré par la zymolyase, une enzyme qui digère les parois cellulaires fongiques.^{313,314} Par conséquent et suite à l'effet du VPA sur la phosphorylation de Slt2, nous nous sommes intéressés à la voie de la régulation osmotique. Cette cascade s'active en réponse à une augmentation de l'osmolarité extracellulaire.³¹⁵

Hog1 est la kinase au cœur de la voie de la régulation osmotique. Il existe deux mécanismes capables d'activer cette protéine (Figure 13) et tous deux passent par l'activation préalable de la protéine d'échafaudage Pbs2. Suite à la détection du changement d'osmolarité, l'activité de Sln1 se trouve être inhibée, ce qui entraîne la liaison de Ssk1 avec Ssk2/22, les activant par le fait même.³¹⁶ Ssk2/22 vont à leur tour lier et activer Pbs2.³¹⁷ Sho1 peut également percevoir les stress osmotiques. Elle va alors permettre l'ancrage d'un complexe formé des protéines Pbs2, Ste11 et Hog1 au niveau de la membrane cellulaire via son interaction avec Pbs2.³¹⁸ Sho1 permet également de recruter Cdc42, Cdc44 et Ste20, trois protéines nécessaires pour l'activation de Ste11.³¹⁹ Cette dernière active alors Pbs2. Il a été démontré que Mbs2 et Hrk1 pouvaient également activer Hog1 à travers Sho1.³²⁰ Une fois activé, Mbs2 interagit avec Bem1 pour recruter Ste20 au niveau du complexe.³²¹ Opy2 est également importante pour cette voie d'activation puisqu'elle permet de recruter la protéine adaptatrice Ste50, essentielle pour l'activité du complexe.^{322,323} Peu importe la protéine de détection utilisée (Sln1 ou Sho1), l'activation de Pbs2 engendre la phosphorylation de Hog1.³¹⁵ Cette dernière est ensuite exportée dans le noyau pour se lier à différents promoteurs. Hog1 recrute des complexes pour modifier l'organisation des nucléosomes afin d'induire l'expression de plusieurs gènes, dont plusieurs impliqués dans la formation et le transport de glycérol, une molécule importante dans l'adaptation aux stress osmotiques.³²⁴⁻³²⁶ Hog1 a également la capacité de phosphoryler Mrc1, une composante du complexe de réplication, ce qui retarde la progression de la réplication en phase S.³²⁷

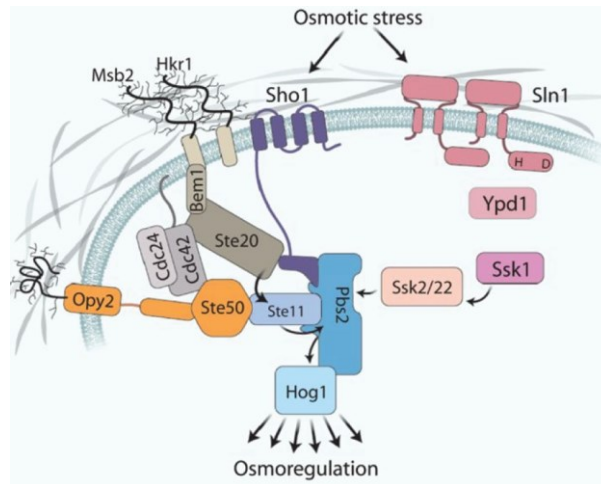


Figure 13 : la voie de la régulation osmotique

Schéma de la voie de régulation activée suite à un stress osmotique chez S. cerevisiae. Figure modifiée de Brewster J.L. and Gustin M.C., Hog1: 20 years of discovery and impact Sci Signal (2014).

1.9 Les KDACi, des régulateurs synthétiques de la prolifération cellulaire

Comme mentionné précédemment, l'acétylation des protéines est un processus primordial dans la régulation de la prolifération. Comprendre les mécanismes affectés par cette modification est donc essentiel pour comprendre les bases de fonctionnement de la cellule. L'utilisation des inhibiteurs de KDAC est l'une des manières de déterminer l'impact de l'acétylation sur une multitude de mécanismes.

L'utilisation de ces molécules dans certains organismes a montré un impact possible de l'inhibition des désacétylases sur la prolifération cellulaire. Le TSA est connu pour bloquer la prolifération cellulaire et induire l'apoptose dans des cellules tumorales du foie.³²⁸ Il en va de même pour le SAHA et le sodium butyrate dont des études ont montré un effet antiprolifératif au niveau de la transition G1/S.³²⁹ Le VPA, molécule employée dans notre étude, a montré le même effet sur la prolifération dans différents organismes modèles. Chez l'humain, ce composé a la capacité de modifier l'expression de p21, une protéine inhibitrice

des Cdk.³³⁰ D'autres études démontrent que le VPA cause un arrêt de la prolifération, plus précisément en ayant un effet durant les phases G1 et G2/M du cycle cellulaire.^{331,332} Toutefois, les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces effets ne sont pas bien compris. Il est intéressant de noter qu'aucune étude n'a été effectuée sur l'effet du VPA durant la phase S. Une explication potentielle de l'effet du VPA proviendrait du fait qu'il aurait la capacité d'entraîner la dégradation de diverses protéines par autophagie.¹⁸⁰ D'un autre côté, plusieurs cribles effectués chez *S. pombe* ont identifié des gènes qui, lorsque mutés, confèrent une sensibilité au VPA. Parmi ceux-ci, on retrouve des protéines impliquées dans la transduction des signaux tels les MAPK.^{140,174,178} Il n'y a toutefois aucun consensus quant aux mécanismes pouvant expliquer les effets cellulaires observés en présence de VPA.

Ainsi, durant ma maîtrise, je me suis intéressée à élucider les mécanismes sous-jacents à l'effet antiprolifératif de l'acide valproïque. Pour ce faire, nous avons utilisé la levure comme organisme modèle, plus précisément *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons donc investigué l'effet de ce composé sur la progression dans les différentes phases du cycle cellulaire ainsi que sur les mécanismes de réparation. Afin d'expliquer l'effet antiprolifératif, nous nous sommes également intéressés à l'effet du VPA sur différentes voies de signalisation cellulaire. Guidés par la littérature, nous avons porté une attention particulière aux cascades décrites précédemment. Nous avons découvert que le VPA inhibe la progression dans toutes les phases du cycle cellulaire de manière rapide, réversible et dépendante du pH extracellulaire. Nos recherches démontrent que le VPA interfère négativement sur le mécanisme permettant la transition entre les phases G1 et S. Finalement, l'acide valproïque arrête la cellule durant la phase de réplication, et ce, sans sembler causer de dommages à l'ADN.

Contribution de l'étudiant

J'ai contribué à 70 % à la réalisation de l'article ci-joint. J'ai réalisé toutes les expériences sous-jacentes aux figures de l'article, mis à part pour les Figures 3 e-g), 4 b) 5 a-c) et 6 c). J'ai contribué à l'élaboration des expériences ainsi qu'à la rédaction et la mise en page de l'article.

Valproate inhibits MAP kinase signalling and cell cycle progression in *S. cerevisiae*

Kristelle Desfossés-Baron^{1,2}, Ian Hammond-Martel¹, Adnane Sellam^{3,4} Stephen Roberts⁵ and
Hugo Wurtele^{1,6}

Running title: Valproate inhibits cell cycle progression

¹ Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, 5415 L'Assomption Boulevard,
Montreal, H1T 2M4, Canada

² Molecular biology program, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succursale Centre-
ville, Montreal, H3C 3J7, Canada

³ Infectious Diseases Research Centre-CRI, CHU de Québec Research Center (CHUQ),
Université Laval, Québec, G1V 4G2, Canada

⁴ Department of Microbiology-Infectious Disease and Immunology, Faculty of Medicine,
Université Laval, Québec, G1V 0A6, Canada

⁵ Division of Biomedical and Life Sciences, Faculty of Health and Medicine, Lancaster
University, Lancaster, LA1 4YQ, UK

⁶ Department of Medicine, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succursale Centre-ville,
Montreal, H3C 3J7, Canada

2.1 ABSTRACT

Valproate (VPA) is a widely prescribed short chain fatty acid with anticonvulsant and anticancer properties. Although its clinical mode of action remains poorly understood at the molecular level, VPA has been shown to block cell cycle progression and proliferation in human cells, and to influence cellular signalling by directly inhibiting class I and II histone deacetylases (HDAC). Here, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as a model to explore the basis of the antiproliferative properties of VPA. Our results indicate that, at low environmental pH, VPA strongly inhibits growth of budding yeasts, and induces a complex transcriptional response. The mating pheromone, cell wall integrity, and unfolded protein response pathways were influenced by VPA exposure. Moreover VPA caused extracellular calcium influx via the Mid1/Cch1 channels in budding yeast, although our results demonstrate that cell survival in response to this drug does not depend on calcium-dependent signalling. Finally, we found that VPA rapidly blocks cell cycle progression and DNA replication in budding yeast, and that these effects are not due to DNA damage-induced checkpoint activation or to the induction of DNA lesions. Overall, our data identify heretofore unknown biological responses to VPA which together may contribute to its cell growth-inhibiting properties.

2.2 INTRODUCTION

Sodium valproate (or valproic acid; VPA) is a short chain fatty acid with strong anticonvulsant properties and low toxicity that is widely prescribed to treat generalized and partial seizures, schizoaffective disorders and migraines¹. However, the molecular basis of its therapeutic efficacy in these disorders remains unclear^{2,3}. In cultured cells, at clinically-relevant doses, VPA influences a broad spectrum of cellular processes in part via its ability to directly inhibit class I and II histone deacetylases (HDAC)^{4,5}. HDACs reverse lysine acetylation on histones, and can also deacetylate other proteins⁶. Four HDAC classes have been described, with class I, II and IV presenting homology to yeast Hda1 and Rpd3, and class III NAD-dependent HDACs displaying homology to yeast Sir2^{7,8}. Acetylation neutralizes the charge of lysine residues, and depending on the location of acetylated lysines in histone proteins, can negatively influence DNA-histone interactions⁶. Because of this, histone acetylation is generally associated with chromatin decondensation and gene expression, whereas deacetylated histones promote a repressive chromatin state. Importantly, the ability of HDACs to deacetylate lysines in non-histone proteins (reviewed in⁹) adds considerable complexity to the cellular effects of HDAC inhibition.

Cancer cells are well-known to present epigenetic aberrations such as abnormal patterns of DNA methylation and histone acetylation, which drive misregulation of gene expression during multistage carcinogenesis¹⁰. Because of its influence on chromatin structure, VPA has garnered significant interest as a potential anticancer drug^{11,12}. VPA was

shown to inhibit growth and cell cycle progression, and to induce apoptosis and senescence, in cancer cells *in vitro*¹³. This drug also curtails cancer cell proliferation in xenografts, suggesting that it may possess anticancer activity *in vivo* as well¹⁴. Even though clinical trials revealed that VPA alone displays only modest anticancer activity, it appeared more promising when used in conjunction with genotoxic chemotherapy drugs, i.e. doxorubicin¹⁵, karenitecin (topoisomerase I inhibitor)¹⁶, and cisplatin¹⁷. Nevertheless, the mechanisms explaining the anticancer and cell growth-curtailling properties of VPA remain to be fully elucidated at the molecular level.

Yeast is a model organism of choice to investigate the molecular mechanism of action of pharmacological agents. As is the case in human cancer cell lines, long term VPA exposure causes apoptosis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*^{18,19}. Recent data also suggest that VPA-mediated HDAC inhibition leads to hyperacetylation of DNA repair proteins in budding yeast, resulting in their eventual degradation via autophagy and consequent DNA repair defects²⁰. These observations provide potential explanations for the observed synergies between VPA and genotoxic drugs in cancer treatment²⁰. In addition, genomic screens in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* identified several genes involved in membrane trafficking (retromer complex) and signal transduction (Ras, MAP kinases) whose mutation cause hypersensitivity to VPA²¹⁻²³. Exposure to this drug was also shown to cause cell wall perturbations in *S. pombe*, leading to synergistic growth defects when combined with cell wall stress-causing treatments, e.g. zymolyase and micafungin exposure²³. Consistent with the known fact that cell wall and membrane/endoplasmic reticulum perturbations elevate

cytoplasmic calcium^{24,25}, VPA induces extracellular Ca²⁺ influx via the Cch1-Yam8 channel complex in *S. pombe*²². Overall the available data suggest that VPA may influence fungal cell proliferation by modulating the activity of several important cellular pathways, as is the case in human cells.

In the present work, we used *S. cerevisiae* as a model to investigate the molecular basis of the effect of VPA on cell cycle progression and growth. Our results indicate that at low pH VPA is cytotoxic and induces a complex transcriptional response. We also demonstrate that VPA modulates the activity of several cellular pathways, and blocks cell cycle progression without activating DNA damage-induced checkpoints. Overall, our data highlight previously unreported VPA-induced cellular responses which together may contribute to its antiproliferative properties.

2.3 METHODS

Yeast strains, growth conditions, chemicals: Yeast strains were generated and propagated using standard yeast genetics methods. SC: synthetic complete medium, YPD: yeast extract peptone dextrose medium. Haploid mutant strains were from Yeast MATa haploid deletion collection (GE Healthcare YSC1053, BY4741 genetic background). The WT W303 MATa strain was obtained from GE Healthcare (YSC1058). TAP-tagged strains were from the Yeast TAP-tag collection (GE Healthcare YSC1177, S288C genetic background). Yeast expressing Rad53-V5-6xHis was obtained from the Cross and Capture collection (GE Healthcare YSC5049, BY4741 genetic background). Other strains were described in detail elsewhere: W5094-1C²⁶ (W303 MATa *ADE2 RAD5 trp1-1 LYS2 RAD52-YFP*), W3775-12C^{27,28} (W303 MATa *RAD5 RFA1-8ALA-YFP*), HWY1634²⁸ (BY4741 MATa *mec1Δ::HPHMX sml1Δ::kanMX*), U953-61A²⁶ (W303 MATa *trp1-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3*), YJT75²⁶ (W303 MATa *trp1-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 sml1Δ::URA3 rad53Δ::LEU2*). Chemicals: Valproic acid sodium salt (VPA; Sigma-Aldrich; P4543), sodium butyrate (Sigma-Aldrich; 303410), methyl methanesulfonate (MMS; Sigma-Aldrich; 129925) and 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (Sigma- Aldrich; BAPTA; A4926), ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA; Bioshop Canada, EGT101), caffeine (Bioshop Canada, CAF114), Hydroxyurea (HU; Biobasic, HB0528), trichostatin A (Cedarlane, S1045), micafungin (MCKesson Canada, 205666), nocodazole (Wisent, 420-100-QM).

Cell synchronization, transient treatment with genotoxic agents and cell viability assays:

Cells were grown overnight in SC or YPD medium at 25°C and arrested in G1 at 30°C using 3 µg/ml α - factor for 90 minutes, followed by the addition of a second dose of α -factor for 75 minutes. Cells were then released into the cell cycle by washing them once with medium and incubating them in fresh medium containing 50 µg/ml pronase and, unless otherwise stated, 0.03 % MMS or 200 mM HU. After transient MMS treatment, cells were washed with 2.5 % sodium thiosulfate (a chemical that inactivates MMS) and released into fresh medium. After

transient HU treatment, cells were washed with medium and released in fresh SC. Aliquots of cells were collected as a function of time and flash frozen on dry ice before being processed for immunoblotting or neutral two-dimensional gel electrophoresis. Where applicable, appropriate dilutions of cells were plated on YPD-agar to measure viability by colony formation assays.

Measurement of DNA content by flow cytometry: Cells were fixed with 70 % ethanol prior to FACS flow cytometry analysis. DNA content was determined using Sytox Green (Life Technologies) as previously described.²⁹ Flow cytometry was performed on FACS Calibur instrument using the Cell Quest software. Histograms were generated using FlowJo 7.6.5.

Immunoblots: Whole-cell lysates were prepared for SDS–polyacrylamide gel electrophoresis using an alkaline cell lysis³⁰ or standard glass beads/trichloroacetic acid precipitation methods. SDS-PAGE and protein transfers were performed using standard molecular biology protocols. Antibodies: polyclonal antibodies (AV94 and AV100) respectively raised against yeast histone H4 and a C-terminal peptide of H3 as previously described^{31,32}, Monoclonal anti-H3K9ac (Cell Signaling, C5B11, Cat. No 9649), Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling, D3F9, Cat. No 4511) and p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) phospho (Cell Signaling, 9101S), Histone H4K5ac (Active Motif, 39583, 39584), H4K12ac (Active motif, 39165, 39166), Anti-acetyl-histone H4K16Ac (Millipore, Cat. No 07-329), anti-acetyllysine (Immunechem, ICP0380), Anti-TAP (CBP) (Fisher, cab1001). Anti-tubulin [YOL1/34] (Abcam, ab6161), Anti-V5 (Medimab, ab27671).

Neutral two-dimensional gel electrophoresis. DNA replication intermediates were studied as previously described³³. DNA was digested using the *EcoRV* and *HindIII* restriction enzymes. Southern blotting was performed using a probe specific to the *ARS305* replication origin²⁶.

Drug susceptibility assays: For spot assays, 5-fold serial dilutions of saturated cultures were spotted on YPD-agar and incubated at 30°C for 3 to 5 days. For growth assays in 96 well plate format, saturated cultures were diluted at 0.001 OD/ml and mixed with medium containing various concentrations of drugs in a 1:1 proportion. For colony formation assays, appropriate cell dilutions were plated on YPD-agar. Colony formation was monitored after 3 to 5 days of incubation at 30°C. For growth curve assays, saturated cultures were diluted at 0.01 OD/ml in medium +/- 10 mM VPA. Optical density was monitored every 30 minutes for 48 hours.

Fluorescence microscopy: Cell samples were fixed using formaldehyde as previously described ²⁶ and examined using a GE DeltaVision Olympus IX71 fluorescence microscope equipped with an UIS2 60X/1.42 Plan Apo objective (Olympus), a 15-bit EDGE/sCMOS (PCO) camera, and softWoRx v.6.2.0 software. Images were analysed using Image J 1.46E. At least 300 cells were examined per sample.

Luminometry analysis of calcium intake: The *cch1Δ* mutant was derived from the parental *Saccharomyces cerevisiae* strain JK9-3da (MATa *leu2-3, 112Δ, his4Δ trp1Δ ura3-52Δ*) by replacing the *CCH1* gene by a KanMX cassette ³⁴. Yeast strains were transformed with pEVP11/AEQ (a plasmid bearing Apoaequorin gene and a *LEU2* marker, generously provided by Dr Patrick Masson, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, US) ³⁵. Unless otherwise stated, yeast strains were cultured at 30°C in SC minus leucine (SC-Leu). 2 mM EGTA and 8 mM valproic acid was added to SC-Leu using stock solutions of EGTA (50 mM Na₂EGTA, 10 mM HEPES, 2 % glucose, pH 7.0 with NaOH) and valproic acid (200 mM sodium valproate) respectively. Cells expressing apoaequorin were grown overnight in SC-Leu in a shaking (150 rpm) incubator to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 8 (approximately 1 x 10⁸ cells/ml). OD₆₀₀ was determined after 8x dilution of culture in water. To obtain cells in mid-log growth phase, 0.5 ml of overnight cultures were subcultured into 10

ml of fresh SC-Leu to give an OD₆₀₀ of 0.8 and incubated shaking at 150 rpm for up to 3 hours until an OD₆₀₀ between 1.6 and 2.4 was reached. Cells were pelleted and resuspended in fresh SC-Leu to an OD₆₀₀ of 2.4. 4 µl of 0.5 mM coelentraine (Prolume, USA) in absolute methanol was added to 1 ml of cells and incubated in the dark for 2 hours at 30°C shaking at 150 rpm. Coelentraine loaded cells were pelleted in a microcentrifuge and resuspended in fresh SC-Leu to an OD₆₀₀ of 8. Luminescence from 20 µl samples of mid-log growth phase cells was recorded as previously reported³⁶. VPA was added to samples after 40 seconds in 200 µl of SC-Leu, SC-Leu supplemented with 2 mM EGTA or BAPTA buffer (10 mM BAPTA, 50 mM MES, 2% glucose, pH 5.5). Luminescence (expressed in arbitrary units (AU) per 1 second) was measured for at least 400 seconds after which cells were lysed with 1.6 M CaCl₂ in 20% (v/v) ethanol to determine total (summed) luminescence. Total luminescence was in significant excess over luminescence induced by VPA indicating that the availability of aequorin-coelentraine complex was not limiting during measurements of Ca²⁺.

RNA sequencing and RT-PCR: Total RNA was extracted from 50 OD of cells using a hot phenol protocol³⁷. RNA quality was assessed by calculating OD_{260/280} and OD_{260/230} ratios. For *HAC1* RT-PCR, cDNA were prepared using M-MLV reverse transcriptase (ThermoFisher cat. #28025-013) and RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (ThermoFisher cat. #10777-019) following manufacturer's protocols. PCR was performed using Hot Start *Taq* DNA Polymerase (M0495S; NEB); PCR primers were as described³⁸. For RNA sequencing, quantification of total RNA was made using the QuBIT kit (Life Technologies) and 4 µg of total RNA was used for sequencing. Quality of total RNA was assessed with a BioAnalyzer Nano (Agilent) and all samples had a RIN above 8. The KAPA mRNAseq stranded kit (KAPA, Cat no. KK8420) was used to make libraries. Ligation was done with 100 nM final concentration of Illumina index; 6 PCR cycles were required to amplify cDNA libraries. cDNA libraries were quantified using QuBit and BioAnalyzer. All libraries were diluted to 10 nM and normalized by qPCR using the KAPA library quantification kit (KAPA; Cat no. KK4973). Libraries were pooled to equimolar concentration. Sequencing was performed using a Illumina Miseq using the Miseq Reagent Kit v2 (50 cycle single-read) and

7 pM of the pooled library. Cluster density was targeted at around 800k clusters/mm². Approx. 3-6 million reads were generated by samples. Library preparation and sequencing was performed at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform (Université de Montreal).

RNA sequencing analysis: Sequences were trimmed for sequencing adapters and aligned to the *Saccharomyces cerevisiae* reference genome using Tophat version 2.0.10. The UCSC sacCer3 genome was used along with July 2015 gene annotations. Gene expression was quantified using Cufflinks- 2.1.1 and htseq-count (with intersection-strict argument). Differential expression was assessed using DESeq2 version 1.6.2 in which readcounts were normalized and grouped by condition. See Supplementary table S1 for RNA profiling data ³⁹. Venn diagrams were made using the <http://www.bioinformatics.lu/venn.php> web server. The top 300 up- or down-regulated genes were compared using Venn diagrams across datasets. P-values were calculated using a hypergeometric test and R i386 version 3.2.2. The total number of genes used for p-value determination was the smallest number of the two data sets.

2.4 RESULTS

2.4.1 VPA inhibits cell proliferation in a pH-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. We assessed the effect of sodium valproate (VPA) on cell proliferation in two standard yeast growth media by measuring the OD₆₃₀ of cultures exposed for 48 hours to increasing concentrations of VPA (see Methods). VPA displayed much stronger growth-inhibiting effect in synthetic (SC) medium as compared to YPD (Figure 1A-B). The pH of the SC medium used in these experiments was measured and found to be approximately 4.1. We determined that yeast cells grew at a similar rate in the presence of increasing concentrations of VPA in either SC, or in YPD where pH had been adjusted of 4 using hydrochloric acid (Figure 1C). To investigate whether VPA is fungicidal or fungistatic to *S. cerevisiae*, we exposed cells to 10 mM VPA in either liquid SC or YPD medium for increasing periods of time, followed by plating on YPD-agar (Figure 1D). Yeast cells incubated in SC medium (pH 4.1) containing VPA for 2 hours exhibited severe loss of cell viability, whereas no such fungicidal effect was observed even after 24 hours of incubation in YPD (pH 6.8) containing 10 mM VPA. These data confirm that low environmental pH, and not nutrient availability, permits rapid (within 2 hours) VPA-induced growth inhibition in budding yeast.

2.4.2 VPA induces a complex transcriptional response in *S. cerevisiae*. We sought to further investigate the molecular basis of the antiproliferative properties of VPA. We hypothesized that low pH could potentiate the HDAC inhibiting activity of VPA^{4,5} and lead to more pronounced biological effects. Published chromatin immunoprecipitation data indicate that yeast cells lacking archetypal class I and II HDACs, e.g. Hda1 and Rpd3, present hyperacetylation at several lysine residues in histones (H3K9, H4K5, H4K12)^{40,41}. However, using immunoblotting we found that global acetylation at these sites was not noticeably modulated by exposure to VPA for 60 minutes in either SC or YPD medium (Figure 2A). Immunoblots using a pan-anti acetyllysine and anti-H4K16ac

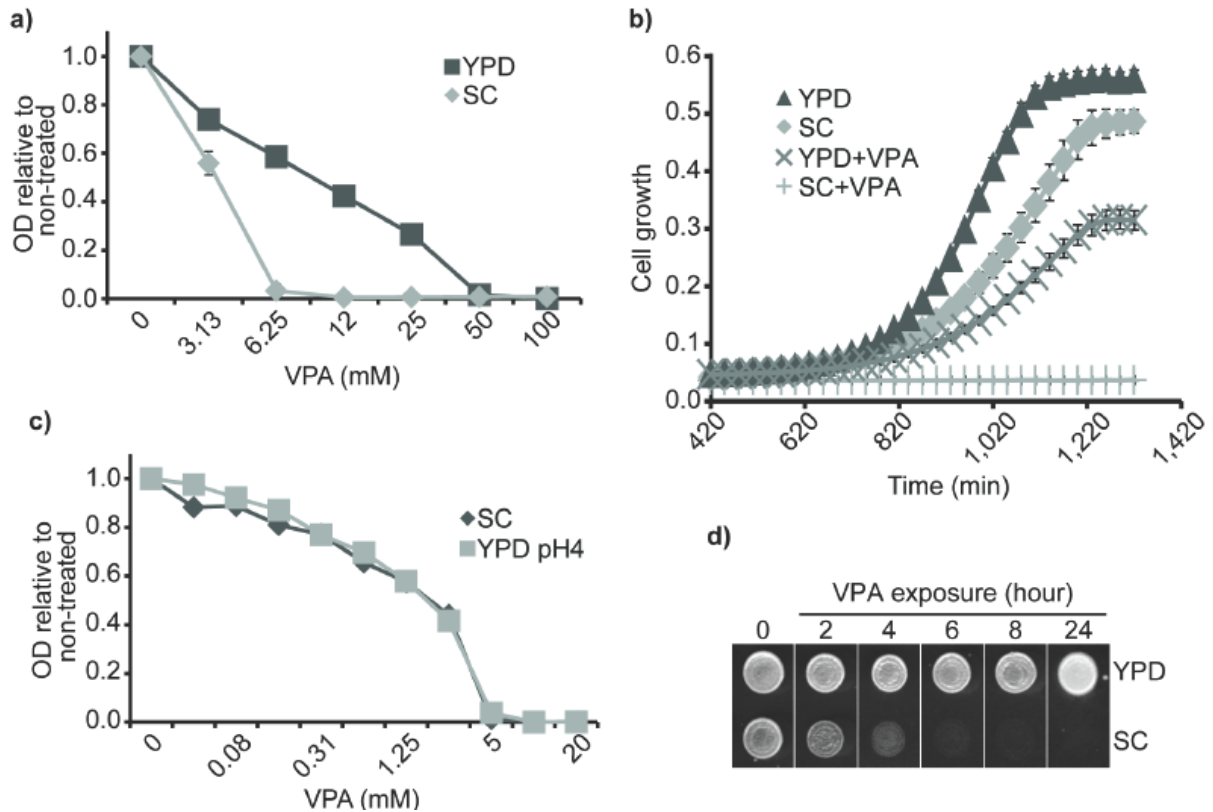


Figure 1: VPA inhibits cell proliferation in a pH-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. A) VPA inhibits cell proliferation at lower concentrations in SC compared to YPD medium. Cells were incubated in SC or YPD containing the indicated concentrations of sodium valproate (VPA) at 30°C. Cell growth was monitored by OD_{630} measurements after 48 h. B) 10 mM VPA prevents cell proliferation in SC medium. Saturated cultures were diluted at 0.005 OD/mL in YPD or SC containing 10 mM of VPA for 24 h. OD_{630} measurements were taken every 30 minutes. C) VPA-induced growth inhibition depends on the pH of the medium. pH of YPD was adjusted to 4 with hydrochloric acid. Cell growth was assessed as in A. D) VPA is fungicidal in SC medium. Yeast cultures were incubated in SC or YPD containing 10 mM VPA at 30°C. Cells were spotted on YPD-agar after the indicated time, and plates were incubated at 30°C.

antibody also did not reveal obvious differences between YPD and SC upon VPA treatment. These data suggest that the striking difference in the effect of VPA on cell proliferation in SC vs YPD media are unlikely to be due to strong increase in global protein lysine acetylation, although it remains possible that VPA may influence histone acetylation at specific genomic loci or on in a limited number of non-histone proteins in SC medium. We also cannot exclude the possibility that longer term exposure to VPA in SC medium may eventually lead to increased levels of protein lysine acetylation.

