



Université de Sherbrooke

**Caractérisation des protéines Str3 et Tpx1 dans l'homéostasie de l'hème chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*.**

Par  
Vincent Normant  
Programme de Biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)  
en Biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Décembre, 2018

Membres du jury d'évaluation  
Pr Simon Labbé, directeur de thèse  
Pr François Bachand, département de biochimie  
Pr Claude Asselin, département d'anatomie et de biologie cellulaire  
Pr Bernard Turcotte, département de médecine, Université McGill

© Vincent Normant - 2018

## RÉSUMÉ

### Caractérisation des protéines Str3 et Tpx1 dans l'homéostasie de l'hème chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*.

Par

Vincent Normant

Programmes de Biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La molécule d'hème est un groupement prosthétique qui est requis par de nombreuses protéines impliquées dans des processus cellulaires vitaux. En excès, la molécule d'hème libre est toxique car elle peut facilement causer des dommages aux membranes ou participer à la formation d'espèces réactives à l'oxygène. Son homéostasie doit donc être rigoureusement régulée. Pour obtenir l'hème de façon exogène, les organismes ont développé une panoplie de stratégies afin de l'acquérir. De plus, pour plusieurs organismes incluant les levures pathogènes, il a été montré que leur capacité à acquérir l'hème est souvent en lien direct avec leur habilité à infecter l'hôte. Chez l'organisme modèle, *Schizosaccharomyces pombe*, il a été découvert que la protéine de surface Shu1 est impliquée dans l'acquisition d'hème. Une souche délétée pour le gène *hem1<sup>+</sup>* n'est plus capable de synthétiser de l'hème. Elle doit donc recourir à l'acquisition d'hème exogène pour survivre. Une souche *hem1Δ shu1Δ* n'est pas capable de croître en présence d'une faible quantité d'hème (0,075µM) dans le milieu de culture. Nous avons montré dans cette thèse que si cette concentration excède 0,15µM, la souche est capable de croître, suggérant l'existence d'un deuxième transporteur d'hème. Cette croissance est dépendante de la protéine Str3 qui code pour un transporteur de type MFS (Major Facilitator Superfamily transporter). Ainsi, une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* présente une incapacité de croître en présence de 0,15µM d'hème, montrant l'importance de *str3<sup>+</sup>* à cette concentration d'hème. La protéine Str3 se localise à la surface cellulaire. Elle a la capacité de lier de l'hème via une boucle extracellulaire. Enfin, la présence de Str3 à la surface cellulaire permet l'entrée dans la cellule de Zinc-Mésoporphyrine (ZnMP), un analogue fluorescent de l'hème. Nous avons ensuite montré que Str3 interagit avec la peroxyrédoxine Tpx1 en présence d'hème. La protéine Tpx1, initialement caractérisée pour sa réponse au stress oxydatif, est capable de lier deux molécules d'hème au niveau de deux motifs CP. La mutation des deux motifs CP abolie la capacité de croissance en présence de 0.15µM d'hème d'une souche délétée pour les gènes *hem1<sup>+</sup>* et *shu1<sup>+</sup>* (*hem1Δ shu1Δ*). Ainsi, Tpx1 et Str3 participent à une voie commune d'assimilation de l'hème chez *S. pombe*. Enfin, nos résultats montrent que la présence de Str3 et Tpx1 est requise pour le fonctionnement de l'hémoprotéine Frp1, une ferriréductase de surface.

Mots clés : Hème, *Schizosaccharomyces pombe*, Transporteur MFS, Peroxyrédoxine, Str3, Tpx1

## TABLE DES MATIERES

Résumé .....	i
Table des matières.....	ii
Liste des figures .....	iv
Liste des tableaux .....	viii
Liste des abréviations.....	ix
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Les métaux en biologie .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Importance du fer pour les organismes vivants .....</b>	<b>2</b>
2.1. Le fer comme co-facteur.....	2
2.2. La toxicité liée au fer .....	3
2.3. Biodisponibilité du fer dans l'environnement .....	3
2.4. Le fer, un facteur de virulence.....	3
2.5. Acquisition du fer chez les organismes unicellulaires .....	4
2.6. Absorption et séquestration du fer chez l'humain.....	6
<b>3. L'hème comme source de fer .....</b>	<b>11</b>
3.1. Voie de synthèse endogène de l'hème.....	11
3.2. Acquisition exogène d'hème.....	13
3.3. Les organismes auxotrophes pour l'hème .....	15
<b>4. Homéostasie du fer chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....</b>	<b>15</b>
4.1. Généralités sur <i>S. pombe</i> .....	15
4.2. Transport du fer chez <i>S. pombe</i> .....	16
4.3. Homéostasie de l'hème chez <i>S. pombe</i> .....	17
4.4. Contrôle de l'expression des gènes d'assimilation du fer.....	19
<b>5. Homéostasie de l'hème chez les levures .....</b>	<b>23</b>
5.1. Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
5.2. L'import de l'hème chez <i>Candida albicans</i> est dépendant des protéines	
CFEM.....	23
5.3. Le transport de l'hème chez <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	26
<b>6. Les protéines de transport de type MFS.....</b>	<b>27</b>

6.1. La structure et le fonctionnement des MFS .....	27
6.2. Les MFS et le transport du fer et de l'hème.....	31
7. Les peroxyrédoxines .....	34
7.1. Définition des peroxyrédoxines.....	34
7.2. Cycle catalytique des peroxyrédoxines .....	35
7.3. Hydroxylation des peroxyrédoxines 2-Cys typiques.....	37
7.4. Implication des peroxyrédoxines dans les réponses cellulaires .....	39
7.5. La peroxyrédoxine Tpx1 chez <i>S. pombe</i> .....	39
7.6. Les peroxyrédoxines et l'hème.....	41
8. Hypothèses et objectifs de recherche .....	43
<b>Chapitre 1 .....</b>	<b>44</b>
<b>Chapitre 2.....</b>	<b>82</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>134</b>
1. Les voies Shu1 et Str3 sont deux voies d'acquisition d'hème indépendantes..	134
2. Le transport de l'hème par la protéine Str3.....	136
3. La stabilité de Str3 à la surface cellulaire.....	142
4. Profil d'ubiquitinylation de Str3 .....	144
5. Signalisation qui amène Tpx1 à la membrane plasmique au contact de Str3.	149
6. Rôle de Tpx1 dans la protection contre l'hème libre.....	151
7. La GAPDH, une chaperonne de l'hème.....	154
8. Effet de Str3 et Shu1 sur l'activité de la chaîne respiratoire .....	156
9. Étude de l'activité catalase de Ctt1 comme senseur de l'hème intracellulaire	157
10. Conservation de Str3 chez les levures .....	158
<b>Conclusion .....</b>	<b>161</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>162</b>
<b>Liste des références .....</b>	<b>163</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>183</b>

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

<b>Figure 1.</b> <i>Les différentes formes de fer présents dans les sites catalytiques.</i> .....	2
<b>Figure 2.</b> <i>Réaction de Fenton.</i> .....	3
<b>Figure 3.</b> <i>Acquisition du fer chez les bactéries et les levures.</i> .....	5
<b>Figure 4.</b> <i>Homéostasie du fer chez l'homme.</i> .....	10
<b>Figure 5.</b> <i>Voie de biosynthèse de l'hème.</i> .....	13
<b>Figure 6.</b> <i>Régulation de l'homéostasie du fer chez S. pombe.</i> .....	22
<b>Figure 7.</b> <i>Les quatre protéines à domaine CFEM impliquées dans l'homéostasie de l'hème chez C. albicans.</i> .....	25
<b>Figure 8.</b> <i>L'import de l'hème chez les levures C. albicans, C. neoformans et S. pombe.</i> .....	27
<b>Figure 9.</b> <i>Structure et modes de transports des MFS.</i> .....	31
<b>Figure 10.</b> <i>Cycle catalytique des peroxyrédoxines (A) à une cystéine, 1-Cys, (B) à deux cystéines typiques ou (C) à deux cystéines atypiques.</i> .....	38
<b>Figure 11.</b> <i>Réponses cellulaires en fonction du stade oxydatif de Tpx1</i> .....	40

### CHAPITRE 1

<b>Figure 1.</b> <i>Deletion of <math>shu1^+</math> leads to poor growth in the presence of low hemin concentration (0.075 <math>\mu</math>M), but does not compromise cell growth with higher hemin concentrations (0.15 and 0.5 <math>\mu</math>M).</i> .....	50
<b>Figure 2.</b> <i><math>str3^+</math> encodes a cell-surface protein that is biosynthetically regulated by cellular iron levels.</i> .....	52
<b>Figure 3.</b> <i>The <math>str3^+</math> gene is required for hemin acquisition by <math>hem1\Delta shu1\Delta</math> cells in ALA-free medium supplemented with 0.15 <math>\mu</math>M hemin</i> .....	55
<b>Figure 4.</b> <i>Deletion of <math>shu1^+</math> and <math>str3^+</math> lead to defects in the cellular assimilation of ZnMP, albeit in a different concentration threshold.</i> .....	57
<b>Figure 5.</b> <i>Expression of S. pombe Str3 in S. cerevisiae leads to cellular accumulation of ZnMP.</i> .....	60
<b>Figure 6.</b> <i>Str3 binds hemin</i> .....	63

<b>Figure 7.</b> <i>Str3 is an integral membrane-associated protein</i> .....	64
<b>Figure 8.</b> <i>Str3 (522-576) and hemin interact with one another</i> .....	66
<b>Figure S1.</b> <i>Str3-mediated heme transport is independent on Abc3.</i> .....	80
<b>Figure S2.</b> <i>Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP is largely detected in the unbound fraction when subject to hemin pulldown assays using hemin-agarose beads.</i> .....	81

## CHAPITRE 2

<b>Figure 1.</b> <i>La ZnMP entre directement dans le cytoplasme via Str3</i> .....	95
<b>Figure 2.</b> <i>Localisation de Str3 à la surface cellulaire en présence de différentes concentrations en hémine et en présence de 10 <math>\mu</math>M de ZnMP</i> .....	98
<b>Figure 3.</b> <i>Recherche des partenaires protéiques de Str3 par biotinylation de proximité.</i> ..	101
<b>Figure 4.</b> <i>L'interaction entre Str3 et Tpx1 est renforcée en présence d'hémine</i> .....	104
<b>Figure 5.</b> <i>Tpx1 est plus fortement enrichie dans la fraction membranaire en présence d'hémine</i> .....	108
<b>Figure 6.</b> <i>Tpx1 se lie à l'hémine in vitro</i> .....	110
<b>Figure 7.</b> <i>Le gène tpx1<sup>+</sup> est nécessaire pour l'acquisition de l'hème par une souche hem1 <math>\Delta</math> shu1 <math>\Delta</math> en absence de ALA dans un milieu supplémenté avec 0.15 <math>\mu</math>M d'hémine</i> .....	113
<b>Figure 8.</b> <i>L'expression de ctt1<sup>+</sup> est affectée en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans une souche exprimant Tpx1 CP1/CP2 mutant.</i> .....	115
<b>Figure 9.</b> <i>Les motifs CP de Tpx1 permettent sa liaison à l'hème</i> .....	116
<b>Figure 10.</b> <i>La protéine Tpx1 par sa liaison à la molécule d'hème protège cette dernière de la dégradation par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et empêche son activité peroxydase</i> .....	119
<b>Figure 11.</b> <i>La voie Str3-Tpx1 permet de nourrir la ferriréductase Frp1 en hémine acquise par la voie exogène.</i> .....	122
<b>Figure S1.</b> <i>Vérification de la répression du promoteur inductible nmt1<sup>+</sup> (41X) lors de la production du « pool » protéique de Str3-GFP.</i> .....	128
<b>Figure S2.</b> <i>Alignement des protéines Tpx1 (S. pombe), HBP23 (R. norvegicus) et PRX1 (H. sapiens)</i> .....	129
<b>Figure S3.</b> <i>Tpx1 et Shu1 n'interagissent pas ensemble</i> .....	129
<b>Figure S4.</b> <i>Purification de 6His-Tpx1, 6His-Tpx1 CP1 MUT, 6His-Tpx1 CP2 MUT et 6His-Tpx1 CP1/CP2 MUT</i> .....	130

## DISCUSSION

<b>Figure 1.</b> <i>Homéostasie de l'hème chez S. pombe.</i> .....	135
<b>Figure 2.</b> <i>Alignement des protéines Str3 (S. pombe) et FLVCR1a (H. sapiens) et prédiction de structure de Str3.</i> .....	137
<b>Figure 3.</b> <i>Structure de la boucle extracellulaire de Str3 et du domaine NEAT de IsdX1 de B. anthraxis.</i> .....	142
<b>Figure 4.</b> <i>Str3-GFP est stabilisée à la surface cellulaire en présence d'hémine après trois heures de traitement.</i> .....	143
<b>Figure 5.</b> <i>Str3 ou ses partenaires protéiques est (sont) moins ubiquitinylée(s) en présence d'hème.</i> .....	145
<b>Figure 6.</b> <i>L'absence de ubp5+ entraîne une mauvaise localisation de Str3-GFP et un défaut de croissance en présence de 0.15 µM d'hémine.</i> .....	148
<b>Figure 7.</b> <i>Alignement des GAPDH des levures S. cerevisiae et S. pombe et humaine.</i> .....	155
<b>Figure 8.</b> <i>L'activité catalase de Ctt1 est abolie dans une souche hem1Δ déplétée en ALA</i> .....	158
<b>Figure 9.</b> <i>Phylogénie de Str3 chez les levures</i> .....	160

## ANNEXES

<b>Figure 1.</b> <i>cuf1<sup>+</sup> is required for maximal expression of cum1<sup>+</sup> in meiotic cells under copper-deficient conditions</i> .....	195
<b>Figure 2.</b> <i>cum1<sup>+</sup> is expressed exclusively during meiosis</i> .....	196
<b>Figure 3.</b> <i>Fusion of cum1<sup>+</sup> promoter regions to a reporter gene resulted in its regulated expression by Cuf1 in a CuSE-dependent manner</i> .....	198
<b>Figure 4.</b> <i>CuSE elements of cum1<sup>+</sup> promoter are required for induction of gene expression in a Cuf1-dependent manner under copper-limiting conditions</i> .....	200
<b>Figure 5.</b> <i>Cuf1 binds to the cum1<sup>+</sup> promoter in vegetative cells under copper-limiting conditions</i> .....	202
<b>Figure 6.</b> <i>Expression of iss1<sup>+</sup> produces two different sizes of transcripts</i> .....	205
<b>Figure 7.</b> <i>Elimination of the long iss1<sup>+</sup> transcript leads to derepression of cum1<sup>+</sup> mRNA in a TTM- and Cuf1-dependent manner</i> .....	207
<b>Figure 8.</b> <i>Synchronization of wild-type and mutant strains using nitrogen starvation</i> .....	209

**Figure 9.** *Elimination of cumI<sup>+</sup> mRNA in G1 cells requires components of the RNAi machinery.....*211

**Figure 10.** *Silencing cumI<sup>+</sup> expression in unsynchronized vegetative cells requires RNAi components .....*212

**Figure 11.** *cufI<sup>+</sup> is required for TTM-dependent induction of cumI<sup>+</sup> mRNA in a dcr1Δ mutant strain undergoing G1 cell-cycle phase .....*213

**Figure 12.** *Copper starvation represses the long issI<sup>+</sup> RNA isoform at the end of meiosis .....*214

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1

**Table 1.** *S. pombe* and *S. cerevisiae* strains used in this study.....76

### CHAPITRE 2

**Table 1.** *Liste des souches utilisées*.....93

### ANNEXE

**Table 1.** *S. pombe* strains genotypes. ....193

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : *ATP binding cassette*  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ATP : adenosine triphosphate  
ARN : acide ribonucléique  
ALA : acide 5-aminolevulinate  
ALAD : *5-aminolevulinic acid dehydratase* / acide 5-aminolevulinique déhydratase  
ALAS : *5-aminolevulinic acid synthase* / synthase de l'acide 5-aminolevulinique  
BSA : *bovine serum albumin* / albumine de sérum de bœuf  
Ca<sup>2+</sup> : calcium  
CD : cluster of differentiation / cluster de différenciation  
CFEM : *common in several fungal extracellular membranes*  
Co<sup>2+</sup> : cobalt  
C<sub>P</sub> : cystéine peroxydatique  
CP : cystéine et proline  
CPgenIII : coproporphyrinogène III  
CPOX : coproporphyrinogène oxydase  
Cp-S<sup>-</sup> : cystéine peroxydatique réduite  
Cp-SOH : cystéine peroxydatique oxydée  
C<sub>R</sub> : cystéine de résolution  
Cu<sup>2+</sup> : cuivre  
DCYTB : *duodenal cytochrome b* / cytochrome b duodénale  
Dip : 2.2'- dipyridyl  
DMT1 : *divalent metal transporter 1* / transporteur de métaux divalent 1  
DTPA : acide diéthylnetriaminpentaacétique  
DTT : dithiothéirol  
DUB : déubiquitine ligase  
EDTA : éthylènediaminetétraacétique  
EGTA : acide éthylène-bis(oxyéthylènenitrilo)tétraacétique  
EMM : *Edinburgh minimal medium*  
ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport* / complexes permettant le transport endosomal  
GFP : *green fluorescent protein* / protéine fluorescente verte  
GRX : *glutaredoxin like domain*  
FABP : *fatty-acid-binding protein* / protéine liant les acides gras  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
Fe<sup>2+</sup> : fer ferreux (réduit)  
Fe<sup>3+</sup> : fer ferrique (oxydé)  
FECH : ferrochelatase  
Fe-S : centre fer-soufre  
FLVCR : *feline leukemia virus subgroup C cellular receptor* / récepteur au virus de la leucémie du chat sous-groupe C  
FPN1 : ferroportine  
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase

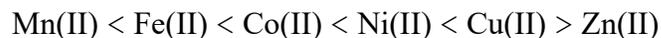
GLUT : *glucose transporter*/ transporteur de glucose  
 GPI : glycosylphosphatidylinositol  
 GST : glutathione S-transférase  
 H<sup>+</sup> : proton  
 HAB : heme-auxotrophic bacteria/ bactéries auxotrophes pour l'hème  
 Hb : hémoglobine  
 HBP23 : *heme binding protein 23*/ protéine liant l'hème de 23 kDa  
 HCP-1 : *heme carrier protein 1*/ protéine de transport de l'hème 1  
 HEPES : acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique  
 HFE : *high iron (Fe)*  
 HIF2 $\alpha$  : *hypoxia-inducible factor 2 alpha*/ facteur inductible par l'hypoxie 2 alpha  
 HMB : tetrapyrrole hydroxyméthylbilane  
 HMBS : hydroxyméthylbilane synthase  
 HMOX1 : hème oxygénase 1 humaine  
 Hp : hémopexine  
 HRG1 : *heme responsive gene 1*/ gène de réponse à l'hème  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène  
 iNOS : *inductible nitric oxide synthase*/ enzyme synthétisant l'oxyde de nitrite inductible  
 IRE : *iron-responsive element*/ élément de réponse au fer  
 IRP1/IRP2 : *iron-responsive element-binding proteins 1/2*/ protéines de liaison aux IRE 1 et 2  
 K<sub>D</sub> : constante de dissociation  
 MAP : *mitogen-activated protein*/ protéine activée en mitose  
 MFS : *major facilitator superfamily*  
 Mg<sup>2+</sup> : magnésium  
 Mn<sup>2+</sup> : manganèse  
 Mo<sup>6+</sup> : molybdène  
 MS/MS : *tandem mass spectrometry*/spectrométrie de masse en tandem  
 Na<sup>+</sup> : sodium  
 NADP : nicotinamide adénine dimucléotide phosphate  
 NEAT : *near-iron transporter*  
 NES : *nuclear export signal*/signal d'export nucléaire  
 NF- $\kappa$ B : *nuclear factor-kappa B*/ facteur nucléaire kappa B  
 Ni<sup>2+</sup> : nickel  
 NLS : *nuclear localization sequence*/séquence de localisation nucléaire  
 NO : oxyde de nitrite  
 NO<sup>3-</sup> : nitrate  
 OH<sup>-</sup> : hydroxyles  
 OH $\cdot$  : radicaux hydroxyles  
 O-O : pont peroxy  
 OONO<sup>-</sup> : peroxy nitrite  
 ORF : *open reading frame*/ cadre ouvert de lecture  
 PBG : monopyrrole porphobilinogène  
 PBS : *phosphate-buffered saline*/ tampon phosphate  
 PCNA : *proliferating cell nuclear antigen*  
 PCR : *polymerase chain reaction*/ réaction en chaîne de polymérisation

PDB : *protein data bank*/ base de données des protéines  
PMSF : phenylmethylsulfonylfluoride  
PPIX : protoporphirine IX  
PPOX : protoporphyrinogène oxidase  
PRDX : peroxyrédoxine  
ROO<sup>-</sup> : hydroperoxydes organiques  
ROS : reactive oxygen species/ espèces réactives à l'oxygène  
R-S<sup>-</sup> : groupement thiolate  
SC : *synthetic complete*/ milieu synthétique complet  
SDS : sodium dodecyl sulfate  
SITD : *siderophore transporter domain*/ domaine des transporteurs de sidérophores  
SOD : superoxyde dismutase  
S-S : pont disulfure  
TBS : *Tris-buffered saline*/ tampon Tris-HCl  
TF : transferrine  
TFR : récepteur à la transferrine  
TM : *transmembrane domain*/domaine transmembranaire  
TPEN : N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylenediamine  
TRX : *thioredoxin like-domain*  
TTC : chlorure de 2,3,5 triphenylterazolium  
Ub : ubiquitine  
UTR : *untranslated region*/ region non traduite  
UROD : uroporphyrinogène décarboxylase  
UROgenIII : uroporphyrinogène III  
UROS : uroporphyrinogène synthase  
Vps : vacuolar protein sorting  
YES : *yeast extract plus supplements medium*/ milieu à l'extrait de levure supplémenté  
WT : wild-type  
ZF1/ZF2 : *zinc finger 1/2*/ doigts de zinc 1/2  
Zn<sup>2+</sup> : zinc  
ZnMP : zinc mésoporphyrine

# INTRODUCTION

## 1. Les métaux en biologie

Le terme métal désigne un des trois groupes de la classification périodique, les deux autres groupes étant les métalloïdes et les non métaux. Ainsi, chez les organismes vivants, l'interaction des protéines avec les métaux est retrouvée en très grande proportion, soit un quart à un tiers des protéines totales dépendamment de l'espèce et du type cellulaire (Dupont et al., 2006). Les métaux servant de cofacteur aux protéines sont les métaux dits de transitions ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{6+}$ ) et certains métaux alcalino-terreux ( $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ). Les principaux métaux de transition sont classés par la série de Irving-Williams suivant leurs capacités à former des complexes stables avec les protéines (Foster et al., 2014; Irving and Williams, 1948).



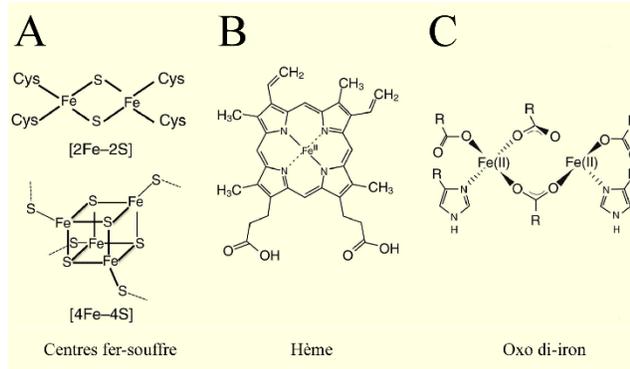
Ainsi, les différents métaux sont retrouvés en proportion variée comme cofacteurs protéiques. Le magnésium est le métal retrouvé le plus abondamment dans les enzymes (16% des enzymes utilisent du magnésium comme cofacteur). Ce dernier est surtout présent dans les transférases (~50%) (Andreini et al., 2008; Waldron et al., 2009). Le zinc, le fer et le manganèse sont également très souvent utilisés comme cofacteur (9% pour le zinc, 8% pour le fer et 6% pour le manganèse). Le zinc est fortement retrouvé dans les hydrolases (Waldron et al., 2009). Il permet la structuration des domaines protéiques comme les doigts de zinc (Cassandri et al., 2017). Le fer est un cofacteur très important pour les oxydoréductases (Waldron et al., 2009). Le fer est également présent sous forme de centres fer-soufre et d'hème dans diverses protéines. Le manganèse est quant à lui surtout présent dans les transférases comme le magnésium. De plus, certaines superoxydes dismutases (SOD) utilisent comme cofacteur le manganèse (Miller, 2012). Les autres métaux sont retrouvés en proportion beaucoup plus faibles ( $\leq 2\%$ , calcium, cuivre et cobalt et  $\leq 1\%$  sodium, nickel et molybdène) (Waldron et al., 2009). Le cuivre comme le fer est principalement le cofacteur

des oxydoréductases. Plusieurs SOD utilisent du cuivre comme cofacteur. Le cobalt est retrouvé dans certaines transférases et hydrolases (Waldron et al., 2009).

## 2. Importance du fer pour les organismes vivants

### 2.1. Le fer comme co-facteur

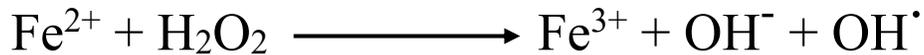
Le fer appartient à la catégorie des métaux de transition. Il est essentiel à la survie de la plupart des espèces procaryotes et eucaryotes vivants en aérobie (à l'exception de certaines espèces bactériennes comme *Lactobacillus plantarum*). Son importance lui vient du fait qu'il est capable d'accepter ou de donner un électron, ainsi, il peut passer d'une forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ , fer ferrique) à une forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ , fer ferreux) et inversement. Il peut donc servir de cofacteur enzymatique à de nombreuses protéines impliquées dans des processus cellulaires vitaux comme la production d'ATP, la synthèse d'acides aminés, le métabolisme de lipides ou la synthèse et la réparation de l'ADN. Le fer se retrouve aux niveaux des sites catalytiques sous forme d'un complexe binucléaire de fer (oxo di-iron), de centre fer soufre (Fe-S), ou d'hème (Figure 1) (Kaplan and Ward, 2013).



▲ **Figure 1.** Les différentes formes de fer présents dans les sites catalytiques. Le fer est présent dans les sites catalytiques sous forme de centres fer-soufre (Fe-S) de type [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] (A), sous forme d'hème (B) ou sous forme de complexe binucléaire de fer ou oxo di-iron (C). Adapté de Kaplan et Ward, 2013 (Kaplan and Ward, 2013).

## 2.2. La toxicité liée au fer

Néanmoins, le fer peut être extrêmement toxique pour les cellules, si ce dernier se retrouve sous forme labile. En effet, ces propriétés d'oxydo-réductions permettent au fer de réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et ainsi de générer des hydroxyles (OH<sup>-</sup>) et des radicaux hydroxyles (OH<sup>·</sup>) par la réaction de Fenton (Figure 2) (Halliwell and Gutteridge, 1992). Ces dérivés font partis des espèces réactives à l'oxygène aussi appelées ROS (*reactive oxygen species*). Les ROS ont un pouvoir oxydant très puissant et peuvent endommager fortement les membranes lipidiques, les protéines et les acides nucléiques.



▲ **Figure 2.** *Réaction de Fenton.* Le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) est capable de réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour donner du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>), générer des hydroxyles (OH<sup>-</sup>) et des radicaux hydroxyles (OH<sup>·</sup>).

## 2.3. Biodisponibilité du fer dans l'environnement

Le fer est un des éléments le plus abondant sur Terre (35% de la masse terrestre est composée de fer). En condition physiologique, c'est-à-dire en présence d'oxygène et à pH neutre, le fer est rapidement oxydé (Fe<sup>3+</sup>). Ce dernier est très peu soluble et polymérise sous forme d'hydroxydes de fer (Spiro et al., 1966). Ainsi, la majorité du fer terrestre est non disponible pour les organismes vivants. Au contraire, le fer sous forme réduite est plus soluble et plus facilement assimilable. Ainsi, les organismes vivants ont développé diverses stratégies pour assimiler le fer. Plusieurs niveaux de régulation existent pour la capture, le transport, l'utilisation, la séquestration et l'entreposage du fer.

## 2.4. Le fer, un facteur de virulence

Le fer est un facteur de virulence majeur chez la plupart des micro-organismes pathogènes humains incluant les bactéries et les espèces fongiques. Ainsi, les mécanismes de capture et de séquestration du fer sont très efficaces chez l'homme. Des études menées

dans les années 1940 avaient révélé que des protéines de hautes affinités pour le fer, présentes dans le sang et dans le blanc d'œuf étaient capables d'inhiber la croissance de plusieurs bactéries comme *Escherichia coli* et même celle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Schade and Caroline, 1944). Ainsi, les protéines du sang (e. g. transferrine) ou du blanc d'œuf (e. g. albumine) fixent le fer avec une affinité très forte. En ajoutant du fer en excès aux milieux de cultures, les auteurs restauraient la croissance des microorganismes. Par cette étude pionnière, ils venaient de démontrer l'importance de ce métal pour la croissance des microbes étudiés. Plus tard, une étude a montré que l'injection de fer permettait de réduire la dose létale de *E. coli* chez le cobaye suggérant ainsi un rôle important du fer dans l'infection (Bullen and Rogers, 1968). Ainsi, le concept d'immunité nutritionnelle a été établi. Ce dernier fait référence au contrôle par l'hôte de nutriments, incluant le fer, essentiels qui affecte la survie et la prolifération des pathogènes (Kochan, 1973). Pour pallier ce contrôle par l'organisme hôte, les organismes pathogènes ont développé de multiples mécanismes pour dérober le fer à leur hôte.

### 2.5. Acquisition du fer chez les organismes unicellulaires

Le fer étant rarement disponible dans l'environnement, en plus du système d'acquisition de fer inorganique, les organismes unicellulaires procaryotes et eucaryotes ont développé plusieurs stratégies pour acquérir du fer de leur hôte (dans le cas par exemple d'infection) ou dans l'environnement. Ainsi, ils peuvent

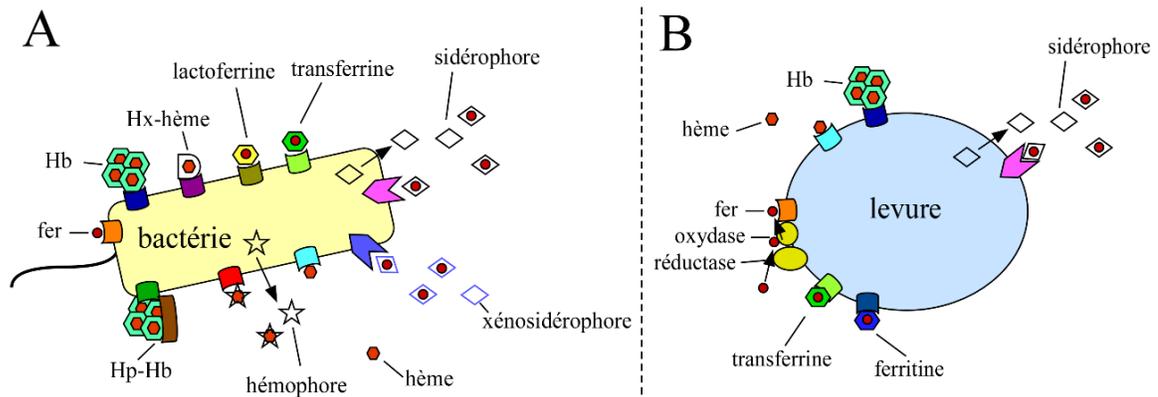
(1) transporter du fer libre via un ou plusieurs systèmes dépendants de réductases de surfaces, comme ceux décrit chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Fre1/2 qui sont des réductases et Fet3/Ftr1 qui codent respectivement pour une oxydase et une perméase) (Dancis, 1998; Hassett et al., 1998; Martins et al., 1998; Spizzo et al., 1997), *Candida albicans* (Fre1/10 qui sont des réductases et Ftr1 qui est une perméase au fer) (Hammacott et al., 2000; Knight et al., 2002; Mamouei et al., 2017; Yamada-Okabe et al., 1996; Ziegler et al., 2011) et chez *Cryptococcus neoformans* (Fre2 et Fre4 codent pour des réductases et Cfo1/Cft1 sont respectivement une oxydase et une perméase (Bairwa et al., 2017; Jung et al., 2009; Saikia et al., 2014)

(2) acquérir du fer directement des protéines comme la transferrine (e.g. TbpA et TbpB chez *Neisseria meningitidis* (Boulton et al., 1999; Schryvers and Stojiljkovic, 1999)), la lactoferrine (e. g. LbpA et LbpB chez *N. meningitidis* (Bonnah and Schryvers, 1998)) ou la ferritine (e. g. Als3 chez *C. albicans*, (Almeida et al., 2008)).

(3) synthétiser des sidérophores (molécules organiques de faible poids moléculaire capables de chélater le fer avec une très grande affinité) et les recapturer (e. g. Str1 transporteur de ferrichrome chez *Schizosaccharomyces pombe* (Mercier and Labbé, 2009; Pelletier et al., 2003), FpvA et FpvB transporteur de pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*, FptA transporteur de pyochéline chez *Pseudomonas aeruginosa* (Schalk and Cunrath, 2016)).

(4) capturer des xénosidérophores synthétisés par d'autres espèces (e. g. Arn1 transporte du ferrichrome chez *S. cerevisiae* (Kim et al., 2002, 2005), Sit1 transporte du ferrichrome chez *C. albicans* (Ardon et al., 2001; Heymann et al., 2002), PfeA et PirA transportent de l'entérobactine chez *P. aeruginosa* (Dean and Poole, 1993; Ghysels et al., 2005))

(5) acquérir de l'hème libre ou l'hème directement des hémoprotéines (voir section 5). Ainsi, cette très grande diversité de sources de fer permet aux espèces de s'adapter rapidement et efficacement à leur environnement (Hood and Skaar, 2012; Palmer and Skaar, 2016; Sheldon et al., 2016) (Figure 3).



▲ **Figure 3.** Acquisition du fer chez les bactéries et les levures. Différents systèmes d'acquisition du fer permettent aux organismes unicellulaires, bactéries (A) et levures (B) de l'acquérir dans leur environnement (Almeida et al., 2009; Barber and Elde, 2015)

## 2.6. Absorption et séquestration du fer chez l'humain

Chez les organismes pluricellulaires, l'assimilation et la séquestration du fer sont très finement régulées. Ainsi, certaines mutations génétiques (e. g. mutations du gène HFE, de l'hepcidine, de la frataxine, de la céruloplasmine...) entraînent des défauts dans l'homéostasie du fer (défaut ou surcharge) comme les anémies, l'hémochromatose, l'ataxie de Friedreich ou encore acéruloplasminémie (Rolfs and Hediger, 1999). De plus, il a été démontré que des défauts dans l'homéostasie martiale augmente la susceptibilité aux infections (McDermid and Prentice, 2006). Le fer est essentiellement acquis au niveau digestif et par recyclage des érythrocytes (érythrophagocytose). Le fer alimentaire est majoritairement présent sous forme ferrique. Ce dernier est absorbé principalement par les entérocytes matures de la partie distale de l'intestin grêle (iléon). Les entérocytes de la partie distale peuvent également importer du fer (duodénum et jejunum) (Fuqua et al., 2012). Avant son transport sous forme ferrique par le transporteur DMT1, le fer est réduit par le cytochrome b duodénale (DCYTB, *duodenal cytochrome b*), ferriréductase membranaire exposée dans la lumière intestinale (Lane et al., 2015). Le bol alimentaire contient également une source importante d'hème (Gulec et al., 2014). Le transport de l'hème dans les entérocytes n'est pas entièrement élucidé. Il est suggéré que l'hème entre via un transporteur ou la molécule est endocytée. Ensuite, l'hème est dégradé par l'hème oxygénase (HMOX1) (Han, 2011). Si la quantité de fer sanguine est suffisante, le fer dans l'entérocyte est stocké dans un complexe multiprotéique de ferritine (Gulec et al., 2014). Sinon, il est exporté par le transporteur ferroportine (FPN1) situé à la membrane basolatérale de l'entérocyte (Gulec et al., 2014). L'efficacité d'exportation du fer par la ferroportine est augmenté par l'activité de l'héphaestine (HP), une ferroxidase ancrée via un domaine transmembranaire (situé en carboxy-terminal) dans la membrane basolatérale des entérocytes (Petрак and Vyoral, 2005). Le fer oxydé par l'HP est ensuite chargé sur la transferrine (TF). Chaque molécule de TF peut fixer deux ions  $Fe^{3+}$ . Cette dernière liée au fer permet sa distribution aux différents tissus via la circulation sanguine. La TF est synthétisée dans le foie (Frazer and Anderson, 2014). Au niveau cellulaire, la transferrine liée au fer est reconnue par le récepteur à la transferrine (TFR). Le complexe est internalisé dans les cellules par endocytose clathrine dépendante. Dans l'endosome, le fer est relargué de la transferrine par le changement de conformation de

la transferrine et la réduction du fer via la réductase endosomale STEAP3 (Anderson and Frazer, 2017). Le fer est ensuite relargué dans le cytoplasme par le transporteur DMT1 (Tabuchi et al., 2000), le complexe TF-TFR est quant à lui recyclé vers la membrane plasmique. Le fer cytoplasmique est soit séquestré au niveau de la ferritine dans le cytoplasme, il peut également être acheminé à la mitochondrie et entrer dans la voie de biosynthèse de l'hème ou des centres fer-soufre, ou encore être exporté par la ferroportine dans le cas d'une trop forte concentration en fer. La céruloplasmine (CP) joue le rôle d'oxydase circulante et permet l'oxydation du fer transporté par la ferroportine.

Dans le cas d'une surcharge en fer dans la circulation sanguine, le foie sécrète une protéine appelée hepcidine, qui se fixe sur la ferroportine induisant son internalisation puis sa dégradation. Cela permet de limiter la libération de fer dans la circulation sanguine (Ganz, 2011). De plus, plusieurs transcrits impliqués dans l'homéostasie du fer sont régulés par deux protéines liant l'ARN ; IRP1 et IRP2. Ces dernières lient leurs transcrits cibles sur des éléments appelés IRE (*iron response element*) au niveau des régions non traduites. Dans une condition carencée en fer, IRP1 et IRP2 se lient sur les transcrits codants pour les ferritines L (light) et H (heavy), la ferroportine, le facteur HIF2 $\alpha$ , la ALAS (l'acide 5-aminolevulinate synthase) et l'aconitase mitochondriale ce qui provoque leur répression traductionnelle. Les protéines IRP1 et IRP2 se lient également aux transcrits codants pour le récepteur de la transferrine et pour le transporteur DMT1, favorisant leur stabilité. En présence de fer, IRP1 est inactivé par la formation d'un centre 4Fe-4S et IRP2 est dégradée (Papanikolaou and Pantopoulos, 2017).