We performed RNA-seq using cells incubated in SC medium containing VPA for 60 minutes to document cellular pathways that are solicited under these growth conditions (Supplementary Table S1). Using a cut-off of two-fold difference in expression, we found that VPA exposure induced the expression of 297 genes and caused repression of 300 genes (Figure 2B). Gene Ontology (GO)-term analysis revealed that genes involved in metabolic processes and protein folding were strongly upregulated by VPA, whereas genes involved in cell cycle progression, DNA replication, and sexual reproduction were downregulated (Table 1). To assess whether this transcriptional response is associated with HDAC inhibition, we compared our dataset with published RNA profiling data generated in response to Trichostatin A (TSA), a well-known class I and II HDAC inhibitor, and also with those documenting differences in gene expression between wild type (WT) cells and *sin3Δ* (a component of Rpd3-containing HDAC complexes) or *hda1Δ* mutants⁴². A limited but significant number of genes that are upregulated in VPA-treated cells were also upregulated in response to TSA, or as a result of *sin3Δ* or *hda1Δ* mutations (Figure 2C). Interestingly, GO term analysis of these genes revealed a significant enrichment in protein folding functions (data not shown), suggesting that this particular VPA-induced transcriptional signature may result at least in part from HDAC inhibition. Our analysis also clearly indicates that several genes are differentially regulated in response to VPA as compared to either HDAC mutations or TSA exposure, suggesting that VPA may also influence gene expression in a HDAC-independent manner in yeast.

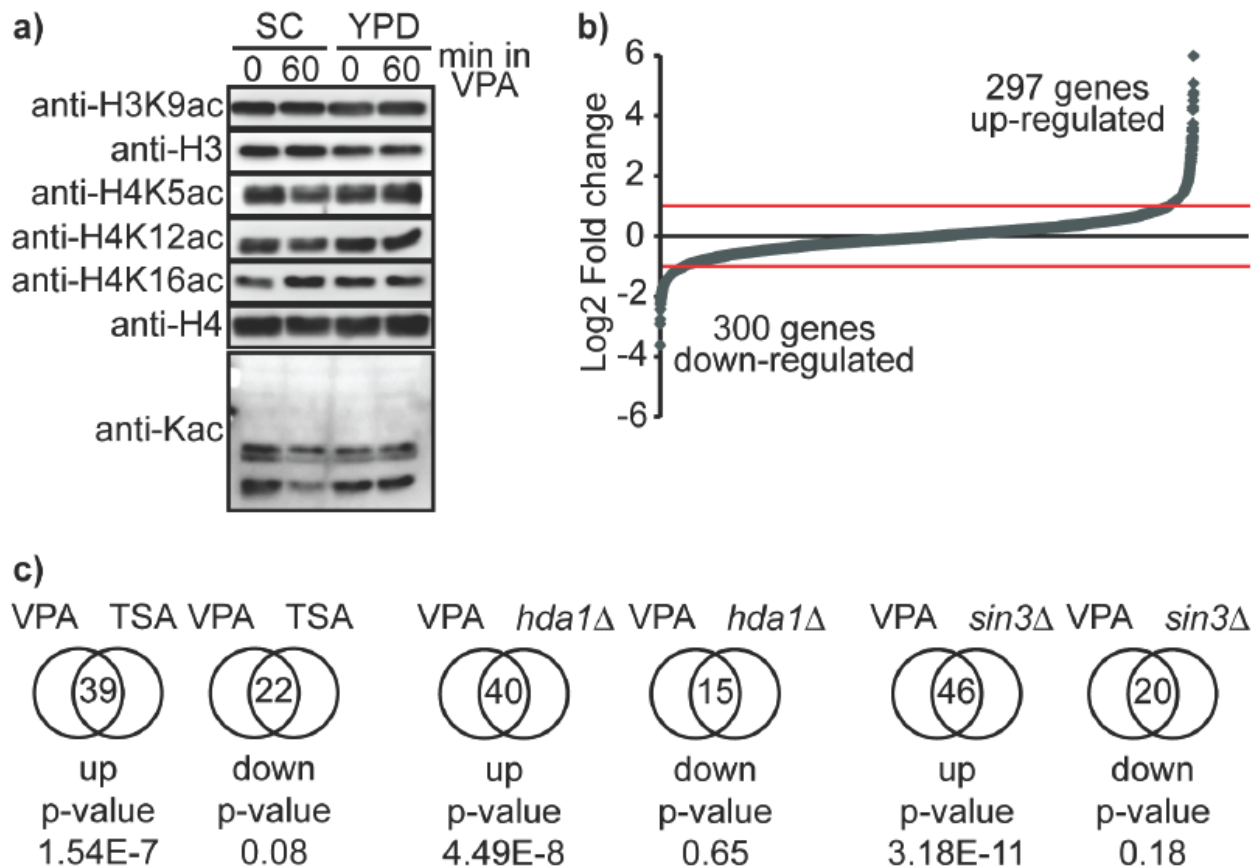


Figure 2: VPA elicits a complex transcriptional response in *S. cerevisiae*. A) VPA does not cause global changes in protein acetylation. Exponentially growing cells were incubated in SC or YPD containing 10 mM VPA for 60 minutes at 30°C. Samples were then processed for immunoblotting using the indicated antibodies. B) Summary of RNA profiling results from cells exposed to 10 mM VPA for 60 minutes in SC. See Methods for details. Red lines indicate fold-changes of +/- 2. The number of up- and down-regulated genes (+/- 2-fold) is indicated. C) A significant number of genes that are upregulated in response to VPA are also upregulated in response to trichostatin A (TSA) or deletion of HDAC-encoding genes (*sin3*Δ or *hda1*Δ). The top 300 up- and downregulated genes in response to VPA were compared to published datasets using Venn diagrams; p-values were calculated using hypergeometric tests (see Methods for details).

Table 1: Go-term analysis (cellular processes) of up- and down-regulated genes in presence of VPA

Up-regulated genes				
term_ID	description	Cluster frequency	Background frequency	P-value
GO:0044281	small molecule metabolic process	69 out of 297 genes, 23.2%	684 out of 7164 background genes, 9.5%	6.42E-10
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	46 out of 297 genes, 15.5%	349 out of 7164 background genes, 4.9%	8.95E-10
GO:0006082	organic acid metabolic process	46 out of 297 genes, 15.5%	363 out of 7164 background genes, 5.1%	3.71E-09
GO:0006457	protein folding	21 out of 297 genes, 7.1%	94 out of 7164 background genes, 1.3%	1.13E-07
GO:0042026	protein refolding	10 out of 297 genes, 3.4%	17 out of 7164 background genes, 0.2%	1.55E-07
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	36 out of 297 genes, 12.1%	273 out of 7164 background genes, 3.8%	3.27E-07
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	26 out of 297 genes, 8.8%	153 out of 7164 background genes, 2.1%	4.40E-07
GO:1901605	alpha-amino acid metabolic process	24 out of 297 genes, 8.1%	140 out of 7164 background genes, 2.0%	1.74E-06
GO:0006090	pyruvate metabolic process	12 out of 297 genes, 4.0%	38 out of 7164 background genes, 0.5%	1.69E-05
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	88 out of 297 genes, 29.6%	1251 out of 7164 background genes, 17.5%	7.56E-05
GO:0002181	cytoplasmic translation	24 out of 297 genes, 8.1%	171 out of 7164 background genes, 2.4%	9.82E-05
GO:0055086	nucleobase-containing small molecule metabolic process	27 out of 297 genes, 9.1%	210 out of 7164 background genes, 2.9%	9.98E-05
GO:0046031	ADP metabolic process	10 out of 297 genes, 3.4%	30 out of 7164 background genes, 0.4%	1.50E-04
GO:0009132	nucleoside diphosphate metabolic process	10 out of 297 genes, 3.4%	32 out of 7164 background genes, 0.4%	3.00E-04
GO:0046496	nicotinamide nucleotide metabolic process	14 out of 297 genes, 4.7%	70 out of 7164 background genes, 1.0%	6.20E-04
GO:0000096	sulfur amino acid metabolic process	10 out of 297 genes, 3.4%	36 out of 7164 background genes, 0.5%	1.00E-03
GO:0009628	response to abiotic stimulus	22 out of 297 genes, 7.4%	167 out of 7164 background genes, 2.3%	1.02E-03
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	23 out of 297 genes, 7.7%	183 out of 7164 background genes, 2.6%	1.33E-03
GO:0072521	purine-containing compound metabolic process	18 out of 297 genes, 6.1%	123 out of 7164 background genes, 1.7%	2.11E-03
GO:0072524	pyridine-containing compound metabolic process	14 out of 297 genes, 4.7%	84 out of 7164 background genes, 1.2%	6.01E-03

down-regulated genes				
Term_ID	description	Cluster frequency	Background frequency	P-value
GO:0000003	reproduction	196 out of 300 genes, 65.3%	3601 out of 7164 background genes, 50.3%	4.99E-05
GO:0000755	cytogamy	175 out of 300 genes, 58.3%	3195 out of 7164 background genes, 44.6%	6.90E-04
GO:0008645	hexose transport	42 out of 300 genes, 14.0%	464 out of 7164 background genes, 6.5%	1.22E-03
GO:0044699	single-organism process	8 out of 300 genes, 2.7%	24 out of 7164 background genes, 0.3%	3.28E-03
GO:0044763	single-organism cellular process	6 out of 300 genes, 2.0%	13 out of 7164 background genes, 0.2%	6.38E-03

Our RNA profiling data indicate that genes involved in protein folding are upregulated in response to VPA. We therefore investigated whether this drug activates the canonical unfolded protein response (UPR) pathway in yeast, and also sought to verify the possible contribution of such UPR- inducing properties to VPA-induced growth-inhibition. The UPR can be triggered by various stimuli to reduce the load of proteins entering the endoplasmic reticulum (ER), and promotes degradation or secretion of unfolded proteins⁴³. Several growth conditions, e.g. dithiothreitol (DTT) exposure or heat shock, induce the expression of genes involved in the UPR^{44,45}. Upon activation of the canonical UPR, the transmembrane protein kinase/nuclease Ire1 promotes splicing of *HAC1* mRNA, leading to the expression of a shorter and more stable form of the Hac1 transcription factor and consequent up- regulation of genes forming the UPR transcriptional program⁴³. Consequently, *ire1Δ* and *hac1Δ* mutants are sensitive to various UPR-inducing conditions⁴⁶, although Ire1- and Hac1-independent pathways have also been reported to modulate gene expression upon ER stress⁴⁷. Consistent with the notion that VPA exposure may cause protein folding defects in yeast, we found significant overlap between genes that are upregulated in response to DTT⁴⁵ or heat shock⁴⁸ vs VPA (Figure 3A). VPA also caused the expression of the shorter isoform of Hac1, and splicing of the *HAC1* mRNA, albeit to a reduced extent as compared to DTT (Figure 3B-C). However, we found that deletion of either *HAC1* or *IRE1* did not cause hypersensitivity to VPA (Figure 3D), indicating that the canonical UPR pathway is not necessary for cell survival

in the presence of this drug in *S. cerevisiae*. This further implies that eventual VPA-induced protein folding/endoplasmic reticulum defects are unlikely to represent major determinants of VPA toxicity in yeast.

2.4.3 VPA causes influx of extracellular calcium in *S. cerevisiae*. In addition to Hac1/Ire1-dependent pathways, long-term cell survival under conditions that compromise normal protein folding depends in part on triggering of a Ca^{2+} influx system, causing elevation of cytosolic Ca^{2+} concentrations and activation of Calcineurin, a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase⁴⁹. Interestingly, recently published data indicates that exposure to VPA causes influx of extracellular calcium in *S. pombe*²². To verify whether this phenomenon also exists in *S. cerevisiae*, we transformed cells with the pEVP11/AEQ plasmid, resulting in cytosolic expression of the Ca^{2+} -sensitive bioluminescent protein aequorin. We found that in SC medium, VPA exposure strongly increased cytoplasmic Ca^{2+} (Ca^{2+} cyt) (Figure 3E). This increase is dependent on Ca^{2+} influx across the plasma membrane since addition of VPA in SC medium containing 2 mM EGTA (which chelates calcium ions) significantly reduced Ca^{2+} cyt elevation compared to that induced by VPA in normal SC, and the presence of 10 mM BAPTA (permitting more effective chelation of extracellular Ca^{2+} at reduced pH) completely abolished VPA-induced Ca^{2+} cyt elevation (Figure 3F). In *S. pombe*, VPA-induced Ca^{2+} influx from the extracellular medium depends on the Cch1-Yam8 voltage-gated high-affinity calcium channel²², whose *S. cerevisiae* homologs are encoded by the *CCH1* and *MIDI* genes³⁴. Notably, VPA-induced Ca^{2+} cyt elevation was abrogated in *cch1* Δ budding yeasts (Figure 3G). However, *cch1* Δ and *mid1* Δ mutants were not hypersensitive to VPA in SC medium (Figure 3H), as was the case for cells lacking either calcium-regulated calcineurin (e.g. *cnal* Δ , *cnb1* Δ , *cmp2* Δ), or calmodulin subunits (e.g. *cmk1* Δ , *cmk2* Δ ; Figure 3I-J). Taken together, our data indicate that cell proliferation in the presence of VPA in SC does not depend on Ca^{2+} cyt elevation and consequent activation of Calcineurin- or Calmodulin- dependent signalling in *S. cerevisiae*.

2.4.4 VPA inhibits activation of the Slt2 cell wall integrity MAP kinase in yeast. In *S. pombe*, VPA was shown to compromise cell wall integrity and to sensitize cells to drugs that cause cell wall damage such as micafungin²³, although the mechanism remains unclear. In addition, elevated intracellular Ca²⁺ is linked to cell wall stress in *S. pombe*²⁴. Consistent with the notion that VPA exposure may cause cell wall stress in *S. cerevisiae* cells grown in SC⁵⁰, we found a small but significant overlap between genes upregulated in response to VPA and those upregulated in response to zymolyase-mediated cell wall digestion (Figure 4A). In addition, signals emanating from the activation of the cell wall integrity pathway can result in activation of a transcriptional program characteristic of UPR activation⁵¹, which is consistent with our RNA profiling data.

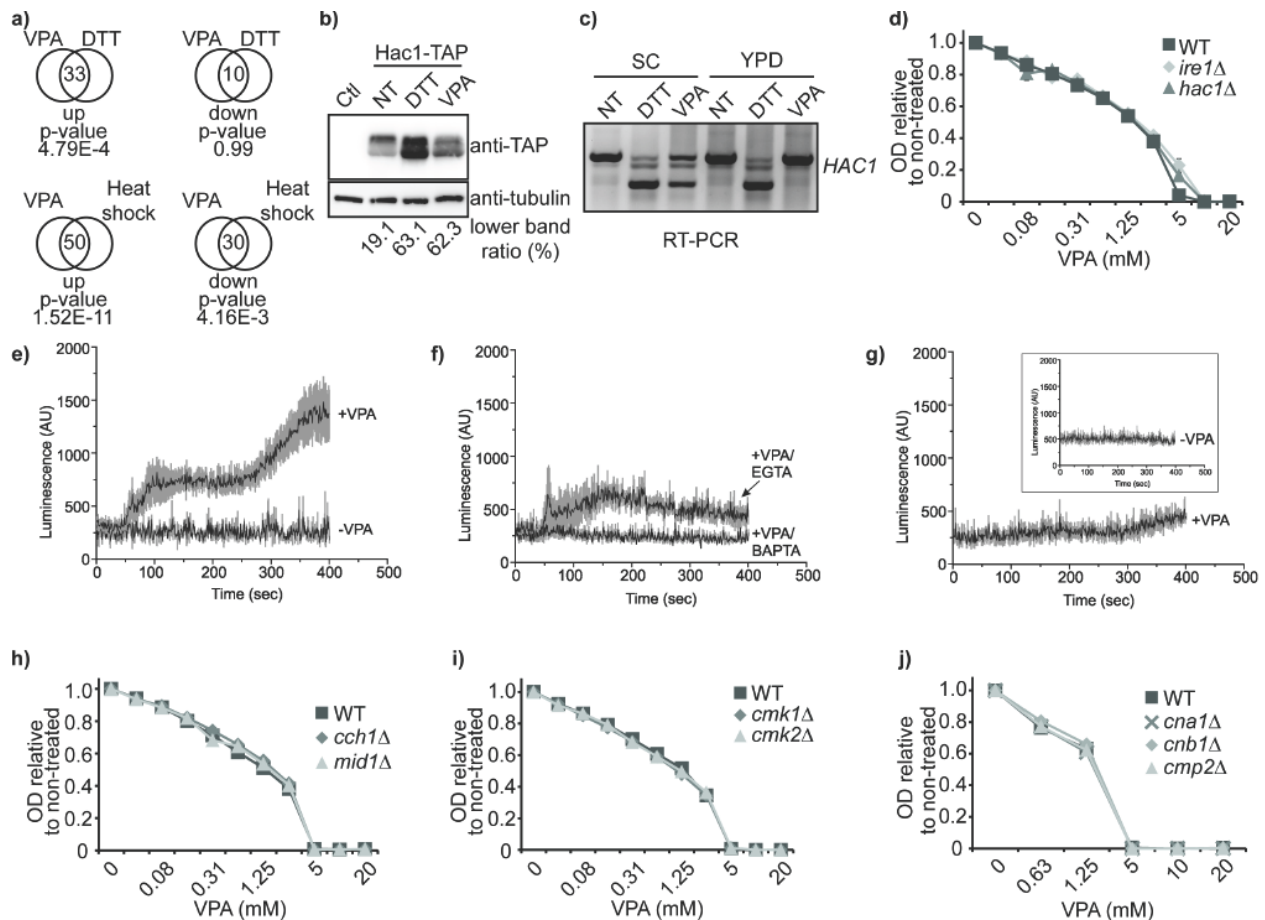


Figure 3 (Légende sur la page 53)

Figure 3: VPA-induced growth inhibition does not result from the induction of UPR or from Cch1/Mid1-mediated elevation of cytoplasmic Ca^{2+} . *A) A significant number of genes that are upregulated in response to VPA are also upregulated in response to dithiothreitol (DTT) or heat shock. The top 300 up- and downregulated genes in response to VPA were compared to published datasets using Venn diagrams; p-values were calculated using hypergeometric tests (see Methods for details). B-C) VPA causes splicing of HAC1 mRNA and expression of the short isoform of Hac1. Asynchronous cells were incubated at 30°C in SC medium +/- 10 mM VPA or 6 mM DTT for one hour. Samples were processed immunoblotting (B), or total RNA was extraction (C), followed by for RT-PCR (see Methods for details). Densitometry analyses were performed, and the ratio of the intensity of lower band on the total intensity of the two HAC1 bands (upper and lower) is presented in %. D) Cells lacking the key UPR factors Hac1 or Ire1 are not hypersensitive to VPA. Cells were incubated in SC medium containing the indicated concentrations of VPA at 30°C. Cell growth was monitored by OD₆₃₀ measurements after 48 h. E to G) Valproic acid induces Cch1-mediated cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ elevation. Ca^{2+} -dependent aequorin luminescence was measured in WT (E and F) or *cch1Δ* (G) cells in response to 8 mM valproic acid (VPA). VPA was added in either SC (+VPA), SC containing 2 mM EGTA (+VPA/EGTA), or in BAPTA buffer (+VPA/BAPTA). Results represent mean (\pm standard error of the mean; SEM) from at least 4 independent experiments. SEM values are illustrated with grey shading. Luminescence was recorded every second and is expressed in arbitrary units (AU). H-J) The anti-proliferative effect of VPA is not Cch1-, Mid1-, calmodulin- or calcineurin- dependent. Cells were treated as in D.*

We investigated whether VPA-induced cell wall stress contributes to the growth-inhibiting properties of this drug in budding yeast. The Slt2 MAP kinase of the cell wall integrity (CWI) pathway is activated in response to perturbation of the cell wall by various chemicals including caffeine, hydroxyurea, and drugs of the echinocandin class, e.g., micafungin^{52,53}. Unexpectedly, we found that basal levels of Slt2 phosphorylation (as detected by an anti-phosphorylated human p44/42 antibody) were strongly downregulated upon VPA exposure in SC medium, whereas the opposite was observed in YPD (Figure 4B,

top panel). This effect was not due to VPA-induced reduction in Slt2 protein levels (Figure 4B, bottom panel). Interestingly, the expression level of several genes acting upstream of Slt2 in the CWI cascade was downregulated in response to VPA (in particular *WSC2*, *ROM1*, *BCK1*; Supplementary Table S2). Although these effects are relatively modest, our data raise the possibility that transcriptional repression of upstream activators might contribute to the observed effect of VPA on Slt2 phosphorylation.

We next sought to investigate the functional relevance of VPA-induced reduction of Slt2 phosphorylation. Induction of Slt2 phosphorylation by hydroxyurea, caffeine, and micafungin was strongly inhibited by co-treatment with VPA in SC (Figure 4C). Activation of the CWI signaling cascade culminates with the activation of the Rlm1 transcription factor, and increased expression of its target genes^{52,54}. Consistently, VPA abrogated increased expression of three proteins encoded by such genes in response to micafungin, i.e. Crh1, Pst1, Chs3 (Figure 4D), even though expression of Rlm1 itself was not modulated by VPA (Supplementary Table S2). Our RNA profiling data indicated that none of the phosphatases that are known to dephosphorylate Slt2⁵⁵⁻⁵⁷, e.g. Sdp1, Msg5, Ptp2, Ptp3, were upregulated at the transcriptional level in response to VPA (Supplementary Table S2). In agreement with this, VPA-induced abrogation of Slt2 phosphorylation was still observed in cells lacking any of those phosphatases, and such cells did not present detectable hypersensitivity to VPA (Figure 4E-F). Importantly, VPA synergized with the cell wall-damaging drug micafungin in preventing *S. cerevisiae* cells growth, and lack of Slt2 did not modulate sensitivity to VPA (Figure 4G- H). Overall our data suggest that inhibition of the CWI cascade may contribute to the effects of VPA on the response to drug-induced cell wall stress in yeast. Our data also raises the possibility that downregulation of Slt2 activity may sensitize cells to VPA-associated cell wall stress, thereby contributing to the growth-inhibitory properties of this drug under our experimental conditions.