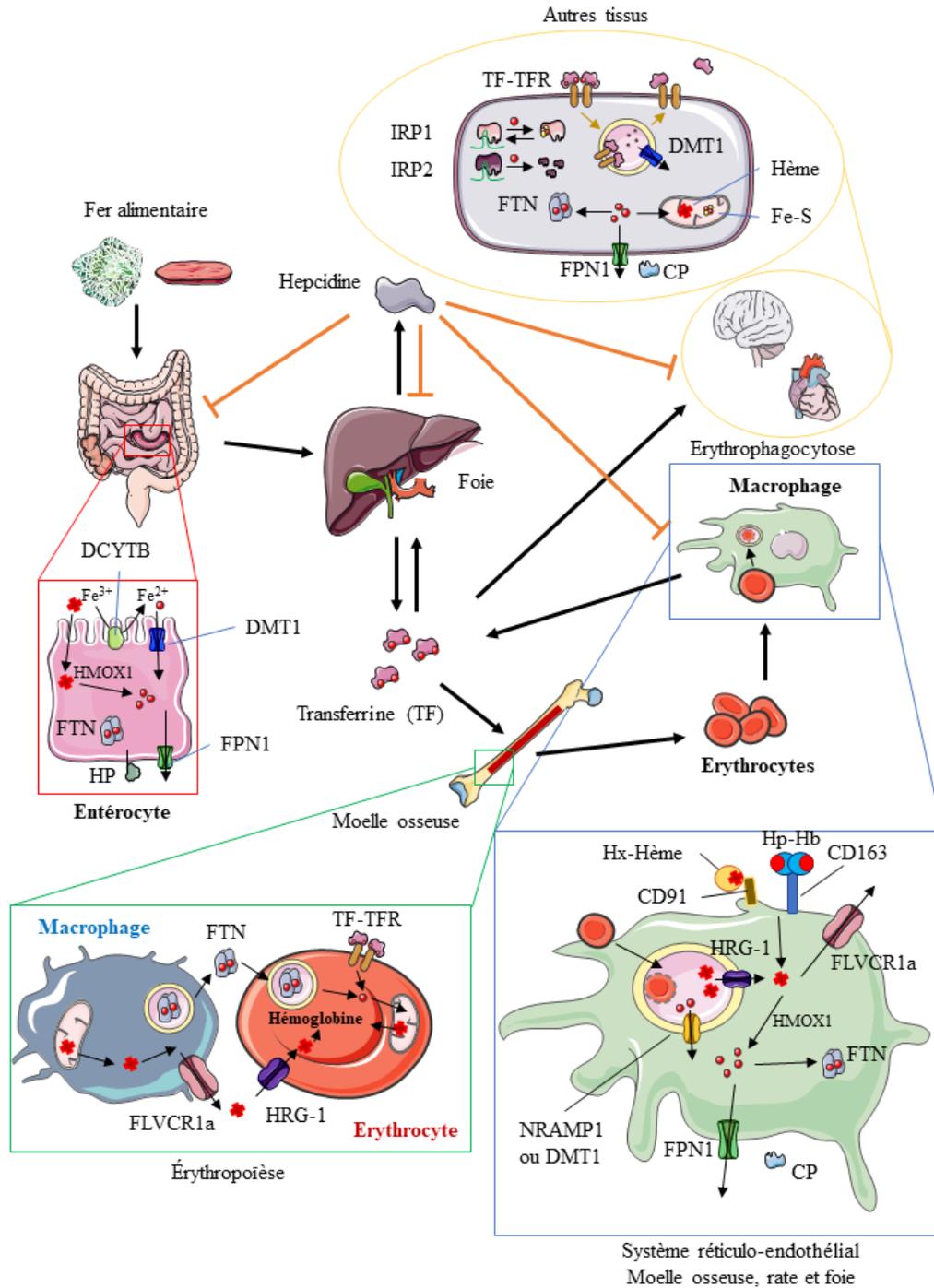
Les érythrocytes contiennent la majorité du fer présent chez l'homme. Ainsi, 58% du fer humain est retrouvé dans l'hémoglobine incluse dans les érythrocytes. La maturation érythrocytaire a lieu dans le foie chez le fœtus puis dans la moelle osseuse chez l'adulte. Les érythrocytes sont issus de la différenciation d'un progéniteur myéloïde, qui se différencie successivement en proérythroblaste, en érythroblaste basophile, en érythroblaste polychromatique et en érythroblaste orthochromatique. Ce dernier est par la suite énucléé pour donner un réticulocyte qui évolue en érythrocyte. Cette différenciation a lieu au niveau de sites appelés îlots érythroblastiques. Les érythrocytes se développent autour de macrophages dits « nourriciers » (ou *nurse macrophages*). Ces macrophages sont

responsables de la régulation de la différenciation des érythrocytes (Palis, 2014). Les progéniteurs érythrocytaires reçoivent majoritairement le fer indispensable à la biosynthèse de l'hème via la transferrine. En effet, ces derniers expriment fortement le récepteur à la transferrine. Néanmoins, d'autres voies existent pour nourrir le progéniteur en fer ou en hème. Ainsi, il a été montré *in vitro* que les macrophages peuvent sécréter de la ferritine capturée par les progéniteurs par micropinocytose (Leimberg et al., 2008). De plus, les progéniteurs érythrocytaires précoces expriment le transporteur d'hème HRG1 (Campbell et al., 2013) et il a également été montré que les macrophages expriment l'exportateur d'hème FLVCR1a (Keel et al., 2008; Knutson et al., 2005). Ainsi, de l'hème pourrait transiter du macrophage vers les précurseurs érythrocytaires lors de la maturation de ces derniers.

Après 120 jours, les érythrocytes sénescents sont recyclés au niveau du système réticuloendothélial par érythrophagocytose par les macrophages présents dans ce tissu. Chaque jour,  $2 \times 10^{11}$  érythrocytes sont recyclés (Ganz, 2012). Après phagocytose par les macrophages, les érythrocytes sont dégradés dans les érythrophagolysosomes. L'hème et le fer issus des érythrocytes sont exportés vers le cytoplasme par HRG1 (White et al., 2013) et NRAMP1 ou DMT1 (Ganz, 2012) respectivement. Dans le cytoplasme du macrophage, le fer est utilisé par les protéines cellulaires, stocké au niveau de la ferritine ou exporté par la ferroportine. Dans le cas de l'hème, l'hème oxygénase HMOX1 présente dans le cytoplasme (Korolnek and Hamza, 2015) et dans l'érythrophagolysosome (Ganz, 2012) a une fonction majeure dans l'érythrophagocytose. En effet, les souris déficientes pour l'hème oxygénase présentent une anémie, une accumulation de fer dans le foie et la rate et une diminution du fer sérique (Poss and Tonegawa, 1997). Les macrophages peuvent également capturer l'hème dans la circulation grâce à deux récepteurs, le CD163 qui reconnaît le complexe hémoglobine-haptoglobine (Kristiansen et al., 2001) et le CD91 reconnaissant l'hème couplée à l'hémopexine (Hvidberg et al., 2005). Les deux récepteurs fixés à leur ligand sont ensuite endocytés (Nielsen and Moestrup, 2009; Thomsen et al., 2013).

Ainsi, le fer est principalement stocké au niveau du foie (environ 1g), des érythrocytes (de 1,8 à 2,5 g), des macrophages (environ 600 mg) et de la moelle osseuse (environ 300 mg). L'organisme humain est donc un milieu pauvre en fer libre, ce dernier étant associé à des protéines (la ferritine, la transferrine, l'hémoglobine...) limitant ainsi sa

toxicité et son acquisition par les microorganismes potentiellement pathogènes (Michels et al., 2015). Le fer est majoritairement stocké sous forme d'hème dans l'organisme humain. De plus, l'hème est la principale source de fer retrouvée dans l'alimentation (Korolnek and Hamza, 2014) (Figure 4).



▲ **Figure 4.** Homéostasie du fer chez l'homme. (voir description dans le texte). DCYTB : cytochrome b duodénale, HMOX1 : hème oxygénase 1, FTN : ferritine, HP : héphaestine, FPN1 : ferroportine, DMT1 : *divalent metal transporter 1*, FLVCR1 et FLVCR2 *feline leukemia virus subgroup C cellular receptors 1 et 2*, HRG-1 : *Heme Responsive Gene-1*, TF : transferrine, TFR : récepteur à la transferrine, CP : céruloplasmine, NRAMP1 : *natural resistance associated macrophage protein 1*, Fe-S centre fer-soufre, IRP1 et IRP2 : *iron response element 1 et 2*.

### 3. L'hème comme source de fer

La molécule d'hème est composée d'un groupement protoporphyrine IX qui coordonne en son centre un atome de fer (Figure 1B). L'hème est impliqué dans de nombreux processus cellulaires et est essentiel pour tous les organismes vivant en aérobie. Ainsi, la molécule d'hème sert de groupement prosthétique à une grande quantité de protéines appelées hémoprotéines comme l'hémoglobine, la myoglobine, certaines sous unités des cytochromes ou encore la catalase. Le niveau d'hème intracellulaire doit néanmoins être rigoureusement contrôlé. En effet, l'hème libre par son caractère hydrophobe est capable de s'insérer dans les membranes et induire de la peroxydation lipidique. De plus, la présence de l'ion fer en son centre lui donne la capacité de générer des radicaux libres qui induisent des dommages aux protéines et aux acides nucléiques toxiques pour la survie cellulaire (Hamza, 2006). L'hème est une source de fer abondante pour les pathogènes humain. En effet, l'hème est la principale source de fer dans le corps humain et deux tiers du fer est séquestré dans l'hème contenu dans l'hémoglobine. De plus, un seul érythrocyte peut contenir jusqu'à 280 millions de molécules d'hémoglobine (Cassat and Skaar, 2013). Ainsi, certains pathogènes fongiques sont capables d'utiliser l'hémoglobine comme source de fer et/ou d'hème (Cadieux et al., 2013), (Kuznets et al., 2014).

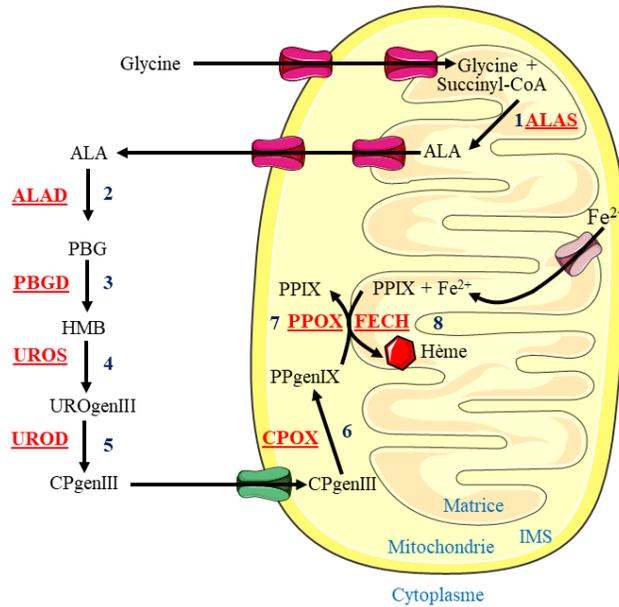
Les organismes vivants ont développé deux grands moyens de s'assurer d'une concentration suffisante en l'hème ; soit ils le synthétisent, soit ils l'acquièrent de façon exogène via des transporteurs spécifiques (Hamza and Dailey, 2012; Korolnek and Hamza, 2014).

#### 3.1. Voie de synthèse endogène de l'hème

La voie de biosynthèse de l'hème (ou *Shemin pathway*) est très conservée chez les eucaryotes. Sa synthèse débute dans la mitochondrie suivie d'étapes se déroulant dans le cytoplasme avant de se terminer dans la mitochondrie (Kresge et al., 2006).

La première étape de biosynthèse de l'hème permet la formation de l'acide 5-aminolevulinate (ALA). Le ALA est issu de la condensation d'une glycine et d'un succinyl-CoA qui est catalysée par l'ALA synthase (ALAS). Chez l'homme l'ALAS est composé

d'un homodimère. Cette première étape de biosynthèse se déroule dans la mitochondrie. Ensuite l'ALA est exporté de la mitochondrie. Deux molécules de ALA sont condensées par une ALA déshydratase (ALAD) en une molécule de monopyrrole porphobilinogène (PBG). Par la suite, quatre PBG sont fusionnés en ligne pour former une molécule de tetrapyrrole hydroxymethylbilane (HMB) par l'hydroxymethylbilane synthase (HMBS). Cette molécule est rendue cyclique par l'uroporphyrinogène synthase (UROS) pour donner l'uroporphyrinogène III. Cette dernière est ensuite décarboxylée par l'uroporphyrinogène décarboxylase (UROD) pour donner une molécule de coproporphyrinogène III. Celle-ci est ensuite transportée vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Dans ce compartiment, le coproporphyrinogène III subit une décarboxylation oxydative sur les groupements propionates A et B qui deviennent des groupement vinyles. La molécule résultante est nommée protoporphyrinogène IX. Les deux dernières étapes se déroulent également dans la mitochondrie. Le protoporphyrinogène IX est oxydé en protoporphyrine IX (PPIX) par la protoporphyrinogène oxidase (PPOX). La dernière étape consiste en l'ajout de fer ferreux dans le macrocycle de PPIX qui donne le protohème IX ou hème. Cet ajout est réalisé par la ferrochelatase (FECH) (Figure 5). L'enzyme limitante de cette biosynthèse est l'ALAS, qui est régulé négativement par la présence d'hème (blocage de la translocation de la pro-enzyme vers la mitochondrie et diminution de la stabilité de l'ARNm) (Hamza and Dailey, 2012).



▲ **Figure 5.** *Voie de biosynthèse de l'hème.* La molécule d'hème est synthétisée par huit enzymes très conservées. Quatre enzymes sont présentes dans la mitochondrie et quatre dans le cytoplasme. La glycine et le succinyl-CoA sont condensés en acide 5-aminolevulinique (ALA) par la ALA synthase (ALAS) (1). Ensuite, le ALA passe dans le cytoplasme où deux molécules sont condensées en porphobilinogène (PBG) par la ALA déshydratase (ALAD) (2). Quatre PBG sont fusionnés en ligne pour former une molécule de tetrapyrrole hydroxyméthylbilane (HMB) par l'hydroxyméthylbilane synthase (HMBS) (3). La HMB est rendue cyclique par l'uroporphyrinogène synthase (UROS) pour donner l'uroporphyrinogène III (UROgenIII) (4). L'UROgenIII est ensuite décarboxylée par l'uroporphyrinogène décarboxylase (UROD) pour donner une molécule de coproporphyrinogène III (CPgenIII) (5). La CPgenIII est transportée à la mitochondrie puis transformée en protoporphyrinogène IX (PPgenIX) par la coproporphyrinogène oxydase (CPOX) (6). Le PPgenIX est oxydé en protoporphyrine IX (PPIX) par la protoporphyrinogène oxydase (PPOX) (7). La dernière étape est réalisée par la ferrochelatase (FECH) qui ajoute un fer ferreux dans le macrocycle de PPIX qui donne le protohème IX ou hème (8). IMS : espace intermembranaire.

### 3.2. Acquisition exogène d'hème

Les systèmes de transport et d'acquisition de l'hème chez les organismes vivants sont moins connus et certains ont été décrits récemment. De plus, il y aurait des mécanismes de transport de l'hème entre les différents compartiments cellulaires. Premièrement, l'hème néosynthétisé est exporté de la mitochondrie vers le cytoplasme. Dans les cellules humaines, ce transport est dépendant de la protéine FLVCR1b (*feline leukemia virus subgroup C*

*cellular receptors*). La protéine FLVCR1b est issue d'un variant d'épissage de la protéine FLVCR1a, qui code pour un exportateur d'hème (Chiabrando et al., 2012). La protéine FLVCR1a est une protéine de type MFS (*major facilitator superfamily transporter*, voir section 6) qui possède douze domaines transmembranaires (Quigley et al., 2000). Outre FLVCR1a, le transporteur ABCG2 permet également d'exporter de l'hème du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (Desuzinges-Mandon et al., 2010). Cette fonction permet certainement de limiter la toxicité qui pourrait être induite par un excès d'hème intracellulaire.

FLVCR2 et HCP-1 (*heme carrier protein 1*) sont deux protéines membranaires prédites qui auraient un rôle dans l'importation de l'hème chez l'homme. FLVCR2 est une protéine homologue aux protéines FLVCR1 à douze domaines transmembranaires de type MFS (Duffy et al., 2010). HCP-1 code pour une protéine à neuf domaines transmembranaires et a été initialement décrite pour transporter du folate et qui pourrait aussi importer de l'hème (Le Blanc et al., 2012 ; Shayeghi et al., 2005). De plus, HCP-1 pourrait être impliquée dans l'export de l'hème des endosomes des macrophages (Schaer et al., 2008). Peu de caractéristiques et de propriétés sont connues à l'heure actuelle sur les modes de transport de l'hème par ces deux protéines.

Chez le ver auxotrophe à l'hème *Caenorhabditis elegans*, les protéines HRG-1 (*heme responsive gene*) et HRG-4 sont importantes pour l'import et l'utilisation de l'hème. HRG-1 et HRG-4 sont des protéines d'environ 19 kDa et contiennent chacune quatre domaines transmembranaires. HRG-4 est localisée à la surface des entérocytes de *C. elegans* et permet le transport de l'hème de la lumière intestinale vers le cytoplasme des entérocytes. La protéine n'est pas conservée chez l'homme (Rajagopal et al., 2008). HRG-1 permet quant à elle le transport de l'hème des endosomes et des lysosomes vers le cytoplasme. Cette dernière est conservée chez l'homme (HRG-1) et permet le transport de l'hème issu des érythrocytes sénescents endocytés puis acheminés vers les phagolysosomes, vers le cytoplasme, lors de l'érythrophagocytose dans les macrophages (White et al., 2013).

### 3.3. Les organismes auxotrophes pour l'hème

Le sentier de la biosynthèse de l'hème est conservé chez la plupart des eucaryotes à l'exception du ver modèle *C. elegans* (Rao et al., 2005) et des parasites trypanosomatidés (Tripodi et al., 2011) comme *Leishmania spp.* (Flannery et al., 2013; Renberg et al., 2015), *Trypanosoma brucei* (Kořený et al., 2013) et *Trypanosoma cruzi* qui eux, sont auxotrophes pour l'hème.

Certaines bactéries sont également auxotrophes pour l'hème (*heme-auxotrophic bacteria*, HAB). Parmi ces HAB, on retrouve notamment *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae* ou encore les bactéries lactiques comme *Lactococcus lactis*. En absence d'hème, ces bactéries utilisent généralement la fermentation, non dépendante de l'hème contrairement à la respiration (Gruss et al., 2012).

Ces espèces deviennent des modèles d'études très intéressants pour le transport de l'hème exogène dont ils sont entièrement dépendant pour leurs hémoprotéines.

## 4. Homéostasie du fer chez *Schizosaccharomyces pombe*

### 4.1. Généralités sur *S. pombe*

Les champignons et les levures font partie du règne des mycètes (ou fungi). Toutes les levures capables de former des cellules binucléées sont incluses dans le sous-règne des dikarya qui comprend les ascomycètes et les basidiomycètes. La levure *S. pombe* appartient au règne des ascomycètes (Hibbett et al., 2007). *S. pombe* vit sous forme haploïde, c'est-à-dire qu'avec une seule copie de chacun de ces chromosomes par cellule. Après duplication du matériel génétique en fin de mitose, un septum se forme au milieu de la cellule. Ainsi, *S. pombe* se divise par fission, d'où son nom de levure à fission ou levure fissipare. Comme la levure à bourgeon *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe* est très utilisée comme organisme modèle en laboratoire (Sabatino and Forsburg, 2010).

## 4.2. Transport du fer chez *S. pombe*

Dans un environnement carencé en fer la levure doit importer ce dernier du milieu extracellulaire. Plusieurs systèmes existent et permettent ainsi une efficacité optimale. Le fer dans l'environnement est majoritairement présent sous forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Pour augmenter sa solubilité, les levures possèdent des réductases de surface. Dans le génome de *S. pombe*, on retrouve un gène noté *frp1*<sup>+</sup> qui code pour la réductase Frp1 prédite pour se localiser à la surface cellulaire. Par homologie avec la réductase de surface Fre1 (*S. cerevisiae*), Frp1 possède un domaine FAD et un domaine NADP qui permettent de générer des électrons nécessaires à la réduction du fer. Ces électrons sont transférés sur deux molécules d'hème et permettent ensuite la réduction du fer de  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  (Matsuyama et al., 2006; Roman et al., 1993). Le fer réduit ( $\text{Fe}^{2+}$ ) peut ensuite être pris en charge par le complexe Fio1/Fip1. Fio1 est une oxydase membranaire dépendante du cuivre pour sa fonction. Son rôle est de réoxyder le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  avant sa prise en charge par la perméase au fer Fip1. Fip1 possède deux motifs REXLE comme son orthologue chez *S. cerevisiae*, Ftr1. Ces motifs présents au niveau des domaines transmembranaires sont essentiels pour le transport du fer par Ftr1 et donc potentiellement pour Fip1 (Askwith et Kaplan, 1997 ; Severance et al., 2004).

Ce système est très efficace pour prendre en charge le fer inorganique. Néanmoins, due à sa toxicité, le fer libre est très peu abondant dans l'environnement et est souvent couplé à des protéines ou de l'hème.

Chez *S. pombe* deux autres systèmes d'acquisition du fer ont été décrits ; l'acquisition des sidérophores et l'assimilation de l'hème.

La levure *S. pombe* est capable de synthétiser un sidérophore, le ferrichrome à partir de l'ornithine. Cette synthèse implique trois protéines ; Sib2, le produit polypeptidique du gène *SPBC17G9.06c* et Sib1. Les gènes *sib1*<sup>+</sup> et *sib2*<sup>+</sup> sont induits en carence de fer, ainsi *S. pombe* produit de l'apo-ferrichrome (c'est-à-dire du ferrichrome non lié à du fer). Une fois produit, le ferrichrome est relargué et peut aller capter du fer dans l'environnement (Mercier and Labbé, 2010). Le ferrichrome couplé au fer est recapturé par la protéine transmembranaire Str1. Le gène *str1*<sup>+</sup> est par ailleurs induit en carence de fer. Str1 code pour une protéine de type MFS (Major Facilitator Superfamily transporter) contenant douze

domaines transmembranaires prédits. La protéine Str1 serait localisée à la surface cellulaire (Matsuyama et al., 2006). Lorsqu'elle est exprimée de façon hétérologue chez *S. cerevisiae* dans laquelle les gènes codant pour l'oxydoréductase Fet3 et les quatre transporteurs de sidérophores (Arn1, Arn2, Arn3 et Arn4) ont été délétés (*FET3Δ ARN1-4Δ*), elle permet à cette dernière d'acquérir du ferrichrome (Pelletier et al., 2003).

### 4.3. Homéostasie de l'hème chez *S. pombe*

La levure à fission a la capacité de néo-synthétiser de l'hème via un sentier de biosynthèse endogène. Bien qu'aucune étude n'ait définie spécifiquement la fonction de chaque enzyme chez *S. pombe*, ces dernières possèdent un haut degré de conservation à comparer à celles retrouvées chez plusieurs autres organismes. Ainsi, les huit enzymes de biosynthèse de l'hème chez *S. pombe* sont codées par les gènes *hem1<sup>+</sup>*, *hem2<sup>+</sup>*, *hem3<sup>+</sup>*, *ups1<sup>+</sup>*, *hem12<sup>+</sup>* *hem13<sup>+</sup>*, *hem14<sup>+</sup>* et *hem15<sup>+</sup>*. Au laboratoire, nous avons démontré que la première enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème Hem1 (ALAS) est essentielle à la survie de la levure. Ainsi, en absence du gène *hem1<sup>+</sup>* (*hem1Δ*), une souche est incapable de survivre, sauf si le milieu est supplémenté en ALA (composé produit par l'enzyme Hem1 par condensation du succinyl-CoA et de la glycine) ou en hémine (Mourer et al., 2015). Par ailleurs, les gènes *hem3<sup>+</sup>* et *ups1<sup>+</sup>* codant respectivement pour les enzymes de la troisième (HMBS) et quatrième étape (UROS) de biosynthèse de l'hème sont réprimés en carence de fer (Mercier et al., 2008). Cela suggère fortement que la voie de biosynthèse de l'hème est régulée négativement en absence de fer, ce dernier étant essentiel pour la dernière étape (FECH). Les organismes qui peuvent utiliser l'hème comme source de fer ou l'utiliser directement comme source d'hème, possèdent des protéines spécialisées pour sa capture et son transport dans les cellules. Chez *S. pombe*, la protéine Shu1 a été la première protéine décrite impliquée dans le transport de l'hème. Le gène *shu1<sup>+</sup>* est induit en carence de fer et est réprimé transcriptionnellement en présence d'une concentration suffisante de fer. Cette répression est dépendante du facteur de transcription Fep1. Ce dernier se fixe au niveau de motifs GATA situés sur le promoteur du gène *shu1<sup>+</sup>*. Le gène *shu1<sup>+</sup>* code pour une protéine de 226 acides aminés. L'analyse bioinformatique de la protéine Shu1 a mis en évidence l'existence d'une

séquence (vingt premiers acides aminés) qui correspondrait à un signal peptidique et qui permettrait à la protéine d'être acheminée à la surface cellulaire. De plus, la protéine posséderait dans sa portion carboxyl-terminale 26 acides aminés composant une région très hydrophobe. Dans cette région se retrouve une sérine en position 199, qui servirait de site d'attachement à une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) permettant la liaison de la protéine Shu1 à la membrane plasmique. Shu1 possède quatre cystéines parmi les sept que contient la protéine qui ont un arrangement proche à celui retrouvé chez les protéines CFEM (*common in several fungal extracellular membrane proteins*). Ainsi, les cystéines aux positions 72, 87, 92 et 101 sont organisés en motif CFEM « partiel », C<sup>72</sup>X<sub>14</sub>C<sup>87</sup>X<sub>4</sub>C<sup>92</sup>X<sub>8</sub>C<sup>101</sup>. La protéine Shu1 est capable de lier de l'hème in vitro, avec une constante de dissociation ( $K_D$ ) de 2,2  $\mu$ M. Cette liaison est abolie dans les deux conditions lorsque les quatre cystéines du motif CFEM « partiel » sont mutées en alanine. En outre, ces mutations n'affectent pas la localisation de la protéine Shu1. La protéine Shu1 est localisée à la surface cellulaire. La digestion de la paroi de la cellule à la zymolyase permet toujours d'observer Shu1 à la membrane plasmique des sphéroplastés suggérant qu'une grande partie de la protéine est localisée à la membrane plasmique. À l'heure actuelle, nous ne pouvons pas écarter la possibilité qu'une partie de la population protéique soit localisée dans la paroi. La protéine Shu1 est impliquée dans l'assimilation de haute affinité de l'hème. Ainsi, une souche délétée pour le gène *hem1*<sup>+</sup> est capable de croître en présence de 0.075  $\mu$ M d'hème. En revanche si la souche est doublement délétée pour le gène *hem1*<sup>+</sup> et *shu1*<sup>+</sup> (*hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$ ), cette dernière est fortement affectée et est incapable de croître normalement en présence de 0.075  $\mu$ M d'hème, démontrant une participation de Shu1 dans l'assimilation d'hème (Mourer et al., 2015). En présence d'hème, Shu1 transite de la surface cellulaire vers la vacuole selon un sentier inconnu. Le composé fluorescent analogue de l'hème, la zinc-mésoporphyrine (ZnMP), à une faible concentration (2  $\mu$ M), transite premièrement par la vacuole et est ensuite redistribué dans le cytoplasme des cellules. En absence d'expression de *shu1*<sup>+</sup> (*hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$ ), ce dernier est absent des cellules. La présence de Shu1 est donc nécessaire pour que le composé transite dans les vacuoles. Le relargage de la ZnMP dans le cytoplasme est dépendant de présence de la protéine vacuolaire Abc3. En effet, en absence de *abc3*<sup>+</sup> (*hem1* $\Delta$  *abc3* $\Delta$ ) la ZnMP reste à l'intérieur des vacuoles. La protéine Abc3 est induite en carence de fer. Elle appartient à la famille des transporteurs de type ATP-binding cassette

(ABC). La protéine Abc3 lie l'hème via un motif CP inversé correspondant aux acides aminés proline 151 et cystéine 152 (P<sup>151</sup>C<sup>152</sup>). De plus, l'absence ou la mutation de Abc3 dans une souche exprimant *shu1*<sup>+</sup>, mais pas *hem1*<sup>+</sup> (*hem1Δ abc3Δ* ou *hem1Δ abc3Δ + abc3<sup>+</sup> P<sup>151</sup>A C<sup>152</sup>A*) empêche la croissance normale en présence de 0.075 μM d'hème. Bien que la présence d'Abc3 soit importante pour le transit de la ZnMP (ou de l'hème) de la vacuole vers le cytoplasme son mécanisme d'action dans l'homéostasie de l'hème reste encore à être caractérisé (Mourer et al., 2017) (Figure 8C).

#### 4.4. Contrôle de l'expression des gènes d'assimilation du fer

Chez *S. pombe*, deux facteurs ont été décrit pour réguler au niveau transcriptionnel l'expression des gènes dépendant du fer. Cette régulation permet de maintenir une concentration en fer adéquate pour une croissance cellulaire.

##### 4.4.1. Fep1 réprime les gènes codant pour les protéines d'acquisition du fer en présence d'un excès de fer

Le facteur de transcription Fep1 est une protéine à doigt de zinc qui reconnaît spécifiquement un élément (A/T)GATA(A/T/G) dans le promoteur de ses gènes cibles. Fep1 est retrouvée sous forme homodimérique. La protéine possède deux doigts de zinc notés ZF1 (*zinc finger 1*) et ZF2 qui sont importants pour la liaison de Fep1 à la chromatine. Le domaine ZF2 est crucial pour la liaison de Fep1 à l'ADN, tandis que ZF1 augmente l'affinité de Fep1 pour la chromatine (Pelletier et al., 2005). De plus, un motif composé de quatre cystéines (*Cys-rich region*) inclue entre les deux régions ZF1 et ZF2 est important pour jauger la concentration en fer dans la cellule. Il est à l'heure actuelle pas clair si ces quatre cystéines lient un atome de fer ou un centre fer-soufre. Ainsi, en présence de suffisamment de fer, Fep1 par sa fixation directe sur la chromatine réprime l'expression de ses gènes cibles. Fep1 permet la répression transcriptionnelle des gènes codant pour les protéines permettant l'import de fer comme le système d'import du fer inorganique, les gènes *fip1*<sup>+</sup>, *fio1*<sup>+</sup>, *fip1*<sup>+</sup>. D'autres gènes cibles régulés par Fep1 comprennent ; *sib1*<sup>+</sup> et *sib2*<sup>+</sup> qui codent pour des protéines de la voie de biosynthèse des sidérophores, *str1*<sup>+</sup> et *str2*<sup>+</sup> qui codent pour des

transporteurs de sidérophores, *shu1*<sup>+</sup>, *abc3*<sup>+</sup> et *str3*<sup>+</sup> qui codent pour des protéines impliquées dans l'acquisition d'hème exogène. Sur la chromatine, Fep1 forme un complexe avec Tup11 et probablement Tup12 qui agissent comme corépresseurs (Znaidi et al., 2004).

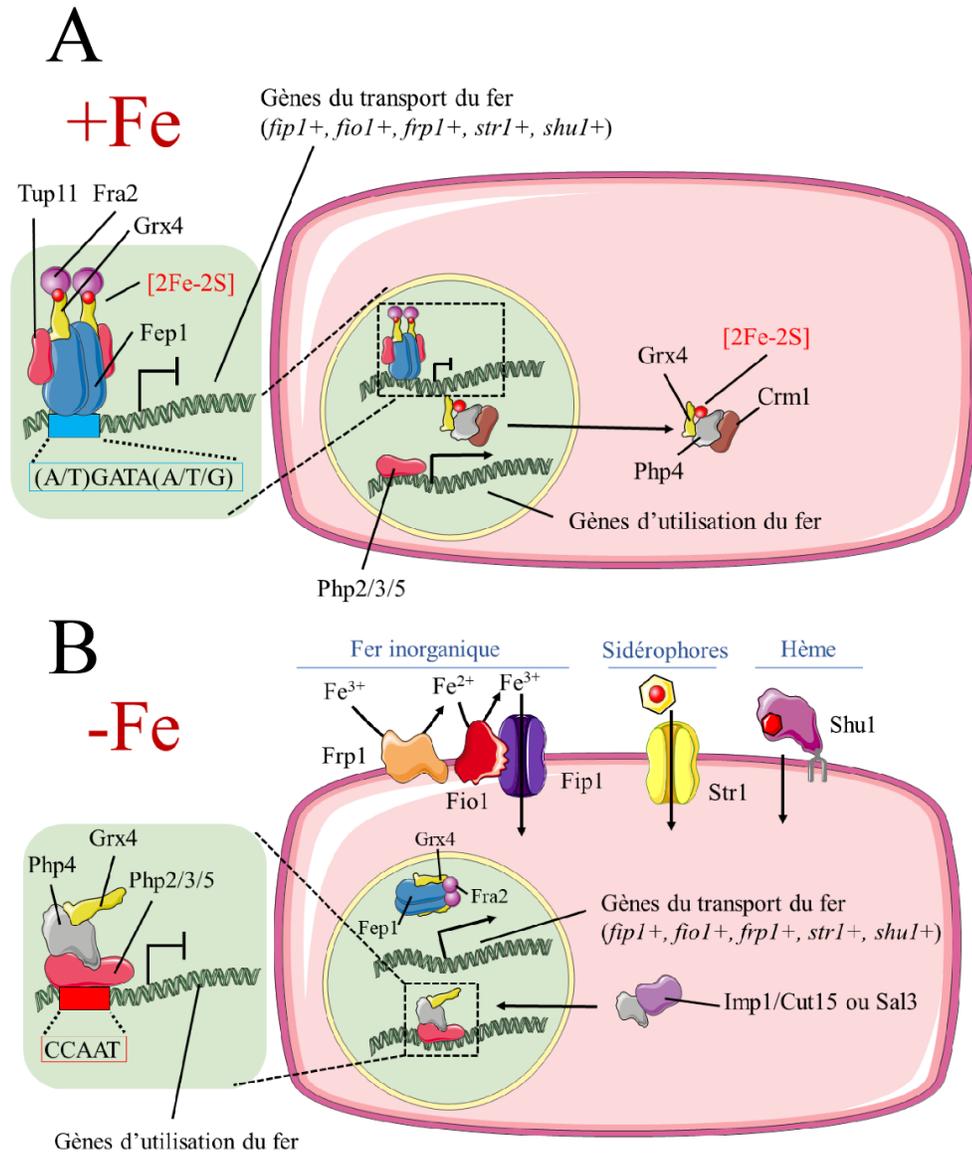
Les gènes cibles de Fep1 sont par conséquent exprimés en carence de fer. Néanmoins, le ou les activateur(s) de ces gènes est (sont) pour le moment inconnu(s). En absence de fer, Fep1 est inactif et non présent sur la chromatine, mais reste localisée dans le noyau (Jacques et al., 2014; Pelletier et al., 2005). Ainsi, Fep1 agit comme un senseur de la concentration intracellulaire en fer. En revanche, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce phénomène ne sont pas connus. La partie amino-terminale de la protéine est responsable de jauger le niveau de fer intracellulaire (Jbel et al., 2009) via la région riche en cystéines appelée *Cys-rich region*. Quatre cystéines de cette région sont hautement conservées (Cys70, 76, 85 et 88 dans le cas de Fep1) et pourrait être impliquées dans la liaison d'un centre fer-soufre (Kim et al., 2016).

La protéine Fep1 possède des partenaires protéiques ; Grx4 et Fra2, qui permettent de réguler Fep1 en absence de fer. Grx4 est une glutarédoxine monothiol contenant deux domaines annotés TRX (*thioredoxin-like domain*) dans la portion amino-terminale et GRX (*glutaredoxin-like domain*) en carboxy-terminale de la protéine. Le domaine TRX est constitutivement lié à la partie carboxy-terminale de Fep1. Néanmoins, le domaine GRX s'associe à la partie amino-terminale de Fep1 en absence de fer et se dissocie en présence de fer (Jbel et al., 2011). Fra2 est une protéine de type BolA qui est liée au complexe Grx4-Fep1. En présence de fer, Fra2 est associée à Grx4 via un centre fer-soufre, ce dernier serait éliminé ou transféré en carence de fer (Encinar del Dedo et al., 2015). Fra2 agit comme co-inactivateur de Fep1 en présence de fer, en effet en absence de Fra2 (*fra2Δ*) ou de Grx4 (*grx4Δ*), Fep1 est constitutivement actif sur la chromatine de ses gènes cibles (Jacques et al., 2014). En plus de la régulation post-traductionnelle de Fep1 par Grx4 et Fra2, le gène *fep1*<sup>+</sup> est réprimé transcriptionnellement par Php4 en carence de fer (Mercier et al., 2008) (Figure 6A).

#### 4.4.2. Contrôle transcriptionnel du système d'économie du fer par Php4

En condition de carence en fer, les gènes codant pour les protéines qui utilisent du fer sont réprimés. Chez plusieurs bactéries, le petit ARN régulateur RhyB est impliqué dans l'élimination de ces transcrits (Massé et al., 2007). De même chez *S. cerevisiae*, les transcrits codant pour les protéines utilisant du fer sont reconnus par les protéines liant l'ARN, Cth1 et Cth2, puis éliminés (Martínez-Pastor et al., 2013). Chez *S. pombe* et les levures filamenteuses (e. g. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*), la régulation de ces gènes est faite au niveau transcriptionnel via des complexes protéiques liant les promoteurs des gènes cibles sur des éléments CCAAT. Chez *S. pombe*, les facteurs liant les éléments CCAAT sont nommés Php2, Php3, Php4 et Php5. Parmi ces dernières, les protéines Php2, Php3 et Php5 sont nécessaires pour la liaison du complexe à l'ADN. Le complexe composé des protéines Php2, Php3 et Php5 est constitutivement lié à l'ADN et n'est pas affecté par la présence ou l'absence de fer. La protéine Php4 se lie au complexe en absence de fer et permet la répression transcriptionnelle des gènes cibles. Ainsi, 86 gènes sont régulés négativement par Php4 (Mercier et al., 2008). Parmi ces gènes, 55% d'entre eux codent pour des protéines qui requièrent du fer comme cofacteur ou encore pour des protéines qui sont associées à des processus cellulaires fer-dépendant comme le cycle de Krebs, la synthèse des centres fer-soufre, la chaîne de transport des électrons mitochondriale, la synthèse d'hème, la synthèse d'acides aminés, la synthèse d'acides gras ou la synthèse de stérols. La protéine Php4 possède dans sa portion amino-terminale un domaine conservé (sKewvIPpRpKPGRKp) qui lui permet d'interagir directement avec le complexe Php2/Php3/Php5. En absence de fer, Php4 est importée au noyau par les protéines karyophérines Imp1, Cut15 et Sal3. En effet, Php4 possède deux séquences de localisation nucléaire (NLS, *nuclear localization sequences*) entre les acides aminés 171 et 174 (KRIR) et entre les acides aminés 234 et 240 (KSVKRVR) (Khan et al., 2014). En présence de fer, l'exportation de Php4 du noyau vers le cytoplasme est dépendante de la protéine Crm1. Php4 possède une séquence d'export nucléaire (NES, *nuclear export signal*) conservée (<sup>93</sup>LLEQLEML<sup>100</sup>) qui est requise pour cet export (Mercier and Labbé, 2009). Php4 interagit constitutivement avec la protéine Grx4 via le domaine TRX de cette dernière. En présence

de fer, le domaine GRX de Grx4 interagit avec Php4 via un centre fer-soufre permettant l'inactivation de Php4 (Dlouhy et al., 2017; Vachon et al., 2012) (Figure 6B).



▲ **Figure 6.** Régulation de l'homéostasie du fer chez *S. pombe*. A. En présence de fer, le facteur de transcription Fep1 est présent sur la chromatine des promoteurs (au niveau d'éléments GATA) de ses gènes cibles codant pour les protéines de transport du fer. Le corépresseur Tup11, ainsi que Fra2 et Grx4 sont liés à Fep1. La protéine Php4 est exportée du noyau par l'exportine Crm1. B. En carence de fer, Php4 est amené au noyau par les importines Imp1, Cut15 et Sal3. En se fixant au complexe Php2, Php3 et Php5, Php4 réprime la transcription des gènes codant pour des protéines utilisatrices de fer. En revanche, Fep1 se décroche de la chromatine de ses gènes cibles. Ainsi, Frp1, Fio1 et Fip1 qui sont exprimés permettent l'import de fer inorganique, alors que Str1 importe du ferrichrome et que Shu1 provoque l'entrée d'hème.

## 5. Homéostasie de l'hème chez les levures

### 5.1. Chez *Saccharomyces cerevisiae*

La levure à bourgeon est incapable d'utiliser l'hème exogène comme source de fer (Santos et al., 2003). Néanmoins, *S. cerevisiae* est capable de biosynthétiser de l'hème. Cette biosynthèse est plus forte lorsque la cellule se retrouve sur un milieu non fermentable. Ainsi, l'activité de l'ALAD (*aminolevulinate dehydratase*) est augmentée dans ces conditions (Sakurada and Matsumura, 1966). Aucun transporteur d'hème n'a été caractérisé chez cette levure à ce jour. Néanmoins, dans une condition hypoxique, la protéine Pug1 est induite et est capable d'importer de la PPIX et d'exporter de l'hème permettant ainsi le contrôle homéostatique de l'hème en absence d'oxygène (Protchenko et al., 2008).

### 5.2. L'import de l'hème chez *Candida albicans* est dépendant des protéines CFEM

*C. albicans* est une levure polymorphique et commensale de l'homme. Elle est principalement retrouvée au niveau de la peau, de la cavité buccale, de l'intestin et de la flore vaginale. Chez les sujets en bonne santé, les infections à *C. albicans* ou candidoses, sont généralement localisées au niveau des organes où réside naturellement la levure. En revanche, chez les sujets immunodéprimés (ayant notamment subi une greffe, une chimiothérapie ou les patients atteints du VIH), elle peut causer des infections létales notamment des septicémies (de Oliveira Santos et al., 2018). Les facteurs de virulence associés à la pathogénicité de *C. albicans* sont le changement morphologique, l'expression d'adhésines, la production d'enzymes hydrolytiques endommageant les tissus et la formation de biofilm (Mayer et al., 2013 ; Sardi et al., 2013).

L'acquisition de fer est un facteur de virulence majeur chez *C. albicans*, son acquisition est requise pour infecter un hôte (Ramanan and Wang, 2000). Contrairement à *S. cerevisiae*, *C. albicans* est capable d'utiliser l'hème comme source de fer et ce, de façon dépendante de la présence de l'hème oxygénase Hmx1 (Santos et al., 2003).

Le système d'acquisition de l'hème chez *C. albicans* est composé de protéines possédant des domaines appelés CFEM. Les protéines Rbt5 et Rbt51 (ou Pga10) ont été les deux premières protéines à domaine CFEM à avoir été décrites comme impliquées dans l'assimilation de l'hème chez *C. albicans*.

Il existe quatre protéines à domaines CFEM chez *C. albicans* impliquées dans l'import d'hème : Rbt5, Pga7, Pga10 et Csa2. Ces dernières sont capables de lier directement de l'hème ainsi que de l'extraire à partir de l'hémoglobine. La protéine Csa2 est sécrétée tandis que Pga7, Rbt5 et Pga10 sont ancrées via une ancre GPI à la paroi ou à la membrane plasmique. Ainsi, l'hème transite d'une protéine à l'autre sous forme de relai jusqu'à l'intérieur de la cellule (Kuznets et al., 2014).