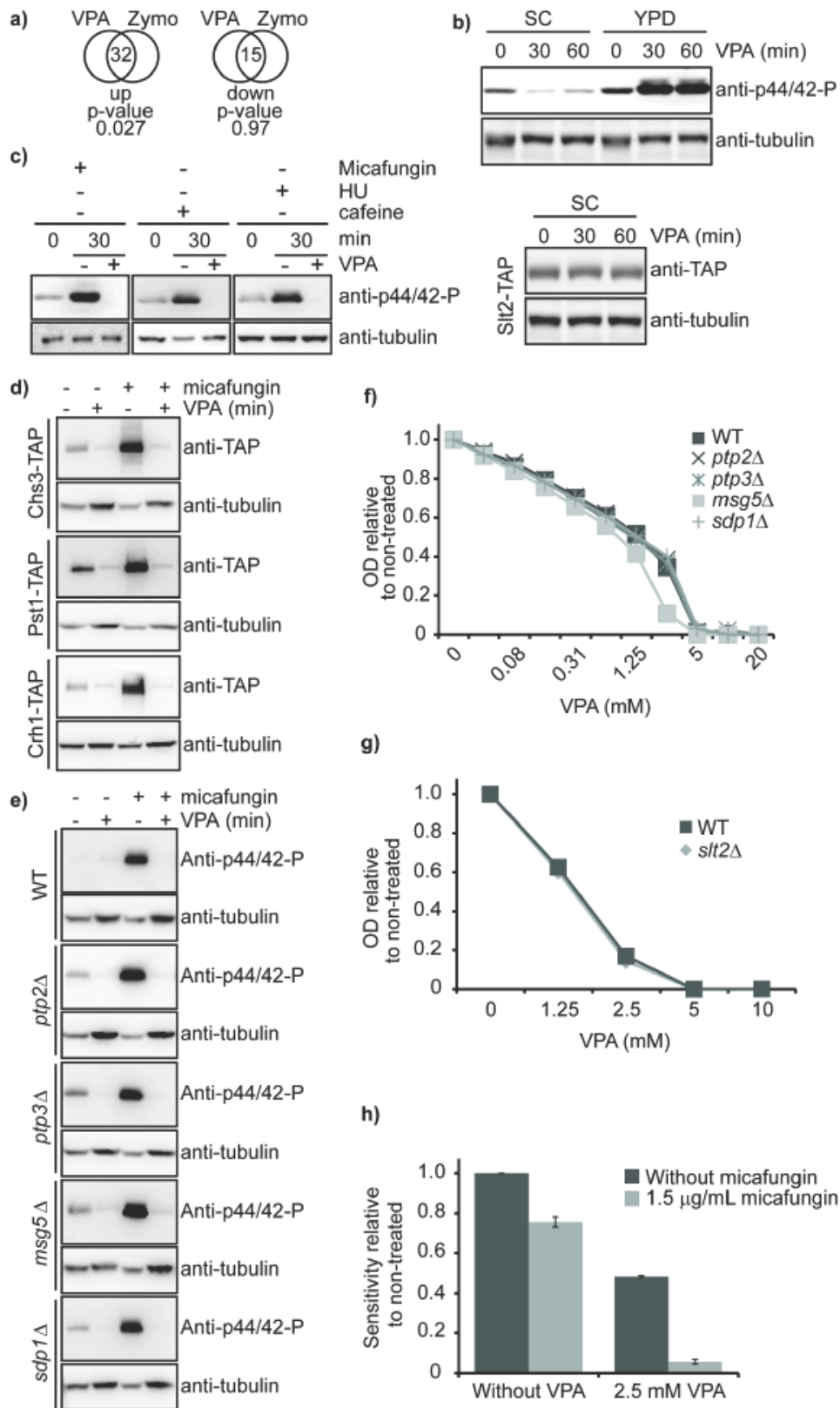


Figure 4 (Légende sur la page 55)

Figure 4: VPA inhibits phosphorylation of the Slt2 cell wall integrity MAP kinase. A) A significant number of genes that are upregulated in response to VPA are also upregulated in response to zymolyase exposure. The top 300 up- and downregulated genes in response to VPA were compared to published datasets using Venn diagrams; p-values were calculated using hypergeometric tests (see Methods for details). B) VPA inhibits basal levels of Slt2 phosphorylation in SC but not in YPD. Exponentially growing cells were incubated with 10 mM VPA in SC or YPD, and samples were processed for immunoblotting at indicated time. Membranes were probed with an anti-phosphorylated human p44/42 antibody (Top panel). Cells expressing Slt2-TAP were treated as above, but the membrane was probed with an anti-TAP antibody (Bottom Panel). C) VPA inhibits stress-induced phosphorylation of Slt2. Exponentially growing cells were incubated for 30 minutes in SC containing or not 10 mM VPA, and either 2 μ g/mL micafungin, 200 mM HU, or 15 mM caffeine. D) VPA inhibits micafungin-induced expression of Rlm1 target genes. Cells were incubated for 30 minutes in SC containing or not 10 mM VPA and 2 μ g/mL micafungin. Samples were then prepared for immunoblotting. E) VPA inhibits stress-induced phosphorylation of Slt2 in cells lacking phosphatases. Cells were incubated for 30 minutes in SC containing or not 10 mM VPA. Samples were prepared for immunoblotting with an anti-phosphorylated human p44/42 antibody. F) Lack of phosphatases that dephosphorylate Slt2 does not influence VPA sensitivity in yeast. Cells were incubated in SC containing the indicated concentration of VPA at 30°C. Cell growth was monitored by OD₆₃₀ measurements after 48 h. G) *slt2* Δ mutants are not hypersensitive to VPA. Cells were treated as in F. H) VPA synergizes with micafungin in preventing yeast growth in SC. Cells were incubated in SC containing VPA and micafungin at 30°C. Cell growth was monitored by OD₆₃₀ measurements after 48 h.

Supplementary Table S2: VPA-induced change in expression of genes involved in the pheromone and cell wall integrity pathways

Pheromone pathway			
Systematic name	Standard name^a	Function	Log2 Fold Change^b
YFL026W	Ste2	Receptor for alpha-factor pheromone	-0.207
YHR005C	Gpa1	Alpha subunit of the G protein	-0.623
YJR086W	Ste18	Gamma subunit of the G protein	0.239
YOR212W	Ste4	Beta subunit of the G protein	0.083
YDR103W	Ste5	Scaffold protein	-0.201
YHL007C	Ste20	Cdc42p-activated signal transducing kinase; activate Ste11	-0.880
YLR362W	Ste11	MEK kinase	-0.055
YCL032W	Ste50	Binds to Ste11 and aids and/or helps maintain in its activation	-0.222
YDL159W	Ste7	MAPKK	-0.060
YGR040W	Kss1	MAP kinase	-0.494
YBL016W	Fus3	MAP kinase	-0.594
YJL157C	Far1	CDK inhibitor and nuclear anchor	-1.141
YPL049C	Dig1	MAPK inhibitor of Ste12	0.616
YDR480W	Dig2	MAPK inhibitor of Ste12	-0.112
YHR084W	Ste12	Transcription factor	-0.240
Cell wall integrity			
Systematic name	Standard name^a	Function	Log2 Fold Change^b
YOR008C	Wsc1	Sensor-transducer of the stress-activated PKC1-MPK1 signaling pathway	0.167
YNL283C	Wsc2	Sensor-transducer of the stress-activated PKC1-MPK1 signaling pathway	-0.975
YOL105C	Wsc3	Sensor-transducer of the stress-activated PKC1-MPK1 signaling pathway	-0.642
YGR023W	Mtl1	Plasma membrane sensor; involved in cell wall integrity signaling	0.743
YLR332W	Mid2	O-glycosylated plasma membrane protein; acts as a sensor for cell wall integrity pathway	0.255
YGR070W	Rom1	Rho1-Guanine nucleotide exchange factor(GEF)	-1.288
YLR371W	Rom2	Rho1-Guanine nucleotide exchange factor(GEF)	-0.462
YLR425W	Tus1	Rho1-Guanine nucleotide exchange factor(GEF)	-0.299
YPR165W	Rho1	GTP-binding protein of the rho subfamily of Ras-like proteins	0.331
YBL105C	Pkc1	Protein serine/threonine kinase; activates Bck1p	-0.607
YJL095W	Bck1	MAPKKK; activated by Pck1p; activates Mkk1/2p	-0.916
YOR231W	Mkk1	MAPKK; activated by Bck1p; target Slr2p	0.329
YPL140C	Mkk2	MAPKK; activated by Bck1p; target Slr2p	0.010

YHR030C	Slr2	MAP kinase; involved in cell wall integrity and cell cycle progression	-0.449
YPL089C	Rlm1	MADS-box transcription factor; phosphorylated and activated by Slr2p	0.034
YOR134W	Bag7	Rho1-Guanine nucleotide exchange factor(GEF)	-0.316
YDR389W	Sac7	Rho1-GTPase activating protein (GAP)	-0.244
YER155C	Bem2	Rho1-GTPase activating protein (GAP)	-0.944
YDL240W	Lrg1	Rho1-GTPase activating protein (GAP)	-1.285
YNL053W	Msg5	Dual-specificity protein phosphatase; regulates/is regulated by	-0.704
YOR208W	Ptp2	Nuclear phosphotyrosine-specific phosphatase; inactivate MAPK	0.132
YER075C	Ptp3	Phosphotyrosine-specific protein phosphatase; inactivated MAPK	-1.289
YIL113W	Sdp1	Stress-inducible dual-specificity MAPK phosphatase; negatively regulates Slr2p	-0.214

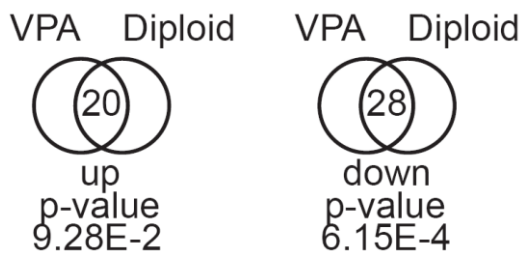
a: Genes are organized upstream (top) to downstream (bottom) of the pathway

b: Log2FoldChange taken from Supplementary Table S1

2.4.5 VPA inhibits the mating pheromone pathway in yeast. The antibody used to characterize Slr2 phosphorylation (anti-phosphorylated human p44/42) also recognizes two other MAP kinases in budding yeast, Kss1 and Fus3. These enzymes are involved in regulating the filamentous growth and alpha factor mating pheromone pathways, respectively, although Kss1 also plays role in the response to alpha factor⁵⁸. Immunoblot performed using the above-described antibody revealed that VPA completely abrogated both basal and alpha factor-induced Kss1 and Fus3 phosphorylation, without affecting the levels of these proteins (Figure 5A-C). Consistently, other proteins of the alpha factor signalling cascade were also influenced by VPA. Alpha factor-induced phosphorylation (as detected by electrophoretic mobility shift) and upregulation of Far1, a downstream target of Fus3, and of the Ste5 scaffolding protein, which brings together the Ste11 MAPKKK, Ste7 MAPKK and Fus3 MAPK to permit their phosphorylation, was impaired in cells exposed to VPA (Figure 5C). We also found that VPA also completely inhibited alpha factor-induced shmoo formation (Figure 5D), confirming the functional consequences of VPA on the mating pheromone pathway.

We explored the possibility that such effects resulted from VPA-induced modulation of gene expression emanating from silent mating loci, which could render cells pseudo-diploid thereby preventing mating and appropriate responses to alpha factor⁵⁹. We compared our VPA-induced expression profiling data to published datasets documenting genes that are specifically expressed in a/alpha diploid cells as compared to haploids⁶⁰ (Supplementary Figure S1, Supplementary Table S3). The results indicate that the expression of a limited but significant number of diploid-specific genes was influenced by VPA. However, only a few of those genes are known to be directly involved in regulating the pheromone/mating pathway⁶¹ (e.g. PRM1, FUS2, FAR1, BUD3). In addition, these genes encode factors that act downstream of Kss1 and Fus3 in the mating pheromone pathway, and as such their downregulation in response to VPA appears unlikely to influence the phosphorylation of these MAP kinases. We next asked specifically whether genes encoding factors acting upstream of Kss1 and Fus3 were repressed in response to VPA (Supplementary Table S2), and found that only *STE20* displayed modest downregulation (1.8-fold). The above-described analyses suggest that VPA- induced transcriptional modulation may contribute to the inhibitory effect of VPA on the mating pheromone cellular response, although the extent to which gene expression defects account for the effect of this drug on this pathway is unclear.

Supplementary Fig S1: Diploid-specific vs VPA-induced genes. *The top 300 up- and*



downregulated genes in response to VPA were compared to published datasets using Venn diagrams; p-values were calculated using hypergeometric tests (see Methods for details).

Supplementary Table S3: Diploid-specific genes whose expression level is modulated by VPA

	Systematic Name	Standard name^a	Function	Log2 Fold Change^b
Up-regulated	YPL250C	ICY2	Protein of unknown function; required for selective and nonselective autophagy	4.189
	YDL039C	PRM7	Pheromone-regulated protein; promoter contains Gcn4p binding elements	3.489
	YGL184C	STR3	Peroxisomal cystathionine beta-lyase	2.882
	YIL056W	VHR1	Transcriptional activator; Involved in response to low biotin concentrations	2.673
	YHR216W	IMD2	Inosine monophosphate dehydrogenase	2.495
	YOL152W	FRE7	Ferric reductase with similarity to Fre2p	2.273
	YJL217W	REE1	Cytoplasmic protein involved in the regulation of enolase (ENO1)	1.908
	YKL071W		Protein of unknown function	1.887
	YEL071W	DLD3	D-lactate dehydrogenase	1.742
	YOL091W	SPO21	Component of the meiotic outer plaque of the spindle pole body	1.462
	YDR523C	SPS1	Protein serine/threonine kinase; expressed at the end of meiosis	1.334
	YOR298W	MUM3	Protein of unknown function involved in outer spore wall organization	1.334
	YPR001W	CIT3	Dual specificity mitochondrial citrate and methylcitrate synthase	1.303
	YOR338W		Protein of unknown function	1.264
	YCR005C	CIT2	Citrate synthase	1.218
	YMR017W	SPO20	Meiosis-specific subunit of the t-SNARE complex	1.199
	YOR255W	OSW1	Protein involved in sporulation	1.194
	YBR072W	HSP26	Small heat shock protein with chaperone activity; suppress unfolded proteins aggregation	1.168
	YBR092C	PHO3	Constitutively expressed acid phosphatase similar to Pho5p; hydrolyzes thiamin phosphates	1.083
YGL170C	SPO74	Component of the meiotic outer plaque of the spindle pole body	0.999	
Down-regulated	YCL014W	BUD3	GEF for Cdc42p. Activated Cdc42p in early G1	-1.001
	YGR269W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data	-1.007
	YLR098C	CHA4	DNA binding transcriptional activator	-1.021
	YAR064W		Protein of unknown function	-1.023

	YIL166C		Putative protein with similarity to allantoate permease (Dal5p) subfamily	-1.024
	YMR118C	SHH3	Putative mitochondrial inner membrane protein of unknown function	-1.036
	YJL019W	MPS3	Nuclear envelope protein	-1.107
	YOL052C-A	DDR2	Multi-stress response protein; DDR2 as a paralog	-1.136
	YJL157C	FAR1	CDK inhibitor and nuclear anchor; Far1p sequesters the GEF Cdc24p in the nucleus; degradation after phosphorylation by Cdc28-Cln; phosphorylation of Far1p by MAPL Fus3p results in association with, and inhibition of Cdc28p-Cln	-1.141
Down-regulated	YLR385C	SWC7	Component of the nuclear Swr1 complex that is involved in chromatin remodeling	-1.178
	YFL040W		member of the sugar porter family; may have a role in intracellular sterol transport	-1.210
	YJL214W	HXT8	Protein of unknown function with similarity to hexose transporters	-1.211
	YGR140W	CBF2	Essential kinetochore protein	-1.225
	YKR045C		Protein of unknown function	-1.268
	YMR078C	CTF18	Subunit of a complex with Ctf8p; subunits with Replication Factor C and is required for sister chromatid cohesion; may have overlapping functions with Rad52p in the DNA damage replication checkpoint	-1.269
	YOL104C	NDJ1	Protein that regulated meiotic SPB cohesion and telomere Clustering	-1.290
	YNL270C	ALP1	Arginine transporter	-1.293
	YFL051C		Protein of unknown function	-1.305
	YDL227C	HO	Site-specific endonuclease; required for gene conversion at the MAT locus through the generation of a ds DNA break; expression restricted to mother cells in late G1	-1.343
	YGR014W	MSB2	Mucin family member involved in various signaling pathways; function as osmosensor in the Sho1p-mediated HOG pathway; functions in Cdc42p- and MAP kinase-dependent filamentous growth signaling pathway	-1.390
	YJR053W	BFA1	Component of the GTPase-activating Bfa1p-Bub2p complex; involved in multiple cell cycle checkpoint pathways that control exit from mitosis	-1.404
	YNR070W	PDR18	Putative transporter of the ATP-binding cassette (ABC) family; role in plasma membrane sterol incorporation; implicated in pleiotropic drug resistance	-1.456
	YPL167C	REV3	Catalytic subunit of DNA polymerase zeta; involved in translesion syntheses during post-replication repair; required for mutagenesis induced by DNA damage; involved in double-strand break repair	-1.461

YMR232W	FUS2	Protein involved in regulating the termination of mating projection growth as well as karyogamy during mating; localizes to nucleus and mating projection tip	-1.601
YPR054W	SMK1	MAP kinase involved in regulation of sporulation and spore wall assembly; autophosphorylates	-1.635
YNL279W	PRM1	Pheromone-regulated multispreading membrane protein; involved in membrane fusion during mating; localizes to the shmoo tip; regulated by Ste12p	-1.918
YDR274C		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data	-2.094
YMR175W	SIP18	Phospholipid-binding hydrophilin; essential to overcome desiccation-rehydration process; expression is induced by osmotic stress	-2.442

a: Data for diploid-specific genes are from Galitski, T., Saldanha, A. J., Styles, C. A., Lander, E. S. & Fink, G. R. Ploidy Regulation of Gene Expression. Science 285, 251–254 (1999). Up- and down-regulated genes (diploid-specific and VPA-induced) were compared in a Venn diagram (see Supplementary Figure S5); genes that are in both datasets are presented here.

b: Log 2 Fold Change is data from Supplementary Table S1 and represent VPA-induced change in expression.

Published data indicate that activation of Hog1 kinase, which responds to osmotic stress in yeast, inhibits alpha factor signalling via phosphorylation of Ste50, a protein important for the activation of the Ste11 MAPKKK^{62,63}. We found that VPA exposure in SC medium, but not in YPD, caused a modest increase in Hog1 phosphorylation as assessed by immunoblot using an anti-human phospho-p38 antibody (Figure 5A,C). We reasoned that VPA-induced activation of Hog1 might contribute to the effect of VPA on the mating pheromone pathway. Contrary to this, deletion of *HOG1* did not prevent VPA-induced reduction in the basal levels of Kss1 and Fus3 phosphorylation (Figure 5E), and VPA-treated *hog1Δ* cells did not form shmoos in response to alpha factor (Figure 5F). These data suggest that Hog1 does not contribute to VPA-induced inhibition of the mating pheromone pathway. Moreover our data clearly shows that the yeast osmosensitive pathway is not required for cell proliferation in the presence of VPA since *hog1Δ* cells are not hypersensitive to this drug (Figure 5G).

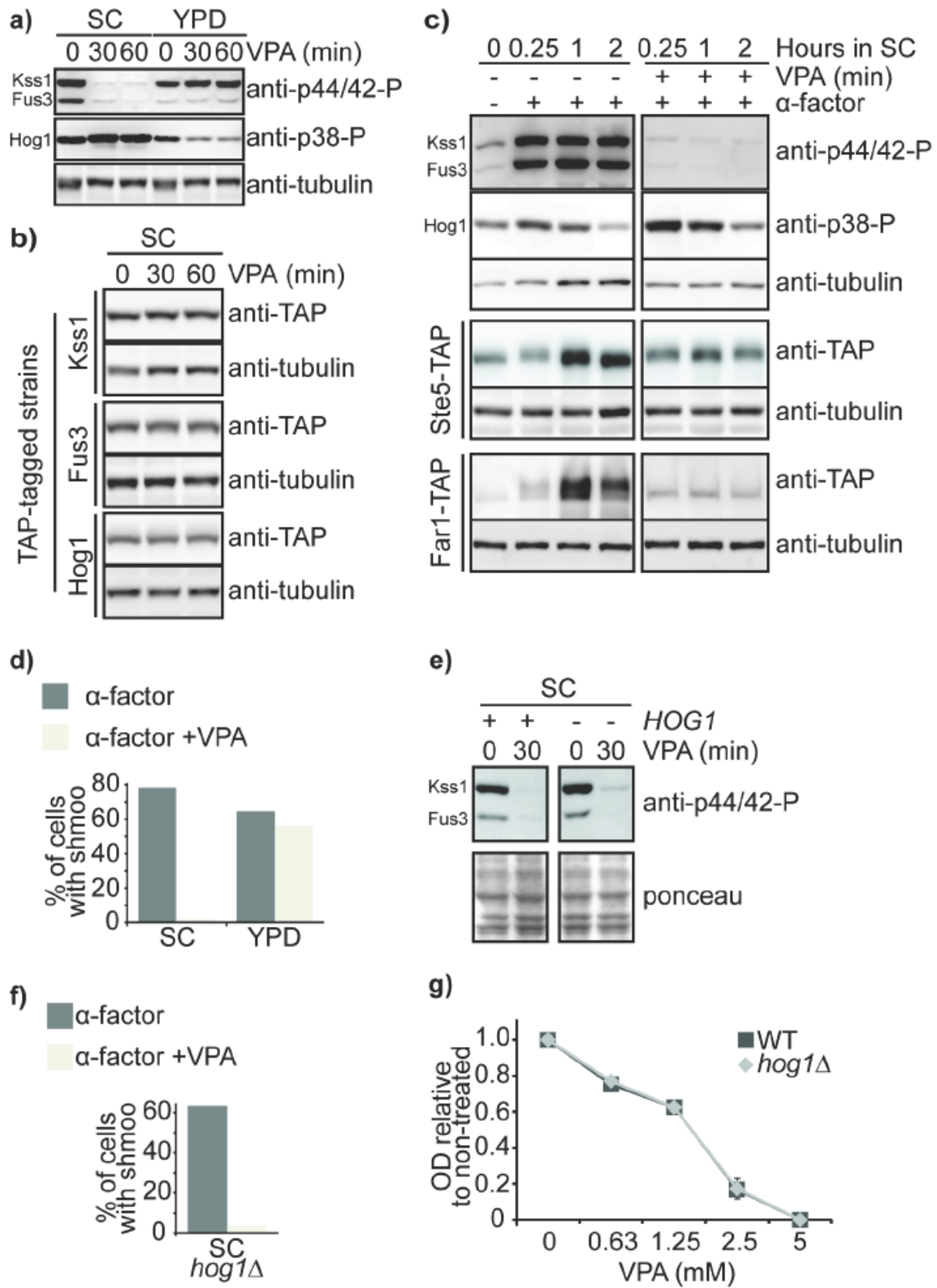


Figure 5 (Légende sur la page 61)

Figure 5: VPA inhibits the mating pheromone signaling pathway. *A) VPA inhibits basal levels of phosphorylation of MAPKs of the pheromone signaling pathway in SC but not in YPD. Exponentially growing cells were treated with 10 mM VPA for the indicated amount of time in the indicated medium. Samples were processed for immunoblotting, and membranes were probed with an anti-tubulin antibody as loading control, anti-phospho human p44/42 antibody that recognizes phosphorylated Kss1 and Fus3, or anti-phospho human p38 antibody recognizing phosphorylated Hog1. B) VPA does not influence Kss1, Fus3, or Hog1 protein levels. Yeast strains expressing TAP-tagged versions of the indicated proteins were incubated in SC containing 10 mM VPA. Samples were processed for immunoblotting at the indicated time, and membranes were probed with an anti-TAP (CBP) antibody. C) VPA inhibits the cellular response to the mating pheromone alpha factor. Cells were incubated in SC with or without alpha factor or 10 mM VPA. Samples were processed for immunoblotting at the indicated time. Membranes were probed as in A and B. D) VPA inhibits alpha factor-induced shmoo formation in SC but not in YPD. Cells were incubated in the indicated media for 2 hours at 30°C. Samples were examined by microscopy to assess shmoo formation. E-F) VPA inhibits Kss1 and Fus3 phosphorylation in a HOG1-independent manner. (E) Cells were incubated in SC containing 10 mM VPA. Samples were processed for immunoblotting at the indicated time; membranes were probed as in A. (F) VPA inhibits shmoo formation in a HOG1-independent manner. Cells were treated as in D. G) hog1Δ cells are not hypersensitive to VPA. Cells were incubated in SC containing the indicated concentration of VPA at 30°C. Cell growth was monitored by OD₆₃₀ measurements after 48 h.*

2.4.6 VPA inhibits cell cycle progression in yeast. To further investigate the biological basis of the growth inhibitory properties of VPA in yeast, we characterized cell cycle progression in the presence of this drug. We found that VPA exposure in SC did not lead to obvious accumulation of cells in any particular phase of the cell cycle as assessed by flow cytometry-based DNA content analysis (Figure 6A). Since cells do not proliferate in SC containing 10 mM VPA over periods of 48 hours as assessed by optical density reading measurements (Figure 1), these results suggest that VPA may inhibit transition between cell cycle phases in yeast.

We first investigated whether VPA influences the G1 to S transition. Cells were synchronized in G1 using alpha factor and released in the cell cycle in presence or absence of VPA. Strikingly, we found that DNA content was not increased in cells exposed to VPA two hours after release from G1 as assessed by FACS (Figure 6B, left panel). Microscopy examination of cells from this experiment further indicated that cells released from G1 arrest in VPA do not form buds as compared to mock-treated cells (Figure 6B, right panel), suggesting that VPA inhibits the transition from G1 to S in yeast. The G1-S transition is well known to depend on cyclin-dependent kinase activity and on the expression of Cln1 and Cln2⁶⁴. We found that Cln1 and Cln2 expression was repressed when cells are released from alpha factor-induced G1 arrest in VPA-containing medium (Figure 6C). Consistently, mRNA levels for the corresponding genes were also downregulated upon VPA exposure (Supplementary Table S1). We further found that expression of the Clb5/Clb6-CDK inhibitor Sic1, whose stability is known to be downregulated in a Cln1/2-CDK manner⁶⁵, was maintained in cells released from alpha factor arrest in SC medium containing VPA (Figure 6C). We conclude that downregulation of Cln1/2 expression is likely to cause VPA-induced G1 to S transition defects upon release from alpha factor arrest. We also verified whether exposure to VPA compromised passage through mitosis. Cells were synchronized in G1 and released in the cell cycle in the presence of nocodazole. G2/M-arrested cells were then released in the cell cycle in the presence or absence of VPA. We found that VPA strongly inhibited the progression from G2/M to the next G1 as assessed by flow cytometry (Figure 6D), although the mechanisms are not clear at present.

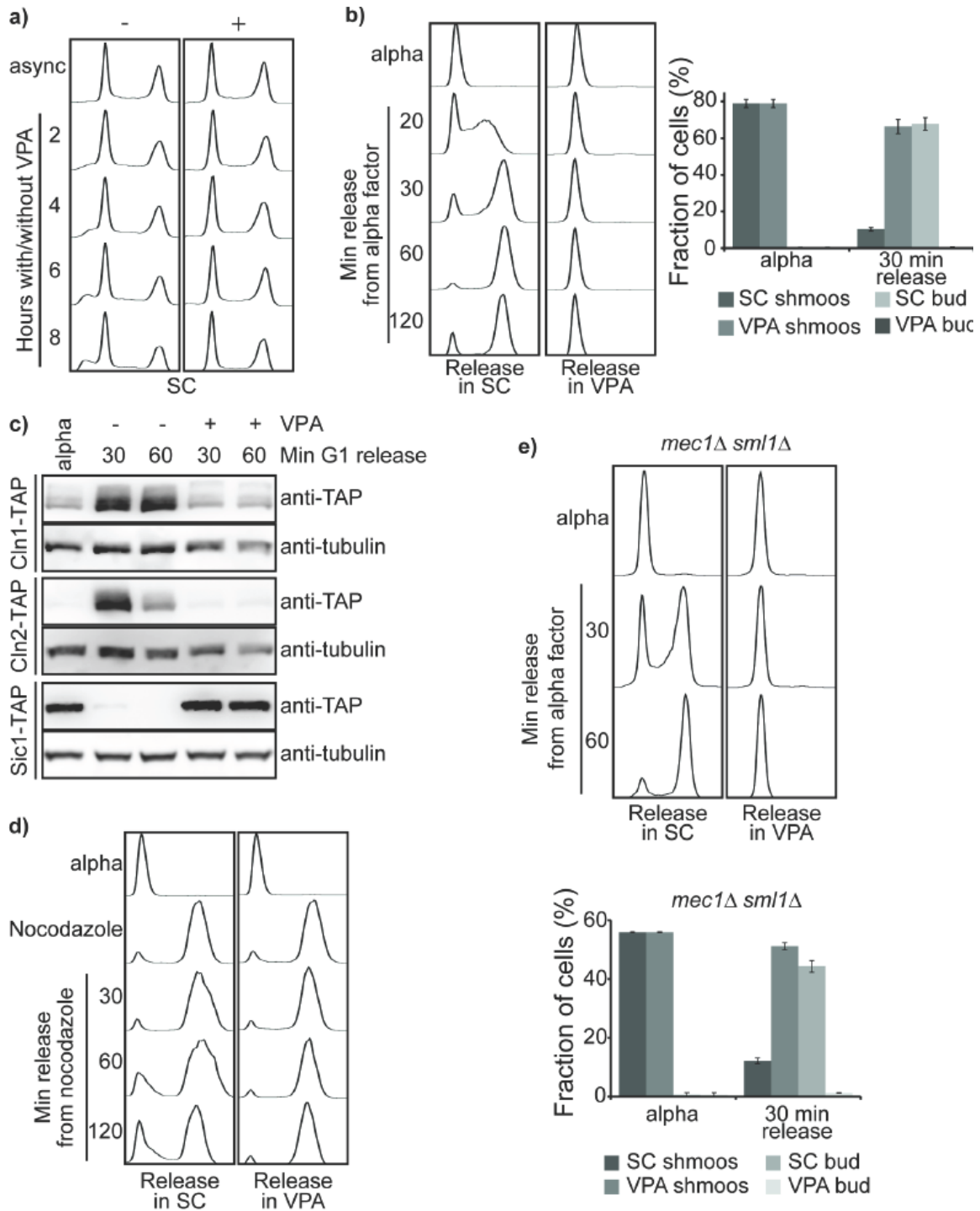


Figure 6: VPA inhibits the G1-S and G2/M-G1 transitions. A) VPA-treated cells do not accumulate in a particular phase of the cell cycle. Exponentially growing cells were incubated in SC containing 10 mM VPA at 30°C. Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point. B) VPA inhibits cell cycle in G1 phase.

Cells were synchronized in G1 with alpha factor and released immediately in fresh SC +/- 10 mM VPA. Samples were processed for DNA content analysis by FACS at the indicated time point (left panel) or examined by microscopy to assess budding (right panel). C) VPA inhibits Cln1-2 expression and Sic1 downregulation during the G1-S transition. Cells were synchronized in G1 with alpha factor and released in SC +/- 10 mM VPA. Samples were processed for immunoblotting at the indicated times. Membranes were probed with an anti-TAP (CBP) or anti-tubulin antibody. D) VPA inhibits progression from G2/M to G1. Cells were synchronized in G1 with alpha factor and released toward S-phase in the presence of nocodazole for 90 minutes. Cells were washed and incubated in SC +/- 10mM VPA. Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point. E) Mec1 is not required for VPA- induced inhibition of cell cycle progression and shmoo formation. Cells were treated as in B. Samples were processed for DNA content analysis by FACS (top panel) or examined by microscopy to assess budding (bottom panel).

Activation of the DNA damage checkpoint in response to DNA lesions inhibits the G1-S transition in yeast^{66,67}. In particular, the Mec1 kinase and its downstream target Rad53 are required to mediate G1 arrest in response to genotoxic stress⁶⁶. Activation of the DNA damage checkpoint kinases inhibits Cln1 and Cln2 expression, thereby blocking entry into S phase⁶⁸. We hypothesized that VPA might cause DNA damage, thereby inducing Mec1-dependent repression of Cln1 and Cln2 expression and inhibiting the G1-S transition. Contrary to this, we found that VPA inhibited S phase entry in cells lacking *MEC1* released from G1 (Figure 6E, top panel). Furthermore, VPA also completely inhibited bud formation in *mec1Δ sml1Δ* cells under these conditions (Figure 6E, bottom panel). We conclude that activation of the DNA damage-induced G1 checkpoint is unlikely to contribute to VPA-mediated inhibition of G1-S transition in yeast.

2.4.7 VPA inhibits DNA replication in *S. cerevisiae*. The fraction of S phase cells in asynchronous yeast populations is limited, precluding us from rigorously ascertaining whether

VPA had any effect on DNA replication initiation/S phase progression (Figure 6A). To circumvent this problem, cells were arrested in G1 with alpha factor and released for 20 to 30 minutes toward S phase before addition of VPA to the medium. Strikingly, we found that VPA completely arrested DNA replication in SC medium (Figure 7A). Our results further show that replication does not progress between the time of VPA addition and subsequent time points, indicating that VPA acts very rapidly to block active DNA replication forks. To facilitate subsequent characterization and obtain cell populations that are synchronized in S before VPA exposure, we synchronized cells in G1 with alpha factor and released them toward S in the presence of either hydroxyurea (HU) or methyl methanesulfonate (MMS) for 90 minutes. Under these conditions, cells accumulated in early (HU) or mid (MMS) S phase (Figure 7B); entry into S phase was confirmed by evaluating cell budding by microscopy (more than 95% of cells with buds; data not shown). Removal of HU or MMS followed by incubation in fresh SC medium allowed cells to complete DNA replication within 60 to 120 minutes. In contrast, DNA content of cells incubated in SC containing VPA after removal of HU or MMS did not change over this time period (Figure 7B). We conclude that VPA inhibits the resumption of DNA replication after HU- or MMS-induced DNA replication arrest in yeast.

We tested whether VPA-mediated inhibition of DNA replication operates in a pH-dependent manner. Addition of 10 mM VPA did not prevent resumption of DNA replication after HU-mediated S phase arrest in YPD medium at pH 6.7 (Figure 7C), although elevated concentrations of VPA delayed HU recovery to some extent under these conditions (Figure 7D). In contrast VPA completely inhibited resumption of DNA replication after HU arrest when the pH of YPD medium was adjusted to 4 (Figure 7E), strongly suggesting that low pH explains VPA-mediated inhibition of DNA replication in SC medium. Importantly, our pH measurements revealed that addition of 10 mM VPA to SC medium raised its pH to 5. We therefore considered the possibility that VPA-induced inhibition of DNA replication could result from a sudden increase in pH upon addition of VPA to the medium. Contrary to this, releasing cells from alpha factor block into SC medium at pH 4 and then raising the pH to 5 to simulate addition of VPA (Figure 7F panel i) did not strongly influence DNA replication. Moreover maintaining a constant pH of 5 throughout the experiment did not abrogate the

effect of VPA on replication (Figure 7F, compare panel ii and iii). These data indicate that VPA-induced pH change does not explain the effect of this drug on S phase progression.

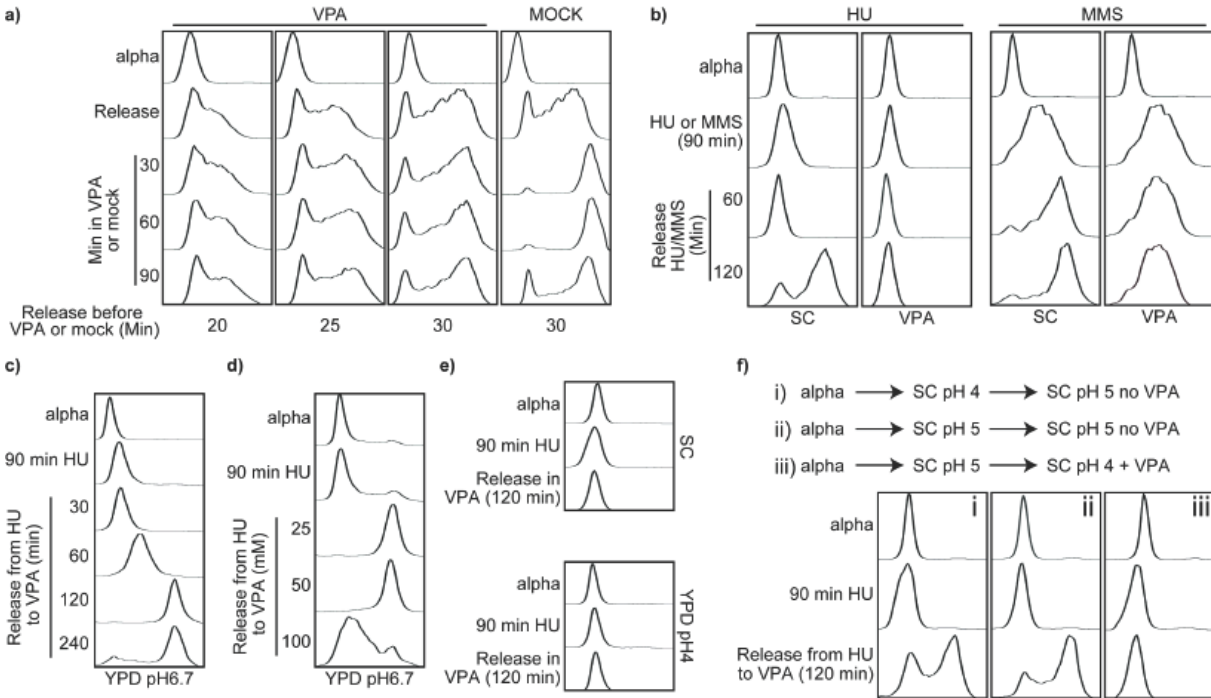
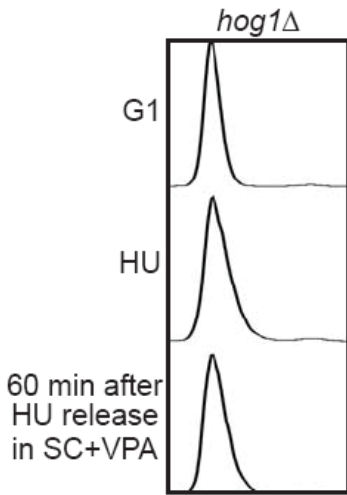


Figure 7: VPA inhibits S phase progression. A) VPA rapidly inhibits DNA replication progression. Cells were synchronized in G1 and released in SC toward S phase. 10 mM of VPA was added 20, 25 or 30 minutes after release. Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point. B) VPA inhibits resumption of DNA replication after exposure to genotoxins. Cells were synchronized in G1 and released toward S in SC containing 0.03% MMS or 200 mM HU for 90 minutes. Cells were washed and incubated with SC +/- 10 mM VPA. Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point. C) VPA does not inhibit S phase progression in YPD (pH 6.7). Cells were treated as in B. D) Elevated concentrations of VPA inhibit DNA replication in YPD. Cells were synchronized in G1 and released toward S in the presence of 200 mM HU for 90 minutes. Cells were washed and then incubated with YPD +/- VPA at the indicated concentration for 60 minutes. Samples were then processed for DNA content analysis by flow cytometry. E) VPA inhibits cell cycle progression in YPD at low pH. Cells were treated as in C, except that the pH of YPD medium was adjusted to 4 with hydrochloric

acid. F) VPA-induced pH modulation does not influence resumption of DNA replication after HU-induced arrest. Cells were synchronized in G1 in SC at normal pH (left panel) or in SC with its pH adjusted to 5 (middle and right panel). Cells were released in SC toward S (at the same pH as that used during G1 synchronization) in the presence of 200 mM HU for 90 minutes. Cells were washed and then incubated in SC whose pH was adjusted to 5 (left and middle panel), or in SC containing 10mM VPA (right panel; resulting pH is approximately 5 in these conditions). Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point.

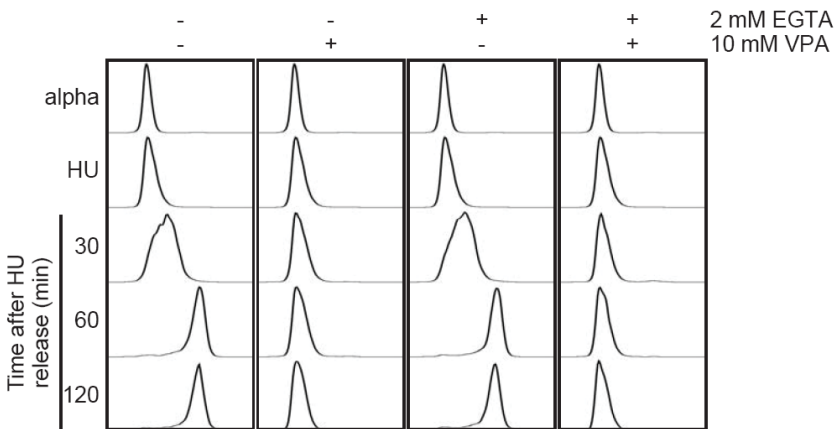
Recent studies indicate that activation of the Hog1 osmoresponsive pathway delays S phase progression via direct phosphorylation of the Mrc1 replisome protein^{69,70}. Since we observed a modest increase in Hog1 phosphorylation in response to VPA in SC medium (Figure 5A), we hypothesized that Hog1 activity might explain VPA-induced inhibition of DNA replication. However we found that VPA efficiently blocked resumption of DNA replication after HU exposure in *hog1Δ* cells (Supplementary figure S2). Furthermore mutation of Mrc1 residues phosphorylated by Hog1 in response to osmotic stress⁶⁹ to non-phosphorylatable alanines also did not compromise the effect of VPA on DNA replication (data not shown). We also verified whether VPA-induced increase in Ca²⁺cyt levels might influence cell cycle progression. Cells were synchronized in G1 using alpha factor and released toward S phase in HU-containing medium. Cells were then incubated in the presence of VPA alone or in combination with EGTA in medium without HU. We found that addition of EGTA did not influence VPA-induced inhibition in DNA replication resumption in these conditions (Supplementary Figure S3). Likewise, deletion of the *CCHI* or *MIDI* genes did not abolish the effect of VPA on DNA replication progression after HU removal (Supplementary Figure S4). Recently published data suggest that long term (hours) exposure to VPA causes autophagy-mediated degradation of DNA repair proteins²⁰. We therefore verified whether this pathway might influence DNA replication, but contrary to this notion we found that deletion of several autophagy genes (*ATG1*, *ATG8*, *ATG19*) does not influence the effect of VPA on S phase progression (Supplementary Figure S5). We conclude that neither activation

of the Hog1-dependent osmostress response, autophagy pathway, or of Cch1-Mid1-dependent calcium intake, explains the inhibitory effect of VPA on DNA replication.

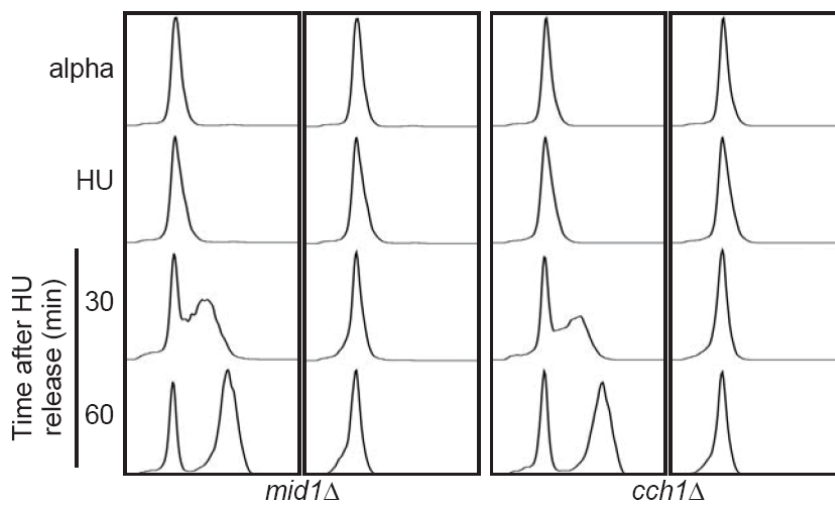


Supplementary Fig S2: VPA-mediated DNA replication inhibition does not require Hog1. Cells were synchronized in G1 and released toward S phase in SC medium containing 200 mM HU for 60 minutes. Cells were washed and incubated with SC +/- 10 mM VPA. Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point.

Supplementary Fig S3: VPA inhibits DNA replication in the presence of EGTA. Cells were synchronized in G1 with alpha factor and released toward S phase in SC medium

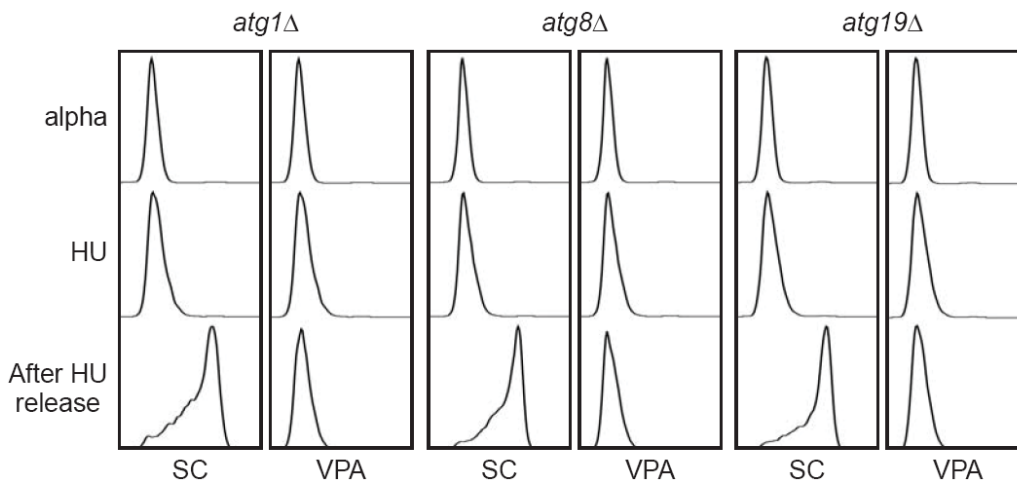


containing 200 mM HU for 60 minutes. Cells were washed and incubated with SC +/- 10 mM VPA +/- 2 mM EGTA. Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point.



Supplementary Fig S4: VPA-mediated inhibition of DNA replication does not require the Mid1-Cch1 calcium channel. Cells were synchronized in G1 and released toward S phase in SC medium

containing 200 mM HU for 60 minutes. Cells were washed and incubated with SC +/- 10 mM VPA. Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point.



Supplementary Fig S5: VPA-mediated inhibition of DNA replication does not require genes of the autophagy pathway. Cells were synchronized in G1 and released toward S phase in SC medium containing 200 mM HU for 60 minutes. Cells were washed and incubated with SC +/- 10 mM VPA. Samples were processed for DNA content analysis by flow cytometry at the indicated time point.

2.4.8 VPA does not compromise the integrity of DNA replication forks. We next considered the possibility that VPA could irreversibly compromise active DNA replication forks, thereby preventing completion of S phase. We first verified whether the effect of VPA on DNA replication was reversible. Cells were arrested in G1 and released toward S in the presence of 200 mM HU. After removal of HU, cells were incubated in VPA for one hour before being released in SC medium with or without VPA. Our results indicate that cells rapidly resumed DNA replication after removal of VPA from the medium and completed S phase within 60 minutes (Figure 8A). We also directly characterized the structure of DNA replication forks formed at the ARS 305 early firing replication origin using neutral two-dimension gel electrophoresis³³, and found that DNA structures formed after 90 minutes in HU were unchanged upon removal of HU from the medium and subsequent 60 minutes incubation in the presence of VPA (Figure 8B). These data are consistent with the notion that blocked DNA replication forks are not irremediably compromised after VPA exposure in yeast.

Several genotoxic drugs impede the progression of DNA replication forks, by causing lesions which block DNA polymerases, e.g. MMS-induced methylated DNA bases⁷¹, or by inhibiting enzymes that are associated with DNA replication, e.g. HU-mediated inhibition of ribonucleotide reductase, or camptothecin (CPT)-induced inhibition of topoisomerase I^{72,73}. At sites of DNA lesions, DNA repair proteins form foci that can be visualized by microscopy. In particular, homologous recombination (HR) is a critical mechanism to circumvent replicative stress caused by genotoxins (reviewed in^{74,75}). To verify whether VPA acts as a genotoxic agent in yeast, we monitored focus formation for the critical HR factor Rad52 and of the Rfa1 subunit of the single-stranded DNA (ssDNA)-binding protein complex RPA, which are both involved in early steps of the HR cascade (Figure 8C). Cells were synchronized in G1 using alpha factor, and released either in medium containing HU or CPT as controls, or in SC medium for 30 minutes followed by addition of VPA (similar to the experiments described in Figure 7A). The results indicate that exposure to HU or VPA during S phase does not cause the formation of either Rad52 or Rfa1 foci. This is in contrast to the situation for CPT, which led to high frequencies of foci of both proteins in these conditions.

These data are consistent with published results indicating opposing effects of HU and CPT in Rad52 foci formation during S phase⁷⁶.

Exposure to HU for short durations does not cause formation of HR foci in S phase cells; however the genotoxic effects of this drug cause severe loss of cell viability in cells devoid of the critical DNA damage checkpoint kinases Mec1 or Rad53⁷⁷, which are well-known to be exquisitely sensitive to perturbations of DNA replication forks progression. Consistent with the notion that VPA- induced S phase arrest does not compromise DNA replication forks, cells lacking Mec1 or Rad53 were not hypersensitive to VPA in SC medium (Figure 8D). Formation of ssDNA at stalled DNA replication forks leads to Mec1 activation and phosphorylation of its downstream target Rad53 in response to HU or MMS⁷⁸. In contrast to HU, cells exposed to VPA during S phase did not exhibit Rad53 phosphorylation (Figure 8E left panel, as assessed by phosphorylation-induced mobility shift in SDS-page). In addition, VPA did not cause Rad53 phosphorylation to persist after removal of HU from the medium (Figure 8E right panel). These results are consistent with a model in which VPA does not block active DNA replication forks by causing DNA damage.

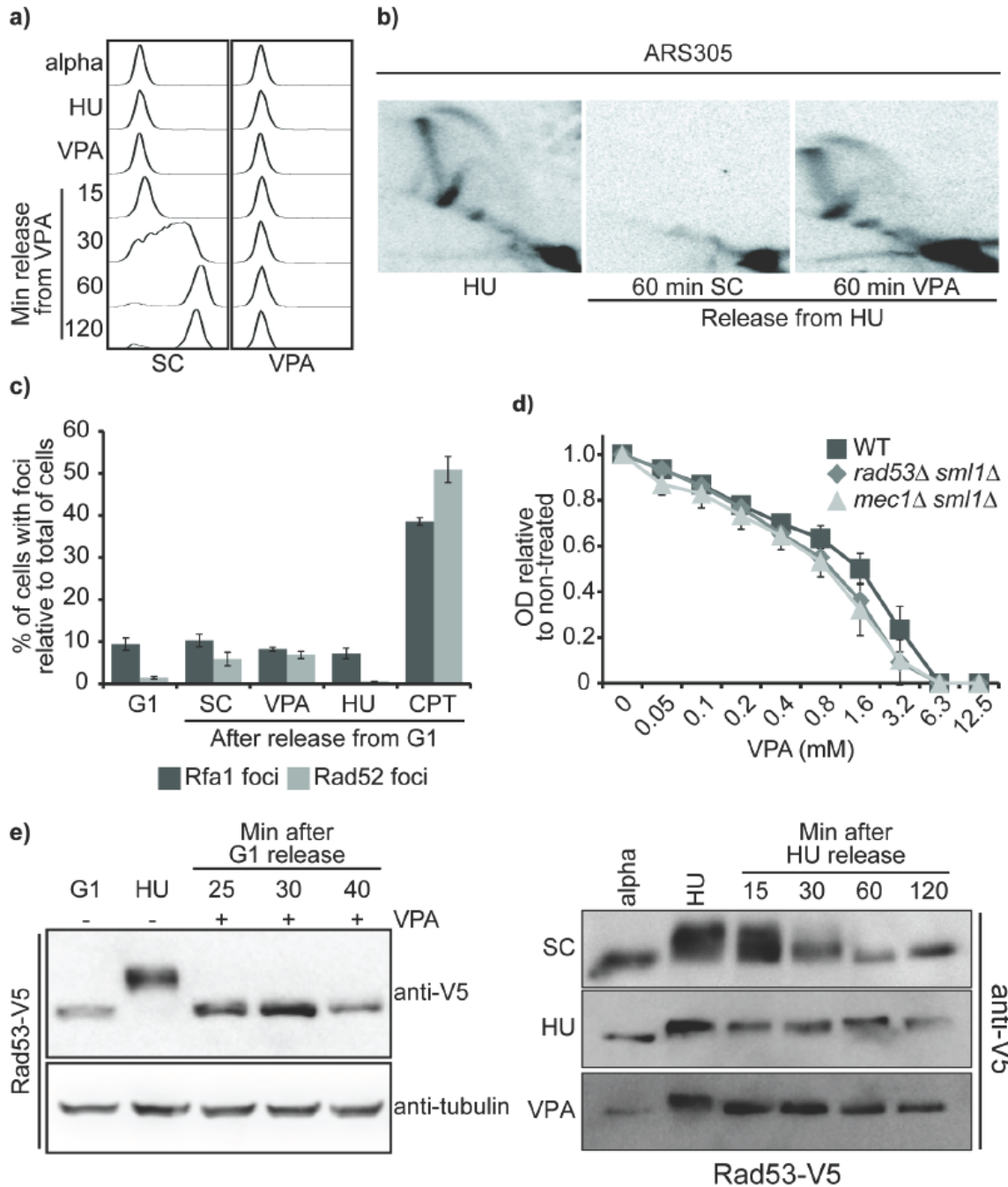


Figure 8: VPA does not induce a DNA damage response. A) VPA reversibly inhibits DNA replication. Cells were synchronized in G1 with alpha factor and released toward S in SC containing 200 mM HU for 90 minutes. Cells were washed and incubated in SC containing 10 mM VPA for 60 minutes. Cells were then washed and incubated in SC. Samples were processed for DNA content analyses by flow cytometry. B) VPA does not influence the structure of HU-stalled DNA replication forks. Cells were synchronized in G1, and released

toward S in SC containing 200 mM HU for 90 minutes. Cells were washed and incubated in SC +/- 10 mM VPA for 60 minutes. Samples were processed for neutral two-dimensional agarose gel electrophoresis. C) VPA does not induce Rad52 or Rfa1 foci. Cells expressing Rad52-YFP or Rfa1-8ala-YFP were synchronized in G1 and released toward S in SC for 30 minutes followed by addition of in 10 mM VPA for 60 minutes. As controls, cells were released toward S in SC containing 5µg/mL CPT or 200 mM HU for 60 minutes. Samples were then examined by fluorescence microscopy. D) Lack of Mec1 or Rad53 does not sensitize to VPA. Cells were incubated in SC containing VPA. Growth was monitored by OD₆₃₀ measurements after 48 h. E) VPA does not cause Rad53 phosphorylation, or prevent its dephosphorylation. Left panel: Cells were synchronized in G1 and released toward S in SC. 10 mM VPA was added after 25, 30 or 40 minutes. Cultures were further incubated for 60 minutes. As control, cells were released from G1 in SC containing 200 mM HU for 60 minutes. Right panel: Cells expressing Rad53-V5-6His were synchronized in G1 and released toward S in presence of 200 mM HU for 60 minutes. Cells were washed and incubated in SC +/- 10 mM VPA or 200 mM HU.