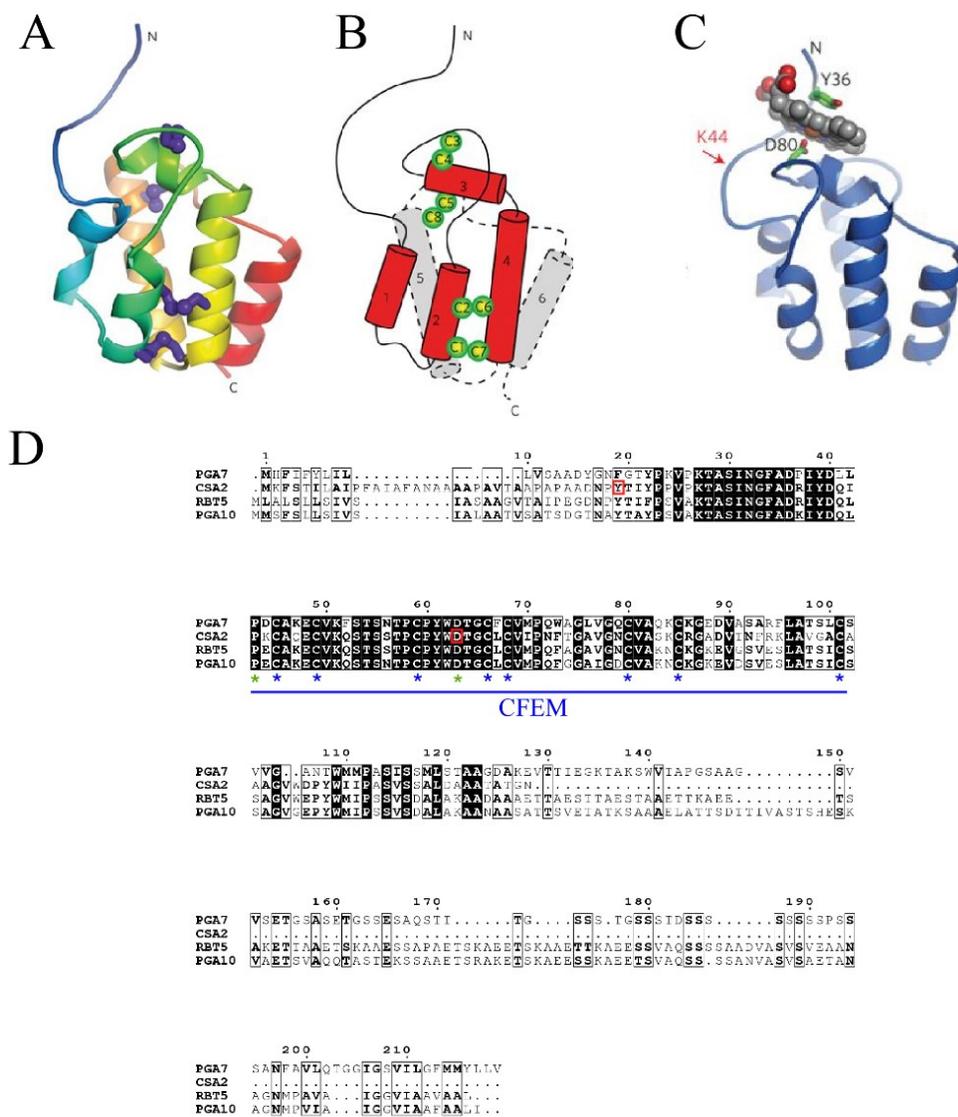
Les protéines à domaines CFEM sont présentes que chez les levures et les plantes et elles sont souvent associées à la virulence fongique (Kulkarni et al., 2003). Ainsi, la première protéine possédant un domaine CFEM à avoir été décrite est ACI1, protéine de la levure *Magnaporthe grisea* qui infecte le riz. La présence de cette dernière est essentielle pour la virulence de *M. grisea* (Kulkarni and Dean, 2004). De même, l'absence de Pga7 dans une souche de *C. albicans* diminue sa virulence dans un modèle murin d'infection systémique (Kuznets et al., 2014). L'ARNm codant pour Rbt5 est l'un des ARN les plus induits dans un modèle expérimental d'infection murin pour *C. albicans* (Amorim-Vaz et al., 2015). De plus, des anticorps anti-Rbt5 sont retrouvés dans les sérums de patients atteints de candidoses systémiques (Mochon et al., 2010). La délétion des gènes codant pour Rbt5 et Pga10 entraîne des défauts dans la capacité de la levure à former du biofilm (Pérez et al., 2006)

Un domaine CFEM est composé de huit cystéines conservées et arrangées selon le motif suivant ;  $PxC[A/G]x_2Cx_{8-12}Cx_{1-3}[x/T]Dx_{2-5}Cx_{9-14}Cx_{3-4}Cx_{15-16}C$  (ou x représente n'importe quel acide aminé). Les domaines CFEM sont généralement présents dans des régions hydrophobes des protéines (35 à 45 % de résidus hydrophobes) (Kulkarni et al., 2003).

Récemment, la structure de Csa2, a été élucidée. Csa2 est composée de 6 hélices  $\alpha$  qui forment une structure en panier. Ce repliement est possible grâce à la formation de ponts disulfures entre les huit cystéines conservées du domaine CFEM. En effet, la cystéine 1 interagit avec la cystéine 7, la cystéine 2 avec la cystéine 6, la cystéine 3 avec la cystéine 4

et la cystéine 5 avec la cystéine 8. La coordination de la molécule d'hème est prédite pour s'effectuer au sommet de la structure protéique via la tyrosine 36 et l'acide aspartique 80. La tyrosine coordonnerait la structure carbonée, tandis que l'acide aspartique coordonnerait l'atome de fer (Nasser et al., 2016) (Figure 7).

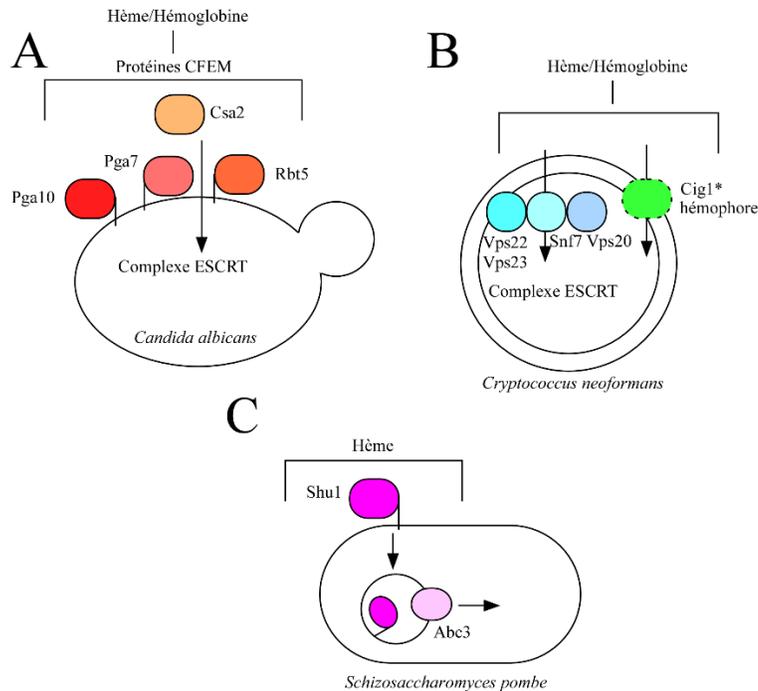
Un complexe multiprotéique ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) serait impliqué dans l'endocytose de l'hème vers l'intérieur de la cellule (Weissman et al., 2008) (Figure 8A).



▲ **Figure 7.** Les quatre protéines à domaine CFEM impliquées dans l'homéostasie de l'hème chez *C. albicans*. A et B. Le domaine CFEM de Csa2 a été cristallisé, il est composé de six hélices  $\alpha$ , contenant huit cystéines conservées. Les huit cystéines (ronds verts) forment des ponts disulfures deux à deux ce qui permet d'arranger la structure « en panier ». C. Les deux acides aminés importants pour coordonner la molécule d'hème au sommet du domaine CFEM sont la tyrosine 36 (Y36) et l'acide aspartique 80 (D80). D. L'alignement de Csa2, Pga7, Rbt5 et Pga10 montre la conservation des huit cystéines du domaine CFEM (PxC[A/G]<sub>x2</sub>C<sub>x8-12</sub>C<sub>x1-3</sub>[X/T]DX<sub>2-5</sub>C<sub>x</sub>C<sub>x9-14</sub>C<sub>x3-4</sub>C<sub>x15-16</sub>C). Par ailleurs, l'acide aspartique (D encadré en rouge) est conservé dans les quatre protéines. La tyrosine (Y encadré en rouge) est conservée chez Csa2, Rbt5 et Pga10 mais pas chez Pga7 (Nasser et al., 2016). L'alignement de séquences a été réalisé avec le programme Clustal-Omega (Sievers and Higgins, 2014), puis traité avec le programme ESPript 3.0 (Robert and Gouet, 2014).

### 5.3. Le transport de l'hème chez *Cryptococcus neoformans*

La protéine Cig1 exprimée chez *C. neoformans* est capable de lier de l'hème. Cependant, elle ne possède pas de motif conservé de liaison à l'hème. En revanche, la délétion du gène codant pour Cig1, entraîne un retard de croissance des souches en présence d'hème, et diminue la virulence de *C. neoformans* chez la souris. Cig1 agirait comme un hémophore capable de capter de l'hème dans l'environnement (Cadieux et al., 2013). Cependant, la localisation et le mécanisme de transport de la molécule d'hème dans la cellule restent à définir. Certaines composantes des complexes ESCRT-I, II et III semblent impliquées dans l'import d'hème, car les délétions des gènes codant pour Vps23 (ESCRT-I), Vps22 (ESCRT-II), Snf7 et Vps20 (ESCRT-III), entraînent un défaut de croissance en présence d'hème comme seule source de fer (Hu et al., 2015) (Figure 8B).



▲ **Figure 8.** *L'import de l'hème chez les levures C. albicans, C. neoformans et S. pombe.* A. Chez *C. albicans*, les protéines à domaine CFEM, Rbt5, Pga7, Pga10 et Csa2 sont impliquées dans le transport de l'hème seul ou l'hème arraché de l'hémoglobine. Ensuite, l'hème est internalisé dans la cellule par le complexe ESCRT. B. Chez *C. neoformans*, l'hémophore Cig1 permettrait la capture de l'hème. Les protéines du complexe ESCRT, Vps20, Vps22, Vps23 et Snf7 permettent le transport de l'hème dans la cellule. C. Chez *S. pombe*, la protéine Shu1 est responsable de l'internalisation de l'hème du milieu extracellulaire vers la vacuole. Ensuite, la protéine Abc3 permet l'export de l'hème de la vacuole vers le cytoplasme. \* Aucune localisation de Cig1 n'a été montrée expérimentalement

## 6. Les protéines de transport de type MFS

### 6.1. La structure et le fonctionnement des MFS

Le transport moléculaire à travers les membranes cellulaires peut se faire en absence ou en présence de protéines transmembranaires. Dans le cas où ce dernier est effectué sans protéine, on parle de diffusion. Les protéines membranaires sont classifiées en deux catégories : les protéines de type « canaux » qui sont ouvertes aux deux extrémités de la protéine. Ainsi, ce type de protéine va permettre le passage de son ligand dans le sens du gradient. Les transporteurs quant à eux, sont capable de transporter leur ligand contre le

gradient et sont dits actifs en opposition aux canaux qui sont dits passifs. Les transporteurs sont séparés en deux groupes. Le premier groupe est appelé transporteur actif primaire. Il est composé des protéines hydrolysant un substrat pour être actif. Ainsi, parmi ces protéines sont retrouvés les transporteurs de type ABC, qui lient une molécule d'ATP et hydrolyse cette dernière dans le but de transporter leur ligand. Le deuxième groupe est appelé transporteur actif secondaire et est divisé en trois types de protéines : les symporteurs (ou co-transporteurs) qui transportent deux ligands dans le même sens, les antiporteurs (ou échangeurs) qui transportent deux ligands dans des sens opposés et les facilitateurs (ou uniporteurs) qui transportent un seul substrat. Cette dernière catégorie est parfois classifiée comme un troisième type de transporteur à part des transporteurs actifs secondaires (Figure 9A). Les transporteurs actifs secondaires utilisent en général, le potentiel électrochimique d'un ion co-transporté comme un proton ( $H^+$ ) ou du sodium ( $Na^+$ ) (Shi, 2013; Yan, 2015).

Les MFS sont des protéines ubiquitaires qui représentent la grande majorité des transporteurs actifs secondaires. Plus de 15 000 séquences de MFS sont répertoriées dans le règne du vivant. Ces protéines peuvent transporter une très grande variété de substrats tels que les ions organiques et inorganiques, les nucléosides, les acides aminés, les peptides de petite taille et les lipides (Yan, 2015).

La première protéine de type MFS à avoir été cristallisée est le symporteur lactose/proton LacY exprimé chez *E. coli* (Abramson et al., 2003). À ce jour, il existe vingt-quatre structures de MFS répertoriées dans la base de données PDB (*Protein Data Bank*). La plupart de ces structures sont bactériennes (19), deux structures correspondent aux transporteurs de sucres humains (GLUT1 et GLUT3). Enfin, le transporteur de fructose GLUT5 a été cristallisé à partir du rat et de la vache, et le symporteur de nitrate/proton de NRT1.1 chez *Arabidopsis thaliana*. Ces structures permettent de mieux comprendre les mécanismes qui régissent le transport par les MFS.

Les différentes protéines MFS ont été cristallisées dans trois conformations différentes ; la conformation ouverte vers le cytoplasme (*inward open*) (e.g. LacY) (Abramson et al., 2003), la conformation fermée (*occluded*) (e. g. EmrD) (Yin et al., 2006) et la conformation ouverte vers le milieu extracellulaire (*outward open*) (e. g. FucP) (Dang et al., 2010) (Figure 9C).

Sauf exceptions, la majorité des transporteurs MFS partagent la même organisation structurale. Ainsi, ils sont composés de douze domaines transmembranaires qui sont annotés de TM1 à TM12. La structure du MFS est séparée en deux régions symétriques appelées domaine N qui contient les six premiers TM (TM1 à TM6) situés en N-terminal de la protéine et domaine C qui inclue les six derniers TM (TM7 à TM12). Les domaines TM6 et TM7 sont séparés par une longue boucle cytoplasmique. Les extrémités N- et C- terminales des protéines MFS sont par ailleurs localisées dans le cytoplasme. Les régions N et C présentent une pseudo symétrie dont l'axe est perpendiculaire à la membrane lipidique. Par ailleurs, chaque région est constituée d'une structure pairée répétée. Ainsi, la région N est composée du TM1 à 3 répété par le TM4 à 6 et la région C quant à elle est composée du TM7 à 9 qui sont répétés par le TM10 à 12. La structure répétée présente une rotation d'environ 180°C par rapport à la structure de référence, parallèle à la membrane lipidique (Shi, 2013; Yan, 2015) (Figure 9B).

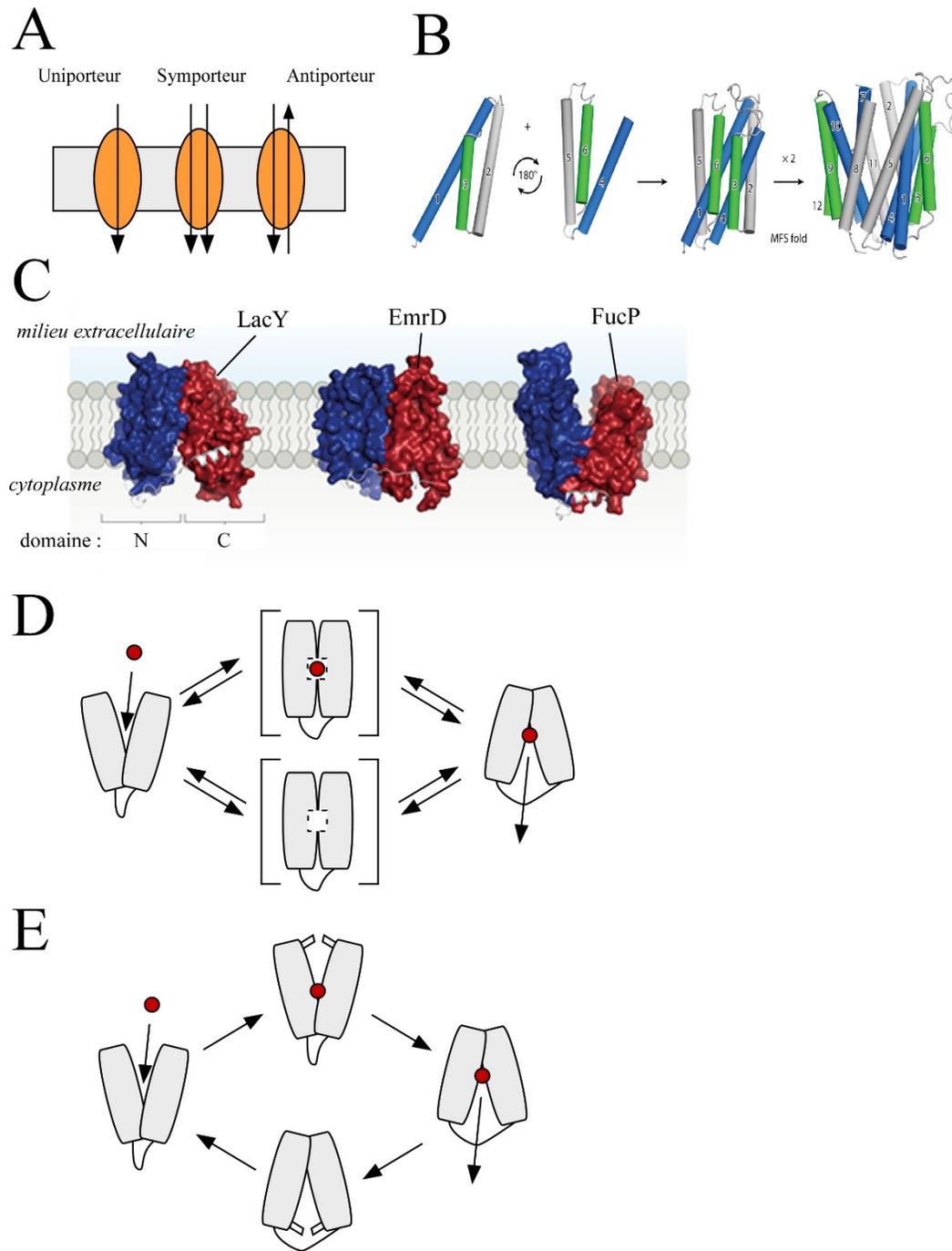
Bien avant la cristallisation des MFS, un modèle de transport avait été établi dans les années 1960. Ce modèle appelé « *alternate access model* » émettait l'hypothèse que les transporteurs changent de structure en présence de leur ligand. Ainsi, le ligand se fixant dans le centre de la protéine, préalablement ouverte vers le milieu extérieur, cette dernière change de conformation et s'ouvre vers le cytoplasme pour relâcher le ligand dans la cellule (Jardetzky, 1966).

Grâce aux différentes structures de MFS obtenues par les différents groupes, deux modèles de transport ont été établis ; le « *rocker-switch* » et le « *clamp and switch* ». Le modèle du « *rocker-switch* » a été le premier à être établi et va dans le sens de la théorie avancée par Jardetzky (Jardetzky, 1966). Ce modèle propose une rotation en miroir des régions N et C, autour d'un axe central matérialisé par le ligand. Dans ce modèle, la fixation du ligand a un rôle primordial dans le changement de conformation de la protéine. Ainsi, cette dernière est en conformation ouverte vers le milieu extracellulaire. En présence de son ligand, elle passe en position fermée transitoire puis en conformation ouverte vers le cytoplasme permettant le relargage du ligand et repasse en position fermée transitoire sans ligand. Des interactions électrostatiques au sommet et à la base de la protéine dans les

conformations ouverte vers le cytoplasme et ouverte vers le milieu extracellulaire respectivement, semblent très importantes dans ce modèle (Law et al., 2008) (Figure 9D).

Le deuxième modèle établi appelé « *clamp and switch* », permet d'expliquer la présence de structures intermédiaires dans la conformation fermée des MFS. Ces deux stades sont appelés « *inward-facing occluded* » et « *outward-facing occluded* ». La fermeture du site de liaison de ces deux conformations est réalisée par des clamps. Ainsi, la fermeture du site de liaison en conformation « *outward-facing occluded* » est réalisée par les extrémités des TM1 et TM7, tandis que la fermeture du site de liaison dans la conformation « *inward-facing occluded* » est faite par les extrémités des TM4 et TM10. Une fois les clamps fermés dans une position ou une autre, une étape de « *switching* » est réalisée, soit vers le cytoplasme ou soit vers le milieu extracellulaire, permettant le relargage du ligand dans le cytoplasme ou la réouverture du transporteur, respectivement (Quistgaard et al., 2016) (Figure 9E).

▼ **Figure 9.** *Structure et modes de transports des MFS.* A. Il existe trois types de protéines MFS, les uniporteurs qui transportent un seul ligand, les symporteurs qui transportent deux ligands dans le même sens et les antiporteurs qui transportent deux ligands dans deux sens opposés. B. Les transporteurs MFS sont composés de douze domaines transmembranaires annotés de TM1 à TM12. La structure du MFS est séparée en deux régions symétriques appelés région N pour les six premiers TM (TM1 à TM6) situés en N-terminal de la protéine et région C pour les six derniers TM (TM7 à TM12). Les régions N et C présentent une pseudo symétrie dont l'axe est perpendiculaire à la membrane lipidique. Chaque région est constituée d'une structure pairée répétée. La structure répétée présente une rotation d'environ 180°C par rapport à la structure de référence parallèle à la membrane lipidique. C. Plusieurs MFS ont été cristallisés dans trois conformations différentes ; la conformation ouverte vers le cytoplasme (*inward open*) comme LacY, la conformation fermée (*occluded*) comme EmrD et la conformation ouverte vers le milieu extracellulaire (*outward open*) comme FucP. D et E. Deux modèles de fonctionnement des MFS ont été proposées ; le « *rocker-switch* » (D) et le « *clamp and switch* » (E) Adapté de Quistgaard (Quistgaard et al., 2016).



## 6.2. Les MFS et le transport du fer et de l'hème

Des études antérieures ont montré que certains transporteurs MFS sont impliqués dans l'homéostasie du fer chez les eucaryotes.

### 6.2.1. La ferroportine

La ferroportine est une protéine MFS, impliquée dans l'export du fer du cytoplasme des cellules vers la circulation sanguine. Elle est fortement exprimée dans les tissus et cellules associés au transport du fer, comme les entérocytes, les cellules de Kupffer, les macrophages spléniques de la pulpe rouge, les hépatocytes et les syncytiotrophoblastes placentaires (Figure 4). La ferroportine est fortement exprimée en présence de fer dans la cellule. Le niveau d'ARNm est augmenté lorsque le fer libre intracellulaire augmente (Chua et al., 2006). De même, l'érythrophagocytose stimule la production de ferroportine (Knutson et al., 2005). En revanche, dans le cas d'une réponse inflammatoire, une diminution de la transcription de la ferroportine est observée (Liu et al., 2005; Yang et al., 2002). L'ARNm de la ferroportine possède dans sa région 5'UTR une séquence IRE qui est liée par les protéines IRP en absence de fer, ce qui inhibe la traduction. En revanche, en présence de fer, l'absence de liaison des protéines IRP sur la séquence IRE permet la traduction de la ferroportine (Anderson and Frazer, 2017).

Cependant, les mécanismes de transport dépendant de la ferroportine sont peu connus et la structure de la ferroportine n'a pas été résolue. Le modèle proposé est que le fer sous forme réduit, se fixe à la ferroportine en position « *inward open* ». Cette fixation par le modèle du « *rocker-switch* », induit le relargage du fer dans le milieu extracellulaire. Ce dernier est oxydé certainement par la céruloplasmine ou l'héphaestine puis transféré sur la transferrine (Drakesmith et al., 2015).

En cas de surcharge martiale dans le sang, l'hepcidine se fixe à la ferroportine (Nemeth et al., 2004). Cette interaction provoque la phosphorylation de la ferroportine qui est suivie d'une internalisation puis d'une dégradation dans le lysosome. Ce processus est dépendant de l'ubiquitylation de la ferroportine (De Domenico et al., 2007; Drakesmith et al., 2015). Cela a pour conséquence de limiter le relargage du fer des cellules vers le sang. Des mutations dans la ferroportine entraîne une hémochromatose héréditaire de type IV ou maladie de la ferroportine. Dans ces conditions, la ferroportine n'assurant pas correctement son rôle (insensibilité à l'hepcidine, défaut de localisation de la ferroportine ou perte

fonctionnelle dans l'export du fer). Ainsi, le fer est mal redistribué dans l'organisme (Pietrangelo, 2017).

### 6.2.2. Les transporteurs de sidérophores fongiques

Chez les levures, des protéines MFS ont été identifiées comme responsables du transport de sidérophores. Ainsi, chez *S. pombe*, Str1 coderait pour une protéine de type MFS possédant douze domaines transmembranaires et elle est impliquée dans l'assimilation de ferrichrome (Pelletier et al., 2003). De même, la protéine Arn1, chez *S. cerevisiae* permet également d'importer du ferrichrome (Heymann et al., 2000). La protéine Sit1, chez *Candida glabrata* est capable d'importer différents sidérophores (ferrichrome, ferrirubine et coprogène) (Nevitt and Thiele, 2011). En plus de posséder 14 domaines transmembranaires, ces deux MFS (Arn1 et Sit1) possèdent une boucle extracellulaire entre les domaines transmembranaires 13 et 14. Cette boucle appelée SITD (siderophore transporter domain) est conservée chez les transporteurs de sidérophores fongiques (Nevitt and Thiele, 2011). En ce qui concerne la protéine Arn1, la boucle est responsable de la liaison au ferrichrome via deux motifs Y<sup>534</sup>XXX<sup>538</sup>Y et Q<sup>550</sup>R<sup>563</sup>YR<sup>563</sup> (Kim et al., 2002). Cependant, aucun mécanisme de transport ni aucune structure tri-dimensionnelle n'ont été décrits à ce jour pour ces deux protéines MFS.

### 6.2.3. Les protéines FLVCR humaine impliquées dans le transport de l'hème

La protéine FLVCR1a est une protéine de type MFS, elle a été décrite comme pouvant exporter de l'hème. Elle a été initialement décrite comme une protéine de surface servant de récepteur au virus de la leucémie féline du sous-groupe C qui cause une aplasie des globules rouges chez le chat (Quigley et al., 2000 ; Taylor et al., 1999). Plus tard, il a été montré que FLVCR1a est impliqué dans l'export de l'analogue fluorescent de l'hème, la ZnMP. De plus, FLVCR1a est requis pour le transport de l'hème radiomarqué avec du <sup>55</sup>Fe dans différentes lignées cellulaires (Quigley et al., 2004). Aucune étude n'a pour le moment été publiée concernant le mécanisme de liaison de FLVCR1 à l'hème. Un motif de liaison putatif à l'hème a été identifié par bioinformatique (<sup>145</sup>H<sup>153</sup>X<sup>153</sup>Y<sup>153</sup>X<sup>44</sup>H<sup>198</sup>) (Khan and Quigley, 2011). FLVCR1 possède une protéine homologue appelée FLVCR2 qui a été décrite comme

pouvant importer de l'hème chez l'homme. Jusqu'ici, ce transporteur a été très peu caractérisé. Aucune localisation de ce dernier n'a été rapportée à ce jour. Néanmoins, sa délétion dans des cellules de rhabdomyosarcome entraîne une diminution de l'entrée de l'analogue fluorescent de l'hème, la ZnMP, ce qui laisse penser que la protéine est au moins présente à la surface cellulaire et serait impliquée dans l'entrée d'hème (Duffy et al., 2010).

## 7. Les peroxyrédoxines

### 7.1. Définition des peroxyrédoxines

Les peroxyrédoxines sont de petites protéines (variant en général entre 20 et 30 kDa) qui ont été initialement décrites pour leur activité antioxydante. En effet, elles sont capables de réduire les espèces oxygénées comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le peroxy-nitrite ( $OONO^-$ ) et un grand nombre d'hydroperoxydes organiques ( $ROO^-$ ). Contrairement aux catalases, aux superoxydes dismutases et à la plupart des peroxydases, les peroxyrédoxines fonctionnent sans cofacteur (Perkins et al., 2014). Les peroxyrédoxines sont ubiquitaires et très fortement exprimées. Ainsi, chez l'homme, elles représentent 0.8% de toutes les protéines solubles (Rhee et al., 2005). Il existe plus de 120 structures répertoriées dans la base de donnée de structures PDB et plus de 15 000 gènes annotés comme codants pour des peroxyrédoxines (Perkins et al., 2014). Récemment, un rôle dans l'homéostasie cellulaire leur a été attribué. Elles sont capables d'induire des réponses cellulaires via des cascades de signalisation. Par exemple, il a été montré que les peroxyrédoxines peuvent activer la protéine Myc et induire la transformation cellulaire ou l'apoptose (Mu et al., 2002 ; Wonsey et al., 2002). De même, elles peuvent réguler l'activation de NF- $\kappa$ B (Kang et al., 1998). De plus, elles sont surexprimées dans les cellules cancéreuses notamment du sein, du poumon et du thymus (Chang et al., 2001 ; Noh et al., 2001 ; Nonn et al., 2003). Leur haut niveau d'expression corrèle souvent avec une résistance à l'apoptose induite par les radiations (Park et al., 2000) ou par le cisplatine (Chung et al., 2001). Enfin, la délétion du gène de la Prdx1, la peroxyrédoxine la plus abondante chez la souris, favorise le développement de tumeurs, des anémies hémolytiques et une mort prématurée des animaux (Neumann et al., 2003).

Plusieurs peroxyrédoxines sont exprimées chez la plupart des espèces. Par exemple, trois peroxyrédoxines sont présentes chez *E. coli* et *C. elegans*, quatre sont retrouvées chez *S. pombe*, cinq chez *S. cerevisiae* et six chez l'homme, la drosophile et *A. thaliana*. Elles sont retrouvées actives dans différents organites comme le noyau, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, le péroxysome ou encore le cytoplasme. Les peroxyrédoxines sont très conservées au cours de l'évolution et auraient évoluées à partir d'une thiorédoxine ancestrale. Leur origine remonterait à l'apparition de l'oxygène sur terre, il y a environ 2.4 milliards d'années (Copley et al., 2004). Les peroxyrédoxines sont classifiées en trois groupes distincts, les peroxyrédoxines à une cystéine (1-Cys) (Figure 10A), à deux cystéines typiques (2-Cys typiques) (Figure 10B) et à deux cystéines atypiques (2-Cys atypiques) (Figure 10C). Les peroxyrédoxines sont également classifiées selon leurs homologues avec les peroxyrédoxines humaines (PRDX), ainsi les PRDX1 à 4 sont toutes des peroxyrédoxines 2-Cys typiques, les PRDX5 sont des peroxyrédoxines 2-Cys atypique et les PRDX6 sont des peroxyrédoxines 1-Cys (Chang et al., 2016 ; Nicolussi et al., 2017). Néanmoins elles partagent toutes un motif conservé Pxxx[T/S]xxC qui est inclu dans le site catalytique et qui est appelé boucle-C<sub>P</sub>. La cystéine dite peroxydatique (C<sub>P</sub>) par son atome de soufre donne l'activité à la protéine. Le site catalytique est toujours composé des acides aminés proline et thréonine ou serine et d'une arginine permettant de garder la cystéine C<sub>P</sub> déprotonée donc active (Hall et al., 2010).

## 7.2. Cycle catalytique des peroxyrédoxines

La réaction catalytique des peroxyrédoxines est divisée en trois étapes distinctes ; (1) la peroxydation, (2) la résolution et (3) le recyclage.

### 7.2.1. La peroxydation

La peroxydation consiste en l'oxydation de la C<sub>P</sub>-S<sup>-</sup> en C<sub>P</sub>-SOH par un une espèce contenant un pont peroxy- (O-O). Lors de la peroxydation, le groupement thiolate (R-S<sup>-</sup>) de la C<sub>P</sub> attaque (attaque nucléophile) le peroxy- de son substrat, ce qui génère de l'eau (dans

le cas du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou un alcool. La C<sub>P</sub> est alors oxydée pour former un acide sulfénique (Cp-SOH) (Hall et al., 2010) (Figure 10).

### 7.2.2. La résolution

La résolution consiste en la formation d'un pont disulfure (S-S) entre la C<sub>P</sub> oxydée de la première peroxyrédoxine et la C<sub>R</sub> de la deuxième peroxyrédoxine dans le cas des 2-Cys typiques, de la C<sub>P</sub> oxydée avec la C<sub>R</sub> d'une même peroxyrédoxine dans le cas des 2-Cys atypiques et de la C<sub>P</sub> oxydée avec un groupement thiol d'un réducteur (comme le glutathion) dans le cas des peroxyrédoxines à 1-Cys. Dans ce dernier cas, il y a tout d'abord formation d'un pont disulfure entre la C<sub>P</sub> et une glutathion-S-transférase (GST) (isoforme  $\pi$ ) pour former un hétérodimère PRX-C<sub>P</sub>-S-S- $\pi$ GST. Cette réaction libère une molécule d'eau. Le pont disulfure de l'hétérodimère est réduit successivement par deux molécules de glutathion GSH. Le premier GSH ramène la GST à son état basal, convertissant ainsi le PRX-C<sub>P</sub>-S-S-pGST en PRX-C<sub>P</sub>-S-SG et en pGST-SH. Le deuxième GSH permet de ramener la peroxyrédoxine 1-Cys à son état initial (PRX-C<sub>P</sub>-S-SG + GSH donnant GSSG + PRX-C<sub>P</sub>-S<sup>-</sup>) (Manevich et al., 2004) (Figure 10).

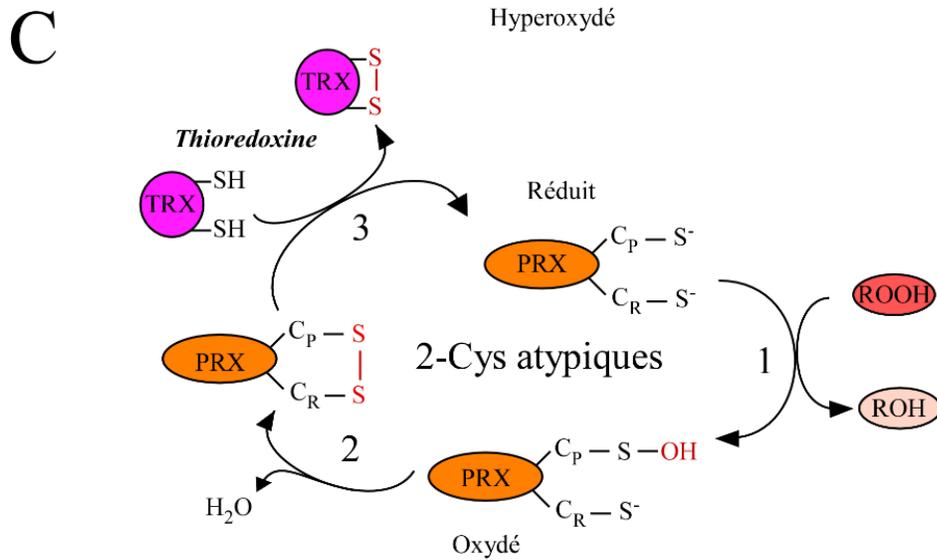
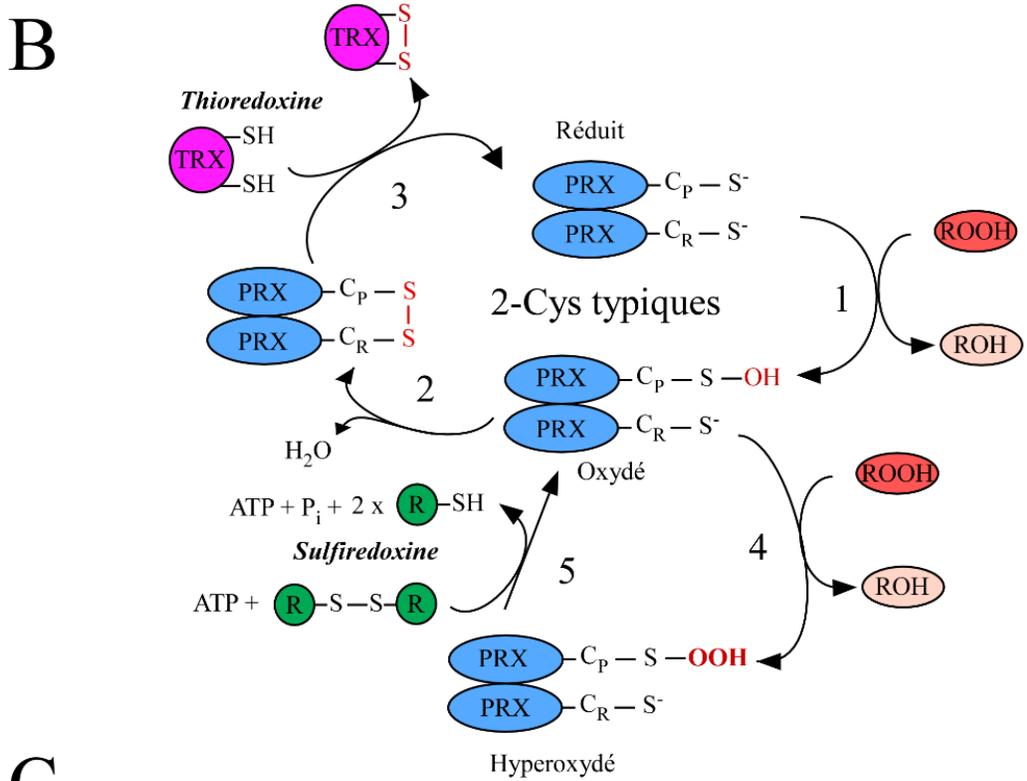
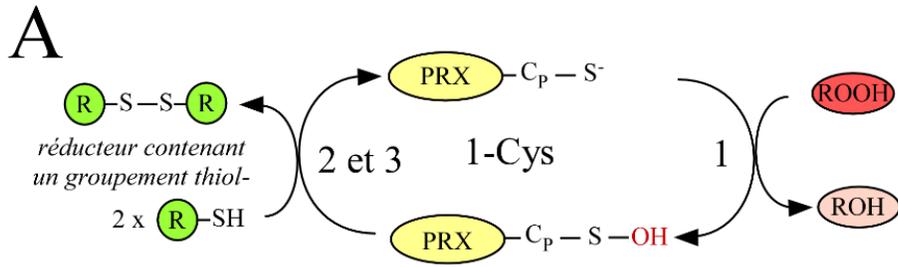
### 7.2.3. Le recyclage

La dernière étape de la réaction consiste à ramener la peroxyrédoxine à son état de départ. Dans le cas des peroxyrédoxines à 2-Cys, la réduction du pont disulfure intermoléculaire pour les 2-Cys typiques et intramoléculaire dans le cas des 2-Cys atypiques est effectuée par une thiorédoxine. Les thiorédoxines sont de petites protéines contenant un motif CxxC conservé dans leur séquence. Ainsi, les deux cystéines du motif sont à l'état réduit (Cys-SH). En présence du pont S-S des peroxyrédoxines et d'une thiorédoxine, le pont S-S est réduit ramenant la peroxyrédoxine à son état basal. Cette réaction forme un pont disulfure intramoléculaire entre les deux cystéines CxxC de la thiorédoxine (Aran et al., 2009) (Figure 10).

### *7.3. Hyperoxydation des peroxyrédoxines 2-Cys typiques*

Lors de l'étape de résolution, les peroxyrédoxines 2-Cys typiques sont vulnérables à une deuxième attaque par un peroxyde. Ainsi, l'acide sulfénique ( $C_P\text{-OH}$ ) est converti en acide sulfinique ( $C_P\text{-OOH}$ ). Les peroxyrédoxines 2-Cys typiques sont plus ou moins sensibles à cette hyperoxydation. Ainsi, on parle de peroxyrédoxines « robustes » ou « sensibles ». La sensibilité est corrélée avec la présence de deux motifs GGLG et YF très conservés chez les eucaryotes. En revanche, ces motifs sont absents chez la plupart des procaryotes qui semblent plus robustes à l'hyperoxydation. Ces deux motifs donnent la conformation à la structure entourant les  $C_P$  et  $C_R$  pour une meilleure adaptation aux différents degrés de stress. Ainsi, en présence d'un stress élevée, ils empêchent la formation du pont disulfure entre la  $C_P$  et la  $C_R$  laissant ainsi la possibilité à une hyperoxydation responsable d'une réponse cellulaire différente (Wood et al., 2003).

La réduction  $C_P\text{-OOH}$  est dépendante d'une sulforédoxine et d'ATP. Le motif GGLG est nécessaire pour la formation du complexe sulforedoxine-ATP-peroxyrédoxine, suggérant un rôle important dans la réduction de la protéine (Jacob et al., 2004 ; Jönsson et al., 2008) (Figure 10B).



▲ **Figure 10.** Cycle catalytique des peroxyrédoxines (A) à une cystéine, 1-Cys, (B) à deux cystéines typiques ou (C) à deux cystéines atypiques. Les peroxyrédoxines 1-Cys et 2-Cys atypiques sont actives en monomères tandis que les 2-Cys typiques sont dimériques. Le cycle catalytique est composé de trois étapes. À la première étape (1), la cystéine peroxydatique ( $C_P$ ) est oxydée par l'hydroperoxyde (ROOH). Cette étape est suivie par la résolution (2) qui permet la formation d'un pont disulfure (S-S) inter- (2-Cys typiques) ou intra- moléculaire (2-Cys atypiques) ou avec une espèce contenant un groupement thiol (SH) (1-Cys). Cette étape permet le relargage d'une molécule d'eau. Enfin, le recyclage (3) ramène la  $C_P$  à un état basal réduit. Cette étape implique une thiorédoxine réduite contenant deux groupement thiol (SH) dans le cas des 2-Cys qui forment un pont disulfure (S-S), et la formation d'un pont disulfure entre deux molécules contenant un groupement thiol. Les peroxyrédoxines sensibles peuvent être hyperoxydées (4) sur la  $C_P$  ( $C_P-S-OOH$ ) rendant la peroxyrédoxine inactive. Cette hyperoxydation est réduite par une sulfiredoxine en présence d'ATP (5), ramenant la peroxyrédoxine à un état oxydé ( $C_P-S-OH$ ) (Detienne et al., 2018).

#### 7.4. Implication des peroxyrédoxines dans les réponses cellulaires

La fonction des peroxyrédoxines dans la réponse cellulaire a été surtout décrite pour les peroxyrédoxines 2-Cys typiques. Ainsi, la réponse cellulaire engendrée va être différente selon le degré d'oxydation de la  $C_P$ . En outre, l'hydroxydation ( $C_P-S-OOH$ ) de cette dernière entraîne une incapacité à produire une réponse cellulaire. Les différents degrés de réponse cellulaire dépendant des peroxyrédoxines ont été décrits dans plusieurs études chez *S. pombe* (Brown et al., 2013; Calvo et al., 2013; Day et al., 2012; Paulo et al., 2014; Veal et al., 2004; Vivancos et al., 2005)

#### 7.5. La peroxyrédoxine *Tpx1* chez *S. pombe*

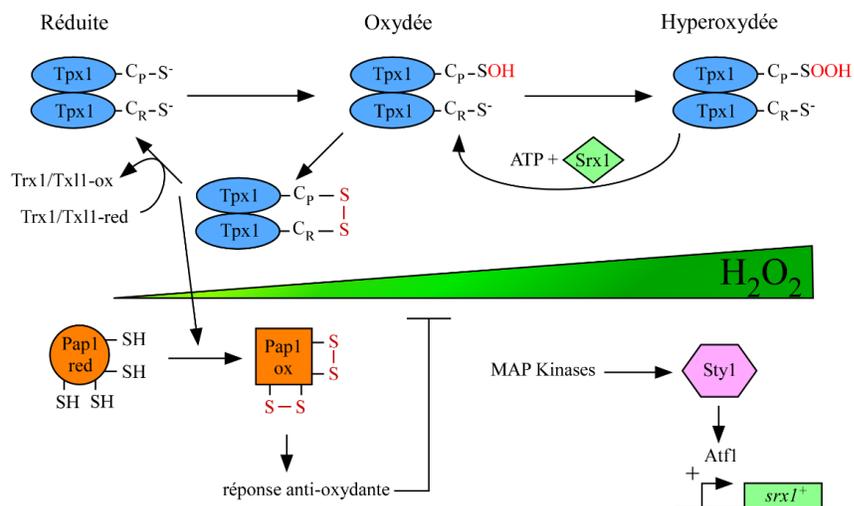
Chez la levure *S. pombe*, il existe quatre protéines qui sont annotées comme étant des peroxyrédoxines ; *Tpx1*, *But1*, *Bcp1* et *Gpx1* (Kim et al., 2010). *Tpx1* est la mieux caractérisée des quatre et est classifiée comme une peroxyrédoxine à 2-Cys typiques qui est homologue à PRDX2 (Nicolussi et al., 2017). De plus, son implication dans la réponse liée au stress oxydatif a été caractérisée (Boronat et al., 2014).

Dans des conditions physiologiques normales, *Tpx1* oscille entre un état réduit et un état oxydé. Le retour à l'état réduit implique la formation d'un pont disulfure entre la cystéine peroxydatique de la première protéine *Tpx1* et la cystéine de résolution de la deuxième

protéine Tpx1. Ensuite, une thiorédoxine (Trx1 ou Tx11) réduit le pont disulfure en s'oxydant (Brown et al., 2013; Day et al., 2012).

Lorsque le stress oxydatif est modéré, le ratio de protéines Tpx1 oxydées augmente par rapport au ratio de protéines Tpx1 réduites. Ainsi, en présence d'une plus grande quantité de Tpx1 oxydée, le facteur de transcription Pap1 se retrouve à son tour oxydé de façon Tpx1 dépendante. La protéine Pap1 peut ainsi activer l'expression de ses gènes cibles (~ 80 gènes) impliqués dans la réponse au stress oxydatif (e.g. *ctl1*<sup>+</sup>, *caf5*<sup>+</sup>, *trr1*<sup>+</sup> *obr1*<sup>+</sup>) (Calvo et al., 2013). La protéine Tpx1 doit être oxydée et capable de retrouver son état basal pour activer Pap1. En effet, si la C<sub>R</sub> est mutée (Tpx1C<sup>169</sup>S), l'induction de Pap1 ne se fait pas (Jara et al., 2008).

En présence d'un stress élevé (concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supérieure ou égale à 1 mM), une proportion importante de la protéine Tpx1 se retrouve hyperoxydée sur la cystéine peroxydatique (C<sub>P</sub>-SOOH). Ainsi, la protéine Tpx1 dans cet état d'oxydation est inactive et est donc incapable d'activer Pap1. Dans cet état de stress, le facteur Pap1 est inactif, c'est la voie d'activation de la protéine Sty1 qui intervient dans cette réponse. La protéine Sty1 est activée par phosphorylation, dépendante d'une voie MAP kinase. La protéine Sty1 stabilise le facteur de transcription Atf1 qui induit l'expression de gène de réponse au stress. Parmi ces gènes, on retrouve le gène *srx1*<sup>+</sup> qui code pour la sulfirédoxine Srx1 qui permet la réduction en présence d'ATP, de la C<sub>P</sub>-SOOH en C<sub>P</sub>-SOH de Tpx1, rendant cette dernière active (Vivancos et al., 2005, 2006) (Figure 11).



▲ **Figure 11.** *Réponses cellulaires en fonction du stade oxydatif de Tpx1.* Tpx1 est une peroxyrédoxine à 2-Cys typiques. A l'état réduit, Tpx1 est inactive. En présence d'un stress modéré (~ 0.2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), une forte proportion de Tpx1 est oxydée sur la C<sub>P</sub> (C<sub>P</sub>-SOH). La résolution de l'oxydation par la formation du pont disulfure suivit du recyclage par les thiorédoxines (Trx1 et Tlx1) permettent l'activation de Pap1. Pap1, à l'état inactif, est cytoplasmique et possède quatre cystéines réduites (SH). L'activation par Tpx1 entraîne la formation de ponts disulfures entre les cystéines, ce qui provoque la relocalisation nucléaire de Pap1, qui peut ainsi activer la transcription de ses gènes cibles (~ 80 gènes) impliqués dans la réponse anti-oxydante. En présence d'un stress élevé (~ 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Tpx1 est hyperoxydée sur la C<sub>P</sub> (C<sub>P</sub>-SOOH), la rendant inactive pour induire des réponses cellulaires. Dans ces conditions, c'est la voie des MAP kinases aboutissant à l'activation de Atf1 (stabilisé par Sty1) qui est impliquée dans la réponse au stress. Atf1 active notamment le gène *srx1<sup>+</sup>*, codant pour la sulfirédoxine Srx1 qui est responsable de la réduction de Tpx1 hyperoxydée en présence d'ATP, rendant cette dernière de nouveau active (Veal et al., 2014).

### 7.6. Les peroxyrédoxines et l'hème

L'hème labile, c'est-à-dire non lié à des protéines est délétère pour les cellules, car il est capable de s'intercaler dans les membranes et induire de la peroxydation lipidique (Anzaldi and Skaar, 2010). Cette population d'hème labile est minoritaire dans les cellules. Des groupes de recherche se sont intéressés à quantifier les niveaux d'hème labile dans les différents compartiments cellulaires en utilisant des molécules qui captent la présence d'hème libre chez la levure *S. cerevisiae* (Hanna et al., 2016) et les cellules de mammifères (Yuan et al., 2016). Les protéines capables de lier de l'hème avec une faible affinité font l'objet d'une attention toute particulière. En effet, ces dernières pourraient agir comme des chaperonnes d'hème et ainsi limiter sa toxicité intracellulaire. Ces chaperonnes pourraient permettre son transport intracellulaire et favoriser sa redistribution aux hémoprotéines cellulaires. Plusieurs protéines candidates ont montré une capacité à lier de l'hème sans être des protéines dépendantes de l'hème pour leur fonction. Parmi ces protéines, les glutathion-S-transférases (GST) (Ketley et al., 1975), la protéine liant les acides gras FABP (fatty acid binding protein) (Vincent and Muller-Eberhard, 1985) et la GAPDH (glycolytic enzyme glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) (Hannibal et al., 2012; Sweeny et al., 2018). Toutes ces protéines sont fortement exprimées dans les cellules, ce qui leur permettrait de supporter plusieurs fonctions cellulaires.

La découverte de l'activité peroxyrédoxine (ou thiorédoxine peroxydase) de la protéine Tsa1 (homologue de Tpx1 chez *S. cerevisiae*) (Chae et al., 1994) a été faite à la même époque que la mise en évidence de la propriété de sa protéine orthologue HBP23 (heme binding protein de 23 kDa) chez le rat à pouvoir lier l'hème (Iwahara et al., 1995). La protéine HBP23 est homologue la protéine PRDX1 humaine. Chez les bactéries *L. lactis* et *Streptococcus agalactiae*, la protéine AhpC (*alkyl hydroperoxide reductase C*) a été décrite comme étant une peroxyrédoxine à 2-Cys typiques qui peut lier de l'hème (Lechardeur et al., 2010). La protéine PRDX1 humaine est également capable de lier de l'hème in vitro et permettrait in vivo de limiter la toxicité de l'hème dans le cytoplasme (Watanabe et al., 2017).

Ainsi, les peroxyrédoxines ont deux rôles cellulaires distincts ; (1) la réponse au stress oxydatif en diminuant les espèces peroxyliées ou en induisant des réponses cellulaires protectives et (2) la liaison à l'hème. Cependant, leur activité en lien avec la liaison à l'hème n'a pas fait l'objet d'études fonctionnelles in vivo, laissant ouverte de nombreuses questions quant à leur rôle physiologiques vis à vis l'homéostasie de l'hème.

## 8. Hypothèses et objectifs de recherche

Avant les travaux publiés dans cette thèse, un seul récepteur d'hème, Shu1, avait été caractérisé chez *S. pombe*. Nos travaux ont montré qu'en absence de biosynthèse d'hème endogène (*hem1Δ*), une souche n'exprimant pas *shu1*<sup>+</sup> est capable de croître à partir d'une concentration de 0.15 μM d'hème, suggérant l'existence d'autres protéines capables de faire entrer de l'hème dans la cellule indépendamment de Shu1. Parmi, les dix gènes les plus induits en carence de fer, l'un d'eux code pour la protéine Str3 dont le ligand est inconnu. Par des analyses préliminaires d'arrimage moléculaire, nous avons pu simuler que Str3 pourrait fixer de l'hème.

Les objectifs de cette thèse étaient :

- (1) d'élucider si la protéine Str3 pouvait être impliquée dans le transport de l'hème chez *S. pombe*.
- (2) de caractériser la voie d'entrée de l'hème dépendante de Str3.
- (3) de trouver un (ou des) partenaire(s) protéique(s) à Str3 impliqué(s) dans l'assimilation de l'hème chez *S. pombe*.

# CHAPITRE 1

**The major facilitator transporter Str3 is required for low-affinity heme acquisition in *Schizosaccharomyces pombe*.**

**Auteurs de l'article :** Vincent Normant, Thierry Mourer et Simon Labbé

**Statut de l'article :** publié dans The Journal of Biological Chemistry, 2018, 27; 293(17) : 6349-6362

**Avant-propos :** J'ai réalisé 85% du travail expérimental de ce manuscrit. Certaines souches et outils moléculaires ainsi que des résultats préliminaires de quelques figures ont été produits par TM. Les versions finales des figures ont été produites par VN et SL. J'ai participé activement à l'écriture du manuscrit.

**Résumé :** Chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*, l'acquisition de l'hème exogène est largement dépendante de la protéine ancrée à la membrane plasmique Shu1. Ici, nous avons montré que la protéine Str3, appartenant à la famille des protéines MFS (major facilitator superfamily) est impliquée dans l'import d'hème. En utilisant une souche déficiente pour sa voie de biosynthèse endogène (*hem1Δ*) et délétée pour *shu1*<sup>+</sup> (*hem1Δ shu1Δ*), nous avons montré que cette dernière est capable d'utiliser de l'hème exogène en présence de Str3. Nos résultats microscopiques ont montré que la souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* est incapable d'accumuler l'analogue fluorescent de l'hème : la zinc mesoporphyrine IX (ZnMP). En revanche, une souche *hem1Δ shu1Δ* exprimant Str3 est capable d'assimiler de la ZnMP à une concentration de 10 μM. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est incapable d'assimiler une source d'hème exogène. Nous avons montré que l'expression hétérologue de Str3 permet l'accumulation de ZnMP chez *S. cerevisiae*. De plus, Str3 est capable de se lier aux billes d'agarose couplées à de l'hémine. En revanche, une protéine Str3 dont les acides aminés tyrosines et sérine ont été remplacés par des acides aminés alanines au niveau de deux motifs potentiels de liaison à l'hème (Y<sup>530</sup>X<sub>3</sub>Y<sup>534</sup> et S<sup>552</sup>X<sub>4</sub>Y<sup>557</sup>), est grandement affectée dans sa capacité à lier de l'hème. De plus, cette protéine Str3 modifiée est incapable de restaurer la croissance d'une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* en présence d'hème exogène. Enfin, nous avons montré que les motifs putatifs de liaison à l'hème sont situés dans une

boucle extracellulaire de Str3. L'analyse de la liaison à l'hème par spectrométrie à absorbance du domaine correspondant à la boucle extracellulaire de Str3 purifié chez *E. coli*, montre une interaction de la boucle avec l'hème et présente une constante de dissociation ( $K_D$ ) de 6.6  $\mu\text{M}$ . Tous ces résultats mettent en lumière la présence d'un second transporteur d'hème chez *S. pombe*.

## ABSTRACT

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, acquisition of exogenous heme is largely mediated by the cell membrane-associated Shu1. Here, we report that Str3, a member of the major facilitator superfamily of transporters promotes cellular heme import. Using a strain that cannot synthesize heme *de novo* (*hem1*Δ) and lacks Shu1, we found that the heme-dependent growth deficit of this strain is rescued by hemin supplementation in the presence of Str3. Microscopic analyses of a *hem1*Δ *shu1*Δ *str3*Δ mutant strain in the presence of the heme analog zinc mesoporphyrin IX (ZnMP) revealed that ZnMP fails to accumulate within the mutant cells. In contrast, Str3-expressing *hem1*Δ *shu1*Δ cells could take up ZnMP at a 10-μM concentration. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* cannot efficiently transport exogenously supplied hemin. However, heterologous expression of Str3 from *S. pombe* in *S. cerevisiae* resulted in ZnMP accumulation within *S. cerevisiae* cells. Moreover, hemin-agarose pulldown assays revealed that Str3 binds hemin. In contrast, a Str3 mutant in which Tyr and Ser residues of two putative heme-binding motifs (<sup>530</sup>Y-X<sub>3</sub>-Y<sup>534</sup> and <sup>552</sup>S-X<sub>4</sub>-Y<sup>557</sup>) had been replaced with alanines exhibited a loss of affinity for hemin. Furthermore, this Str3 mutant failed to rescue the heme-dependent growth deficit of a *hem1*Δ *shu1*Δ *str3*Δ strain. Further analysis by absorbance spectroscopy disclosed that a predicted extracellular loop region in Str3 containing the two putative heme-binding motifs interacts with hemin, with a *K<sub>D</sub>* of 6.6 μM. Taken together, these results indicate that Str3 is a second cell-surface membrane protein for acquisition of exogenous heme in *S. pombe*.

## INTRODUCTION

Heme is a macrocycle molecule constituted of a protoporphyrin ring in which one atom of iron is coordinated at its center (1). The coordinated iron can adopt both oxidized (Fe<sup>3+</sup>) and reduced (Fe<sup>2+</sup>) states. The redox active nature of iron makes heme a critical cofactor for a wide variety of enzymes, including cytochromes, globins and catalases that are required in vital biochemical processes, such as respiration, oxygen transport and disproportionation of hydrogen peroxide, respectively (2). Heme is also known to serve as a signaling molecule in cellular responses, such as antioxidant defence and regulation of the circadian clock (3,4). Due to its critical physiological importance, a majority of organisms have evolved with different means to secure heme (5). In the case of heme prototrophs, these

organisms possess an eight-step enzymatic pathway that involves anabolic enzymes that are located either in mitochondria or the cytoplasm, depending where their specific action takes place along the biosynthetic pathway. In the case of the heme biosynthesis pathway, proteins that are required for heme production have been identified in most organisms as well as the reactions they catalyze (1). A second mean used by a number of organisms is to acquire heme from external environmental sources (6). As opposed to the well-characterized enzymes responsible for the synthesis of the heme molecule, knowledge of cellular components that are required for acquisition of exogenous heme is more limited and has only been investigated in a small number of organisms.

In *Schizosaccharomyces pombe*, heme biosynthesis and exogenous heme uptake represent two different ways to acquire heme (7). Heme biosynthesis involves eight enzymes encoded by the following genes: *hem1*<sup>+</sup>, *hem2*<sup>+</sup>, *hem3*<sup>+</sup>, *ups1*<sup>+</sup>, *hem12*<sup>+</sup>, *hem13*<sup>+</sup>, *hem14*<sup>+</sup>, and *hem15*<sup>+</sup>. The first enzyme is named Hem1 ( $\delta$ -aminolevulinate acid synthase) and produces  $\delta$ -aminolevulinate (ALA) by condensation of succinyl-CoA with glycine. ALA is then converted to porphobilinogen by a second enzyme (Hem2) of the biosynthetic pathway towards heme biosynthesis that involves six additional steps. In fission yeast, the *hem1*<sup>+</sup> gene is essential since its disruption is lethal for the cells. A strategy to keep *hem1* $\Delta$  cells alive consists to add exogenous ALA, allowing heme biosynthesis to resume at step 2 and then proceed further along the biosynthetic pathway until production of heme. A second way to ensure viability of *hem1* $\Delta$  cells is to supplement the mutant cells with exogenous hemin (heme chloride). In this case, *hem1* $\Delta$  cells are therefore forced to use their own heme uptake system. This experimental design (*hem1* $\Delta$  + hemin) selectively blocks heme biosynthesis, setting conditions to investigate the mechanisms of exogenous heme acquisition by cells.

Following this approach, studies have previously shown that *S. pombe* iron-starved cells produced Shu1, which is a small cell-surface heme-binding protein of 25 kDa (7). Shu1 is attached to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (8). Absorbance spectroscopy and hemin-agarose pulldown experiments have demonstrated that Shu1 exhibits a constant of dissociation ( $K_D$ ) of 2.2  $\mu$ M for hemin (7). Furthermore, *in vivo*

functional growth assays have shown that the presence of Shu1 is required for assimilation of exogenous heme by *S. pombe hem1Δ* cells (7).

Studies have shown that Shu1 is required for cellular internalization of the heme analog zinc mesoporphyrin IX (ZnMP) (7,8). When heme biosynthesis is selectively blocked in *hem1Δ* mutant cells, ZnMP first accumulates into vacuoles and then within the cytosol (8). Consistent with this observation, results have shown that in response to elevated concentrations of heme or ZnMP, Shu1 undergoes internalization from the cell surface to the vacuole (8). Disruption of the vacuolar Abc-type transporter Abc3 results in *hem1Δ abc3Δ* mutant cells being unable to grow in the presence of heme as the sole iron source (8). Although the pathway whereby internalized heme or its analog ZnMP becomes available to the cells is still unclear, results have shown that Abc3 participates in the mobilization of stored heme or ZnMP from the vacuole to the cytosol (8).

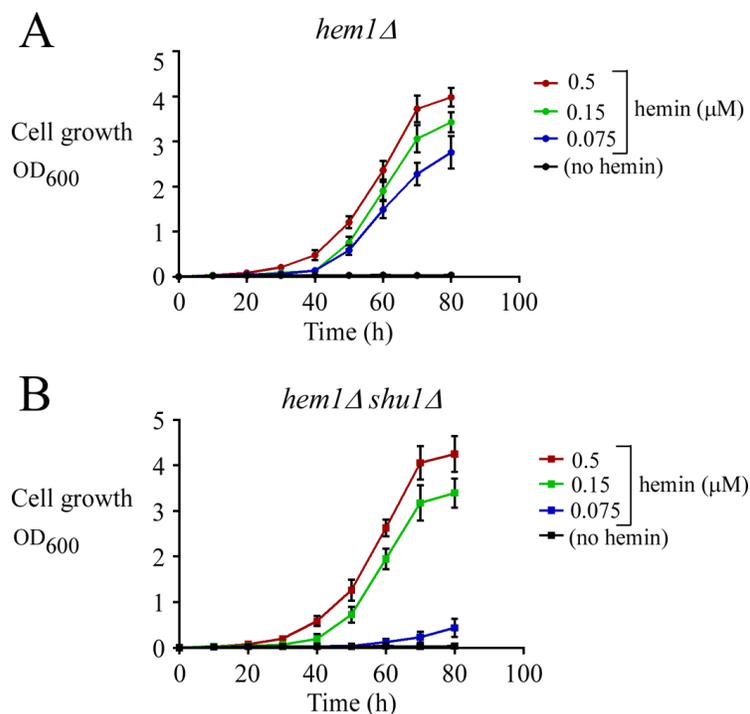
Besides Shu1, Abc3 (heme assimilation) and the Fip1-Fio1 iron-dependent permease-oxidase complex (reductive iron uptake) (9), there are other *S. pombe* transport-related proteins that are regulated at the transcriptional level in response to changes in iron concentrations (10). For instance, Str1, Str2 and Str3 expression is induced under conditions of iron starvation and repressed under iron-replete conditions (11). Str1, Str2, and Str3 proteins are classified as members of the major facilitator superfamily (MFS) of transporters (12,13). In the case of Str1, its heterologous expression in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain that is deficient in high-affinity iron uptake systems results in assimilation of iron from ferrichrome (11). This result is consistent with the fact that *S. pombe* possesses the ability to produce ferrichrome (14) and with the plasma membrane localization of Str1 in *S. pombe*. In the case of Str2, its physiological role in *S. pombe* is still unclear and the ORFeome global analysis of protein localization indicates that Str2 localizes to the membrane vacuole (15). Str3 displays the lowest sequence identity with Str1 and Str2 (11). Although Str3 localizes to the plasma membrane of cells (15), its heterologous expression in an iron uptake deficient *S. cerevisiae* strain fails to restore growth in the presence of siderophores including ferrichrome and ferroxiamine B (11). The biological function of Str3 remains therefore undetermined.

To further investigate the mechanisms whereby *S. pombe* cells acquire exogenous heme, cells lacking Hem1 and Shu1 were incubated using a range of concentrations of hemin. Although growth of *hem1Δ shu1Δ* cells was inhibited in the presence of 0.075 μM hemin, medium supplementation with 0.15 and 0.5 μM hemin restored the ability of *hem1Δ shu1Δ* cells to grow when hemin was the sole source of iron. The fact that hemin-dependent growth deficiency of *hem1Δ shu1Δ* cells can be overcome in a medium supplemented with high hemin concentrations ( $\geq 0.15$  μM) indicated the presence of a Shu1-independent hemin uptake pathway. Here, we show that the presence of Str3 was required to suppress inhibited growth of *hem1Δ shu1Δ* cells in the presence of 0.15 μM exogenous hemin. As previously shown, *hem1Δ* cells expressing Shu1 were able to take up the heme analog ZnMP at concentration of 2 μM. In contrast, deletion of *shu1*<sup>+</sup> (*shu1Δ*) led to defects in the assimilation of ZnMP, unless Str3 was expressed in *hem1Δ shu1Δ* cells in the presence of ZnMP at concentration of 10 μM. Inactivation of *str3Δ* in a *hem1Δ shu1Δ* strain abolished assimilation of ZnMP. Expression of an active *S. pombe* Str3 protein in *S. cerevisiae* led to cellular accumulation of ZnMP, whereas untransformed *S. cerevisiae* failed to take up ZnMP due to the absence of an endogenous heme transport system. Results showed that Str3 binds to hemin-agarose and exhibits an equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) value of 6.6 μM for hemin. Taken together, these results are consistent with the existence of an additional hemin acquisition pathway in *S. pombe* that involves the action of Str3.

## RESULTS

*Effect of the shu1Δ deletion on the ability to assimilate hemin.* Two strategies can be used to keep *S. pombe hem1Δ* cells alive. The first approach is to add ALA in cultures of *hem1Δ* cells (7). In this case, ALA serves as a substrate for the downstream enzyme Hem2 of the biosynthetic pathway towards heme biosynthesis. The second approach is to supplement *hem1Δ* cells with exogenous hemin (Fig. 1A) (7,8). This latter approach (*hem1Δ* + hemin) makes sure that heme biosynthesis is selectively blocked, setting conditions to investigate the mechanisms by which external hemin is taken up by the cells. Here, *hem1Δ* cells that had been supplemented with 0.075, 0.15 or 0.5 μM hemin exhibited cell growth to an  $A_{600}$  of 2.7, 3.4, and 3.9, respectively, over a time period of 80 h (Fig. 1A). In the absence of

hemin (and ALA), *hem1* $\Delta$  cells were unable to grow compared to *hem1* $\Delta$  cells that had been supplemented with exogenous hemin (Fig. 1A). As we have previously shown (7), disruption of the gene encoding the cell-surface protein Shu1 in *hem1* $\Delta$  cells resulted in a poor growth of these cells (*hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$ ) ( $A_{600}$  of 0.4 after 80 h) in the presence of 0.075  $\mu$ M hemin (Fig. 1B). However, *hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$  cells grown in the same medium supplemented with high concentrations of hemin (0.15 and 0.5  $\mu$ M) exhibited a robust cell growth to an  $A_{600}$  of 3.4 and 4.2 that was similar to hemin-replete *hem1* $\Delta$  (*shu1*<sup>+</sup>) cells (Fig. 1, A and B). We therefore concluded that Shu1 is required for hemin acquisition when hemin is present at very low concentrations (0.075  $\mu$ M), whereas its presence is dispensable under conditions of high hemin concentrations (0.15 and 0.5  $\mu$ M).

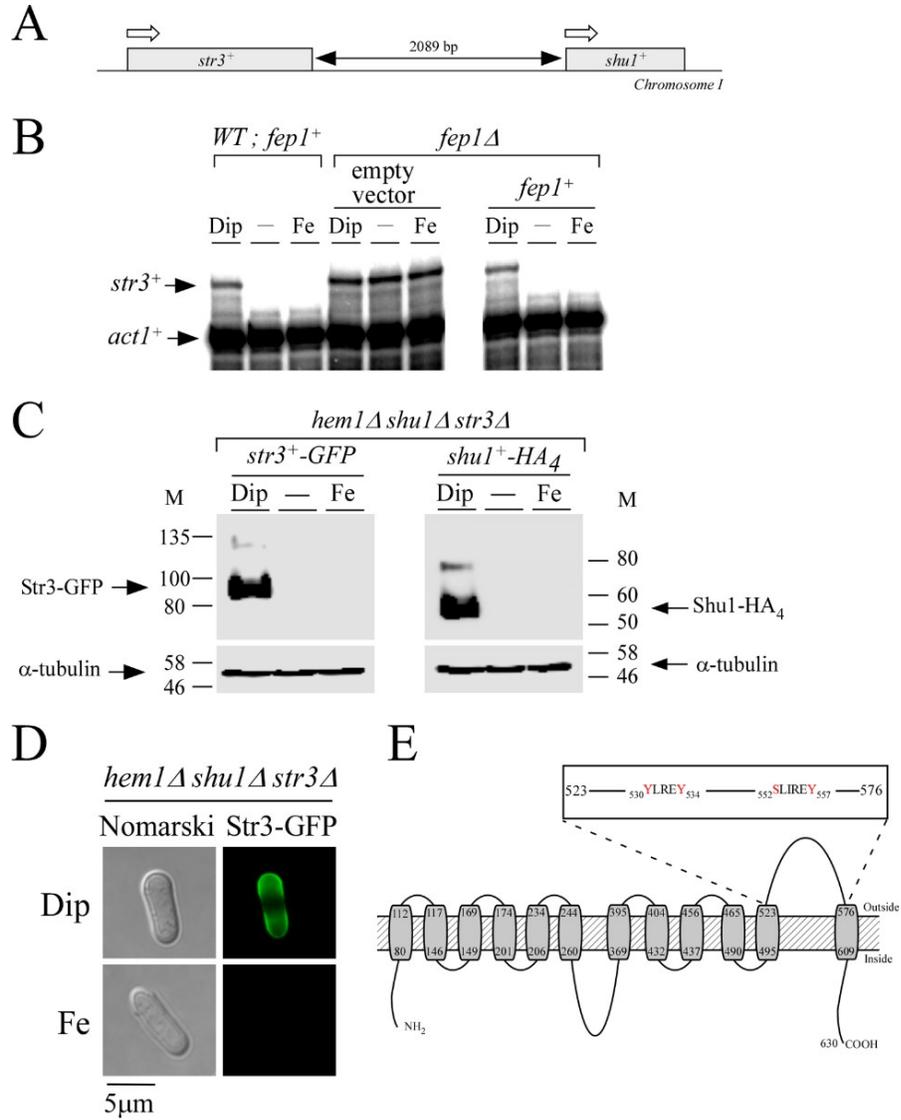


**▲ Figure 1.** Deletion of *shu1*<sup>+</sup> leads to poor growth in the presence of low hemin concentration (0.075  $\mu$ M), but does not compromise cell growth with higher hemin concentrations (0.15 and 0.5  $\mu$ M). *A*, Growth of *hem1* $\Delta$  cells was assessed in ALA-free medium that was left untreated (*no hemin*, *black*) or which was supplemented with exogenous hemin. Hemin color codes are as follow: *blue* (0.075  $\mu$ M), *green* (0.15  $\mu$ M), and *red* (0.5  $\mu$ M). *B*, Growth of *hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$  cells was assessed under the same conditions as described for *panel A*. Values are represented as the averages  $\pm$  S.D. of a minimum of three independent experiments.

*Str3* is an iron-regulated cell-surface protein that supports efficient hemin acquisition when hemin levels exceed 0.075  $\mu\text{M}$ . Given the fact that hemin concentrations of 0.15 and 0.5  $\mu\text{M}$  restored cell growth levels of *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$*  mutant comparable to *hem1 $\Delta$  (shu1 $^+$ )* mutant, we sought to identify an additional protein that was involved in hemin acquisition. One possibility was that an additional protein involved in hemin acquisition was produced as a function of changes in iron concentrations. Its gene expression could therefore be under control of Fep1, in a manner similar to Shu1 (7). Accordingly, its transcription would be repressed under high iron conditions and derepressed under low-iron conditions. To further support hemin acquisition, one additional protein would have to be localized at the cell surface. In this connection, we noticed that the *str3 $^+$*  gene was immediately adjacent to *shu1 $^+$*  on chromosome I and possessed all of these characteristics (Fig. 2). Indeed, *str3 $^+$*  mRNA levels were repressed when cells were grown in the presence of iron. In contrast, *str3 $^+$*  mRNA levels were increased  $5.0 \pm 0.3$  fold compared to basal levels observed in the untreated cells in the presence of the iron chelator 2,2'-dipyridyl (Dip) (Fig. 2B). Results showed that *str3 $^+$*  transcription was controlled by Fep1 since its disruption (*fep1 $\Delta$* ) resulted in increased *str3 $^+$*  mRNA levels which were unresponsive to iron for repression (Fig. 2B). In the absence of Fep1, *str3 $^+$*  was expressed  $12.0 \pm 0.5$  fold compared to basal levels observed in wild-type untreated cells. Conversely, *fep1 $\Delta$*  cells in which a wild-type *fep1 $^+$*  allele was reintegrated regained the ability to repress *str3 $^+$*  gene expression in response to iron (Fig. 2B).

The iron-dependent regulated expression of *str3 $^+$*  prompted us to examine Str3-GFP protein levels in untreated cells and in cells incubated under conditions of low and high concentrations of iron. Functional *str3 $^+$ -GFP* and *shu1 $^+$ -HA $_4$*  alleles expressed under the control of their own promoters were integrated in a *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$  str3 $\Delta$*  mutant strain. This strain was grown to mid-logarithmic phase and then incubated in ALA-free medium containing hemin (0.075  $\mu\text{M}$ ) and Dip (250  $\mu\text{M}$ ) or iron (100  $\mu\text{M}$ ) or in their respective absence. Results showed that the steady-state levels of Str3-GFP followed those of *str3 $^+$*  mRNA and were primarily detected in iron-starved cells (Fig. 2C). The Shu1-HA $_4$  protein, which is known to be expressed under low iron conditions (7), was used as a control in parallel experiments (Fig. 2C). Fluorescence microscopy analysis consistently showed Str3-

GFP localization at the plasma membrane under conditions of iron starvation (Fig. 2D). In contrast, Str3-GFP fluorescence signal was lost when cells were incubated in the presence of iron (Fig. 2D).

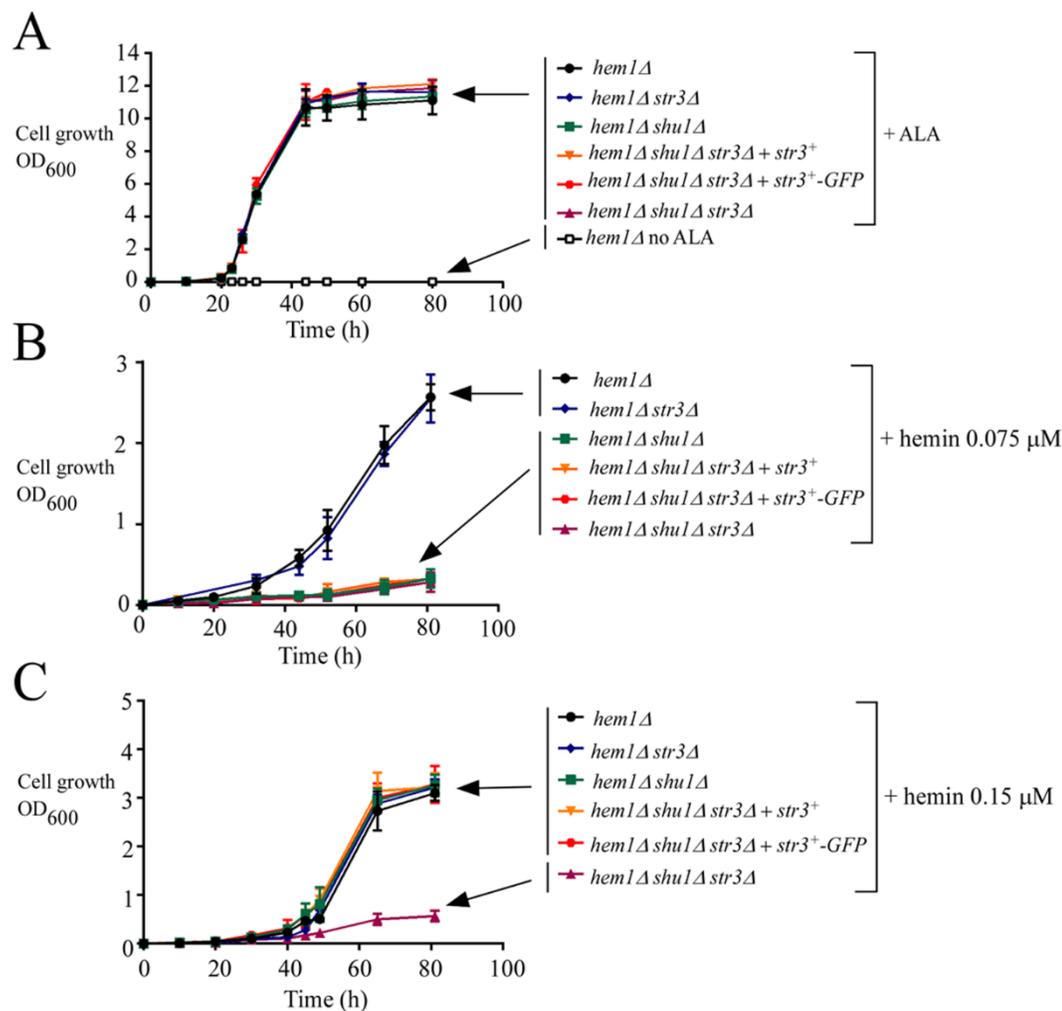


▲ **Figure 2.** *str3*<sup>+</sup> encodes a cell-surface protein that is biosynthetically regulated by cellular iron levels. *A*, Schematic illustration of a genomic DNA region and location of the two neighbor *str3*<sup>+</sup> and *shu1*<sup>+</sup> genes. White arrows indicate direction of gene transcription. Black double-headed arrow indicates the length of the intergenic region. *B*, Wild-type (*WT*; *fep1*<sup>+</sup>) and *fep1Δ* strains were either left untreated (-) or treated with Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (Fe, 100 μM) for 3 h. In the case of the *fep1Δ* strain, it was transformed with an empty vector or an integrative vector containing the wild-type *fep1*<sup>+</sup> allele. Total RNA was prepared from each sample and then *str3*<sup>+</sup> and *act1*<sup>+</sup> steady-state mRNA levels were analyzed by RNase protection assays. Results are representative of three independent experiments. *C*, *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing *str3*<sup>+</sup>-GFP and *shu1*<sup>+</sup>HA<sub>4</sub> alleles were treated with Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (Fe, 100 μM), or they were left untreated for 3 h. Triton X-100-solubilized extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-GFP, anti-HA, or anti-α-tubulin antibodies. The positions of the molecular weight (M) of protein standards (in kDa) are indicated on each side. *D*, *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing GFP-tagged Str3 were treated with Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (Fe, 100 μM) for 3 h. Cells were analyzed by fluorescence microscopy (*right*) for the presence of Str3-GFP. Nomarski optics (*left*) was used to ascertain cell morphology. *E*, A topological model of Str3 is shown. The gray boxes represent 12 predicted transmembrane domains and their positions are indicated with numbers. The amino acid sequence numbers refer to the position relative to the first amino acid of Str3. Inset indicates the presence of YLREY and SLIREV amino acid residues that are located in the predicted extracellular loop 11 of Str3.