2.5 DISCUSSION

In this work, we used *S. cerevisiae* as a model system to further investigate the basis of the antiproliferative effects of VPA. We found that VPA displays potent fungicidal activity at low environmental pH in budding yeast, which is consistent with a recent report indicating that pH also influences VPA-induced growth inhibition and apoptosis in *S. pombe*⁷⁹. We note that previously published data indicate that VPA induces apoptosis in *S. cerevisiae*, although these experiments were performed in YPD medium over longer time periods (24 h or more)^{18,19}. Intriguingly, VPA-induced apoptosis was reported to depend on Yca1 (a caspase-like protease) and on the class III HDAC Sir2 in budding yeast^{18,19}. While we did not specifically test whether VPA leads to apoptosis in budding yeast grown in SC medium, our unpublished data shows that *yca1*Δ and *sir2*Δ mutants are not resistant to VPA under these growth conditions (data not shown). This suggests that VPA-induced growth inhibition may result from the activity of different cellular pathways depending on environmental pH. The reason for such pH-dependency of the effect of VPA on yeast cell proliferation is unclear. Since VPA is a weak acid (pKa 4.8), it is possible that environmental pH-induced neutralization of its charge may facilitate its entry into yeast cells, although further experiments are required to assess this model. In any case our data raise the possibility that VPA may present therapeutically useful fungicidal properties at relatively low pH. In this respect we note that the pH of human vaginal mucosal surfaces is normally within the 3.8 to 4.5 pH range. Future experiments should therefore aim to test whether VPA is toxic to pathogenic fungi that cause vaginal infections in women, e.g. *Candida albicans*.

At low pH, VPA induced a complex transcriptional response which only partially overlapped with that induced by another HDAC inhibitor, TSA. Interestingly, both drugs caused upregulation of genes involved in protein folding. Indeed our results indicate that VPA induces known markers of the canonical UPR, e.g. *HAC1* mRNA splicing and expression of a short isoform of Hac1, although this pathway does not appear to contribute to cell survival in the presence of this drug since *hac1*Δ and *ire1*Δ mutants are not hypersensitive. Similarly, VPA also increased influx of extracellular calcium, a response which has been linked to the

UPR⁴⁹, even though deletion of genes encoding either calcium channels, or calcineurin and calmodulin subunits, did not influence survival in VPA. We note that this is in sharp contrast with numerous other environmental stresses, e.g. NaCl, azole, cold, iron, plant essential oils, amiodarone, which cause fungi to rely on Cch1/Mid1-dependent signalling for survival^{36,80–85}. The molecular mechanisms explaining VPA-induced UPR activation remain unclear, although VPA has been shown to cause cell wall damage and membrane trafficking defects in *S. pombe*²³, which can both lead to UPR activation^{43,51}. Further experiments will be necessary to determine the molecular basis of VPA-induced UPR activation in *S. cerevisiae*, and to validate the contribution of UPR-associated phenomena, i.e. cell wall stress, calcium influx, membrane trafficking, to the antiproliferative properties of this drug in budding yeast.

Unexpectedly, we found that VPA influences MAP kinase signalling in budding yeast. Specifically the Slt2-dependent cell wall integrity and Kss1/Fus3-dependent mating pheromone pathways were rapidly downregulated upon VPA exposure, while p38 (Hog1) phosphorylation was modestly upregulated in these conditions. Our results clearly show that *hog1Δ* cells are not sensitive to VPA, indicating that upregulation of the osmoprotection response pathway is not necessary for survival in response to this drug. On the other hand, it is unclear whether downregulation of cell wall integrity and mating pheromone signalling contributes to VPA-mediated growth arrest. Indeed, mutations in genes encoding key components of these pathways have not been reported to cause significant growth defects, although we cannot exclude that simultaneous inactivation of both pathways may contribute to VPA-mediated growth inhibition. As mentioned earlier, VPA was shown to negatively influence cell wall integrity in fission yeast, and also to synergize with cell wall-damaging agents in preventing growth in this organism²³. In addition, Slt2 is well-known to be required for resistance to cell wall stress caused by various treatments⁵⁰. Based on our results and on the above-mentioned considerations, we speculate that VPA-induced cell wall stress and Slt2 phosphorylation defects may synergize to inhibit yeast proliferation. We also note that VPA-induced modulation of MAP kinase signalling has been observed in several mammalian model systems, but the effects (activation or inhibition) appear to vary widely between model systems. For example, in human HepG2 hepatic carcinoma cells VPA promotes MEK1/2

signalling without activating p38⁸⁶, whereas the opposite is observed in K562 erythroid cells⁸⁷. Future studies will be required to elucidate the molecular mechanisms causing VPA-induced modulation of MAP kinase signalling in yeast, and to compare them with those operating in various human cultured cell systems.

Our data indicate that VPA blocks cell cycle progression in every phase of the cell cycle. In particular, we found that the G1 to S transition was impeded by VPA via downregulation of the expression of the Cln1 and Cln2 cyclins. G1 arrest has been observed in VPA-treated human glioma cells, and also appears to depend on modulation of cyclin levels¹³. Elucidation of the mechanisms underlying VPA-mediated reduction in Cln1/2 levels in yeast will require further experiments, although we excluded possible contributions of the DNA damage-induced checkpoint kinase Mec1 to this phenomenon. Remarkably, we also observed that VPA causes rapid and reversible DNA replication arrest in yeast. As was the case for VPA-induced inhibition of the G1-S transition, we did not observe any evidence of VPA-induced DNA damage (Rad52 or Rfa1 focus formation, Rad53 checkpoint kinase phosphorylation) which could explain reduced progression of DNA replication forks in the presence of this drug. Several of our results also clearly indicate that VPA-blocked replisomes are not compromised: i) VPA does not modify the structure of replication forks as assessed by 2D gel electrophoresis, ii) cells lacking the critical S phase-checkpoint kinases Rad53 or Mec1 are not hypersensitive to VPA, iii) the effect of VPA on DNA replication is reversible. We also excluded the possibility that Hog1-mediated phosphorylation of the replication factor Mrc1, which delays S phase progression in response to salt-induced osmotic stress, could contribute to VPA-induced DNA replication arrest⁶⁹. To our knowledge, such VPA-induced inhibition of DNA replication has not previously been reported. Further understanding the molecular mechanisms underlying this effect may prove useful toward studying the structure of stalled DNA replication forks in the absence of DNA-damaging drugs.

VPA is widely prescribed to treat several human neurological conditions^{2,3} and presents antiproliferative properties which may be therapeutically useful in the treatment of various cancers^{11,12}. In this regard, our work outlining heretofore unreported cellular effects

of VPA exposure in yeast highlights several novel research avenues toward understanding the molecular basis of the multiple applications of this drug.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research [MOP 123438], Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN 435636-2013), Cole Foundation, and Canadian Foundation for Innovation to H.W. H.W. is the recipient of a Fonds de la recherche du Québec-Santé Junior 1 scholarship. K.D.B. is the recipient of a PhD scholarship from the Cole Foundation and the Fondation de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. We thank Dr Dindial Ramotar (Université de Montréal, Canada), Dr Fransesc Posas (Universitat Pompeu Fabra), Dr Alain Verreault (Université de Montreal, Canada) for providing yeast strains, antibodies and plasmids. We also thank the Genomics platform of the Institute for research in immunology and cancer for their help in performing RNA profiling experiments, Edlie St-Hilaire for technical support, and Dr Elliot Drobetsky for critical reading of the manuscript.

2.7 AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

K.D.B. and I.H.M. planned and performed experiments, and participated in writing the manuscript. S.R. planned and performed luminescence-based intracellular calcium detection experiments, wrote parts of the manuscript pertaining to these experiments, and revised the manuscript. A.S. analysed RNA profiling data and revised the manuscript. H.W. supervised the experiments, and wrote/revised the manuscript.

2.8 ADDITIONAL INFORMATION

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

2.9 REFERENCES

1. Johnston, D. Valproic acid: update on its mechanisms of action. *Epilepsia* **25 Suppl 1**, S1–4 (1984).
2. Löscher, W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog. Neurobiol.* **58**, 31–59 (1999).
3. Chiu, C.-T., Wang, Z., Hunsberger, J. G. & Chuang, D.-M. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol. Rev.* **65**, 105–142 (2013).
4. Phiel, C. J. *et al.* Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J. Biol. Chem.* **276**, 36734–36741 (2001).
5. Göttlicher, M. *et al.* Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **20**, 6969–6978 (2001).
6. Shahbazian, M. D. & Grunstein, M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 75–100 (2007).
7. Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L. & Boeke, J. D. The Biochemistry of Sirtuins. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 435–465 (2006).
8. Seto, E. & Yoshida, M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018713 (2014).
9. Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T. & Oehme, I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* **277**, 8–21 (2009).
10. Oronsky, B. *et al.* Rewriting the epigenetic code for tumor resensitization: a review. *Transl. Oncol.* **7**, 626–631 (2014).
11. Li, Z. & Zhu, W.-G. Targeting histone deacetylases for cancer therapy: from molecular mechanisms to clinical implications. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 757–770 (2014).
12. Brodie, S. A. & Brandes, J. C. Could valproic acid be an effective anticancer agent? The evidence so far. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **14**, 1097–1100 (2014).
13. Bacon, C. L., Gallagher, H. C., Haughey, J. C. & Regan, C. M. Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase. *J. Neurochem.* **83**, 12–19 (2002).

14. Li, X.-N. *et al.* Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1912–1922 (2005).
15. Scherpereel, A. *et al.* Valproate-doxorubicin: promising therapy for progressing mesothelioma. A phase II study. *Eur. Respir. J.* **37**, 129–135 (2011).
16. Daud, A. I. *et al.* Potentiation of a topoisomerase I inhibitor, karenitecin, by the histone deacetylase inhibitor valproic acid in melanoma: translational and phase I/II clinical trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 2479–2487 (2009).
17. Coronel, J. *et al.* A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **28 Suppl 1**, S540–546 (2011).
18. Mitsui, K., Nakagawa, D., Nakamura, M., Okamoto, T. & Tsurugi, K. Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. *FEBS Lett.* **579**, 723–727 (2005).
19. Sun, Q., Bi, L., Su, X., Tsurugi, K. & Mitsui, K. Valproate induces apoptosis by inducing accumulation of neutral lipids which was prevented by disruption of the SIR2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **581**, 3991–3995 (2007).
20. Robert, T. *et al.* HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* **471**, 74–79 (2011).
21. Ma, Y. *et al.* Isolation of a fission yeast mutant that is sensitive to valproic acid and defective in the gene encoding Ric1, a putative component of Ypt/Rab-specific GEF for Ryh1 GTPase. *Mol. Genet. Genomics MGG* **284**, 161–171 (2010).
22. Zhang, L., Ma, N., Liu, Q. & Ma, Y. Genome-Wide Screening for Genes Associated with Valproic Acid Sensitivity in Fission Yeast. *PLoS ONE* **8**, (2013).
23. Miyatake, M. *et al.* Valproic acid affects membrane trafficking and cell-wall integrity in fission yeast. *Genetics* **175**, 1695–1705 (2007).
24. Ma, Y. *et al.* Transient Receptor Potential (TRP) and Cch1-Yam8 Channels Play Key Roles in the Regulation of Cytoplasmic Ca²⁺ in Fission Yeast. *PLoS ONE* **6**, (2011).
25. Hong, M.-P., Vu, K., Bautos, J. & Gelli, A. Cch1 Restores Intracellular Ca²⁺ in Fungal Cells during Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* **285**, 10951–10958 (2010).

26. Wurtele, H. *et al.* Histone h3 lysine 56 acetylation and the response to DNA replication fork damage. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 154–172 (2012).
27. Simoneau, A. *et al.* Interplay Between Histone H3 Lysine 56 Deacetylation and Chromatin Modifiers in Response to DNA Damage. *Genetics* (2015). doi:10.1534/genetics.115.175919
28. Bélanger, F. *et al.* Mutations in Replicative Stress Response Pathways Are Associated with S Phase-Specific Defects in Nucleotide Excision Repair. *J. Biol. Chem.* (2015). doi:10.1074/jbc.M115.685883
29. Haase, S. B. & Reed, S. I. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle Georget. Tex* **1**, 132–136 (2002).
30. Kushnirov, V. V. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast Chichester Engl.* **16**, 857– 860 (2000).
31. Tang, Y. *et al.* Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 738–745 (2008).
32. Gunjan, A. & Verreault, A. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell* **115**, 537–549 (2003).
33. Liberi, G. *et al.* Methods to study replication fork collapse in budding yeast. *Methods Enzymol.* **409**, 442–462 (2006).
34. Fischer, M. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett.* **419**, 259–262 (1997).
35. Batiza, A. F., Schulz, T. & Masson, P. H. Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J. Biol. Chem.* **271**, 23357–23362 (1996).
36. Roberts, S. K., McAinsh, M. & Widdicks, L. Cch1p mediates Ca²⁺ influx to protect *Saccharomyces cerevisiae* against eugenol toxicity. *PLoS One* **7**, e43989 (2012).
37. Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H. & Lockhart, D. J. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1359–1367 (1997).
38. Mori, T. *et al.* Dual Functions of Yeast tRNA Ligase in the Unfolded Protein Response: Unconventional Cytoplasmic Splicing of HAC1 Pre-mRNA Is Not Sufficient to Release Translational Attenuation. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3722–3734 (2010).
39. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA- seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
40. Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N. & Grunstein, M. Global histone acetylation and deacetylation

in yeast. *Nature* **408**, 495–498 (2000).

41. Rundlett, S. E. *et al.* HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14503–14508 (1996).
42. Bernstein, B. E., Tong, J. K. & Schreiber, S. L. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13708–13713 (2000).
43. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529 (2007).
44. Rubio, C. *et al.* Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *J. Cell Biol.* **193**, 171–184 (2011).
45. Leber, J. H., Bernales, S. & Walter, P. IRE1-independent gain control of the unfolded protein response. *PLoS Biol.* **2**, E235 (2004).
46. Gardarin, A. *et al.* Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. *Mol. Microbiol.* **76**, 1034–1048 (2010).
47. Schröder, M., Clark, R. & Kaufman, R. J. IRE1- and HAC1-independent transcriptional regulation in the unfolded protein response of yeast. *Mol. Microbiol.* **49**, 591–606 (2003).
48. Causton, H. C. *et al.* Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 323–337 (2001).
49. Bonilla, M., Nastase, K. K. & Cunningham, K. W. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* **21**, 2343–2353 (2002).
50. García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Bermejo, C., Nombela, C. & Arroyo, J. The High Osmotic Response and Cell Wall Integrity Pathways Cooperate to Regulate Transcriptional Responses to Zymolyase-induced Cell Wall Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 10901–10911 (2009).
51. Scrimale, T., Didone, L., de Mesy Bentley, K. L. & Krysan, D. J. The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **20**, 164–175 (2009).
52. Levin, D. E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 262–291 (2005).
53. Soriano-Carot, M., Bañó, M. C. & Igual, J. C. The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2

- is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div.* **7**, 1 (2012).
54. Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J. & Levin, D. E. Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol. Microbiol.* **46**, 781–789 (2002).
 55. Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J. & Ota, I. M. Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7651–7660 (1999).
 56. Martín, H., Rodríguez-Pachón, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. & Molina, M. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 1511–1519 (2000).
 57. Hahn, J.-S. & Thiele, D. J. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slr2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J. Biol. Chem.* **277**, 21278–21284 (2002).
 58. Chen, R. E. & Thorner, J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1773**, 1311–1340 (2007).
 59. Rine, J., Strathern, J. N., Hicks, J. B. & Herskowitz, I. A Suppressor of Mating-Type Locus Mutations in *Saccharomyces Cerevisiae*: Evidence for and Identification of Cryptic Mating-Type Loci. *Genetics* **93**, 877–901 (1979).
 60. Galitski, T., Saldanha, A. J., Styles, C. A., Lander, E. S. & Fink, G. R. Ploidy Regulation of Gene Expression. *Science* **285**, 251–254 (1999).
 61. Merlini, L., Dudin, O. & Martin, S. G. Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol.* **3**, 130008 (2013).
 62. Nagiec, M. J. & Dohlman, H. G. Checkpoints in a Yeast Differentiation Pathway Coordinate Signaling during Hyperosmotic Stress. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
 63. Hao, N., Zeng, Y., Elston, T. C. & Dohlman, H. G. Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *J. Biol. Chem.* **283**, 33798–33802 (2008).
 64. Bloom, J. & Cross, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 149–160 (2007).
 65. Barberis, M. Sic1 as a timer of Clb cyclin waves in the yeast cell cycle--design principle of not just an inhibitor. *FEBS J.* **279**, 3386–3410 (2012).

66. Gerald, J. N. F., Benjamin, J. M. & Kron, S. J. Robust G1 checkpoint arrest in budding yeast: dependence on DNA damage signaling and repair. *J. Cell Sci.* **115**, 1749–1757 (2002).
67. Javaheri, A. *et al.* Yeast G1 DNA damage checkpoint regulation by H2A phosphorylation is independent of chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13771–13776 (2006).
68. Sidorova, J. M. & Breeden, L. L. Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**, 3032–3045 (1997).
69. Duch, A. *et al.* Coordinated control of replication and transcription by a SAPK protects genomic integrity. *Nature* **493**, 116–119 (2013).
70. Yaakov, G. *et al.* The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmostress. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3572–3582 (2009).
71. Tercero, J. A. & Diffley, J. F. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**, 553–557 (2001).
72. Yarbrow, J. W. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin. Oncol.* **19**, 1–10 (1992).
73. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 789–802 (2006).
74. Krogh, B. O. & Symington, L. S. RECOMBINATION PROTEINS IN YEAST. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 233–271 (2004).
75. Budzowska, M. & Kanaar, R. Mechanisms of Dealing with DNA Damage-Induced Replication Problems. *Cell Biochem. Biophys.* **53**, 17–31 (2008).
76. Alabert, C., Bianco, J. N. & Pasero, P. Differential regulation of homologous recombination at DNA breaks and replication forks by the Mrc1 branch of the S-phase checkpoint. *EMBO J* **28**, 1131–1141 (2009).
77. Branzei, D. & Foiani, M. The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair* **8**, 1038–1046 (2009).
78. Pellicioli, A. *et al.* Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J.* **18**, 6561–6572 (1999).
79. Mutoh, N., Kitajima, S. & Ichihara, S. Apoptotic cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* induced by valproic acid and its extreme susceptibility to pH

- change. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1113–1118 (2011).
80. Matsumoto, T. K. *et al.* An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 33075–33080 (2002).
 81. Kaur, R., Castaño, I. & Cormack, B. P. Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1600–1613 (2004).
 82. Peiter, E., Fischer, M., Sidaway, K., Roberts, S. K. & Sanders, D. The *Saccharomyces cerevisiae* Ca²⁺ channel Cch1pMid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Lett.* **579**, 5697–5703 (2005).
 83. Gupta, S. S. *et al.* Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**, 28831–28839 (2003).
 84. Maresova, L., Muend, S., Zhang, Y.-Q., Sychrova, H. & Rao, R. Membrane Hyperpolarization Drives Cation Influx and Fungicidal Activity of Amiodarone. *J. Biol. Chem.* **284**, 2795–2802 (2009).
 85. Roberts, S. K., McAinsh, M., Cantopher, H. & Sandison, S. Calcium Dependence of Eugenol Tolerance and Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **9**, e102712 (2014).
 86. Jansen, M. S. *et al.* Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7199–7204 (2004).
 87. Witt, O., Mönkemeyer, S., Kanbach, K. & Pekrun, A. Induction of fetal hemoglobin synthesis by valproate: modulation of MAP kinase pathways. *Am. J. Hematol.* **71**, 45–46 (2002).

3. Discussion

3.1 Effet pH dépendent du VPA

Dans cet ouvrage, nous avons utilisé l'organisme modèle *S. cerevisiae* en vue de déterminer les mécanismes moléculaires à la base des effets antiprolifératif du VPA. Nous montrons d'abord un effet du VPA dont l'activité est dépendante d'un environnement dans lequel le pH est acide. Ces données corroborent celles obtenues précédemment chez *S. pombe*.³³³ L'activité dépendante du pH peut expliquer pourquoi plusieurs des effets que nous avons observés dans cette étude n'avaient jamais été découverts. Effectivement, les données obtenues sur les effets du VPA présentes dans la littérature ont été généralement réalisées dans un milieu nutritif de type YPD possédant un pH plus neutre.^{140,180} L'utilisation d'un milieu acide nous a donc permis de découvrir de nouveaux effets du composé. Notre étude a d'ailleurs mis à jour un total de 597 gènes régulés par le VPA lorsque comparés à une souche non traitée en milieu acide. Il faut savoir toutefois que le contrôle et les échantillons en présence du VPA ont été traités dans le milieu synthétique possédant un pH acide. Il aurait été intéressant de pouvoir comparer les profils transcriptionnels entre les milieux SC à pH 4 et à pH 7, avec et sans VPA. Cela nous aurait permis de découvrir possiblement de nouveaux gènes affectés par le VPA dans le milieu acide exclusivement. Malgré le fait que l'effet du VPA est dépendant du pH et affecte particulièrement la prolifération dans un tel milieu, il n'est pas à exclure la possibilité qu'il inhibe ou active la transcription de gènes non reliés à la progression dans le cycle cellulaire, et ce, dans tout type de milieu. Avec une analyse des transcrits dans un milieu à pH plus neutre, nous aurions pu retirer de notre étude les gènes modulés par le VPA de façon pH indépendante.

Une explication fort plausible de l'effet pH dépendent du VPA réside dans le fait que le pK_a de la molécule se situe à 4,80.^{334,335} Pour un acide tel que l'acide valproïque, cela signifie que plus le pH environnemental est acide, plus la molécule se retrouve en plus grande proportion sous une forme non ionisée (non chargée). Par conséquent, la molécule peut

diffuser plus librement à travers la membrane cellulaire. Il s'agit d'un principe connu dans le domaine médical. L'acide acétylsalicylique est reconnu pour être absorbé au niveau de l'estomac dû au bas pH dans cet organe.³³⁶ Suivant ce principe, le VPA se retrouverait alors en plus grande quantité dans la cellule si celle-ci se retrouve dans un pH acide, ce qui expliquerait la plus grande efficacité du composé. Bien que nous n'ayons pu prouver qu'il y ait une plus grande concentration de VPA dans les cellules à bas pH, nous avons démontré la corrélation entre l'acidité et l'efficacité du VPA, et ce, dans deux milieux de culture différents (Appendice 1). Une manière simple de vérifier l'hypothèse serait de quantifier la molécule par spectrométrie de masse dans un milieu à différents pH.

Ce test n'exclurait pas toutefois la possibilité que le VPA entre dans la cellule par un mécanisme différent du transport passif. En général, les acides gras peuvent passer de l'environnement extracellulaire à celui intracellulaire directement à travers la membrane (transport passif) ou à l'aide de protéines capables de lier ces molécules (transport actif).^{337,338} Le VPA étant une chaîne d'acide gras, son entrée dans la cellule pourrait s'effectuer à l'aide de ces mêmes protéines. Il serait donc intéressant d'évaluer la sensibilité de mutants de transporteurs d'acide gras en présence de VPA. Dans le cas où la molécule entre dans la cellule par ce type de transport, la délétion du transporteur devrait donc inhiber l'effet du VPA. Jusqu'à présent, dans la littérature, aucune protéine d'import ne semble être activée préférentiellement à bas pH extracellulaire. Toutefois, l'expression de certains transporteurs présents à l'intérieur des cellules semble dépendre du pH. C'est le cas pour Pdr12, une protéine de la famille des transporteurs ABC chargés d'exporter les drogues hors de la cellule, qui se trouve être constitutivement exprimé dans des cultures cellulaires à pH acide.³³⁹⁻³⁴¹ Il serait donc intéressant d'effectuer les tests des mutants de transporteurs dans des milieux à différents pH. Cela permettrait peut-être de découvrir de nouvelles propriétés dépendantes du pH à ces protéines.

Il n'est pas non plus à exclure que le VPA puisse influencer préférentiellement des voies de signalisation ou protéines qui sont plus actives en pH acide. C'est le cas notamment d'un facteur de transcription et d'un transporteur de potassium, Zms1 et Trk2 respectivement, dont l'expression est activée à pH acide et réprimée à pH basique.³⁴² Toutefois, les voies de

signalisation affectées par le VPA dans notre étude sont des cascades activées indépendamment du pH environnant. Par conséquent, soit le VPA affecte des voies indépendamment de celles activées dans un pH alcalin, soit ces dernières sont reliées d'une quelconque manière aux cascades régissant différents stress cellulaires. Un approfondissement de l'effet du VPA sur les voies de signalisation préférentiellement actives en pH acide sera nécessaire pour répondre à cette question.

3.2 La prolifération cellulaire

Puisqu'il a été démontré que le VPA induisait l'apoptose, il serait logique de penser que l'explication de l'effet antiprolifératif observé lors d'une exposition transitoire à la molécule résiderait dans cette théorie. Des études ont clairement montré l'implication des gènes YCA1 et SIR2 dans l'induction de l'apoptose en présence du VPA. La délétion de ces deux gènes empêcherait donc l'apoptose de survenir en réponse à cette molécule.^{175,176} Nous avons testé la sensibilité de ces mutants au VPA par croissance cellulaire en plaque. Aucun des deux mutants n'altère la sensibilité observée en présence de VPA (Appendice 2). Cela suggère donc que le VPA n'exerce pas son inhibition sur la prolifération cellulaire en modulant les voies dépendantes de l'apoptose. Il serait néanmoins intéressant d'évaluer l'effet du VPA sur divers marqueurs d'apoptose en milieu acide. Il existe plusieurs autres protéines impliquées dans la mort cellulaire. Bxi1 a la capacité d'induire l'apoptose suite à un stress activant la réponse à un mauvais repliement des protéines, mécanismes qui semblent être affectés par le VPA (Article Figure 3A). Kex1 a été observé comme primordiale lors d'un stress induit par l'acide hypochlorique.³⁴³ Dans le cas d'une exposition à l'éthanol, ce serait plutôt Fis1 qui contrôlerait la mort cellulaire.³⁴⁴ Il serait toutefois important d'inclure un contrôle des levures exposées au VPA dans du SC à pH neutre lors des tests en plaque à titre de comparaison s'il survenait une diminution de la sensibilité.