Str3 is predicted to be a member of the MFS transporters (11). As commonly found in a large number of MFS proteins, a topological model of Str3 predicts the presence of 12 transmembrane spans (Fig. 2E). Transmembrane spans 1 – 6 form the first half of the protein, whereas transmembrane spans 7 – 12 constitute the second half of Str3. In the model, the two halves of Str3 are linked by the extended loop 6. This loop is predicted to be cytosolic and would allow a flexible movement between the N- and C-terminal halves of Str3. According to a predicted three-dimensional model by I-TASSER (16) and virtual docking simulation of heme to Str3, we observed the presence of a potential heme-binding pocket in the vicinity of extracellular loop 11. Furthermore, we found the presence of two putative heme-binding sequences <sup>530</sup>Y-X<sub>3</sub>-Y<sup>534</sup> and <sup>552</sup>S-X<sub>4</sub>-Y<sup>557</sup> in loop 11. Based on these observations and the fact that no experimental substrate was known for Str3, we created a *hem1Δ shu1Δ str3Δ* triple mutant strain to investigate whether Str3 may function in heme acquisition when the heme biosynthetic pathway was disrupted. First, *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells were incubated in the presence of ALA to verify that their growth was equivalent to *hem1Δ*, *hem1Δ shu1Δ*, and *hem1Δ str3Δ* strains (Fig. 3A). As a negative control, removal

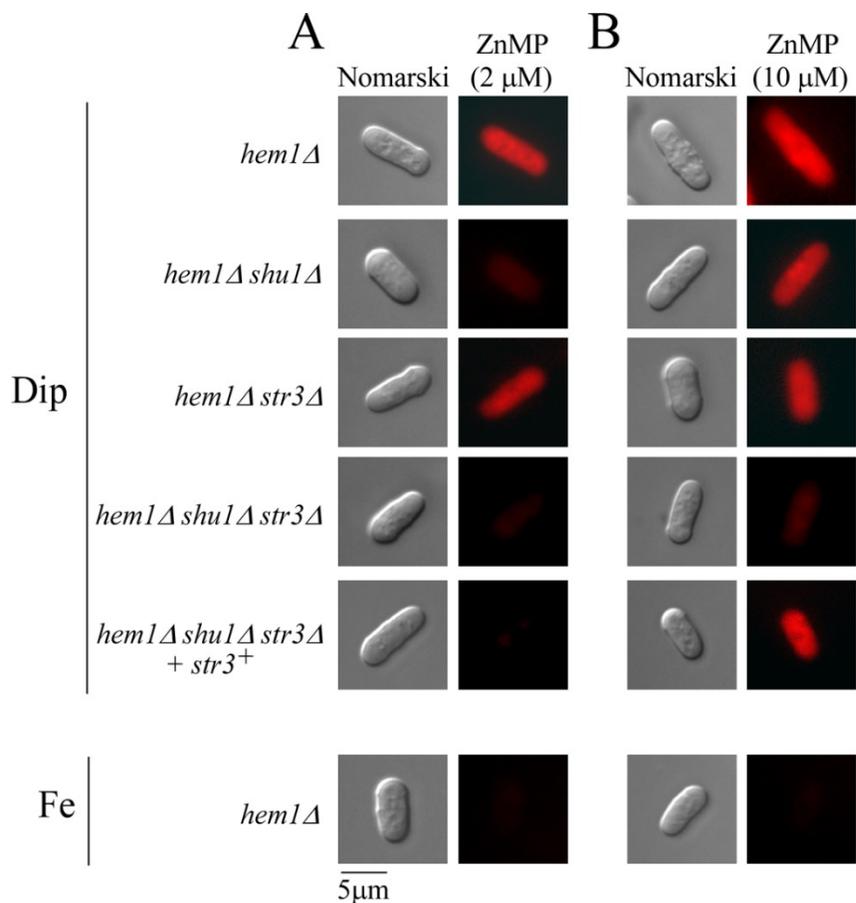
of ALA was lethal for a *hem1Δ* mutant strain (Fig. 3A). When *hem1Δ* and *hem1Δ str3Δ* cells (both strains expressing *shu1*<sup>+</sup>) were incubated in the absence of ALA and in the presence of 0.075 μM hemin, they exhibited a similar cell growth to *A*<sub>600</sub> of 2.6 over a time period of 80 h (Fig. 3B). Under these conditions and over the same period of time, *hem1Δ shu1Δ* and *hem1Δ shu1Δ str3Δ* strains (both lacking *shu1*) exhibited poor growth (*A*<sub>600</sub> of 0.33 and 0.29, respectively), which represented  $8.0 \pm 1.1$  fold less growth compared to strains that expressed a functional *shu1*<sup>+</sup> allele (Fig. 3B). This poor growth phenotype was still observed when growth assays were performed using *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells containing an untagged *str3*<sup>+</sup> or a GFP-tagged *str3*<sup>+</sup> allele that had been reintegrated (Fig. 3B).

We then investigated whether there was an effect of deletion of Str3 on hemin acquisition when hemin levels exceed 0.075 μM. Growth of *hem1Δ shu1Δ* (expressing endogenous *str3*<sup>+</sup>) and *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells was assessed in the presence of 0.15 μM hemin but in the absence of ALA. In the case of *hem1Δ shu1Δ* cells (expressing *str3*<sup>+</sup>), their ability to grow was restored in the presence of 0.15 μM hemin (*A*<sub>600</sub> of 3.3 after 80 h), but not in the same medium supplemented with lower concentrations of hemin (0.075 μM) (*A*<sub>600</sub> of 0.33 after 80 h) (Fig. 3, B and C). When growth assays were performed using *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing a wild-type *str3*<sup>+</sup> or a GFP-tagged *str3*<sup>+</sup> allele in the presence of 0.15 μM hemin, results showed that these strains exhibited robust growth in a manner similar to *hem1Δ shu1Δ* cells expressing an endogenous *str3*<sup>+</sup> (Fig. 3C). Taken together, these results revealed that Str3 supports hemin acquisition in the presence of 0.15 μM hemin but it is not effective when hemin levels are as low as 0.075 μM.



▲ **Figure 3.** The *str3<sup>+</sup>* gene is required for hemin acquisition by *hem1Δ shu1Δ* cells in ALA-free medium supplemented with 0.15 μM hemin. *A*, Growth of the indicated yeast strains was assessed in YES medium that was left untreated (no ALA, open squares) or supplemented with exogenous ALA (200 μM). Strain color codes are as follows: black (*hem1Δ*), blue (*hem1Δ str3Δ*), green (*hem1Δ shu1Δ*), orange (*hem1Δ shu1Δ str3Δ* expressing *str3<sup>+</sup>*), red (*hem1Δ shu1Δ str3Δ* expressing *str3<sup>+</sup>-GFP*), and violet (*hem1Δ shu1Δ str3Δ*). *B* – *C*, Growth of strains was assessed in the presence of 0.075 μM (*panel B*) or 0.15 μM (*panel C*) hemin but in the absence of ALA. Strain color codes are the same as described in *panel A*. Results are representative of three independent experiments. Values are represented as the averages ± S.D.

*Str3* is required for cellular assimilation of ZnMP in the absence of *Shu1*. To obtain further evidence that *Str3* supported heme assimilation, we deleted the *str3*<sup>+</sup> gene (*str3Δ*) in a strain lacking *hem1*<sup>+</sup> and *shu1*<sup>+</sup> (*hem1Δ shu1Δ*) and tested whether this triple disruption strain could accumulate fluorescent ZnMP in comparison with a *hem1Δ shu1Δ* strain (Fig. 4). The indicated strains were incubated in ALA-free medium containing Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (100 μM) for 3 h. Cells were then incubated for 90 min in the presence of two distinct concentrations of ZnMP (2 and 10 μM). The ZnMP fluorescent signal was mostly lost in *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells when they had been incubated in the presence of 2 and 10 μM ZnMP (Fig. 4, A and B). Interestingly, in the presence of 10 μM ZnMP, a high intracellular ZnMP fluorescence signal was detected in *hem1Δ shu1Δ* mutant cells expressing an endogenous *str3*<sup>+</sup> allele or in *hem1Δ shu1Δ str3Δ* mutant cells expressing a wild-type *str3*<sup>+</sup> allele that had been re-integrated (Fig. 4B). In the presence of 2 μM ZnMP, the above-mentioned mutant strains expressing *str3*<sup>+</sup> failed to significantly accumulate ZnMP (Fig. 4A). In the case of *hem1Δ* and *hem1Δ str3Δ* cells that expressed an endogenous *shu1*<sup>+</sup> allele, a strong intracellular ZnMP fluorescence signal was observed in the presence of both concentrations of ZnMP (Fig. 4). There was an absence of ZnMP fluorescent signal in *hem1Δ* cells when they had been incubated in the presence of high iron concentrations (100 μM) due to the fact that expression of *shu1*<sup>+</sup> and *str3*<sup>+</sup> is repressed in iron-replete cells (7,11). Taken together, these results indicated that the inability to take up ZnMP in a *hem1Δ shu1Δ* mutant strain can be overcome by *Str3* when the medium is supplemented with 10 μM ZnMP. We therefore concluded that *S. pombe* possesses a *Shu1*-independent low affinity heme uptake pathway that requires *Str3*.



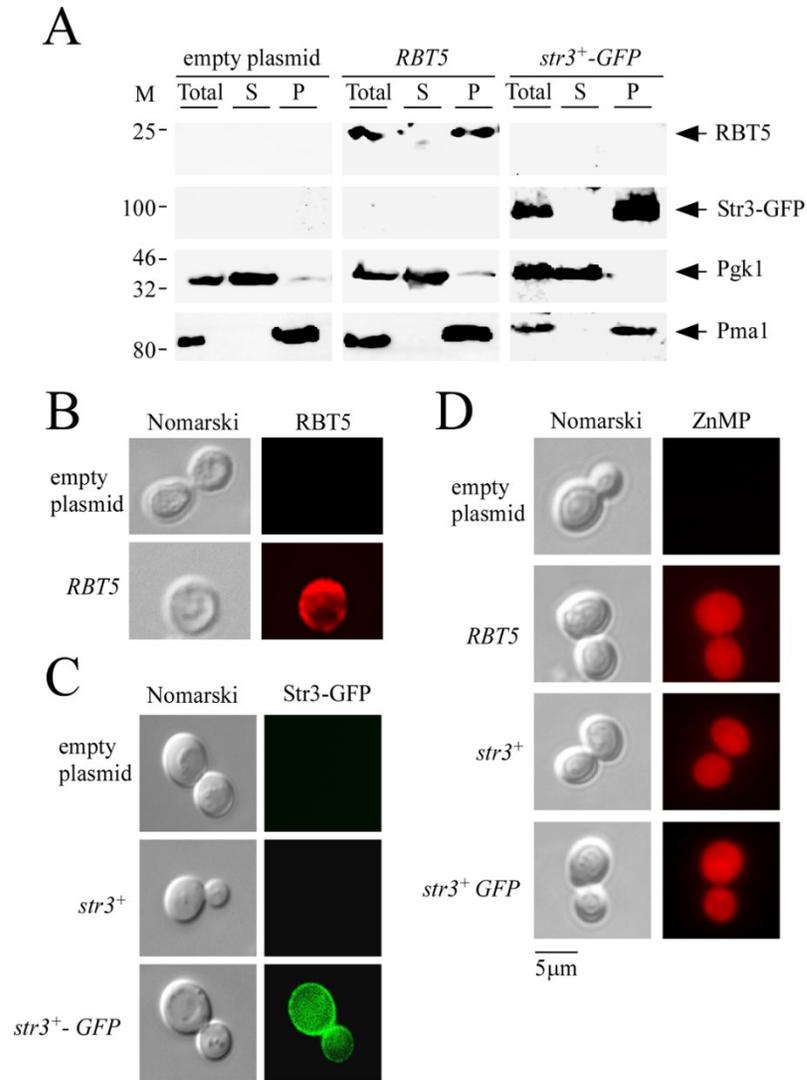
**▲ Figure 4.** Deletion of *shu1<sup>+</sup>* and *str3<sup>+</sup>* lead to defects in the cellular assimilation of ZnMP, albeit in a different concentration threshold. The indicated strains were precultured in the presence of Dip (50 μM) or FeCl<sub>3</sub> (100 μM), and ALA (200 μM). Cells were transferred in ALA-free medium containing Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (100 μM) for 3 h. In the final 90 min of treatment, ZnMP was added at the indicated concentration (2 μM, *panel A* or 10 μM, *panel B*). A *hem1Δ shu1Δ str3Δ* triple mutant strain in which a wild-type copy of the *str3<sup>+</sup>* gene was reintegrated (*re-int.*) was cultured in an identical manner. Cells were analyzed by fluorescence microscopy for accumulation of fluorescent ZnMP (*right*). Nomarski optics (*left*) was used to examine cell morphology. Results of microscopy are representative of five independent experiments.

*Heterologous expression of Str3 allows S. cerevisiae to acquire ZnMP.* In contrast to *S. pombe*, the yeast *S. cerevisiae* is unable to acquire exogenous heme (2,17). However, heterologous expression in *S. cerevisiae* of a heme uptake protein isolated from another organism confers the ability to *S. cerevisiae* to utilize heme or hemoglobin (18,19). To validate the role of Str3 in the assimilation of exogenous ZnMP, we expressed the *str3<sup>+</sup>* gene in a *S. cerevisiae* BY4741 *hem1Δ* mutant strain. In the presence of ALA, *hem1Δ* cells grew

due to the fact that ALA was used by Hem2, the second enzyme of the heme biosynthetic pathway. This observation suggested that the mutant cells generated sufficient quantities of heme for cellular needs of heme-dependent pathways. In contrast, there was a selective block of heme biosynthesis in absence of ALA. This observation was used as a stepping stone to investigate the nature of proteins that may participate in exogenous acquisition of heme. Experimentally, the *str3*<sup>+</sup> (*S. pombe*), *str3*<sup>+</sup>-GFP and *RBT5* (*C. albicans*) (20) genes were placed under the control of the *GPD* gene promoter and then transformed in *S. cerevisiae hem1Δ* cells using a centromeric plasmid. The cell surface-anchored heme-binding protein Rbt5 was used as a control because it has been established that it confers the ability to utilize exogenous hemin in *hem1Δ* cells (18). To ascertain that Str3-GFP and Rbt5 were produced, crude membrane fractions were isolated by ultracentrifugation. Immunoblotting analysis showed that Str3-GFP, Rbt5, and Pma1 were associated with the membrane fractions (Fig. 5A). Plasma membrane protein Pma1 used as a control was detected in the membrane fraction (21). As expected, Str3-GFP, Rbt5, and Pma1 were not detected in the soluble fraction. In contrast, Pgc1 that is known to be found in the cytosolic fraction was present in the supernatant fraction (Fig. 5A). Indirect immunofluorescence and direct fluorescence microscopy were respectively performed to assess the cellular location of Rbt5 and Str3-GFP heterologously expressed in *S. cerevisiae*. In the case of Rbt5, results showed that Rbt5-dependent fluorescence was primarily detected at the cell periphery (Fig. 5B). In the case of Str3-GFP, the GFP signal was predominantly localized at the cell surface (Fig. 5C). When *S. cerevisiae hem1Δ* cells were transformed with an empty plasmid or an untagged *str3*<sup>+</sup>, the fluorescence signal was absent (Fig. 5, B and C). Given the results that Rbt5 and Str3-GFP were localized at *S. cerevisiae* cell surface, we investigated whether their presence led to cellular accumulation of fluorescent ZnMP. ALA was omitted from the culture medium to repress heme biosynthesis and *hem1Δ* cells were preincubated for 3 h under conditions of iron starvation. Cells were then incubated for 90 min in the presence of ZnMP (50 μM). Results showed that *S. cerevisiae hem1Δ* cells expressing Rbt5, Str3 or Str3-GFP produced a ZnMP-associated fluorescence signal that was mainly located in the cytoplasm of cells (Fig. 5D). There was an absence of ZnMP fluorescent signal in cells transformed with an empty expression plasmid (Fig. 5D). Taken together, these results established the fact that

heterologous expression of *S. pombe* Str3 in *S. cerevisiae* leads to cytoplasmic accumulation of the heme analog ZnMP.

▼ **Figure 5.** *Expression of S. pombe Str3 in S. cerevisiae leads to cellular accumulation of ZnMP.* *A*, A *S. cerevisiae hem1Δ* mutant strain was transformed with plasmid p415GPD alone (empty plasmid) or with plasmids p415GPD*RBT5* or p415GPD*str3<sup>+</sup>-GFP*. Cells were precultured in the presence of ALA (200 μM) and then transferred in an ALA-free media in which they were incubated for 3 h. Total protein extracts (Total) from these cells were prepared and ultracentrifuged to obtain supernatant (S) and membrane protein pellet fraction (P). Supernatant and pellet fractions were resolved on SDS-polyacrylamide gels and analyzed for steady-state levels of Rbt5, Str3-GFP, Pgk1, and Pma1 by immunoblotting using anti-Rbt5, anti-GFP, anti-Pgk1, and anti-Pma1 antibodies. M, positions of molecular weight of protein standards (in kDa) are indicated on the left-hand side. *B - C*, *hem1Δ* cells expressing *C. albicans* Rbt5 (*panel B*), *S. pombe* Str3 and Str3-GFP (*panel C*) proteins were analyzed by indirect immunofluorescence (Rbt5) and direct fluorescence (Str3-GFP) microscopy. Absence of fluorescence was observed in the case of cells harboring an empty plasmid or an untagged *str3<sup>+</sup>* allele. *D*, *S. cerevisiae hem1Δ* cells expressing the indicated allele were precultured in the presence of ALA (200 μM). Cells were washed and incubated in ALA-free medium for 3 h. After a 90-min treatment with ZnMP (50 μM), cells were examined by fluorescence microscopy for accumulation of fluorescent ZnMP (*right*). Cell morphology was examined using Nomarski optics (*left panels, B - D*). Results of microscopy are representative of five independent experiments.



*Str3 binds hemin.* To further examine whether Str3 was able to bind heme, *str3<sup>+</sup>-GFP* and *shu1<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>* fusion alleles were co-expressed in a *hem1Δ shu1Δ str3Δ* triple mutant strain. Mid-logarithmic cells were washed to remove ALA and then treated with Dip (250 μM) or iron (100 μM) for 3 h. Total protein extracts were prepared and cell membranes isolated by ultracentrifugation. Membrane protein fractions were detergent-treated (Triton X-100) and then re-fractionated by ultracentrifugation. Solubilized Str3-GFP and Shu1-HA<sub>4</sub> were mixed with hemin-agarose or agarose (control) beads. Immunoblotting analysis of proteins bound to hemin-agarose using anti-GFP and anti-HA antibodies revealed that both Str3-GFP and Shu1-HA<sub>4</sub> isolated from iron-starved cells were detected in the bound fraction (Fig. 6A). In hemin-agarose pulldown assays, Shu1-HA<sub>4</sub> served as a control of known heme-binding protein (7,8). As an additional control for specificity of the resin, Str3-GFP and Shu1-HA<sub>4</sub>

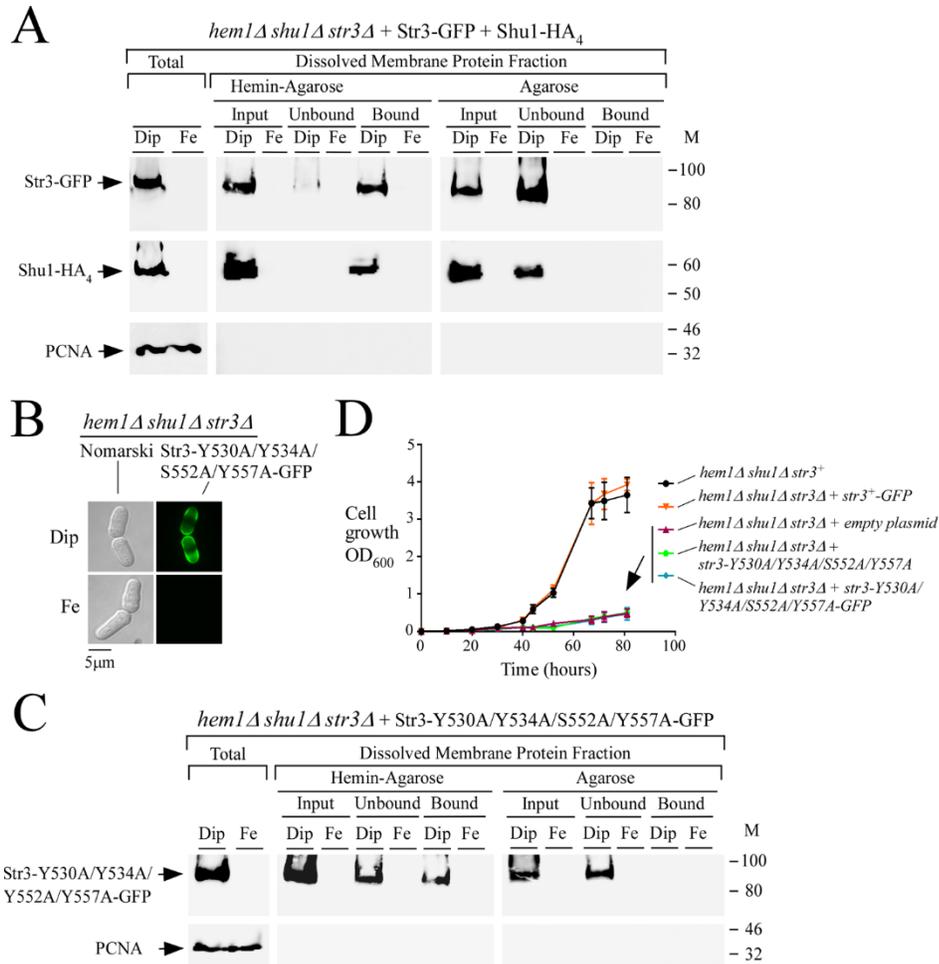
were found in the unbound fraction (flow-through) when only agarose beads were used (Fig. 6A). Consistent with iron-dependent repression of *str3*<sup>+</sup>-GFP and *shu1*<sup>+</sup>-HA4 transcript levels (under the control of *str3*<sup>+</sup> and *shu1*<sup>+</sup> promoters, respectively), Str3-GFP and Shu1-HA4 were not detected in membrane fractions that had been prepared from iron-replete cells (Fig. 6A). Soluble PCNA was only detected in whole cell extracts and was absent from the membrane protein fractions.

As mentioned above, two putative heme-binding motifs <sup>530</sup>Y-X<sub>3</sub>-Y<sup>534</sup> and <sup>552</sup>S-X<sub>4</sub>-Y<sup>557</sup> are present within the sequence of the predicted loop 11 of Str3. We therefore tested whether Tyr<sup>530</sup>, Tyr<sup>534</sup>, Ser<sup>552</sup>, and Tyr<sup>557</sup> residues were involved in the ability of Str3 to interact with hemin. Our approach was to replace these residues (positions 530, 534, 552, and 557) with alanine residues. When expressed in *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells that had been washed to remove ALA and then incubated in the presence of Dip (250 μM, 3 h), the Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP mutant protein was located at the cell surface as observed in the case of wild-type GFP-tagged Str3 (Figs 5 and 6B). In contrast, Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP was not detected at the surface of iron-treated (100 μM, 3 h) cells. Membrane fractions collected by ultracentrifugation were subjected to Triton X-100 treatment and the solubilized proteins were analyzed by hemin pulldown assays using hemin-agarose or agarose beads. Results showed that Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP was largely detected in the unbound (flow through) fraction (64±5% of the preparation), consistent with a loss of affinity for hemin (Fig. 6C). A small but significant proportion of the mutant protein (36±5% of the preparation) was still retained on hemin-agarose. In the case of Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP, its presence in the unbound fraction (Fig. 6C, center panel) after hemin pulldown assays was markedly higher as compared with wild-type Str3-GFP for which only minimal amounts (≥0.5±0.05% of the preparation) of the protein was found in the unbound fraction (Fig. 6A, center panel). Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP was exclusively found in the unbound fraction when agarose beads were used and it was not detected in protein extracts that had been prepared from iron-replete cells as opposed to extracts prepared from iron-starved cells (Fig. 6C).

To investigate whether mutations of Tyr530, Tyr534, Ser552, and Tyr557 residues to Ala in Str3 affected the ability of cells to grow in the presence of exogenous hemin as a sole source

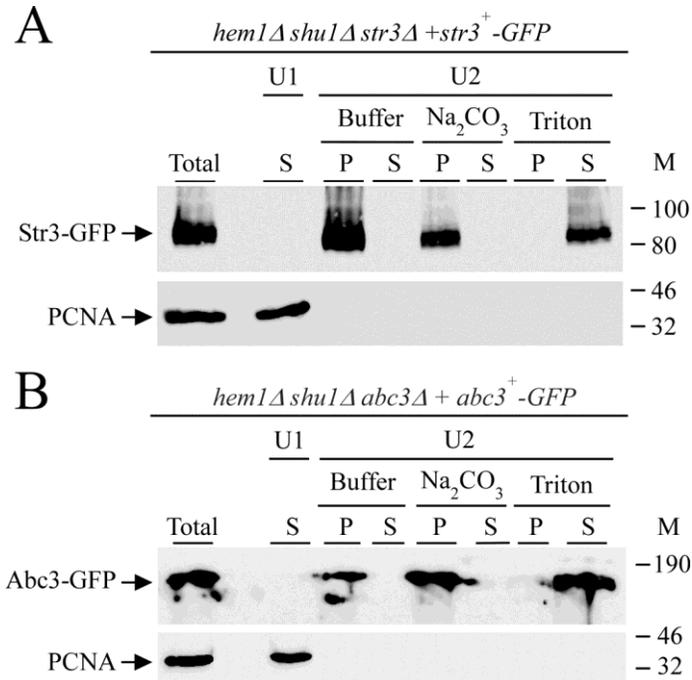
of heme (no ALA; heme biosynthesis off), *hem1Δ shu1Δ str3Δ* mutant cells were transformed with integrated plasmids expressing the following alleles: *str3<sup>+</sup>-GFP*, *str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A*, *str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP*, and an empty plasmid as control. In the presence of hemin (0.15 μM), *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing Str3-GFP grew to  $A_{600}$  of 3.6 over a time period of 80 h. This level of growth was comparable to that of *hem1Δ shu1Δ* mutant cells in which an endogenous *str3<sup>+</sup>* gene had been expressed ( $A_{600}$  of 3.9 after 80 h) (Fig. 6D). In contrast, *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing either Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A or Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP exhibited poor growth ( $A_{600}$  of 0.49 and 0.47, respectively, after 80 h) in a medium supplemented with hemin (0.15 μM) (Fig. 6D). Taken together, these results indicated that amino acid residues Tyr<sup>530</sup>, Tyr<sup>534</sup>, Ser<sup>552</sup>, and Tyr<sup>557</sup> within the predicted extracellular loop between the eleventh and twelfth transmembrane regions of Str3 are required for its hemin-dependent transport function.

▼ **Figure 6.** *Str3 binds hemin.* *A*, *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells co-expressing GFP-tagged Str3 and HA<sub>4</sub>-tagged Shu1 were precultured in the presence of ALA (200 μM) and Dip (50 μM). Cells in the mid-exponential phase of growth were transferred to ALA-free medium and treated with Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (100 μM) for 3 h. Whole cell extracts (Total) were prepared and cell membranes were obtained by ultracentrifugation. Triton X-100-solubilized membrane proteins (input) were subjected to hemin pulldown assays using hemin-agarose or agarose alone. Unbound and bound protein fractions were analyzed by immunoblot assays using anti-GFP, anti-HA, and anti-PCNA antibodies. *B*, *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP were analyzed for detection of a GFP-mediated signal by fluorescence microscopy (*right*). Before microscopic analysis, cells were incubated in the presence of Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (Fe, 100 μM) for 3 h. Nomarski optics was used to reveal cell morphology (*left*). *C*, *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing GFP-tagged Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A mutant protein were cultured under the same conditions as described for *panel A*. Protein fractionation, pulldown assays with hemin-agarose, and immunoblotting were carried out as indicated for *panel A*. M, Positions of molecular weight of protein standards (in kDa) are indicated on the right-hand side. *D*, Growth of the indicated strains was assessed in the presence of hemin (0.15 μM) but in the absence of ALA. Strain color codes were: *hem1Δ shu1Δ str3<sup>+</sup>* in black; *hem1Δ shu1Δ str3Δ* expressing *str3<sup>+</sup>-GFP* in orange; *hem1Δ shu1Δ str3Δ* with an empty plasmid in violet; *hem1Δ shu1Δ str3Δ* expressing *str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A* in green; and *hem1Δ shu1Δ str3Δ* expressing *str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP* in blue. Values are represented as the averages ± S.D. of three independent experiments.



*Str3* is an integral membrane protein. Cell-surface detection and a topological model of Str3 suggest that it is integrated into cellular membranes. To investigate this prediction, cell membranes were isolated by ultracentrifugation of whole-cell extracts of *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing *str3<sup>+</sup>-GFP* under low iron conditions. In parallel experiments, we used *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells expressing *abc3<sup>+</sup>-GFP* under the same conditions since Abc3 is a control protein known to be integrated into cellular membranes (22). After a first ultracentrifugation, soluble and released peripheral membrane proteins present in the supernatants were left untreated and analyzed by immunoblot assays (Fig. 7, U1). In the case of the pellet fraction, it was resuspended and left untreated or was adjusted to 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> or 1% Triton X-100, and then refractionated through a second ultracentrifugation. Results showed that in the absence of any treatment, Str3-GFP and Abc3-GFP were detected only in the pellet fractions (Fig. 7, Buffer). An identical protein pattern was observed when the procedure had been performed in the presence of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, which is known to selectively

release non-integral membrane proteins (with no effect on integral membrane proteins). Treatment of the pellet fraction with Triton X-100 induced the release of Str3-GFP and Abc3-GFP, which were detected in the supernatant fractions (Fig. 7, A and B). Taken together, these results indicated that Str3-GFP is an integral membrane protein as previously characterized in the case of Abc3-GFP (22). As an additional control, soluble PCNA was detected only in the supernatant fraction (Fig. 7, A and B).

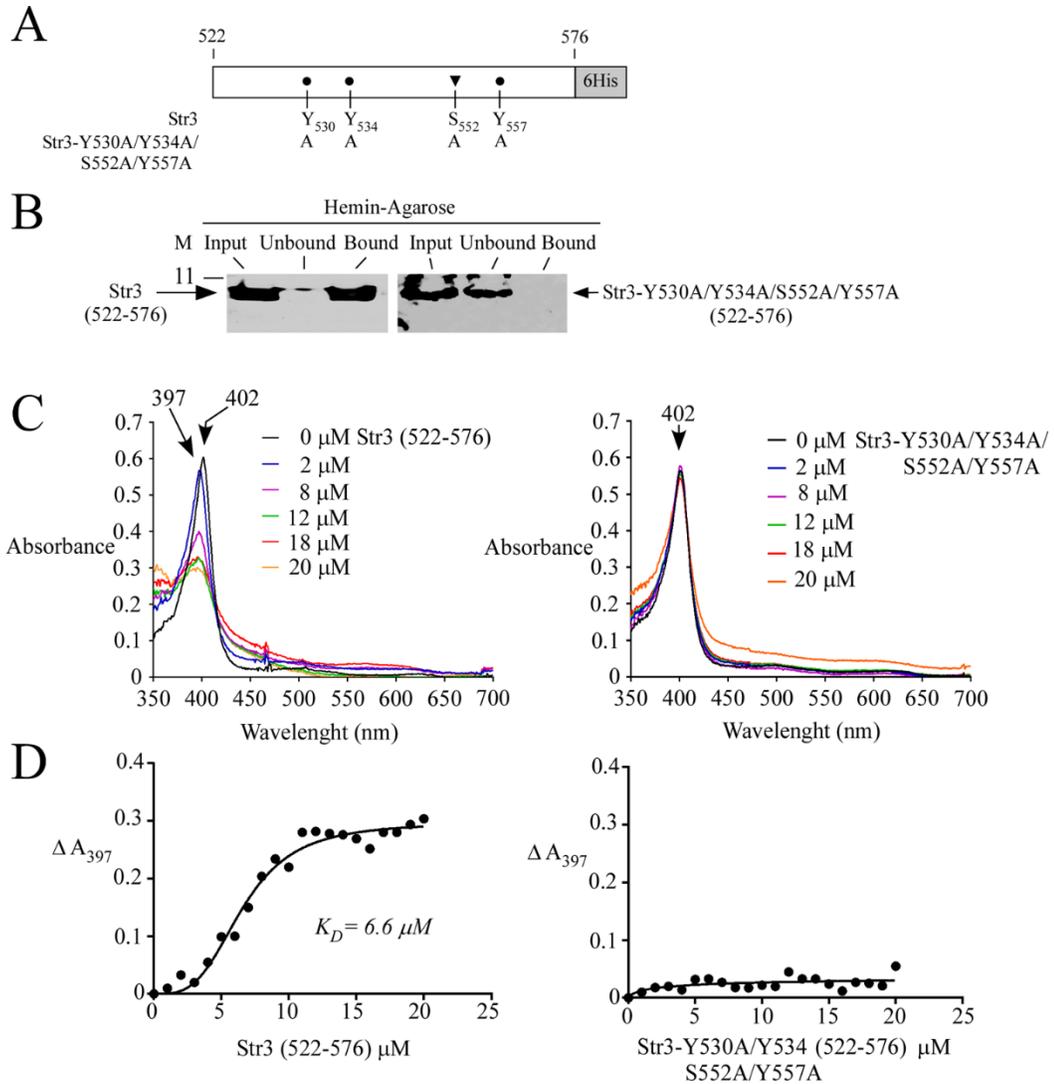


**▲ Figure 7.** *Str3* is an integral membrane-associated protein. *hem1Δ shu1Δ str3Δ* and *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* mutant strains were transformed with *str3<sup>+</sup>-GFP* (panel A) and *abc3<sup>+</sup>-GFP* (used as a control, panel B) alleles, respectively. Transformed cells were pre-cultured in the presence of Dip (50 μM) and ALA (200 μM). Cells were washed twice and mid-logarithmic-phase cells were incubated in the presence of Dip (250 μM) for 3 h. Total-extract preparation (Total) was subjected to a first ultracentrifugation (U1) at 100,000 X g. The supernatant (S; U1) was analyzed. The membrane-containing pellet fraction obtained from U1 was resuspended and kept untreated (buffer) or incubated in the presence of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 M) or Triton X-100 (1%), and then ultracentrifuged a second time at 100,000 X g (U2). Supernatant (S) and pellet (P) fractions were resolved on SDS-polyacrylamide gels and analyzed by immunoblotting using anti-GFP and anti-PCNA antibodies. M, Positions of molecular weight of protein standards (in kDa) are indicated on the right-hand side. Str3-GFP, Abc3-GFP, and PCNA are indicated with arrows.

*The predicted hydrophilic loop region 522 – 576 of Str3 binds hemin.* The biophysical properties of Str3 which is an integral membrane protein that harbors 12 predicted hydrophobic membrane spans prevent the full-length Str3 to be expressed as a soluble protein

in *E. coli*. However, when a portion of *str3*<sup>+</sup> encoding the extracellular loop 11 corresponding to amino acid residues 522 – 576 was subcloned, the resulting polypeptide was highly soluble in *E. coli*. Of interest, Str3 522 – 576 contained two putative heme-binding motifs <sup>530</sup>Y-X<sub>3</sub>-Y<sup>534</sup> and <sup>552</sup>S-X<sub>4</sub>-Y<sup>557</sup> (Fig. 8A). We investigated the ability of purified, bacterially expressed Str3 522 – 576 to interact with hemin. In parallel experiments, a mutant version of Str3 522 – 576 in which Tyr<sup>530</sup>, Tyr<sup>534</sup>, Ser<sup>552</sup>, and Tyr<sup>557</sup> had been substituted by Ala residues was generated and produced in *E. coli*. His<sub>6</sub>-tagged protein products (wild-type and mutant) were purified using two successive rounds of affinity chromatography on nickel-agarose beads. Results showed that wild-type Str3 522 – 576 was retained on hemin-agarose beads, with a trace amount of protein detected in the flow-through (unbound) fraction (Fig. 8B). In contrast, the mutant form of Str3 522 – 576 (harboring Y530A/Y534A/S552A/Y557A substitutions) was exclusively found in the flow-through (unbound) fraction (Fig. 8B).

Additional evidence that the amino acid region 522 – 576 of Str3 bound hemin was obtained by spectroscopy. Absorbance spectra of addition of increasing quantities of purified Str3 (522-576) (0 – 20 μM) to a fixed concentration of hemin (2 μM) were recorded. Absorption of hemin exhibited a typical Soret peak at 402 nm in the absence of Str3 (Fig. 8C). Results showed that addition of Str3 (522 – 576) caused a shift in the absorbance of hemin to shorter wavelengths (blue shift) corresponding to 394 – 397 nm (Fig. 8C). The absorption peak that was blue-shifted in the presence of Str3 (522 – 576) decreased as a function of increasing concentrations of Str3 (Fig. 8C). In contrast, the blue shift was not observed in the case of the Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A mutant. Furthermore, the intensity of the peak did not show significant changes as a function of increasing concentrations of Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A (Fig. 8C). Analysis of the data yielded a value of  $6.6 \times 10^{-6}$  M for the constant of dissociation ( $K_D$ ) with respect to Str3 (522 – 576). On the other hand, the lack of interaction between Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A and hemin did not allow a  $K_D$  value to be determined (Fig. 8D). Taken together, these results showed that the Str3 (522 – 576) region interacts with hemin without the need for an additional protein partner.



▲ **Figure 8.** *Str3* (522-576) and hemin interact with one another. *A*, Schematic representation of the *Str3* (522-576) region and its mutant derivative. *B*, Purified wild-type *Str3* (522-576) (*left side*) or *Str3*-Y530A/Y534A/S552A/Y557A (522-576) mutant (*right side*) (*Input*) was incubated with hemin-agarose beads. Unbound and bound purified wild-type or mutant *Str3* (522-576) was analyzed by immunoblot assays using an anti-HIS<sub>6</sub> antibody. *C*, differential spectral titration of wild-type *Str3* (522-576)-hemin interaction (*left side*) using 5 μM of hemin and increasing concentrations of *Str3* (0 – 20 μM). Similar titration assays (*right side*) were performed with increasing concentrations of *Str3*-Y530A/Y534A/S552A/Y557A (522-576) mutant (0 – 20 μM) and hemin (5 μM). *D*, hemin-binding curves for wild-type (*left*) and mutant (*right*) *Str3* (522-576) obtained by plotting changes in absorbance at the Soret peak as a function of *Str3* concentrations. Wild-type *Str3* (522-576) and hemin interacted with one another with a  $K_D$  of  $6.6 \times 10^{-6}$  M.

## DISCUSSION

We have previously reported that *S. pombe* has the ability to utilize exogenous hemin as a heme source (7). Heme acquisition by *S. pombe* occurs through the activity of Shu1 in the presence of 0.075  $\mu\text{M}$  hemin in the medium (7). Here, we showed that *hem1 $\Delta$ shu1 $\Delta$*  mutant cells were still able to acquire exogenous hemin at concentrations of 0.15  $\mu\text{M}$  or higher, suggesting the presence of an additional mechanism for hemin acquisition. Genetic evidence for the role of Str3 as a hemin transporter was obtained by characterizing the consequence of its disruption in *hem1 $\Delta$ shu1 $\Delta$*  cells. Indeed, disruption of the *str3*<sup>+</sup> gene (*str3 $\Delta$* ) abrogated the ability of these cells to grow in the presence of 0.15  $\mu\text{M}$  hemin.

*In silico* membrane topology analysis of Str3 predicted that the protein contained amino acid sequence signatures characteristic of members of the MFS transporters (13). Str3 has been predicted to possess 12 transmembrane spans that are connected by short hydrophilic loops, except in the case of loops 6 and 11 that are notably longer. Loop 6 has been predicted to be cytosolic and to interconnect the first 6 transmembrane spans with the second half of the protein, whereas loop 11 has been predicted to be extracellular and exposed to a potential ligand. In the case of MFS-type iron-siderophore transporter, loop 11 contains the siderophore transporter domain (SITD) in which a highly conserved Tyr residue is present and required for uptake of siderophore into the cells (23). Although this highly conserved Tyr residue (position 571) was also found in Str3, loop 11 of Str3 was unique due to the presence of two putative heme-binding sequences <sup>530</sup>Y-X<sub>3</sub>-Y<sup>534</sup> and <sup>552</sup>S-X<sub>4</sub>-Y<sup>557</sup> that were absent in *S. pombe* Str1 and Str2 proteins. These two putative heme-binding sequences were reminiscent of NEAr-iron Transporter (NEAT) motifs that are found in several Gram-positive bacteria (24). Although the initial proposed role of NEAT domains was to bind siderophores for their delivery into Gram-positive cells, subsequent studies have shown that NEAT-containing proteins function to scavenge heme from hemoproteins and to uptake it through the bacterial cell surface for delivery into the cytosol (24-26). Several NEAT proteins contain a domain in which amino acid sequences are arranged in S-X<sub>4</sub>-Y and Y-X<sub>3</sub>-Y configurations that are important for heme-binding function (24). In bacteria, the canonical S-X<sub>4</sub>-Y motif is generally found within a small and unique  $\alpha$ -helix structure located at the N-terminal of the NEAT domain. The remaining part of the domain is

constituted of eight  $\beta$ -strands that form a conserved  $\beta$ -barrel fold. The Y-X<sub>3</sub>-Y motif is found within the eighth  $\beta$ -strand located at the C-terminal of the domain. In the case of the loop 11 of Str3, its structural conformation is unknown. However, according to an *in silico* three-dimensional model by I-TASSER (16), a putative heme-binding pocket has been predicted and comprised the Y-X<sub>3</sub>-Y and S-X<sub>4</sub>-Y motifs. In the current report, mutations of the Y-X<sub>3</sub>-Y and S-X<sub>4</sub>-Y motifs in Str3 led cells expressing the *str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A* allele to be unable to rescue *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$  str3 $\Delta$*  cells to grow in the presence of hemin in comparison to *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$  str3 $\Delta$*  cells expressing a wild-type *str3*<sup>+</sup> allele. Furthermore, pulldown assays using protein lysates prepared from cells expressing Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A showed that substitutions of Tyr<sup>530</sup>, Tyr<sup>534</sup>, Ser<sup>552</sup>, and Tyr<sup>557</sup> for the corresponding Ala residues markedly decreased Str3 binding to hemin-agarose. When the wild-type version of the loop 11 of Str3 (522 – 576) was produced and purified from *E. coli*, it was retained on hemin-agarose beads using pulldown assays. In contrast, a mutant form of the loop 11 containing Y530A/Y534A/S552A/Y557A substitutions failed to bind hemin-agarose beads, revealing that Tyr<sup>530</sup>, Tyr<sup>534</sup>, Ser<sup>552</sup>, and Tyr<sup>557</sup> residues participated in hemin coordination in Str3. However, whether one amino acid residue has a contribution to binding higher than the others or whether there is influence of additional amino acid residues flanking the motif or elsewhere will require additional studies. Based on an *in silico*-generated model, the Y-X<sub>3</sub>-Y and S-X<sub>4</sub>-Y motifs located in the loop 11 of Str3 may serve as a docking site to facilitate heme entry into the central cavity of the MFS transporter.