3.3 Les désacétylases d'histones

Dans la littérature, il avait été démontré que le VPA agissait sur certaines KDAC, notamment Rpd3 et Hda1.¹⁸⁰ Contrairement à ce qui était attendu, le VPA ne semble pas causer de changement dans l'intensité de l'acétylation de plusieurs lysines au niveau des histones (Article Figure 2a), lysines dont l'acétylation est partiellement sous le contrôle de Rpd3 et de Hda1 tel que mentionné dans la section des KDAC de classe I et II des lysines désacétylase.^{78-80,83} Ce ne sont toutefois pas les seules lysines dont l'acétylation dépend de ces deux KDAC. Il a été démontré qu'ils avaient la capacité d'affecter également la lysine 8 sur l'histone H4 et la lysine 14 sur l'histone H3.⁷⁹ Rpd3 peut également déacétyler les lysines 23 et 27 sur l'histone H3, la lysine 7 sur l'histone H2A et les lysines 11 et 16 sur les histones H2B.⁸⁰ Afin de mieux caractériser l'effet du VPA sur les lysines affectées par Rpd3 et Hda1, nous aurions pu également vérifier ces autres modifications aux histones, bien que celles observées dans cette étude semblent être les plus souvent citées dans la littérature. Il aurait également été intéressant d'étudier l'effet de la délétion de différentes KDAC sur la sensibilité des cellules au VPA. Dans le cas où l'effet du VPA est causé par un effet inhibiteur sur les KDAC, la délétion de ses cibles devrait occasionner une absence de viabilité équivalente à celle observée en présence de la molécule. Pour étudier cette théorie, il faudrait générer des mutants de KDAC simples et en combinaison les unes avec les autres, et d'effectuer un test de croissance cellulaire en absence de VPA. Par ailleurs, certaines désacétylases jouent des rôles différents que ceux décrits au niveau des histones. Par exemple, Hos2, une désacétylase de classe I, est impliquée dans la réponse aux stress sécrétoires et est requise pour activer la kinase Slt2 de la cascade de l'intégrité à la paroi cellulaire, une voie de signalisation affectée par le VPA (Article Figure 4).¹⁰³ Des études futures devraient donc viser à investiguer plus en profondeur l'effet du VPA sur les différentes KDAC.

Il serait également intéressant de tester l'effet du VPA sur les différentes KAT. Si l'effet antiprolifératif du VPA est causé par son rôle d'inhibiteur de désacétylase, la suppression de KAT contrerait la sensibilité observée. Cela part du principe que l'inhibition de KDAC par la molécule résulterait en une augmentation de l'acétylation par les KAT. En supprimant les KAT responsables, on devrait observer une perte de la sensibilité des cellules

en présence de VPA. Pour étudier cette théorie, il faudrait procéder de la même manière que pour les KDAC, à savoir générer différents mutants de KAT seules ou en combinaison, et effectuer un test de croissance. Toutefois, il est important ici de mettre les cellules en présence de VPA pour déterminer s'il y a une perte de sensibilité entre les mutants et une souche sauvage exposée à la drogue.

3.4 La voie d'un mauvais repliement des protéines («Unfolded Protein Response»)

Parmi les gènes régulés par le VPA, nous avons découvert que le composé affectait d'importantes voies cellulaires. Parmi celles-ci, on retrouve la voie de réponse à un mauvais repliement des protéines (« unfolded protein response »; UPR). Nous avons donc investigué l'activation de cette voie par le VPA et tenté de déterminer si la voie UPR pouvait être liée à la prolifération cellulaire chez *S. cerevisiae*. Des études ont en effet montré qu'un stress UPR régulait négativement des cyclines de phase G1 chez les mammifères.³⁴⁵ Chez la levure, la cascade de signalisation implique d'abord la phosphorylation et l'activation de la protéine kinase Ire1 possédant une activité endonucléase.³⁴⁶ Cette dernière a pour rôle d'épisser l'ARN messenger de Hac1 en cas de stress UPR, qui devient alors plus stable et peut ainsi éventuellement jouer son rôle de facteur de transcription.³⁴⁷ Il semblerait également que cette voie soit étroitement liée à un influx de calcium dans le cytoplasme.³⁴⁸ Nos recherches ont démontré que le VPA entraîne l'épissage de la protéine Hac1 (Article Figure 3b-c), en plus de provoquer une augmentation du calcium intracellulaire (Article Figure 3e-g). Toutefois, la délétion des gènes directement impliqués dans la voie UPR, tels IRE1 et HAC1, dans l'import du calcium, comme CCH1 et MID1, ou encore ceux codant pour les calcineurines et les calmodulines, soient CNA1, CNB1 et CMP2, n'affecte en aucun cas la sensibilité des cellules au VPA (Article Figure 3). Ces résultats laissent donc penser que l'effet du VPA sur la prolifération cellulaire n'est pas dépendant des voies UPR et calcique. Il y a la possibilité, telle que mentionnée précédemment, que les gènes UPR affectés par le VPA découverts dans le séquençage soient causés par l'effet général de la molécule indépendamment du pH (voir

section Effet pH dépendent du VPA présenté précédemment). Il aurait donc été d'autant plus intéressant d'avoir un traitement à pH neutre comme contrôle dans nos expériences.

3.5 Les MAPK

Une observation intéressante de notre étude est l'influence que possède le VPA sur les MAPK. Nous avons démontré que le VPA empêche la phosphorylation et l'activité de Slt2, la kinase au cœur de la voie de l'intégrité de la paroi cellulaire, et ce, indépendamment de la présence d'agents activateurs de cette cascade (Article Figure 4). Il s'agit d'un fait intrigant puisque cette cascade est connue pour répondre positivement à plusieurs drogues telles le HU, le MMS, la zymolyase et la micafungine.^{296,349,350} Concordant avec l'inhibition de l'activité de Slt2, le VPA entraîne une diminution dans l'expression des cibles de Rlm1, le facteur de transcription de cette voie. Comme mentionné précédemment, la cascade compte plusieurs inhibiteurs ciblant spécifiquement Slt2. Toutefois, aucun d'entre eux ne semble être la cause de l'inactivation de la kinase par le VPA. Nous avons également investigué l'effet du VPA sur la protéine Ptc6. Il a été découvert récemment que cette protéine avait pour rôle d'inhiber Mkk1/2, soit les kinases en amont de Slt2.³⁵¹ On observe toutefois la même absence d'activité de Slt2 dans le mutant *ptc6Δ* en présence de VPA que dans les autres mutants de phosphatases (Appendice 3). Cependant, puisqu'il y a redondance entre l'action des protéines inhibitrices sur la kinase, il aurait été intéressant d'étudier l'effet du VPA sur Slt2 et les cibles de Rlm1 dans des mutants présentant une combinaison de délétion pour Sdp1, Msg5, Ptp2 et Ptp3 en comparant l'intensité des bandes obtenues lors d'un immunobuvardage de type Western. Puisqu'aucune évidence dans la littérature ne suggère que la voie de l'intégrité à la paroi cellulaire interfère avec la progression dans le cycle cellulaire, l'effet du VPA sur Slt2 ne peut expliquer à elle seule l'effet antiprolifératif. Cela sous-entend que le VPA active une autre voie qui engendrerait l'arrêt dans le cycle. Un fait intéressant au sujet de l'inhibition de l'activité de Slt2 par le VPA est la synergie observée en présence de micafungine (Figure 4). La hausse de sensibilité en présence des deux drogues peut être expliquée par le fait que le VPA, en inhibant la phosphorylation de Slt2, rend la cellule plus sensible aux agents induisant

un stress à la paroi cellulaire. Ce résultat rend le VPA intéressant d'un point de vue pharmaceutique (voir la section Conclusion).

Suite à l'effet inattendu du VPA sur Slt2, nous avons investigué l'effet du composé sur la protéine Hog1. Des études ont montré que la voie de l'intégrité membranaire et celle induite lors d'un stress osmotique pouvaient collaborer afin de coordonner la réponse à plusieurs stress.³⁵² Contrairement à ce qui a été obtenu avec Slt2, le VPA semble augmenter légèrement l'activation de la protéine Hog1 (Article Figure 5a), suggérant ainsi que le VPA entraîne l'activation de la voie de la réponse au stress osmotique indépendamment de celle de l'intégrité de la paroi cellulaire. Afin de déterminer les conséquences de cette augmentation de l'activité de Hog1, nous nous sommes intéressés à la protéine Mrc1. Récemment, il a été découvert que cette dernière avait la capacité de causer un arrêt dans la réplication de l'ADN lorsque phosphorylée par Hog1, et ce, en inhibant la progression des fourches de réplication.³²⁷ Cet arrêt survenant suite à un stress est indépendant du point de contrôle des dommages à l'ADN dont les kinases Mec1 et Rad53 font parties. Nous avons donc étudié l'effet du VPA sur des souches mutantes comprenant une protéine Mrc1 non phosphorylable par Hog1, souches offertes par le Dr Frances Posas.³²⁷ Toutefois, le VPA joue toujours aussi efficacement son rôle d'inhibiteur de la prolifération cellulaire dans de tels mutants, nous indiquant par le fait même que l'effet antiprolifératif du VPA ne dépend pas de l'inactivation des fourches de réplication par la phosphorylation Hog1-dépendante de Mrc1 (Appendice 4). De plus, l'effet du VPA sur Hog1 n'est pas suffisant pour expliquer le rôle antiprolifératif du composé puisqu'un mutant *hog1Δ* montre la même sensibilité au médicament qu'une souche sauvage (Figure 5g). Il n'est pas impossible que l'effet antiprolifératif du VPA soit une combinaison du dysfonctionnement de la voie Slt2 et de l'activation de celle de Hog1, bien que nous ne puissions en être certains. Puisqu'un mutant *hog1Δslt2Δ* est viable, il serait intéressant d'approfondir cette théorie en vérifiant la sensibilité au VPA dans ce double mutant.³¹⁴ Toutefois, la viabilité du double mutant laisse penser que le VPA atteint une autre cible que Slt2 et Hog1. En effet, puisque le VPA inhibe la prolifération cellulaire, on s'attend à ce que la délétion de ses cibles résulte en une souche non viable.

Le VPA affecte également deux autres MAPK, soient Fus3 et Kss1 (Article Figure 5). Ces protéines sont les dernières kinases de la cascade de la voie des phéromones. Elles ont pour rôles d'activer des facteurs de transcription, Dig1/2, et d'arrêter la progression dans le cycle cellulaire en phase G1 par l'activation de l'inhibiteur Far1.²⁸⁹⁻²⁹² Afin de déterminer si le VPA agit directement sur ces kinases ou sur une protéine en amont de la cascade, nous avons déterminé l'effet de l'inhibiteur sur la protéine d'échafaudage Ste5 et sur le régulateur de la prolifération Far1. Le VPA semble interférer avec le niveau de ces protéines habituellement présentes durant la phase G1 (Article Figure 5). Le composé agirait par conséquent en amont de Fus3 et Kss1 de manière à inhiber l'entièreté de la cascade durant une stimulation au facteur alpha. L'inhibition de cette voie de signalisation peut d'ailleurs être observée par l'absence de formation de shmoo dans le milieu acide en présence de VPA. Il serait intéressant d'investiguer plus en profondeur les mécanismes sous-jacents à l'inhibition de la voie des phéromones par le VPA. Ce dernier étant une petite molécule, bien que différente de l'hormone, il n'est pas impossible qu'elle agisse comme un inhibiteur non compétitif au niveau du récepteur. Le composé pourrait également interférer sur les autres protéines en amont de Kss1 et Fus3. Une possibilité serait l'impact du VPA sur les MPTs des protéines de la cascade. Une identification des MPTs par spectrométrie de masse des protéines de la voie des phéromones, avec et sans VPA, pourrait identifier tout changement dans l'acétylation des protéines. Cela donnerait également de l'information sur les autres marques possibles telles que la phosphorylation ou l'ubiquitination. De cette manière, nous pourrions savoir si le VPA agit sur des complexes qui ne font pas partie du corps de la cascade, mais qui pourrait provoquer l'ajout de groupements spécifiques de manière à inhiber l'action des protéines de la voie des phéromones.

L'effet du VPA sur la voie des phéromones ne peut expliquer la sensibilité observée de manière générale en présence du composé. En général, cette voie de signalisation ne s'active que lors d'une stimulation par phéromones et ne survient pas dans un cycle normal de division cellulaire. Par conséquent, des mutants de cette cascade ne devraient pas causer d'augmentation de la sensibilité en présence de VPA. Afin de confirmer ce point, il serait important d'effectuer des tests de sensibilité de différents mutants de la cascade en présence et en absence de VPA. En théorie, puisque nous avons démontré que le VPA inhibe la cascade et

que les mutants de cette voie sont viables, la délétion des gènes codant pour les protéines impliquées dans celle-ci ne devrait pas avoir d'impact sur les résultats obtenus. Toutefois, on ne peut exclure la possibilité que certaines protéines de la cascade interfèrent de manière encore inconnue avec d'autres voies de signalisation qui, elles, auraient un impact sur la viabilité des cellules en présence du composé. Il serait intéressant notamment d'évaluer l'effet du VPA et de la délétion de certains gènes de la voie des phéromones dans le milieu YPD en présence de VPA. Puisque les gènes de la cascade sont légèrement régulés à la baisse en présence de VPA dans un milieu SC, le fait de simuler l'inhibition de l'expression de ces mêmes gènes dans le milieu YPD pourrait peut-être amener un phénotype de sensibilité en présence de VPA allant dans le même sens que celui observé dans un milieu à pH acide.

3.6 Le cycle cellulaire

3.6.1 La transition G1/S

Dans des cellules de gliome, le VPA cause une expression aberrante de l'une des cyclines de phase G1, entraînant ainsi un arrêt dans la prolifération cellulaire.³³¹ Chez *S. cerevisiae*, nous avons également observé un effet du VPA sur les cyclines de phase G1, particulièrement sur Cln1 et Cln2 (Article Figure 6). On observe en effet une absence de ces deux cyclines en présence du composé. Ce faisant, puisque Cln1/2 ne peuvent jouer leur rôle, Sic1 ne peut être dégradé, ce qui est observable par immunobuvardage de type Western. Les cyclines de phase S, Clb5/6, ne peuvent alors être libérées de l'inhibiteur Sic1, provoquant ainsi un arrêt en phase G1. Nous n'avons toutefois pas investigué les mécanismes sous-jacents à cet effet. L'analyse du séquençage suggère que le VPA interfère au niveau transcriptionnel de manière à empêcher la synthèse des deux protéines. Il serait donc intéressant de déterminer l'effet du VPA sur le complexe transcriptionnel SBF qui est en charge de réguler la transcription des cyclines Cln1/2.^{200,201} De la même manière que pour la voie des phéromones, une analyse au spectromètre de masse nous permettrait de déterminer si le VPA entraîne une différence dans les MPTs de ce complexe.

3.6.2 La réplication de l'ADN

Nos recherches nous ont permis de découvrir un effet du VPA qui n'avait pas encore été répertorié, soit l'arrêt de la progression des fourches de réplication (Article Figure 7). L'arrêt observé lors d'une exposition transitoire au VPA ne semble pas affecter la structure des fourches de réplication selon nos résultats de gel d'électrophorèse en deux dimensions. Beaucoup d'agents génotoxiques, tels que le HU, causent le même type d'arrêt dans la réplication. Cependant, ces derniers activent généralement le point de contrôle survenant suite à des dommages à l'ADN. Dans le cas du VPA, on note une absence totale de la persistance dans l'activation de la kinase Rad53 après traitement au HU. De plus, les mutants *mec1Δ* et *rad53Δ* ne sont pas significativement plus sensibles au VPA qu'une souche sauvage. Tous ces résultats nous amènent à penser que le VPA ne compromet pas les fourches de réplication, mais ne fait que les bloquer temporairement. À notre connaissance, aucun autre agent bloquant la réplication ne montre les mêmes effets concernant l'activation de la cascade du point de contrôle. Jusqu'à maintenant, nous n'avons pu déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans le blocage de la réplication, bien que nos résultats nous permettent d'exclure plusieurs scénarios (voir ci-dessous).

Le résultat des gels en deux dimensions nous indique que le VPA ne semble pas altérer les bulles de réplication. Toutefois, cela n'indique pas si tous les composants des fourches sont présents. Une immunoprécipitation des protéines se situant à la fourche de réplication en présence et en absence de VPA nous permettrait de nous assurer que toutes les protéines nécessaires à la réplication de l'ADN sont présentes. L'idée que le VPA interfère avec le recrutement des protéines du réplisome n'est toutefois valable que dans le scénario où le VPA empêche le départ des fourches de réplifications, tardives et non tardives. Cela n'explique en rien l'arrêt des fourches de réplication déjà actives. Ce dernier point pourrait potentiellement être expliqué par une modification des MPTs des protéines du réplisome causé par le VPA. Une analyse au spectromètre de masse pourrait répondre à cette hypothèse. Il n'est pas impossible qu'un mécanisme d'acétylation du réplisome encore inconnu régule sa progression.

Suite aux résultats obtenus avec les cyclines de phase G1, il serait intéressant de déterminer l'effet du VPA sur les cyclines de phase S, plus particulièrement sur Clb5. Comme mentionné dans la section sur les cyclines en introduction, Clb5 est capable d'inhiber le départ des fourches de réplication tardives. Le VPA, en agissant sur Clb5, pourrait donc causer un ralentissement assez conséquent de la réplication dû à l'inhibition de ces fourches. Il suffirait, pour vérifier cette théorie, d'analyser le signal de Clb5 par immunobuvardage en présence ou en absence de VPA après l'avoir couplé à un peptide détectable par anticorps. Toutefois, dans le cas d'un tel scénario, la réplication se trouverait uniquement ralentie. En effet, les origines de réplication de départ seraient capables de compléter la réplication, bien que plus lentement qu'avec le soutien des origines tardives. Puisque le VPA inhibe complètement la progression en phase S, cette théorie ne pourrait expliquer à elle seule l'effet antiprolifératif du VPA. Toutefois, il n'est pas exclu qu'un tel effet puisse contribuer à l'inhibition de la réplication s'il est couplé avec d'autres mécanismes affectés. Dans le cas d'un effet sur Clb5, il serait évidemment intéressant de déterminer si le VPA affecte également cette protéine au début de la phase S. Les tests effectués durant la réplication ont été réalisés en ajoutant le VPA après la relâche en phase S. Nous ne savons donc pas si le VPA empêche le départ des fourches entre l'étape nécessitant Sic1 (voir section La transition G1/S de la discussion) et le moment où les premières fourches sont déjà en marches.

3.7 La biosynthèse de l'inositol

L'inositol est une molécule organique cyclique présente dans la nature. Dans les cellules eucaryotes, elle joue un rôle de messenger secondaire, notamment sous forme d'inositol phosphate, de phosphatidylinositol (PI) et de phosphatidylinositol phosphate (PIP). Sous forme PI, il entre dans la composition de la membrane cellulaire. Après stimulation, le PI est clivé en diacylglycerol (DAG) et en inositol triphosphate (IP₃) qui jouent chacun des rôles de messenger dans la cellule. Il a d'ailleurs été démontré que ces molécules influencent la prolifération cellulaire.³⁵³ Une étude démontre que l'inositol est impliqué dans la progression en phase S suite à un arrêt induit par l'activation de la voie des phéromones.³⁵⁴ Le valproate,

un sel de l'acide valproïque, semble entraîner la diminution de la concentration de *myo*-inositol et la synthèse de l'inositol 1-phosphate. Ce faisant, il entraîne l'augmentation de l'expression de INO1 et INO2, deux gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse de l'inositol triphosphate.^{355,356} La capacité du VPA à altérer la voie de formation de l'inositol pourrait expliquer l'effet antiprolifératif de l'inhibiteur observé dans notre étude. Nous avons donc approfondi la question en effectuant un test de croissance en présence de VPA, avec ou sans inositol (Appendice 5). Toutefois, il n'y a aucun changement dans la sensibilité d'une souche sauvage en présence de VPA lorsque l'on compare un milieu sans et avec inositol. Il semble donc que l'effet antiprolifératif observé ne soit pas causé par la déplétion d'inositol. Toutefois, comme mentionné à plusieurs reprises, il n'est pas impossible qu'une combinaison d'événements, impliquant un effet au niveau de l'inositol, explique l'inhibition de la progression dans le cycle cellulaire en présence de VPA. Il serait donc intéressant d'approfondir la question de l'inositol, notamment en analysant la sensibilité de mutants de gènes impliqués dans cette voie. Entre autres, la délétion des gènes PRS1 et PRS3, protéines impliquées dans le métabolisme des phospholipides, ont déjà montré une sensibilité au VPA.³⁵⁷ Un test par cytométrie en flux nous permettrait de déterminer si ces mutants présentent toujours un arrêt dans la prolifération cellulaire en présence de VPA.

4. Conclusion

Les infections fongiques touchent 70 à 75 % des femmes et le taux de récurrence est évalué à 40-50 %. L'infection vulvo-vaginale par la levure de type *Candida* est l'infection vaginale la plus fréquente et coûte plus de 1 million de dollars par an aux États-Unis.³⁵⁸ La plupart de ces infections peuvent être traitées oralement ou localement sur une courte durée avec des composés azoles (fluconazole, butoconazole, miconazole, etc).³⁵⁹⁻³⁶¹ Ces derniers ont généralement une efficacité entre 80 et 90% après 2 à 3 jours de traitement. Lors d'infections avec complications, un traitement prolongé peut être nécessaire. Une étude démontre l'efficacité du fluconazole contre ce type d'infections lorsque l'agent antifongique est administré de manière répétée sur plusieurs mois.^{361,362} Toutefois, des études effectuées dans les dernières années laissent à penser que les levures développent une certaine résistance aux traitements standards, notamment aux traitements utilisant les composés azoles.^{363,364} Parmi les causes de cette résistance, on note l'apparition de mutations sélectives pouvant être associées à la résistance acquise et à l'adaptation de l'hôte.³⁶⁴ D'autres études ont montré que les souches résistantes aux traitements expriment majoritairement en plus grande quantité des protéines de transports de type ABC, soit la plus grande famille de protéines impliquées dans l'export des drogues.^{365,366} D'autres protéines de transports de la famille MFS-T semblent également être plus exprimées dans les mêmes souches.³⁶⁷ Bien qu'il s'agisse de grandes découvertes dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'effet de résistances des levures face aux agents antifongiques, la découverte de nouveaux traitements est nécessaire pour palier au problème.

Notre étude met en lumière des effets nouveaux du VPA au niveau de la progression dans le cycle cellulaire. Le VPA interfère de manière réversible avec la prolifération, sans toutefois sembler induire de stress génotoxique. L'un des aspects les plus intéressants qui ressortent de notre étude se trouve être son action en pH acide à faible concentration. Dans un tel milieu, on observe une synergie entre le VPA et la micafungine, un médicament administré pour le traitement d'infections par des levures chez l'humain.³⁶⁸ La synergie observée lorsque

ces deux composés sont combinés laisse penser que le VPA pourrait être utilisé dans le traitement de ce type d'infections. Plus particulièrement, ce composé pourrait être utilisé au niveau des muqueuses vaginales de la femme dont le pH est près du pK_a du composé, soit autour de 4-4,5.^{358,369,370} Le VPA étant plus efficace à bas pH, il pourrait potentiellement servir à traiter les infections vulvo-vaginales. Aucune étude ne fait mention de protéines capables de transporter le VPA hors de la cellule. De ce fait, les mécanismes de résistances des levures face aux traitements azolés pourraient ne pas affecter l'efficacité du VPA. Des études plus approfondies sur les transporteurs sont requises, notamment afin de vérifier que l'activité d'aucun d'entre eux n'est activée contre le VPA à bas pH. Nos résultats nous amènent donc à penser que le composé pourrait être utilisé seul ou en combinaison avec des agents antifongiques pour traiter les infections à levures chez la femme. De plus, le fait que le VPA soit déjà utilisé dans le traitement de troubles neurologiques pourrait être un atout pour une future mise en marché du VPA comme traitement antifongique.

5. Bibliographie

1. Kornberg, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868–871 (1974).
2. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
3. Schultz, M. C., Hockman, D. J., Harkness, T. A., Garinther, W. I. & Altheim, B. A. Chromatin assembly in a yeast whole-cell extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9034–9039 (1997).
4. Goytisolo, F. A. *et al.* Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5. *EMBO J.* **15**, 3421–3429 (1996).
5. Bustin, M., Catez, F. & Lim, J.-H. The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol. Cell* **17**, 617–620 (2005).
6. Thomas, J. O. Histone H1: location and role. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 312–317 (1999).
7. White, A. E., Hieb, A. R. & Luger, K. A quantitative investigation of linker histone interactions with nucleosomes and chromatin. *Sci. Rep.* **6**, 19122 (2016).
8. Ushinsky, S. C. *et al.* Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* **13**, 151–161 (1997).
9. Patterton, H. G., Landel, C. C., Landsman, D., Peterson, C. L. & Simpson, R. T. The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 7268–7276 (1998).
10. Smith, B. C. & Denu, J. M. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 45–57 (2009).

11. Ubersax, J. A. & Ferrell, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 530–541 (2007).
12. Pickart, C. M. & Eddins, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**, 55–72 (2004).
13. Choe, J., Kolodrubetz, D. & Grunstein, M. The two yeast histone H2A genes encode similar protein subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 1484–1487 (1982).
14. Wallis, J. W., Hereford, L. & Grunstein, M. Histone H2B genes of yeast encode two different proteins. *Cell* **22**, 799–805 (1980).
15. HHT2 | SGD. Available at: <http://www.yeastgenome.org/locus/S000004976/overview>. (Accessed: 14th April 2016)
16. HHT1 | SGD. Available at: <http://www.yeastgenome.org/locus/S000000214/overview>. (Accessed: 14th April 2016)
17. HHF1 | SGD. Available at: <http://www.yeastgenome.org/locus/S000000213/overview>. (Accessed: 14th April 2016)
18. HHF2 | SGD. Available at: <http://www.yeastgenome.org/locus/S000004975/overview#literature>. (Accessed: 14th April 2016)
19. Krebs, J. E. Moving marks: dynamic histone modifications in yeast. *Mol. Biosyst.* **3**, 590–597 (2007).
20. Fuchs, S. M., Larabee, R. N. & Strahl, B. D. Protein modifications in transcription elongation. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 26–36 (2009).
21. Xu, F., Zhang, K. & Grunstein, M. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* **121**, 375–385 (2005).

22. Ye, J. *et al.* Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly. *Mol. Cell* **18**, 123–130 (2005).
23. Tanner, K. G., Langer, M. R., Kim, Y. & Denu, J. M. Kinetic mechanism of the histone acetyltransferase GCN5 from yeast. *J. Biol. Chem.* **275**, 22048–22055 (2000).
24. Berndsen, C. E., Albaugh, B. N., Tan, S. & Denu, J. M. Catalytic mechanism of a MYST family histone acetyltransferase. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 623–629 (2007).
25. Simon, M. *et al.* Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12711–12716 (2011).
26. Shogren-Knaak, M. *et al.* Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844–847 (2006).
27. Allahverdi, A. *et al.* The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1680–1691 (2011).
28. Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P. & Bradbury, E. M. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 ‘tail’ to DNA. *J. Biol. Chem.* **268**, 305–314 (1993).
29. Clapier, C. R. & Cairns, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273–304 (2009).
30. Zunder, R. M., Antczak, A. J., Berger, J. M. & Rine, J. Two surfaces on the histone chaperone Rtt106 mediate histone binding, replication, and silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E144–153 (2012).
31. Su, D. *et al.* Structural basis for recognition of H3K56-acetylated histone H3-H4 by the chaperone Rtt106. *Nature* **483**, 104–107 (2012).