*S. pombe* Str3 is not the unique case of MFS-type transporter that mediates heme transport. In humans, FLVCR1a, FLVCR1b, and FLVCR2 are MFS-type transporters (27-31). FLVCR1a is a plasma membrane heme exporter (30). FLVCR1b encodes a shorter isoform of FLVCR1a that localizes to the mitochondrial membrane (27). FLVCR1b possesses 6 hydrophobic transmembrane domains and it is likely that FLVCR1b homodimerizes to form a full-length transporter with 12 transmembrane domains similar to FLVCR1a. It has been reported that FLVCR1b functions as a mitochondrial heme exporter (27). In the case of FLVCR2 expressed in mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes, it functions as an importer of heme (28). In cats, the cell surface heme exporter FLVCR1a is recognized and bound by the feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C) (32). Although the loop 11 of

FLVCR1a is shorter in comparison to that of Str3, FLVCR1a loop 11 is required for FeLV-C-FLVCR1 association (32). Upon the binding of FLVCR1a by FeLV-C viruses, cellular heme efflux is blocked. The observation that FLVCR1a loop 11 functions as a docking site for FeLV-C is reminiscent of our findings that the loop 11 of Str3 is involved in heme binding and may serve as an initial docking site for heme.

Structural studies of MFS transporters have shown that the twelve  $\alpha$ -helical transmembrane spans are organized into two six-helix halves (12,13). Substrate transport across the membrane likely occurs via a clamp-and-switch (also called rocker-switch) mechanism whereby the two halves of the transporter cycle through outward-opening (substrate loaded), occluded (substrate-bound) and inward-opening (substrate released) conformations. At present, the nature of the amino acid residues of Str3 and FLVCR that coordinate heme in the occluded state of the transporters is unknown. However, in the case of FLVCR1a, an *in silico* sequence analysis of heme carrier proteins has suggested that His-145, Tyr-153, and His-198 are likely to be involved in the heme transport process (30,33). Pairwise sequence alignment between Str3 and FLVCR1a has revealed that Tyr-153 is conserved in both proteins. Furthermore, the aromatic side chain of Tyr-153 (found at position 160 in Str3) is predicted to be positioned in the center of the transporter and available for substrate coordination. Additional studies will be required to confirm the functional role of Tyr-160 in Str3 as well as to identify additional amino acid residues that coordinate heme in the heme-bound occluded state of Str3.

*S. pombe* uses three distinct strategies for acquisition of iron from environmental sources. A first system involves the transport of reduced free iron ions through an oxidase-permease-based iron uptake machinery that consists of the Fio1 and Fip1 proteins, respectively (9). A second system takes up siderophore-bound iron through the ferrichrome transporter Str1 (11). A third system triggers assimilation of exogenous heme using the cell surface proteins Shu1 and Str3. Interestingly, *str3*<sup>+</sup> and *shu1*<sup>+</sup> are gene neighbors on chromosome I of *S. pombe* and their transcription is oriented in the same direction. In the case of Shu1, experiments using the heme analog ZnMP have shown that the prosthetic group first accumulates into vacuole and then within the cytoplasm (8). Furthermore, the same study has shown that mobilization of stored ZnMP from the vacuole for redistribution within the

cytoplasm requires the vacuolar transporter Abc3 (8). Upon addition of the iron chelator Dip, we observed that expression profiles of *fiol*<sup>+</sup> (or *fipl*<sup>+</sup>) and *str1*<sup>+</sup> were rapidly induced within 15 to 30 min of treatment. This step was followed by a sustained induction of *fiol*<sup>+</sup> and *str1*<sup>+</sup> mRNA levels for at least 4 h. In the case of *shu1*<sup>+</sup>, *abc3*<sup>+</sup>, and *str3*<sup>+</sup>, under the same conditions, their transcript levels were detected at times later than those of *fiol*<sup>+</sup> and *str1*<sup>+</sup>. Furthermore, *shu1*<sup>+</sup>, *abc3*<sup>+</sup>, and *str3*<sup>+</sup> mRNA levels were at their maximum levels only after 4 h in iron-starved cells. This observation suggests a common temporal regulation for *shu1*<sup>+</sup>, *abc3*<sup>+</sup>, and *str3*<sup>+</sup> compared to *fiol*<sup>+</sup> and *str1*<sup>+</sup>.

We have previously shown that Shu1 interacts with hemin with a  $K_D$  of 2.2  $\mu\text{M}$  (7). In the current study, results showed that loop 11 of Str3 exhibits a  $K_D$  value of 6.6  $\mu\text{M}$  for hemin. These results revealed that Str3 possesses a lower affinity for hemin than Shu1. Consistent with this observation, the hemin-dependent growth deficiency of a *hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$  double mutant (expressing *str3*<sup>+</sup>) can only be rescued when exogenous hemin exceeded  $\geq 2$  times the concentration that is required to overcome hemin deficiency of a *hem1* $\Delta$  single mutant (expressing *shu1*<sup>+</sup>). When the *abc3*<sup>+</sup> gene was deleted in a *hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$  mutant strain, *hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$  *abc3* $\Delta$  cells exhibited similar growth compared with *hem1* $\Delta$  *shu1* $\Delta$  cells in the presence of 0.15  $\mu\text{M}$  hemin, revealing that Str3 function was unaffected by the absence of the vacuolar transporter Abc3. Together, the results revealed that *S. pombe* possesses two systems with different affinities to bring exogenous heme into the cell. As a saprophyte fungus, these two transport systems identified in *S. pombe* may strengthen its ability to acquire external heme from natural sources in its environment.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Yeast strains and growth media.* Genotypes of *S. pombe* and *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. All *S. pombe* strains were maintained on yeast extract plus supplements medium (YES) containing 0.5% yeast extract, 3% glucose and 225 mg/l of adenine, uracil, leucine, lysine and histidine (34). In the case of cells lacking Hem1 (*hem1* $\Delta$ ), they were supplemented with ALA (200  $\mu\text{M}$ ) under non-selective growth conditions. *hem1* $\Delta$  mutant cells could also be maintained alive in the absence of ALA by supplementing the medium with exogenous hemin at the indicated concentrations (0.075, 0.15, and 0.5  $\mu\text{M}$ ). In

the presence of exogenous hemin, *hem1* $\Delta$  cells rely on their heme uptake machinery to sustain growth instead of using their own heme biosynthesis pathway. Strains used for DNA plasmid integration were cultured in Edinburgh minimal medium (EMM) in which specific amino acids were omitted as required to trigger chromosomal integration events. For monitoring cell growth, pre-cultures of cells were carried out in YES medium containing 2,2'-dipyridyl (Dip) (50  $\mu$ M) to chelate iron and, at the same time, to foster expression of iron-starvation-inducible genes, including *str3*<sup>+</sup> and *shu1*<sup>+</sup>. During pre-cultures of cells, ALA (200  $\mu$ M) was added to ensure biosynthesis of heme. Once pre-cultures reached mid-logarithmic phase, cells were washed twice and then diluted 1000-fold in YES containing Dip (10  $\mu$ M or the indicated concentration) and hemin (0.075, 0.15, or 0.5  $\mu$ M) but in the absence of ALA (unless otherwise stated). Cell cultures were then initiated and monitored (*A*<sub>600</sub>) at each of the indicated times. *S. cerevisiae hem1* $\Delta$  cells were grown in standard minimal medium (SD) that was supplemented in ALA (200  $\mu$ M), unless otherwise stated. Synthetic complete medium (SC) lacking leucine (SC-leu) was used to transform *S. cerevisiae* cells with p415-GPD (35) and its derivatives.

*Plasmids.* PCR amplification of the *str3*<sup>+</sup> gene was performed using primers designed to generate XmaI and NotI restriction sites at the upstream and the downstream termini of the open reading frame, respectively. The PCR product was digested with XmaI and NotI and cloned into the corresponding sites of pBPade6<sup>+</sup> (36). The resulting plasmid was named pBPade-*str3*<sup>+</sup>. Subsequently, the *str3*<sup>+</sup> promoter region from position -785 upstream of the initiator codon of *str3*<sup>+</sup> was isolated by PCR amplification and then inserted into pBPade-*str3*<sup>+</sup> at the ApaI and XmaI sites. This pBPade-*str3*<sup>+</sup> derivative was denoted pBPade-785*str3*<sup>+</sup>, and it allowed expression of *str3*<sup>+</sup> under the control of its own promoter. The *GFP* coding sequence derived from pSF-GP1 (37) was isolated by PCR using primers designed to generate NotI and SacII sites at the 5' and 3' termini of the *GFP* gene. The NotI-SacII *GFP*-encoded DNA fragment was inserted in-frame with the 3'-terminal coding sequence of *str3*<sup>+</sup>, creating pBPade-785*str3*<sup>+</sup>-*GFP*. Plasmid pBPade-785*str3*<sup>+</sup>-*GFP* was used to introduce mutations in the coding sequence of *str3*<sup>+</sup>. Codons corresponding to Tyr<sup>530</sup>, Tyr<sup>534</sup>, Ser<sup>552</sup>, and Tyr<sup>557</sup> were replaced by nucleotide triplets that encode alanine. These site-

specific mutations were created by a PCR overlap extension method (38). The resulting plasmid containing the *str3*<sup>+</sup> mutant allele was denoted pBPade-785*str3*-Y530A/Y534A/S552A/Y534A-GFP. A similar strategy was used to create an untagged *str3*<sup>+</sup> mutant allele and the plasmid was called pBPade-785*str3*-Y530A/Y534A/S552A/Y534A. The *shu1*<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub> gene was isolated from pBP-1317*shu1*<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub> (7) using the ApaI and SacII restriction enzymes. The purified DNA fragment was cloned into the corresponding sites of pJK148 (39). The resulting plasmid was denoted pJK-1317*shu1*<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>. The coding sequence corresponding to the *str3*<sup>+</sup> gene was isolated by PCR and cloned into the BamHI-XhoI-cut p415GPD vector (35). This centromeric plasmid was named p415GPD*str3*<sup>+</sup>. The *str3*<sup>+</sup>-GFP coding sequence was amplified from plasmid pBPade-785*str3*<sup>+</sup>-GFP using primers designed to generate XmaI and XhoI sites at each extremity of the PCR product. The DNA fragment was inserted into the corresponding sites of p415GPD, creating p415GPD*str3*<sup>+</sup>-GFP. The *RBT5* open reading frame was isolated by PCR from genomic DNA of the *Candida albicans* SC5314 strain. The PCR-amplified fragment was digested with XmaI and XhoI and cloned into the corresponding sites of p415GPD. The resulting plasmid was denoted p415GPD*RBT5*. The C-terminal DNA coding region of Str3 (corresponding to residues 522 – 576) was amplified by PCR using primers designed to generate NcoI and XhoI sites at the 5' and 3' termini of the DNA fragment, respectively. The purified PCR product was subsequently cloned into the corresponding sites of pET28a, which resulted in the Str3 fragment (522-576) fused downstream of and in-frame to the His<sub>6</sub> tag coding region. The resulting plasmid pET28a<sup>522</sup>Str3<sup>576</sup> was used to introduce mutations in the coding sequence of *str3*<sup>+</sup>. Codons corresponding to Tyr<sup>530</sup>, Tyr<sup>534</sup>, Ser<sup>552</sup>, and Tyr<sup>557</sup> were replaced with Ala residues. These site-specific mutations were created by a PCR overlap extension method (38). The new mutant plasmid was named pET28a<sup>522</sup>Str3<sup>576</sup>Y530A/Y534A/S552A/Y557A.

*RNA isolation and analysis.* Total RNA was extracted by a hot phenol method as described previously (40). Transcripts were analyzed using RNase protection assays as described previously (41). Plasmids pSK*str3*<sup>+</sup> (11) and pSK*act1*<sup>+</sup> (42) were linearized with BamHI for subsequent labeling with the use of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP and the T7 RNA polymerase. The

resulting antisense RNA probes served to determine *str3*<sup>+</sup> and *act1*<sup>+</sup> steady-state mRNA levels. In the case of *act1*<sup>+</sup> transcripts, they were probed as an internal control for normalization during quantification of RNase protection products.

*Direct fluorescence and indirect immunofluorescence microscopy.* Fluorescence and differential interference contrast images of cells were viewed with a Nikon Eclipse E800 epifluorescent microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with a Hamamatsu ORCA-ER digital cooled camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Cells were subjected to microscopic analysis using a 1000X magnification and the following filters: 340-380 nm (blue), 465-495 nm (green), 510-560 nm (red). For detection of fluorescent ZnMP accumulation in *S. pombe* cells, liquid cultures of the indicated strains were seeded to an *A*<sub>600</sub> of 0.5. The cultures were then incubated in ALA-free medium containing Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (100 μM) for 3 h. Subsequently, ZnMP (2 or 10 μM) was added for 90 min. ZnMP accumulation was stopped by adding 5 volumes of ice-cold 5% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS). After centrifugation, cells were resuspended in ice-cold 2% BSA in PBS and examined by fluorescence microscopy as described previously (7,8). In the case of *S. cerevisiae* cells, a similar method was used for fluorescence microscopic visualization of ZnMP, except that the indicated strains were incubated in ALA-free standard minimal medium (SD) containing a higher concentration of ZnMP (50 μM) than used in *S. pombe*. To determine the cellular location of Rbt5 in *S. cerevisiae* cells, indirect immunofluorescence microscopy was performed using formaldehyde-fixed cells as described previously (36). Cells were spheroplasted using zymolase (30 mg/ml), β-mercaptoethanol (10 mM) and Triton X-100 (1%) as described previously (7). Spheroplasts were adsorbed on poly-L-lysine-coated (0.1%) multiwall slides as described previously (36). After a 30 min block with Tris buffered saline (TBS) buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% BSA, and 0.02% sodium azide), cells were incubated with a custom anti-Rbt5 antibody (Abcam, Burlingame, CA) diluted 1:250 in TBS. After a 18-h reaction, cells were washed with TBS and incubated for 90 min with tetramethylrhodamine-labelled goat anti-rabbit IgG (Invitrogen; T-2769) diluted 1:500 in TBS. Fields of cells shown in this study correspond to a minimum of five independent experiments.

*Protein extraction and analysis.* Preparation of cell lysates from *S. pombe* and *S. cerevisiae* was performed with glass beads using the HEGN100 buffer containing 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10% glycerol, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT), and a complete protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich; P8340). Cells were broken using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals, Solon, OH). Cell lysates were fractionated using successive rounds of ultracentrifugation as described previously (8). Soluble and dissolved membrane proteins were resolved by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and analyzed by immunoblot assays. For protein expression analysis, the following primary antibodies were used for immunodetection: monoclonal anti-GFP antibody B-2; monoclonal anti-HA antibody F-7 (Santa Cruz Biotechnology); monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin antibody B-5-1-2; monoclonal anti-PCNA antibody PC10 (Sigma-Aldrich); monoclonal anti-Pma1 antibody 40B7 (Thermo Fisher Scientific); monoclonal anti-Pgk1 antibody 22C5-D8 (Molecular Probes); monoclonal anti-Hiss antibody (penta-His; Quiagen); and, custom polyclonal anti-Rbt5 (Abcam). Following incubation with primary antibodies, membranes were washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences), developed with ECL reagents (Amersham Biosciences), and visualized by chemiluminescence. In the case of pulldown assays with hemin-agarose, proteins (~100  $\mu$ g) were incubated with 20  $\mu$ l of hemin-agarose or agarose beads, and the suspensions were mixed end-over-end for 30 min at 25°C. The beads were centrifuged, and unbound material was kept on ice. The beads were washed three times with 1 ml of buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl and 1% Triton X-100. The beads were transferred to a fresh microtube before the last wash. Immunoprecipitates and unbound material were resuspended and mixed, respectively, with 50  $\mu$ l of SDS loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% SDS, 5 mM EDTA, 8 M urea) and heated for 30 min at 37°C. Samples were resolved by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels.

*Purification of Str3 522-576 expressed in bacteria.* *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS cells harboring plasmid pET28a<sup>522</sup>Str3<sup>576</sup> or pET28a<sup>522</sup>Str3<sup>576</sup>Y530A/Y534A/S552A/Y557A were grown to an  $A_{600}$  of 0.5. At this growth phase, pET28a-driven protein expression was induced with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (0.4 mM) for 4 h at 37°C in the presence of ethanol (2%). Cells were then broken up by sonication in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% sucrose, 20 mM imidazole, 50  $\mu$ g/ml lysozyme and 1% Triton X-100) containing a cocktail of protease inhibitors (P8340; Sigma-Aldrich). Protein extracts were incubated for 2 h at 4°C with a suspension (2 ml) of nickel-nitrilotriacetic acid-agarose beads. Str3 (522-576) or Str3Y530A/Y534A/S552A/Y557A (522-576) protein bound to the beads were eluted stepwise with buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glycerol) containing 100, 500, and 1000 mM imidazole. Samples (500 mM imidazole eluate fractions) containing Str3 (522-576) or Str3Y530A/Y534A/S552A/Y557A (522-576) were dialyzed to remove imidazole (down to 5 mM) and processed for an additional purification on the same type of affinity resin.

*Absorbance spectroscopy.* A stock solution of hemin (5 mM) was prepared by dissolution in NaOH (0.1 M) as described previously (7). Fresh stock solution was diluted (1:1000) and hemin concentration was determined at 385 nm using an extinction coefficient of 58,400 liters $\cdot$ mol<sup>-1</sup> $\cdot$ cm<sup>-1</sup>. Association of proteins with heme was determined by adding increasing amounts of a protein (purified Str3 (522-576) or Str3Y530A/Y534A/S552A/Y557A (522-576); 0 to 20  $\mu$ M) to hemin (2  $\mu$ M) in 40% dimethyl sulfoxide buffered with 20 mM HEPES (pH 7.4). Differences in absorption spectra over a range of 350 to 700 nm were recorded using a DU730 spectrophotometer (Beckman Coulter). Changes in absorbance at the Soret peak served to monitor formation of the protein-heme complex and determination of dissociation constant ( $K_D$ ) as described previously (7). Data were analyzed using the GraphPad Prism version 7 software.

▼ **Table 1.** *S. pombe* and *S. cerevisiae* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source or reference
FY435	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210</i>	(43)
<i>fep1Δ</i>	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 fep1Δ::ura4<sup>+</sup></i>	(43)
TMY1	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	(7)
TMY2	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	(7)
TMY17	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup></i>	This study
VNY13	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>:ade6<sup>+</sup></i>	This study
VNY14	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>-GFP:ade6<sup>+</sup></i>	This study
VNY15	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>-GFP:ade6<sup>+</sup> shu1<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>:leu1<sup>+</sup></i>	This study
VNY16	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>Y530A/Y534A/S552A/Y557A:ade6<sup>+</sup></i>	This study
VNY17	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>Y530A/Y534A/S552A/Y557-GFP:ade6<sup>+</sup></i>	This study
BY4741	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(44)
VNY18	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hem1Δ ::KAN<sup>r</sup></i>	This study
VNY19	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hem1Δ ::KAN<sup>r</sup> p415-GPD</i>	This study
VNY20	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hem1Δ ::KAN<sup>r</sup> p415-GPD-RBT5</i>	This study
VNY21	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hem1Δ ::KAN<sup>r</sup> p415-GPD-str3<sup>+</sup></i>	This study
VNY20	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hem1Δ ::KAN<sup>r</sup> p415-GPD-str3<sup>+</sup>-GFP</i>	This study

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Gilles Dupuis for critical reading of the manuscript and for his valuable comments. T.M. is recipient of a studentship from the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Université de Sherbrooke. This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant #RGPIN-2015/2020-04878) to S.L.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest with the content of this article.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.N. planned, designed, and performed most of the experiments. T.M. planned and obtained several preliminary experimental results as well as performed numerous bioinformatics analyses. V.N., T.M. and S.L. analyzed data. V.N., T.M. and S.L. conceptualized research and wrote the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

## REFERENCES

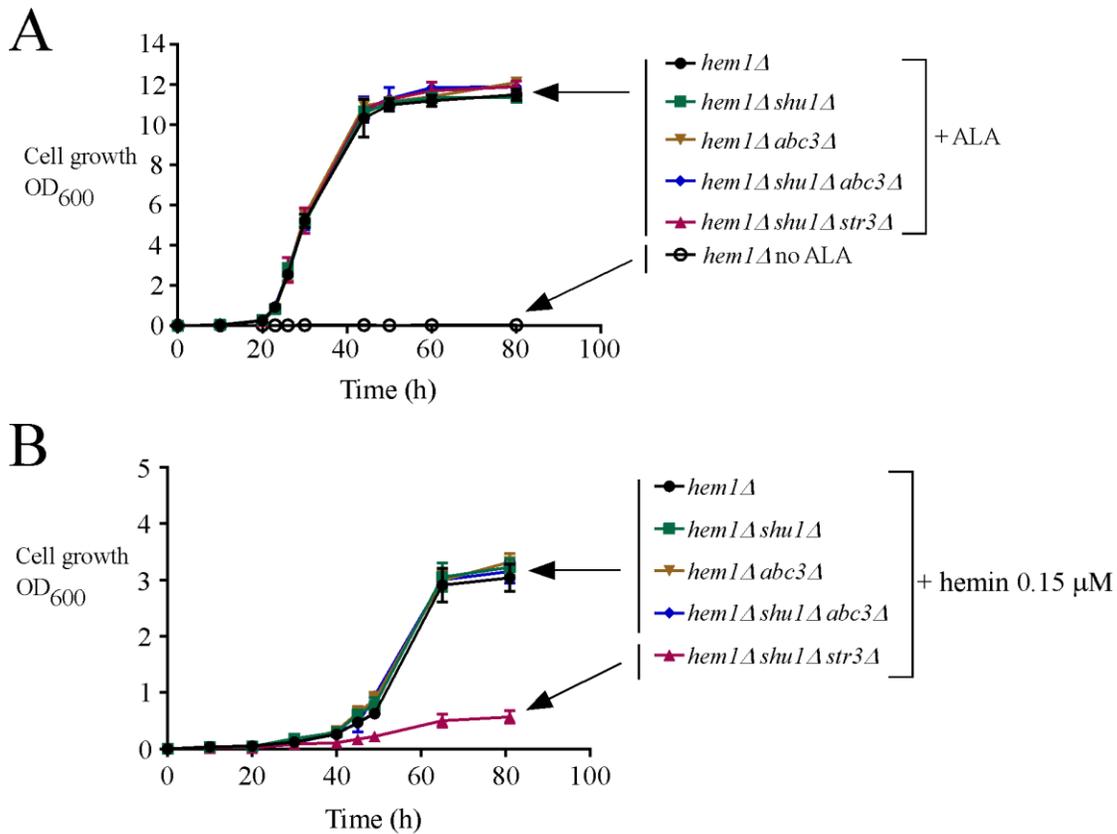
1. Severance, S., and Hamza, I. (2009) Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chem. Rev.* **109**, 4596-4616
2. Hamza, I., and Dailey, H. A. (2012) One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1617-1632
3. Tsiftoglou, A. S., Tsamadou, A. I., and Papadopoulou, L. C. (2006) Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol. Ther.* **111**, 327-345
4. Yuan, X., Rietzschel, N., Kwon, H., Walter Nuno, A. B., Hanna, D. A., Phillips, J. D., Raven, E. L., Reddi, A. R., and Hamza, I. (2016) Regulation of intracellular heme trafficking revealed by subcellular reporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E5144-5152
5. Reddi, A. R., and Hamza, I. (2016) Heme mobilization in animals: a metallolipid's journey. *Acc. Chem. Res.* **49**, 1104-1110
6. Korolnek, T., and Hamza, I. (2014) Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism. *Front. Pharmacol.* **5**, 126
7. Mourer, T., Jacques, J. F., Brault, A., Bisailon, M., and Labbé, S. (2015) Shu1 is a cell-surface protein involved in iron acquisition from heme in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **290**, 10176-10190
8. Mourer, T., Normant, V., and Labbé, S. (2017) Heme assimilation in *Schizosaccharomyces pombe* requires cell-surface-anchored protein Shu1 and vacuolar transporter Abc3. *J. Biol. Chem.* **292**, 4898-4912
9. Askwith, C., and Kaplan, J. (1997) An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 401-405
10. Brault, A., Mourer, T., and Labbé, S. (2015) Molecular basis of the regulation of iron homeostasis in fission and filamentous yeasts. *IUBMB life* **67**, 801-815
11. Pelletier, B., Beaudoin, J., Philpott, C. C., and Labbé, S. (2003) Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. *Nucleic acids Res.* **31**, 4332-4344
12. Quistgaard, E. M., Low, C., Guettou, F., and Nordlund, P. (2016) Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 123-132
13. Yan, N. (2015) Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annu. Rev. Biophys.* **44**, 257-283
14. Schrettl, M., Winkelmann, G., and Haas, H. (2004) Ferrichrome in *Schizosaccharomyces pombe* - an iron transport and iron storage compound. *Biometals* **17**, 647-654

15. Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* **24**, 841-847
16. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7-8
17. Protchenko, O., Rodriguez-Suarez, R., Androphy, R., Bussey, H., and Philpott, C. C. (2006) A screen for genes of heme uptake identifies the FLC family required for import of FAD into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **281**, 21445-21457
18. Weissman, Z., and Kornitzer, D. (2004) A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Mol. Microbiol.* **53**, 1209-1220
19. Weissman, Z., Shemer, R., Conibear, E., and Kornitzer, D. (2008) An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **69**, 201-217
20. Kuznets, G., Vigonsky, E., Weissman, Z., Lalli, D., Gildor, T., Kauffman, S. J., Turano, P., Becker, J., Lewinson, O., and Kornitzer, D. (2014) A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog.* **10**, e1004407
21. Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V. V., and Slayman, C. W. (2000) Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H(+)-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**, 155-160
22. Pouliot, B., Jbel, M., Mercier, A., and Labbé, S. (2010) *abc3+* encodes an iron-regulated vacuolar ABC-type transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **9**, 59-73
23. Nevitt, T., and Thiele, D. J. (2011) Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. *PLoS Pathog.* **7**, e1001322
24. Honsa, E. S., Maresso, A. W., and Highlander, S. K. (2014) Molecular and evolutionary analysis of NEAr-iron Transporter (NEAT) domains. *PLoS One* **9**, e104794
25. Grigg, J. C., Ukpabi, G., Gaudin, C. F., and Murphy, M. E. (2010) Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J. Inorg. Biochem.* **104**, 341-348
26. Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M., and Schneewind, O. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**, 906-909
27. Chiabrando, D., Marro, S., Mercurio, S., Giorgi, C., Petrillo, S., Vinchi, F., Fiorito, V., Fagoonee, S., Camporeale, A., Turco, E., Merlo, G. R., Silengo, L., Altruda, F., Pinton, P., and Tolosano, E. (2012) The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J. Clin. Invest.* **122**, 4569-4579
28. Duffy, S. P., Shing, J., Saraon, P., Berger, L. C., Eiden, M. V., Wilde, A., and Taylor, C. S. (2010) The Fowler syndrome-associated protein FLVCR2 is an importer of heme. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5318-5324
29. Keel, S. B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P. D., De Domenico, I., Vaughn, M. B., Kaplan, J., Palis, J., and Abkowitz, J. L. (2008) A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* **319**, 825-828
30. Khan, A. A., and Quigley, J. G. (2013) Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Mol. Aspects Med.* **34**, 669-682
31. Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., and Abkowitz, J. L. (2004) Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* **118**, 757-766
32. Brown, J. K., Fung, C., and Taylor, C. S. (2006) Comprehensive mapping of receptor-functioning domains in feline leukemia virus subgroup C receptor FLVCR1. *J. Virol.* **80**, 1742-1751
33. Khan, A. A., and Quigley, J. G. (2011) Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 668-682
34. Sabatinos, S. A., and Forsburg, S. L. (2010) Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **470**, 759-795

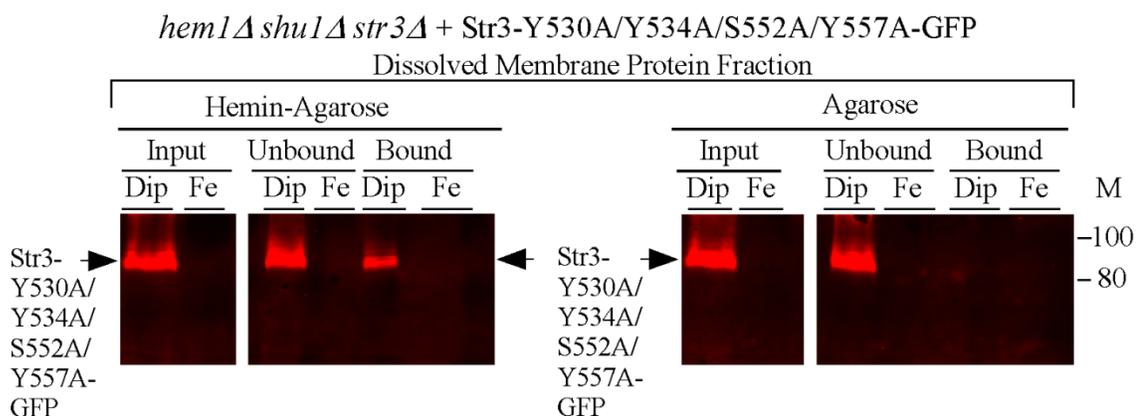
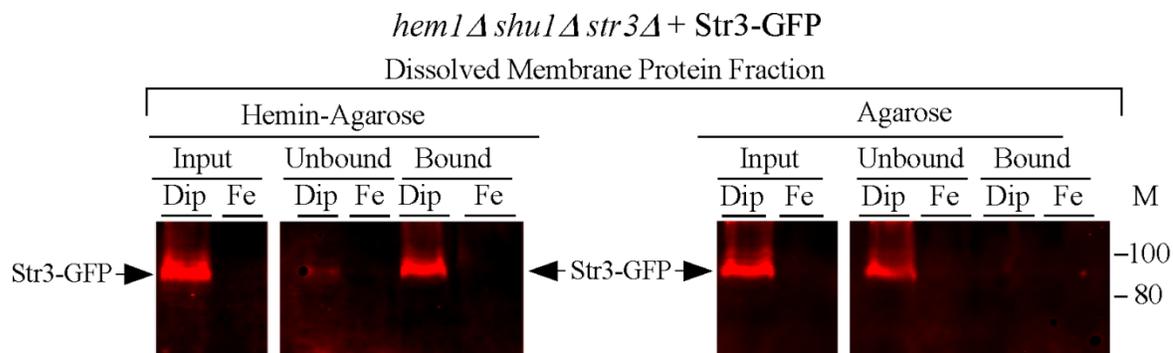
35. Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-122
36. Beaudoin, J., Laliberté, J., and Labbé, S. (2006) Functional dissection of Ctr4 and Ctr5 amino-terminal regions reveals motifs with redundant roles in copper transport. *Microbiology* **152**, 209-222
37. Kim, J., and Hirsch, J. P. (1998) A nucleolar protein that affects mating efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by altering the morphological response to pheromone. *Genetics* **149**, 795-805
38. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59
39. Keeney, J. B., and Boeke, J. D. (1994) Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**, 849-856
40. Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* **14**, 214-229
41. Mercier, A., Watt, S., Bahler, J., and Labbé, S. (2008) Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryot. Cell* **7**, 493-508
42. Mercier, A., Pelletier, B., and Labbé, S. (2006) A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **5**, 1866-1881
43. Pelletier, B., Beaudoin, J., Mukai, Y., and Labbé, S. (2002) Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 22950-22958
44. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132

## FOOTNOTES

Abbreviations used are: ALA,  $\delta$ -aminolevulinate; Dip, 2,2'-dipyridyl; BSA, bovine serum albumin; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EMM, Edinburgh minimal medium; GFP, green fluorescent protein; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PCR, polymerase chain reaction; PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride; SC, synthetic complete; SD, standard minimal; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris buffered saline; WT, wild-type; YES, yeast extract plus supplements; ZnMP, zinc (II) mesoporphyrin.



**▲ Supplemental Figure 1. *Str3*-mediated heme transport is independent on *Abc3*.** *A*, Growth of the indicated yeast strains was assessed in YES medium that was left untreated (no ALA, open circles) or supplemented with exogenous ALA (200 μM). Strain color codes are as follows: black (*hem1Δ*), green (*hem1Δ shu1Δ*), brown (*hem1Δ abc3Δ*), blue (*hem1Δ shu1Δ abc3Δ*), and red (*hem1Δ shu1Δ str3Δ*). *B*, Growth of strains was assessed in the presence of 0.15 μM hemin but in the absence of ALA. Strain color codes are the same as described in *panel A*. Results are representative of three independent experiments. Values are represented as the averages ± S.D.



**▲ Supplemental Figure 2.** *Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A-GFP* is largely detected in the unbound fraction when subject to hemin pulldown assays using hemin-agarose beads. *hem1Δ shu1Δ str3Δ* cells expressing GFP-tagged Str3 (upper panel) or GFP-tagged Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A (lower panel) were precultured in the presence of ALA (200 μM) and Dip (50 μM). Cells in the mid-exponential phase of growth were transferred to ALA-free medium and treated with Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (100 μM) for 3 h. Whole cell extracts were prepared and cell membranes were obtained by ultracentrifugation. Triton X-100-solubilized membrane proteins (input) (70 μg) were subjected to hemin pulldown assays using hemin-agarose or agarose alone. Unbound and bound protein fractions were analyzed by immunoblot assays using an anti-GFP mouse monoclonal antibody and Alexa Fluor 680 goat anti-mouse secondary antibody. Quantification of Western blot bands was performed using a LI-COR Odyssey imaging system. Data are representative of the results of three independent experiments.

## **CHAPITRE 2**

### **Caractérisation du rôle de la protéine Tpx1 dans l'homéostasie de l'hème chez *Schizosaccharomyces pombe*.**

Vincent Normant et Simon Labbé

Département de Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, QC, J1E 4K8, Canada.

## Introduction

Nos résultats précédents (Chapitre 1) ont permis de démontrer que Str3 est impliqué dans l'assimilation de l'hème chez *S. pombe*. Dans ce chapitre, les objectifs sont de :

1. de définir si la présence ou l'absence d'hème affecte la localisation de la protéine Str3 comme c'est le cas pour Shu1 (Mourer et al., 2017)
2. de chercher des partenaires potentiels à Str3 pouvant agir comme des chaperonnes de l'hème
3. de chercher une hémoprotéine affectée par la présence ou l'absence de Str3 en présence d'hème et en absence de biosynthèse endogène d'hème (*hem1Δ*).

Ainsi dans cette partie, nous avons montré que Str3 reste à la surface cellulaire en présence de différentes concentrations d'hémine. Par des analyses protéomiques à haut-débit (spectrométrie de masse MS-MS), nous avons montrés que la protéine Tpx1 interagit avec Str3. Nous avons confirmé ce résultat par des essais d'immunoprécipitation et avons montré que Tpx1 est capable de lier de l'hémine in vitro et in vivo. Par ailleurs, la délétion du gène *tpx1*<sup>+</sup> affecte la croissance des souches délétées pour *hem1*<sup>+</sup> et *shu1*<sup>+</sup> en présence d'hémine comme observé en absence de Str3 (*hem1Δ shu1Δ str3Δ*) (Chapitre 1). Enfin, nous avons démontré que l'absence de Str3 ou Tpx1 affecte l'activité de la ferriréductase Frp1 lorsque la cellule ne dispose que d'une source exogène d'hème et est délétée dans sa voie de biosynthèse endogène d'hème (*hem1Δ*).

## Matériels et méthodes

### Souches et conditions de cultures

Les génotypes des souches de *S. pombe* utilisés dans ce chapitre sont énumérées à la Table 1. Les souches utilisées dans cette étude ont été cultivées dans du milieu YES contenant 0.5% d'extrait de levure, 3% de glucose et 225 mg/l d'adénine, d'uracile, de leucine, de lysine et d'histidine. Les souches délétées pour le gène *hem1*<sup>+</sup> (*hem1Δ*) ont été cultivées dans le même milieu YES supplémenté avec 200 μM de ALA. Pour les expériences avec de l'hémine, le ALA a été substitué par différentes concentrations en hémine (0.05, 0.15, 1, 5, 10 et 50 μM). Dans le cas des souches délétées pour *tpx1*<sup>+</sup> (e. g. *tpx1Δ*, SG5) (Calvo et al., 2013) et celles exprimant l'allèle *tpx1*<sup>+</sup>-*CPI/CP2 MUT*, ces dernières ont été

maintenues dans des jarres microaérophiliques dans du YES ou du YES contenant du ALA (200  $\mu$ M) pour les souches délétées pour le gène *hemI*<sup>+</sup> (*tpx1* $\Delta$  *hem1* $\Delta$ ). Dans le cas des souches exprimant *str3*<sup>+</sup>-*GFP* sous le contrôle du promoteur *nmt1*<sup>+</sup>(*41X*), ces dernières ont été cultivées en présence de thiamine (5  $\mu$ M) sur du milieu EMM (Edinburgh Minimal medium) en présence de ALA (200  $\mu$ M). La dérèpression du promoteur a été provoquée en éliminant la thiamine du milieu de culture.

## Plasmides

Pour construire l'allèle *str3*<sup>+</sup> en fusion avec la séquence codante de la biotine ligase de *Aquifex aeolicus* (BioID<sub>2</sub>), cette séquence a été amplifiée par PCR en utilisant des amorces spécifiques permettant de générer aux extrémités du produit d'amplification des sites de restriction ApaI et NotI en 5' et StuI en 3' du produit de PCR. De plus, une région d'ADN correspondant au 5'UTR a été rajoutée en aval du site NotI. Entre les deux régions correspondantes à Str3 et BioID<sub>2</sub>, nous avons également cloné une courte région servant de lien et constituée d'une séquence d'ADN répétée trois fois 5'-GGAGGAGGAGGATCT-3' et ayant la séquence protéique suivante : GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer. La séquence BioID<sub>2</sub> a été clonée dans un plasmide pBlueScript SK en utilisant les sites ApaI et StuI pour générer le plasmide pSK-BioID<sub>2</sub>. Ensuite, une séquence codant pour l'épitope HA<sub>4</sub> a été amplifiée en générant des sites StuI et SacI par PCR. Le produit correspondant à HA<sub>4</sub> a été cloné dans le plasmide pSK-BioID<sub>2</sub> en utilisant les sites StuI et SacI pour générer le plasmide pSK-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub>. Ce dernier plasmide a été digéré avec les enzymes de restriction NotI et SacI, le plasmide pBPade-785*str3*<sup>+</sup>-*GFP* a été digéré avec les mêmes enzymes pour extraire la GFP. Le fragment BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> a été inséré dans le plasmide pBPade-785*str3*<sup>+</sup> au niveau des sites NotI et SacI pour donner le plasmide pBPade-785*str3*<sup>+</sup>-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub>.

La séquence codante du gène *tpx1*<sup>+</sup> a été amplifiée par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques en amont et en aval du gène *tpx1*<sup>+</sup>. De plus, des sites de restrictions SacII et SacI ont été ajoutés à chaque extrémités de la séquence codante de *tpx1*<sup>+</sup>. Le produit de PCR a ensuite été digéré avec les enzymes SacII et SacI, puis cloné dans le vecteur pJK148 en utilisant ces mêmes sites, pour créer le vecteur pJK-*tpx1*<sup>+</sup>. Ensuite, la région promotrice du gène *tpx1*<sup>+</sup> jusqu'à la position -1500 en amont du codon initiateur a été

amplifiée par PCR. Ce dernier a été cloné dans le vecteur pJK-*tpx1*<sup>+</sup> en utilisant les sites de restriction ApaI et SacII pour générer le plasmide pJK-1500-*tpx1*<sup>+</sup>. La séquence du NTAP a été amplifiée à partir du plasmide pJK-500-*TAP-cuf2*<sup>+</sup> (Ioannoni et al., 2016). Le produit de PCR a ensuite été cloné dans le vecteur pJK-*tpx1*<sup>+</sup> en utilisant les sites de restriction XmaI et SacII. Ainsi, nous avons pu générer le plasmide pJK-*TAP-tpx1*<sup>+</sup>. Ensuite, le promoteur correspondant au 1500 paires de bases (pb) en amont du codon initiateur ont été amplifiées puis clonées dans le vecteur pJK-*TAP-tpx1*<sup>+</sup> en utilisant les sites de restriction ApaI et XmaI pour générer le plasmide pJK-1500-*TAP-tpx1*<sup>+</sup>. Le plasmide pJK-1500-*TAP-tpx1*<sup>+</sup> a été utilisé pour introduire des mutations dans la séquence codante de *tpx1*<sup>+</sup>. Les codons correspondant aux acides aminés Cys<sup>48</sup>, Pro<sup>49</sup>, Cys<sup>169</sup>, et Pro<sup>170</sup> ont été remplacés par des triplet codant pour une alanine. Ces mutations spécifiques ont été créées par la méthode de « PCR overlap extension » (Ho et al., 1989). Ainsi, le plasmide pJK-1500-*TAP-tpx1*<sup>+</sup> *CP1/CP2 MUT* a été créé. Pour générer le plasmide pJK-1500-*tpx1*<sup>+</sup> *CP1/CP2 MUT*, la même stratégie a été utilisée.

La séquence codante sans le codon initiateur ATG de *tpx1*<sup>+</sup> a été amplifiée puis cloné dans le vecteur pET28a en utilisant les sites de restriction NdeI et XhoI, créant ainsi le plasmide pET28a-Tpx1. Les mutations des CP1, CP2 et CP1/CP2 ont été créées par la méthode de « PCR overlap extension » (Ho et al., 1989), générant ainsi les plasmides pET28a-Tpx1 CP1 MUT, pET28a-Tpx1 CP2 MUT et pET28a-Tpx1 CP1/CP2 MUT.

Une portion de la séquence codante de *tpx1*<sup>+</sup> entre les nucléotides 69 et 272 à partir du codon initiateur a été amplifiée par PCR en ajoutant les sites de restriction BamHI et EcoRI. Ensuite le produit de PCR a été cloné dans le plasmide pBlueScript SK en utilisant les sites de restriction BamHI et EcoRI pour générer le plasmide pSK*tpx1*<sup>+</sup>.

### **Analyse des ARN**

Les ARN totaux ont été extraits par la méthode du phénol chaud comme décrit précédemment (Chen et al., 2003). Les niveaux de transcrits ont été analysés par protection à la RNase comme décrit précédemment (Mercier et al., 2008). Les plasmides pSK*str3*<sup>+</sup> (Pelletier et al., 2003), pSK*tpx1*<sup>+</sup>, pSK*ctt1*<sup>+</sup> (Mercier et al., 2006) et pSK*act1*<sup>+</sup> (Mercier et al., 2006) ont été linéarisés avec l'enzyme BamHI. Une sonde anti-sens d'ARN chaude radiomarquée au [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP a ensuite été synthétisée en utilisant la polymérase à ARN T7.

La quantité de sonde antisens détectable permet de déterminer le niveau d'ARNm de *str3*<sup>+</sup>, de *tpx1*<sup>+</sup>, de *ctl1*<sup>+</sup> et de *act1*<sup>+</sup>. L'ARNm *act1*<sup>+</sup> sert de contrôle interne pour normaliser les quantités d'ARNm de *str3*<sup>+</sup>, *tpx1*<sup>+</sup> et *ctl1*<sup>+</sup>.

### **Extractions et analyses protéiques**

Les cellules ont été lysées avec des billes de verre dans du tampon TMN150 contenant 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1% de Nonidet P-40, 1mM de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) et un mélange complet d'inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich, P8340). Les cellules ont été lysées en utilisant un FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH). Les extraits protéiques ont été séparés des débris cellulaires par centrifugation. Ensuite, les extraits ont été mélangés dans un tampon de migration contenant 240 mM de Tris-HCl pH 6.8, 40% de glycérol, 8% de SDS, 2.8 mM de β-mercaptoéthanol, 1 mM de DTT, 6 M d'urée et 2 M de thiourée. Ces derniers ont été chauffés pendant 30 minutes à 65°C. Les extraits ont ensuite été migrés dans des gel SDS-PAGE contenant 10% ou 12% de polyacrylamide et analysés par Western blot. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés, anti-GFP B-2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-mouse-IgG (ICN Biomedicals), anti-α-tubuline B-5-1-2 et anti-PCNA PC10 (Sigma-Aldrich). Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les membranes ont été lavées puis incubées avec un anticorps secondaire conjugué avec la HRP (*horseradish peroxidase*) (Amersham Biosciences) et révélées avec le réactif ECL (BioRad) et visualisées par chimiluminescence.

### **Analyse de protéines biotinylées**

Les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprimant Str3 ou Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub>, ont été cultivées dans du YES contenant 200 μM de ALA et 50 μM de biotine jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de 0.5. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau, puis resuspendues dans le même volume de YES contenant 50 μM de biotine mais ne contenant pas de ALA et traitées avec 250 μM de Dip, 250 μM de Dip et 10 μM d'hémine ou 100 μM de fer (FeCl<sub>3</sub>) pendant trois heures. Les cellules ont été lavées avec du TCA (20%), puis resuspendues dans 7% de TCA et des billes de verre, et lysées en utilisant un FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH). Les protéines ont ensuite été précipitées puis lavées avec de l'acétone 100% et resuspendues dans du tampon contenant 25 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl et

2% de SDS 1 mM de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) et un mélange complet d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, P8340). Les extraits protéiques ont été dialysés contre un tampon contenant 25 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl et 0.2% de SDS pendant deux heures dans des cassette Slide-A-Lyzer 3.5 K MWCO (ThermoFisher). Ensuite, les extraits protéiques ont été incubés pendant deux heures avec des billes d'agarose couplées à de la streptavidine (GE Healthcare) préalablement équilibrées dans du tampon de dialyse. Les billes ont été lavées six fois avec du tampon wash buffer 1 contenant 25 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl et 0.3% de SDS, puis deux fois avec du tampon wash buffer 2 contenant 50 mM de Tris-HCl pH 7.4 et 2 M d'urée, puis deux fois avec du tampon wash buffer 3 contenant 1 M de KCl et enfin deux fois avec du tampon wash buffer 1. Pour l'analyse par Western blot, les extraits protéiques ont été mélangés dans du tampon SDS-Sample Loading Buffer contenant 100 mM de Tris-HCl pH 6.8, 4% de SDS, 20% de glycérol, 8 M d'urée, 2 M de thiourée et 3 mM de biotine (Hwang and Espenshade, 2016). Après migration sur un gel NuPAGE 4-12% puis transfert sur une membrane de nitrocellulose, les protéines biotinylées ont été révélées en utilisant une streptavidine couplée à la HRP (Cell Signaling). Pour l'analyse par spectrométrie de masse, les billes ont été lavées cinq fois avec 20 mM de bicarbonate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), puis incubées 30 minutes à 60°C dans 20 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  et 10 mM de DTT. Après cette incubation, les extraits ont été refroidis puis 15 mM de iodoacetamide ont été ajoutés puis incubés pendant une heure. Ensuite, la concentration en DTT a été montée à 15 mM (10 minutes) et 50 ng de trypsine a été ajoutée sur les billes. Les peptides ont été digérés 18 heures à 37°C. L'activité de la trypsine a été inhibée par acidification en ajoutant 1% d'acide formique. Les billes ont été resuspendues dans une solution contenant 60% d'acétonitrile et 0.1% d'acide formique. Les extraits protéiques ont été séchés puis resuspendus dans 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Les échantillons ont été lavés grâce à un ZipTip préalablement équilibré dans une solution contenant 100% d'acétonitrile puis dans une solution contenant 0.1% de TFA. Les extraits ont été élués dans une solution contenant 1% d'acide formique et 50% d'acétonitrile puis séchés et resuspendus dans une solution contenant 1% d'acide formique. Après dosage protéique, les extraits ont été analysés par spectrométrie de masse.

### **Pull down hémine-agarose**

Pour vérifier la capacité de liaison de Tpx1 à l'hème, une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant Str3-GFP et TAP-Tpx1 ou TAP-Tpx1 CP1/CP2 MUT a été cultivée jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5 dans du YES contenant 200  $\mu$ M d'ALA. Après deux lavages à l'eau, les cellules ont été resuspendues dans le même volume de YES contenant 250  $\mu$ M de Dip et sans ALA. Après 3 heures ( $A_{600}$  de  $\sim$ 1.0), les cellules ont été lysées avec des billes de verre dans du TMN150 à l'aide du FastPrep-24. L'extrait de protéines (75  $\mu$ g) a été mis en présence de 20  $\mu$ l de billes d'agarose couplées à de l'hémine ou de billes d'agarose pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, les billes ont été centrifugées et la fraction non liée (surnageant) a été conservée sur glace. Par la suite, les billes ont été lavées trois fois avec du TMN150 contenant 1% de Triton-X-100. Enfin, les fractions liées et non liées ont été mélangées avec un tampon de migration contenant 240 mM de Tris-HCl pH 6.8, 40% de glycérol, 8% de SDS, 2.8 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1 mM de DTT, 6 M d'urée et 2 M de thiourée, puis migrées sur un gel SDS-PAGE et révélées par Western blot.

### **Immunoprécipitation**

Les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant Str3-GFP et TAP, TAP-Tpx1 ou TAP-Tpx1 CP1/CP2 MUT et *hem1Δ shu1Δ frp1Δ tpx1Δ* exprimant HA<sub>4</sub>-Frp1 et TAP-Tpx1 ou TAP ont été cultivées jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5 dans du YES contenant 200  $\mu$ M d'ALA. Après deux lavages à l'eau, les cellules ont été resuspendues dans le même volume de YES contenant 250  $\mu$ M de Dip, 250  $\mu$ M de Dip et 10  $\mu$ M d'hémine ou 100  $\mu$ M de fer (FeCl<sub>3</sub>) et sans ALA. Après trois heures de traitement ( $A_{600}$  de 1.0), les cellules ont été lysées avec des billes de verre dans du TMN150 à l'aide du FastPrep-24. Une partie de l'extrait protéique a été conservé sur glace (Input, IN, 1 :10) et le reste de la préparation a été incubé pendant deux heures à 4°C avec des billes IgG-sépharose (GE Healthcare) préalablement équilibrées dans du tampon TMN150. Ensuite, les billes ont été lavées trois fois avec du tampon TMN150 contenant 1% de Triton-X-100. Les protéines ont été éluées dans du tampon de migration contenant 240 mM de Tris-HCl pH 6.8, 40% de glycérol, 8% de SDS, 2.8 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1 mM de DTT, 6 M d'urée et 2 M de thiourée, puis migrées sur un gel SDS-PAGE et révélées par Western blot.

## Microscopie directe et indirecte

Les images de microscopies ont été observées avec un microscope à épifluorescence Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, NY) équipé d'une caméra digitale Hamamatsu ORCA-ER (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Les cellules ont été analysées avec un grossissement 1000X et avec les filtres suivants ; 340-380 nm (bleu), 465-495 nm (vert) et 510-560 nm (rouge). Une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant Str3-GFP et TAP-Tpx1 ou TAP-Tpx1 CP1/CP2 MUT a été cultivée jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5 dans du YES contenant 200  $\mu$ M d'ALA. Après deux lavages à l'eau, les cellules ont été resuspendues dans le même volume de YES contenant 250  $\mu$ M de Dip, 250  $\mu$ M de Dip et 10  $\mu$ M d'hémine, 100  $\mu$ M de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) ou laissées non traitées (-) et sans ALA. Après 3 heures ( $A_{600}$  de 1.0), les cellules ont été observées directement par microscopie pour Str3-GFP ou fixées par l'ajout de formaldéhyde (3.7%) pendant 30 minutes. Ensuite, les cellules fixées ont été lavées avec du PBS et resuspendues dans un tampon à sphéroblastes contenant 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1.2 M de sorbitol, 20 mg/ml de zymolyase et 10 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Après 90 minutes, les cellules ont été lavées dans le tampon à sphéroblastes contenant 1% de Triton-X-100. Les cellules ont ensuite été lavées une fois dans du tampon à sphéroblastes et enfin resuspendues dans du tampon TNB contenant 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl et 1% de BSA. Les cellules ont ensuite été adsorbées sur une lame de microscope préalablement traitées avec 0.1% de poly-L-lysine. Après 30 minutes de blocage dans le tampon TNB, ces dernières ont été incubées une nuit à 4°C avec un anticorps anti-IgG (ICN Biomedicals) dilué au 1 :250 dans du TNB. Par la suite, les cellules ont été lavées avec du TNB puis incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la tétraméthylrhodamine (Molecular Probes, Invitrogen, T2769) dilué au 1 :250 dans du TNB.

Pour les expériences de ZnMP, les cellules ont été cultivées dans du YES contenant du ALA (200  $\mu$ M) jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5. A ce point, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau puis resuspendues dans le même volume de YES sans ALA contenant 250  $\mu$ M de Dip et 150  $\mu$ M de Bimane-GS. Après trois heures ( $A_{600}$  de  $\sim$ 1.0), les cellules ont été traitées avec 2  $\mu$ M ou 10  $\mu$ M de ZnMP. Avant observation microscopique, les cellules ont été lavées dans du PBS froid contenant 5% de BSA, puis 2% de BSA, puis dans du PBS. La souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ nmt1<sup>+</sup>(41X)-str3<sup>+</sup>-GFP* a été cultivée dans du EMM supplémenté

en thiamine (5  $\mu\text{M}$ ) et en ALA (200  $\mu\text{M}$ ) jusqu'à une  $A_{600}$  de  $\sim 1.0$ . À ce point, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau pour se débarrasser de l'excès de thiamine et resuspendue à une  $A_{600}$  de 0.5 dans du EMM sans thiamine avec 200  $\mu\text{M}$  de ALA. Ces dernières ont été cultivées dans ce milieu pendant 17 heures. Ensuite, elles ont été lavées deux fois avec de l'eau puis resuspendues dans le même volume de EMM sans ALA puis traitées avec 250  $\mu\text{M}$  de Dip pendant 3 heures. Les cellules ont été centrifugées puis resuspendue dans du YES contenant 5  $\mu\text{M}$  de thiamine ( $t_0$ ). A ce stade, elles ont été traitées avec différentes concentrations de ZnMP (0, 2 ou 10  $\mu\text{M}$ ) ou d'hémine (0, 0.05, 1, 5, 10 ou 50  $\mu\text{M}$ ), puis observées au microscope. Dans le cas du traitement à la ZnMP, les cellules ont été lavées dans du PBS contenant de la BSA avant observation. Dans le cas des traitements avec l'hémine, des cellules ont été lysées pour être analysées par Western blot.

### **Purification de Tpx1 exprimée chez *E. coli***

Des bactéries *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS exprimant pET28aTpx1, pET28aTpx1 CP1 MUT, pET28aTpx1 CP2 MUT et pET28aTpx1 CP1/CP2 MUT ont été cultivées dans du milieu LB jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5. Ensuite, l'expression protéique a été induite par ajout dans le milieu de culture de 1mM d'isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 4 heures à 37°C avec 2% d'éthanol. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication dans du tampon A contenant 50 mM de Tris HCl pH 7.5, 300 mM de NaCl, 10% de succrose, 20 mM d'imidazole, 50  $\mu\text{g/ml}$  de lysozyme, 1% de Triton X-100 et un mélange d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, P8340). L'extrait protéique a ensuite été incubé avec des billes de nickel nitrilotriacetic-agarose (Ni-NTA) pendant deux heures. Les protéines Tpx1, Tpx1 CP1 MUT, Tpx1 CP2 MUT et Tpx1 CP1/CP2 MUT ont été éluées dans du tampon B contenant 50 mM de Tris HCl pH 8.0, 300 mM de NaCl, 10% de glycérol et différentes concentrations d'imidazole (100, 500 en 1000 mM). Les échantillons contenant Tpx1, Tpx1 CP1 MUT, Tpx1 CP2 MUT et Tpx1 CP1/CP2 MUT ont été dialysés pour éliminer l'imidazole.

### **Spectroscopie à absorbance**

Les mesures de spectroscopie à absorbance ont été faites comme décrit précédemment (Normant et al., 2018). La molécule d'hème possède un spectre UV-visible caractéristique avec une absorbance maximale à environ 400 nm correspondant au pic de

Soret. La liaison de l'hème à un peptide modifie le spectre UV-visible de l'hème majoritairement au niveau du pic de Soret. Cette liaison provoque un décalage du pic de Soret vers des longueurs d'onde plus basse ou plus haute, et une diminution ou une augmentation de l'intensité de ce dernier. Ainsi, les mesures de variation dans l'intensité du pic de Soret permettent de déterminer l'affinité du peptide pour l'hème.

Une solution d'hémine (5 mM) a été dissoute dans du NaOH (0.1 M) puis filtrée et diluée 1 :1000 pour obtenir une solution à 5  $\mu$ M. L'association des protéines avec l'hémine a été déterminée en ajoutant des concentrations croissantes (0 à 10  $\mu$ M) de Tpx1 ou Tpx1 CP1/CP2 MUT dans du tampon contenant 40% DMSO et 20 mM d'HEPES pH 7.4. Les spectres d'absorption (350 à 700 nm) ont été mesurés par un spectrophotomètre DU730 (Beckman Coulter). La constante de dissociation ( $K_D$ ) a été déterminée sur le logiciel GraphPad Prism v 6.04 en utilisant la fonction « one specific binding with Hill slope ».

### **Mesure de la dégradation par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La dégradation de l'hème a été mesurée par spectrométrie UV-visible (DU730, Beckman Coulter). Les protéines Tpx1 et Tpx1 CP1/CP2 MUT (2.5  $\mu$ M) ont été incubées avec 5  $\mu$ M d'hémine pendant 5 minutes à 4°C dans du tampon contenant 40% de DMSO et 20 mM d'HEPES pH 7.4. Après 5 minutes, 30  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été ajoutée à la solution, et les valeurs du pic de Soret à 402 nm (correspondant à l'hémine) ont été mesurées toutes les minutes pendant 30 minutes. Chaque point a ensuite été normalisé en soustrayant la valeur au temps zéro sur chaque point subséquent (Grinberg et al., 1999; Watanabe et al., 2017).

### **Mesure de l'activité peroxydase de l'hème**

L'activité peroxydase de l'hème a été déterminée par spectrophotométrie en mesurant (DU730, Beckman Coulter) la co-oxydation d'un substrat par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les protéines Tpx1 et Tpx1 CP1/CP2 MUT (2.5  $\mu$ M) ont été incubées avec 5  $\mu$ M d'hémine pendant 5 minutes à 4°C dans du tampon contenant 40% de DMSO et 20 mM d'HEPES pH 7.4. Après 5 minutes, 1.25 mM de 4-amino antipyrine et 86 mM de phénol ont été ajoutés à 25°C. Le début de la réaction est initié par l'ajout de 360  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La formation de l'antipyrilquinoneimine (rouge) est suivie par la mesure de l'absorbance à 512 nm toutes les minutes pendant 30 minutes (Grinberg et al., 1999; Watanabe et al., 2017).

### **Mesure de l'activité réductase de Frp1 par réduction du TTC en rouge formazan**

Les différentes souches ont été cultivées dans du YES contenant 200  $\mu\text{M}$  de ALA. Pour éliminer le ALA, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau (à une  $A_{600}$  de 1.0) et diluées dans du YES sans ALA ( $A_{600}$  de 0.03) ou avec du ALA ( $A_{600}$  de 0.01). Après 19 heures de culture à 30°C ( $A_{600}$  de  $\sim$ 0.8), les cellules ont été traitées avec 250  $\mu\text{M}$  de Dip pour induire l'expression de Frp1, et 200  $\mu\text{M}$  de ALA, 0.5  $\mu\text{M}$  d'hémine ou sans ALA et sans hémine. Après trois heures, les cellules ont été centrifugées, puis le culot a été resuspendu et déposé sur une plaque YES. Après quelques minutes, les dépôts de cellules ont été recouverts par un agar contenant 67 mM de phosphate de sodium et 0.01% de TTC (chlorure de 2,3,5 triphenylterazolium) pour révéler l'activité ferriréductase de Frp1.

▼ **Table 1.** *Liste des souches utilisées*

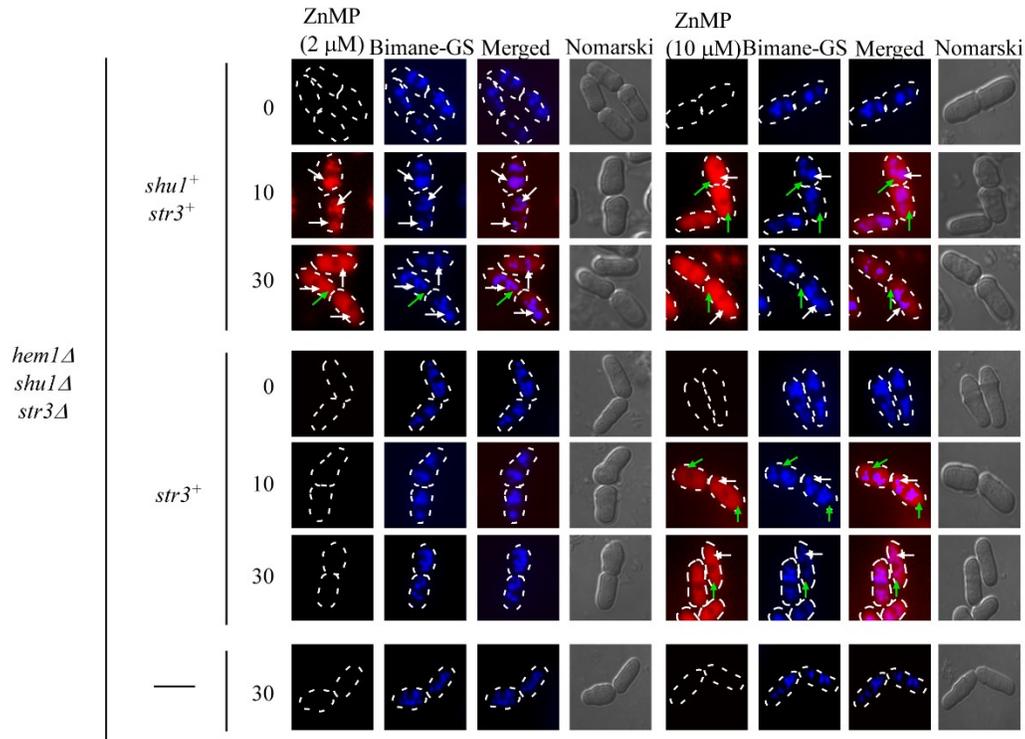
Strain	Genotype	Source or reference
FY435	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210</i>	Pelletier et al. 2002
TMY1	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	Mourer et al. 2015
TMY2	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	Mourer et al. 2015
TMY17	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup></i>	Normant et al. 2018
VNY13	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>:ade6<sup>+</sup></i>	Normant et al. 2018
VNY23	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>:ade6<sup>+</sup> shu1<sup>+</sup>:leu2<sup>+</sup></i>	This study
VNY24	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> nmt1(41X)-str3<sup>+</sup>:ade6<sup>+</sup></i>	This study
VNY25	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub>:ade6<sup>+</sup></i>	This study
VNY26	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>-GFP:ade6<sup>+</sup> TAP::leu2<sup>+</sup></i>	This study
VNY27	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>-GFP:ade6<sup>+</sup> TAP-tpx1<sup>+</sup>:leu2<sup>+</sup></i>	This study
VNY28	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP str3Δ::KAN<sup>r</sup> str3<sup>+</sup>-GFP:ade6<sup>+</sup> TAP-tpx1<sup>+</sup>C48A/P49A/C169A/P170A::leu2<sup>+</sup></i>	This study
VNY29	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP tpx1Δ::KAN<sup>r</sup> tpx1<sup>+</sup>:leu2<sup>+</sup></i>	This study
VNY30	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP tpx1Δ::KAN<sup>r</sup> TAP-tpx1<sup>+</sup>:leu2<sup>+</sup></i>	This study
VNY31	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP tpx1Δ::KAN<sup>r</sup> tpx1<sup>+</sup>C48A/P49A/C169A/P170A::leu2<sup>+</sup></i>	This study
VNY32	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP tpx1Δ::KAN<sup>r</sup> TAP-tpx1<sup>+</sup>C48A/P49A/C169A/P170A::leu2<sup>+</sup></i>	This study
SG5	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 tpx1::natMX6</i>	Calvo et al. 2013
VNY33	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 tpx1::natMX6 hem1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	This study
VNY34	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 tpx1::natMX6 hem1Δ::loxP shu1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	This study
VNY35	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 tpx1::natMX6 hem1Δ::loxP shu1Δ::KAN<sup>r</sup> tpx1<sup>+</sup>:leu2<sup>+</sup></i>	This study
VNY36	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP tpx1Δ::KAN<sup>r</sup> TAP-tpx1<sup>+</sup>:leu2<sup>+</sup> shu1<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>:ade6<sup>+</sup></i>	This study

## Résultats

### Étude de l'assimilation de ZnMP par Shu1 et Str3

Nous avons montré précédemment que les protéines Shu1 et Str3 sont impliquées dans l'assimilation de la ZnMP à 2  $\mu$ M et 10  $\mu$ M, respectivement. A une concentration de 2  $\mu$ M, en présence de Shu1, la ZnMP se localise à la vacuole. Après 10 minutes, son signal fluorescent se co-localise avec le marqueur vacuolaire Bimane-GS (150  $\mu$ M) puis est redistribuée dans le cytoplasme après 30 minutes comme observé précédemment (Mourer et al., 2017). En absence de *shu1*<sup>+</sup> (*hem1 $\Delta$ shu1 $\Delta$ str3 $\Delta$ str3*<sup>+</sup>) et en présence de 2  $\mu$ M de ZnMP, aucune fluorescence de la ZnMP n'est observable. Les cellules exprimant (*hem1 $\Delta$ shu1 $\Delta$ str3 $\Delta$ shu1*<sup>+</sup> *str3*<sup>+</sup>) ou pas *shu1*<sup>+</sup> (*hem1 $\Delta$ shu1 $\Delta$ str3 $\Delta$ str3*<sup>+</sup>), traitées avec 10  $\mu$ M de ZnMP assimilent cette dernière qui se retrouve dans le cytoplasme après 90 minutes (Normant et al., 2018). Ici, nous avons donc suivi l'internalisation de 10  $\mu$ M de ZnMP après 10 et 30 minutes en présence (*hem1 $\Delta$ shu1 $\Delta$ str3 $\Delta$ shu1*<sup>+</sup> *str3*<sup>+</sup>) ou en absence de *shu1*<sup>+</sup> (*hem1 $\Delta$ shu1 $\Delta$ str3 $\Delta$ str3*<sup>+</sup>). Les résultats en présence ou en absence de *shu1*<sup>+</sup> sont similaires, à savoir que dès 10 minutes, la ZnMP est détectable dans le cytoplasme de la cellule. Cette dernière est également détectable après 30 minutes de traitement. En absence de *str3*<sup>+</sup> et *shu1*<sup>+</sup> (*hem1 $\Delta$ shu1 $\Delta$ str3 $\Delta$ str3*<sup>+</sup>), aucune fluorescence n'est détectable à 2  $\mu$ M et 10  $\mu$ M de ZnMP (Figure 1).

Ces résultats montrent que la voie d'assimilation de la ZnMP dépendante de Shu1 à 2  $\mu$ M est différente de celle dépendante de Str3 à 10  $\mu$ M. Ainsi, l'internalisation de la ZnMP dépendante de Str3 entre directement dans le cytoplasme sans passer par la vacuole après 10 minutes de traitement.



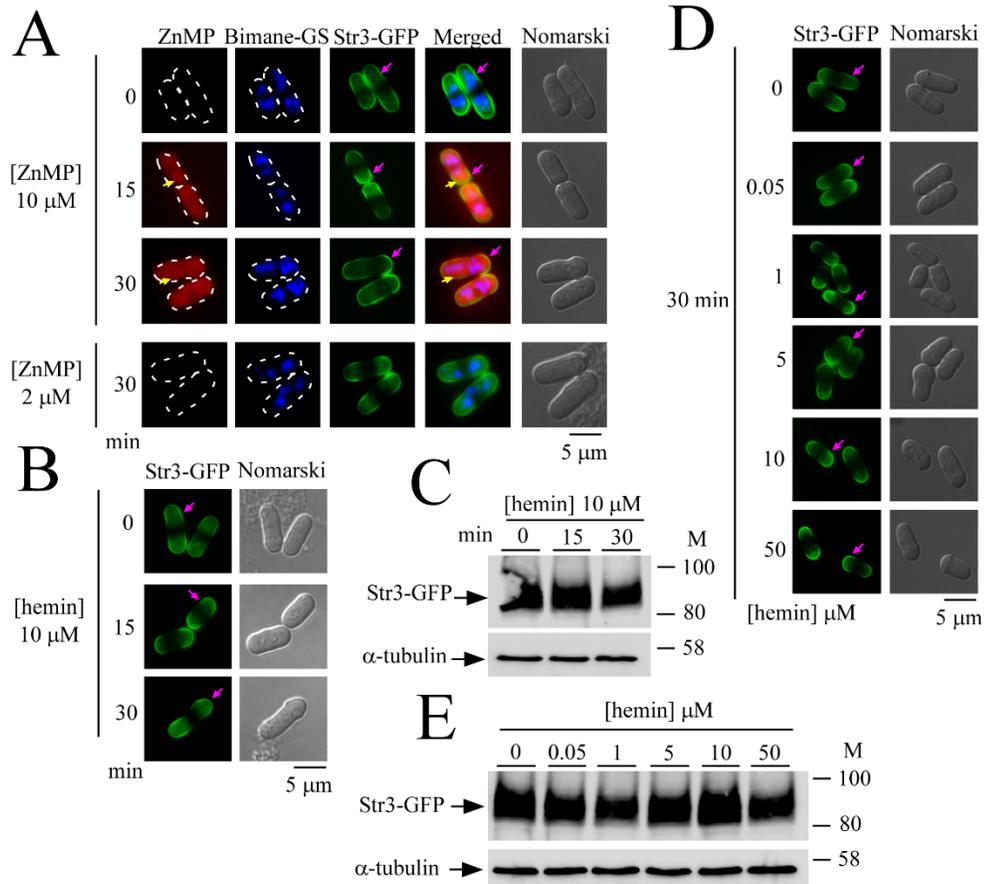
▲ **Figure 1.** La ZnMP entre directement dans le cytoplasme via Str3. Les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ* (-) exprimant Shu1 et Str3 (*shu1<sup>+</sup> str3<sup>+</sup>*) ou Str3 (*str3<sup>+</sup>*), ont été cultivées dans du YES contenant 200 μM de ALA jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5 puis lavées deux fois avec de l'eau et resuspendues dans le même volume de YES contenant du Dip (250 μM) et du monochlorobimane (150 μM, *Bimane-GS*). Après 3 heures, les cellules ont été traitées avec 2 μM ou 10 μM de ZnMP, puis visualisées par microscopie à fluorescence aux temps indiqués (0, 10 et 30 minutes). La fluorescence de la ZnMP à 2 μM (*première colonne*) et à 10 μM (*cinquième colonne*) et du bimane-GS (*deuxième et sixième colonne*) ont été superposées pour observer la colocalisation des deux composés (*Merged, troisième et septième colonnes*). La morphologie cellulaire a également été observée en lumière visible (*Nomarski*). Les résultats de microscopie sont représentatifs de cinq expériences indépendantes. Les vacuoles sont indiquées par les flèches blanches et le cytoplasme par les flèches vertes.

### **Str3 reste localisée à la surface cellulaire après l'entrée de ZnMP**

Nous avons observé précédemment que l'entrée d'hème dans la cellule entraîne l'internalisation de Shu1, qui transporte cette dernière jusqu'à la vacuole. À 30 minutes, le pool protéique de Shu1 est détectable à la vacuole en présence de 10 et 50  $\mu\text{M}$  d'hème. (Mourer et al., 2017). Le gène *str3<sup>+</sup>* couplé en phase avec le gène codant pour la protéine fluorescente GFP, a donc été placé en amont du promoteur inductible à la thiamine *nmt1<sup>+</sup>(41X)*. Ainsi, un pool protéique de Str3-GFP, dans une souche *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$  str3 $\Delta$* , a été créé en dérégulant le promoteur *nmt1<sup>+</sup>* en retirant la thiamine du milieu de culture pendant 20 heures. Ensuite, de la thiamine (5  $\mu\text{M}$ ) a été ajoutée pour stopper la transcription de *str3<sup>+</sup>-GFP* (temps 0). Du Bimane-GS (150  $\mu\text{M}$ ) a été préalablement incubé avec les cellules 3 heures avant le temps 0. De la ZnMP (10  $\mu\text{M}$ ) a été ajoutée au temps 0, puis la fluorescence de la GFP, de la ZnMP et du Bimane-GS a été suivie à 15 et 30 minutes. À ces deux temps, la ZnMP est détectable dans le cytoplasme des cellules comme observé à la figure 1. En revanche, la fluorescence de Str3-GFP est toujours visible à la surface cellulaire. En présence de 2  $\mu\text{M}$  de ZnMP, aucune fluorescence de Zn-MP n'est détectable dans le cytoplasme des cellules après 30 minutes (Figure 2A). Pour étudier, l'effet de l'hème sur la localisation de Str3-GFP, la même expérience a été réalisée en présence d'hémine. Après dérégulation du promoteur *nmt1<sup>+</sup>*, les cellules *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$  str3 $\Delta$  nmt1<sup>+</sup>(41X)-str3<sup>+</sup>-GFP* ont été traitées avec de la thiamine (5  $\mu\text{M}$ ) et de l'hémine (10  $\mu\text{M}$ ). Au temps 0, comme à 15 et 30 minutes, le pool protéique de Str3-GFP reste localisé à la surface cellulaire (Figure 2B). De plus, le statut protéique de Str3-GFP reste constant dans le temps soit à 0, 15 et 30 minutes après l'ajout d'hémine et de thiamine (Figure 2C). Pour valider que la concentration en hème n'affecte pas la localisation du pool de Str3-GFP, des cellules exprimant Str3-GFP, préalablement dérégulées en absence de thiamine pendant 20 heures, ont été traitées avec de la thiamine (5  $\mu\text{M}$ ) et différentes concentrations en hémine soit 0, 0.05, 1, 5, 10 et 50  $\mu\text{M}$ . Après 30 minutes de traitement, Str3-GFP se localise à la surface cellulaire dans toutes les conditions (Figure 2D). Par ailleurs, le statut protéique de Str3-GFP n'est pas affecté par les différentes concentrations en hémine et demeure assez constant en fonction du temps par rapport à la condition non traitée (0  $\mu\text{M}$ ) (Figure 2E).

Ainsi, contrairement à Shu1, qui en présence d'hémine est relocalisée au niveau des vacuoles (Mourer et al., 2017), Str3 reste localisée à la surface cellulaire en présence ou en absence d'hémine.

▼ **Figure 2.** Localisation de Str3 à la surface cellulaire en présence de différentes concentrations en hémine et en présence de 10  $\mu\text{M}$  de ZnMP. A. Une souche *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$  str3 $\Delta$*  exprimant *str3<sup>+</sup>-GFP* sous contrôle du promoteur inductible *nmt1<sup>+</sup>(41X)* a été traitée avec du Dip (250  $\mu\text{M}$ ) et du monochlorobimane (150  $\mu\text{M}$ , *Bimane-GS*) pendant 3 heures après dérepression du promoteur *nmt1<sup>+</sup>* pendant 17 heures. Par la suite, les cellules ont été traitées avec 10  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  de ZnMP et de la thiamine (5  $\mu\text{M}$ ) pour réprimer transcriptionnellement l'expression de *str3<sup>+</sup>-GFP*. L'accumulation de fluorescence de ZnMP, bimane-GS et de Str3-GFP a été suivie par microscopie à épifluorescence aux temps indiqués sur la figure. La fluorescence de la ZnMP, du bimane-GS et de Str3-GFP ont été superposées pour observer la colocalisation des deux composés (*Merged*). La morphologie cellulaire a également été observée en lumière visible (*Nomarski*). B. La souche utilisée dans le panel A, a été traitée avec du Dip (250  $\mu\text{M}$ ) pendant 3 heures après dérepression du promoteur *nmt1<sup>+</sup>* pendant 17 heures. Par la suite les cellules ont été traitées avec 10  $\mu\text{M}$  d'hémine et de la thiamine (5  $\mu\text{M}$ ) pour réprimer transcriptionnellement l'expression de *str3<sup>+</sup>-GFP*. La fluorescence de Str3-GFP a été suivie par microscopie à épifluorescence aux temps indiqués. C. L'expression protéique de Str3-GFP montrée au panel B a été mesurée par Western blot en utilisant un anticorps anti-GFP. L'expression de l' $\alpha$ -tubuline sert de contrôle interne et a été détectée avec un anticorps anti- $\alpha$ -tubuline. D. La souche utilisée dans le panel A, a été traitée avec du Dip (250  $\mu\text{M}$ ) pendant 3 heures après dérepression du promoteur *nmt1<sup>+</sup>* pendant 17 heures. Par la suite les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'hémine (0, 0.05, 1, 5, 10 et 50  $\mu\text{M}$ ) et de la thiamine (5  $\mu\text{M}$ ) pour réprimer transcriptionnellement l'expression de *str3<sup>+</sup>-GFP*. La fluorescence de Str3-GFP a été suivie par microscopie à épifluorescence 30 minutes après l'ajout d'hémine. E. L'expression protéique de Str3-GFP montré au panel D a été mesurée par Western blot en utilisant un anticorps anti-GFP. L'expression de l' $\alpha$ -tubuline servant de contrôle interne, a été détectée avec un anticorps anti- $\alpha$ -tubuline. Les résultats présentés sont représentatifs de cinq expériences indépendantes. Pour les panels A, B et D, le cytoplasme est indiqué par les flèches jaunes et la surface cellulaire par les flèches roses.



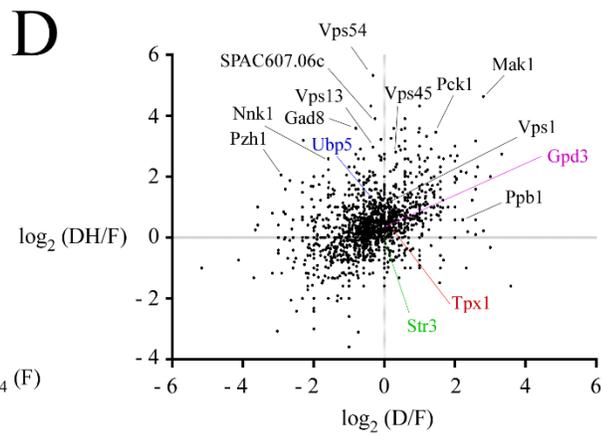
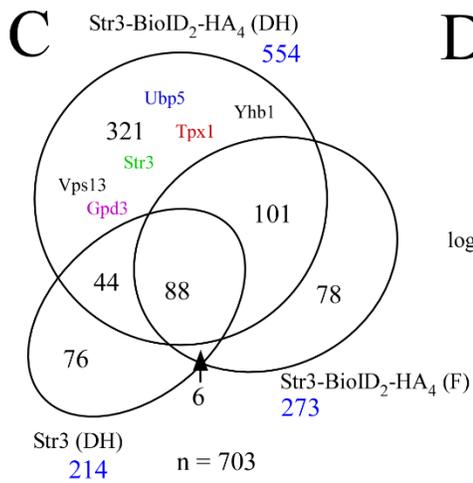
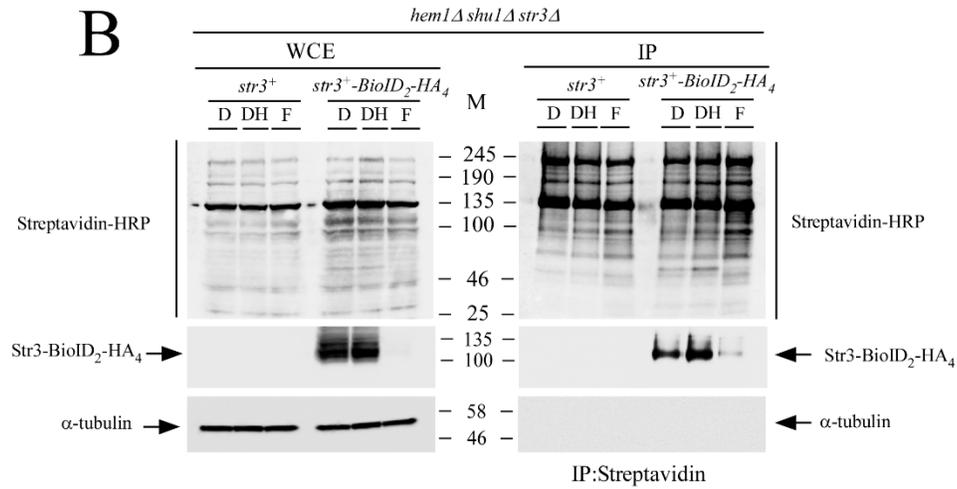
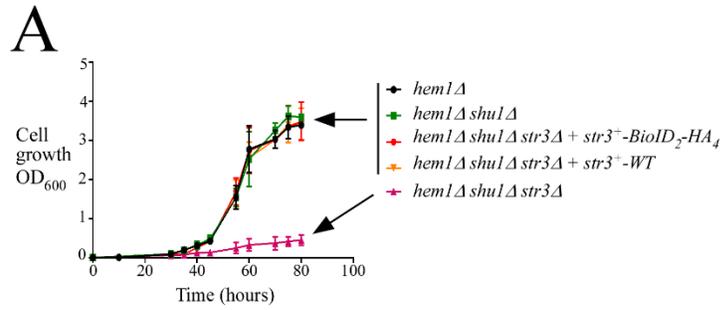
## Recherche de partenaire à Str3 par la méthode BioID<sub>2</sub> suivit d'une analyse en spectrométrie de masse (MS-MS)

Nous avons montré que Str3 demeure à la surface cellulaire et ce, même en présence d'hémine ou de ZnMP. Cela implique qu'il pourrait exister une ou des protéine(s) responsable(s) de la prise en charge et de la redistribution de l'hème dans le cytoplasme. Ainsi, dans le but de trouver des partenaires protéiques à Str3 impliqués dans l'homéostasie de l'hème chez *S. pombe*, un allèle *str3*<sup>+</sup> couplé au gène codant pour la biotine ligase de la bactérie *A. aeolicus* mutée dans le site catalytique (Arg<sup>40</sup> mutée en Gly<sup>40</sup>) (Kim et al., 2016) a été créé. Nous avons dans un premier temps vérifié que la biotine ligase n'affectait pas la fonction de Str3. Pour ce faire, les souches *hem1Δ*, *hem1Δ shu1Δ str3Δ*, *hem1Δ shu1Δ str3Δ str3*<sup>+</sup> et *hem1Δ shu1Δ str3Δ str3*<sup>+</sup>-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> ont été cultivées dans du YES contenant 200 μM de ALA jusqu'à une A<sub>600</sub> de 0.5. A cette densité, les cellules ont été traitées pendant 3 heures dans du YES contenant 200 μM de ALA et 250 μM de Dip pour induire Str3 et Str3-

BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub>. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau pour éliminer l'excès de ALA et resuspendues (1/1000) dans du YES supplémenté ou non avec 200 µM de ALA ou avec 0.15 µM d'hémine et contenant 25 µM de Dip. Toutes les souches en présence de ALA ont une croissance similaire et aucune croissance n'est observable en absence de ALA. En présence de 0.15 µM d'hémine, une croissance est observable lorsque la souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprime l'allèle *str3<sup>+</sup>* (*hem1Δ shu1Δ str3Δ str3<sup>+</sup>*) ou l'allèle *str3<sup>+</sup>*-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> (*hem1Δ shu1Δ str3Δ str3<sup>+</sup>*-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub>) montrant ainsi que l'étiquette BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> n'affecte pas la fonctionnalité de la protéine Str3. Une croissance très faible est observable pour la souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* (Figure 3A).