32. Workman, J. L. Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev.* **20**, 2009–2017 (2006).
33. Shivaswamy, S. *et al.* Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol.* **6**, e65 (2008).
34. Zawadzki, K. A., Morozov, A. V. & Broach, J. R. Chromatin-dependent transcription factor accessibility rather than nucleosome remodeling predominates during global transcriptional restructuring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3503–3513 (2009).
35. Weiner, A., Hughes, A., Yassour, M., Rando, O. J. & Friedman, N. High-resolution nucleosome mapping reveals transcription-dependent promoter packaging. *Genome Res.* **20**, 90–100 (2010).
36. Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X. & Seto, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**, 15–23 (2005).
37. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120 (2001).
38. Kelly, T. J., Qin, S., Gottschling, D. E. & Parthun, M. R. Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7051–7058 (2000).
39. Ruiz-García, A. B. *et al.* HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4. *J. Biol. Chem.* **273**, 12599–12605 (1998).
40. Choudhary, C. *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**, 834–840 (2009).

41. Henriksen, P. *et al.* Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, 1510–1522 (2012).
42. Brownell, J. E. *et al.* Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843–851 (1996).
43. Lee, K. K. & Workman, J. L. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 284–295 (2007).
44. Kimura, A., Matsubara, K. & Horikoshi, M. A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J. Biochem. (Tokyo)* **138**, 647–662 (2005).
45. Tang, Y. *et al.* Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 738–745 (2008).
46. Bazan, J. F. An old HAT in human p300/CBP and yeast Rtt109. *Cell Cycle Georget. Tex* **7**, 1884–1886 (2008).
47. Yang, X.-J. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res.* **32**, 959–976 (2004).
48. Pray-Grant, M. G., Daniel, J. A., Schieltz, D., Yates, J. R. & Grant, P. A. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**, 434–438 (2005).
49. Pascual-García, P. *et al.* Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes Dev.* **22**, 2811–2822 (2008).

50. Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Yates, J. R. & Workman, J. L. The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol. Cell* **2**, 863–867 (1998).
51. Henry, K. W. *et al.* Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* **17**, 2648–2663 (2003).
52. Powell, D. W. *et al.* Cluster analysis of mass spectrometry data reveals a novel component of SAGA. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7249–7259 (2004).
53. Sanders, S. L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A. J. & Weil, P. A. Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4723–4738 (2002).
54. Grant, P. A. *et al.* A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* **94**, 45–53 (1998).
55. Grant, P. A. *et al.* Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11**, 1640–1650 (1997).
56. Pray-Grant, M. G. *et al.* The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8774–8786 (2002).
57. Daniel, J. A. *et al.* Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J. Biol. Chem.* **279**, 1867–1871 (2004).

58. Eberharter, A. *et al.* The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6621–6631 (1999).
59. Sendra, R., Tse, C. & Hansen, J. C. The yeast histone acetyltransferase A2 complex, but not free Gcn5p, binds stably to nucleosomal arrays. *J. Biol. Chem.* **275**, 24928–24934 (2000).
60. Angus-Hill, M. L., Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternglanz, R. & Ramakrishnan, V. Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: A tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *J. Mol. Biol.* **294**, 1311–1325 (1999).
61. Nourani, A. *et al.* Role of an ING1 growth regulator in transcriptional activation and targeted histone acetylation by the NuA4 complex. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7629–7640 (2001).
62. Bittner, C. B., Zeisig, D. T., Zeisig, B. B. & Slany, R. K. Direct physical and functional interaction of the NuA4 complex components Yaf9p and Swc4p. *Eukaryot. Cell* **3**, 976–983 (2004).
63. Krogan, N. J. *et al.* Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13513–13518 (2004).
64. Eisen, A. *et al.* The yeast NuA4 and *Drosophila* MSL complexes contain homologous subunits important for transcription regulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 3484–3491 (2001).
65. Galarneau, L. *et al.* Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol. Cell* **5**, 927–937 (2000).

66. Allard, S. *et al.* NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J.* **18**, 5108–5119 (1999).
67. John, S. *et al.* The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes Dev.* **14**, 1196–1208 (2000).
68. Taverna, S. D. *et al.* 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**, 785–796 (2006).
69. Sutton, A. *et al.* Sas4 and Sas5 are required for the histone acetyltransferase activity of Sas2 in the SAS complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 16887–16892 (2003).
70. Shia, W.-J. *et al.* Characterization of the yeast trimeric-SAS acetyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **280**, 11987–11994 (2005).
71. Parthun, M. R., Widom, J. & Gottschling, D. E. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**, 85–94 (1996).
72. Poveda, A. *et al.* Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **279**, 16033–16043 (2004).
73. Winkler, G. S. *et al.* RNA polymerase II elongator holoenzyme is composed of two discrete subcomplexes. *J. Biol. Chem.* **276**, 32743–32749 (2001).
74. Winkler, G. S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Svejstrup, J. Q. Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3517–3522 (2002).

75. Selth, L. & Svejstrup, J. Q. Vps75, a new yeast member of the NAP histone chaperone family. *J. Biol. Chem.* **282**, 12358–12362 (2007).
76. Krogan, N. J. *et al.* Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637–643 (2006).
77. Gregoret, I. V., Lee, Y.-M. & Goodson, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* **338**, 17–31 (2004).
78. Bernstein, B. E., Tong, J. K. & Schreiber, S. L. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13708–13713 (2000).
79. Rundlett, S. E. *et al.* HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14503–14508 (1996).
80. Suka, N., Suka, Y., Carmen, A. A., Wu, J. & Grunstein, M. Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol. Cell* **8**, 473–479 (2001).
81. Wang, A., Kurdistani, S. K. & Grunstein, M. Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science* **298**, 1412–1414 (2002).
82. Robyr, D. *et al.* Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**, 437–446 (2002).
83. Wu, J., Suka, N., Carlson, M. & Grunstein, M. TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol. Cell* **7**, 117–126 (2001).

84. Carmen, A. A. *et al.* Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12356–12361 (1999).
85. Oppikofer, M. *et al.* A dual role of H4K16 acetylation in the establishment of yeast silent chromatin. *EMBO J.* **30**, 2610–2621 (2011).
86. Celic, I. *et al.* The sirtuins hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation. *Curr. Biol. CB* **16**, 1280–1289 (2006).
87. Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D. & Broach, J. R. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* **7**, 592–604 (1993).
88. Suka, N., Luo, K. & Grunstein, M. Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat. Genet.* **32**, 378–383 (2002).
89. Perrod, S. *et al.* A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *EMBO J.* **20**, 197–209 (2001).
90. Lustig, A. J. Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 233–239 (1998).
91. Vaquero, A. *et al.* SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* **20**, 1256–1261 (2006).
92. Yang, X.-J. & Seto, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 206–218 (2008).
93. Carrozza, M. J. *et al.* Stable incorporation of sequence specific repressors Ash1 and Ume6 into the Rpd3L complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1731**, 77-87–76 (2005).

94. Carrozza, M. J. *et al.* Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**, 581–592 (2005).
95. Yeheskely-Hayon, D. *et al.* The roles of the catalytic and noncatalytic activities of Rpd3L and Rpd3S in the regulation of gene transcription in yeast. *PloS One* **8**, e85088 (2013).
96. Alejandro-Osorio, A. L. *et al.* The histone deacetylase Rpd3p is required for transient changes in genomic expression in response to stress. *Genome Biol.* **10**, R57 (2009).
97. Ruiz-Roig, C., Viéitez, C., Posas, F. & de Nadal, E. The Rpd3L HDAC complex is essential for the heat stress response in yeast. *Mol. Microbiol.* **76**, 1049–1062 (2010).
98. Kremer, S. B. & Gross, D. S. SAGA and Rpd3 chromatin modification complexes dynamically regulate heat shock gene structure and expression. *J. Biol. Chem.* **284**, 32914–32931 (2009).
99. Knott, S. R. V., Viggiani, C. J., Tavaré, S. & Aparicio, O. M. Genome-wide replication profiles indicate an expansive role for Rpd3L in regulating replication initiation timing or efficiency, and reveal genomic loci of Rpd3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **23**, 1077–1090 (2009).
100. Aparicio, J. G., Viggiani, C. J., Gibson, D. G. & Aparicio, O. M. The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4769–4780 (2004).
101. Kim, S., Benguria, A., Lai, C. Y. & Jazwinski, S. M. Modulation of life-span by histone deacetylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3125–3136 (1999).

102. Pijnappel, W. W. *et al.* 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 (2001).
103. Cohen, T. J., Mallory, M. J., Strich, R. & Yao, T.-P. Hos2p/Set3p deacetylase complex signals secretory stress through the Mpk1p cell integrity pathway. *Eukaryot. Cell* **7**, 1191–1199 (2008).
104. Tkach, J. M. *et al.* Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat. Cell Biol.* **14**, 966–976 (2012).
105. Choi, D.-H., Kwon, S.-H., Kim, J.-H. & Bae, S.-H. *Saccharomyces cerevisiae* Cmr1 protein preferentially binds to UV-damaged DNA in vitro. *J. Microbiol. Seoul Korea* **50**, 112–118 (2012).
106. Xin, X., Lan, C., Lee, H. C. & Zhang, L. Regulation of the HAP1 gene involves positive actions of histone deacetylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 120–125 (2007).
107. Borges, V. *et al.* Hos1 deacetylates Smc3 to close the cohesin acetylation cycle. *Mol. Cell* **39**, 677–688 (2010).
108. Xiong, B., Lu, S. & Gerton, J. L. Hos1 is a lysine deacetylase for the Smc3 subunit of cohesin. *Curr. Biol. CB* **20**, 1660–1665 (2010).
109. Davie, J. K., Edmondson, D. G., Coco, C. B. & Dent, S. Y. R. Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *J. Biol. Chem.* **278**, 50158–50162 (2003).

110. Huang, D. *et al.* Dual regulation by pairs of cyclin-dependent protein kinases and histone deacetylases controls G1 transcription in budding yeast. *PLoS Biol.* **7**, e1000188 (2009).
111. Lee, J.-H., Maskos, K. & Huber, R. Structural and functional studies of the yeast class II Hda1 histone deacetylase complex. *J. Mol. Biol.* **391**, 744–757 (2009).
112. Wu, J., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Suka, N. & Grunstein, M. HDA2 and HDA3 are related proteins that interact with and are essential for the activity of the yeast histone deacetylase HDA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4391–4396 (2001).
113. Lin, Y. *et al.* A comprehensive synthetic genetic interaction network governing yeast histone acetylation and deacetylation. *Genes Dev.* **22**, 2062–2074 (2008).
114. Millar, C. B., Xu, F., Zhang, K. & Grunstein, M. Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev.* **20**, 711–722 (2006).
115. Robbins, N., Leach, M. D. & Cowen, L. E. Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance. *Cell Rep.* **2**, 878–888 (2012).
116. Ahn, S.-H., Diaz, R. L., Grunstein, M. & Allis, C. D. Histone H2B deacetylation at lysine 11 is required for yeast apoptosis induced by phosphorylation of H2B at serine 10. *Mol. Cell* **24**, 211–220 (2006).
117. Wang, M. & Collins, R. N. A lysine deacetylase Hos3 is targeted to the bud neck and involved in the spindle position checkpoint. *Mol. Biol. Cell* **25**, 2720–2734 (2014).
118. Lim, C.-J., Jo, H. & Kim, K. Protective roles of osmotic stress-resistant Hos3 against oxidative, nitrosative and nutritional stresses in *Schizosaccharomyces pombe*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 237–245 (2015).

119. Aoyama, K., Kawaura, R., Yamada, H., Aiba, H. & Mizuno, T. Identification and characterization of a novel gene, *hos3+*, the function of which is necessary for growth under high osmotic stress in fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1099–1102 (2000).
120. Gunderson, F. Q., Merkhofer, E. C. & Johnson, T. L. Dynamic histone acetylation is critical for cotranscriptional spliceosome assembly and spliceosomal rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2004–2009 (2011).
121. Brachmann, C. B. *et al.* The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev.* **9**, 2888–2902 (1995).
122. Landry, J. *et al.* The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5807–5811 (2000).
123. Fritze, C. E., Verschueren, K., Strich, R. & Easton Esposito, R. Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *EMBO J.* **16**, 6495–6509 (1997).
124. Aparicio, O. M., Billington, B. L. & Gottschling, D. E. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**, 1279–1287 (1991).
125. Rine, J. & Herskowitz, I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**, 9–22 (1987).
126. Xie, J. *et al.* Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **18**, 6448–6454 (1999).

127. Pappas, D. L., Frisch, R. & Weinreich, M. The NAD(+)-dependent Sir2p histone deacetylase is a negative regulator of chromosomal DNA replication. *Genes Dev.* **18**, 769–781 (2004).
128. Lin, S. J., Defossez, P. A. & Guarente, L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**, 2126–2128 (2000).
129. Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M. & Sinclair, D. A. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J. Biol. Chem.* **277**, 45099–45107 (2002).
130. Stankov, M. V. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in myeloid leukemia by suppressing autophagy. *Leukemia* **28**, 577–588 (2014).
131. Ropero, S. & Esteller, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol. Oncol.* **1**, 19–25 (2007).
132. Alao, J. P., Olesch, J. & Sunnerhagen, P. Inhibition of type I histone deacetylase increases resistance of checkpoint-deficient cells to genotoxic agents through mitotic delay. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2606–2615 (2009).
133. Parekh-Olmedo, H., Engstrom, J. U. & Kmiec, E. B. The effect of hydroxyurea and trichostatin a on targeted nucleotide exchange in yeast and Mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1002**, 43–55 (2003).
134. Olsson, T. G. *et al.* Genetic characterisation of hda1+, a putative fission yeast histone deacetylase gene. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3247–3254 (1998).
135. Kubota, K. *et al.* Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *J. Neurochem.* **97**, 1259–1268 (2006).

136. Liu, M., Brusilow, W. S. A. & Needleman, R. Activity of the yeast Tat2p tryptophan permease is sensitive to the anti-tumor agent 4-phenylbutyrate. *Curr. Genet.* **46**, 256–268 (2004).
137. Grzanowski, A., Needleman, R. & Brusilow, W. S. A. Immunosuppressant-like effects of phenylbutyrate on growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **41**, 142–149 (2002).
138. Kaiser, G. S., Germann, S. M., Westergaard, T. & Lisby, M. Phenylbutyrate inhibits homologous recombination induced by camptothecin and methyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* **713**, 64–75 (2011).
139. Kim, J., Park, H., Im, J. Y., Choi, W. S. & Kim, H. S. Sodium butyrate regulates androgen receptor expression and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* **27**, 3285–3292 (2007).
140. Zhang, L., Ma, N., Liu, Q. & Ma, Y. Genome-wide screening for genes associated with valproic acid sensitivity in fission yeast. *PloS One* **8**, e68738 (2013).
141. Home | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY. Available at: <http://www.guidetopharmacology.org/>. (Accessed: 16th April 2016)
142. FDA Approval for Vorinostat. *National Cancer Institute* Available at: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-vorinostat>. (Accessed: 16th April 2016)
143. Grant, S., Easley, C. & Kirkpatrick, P. Vorinostat. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 21–22 (2007).

144. Richon, V. M. *et al.* A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3003–3007 (1998).
145. Lee, J. Y.-C. *et al.* Inhibition of HDAC3- and HDAC6-Promoted Survivin Expression Plays an Important Role in SAHA-Induced Autophagy and Viability Reduction in Breast Cancer Cells. *Front. Pharmacol.* **7**, 81 (2016).
146. Qian, D. Z. *et al.* Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 634–642 (2006).
147. Atadja, P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. *Cancer Lett.* **280**, 233–241 (2009).
148. FDA Approves Panobinostat for Some Patients with Multiple Myeloma. *National Cancer Institute* Available at: <http://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2015/fda-approves-panobinostat>. (Accessed: 16th April 2016)
149. FDA Approval for Belinostat. *National Cancer Institute* Available at: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-belinostat>. (Accessed: 16th April 2016)
150. Sawas, A., Radeski, D. & O'Connor, O. A. Belinostat in patients with refractory or relapsed peripheral T-cell lymphoma: a perspective review. *Ther. Adv. Hematol.* **6**, 202–208 (2015).
151. Dejligbjerg, M. *et al.* Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Mol. Cancer* **7**, 70 (2008).

152. Nebbioso, A., Carafa, V., Benedetti, R. & Altucci, L. Trials with 'epigenetic' drugs: an update. *Mol. Oncol.* **6**, 657–682 (2012).
153. Buggy, J. J. *et al.* CRA-024781: a novel synthetic inhibitor of histone deacetylase enzymes with antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1309–1317 (2006).
154. Morschhauser, F. *et al.* Phase 1 study of the oral histone deacetylase inhibitor abexinostat in patients with Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, or chronic lymphocytic leukaemia. *Invest. New Drugs* **33**, 423–431 (2015).
155. Study of the Safety and Tolerability of PCI-24781 in Patients With Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00724984?term=PCI-24781&rank=4>. (Accessed: 16th April 2016)
156. Furumai, R. *et al.* FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res.* **62**, 4916–4921 (2002).
157. FDA Approval for Romidepsin. *National Cancer Institute* Available at: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-romidepsin>. (Accessed: 16th April 2016)
158. Gallo, P. *et al.* Inhibition of class I histone deacetylase with an apicidin derivative prevents cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* **80**, 416–424 (2008).
159. Ahn, M. Y. *et al.* Histone deacetylase inhibitor, apicidin, inhibits human ovarian cancer cell migration via class II histone deacetylase 4 silencing. *Cancer Lett.* **325**, 189–199 (2012).

160. Nural-Guvener, H. F. *et al.* HDAC class I inhibitor, Mocetinostat, reverses cardiac fibrosis in heart failure and diminishes CD90+ cardiac myofibroblast activation. *Fibrogenesis Tissue Repair* **7**, 10 (2014).
161. Fournel, M. *et al.* MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 759–768 (2008).
162. A Phase II Study of MGCD0103 (MG-0103) in Patients With Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00431873?term=MGCD0103&rank=4>. (Accessed: 16th April 2016)
163. Inoue, S., Mai, A., Dyer, M. J. S. & Cohen, G. M. Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* **66**, 6785–6792 (2006).
164. Hu, E. *et al.* Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 720–728 (2003).
165. NCT02115282 Clinical Trial. *National Cancer Institute* Available at: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/search/view>. (Accessed: 16th April 2016)
166. Exploring the Anticancer Potential of Valproic Acid in Advanced Thyroid Cancer. *National Cancer Institute* Available at: <http://www.cancer.gov/types/thyroid/research/valproic-acid>. (Accessed: 16th April 2016)

167. Göttlicher, M. *et al.* Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **20**, 6969–6978 (2001).
168. Sandner, G. *et al.* The HDAC Inhibitor Phenylbutyrate Reverses Effects of Neonatal Ventral Hippocampal Lesion in Rats. *Front. Psychiatry* **1**, 153 (2011).
169. Steliou, K., Boosalis, M. S., Perrine, S. P., Sangerman, J. & Faller, D. V. Butyrate histone deacetylase inhibitors. *BioResearch Open Access* **1**, 192–198 (2012).
170. Davie, J. R. Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *J. Nutr.* **133**, 2485S–2493S (2003).
171. Therapeutic Induction of Endogenous Antibiotics - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00800930?term=Butyrate&rank=9>. (Accessed: 16th April 2016)
172. Johnston, D. Valproic acid: update on its mechanisms of action. *Epilepsia* **25 Suppl 1**, S1-4 (1984).
173. Löscher, W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog. Neurobiol.* **58**, 31–59 (1999).
174. Ma, Y. *et al.* Isolation of a fission yeast mutant that is sensitive to valproic acid and defective in the gene encoding Ric1, a putative component of Ypt/Rab-specific GEF for Ryl1 GTPase. *Mol. Genet. Genomics MGG* **284**, 161–171 (2010).
175. Mitsui, K., Nakagawa, D., Nakamura, M., Okamoto, T. & Tsurugi, K. Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. *FEBS Lett.* **579**, 723–727 (2005).

176. Sun, Q., Bi, L., Su, X., Tsurugi, K. & Mitsui, K. Valproate induces apoptosis by inducing accumulation of neutral lipids which was prevented by disruption of the SIR2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **581**, 3991–3995 (2007).
177. Yu, Y. *et al.* Sip1, a conserved AP-1 accessory protein, is important for Golgi/endosome trafficking in fission yeast. *PloS One* **7**, e45324 (2012).
178. Miyatake, M. *et al.* Valproic acid affects membrane trafficking and cell-wall integrity in fission yeast. *Genetics* **175**, 1695–1705 (2007).
179. Botrugno, O. A., Robert, T., Vanoli, F., Foiani, M. & Minucci, S. Molecular pathways: old drugs define new pathways: non-histone acetylation at the crossroads of the DNA damage response and autophagy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 2436–2442 (2012).
180. Robert, T. *et al.* HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* **471**, 74–79 (2011).
181. Alberghina, L. *et al.* Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: basic regulatory design and protein-protein interaction network. *Biotechnol. Adv.* **30**, 52–72 (2012).
182. Hartwell, L. H. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* **38**, 164–198 (1974).
183. Bell, S. P. & Dutta, A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 333–374 (2002).
184. Fu, J., Hagan, I. M. & Glover, D. M. The centrosome and its duplication cycle. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a015800 (2015).

185. Mendenhall, M. D. & Hodge, A. E. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **62**, 1191–1243 (1998).
186. Akhtar, M. S. *et al.* TFIIF kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol. Cell* **34**, 387–393 (2009).
187. Kuchin, S., Yeghiayan, P. & Carlson, M. Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs SSN3 and SSN8 contribute to transcriptional control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4006–4010 (1995).
188. Skaar, D. A. & Greenleaf, A. L. The RNA polymerase II CTD kinase CTDK-I affects pre-mRNA 3' cleavage/polyadenylation through the processing component Pti1p. *Mol. Cell* **10**, 1429–1439 (2002).
189. Measday, V. *et al.* A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1212–1223 (1997).
190. Huang, D. *et al.* Cyclin partners determine Pho85 protein kinase substrate specificity in vitro and in vivo: control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3289–3299 (1998).
191. Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Richardson, H. E., de Barros Lopes, M. & Reed, S. I. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6255–6259 (1989).
192. Lew, D. J. & Reed, S. I. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.* **120**, 1305–1320 (1993).
193. Jackson, L. P., Reed, S. I. & Haase, S. B. Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2456–2466 (2006).

194. Donaldson, A. D. *et al.* CLB5-dependent activation of late replication origins in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* **2**, 173–182 (1998).
195. Epstein, C. B. & Cross, F. R. CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.* **6**, 1695–1706 (1992).
196. Schwob, E. & Nasmyth, K. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**, 1160–1175 (1993).
197. Richardson, H., Lew, D. J., Henze, M., Sugimoto, K. & Reed, S. I. Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* **6**, 2021–2034 (1992).
198. Fitch, I. *et al.* Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **3**, 805–818 (1992).
199. Andrews, B. & Measday, V. The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet. TIG* **14**, 66–72 (1998).
200. Nasmyth, K. & Dirick, L. The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* **66**, 995–1013 (1991).
201. Ogas, J., Andrews, B. J. & Herskowitz, I. Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* **66**, 1015–1026 (1991).
202. Barral, Y., Jentsch, S. & Mann, C. G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Genes Dev.* **9**, 399–409 (1995).
203. Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J. & Harper, J. W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209–219 (1997).

204. Shirayama, M., Tóth, A., Gálová, M. & Nasmyth, K. APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* **402**, 203–207 (1999).
205. Wäsch, R. & Cross, F. R. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* **418**, 556–562 (2002).
206. Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D. & Nasmyth, K. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79**, 233–244 (1994).
207. Loog, M. & Morgan, D. O. Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* **434**, 104–108 (2005).
208. Dirick, L., Böhm, T. & Nasmyth, K. Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 4803–4813 (1995).
209. Verma, R. *et al.* Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science* **278**, 455–460 (1997).
210. Nash, P. *et al.* Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**, 514–521 (2001).
211. Kõivomägi, M. *et al.* Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature* **480**, 128–131 (2011).
212. Di Talia, S., Skotheim, J. M., Bean, J. M., Siggia, E. D. & Cross, F. R. The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature* **448**, 947–951 (2007).
213. Turner, J. J., Ewald, J. C. & Skotheim, J. M. Cell size control in yeast. *Curr. Biol. CB* **22**, R350-359 (2012).

214. McMillan, J. N., Sia, R. A. & Lew, D. J. A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast. *J. Cell Biol.* **142**, 1487–1499 (1998).
215. Sia, R. A., Bardes, E. S. & Lew, D. J. Control of Swe1p degradation by the morphogenesis checkpoint. *EMBO J.* **17**, 6678–6688 (1998).
216. Harvey, S. L. & Kellogg, D. R. Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control. *Curr. Biol. CB* **13**, 264–275 (2003).
217. Lew, D. J. & Reed, S. I. A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J. Cell Biol.* **129**, 739–749 (1995).
218. Pangilinan, F. & Spencer, F. Abnormal kinetochore structure activates the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1195–1208 (1996).
219. Stern, B. M. & Murray, A. W. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr. Biol. CB* **11**, 1462–1467 (2001).
220. Hardwick, K. G. *et al.* Lesions in many different spindle components activate the spindle checkpoint in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**, 509–518 (1999).
221. Sanchez, Y. *et al.* Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**, 357–360 (1996).
222. Morrow, D. M., Tagle, D. A., Shiloh, Y., Collins, F. S. & Hieter, P. TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* **82**, 831–840 (1995).

223. Baldo, V., Testoni, V., Lucchini, G. & Longhese, M. P. Dominant TEL1-hy mutations compensate for Mec1 lack of functions in the DNA damage response. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 358–375 (2008).
224. Brill, S. J. & Stillman, B. Replication factor-A from *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by three essential genes coordinately expressed at S phase. *Genes Dev.* **5**, 1589–1600 (1991).
225. Nakada, D., Hirano, Y., Tanaka, Y. & Sugimoto, K. Role of the C terminus of Mec1 checkpoint kinase in its localization to sites of DNA damage. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5227–5235 (2005).
226. Schwartz, M. F. *et al.* Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* **9**, 1055–1065 (2002).
227. Sweeney, F. D. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr. Biol. CB* **15**, 1364–1375 (2005).
228. Majka, J. & Burgers, P. M. J. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **78**, 227–260 (2004).
229. Mayer, M. L., Gygi, S. P., Aebersold, R. & Hieter, P. Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* **7**, 959–970 (2001).
230. Crabbé, L. *et al.* Analysis of replication profiles reveals key role of RFC-Ctf18 in yeast replication stress response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1391–1397 (2010).
231. Bellaoui, M. *et al.* Elg1 forms an alternative RFC complex important for DNA replication and genome integrity. *EMBO J.* **22**, 4304–4313 (2003).

232. Majka, J. & Burgers, P. M. J. Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2249–2254 (2003).
233. Majka, J., Binz, S. K., Wold, M. S. & Burgers, P. M. J. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J. Biol. Chem.* **281**, 27855–27861 (2006).
234. Majka, J., Niedziela-Majka, A. & Burgers, P. M. J. The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* **24**, 891–901 (2006).
235. Wang, H. & Elledge, S. J. Genetic and physical interactions between DPB11 and DDC1 in the yeast DNA damage response pathway. *Genetics* **160**, 1295–1304 (2002).
236. Navadgi-Patil, V. M. & Burgers, P. M. Yeast DNA replication protein Dpb11 activates the Mec1/ATR checkpoint kinase. *J. Biol. Chem.* **283**, 35853–35859 (2008).
237. Mordes, D. A., Nam, E. A. & Cortez, D. Dpb11 activates the Mec1-Ddc2 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18730–18734 (2008).
238. Navadgi-Patil, V. M. & Burgers, P. M. The unstructured C-terminal tail of the 9-1-1 clamp subunit Ddc1 activates Mec1/ATR via two distinct mechanisms. *Mol. Cell* **36**, 743–753 (2009).
239. Kumar, S. & Burgers, P. M. Lagging strand maturation factor Dna2 is a component of the replication checkpoint initiation machinery. *Genes Dev.* **27**, 313–321 (2013).
240. Sun, Z., Fay, D. S., Marini, F., Foiani, M. & Stern, D. F. Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev.* **10**, 395–406 (1996).

241. Weinert, T. A. & Hartwell, L. H. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**, 317–322 (1988).
242. Blankley, R. T. & Lydall, D. A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast. *J. Cell Sci.* **117**, 601–608 (2004).
243. Alcasabas, A. A. *et al.* Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat. Cell Biol.* **3**, 958–965 (2001).
244. Berens, T. J. & Toczyski, D. P. Colocalization of Mec1 and Mrc1 is sufficient for Rad53 phosphorylation in vivo. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1058–1067 (2012).
245. Chen, S.-H. & Zhou, H. Reconstitution of Rad53 activation by Mec1 through adaptor protein Mrc1. *J. Biol. Chem.* **284**, 18593–18604 (2009).
246. Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J. & Elledge, S. J. Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev.* **15**, 1361–1372 (2001).
247. Hu, F. *et al.* Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell* **107**, 655–665 (2001).
248. Krishnan, V., Nirantar, S., Crasta, K., Cheng, A. Y. H. & Surana, U. DNA replication checkpoint prevents precocious chromosome segregation by regulating spindle behavior. *Mol. Cell* **16**, 687–700 (2004).
249. Chabes, A. *et al.* Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**, 391–401 (2003).

250. Cobb, J. A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C. & Gasser, S. M. DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J.* **22**, 4325–4336 (2003).
251. Zegerman, P. & Diffley, J. F. X. Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature* **467**, 474–478 (2010).
252. Lopez-Mosqueda, J. *et al.* Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing. *Nature* **467**, 479–483 (2010).
253. Paulovich, A. G., Armour, C. D. & Hartwell, L. H. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics* **150**, 75–93 (1998).
254. Kai, M. & Wang, T. S.-F. Checkpoint activation regulates mutagenic translesion synthesis. *Genes Dev.* **17**, 64–76 (2003).
255. Aylon, Y. & Kupiec, M. The checkpoint protein Rad24 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in processing double-strand break ends and in recombination partner choice. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6585–6596 (2003).
256. Sørensen, C. S. *et al.* The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* **7**, 195–201 (2005).
257. Gerald, J. N. F., Benjamin, J. M. & Kron, S. J. Robust G1 checkpoint arrest in budding yeast: dependence on DNA damage signaling and repair. *J. Cell Sci.* **115**, 1749–1757 (2002).
258. Javaheri, A. *et al.* Yeast G1 DNA damage checkpoint regulation by H2A phosphorylation is independent of chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13771–13776 (2006).

259. Sidorova, J. M. & Breeden, L. L. Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**, 3032–3045 (1997).
260. Weinert, T. A., Kiser, G. L. & Hartwell, L. H. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev.* **8**, 652–665 (1994).
261. Allen, J. B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E. C. & Elledge, S. J. The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev.* **8**, 2401–2415 (1994).
262. Gasch, A. P. *et al.* Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2987–3003 (2001).
263. Saintigny, Y. *et al.* Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J.* **20**, 3861–3870 (2001).
264. Xiao, W., Chow, B. L. & Rathgeber, L. The repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **30**, 461–468 (1996).
265. Lundin, C. *et al.* Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3799–3811 (2005).
266. Krogh, B. O. & Symington, L. S. Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 233–271 (2004).
267. Mimitou, E. P. & Symington, L. S. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770–774 (2008).

268. Chen, H., Lisby, M. & Symington, L. S. RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Mol. Cell* **50**, 589–600 (2013).
269. Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A. & Egelman, E. H. Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science* **259**, 1896–1899 (1993).
270. Sugiyama, T. & Kowalczykowski, S. C. Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 31663–31672 (2002).
271. Branzei, D. Ubiquitin family modifications and template switching. *FEBS Lett.* **585**, 2810–2817 (2011).
272. Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–141 (2002).
273. Zhang, H. & Lawrence, C. W. The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15954–15959 (2005).
274. Karras, G. I. *et al.* Noncanonical role of the 9-1-1 clamp in the error-free DNA damage tolerance pathway. *Mol. Cell* **49**, 536–546 (2013).
275. Jeoung, D. I., Oehlen, L. J. & Cross, F. R. Cln3-associated kinase activity in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the mating factor pathway. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 433–441 (1998).
276. Peter, M. & Herskowitz, I. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* **265**, 1228–1231 (1994).

277. Merlini, L., Dudin, O. & Martin, S. G. Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol.* **3**, 130008 (2013).
278. Klein, S., Reuveni, H. & Levitzki, A. Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3219–3223 (2000).
279. Leeuw, T. *et al.* Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* **391**, 191–195 (1998).
280. Wu, C., Whiteway, M., Thomas, D. Y. & Leberer, E. Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 15984–15992 (1995).
281. Moskow, J. J., Gladfelter, A. S., Lamson, R. E., Pryciak, P. M. & Lew, D. J. Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7559–7571 (2000).
282. Leeuw, T. *et al.* Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* **270**, 1210–1213 (1995).
283. Dowell, S. J., Bishop, A. L., Dyos, S. L., Brown, A. J. & Whiteway, M. S. Mapping of a yeast G protein betagamma signaling interaction. *Genetics* **150**, 1407–1417 (1998).
284. Whiteway, M. S. *et al.* Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**, 1572–1575 (1995).
285. Printen, J. A. & Sprague, G. F. Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**, 609–619 (1994).

286. Drogen, F. *et al.* Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr. Biol. CB* **10**, 630–639 (2000).
287. Neiman, A. M. & Herskowitz, I. Reconstitution of a yeast protein kinase cascade in vitro: activation of the yeast MEK homologue STE7 by STE11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3398–3402 (1994).
288. Ma, D., Cook, J. G. & Thorner, J. Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol. Biol. Cell* **6**, 889–909 (1995).
289. Cook, J. G., Bardwell, L., Kron, S. J. & Thorner, J. Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **10**, 2831–2848 (1996).
290. Tedford, K., Kim, S., Sa, D., Stevens, K. & Tyers, M. Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr. Biol. CB* **7**, 228–238 (1997).
291. Zeitlinger, J. *et al.* Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**, 395–404 (2003).
292. Chang, F. & Herskowitz, I. Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell* **63**, 999–1011 (1990).
293. Klis, F. M., Boorsma, A. & De Groot, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* **23**, 185–202 (2006).

294. Martín, H., Rodríguez-Pachón, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. & Molina, M. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 1511–1519 (2000).
295. Buehrer, B. M. & Errede, B. Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6517–6525 (1997).
296. Soriano-Carot, M., Bañó, M. C. & Igual, J. C. The yeast mitogen-activated protein kinase Slr2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div.* **7**, 1 (2012).
297. Ma, Y. *et al.* Transient receptor potential (TRP) and Cch1-Yam8 channels play key roles in the regulation of cytoplasmic Ca²⁺ in fission yeast. *PLoS One* **6**, e22421 (2011).
298. Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A. & Mann, C. The SLR2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **123**, 1821–1833 (1993).
299. Rodicio, R. & Heinisch, J. J. Together we are strong--cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast Chichester Engl.* **27**, 531–540 (2010).
300. Ozaki, K. *et al.* Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 2196–2207 (1996).
301. Andrews, P. D. & Stark, M. J. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 15)**, 2685–2693 (2000).
302. Lee, K. S. *et al.* A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3067–3075 (1993).

303. Irie, K. *et al.* MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3076–3083 (1993).
304. Kim, K.-Y., Truman, A. W., Caesar, S., Schlenstedt, G. & Levin, D. E. Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol. Biol. Cell* **21**, 1609–1619 (2010).
305. Watanabe, Y., Irie, K. & Matsumoto, K. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5740–5749 (1995).
306. Flández, M., Cosano, I. C., Nombela, C., Martín, H. & Molina, M. Reciprocal regulation between Slf2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 11027–11034 (2004).
307. Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J. & Ota, I. M. Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7651–7660 (1999).
308. Hahn, J.-S. & Thiele, D. J. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slf2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J. Biol. Chem.* **277**, 21278–21284 (2002).
309. Blackwell, E., Kim, H.-J. N. & Stone, D. E. The pheromone-induced nuclear accumulation of the Fus3 MAPK in yeast depends on its phosphorylation state and on Dig1 and Dig2. *BMC Cell Biol.* **8**, 44 (2007).

310. Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A. & Saito, H. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1289–1297 (1997).
311. Fuchs, B. B. & Mylonakis, E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot. Cell* **8**, 1616–1625 (2009).
312. Truman, A. W., Kim, K.-Y. & Levin, D. E. Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 6449–6461 (2009).
313. Bermejo, C. *et al.* The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1113–1124 (2008).
314. García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Bermejo, C., Nombela, C. & Arroyo, J. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 10901–10911 (2009).
315. Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E. & Gustin, M. C. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760–1763 (1993).
316. Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M. & Saito, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242–245 (1994).
317. Tatebayashi, K., Takekawa, M. & Saito, H. A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J.* **22**, 3624–3634 (2003).

318. Posas, F. & Saito, H. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**, 1702–1705 (1997).
319. Tatebayashi, K. *et al.* Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.* **25**, 3033–3044 (2006).
320. Tatebayashi, K. *et al.* Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J.* **26**, 3521–3533 (2007).
321. Tanaka, K. *et al.* Yeast osmosensors Hkr1 and Msb2 activate the Hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Sci. Signal.* **7**, ra21 (2014).
322. Ekiel, I. *et al.* Binding the atypical RA domain of Ste50p to the unfolded Opy2p cytoplasmic tail is essential for the high-osmolarity glycerol pathway. *Mol. Biol. Cell* **20**, 5117–5126 (2009).
323. Wu, C., Jansen, G., Zhang, J., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev.* **20**, 734–746 (2006).
324. de Nadal, E. & Posas, F. Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J.* **29**, 4–13 (2010).
325. Hohmann, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 300–372 (2002).
326. Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M. & Hohmann, S. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* **275**, 8290–8300 (2000).

327. Duch, A. *et al.* Coordinated control of replication and transcription by a SAPK protects genomic integrity. *Nature* **493**, 116–119 (2013).
328. Herold, C. *et al.* The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J. Hepatol.* **36**, 233–240 (2002).
329. Zhou, Q., Dalgard, C. L., Wynder, C. & Doughty, M. L. Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells. *BMC Neurosci.* **12**, 50 (2011).
330. Wu, Y. & Guo, S.-W. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid induce cell cycle arrest and p21 expression in immortalized human endometrial stromal cells. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **137**, 198–203 (2008).
331. Bacon, C. L., Gallagher, H. C., Haughey, J. C. & Regan, C. M. Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase. *J. Neurochem.* **83**, 12–19 (2002).
332. Cornago, M. *et al.* Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe. *Cell Death Dis.* **5**, e1435 (2014).
333. Mutoh, N., Kitajima, S. & Ichihara, S. Apoptotic cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* induced by valproic acid and its extreme susceptibility to pH change. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1113–1118 (2011).
334. Tang, W., Palaty, J. & Abbott, F. S. Time course of alpha-fluorinated valproic acid in mouse brain and serum and its effect on synaptosomal gamma-aminobutyric acid levels in comparison to valproic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**, 1163–1172 (1997).

335. Grillo, M. P., Chiellini, G., Tonelli, M. & Benet, L. Z. Effect of alpha-fluorination of valproic acid on valproyl-S-acyl-CoA formation in vivo in rats. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **29**, 1210–1215 (2001).
336. Dotevall, G. & Ekenved, G. The absorption of acetylsalicylic acid from the stomach in relation to intragastric pH. *Scand. J. Gastroenterol.* **11**, 801–805 (1976).
337. McArthur, M. J. *et al.* Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J. Lipid Res.* **40**, 1371–1383 (1999).
338. Anderson, C. M. & Stahl, A. SLC27 fatty acid transport proteins. *Mol. Aspects Med.* **34**, 516–528 (2013).
339. Holyoak, C. D. *et al.* Loss of Cmk1 Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in yeast results in constitutive weak organic acid resistance, associated with a post-transcriptional activation of the Pdr12 ATP-binding cassette transporter. *Mol. Microbiol.* **37**, 595–605 (2000).
340. Paumi, C. M., Chuk, M., Snider, J., Stagljar, I. & Michaelis, S. ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **73**, 577–593 (2009).
341. Sipos, G. & Kuchler, K. Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. *Curr. Drug Targets* **7**, 471–481 (2006).
342. Causton, H. C. *et al.* Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 323–337 (2001).
343. Carmona-Gutierrez, D. *et al.* The cell death protease Kex1p is essential for hypochlorite-induced apoptosis in yeast. *Cell Cycle Georget. Tex* **12**, 1704–1712 (2013).

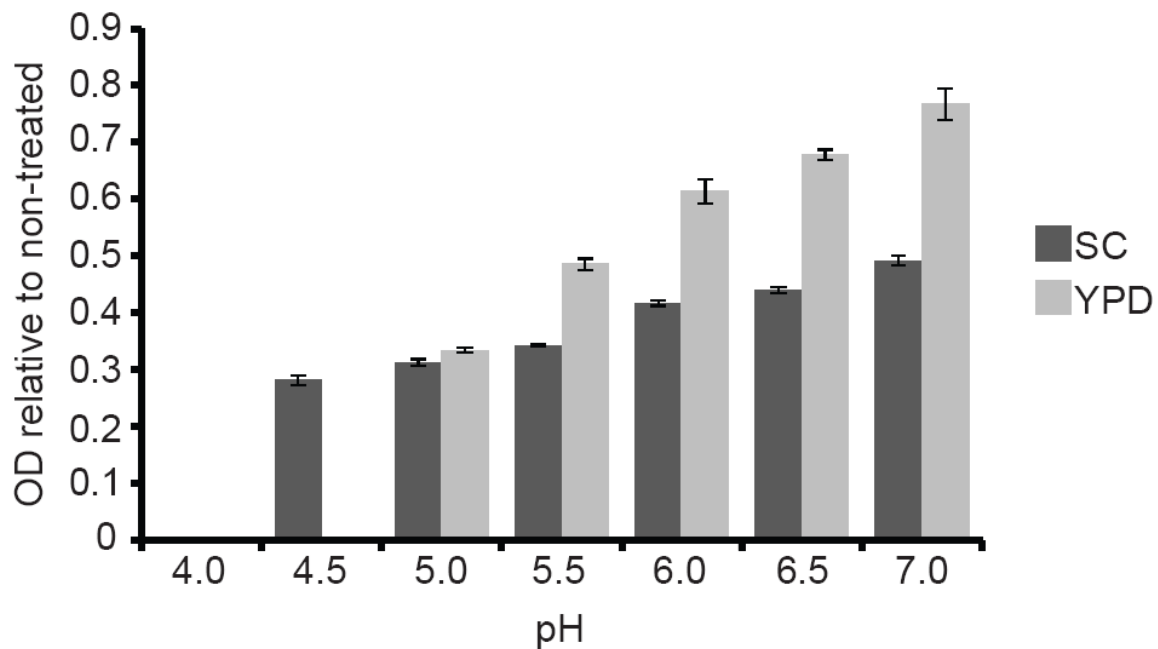
344. Kitagaki, H., Araki, Y., Funato, K. & Shimoi, H. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett.* **581**, 2935–2942 (2007).
345. Brewer, J. W., Hendershot, L. M., Sherr, C. J. & Diehl, J. A. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8505–8510 (1999).
346. Cox, J. S., Shamu, C. E. & Walter, P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**, 1197–1206 (1993).
347. Cox, J. S. & Walter, P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391–404 (1996).
348. Bonilla, M., Nastase, K. K. & Cunningham, K. W. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* **21**, 2343–2353 (2002).
349. Rodríguez-Peña, J. M., Díez-Muñiz, S., Bermejo, C., Nombela, C. & Arroyo, J. Activation of the yeast cell wall integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2. *FEBS Lett.* **587**, 3675–3680 (2013).
350. Nagayoshi, Y. *et al.* Contribution of the Slt2-regulated transcription factors to echinocandin tolerance in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* **14**, 1128–1131 (2014).
351. Tatjer, L. *et al.* Wide-Ranging Effects of the Yeast Ptc1 Protein Phosphatase Acting Through the MAPK Kinase Mkk1. *Genetics* **202**, 141–156 (2016).

352. Rodríguez-Peña, J. M., García, R., Nombela, C. & Arroyo, J. The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* **27**, 495–502 (2010).
353. Uno, I., Fukami, K., Kato, H., Takenawa, T. & Ishikawa, T. Essential role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in yeast cell proliferation. *Nature* **333**, 188–190 (1988).
354. Banfic, H., Bedalov, A., York, J. D. & Visnjic, D. Inositol pyrophosphates modulate S phase progression after pheromone-induced arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **288**, 1717–1725 (2013).
355. Vaden, D. L., Ding, D., Peterson, B. & Greenberg, M. L. Lithium and valproate decrease inositol mass and increase expression of the yeast INO1 and INO2 genes for inositol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 15466–15471 (2001).
356. Deranieh, R. M. *et al.* Perturbation of the Vacuolar ATPase: A NOVEL CONSEQUENCE OF INOSITOL DEPLETION. *J. Biol. Chem.* **290**, 27460–27472 (2015).
357. Kleineidam, A. *et al.* Valproic acid- and lithium-sensitivity in *prs* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 1115–1120 (2009).
358. Sobel, J. D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet Lond. Engl.* **369**, 1961–1971 (2007).
359. Sekhavat, L., Tabatabaai, A. & Tezerjani, F. Z. Oral fluconazole 150 mg single dose versus intra-vaginal clotrimazole treatment of acute vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Public Health* **4**, 195–199 (2011).

360. Dovnik, A., Golle, A., Novak, D., Arko, D. & Takač, I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* **24**, 5–7 (2015).
361. Pappas, P. G. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 503–535 (2009).
362. Sobel, J. D. *et al.* Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **351**, 876–883 (2004).
363. Richards, T. S., Oliver, B. G. & White, T. C. Micafungin activity against *Candida albicans* with diverse azole resistance phenotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 349–355 (2008).
364. Ford, C. B. *et al.* The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *eLife* **4**, e00662 (2015).
365. White, T. C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L. F. & Stevens, D. A. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1704–1713 (2002).
366. Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. & Bille, J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2300–2305 (1996).
367. Wirsching, S., Michel, S. & Morschhäuser, J. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol. Microbiol.* **36**, 856–865 (2000).

368. Mendling, W. *et al.* Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). *Mycoses* **58 Suppl 1**, 1–15 (2015).
369. Linhares, I. M., Summers, P. R., Larsen, B., Giraldo, P. C. & Witkin, S. S. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **204**, 120.e1-5 (2011).
370. Danby, C. S., Boikov, D., Rautemaa-Richardson, R. & Sobel, J. D. Effect of pH on in vitro susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1403–1406 (2012).

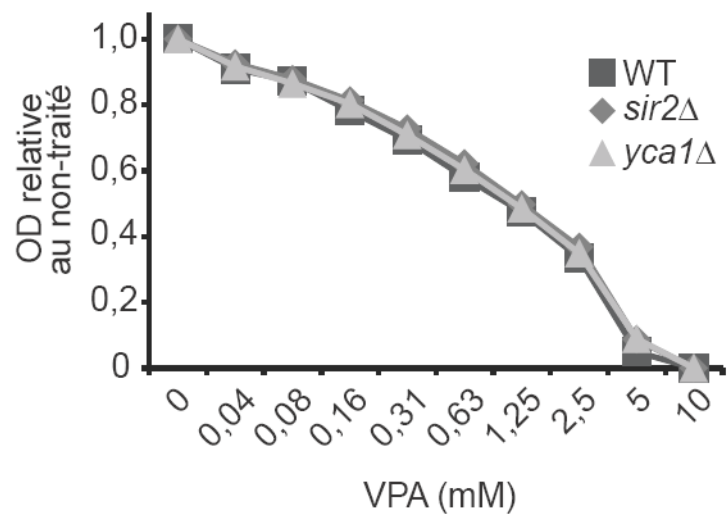
Appendice 1



L'effet du VPA est dépend du pH.

Les cellules sont incubées à 30°C avec différentes concentrations de VPA dans un milieu SC ou YPD dont le pH varie selon les valeurs indiquées. La croissance cellulaire est mesurée par la lecture de l'OD₆₃₀ après 48 heures d'incubation.

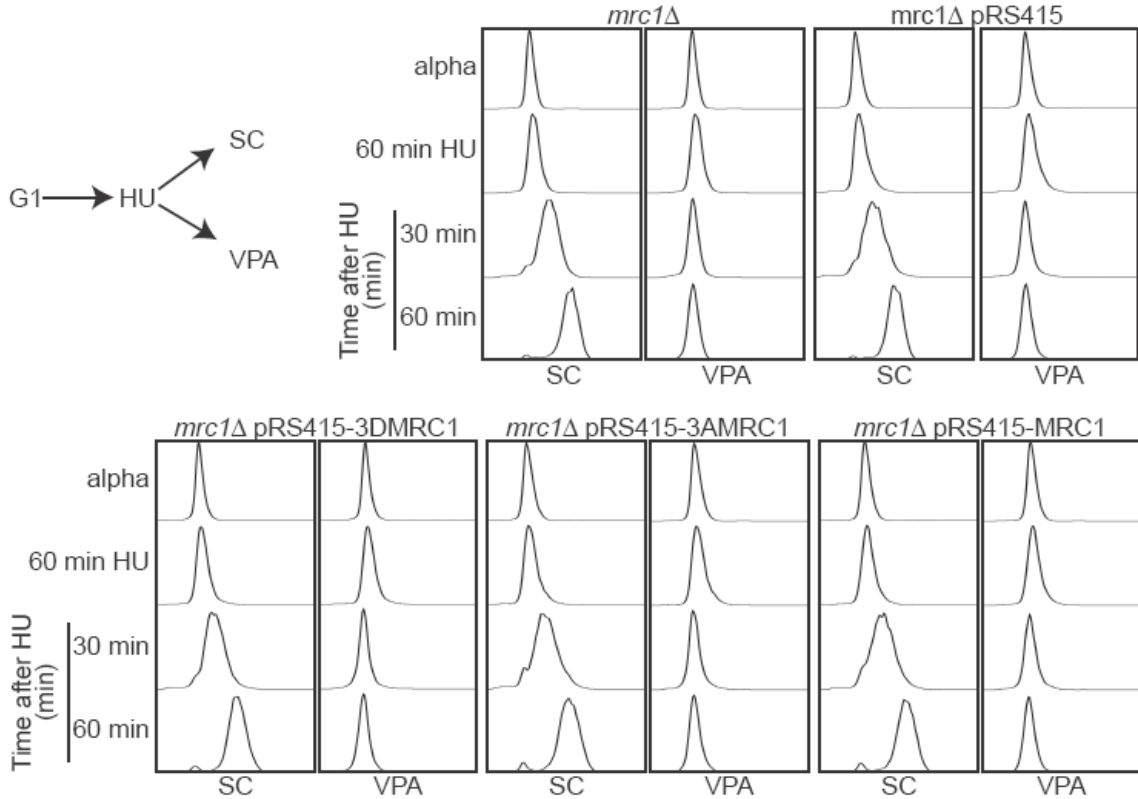
Appendice 2



La sensibilité en présence de VPA est indépendante des gènes reliés à l'apoptose.

Les mutants sont incubées à 30°C dans un milieu SC à différentes concentrations de VPA. La croissance cellulaire est mesurée par la lecture de l'OD₆₃₀ après 48 heures d'incubation.

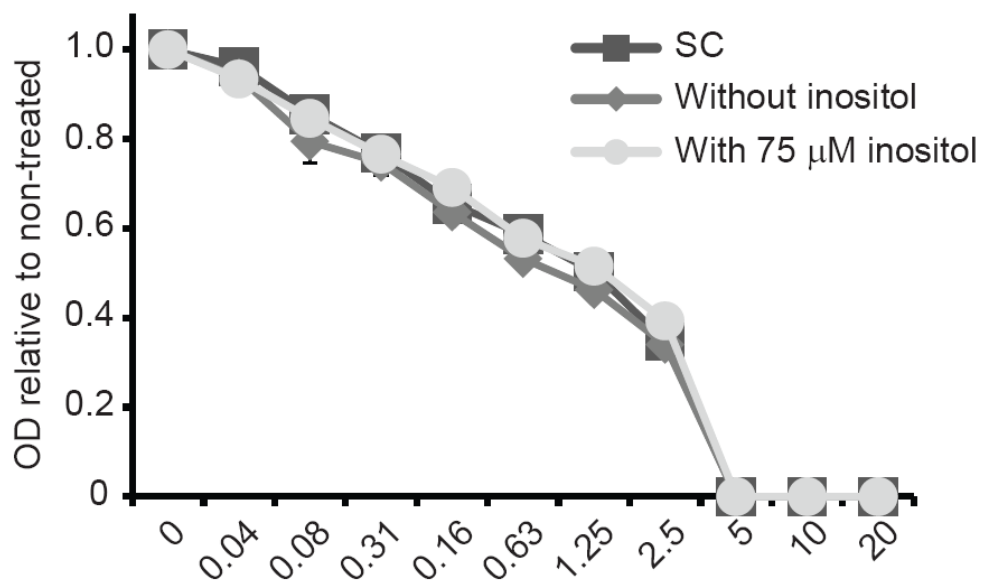
Appendice 3



L'arrêt dans le cycle cellulaire en présence de VPA est indépendant de la phosphorylation de Mrc1 par Hog1.

Les mutants ont été synchronisés en G1 et relâché à travers la phase S dans un milieu SC contenant 200 mM de HU pour 60 minutes. Les cellules ont été lavées et incubées à nouveau dans du milieu SC avec 10 mM VPA. Les échantillons ont été traités pour l'analyse du contenu en ADN par cytométrie en flux aux temps indiqués.

Appendice 4



L'effet du VPA est indépendant d'une déplétion en inositol.

Les cellules sont incubées à 30 °C avec différentes concentrations de VPA dans un milieu SC avec ou sans 75 μM d'inositol. La croissance cellulaire est mesurée par la lecture de l'OD₆₃₀ après 48 heures d'incubation.