Pour déterminer les protéines partenaires de Str3, les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprimant la protéine de fusion fonctionnelle Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> ou la protéine Str3 ont été cultivées dans du YES contenant 200 µM de ALA et 50 µM de biotine jusqu'à une *A<sub>600</sub>* de 0.5. A cette densité, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau puis resuspendues dans le même volume de YES sans ALA contenant 50 µM de biotine et 250 µM de Dip (D), 250 µM de Dip 10 µM d'hémine (DH) ou 100 µM de fer (FeCl<sub>3</sub>). Après 3 heures de traitement, les cellules ont été lysées dans l'acide trichloroacétique (TCA). Les extraits protéiques totaux ont été dialysés pour éliminer l'excès de biotine puis mis en présence de la streptavidine couplée à des billes agarose pendant 2 heures (Hwang and Espenshade, 2016). Après lavages des billes, les extraits protéiques avant (WCE) et après immunoprécipitation (IP) ont été migrés sur gel SDS-PAGE et révélés par Western blot en utilisant une streptavidine couplée à la HRP (révélation des protéines biotinylées) (Figure 3B) ou analysées par MS-MS après digestion à la trypsine. Nous avons réalisé deux expériences de MS/MS. La première expérience de MS/MS a confirmé la présence de protéines biotinylées spécifiquement dans la condition traitée en Dip et en hémine (DH) en présence de Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> comparativement à cette même condition en présence de Str3 (Figure 3C). Ainsi, 321 protéines sont spécifiquement biotinylées dans la condition Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> (DH) parmi lesquelles se retrouvent Str3, Tpx1 (thiorédoxine peroxydase ou peroxyrédoxine), Gpd3 (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), Ubp5 (hydrolase à ubiquitine ou DUB, *deubiquitinating enzyme*), Yhb1 (nitrite oxyde dioxygénase) et Vps13 (*vacuolar protein sorting 13*). La condition Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> traitée en fer (F) a été utilisée comme contrôle

car la protéine Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> n'est pas exprimée dans cette condition (Figure 3C). Une seconde expérience de MS/MS a été réalisée pour valider la présence des protéines biotinylées observées lors de la première expérience. Les six conditions immunoprécipitées (Figure 3B) ont été analysées par MS/MS. Les comptes de peptides pour chaque condition Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub> (D, DH et F) ont été normalisés sur les conditions correspondantes de Str3. Ensuite, les valeurs obtenues en D et DH ont été divisées par l'intensité de la condition contrôle traitée en fer (F) permettant d'éliminer tous les peptides biotinylés de façon non spécifique présents dans cette condition où Str3 n'est pas exprimée. Le graphique présenté à la Figure 3D représente le  $\log_2$  (DH/F) en fonction du  $\log_2$  (D/F). Ainsi, les peptides retrouvés dans le carré supérieur à gauche ( $\log_2$  (DH/F) > 0 et  $\log_2$  (D/H) < 0) sont spécifiquement enrichis dans la condition traitée en Dip et hémine (DH) en présence de Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub>. Ceux retrouvés dans le carré inférieur à droite ( $\log_2$  (DH/F) < 0 et  $\log_2$  (D/H) > 0) sont spécifiquement enrichis dans la condition uniquement traitée en Dip (D) et ceux retrouvés dans le carré supérieur à droite ( $\log_2$  (DH/F) > 0 et  $\log_2$  (D/H) > 0) sont enrichis dans les deux conditions (Dip et Dip + hémine). Les protéines Vps13 et Ubp5 sont comme précédemment enrichies spécifiquement dans la condition traitée en Dip et hémine. La protéine Str3 est enrichie dans les deux conditions de sa détection (D et DH, Figure 3B) tout comme les protéines Tpx1, Gpd3, Vps1, Vps45, Ppb1 (phosphatase à sérine et thréonine dépendante du calcium), Mak1 (histidine kinase) et Pck1 (kinase). Les protéines Vps54, Gad8 (kinase), Nnk1 (kinase à sérine et thréonine), Pzh1 (phosphatase à sérine et thréonine) et la protéine codée par le gène SPAC607.06c (métalopeptidase) sont spécifiquement enrichies dans la condition traitée en Dip et en hémine (DH) (Figure 3D).



▲ **Figure 3.** Recherche des partenaires protéiques de *Str3* par biotinylation de proximité. A. Courbes de croissance des souches indiquées dans du milieu YES supplémenté avec 0.15  $\mu$ M d'hémine. B. Une souche *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$  str3 $\Delta$*  exprimant la protéine de fusion Str3-BioID2-HA<sub>4</sub> ou la protéine Str3 a été cultivée dans du YES contenant 200  $\mu$ M de ALA et 50  $\mu$ M de biotine jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5. A cette densité, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau puis resuspendues dans le même volume de YES sans ALA contenant 50  $\mu$ M de biotine et 250  $\mu$ M de Dip (D), 250  $\mu$ M de Dip 10  $\mu$ M d'hémine (DH) ou 100  $\mu$ M de fer (F, FeCl<sub>3</sub>). Après 3 heures de traitement, les cellules ont été lysées dans l'acide trichloroacétiques (TCA), dialysées puis mis en présence de la streptavidine couplée à des billes agaroses pendant 2 heures. Ensuite, après lavage des billes, les extraits protéiques avant (WCE) et après immunoprécipitation (IP) ont été migrés sur gel SDS-PAGE et révélés par Western blot en utilisant une streptavidine couplé à la HRP, un anticorps anti-GFP (Str3) ou anti- $\alpha$ -tubuline. C-D. Les extraits protéiques immunoprécipités ont été digérés avec de la trypsine puis analysés par MS/MS.

### Str3 interagit fortement avec Tpx1 en présence d'hème

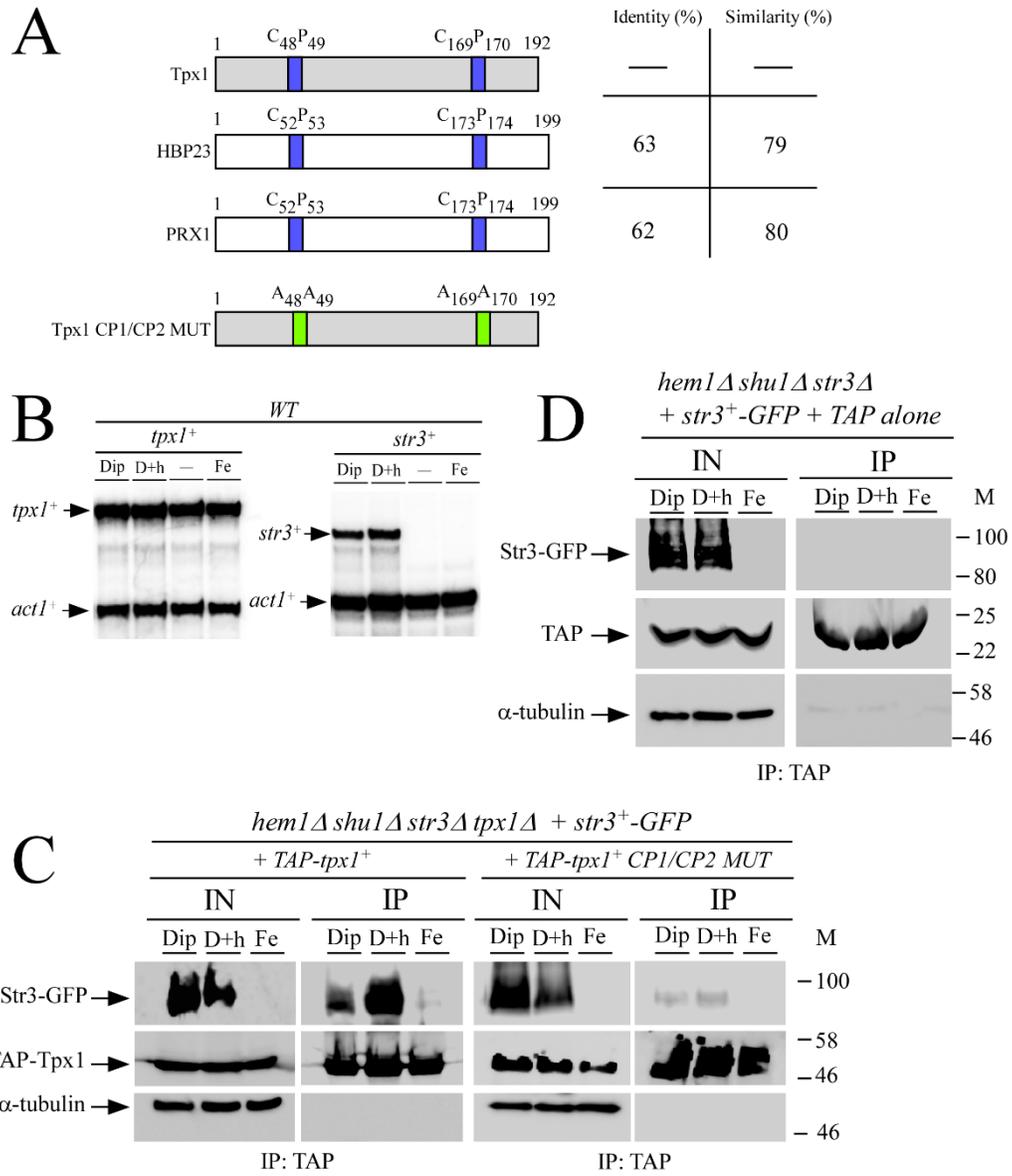
La protéine Tpx1 a été fortement détectée dans la condition contenant du Dip et de l'hémine suggérant une interaction entre Str3 et cette dernière. Tpx1 présente une forte homologie avec la protéine HBP23 (Heme Binding Protein 23) (199 acides aminés) exprimée chez le rat (63% d'identité et 79% de similarité) et avec la protéine PRX1 (199 acides aminés) exprimée chez l'humain (62% d'identité et 80% de similarité) (Figure 4A). De plus, HBP23 et PRX1 ont été décrites comme pouvant lier de l'hème (Iwahara et al., 1995; Watanabe et al., 2017). La protéine Tpx1 est composée de 192 acides aminés. Les trois protéines possèdent deux motifs CP correspondant aux Cys<sup>48</sup>, Pro<sup>49</sup>, Cys<sup>169</sup> et Pro<sup>170</sup> pour Tpx1 et aux Cys<sup>52</sup>, Pro<sup>53</sup>, Cys<sup>173</sup> et Pro<sup>174</sup> pour HBP23 et PRX1. Ces deux motifs sont inclus dans des régions hautement conservées (Figure 4A, S2).

Pour vérifier l'expression génique de *tpx1*<sup>+</sup> dans les conditions du MS-MS, des protections à la RNase sur les ARN totaux ont été réalisées dans les mêmes conditions que ce dernier. L'expression de *tpx1*<sup>+</sup> est constante dans les conditions Dip, Dip et hémine (D+h), basale (-) et fer (Fe). En revanche, *str3*<sup>+</sup> est exprimé uniquement en présence de Dip (Dip et D+h), son expression étant dépendante du facteur de transcription Fep1 (Normant et al., 2018; Pelletier et al., 2003). Il est à noter que la présence d'hémine en plus du Dip n'affecte pas l'expression de *str3*<sup>+</sup> (Figure 4B).

Pour vérifier l'interaction entre Str3 et Tpx1, des souches *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$  str3 $\Delta$  tpx1 $\Delta$*  Str3-GFP exprimant TAP-Tpx1, TAP-Tpx1 CP1/CP2 MUT et une souche *hem1 $\Delta$  shu1 $\Delta$*

*str3Δ* exprimant Str3-GFP et l'étiquette TAP (*TAP alone*) ont été cultivées dans du YES contenant du ALA (200 μM) jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau puis resuspendues dans le même volume de YES et traitées avec du Dip (250 μM) avec ou sans hémine (10 μM) ou avec du fer (Fe, 100 μM) pendant 3 heures. Les protéines ont été extraites dans du tampon TMN150 et les extraits totaux ont été placés en présence de billes de sépharose couplées à un anti-IgG pendant 3 heures à 4°C. Après lavage des billes avec du TMN150 contenant 1% de Triton X-100, les extraits correspondant aux chargements initiaux (inputs, IN) et aux fractions immunoprécipitées (IP), ont été migrés sur un gel SDS-PAGE et révélés par Western blot en utilisant des anticorps anti-GFP, anti-TAP et anti- $\alpha$ -tubuline. En présence de TAP-Tpx1, Str3-GFP est détectable dans la fraction immunoprécipitée (IP) en présence de Dip et plus fortement en présence de Dip et hémine (D+h). Ainsi, l'interaction entre les deux protéines est renforcée en présence d'hémine. Lorsque la protéine Tpx1 est mutée au niveau des motifs CP1 et CP2, la détection de Str3-GFP dans les fractions immunoprécipitées est fortement diminuée comparativement à l'immunoprécipitation réalisée avec la protéine TAP-Tpx1 sauvage. La présence des deux motifs CP est importante pour la liaison à Str3 en présence de Dip et en présence de Dip et d'hémine (Figure 4C). Lorsque Str3-GFP est coexprimée avec l'étiquette TAP (*TAP alone*), Str3-GFP n'est pas détectable dans la fraction immunoprécipitée (IP). Ainsi, aucune interaction n'est observable entre TAP et Str3-GFP montrant ainsi la spécificité de l'interaction entre Str3 et Tpx1 (Figure 4D). De même, l' $\alpha$ -tubuline n'est pas détectable dans les fractions enrichies par immunoprécipitation (IP), confirmant la spécificité de cette dernière (Figure 4C et 4D). Par ailleurs, aucune interaction n'est observable entre TAP-Tpx1 et Shu1-HA<sub>4</sub> en présence de Dip ou de Dip et hémine dans une souche *hem1Δ shu1Δ tpx1Δ shu1<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub> TAP-tpx1<sup>+</sup>* cultivée dans les mêmes conditions expérimentales (Figure S3).

Ces résultats montrent que Str3 et Tpx1 interagissent ensemble plus fortement en présence d'hémine. Par ailleurs, les deux motifs CP (CP1 et CP2) sont requis pour cette liaison.



▲ **Figure 4.** *L'interaction entre Str3 et Tpx1 est renforcée en présence d'hémine.* A. La protéine Tpx1 (192 acides aminés) de *S. pombe* partage 63% et 62% d'identité et 79% et 80% de similarité avec HBP23 (*R. norvegicus*) et PRX1 (*H. sapiens*), respectivement. Les trois protéines possèdent deux motifs CP correspondant aux Cys<sup>48</sup>Pro<sup>49</sup> et Cys<sup>169</sup>Pro<sup>170</sup> pour Tpx1 et Cys<sup>52</sup>Pro<sup>53</sup> et Cys<sup>173</sup>Pro<sup>174</sup> pour HBP23 et PRX1. La protéine Tpx1 CP1/CP2 MUT a été générée par mutagenèse dirigée pour muter les deux motifs Cys<sup>48</sup>Pro<sup>49</sup> et Cys<sup>169</sup>Pro<sup>170</sup> en Ala<sup>48</sup>Ala<sup>49</sup> et Ala<sup>169</sup>Ala<sup>170</sup>. B. Une souche *WT* a été cultivée dans du YES jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.9, puis traitée avec du Dip (250  $\mu$ M), du Dip et de l'hémine (10  $\mu$ M), ou du fer (FeCl<sub>3</sub>, 100  $\mu$ M) ou non traitée pendant 90 minutes. Les ARN totaux ont ensuite été extraits puis analysés par essais à la protection à la RNase. Les niveaux d'ARNm de *tpx1*<sup>+</sup>, *str3*<sup>+</sup> et de *act1*<sup>+</sup> sont indiqués par des flèches. C. Deux souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant Str3-GFP et TAP-Tpx1 ou TAP-Tpx1 CP1/CP2 MUT ont été cultivées dans du YES contenant 200  $\mu$ M de ALA en microaérophilie jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5. Après deux lavages à l'eau, les cellules ont été resuspendues dans du YES contenant du Dip (250  $\mu$ M), du Dip (250  $\mu$ M) et de l'hémine (10  $\mu$ M) ou du fer (FeCl<sub>3</sub>, 100  $\mu$ M). Après trois heures de traitement, les cellules ont été lysées puis une immunoprécipitation anti-IgG (TAP) a été réalisée. Les protéines ont été migrées sur un gel SDS-PAGE puis révélées par Western blot en utilisant des anticorps anti-GFP (Str3), anti-IgG (TAP) et anti- $\alpha$ -tubulin. D. Une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprimant Str3-GFP et TAP (*TAP alone*) a été cultivée dans du YES contenant 200  $\mu$ M de ALA en microaérophilie jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5. Après deux lavages à l'eau, les cellules ont été resuspendues dans du YES contenant du Dip (250  $\mu$ M), du Dip (250  $\mu$ M) et de l'hémine (10  $\mu$ M) ou du fer (FeCl<sub>3</sub>, 100  $\mu$ M). Après trois heures de traitement, les cellules ont été lysées puis une immunoprécipitation anti-IgG (TAP) a été réalisée. Les protéines ont été migrées sur un gel SDS-PAGE puis révélées par Western blot en utilisant des anticorps anti-GFP (Str3), anti-IgG (TAP) et anti- $\alpha$ -tubulin.

### Une fraction de la protéine Tpx1 est plus enrichie à la membrane en présence d'hémine

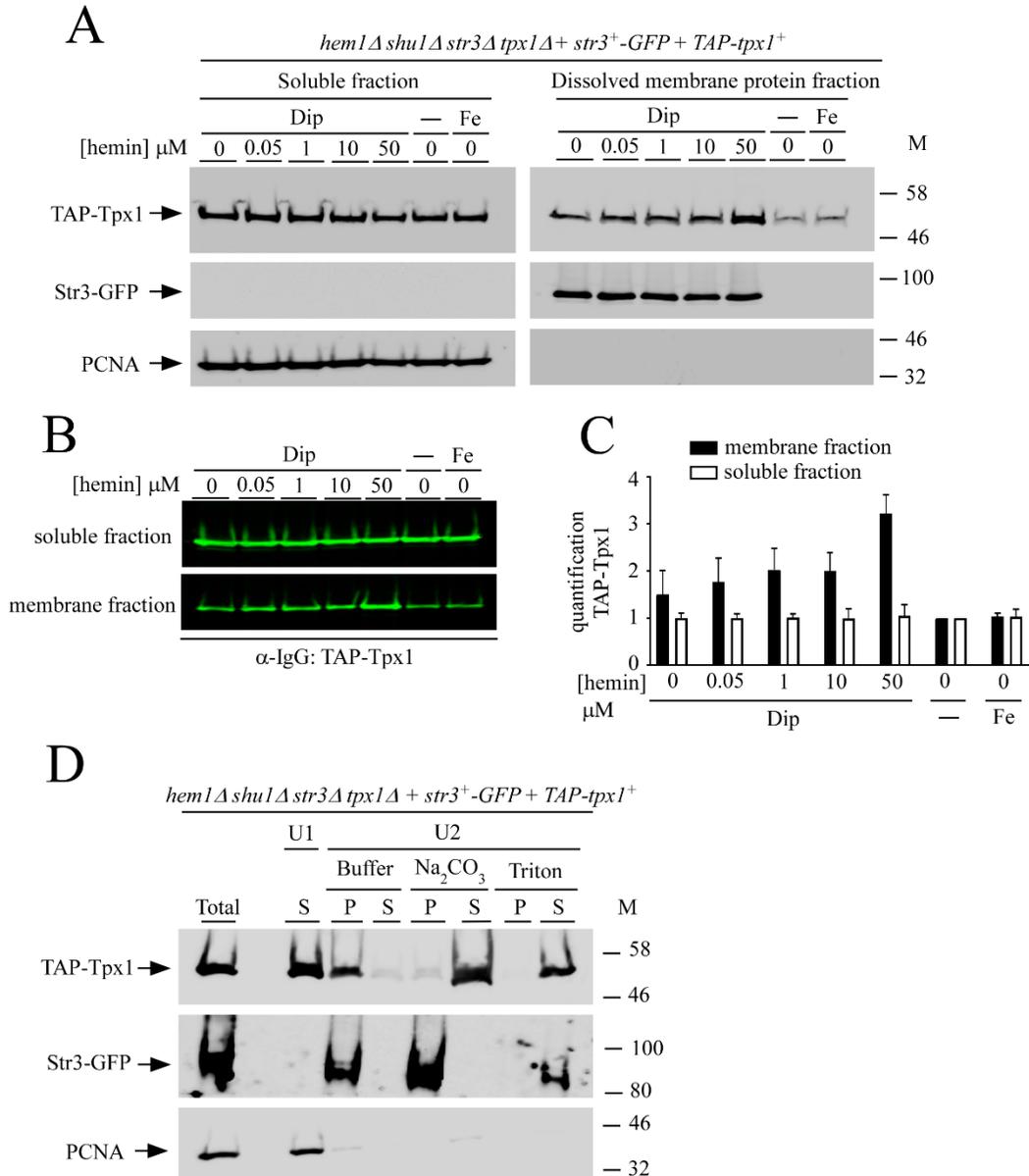
Étant donné que nos résultats montrent que Str3 et Tpx1 interagissent ensemble plus fortement en présence d'hémine, nous avons voulu vérifier si Tpx1 est présent à la membrane dans ces conditions. Ainsi, une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* co-exprimant Str3-GFP et TAP-Tpx1 a été cultivée dans du YES contenant 200  $\mu$ M de ALA. À une  $A_{600}$  de 0.5, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau puis resuspendues dans du YES ne contenant pas de ALA, et traitées avec 250  $\mu$ M de Dip avec différentes concentrations d'hémine (0, 0.05, 1, 10 et 50  $\mu$ M), du fer (FeCl<sub>3</sub>, 100  $\mu$ M) ou laissées non traitées (-) pendant trois heures. Ensuite, les cellules ont été lysées dans du tampon HEGN<sub>100</sub> puis les fractions membranaires et solubles ont été séparées par ultracentrifugation. Les fractions solubles (*Soluble fraction*) et membranaires ont été traitées avec du Triton X-100 pour resolubiliser les protéines (*Dissolved membrane protein fraction*) et ont été migrées sur un gel SDS-PAGE, puis

révélées par Western blot. La protéine Str3 est entièrement détectable dans la fraction membranaire en présence de Dip ou de Dip avec différentes concentrations en hémine. Une partie de la protéine Tpx1 est présente dans la fraction membranaire, cette proportion est faible en condition basale (-) et fer (Fe), mais augmente en présence de Dip et plus fortement en fonction d'une concentration croissante en hémine (Figure 5A). La même expérience que précédemment a été répétée, les extraits protéiques soluble (soluble fraction) et membranaire (membrane fraction) ont été migrés sur un gel SDS-PAGE puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Ensuite, un anticorps primaire anti-IgG a été utilisé puis un anticorps secondaire IRDye 800CW. Nous avons utilisé un LI-COR Odyssey pour la révélation (Figure 5B). Ainsi, on observe que l'expression de TAP-Tpx1 ne varie pas dans la fraction soluble (Figure 5C). En revanche, comme précédemment (Figure 5A), la présence de TAP-Tpx1 à la membrane est très faible dans les conditions basale (-) et en fer (Fe) mais augmente lorsque la concentration en hémine augmente en présence de Dip (Figure 5B et 5C).

Pour vérifier que Tpx1 est accolée à la membrane, un fractionnement biochimique de la fraction membranaire a été réalisé. Dans les conditions de cultures décrites précédemment, la souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ str3<sup>+</sup>-GFP TAP-tpx1<sup>+</sup>* a été cultivée en présence de Dip (250 μM) et de 10 μM d'hémine. Après lyse cellulaire dans du tampon HEGN<sub>100</sub>, une première ultracentrifugation (Figure 5D, U1) a été réalisée permettant de séparer la fraction soluble (Figure 5D, U1, S) de la fraction membranaire. La fraction membranaire a été resuspendue dans du tampon seul (Figure 5B, Buffer), dans du tampon contenant 0.1 M de carbonate de sodium (Figure 5D, NaCO<sub>3</sub>) ou dans du tampon contenant 1% de Triton X-100 (Figure 5D, Triton) et fractionnée une seconde fois par ultracentrifugation (Figure 5B, U2). En absence de traitement (Figure 5D, Buffer) Str3-GFP et TAP-Tpx1 se retrouvent dans la fraction précipitée (Figure 5D, P). En présence de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Str3 se retrouve toujours précipitée (Figure 5B, P), car elle est intégrée dans la membrane comme décrit précédemment (Normant et al., 2018), alors que TAP-Tpx1 est relarguée dans la partie soluble (Figure 5D, S). En présence de Triton X-100, Str3-GFP se retrouve dans la fraction soluble tout comme TAP-Tpx1 (Figure 5D, S). Par ailleurs, la protéine PCNA reste dans la fraction protéique soluble après la première ultracentrifugation (U1).

Ces résultats suggèrent fortement que Tpx1 vient s'accoler à la membrane en présence de Dip lorsque Str3 est biosynthétisée et maturée à la membrane. L'enrichissement de Tpx1 à la membrane est accentué en présence d'hémine.

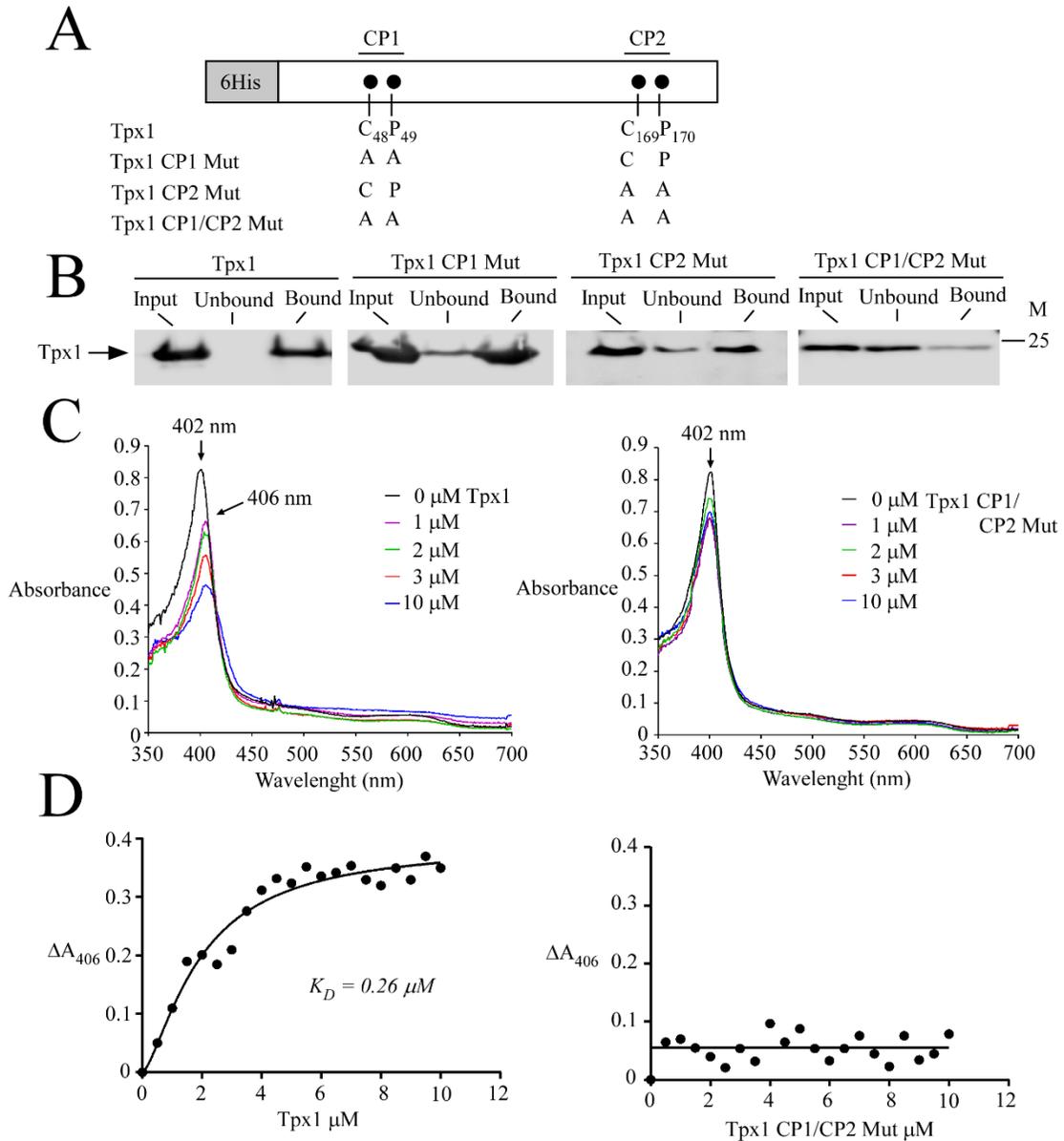
▼ **Figure 5.** *Tpx1 est plus fortement enrichie dans la fraction membranaire en présence d'hémine.* A. Une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant Str3-GFP et TAP-Tpx1 a été cultivée dans du YES contenant 200 μM de ALA jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5 puis lavée deux fois à l'eau et resuspendue dans du YES sans ALA contenant du Dip (250 μM), du Dip et de l'hémine (0.05, 1, 10 ou 50 μM), du fer (Fe, FeCl<sub>3</sub> = 100 μM) ou laissée non traitée (-) pendant trois heures. Ensuite les cellules ont été lysées et la fraction soluble (*Soluble fraction*) a été séparée de la fraction membranaire (*Dissolved membrane protein fraction*) par ultracentrifugation (100 000 X g). La fraction membranaire a été resuspendue dans du tampon contenant 1% de Triton-X-100. A. Les deux fractions ont été migrées sur des gels SDS-PAGE puis les protéines TAP-Tpx1, Str3-GFP et PCNA ont été révélées par Western blot en utilisant des anticorps anti-IgG, anti-GFP et anti-PCNA, respectivement. B-C. Pour quantifier la protéine TAP-Tpx1 dans les fractions solubles et membranaires, un anticorps secondaire fluorescent IRDye 800CW a été utilisé en Western blot (B), puis quantifié par LICOR Odyssey (C). D. Une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant Str3-GFP et TAP-Tpx1 a été cultivée dans du YES contenant 200 μM de ALA jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5 puis lavée deux fois à l'eau et resuspendue dans du YES sans ALA contenant du Dip (250 μM) et de l'hémine (10 μM) pendant trois heures. Un extrait total de protéine (*Total*) a été ultracentrifugé une première fois (*U1*) à 100 000 X g, puis le culot a été resuspendu et laissé non traité (*Buffer*), incubé en présence de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 M) ou en présence de 1% de Triton X-100 et ultracentrifugé de nouveau (*U2*) à 100 000 X g. Les surnageants (S) et les culots (P) de chaque fraction ont été migrés sur un gel SDS-PAGE puis les protéines TAP-Tpx1, Str3-GFP et PCNA ont été révélées par Western blot en utilisant les anticorps anti-IgG (TAP), anti-GFP et anti-PCNA, respectivement.



### Expression de Tpx1 sauvage et mutantes chez *E. coli*

Pour vérifier la liaison de Tpx1 à l'hème, différents peptides correspondant à la protéine Tpx1 ou Tpx1 mutée au niveau des motifs CP (soit C48P49 mutés en A48A49 pour Tpx1 CP1 Mut, C169P170 mutés en A169A170 pour Tpx1 CP2 MUT ou CP48P49 et C169P170 mutés en A48A49 et A169A170 pour Tpx1 CP1/CP2 Mut) ont été exprimés chez *E. coli* avec une étiquette moléculaire 6His (l'étiquette 6His est localisée en amont de la protéine Tpx1) (Figure 6A). Cette étiquette 6His a permis d'enrichir les différents peptides sur des résines couplées à du nickel-NTA (Figure S4). Les différents peptides enrichis (*Input*)

ont été mis en présence de billes d'agarose couplées à de l'hémine puis les différentes fractions ont été révélées par Western blot. Ainsi, lorsque Tpx1 est mis en présence des billes toute la protéine se retrouve dans la fraction liée aux billes (*Bound*) et n'est pas détectable dans la fraction non liée (*Unbound*). Lorsque Tpx1 est mutée pour une ou l'autre région CP (Tpx1 CP1 MUT ou Tpx1 CP2 Mut), une grande partie de la protéine se retrouve toujours dans la partie liée aux billes (*Bound*) et une faible proportion est décrochée des billes (*Unbound*). En revanche, la protéine Tpx1 mutée pour les deux motifs CP (Tpx1 CP1/CP2 Mut) ne se lie plus aux billes (*Bound*) et est majoritairement retrouvée dans la fraction non liée (*Unbound*) (Figure 6B). Pour valider l'importance des deux domaines CP dans la liaison de Tpx1 à l'hème, nous avons titré la liaison de Tpx1 à l'hème par spectrophotométrie. L'hème absorbe à une longueur d'onde précise dans un tampon donné. Ici, nous avons utilisé 5  $\mu\text{M}$  d'hémine dilué dans un tampon HEPES-DMSO (40%), l'absorbance maximale de l'hémine libre est observée à 402 nm correspondant au pic de Soret. Une modification dans l'intensité ou un décalage dans la longueur d'onde maximale de ce dernier indique une interaction avec le peptide ajouté à l'hémine. Des concentrations croissantes de Tpx1 (de 0 à 10  $\mu\text{M}$ ) ou de Tpx1 CP1/CP2 MUT (de 0 à 10  $\mu\text{M}$ ) ont été ajoutées à 5  $\mu\text{M}$  d'hémine et les spectres de 350 à 700 nm ont été mesurés. Dans la condition où la protéine Tpx1 est placée en présence d'hémine, on observe une diminution de l'intensité du pic de Soret et un décalage de ce dernier vers la droite indiquant une liaison Tpx1-hémine. Lorsque Tpx1 est mutée (Tpx1 CP1/CP2 Mut) une légère diminution du pic de Soret est observable. En revanche, on observe aucun décalage de ce dernier, suggérant que la liaison Tpx1-hémine est fortement affectée lorsque les deux motifs CP sont mutés (Figure 6C). En mesurant la différence d'intensité à 406 nm, correspondant au décalage dans le pic de Soret, nous sommes en mesure de calculer une constante de dissociation ( $K_D$ ) en rapportant cette différence d'intensité en fonction de la concentration en Tpx1. Dans le cas de Tpx1 sauvage la courbe obtenue permet de définir la constante de dissociation ( $K_D = 0.26 \mu\text{M}$ ) de l'hème pour Tpx1. Néanmoins, pour Tpx1 CP1/CP2 mutant la courbe obtenue ne nous permet pas de définir une constante de dissociation (Figure 6D).



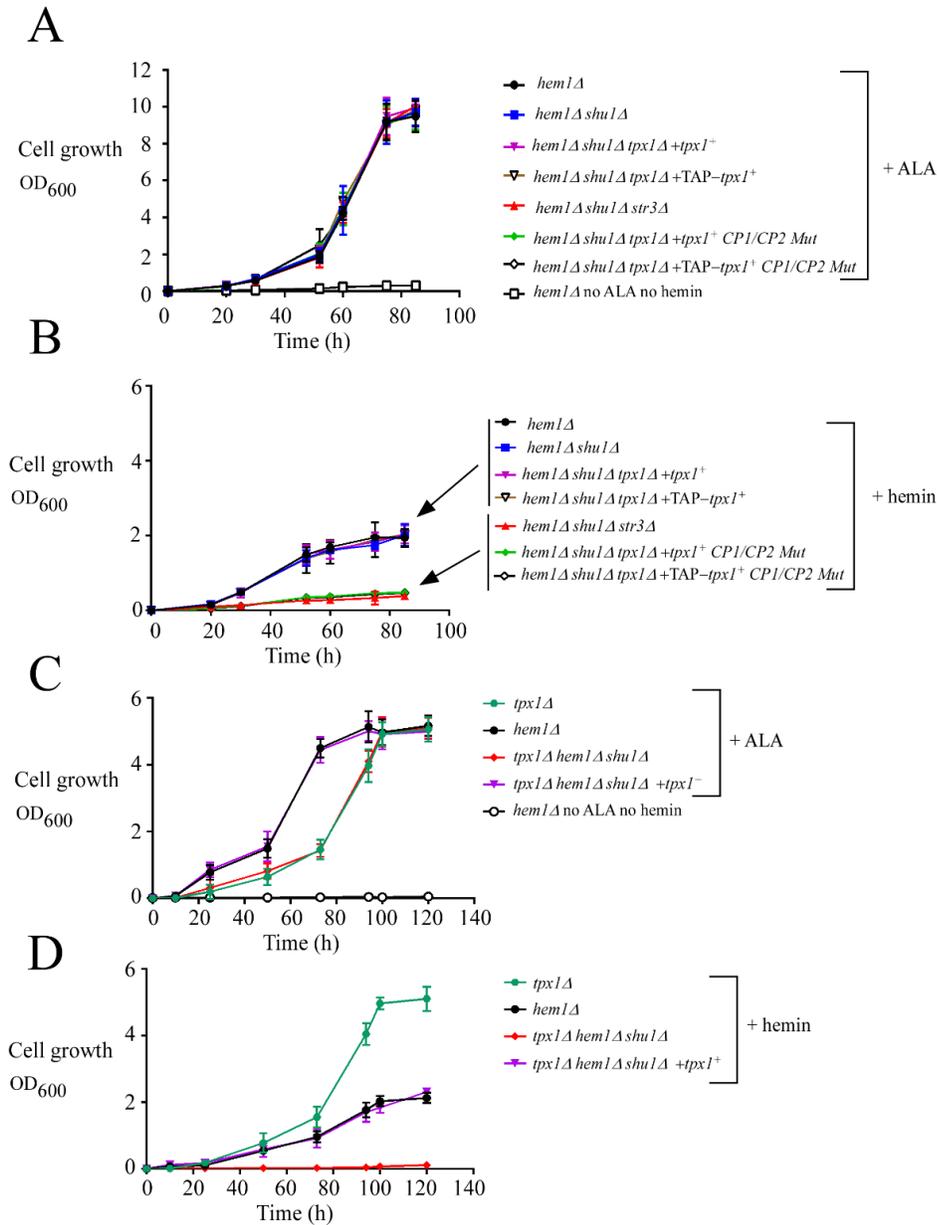
**▲ Figure 6.** *Tpx1* se lie à l'hémine *in vitro*. A. Représentation schématique de 6His-Tpx1 et des mutants 6His-Tpx1-CP1, -CP2 et -CP1/CP2. B. 6His-Tpx1 et 6His-Tpx1-CP1, -CP2 et -CP1/CP2 purifiés (*Input*) ont été incubés avec des billes hémine-agarose. Les fractions non liées (*Unbound*) et liées (*Bound*) aux billes hémine-agarose ont été analysées par Western blot en utilisant un anticorps anti-6His. C. Titration de l'interaction entre différentes concentrations de 6His-Tpx1 (0 à 10  $\mu\text{M}$ ) et l'hémine (5  $\mu\text{M}$ ) – *panel de gauche*. La même expérience a été réalisée avec différentes concentrations de 6His-Tpx1-CP1/CP2 MUT et de l'hémine (5  $\mu\text{M}$ ) – *panel de droite*. D. Les courbes de liaisons de l'hémine à 6His-Tpx1 (*panel de gauche*) et à 6His-Tpx1-CP1/CP2 MUT (*panel de droite*) ont été obtenues en traçant la courbe de la différence d'intensité du pic de Soret (par rapport à la valeur 0  $\mu\text{M}$  de Tpx1) en fonction de la concentration en Tpx1. L'hémine interagit avec Tpx1 sauvage avec une  $K_D$  de 0.26  $\mu\text{M}$  (constante de dissociation).

## L'absence et la mutation de Tpx1 au niveau des motifs CP affecte la croissance des cellules en présence d'hémine

Précédemment, il a été montré que la présence de Str3 est requise en absence des gènes *hemI*<sup>+</sup> et *shuI*<sup>+</sup> (*hemIΔshuIΔ*) pour transporter de l'hème à une concentration de 0.15 μM. Pour valider l'effet de *tpx1*<sup>+</sup> à cette concentration, nous avons réintégré un allèle *tpx1*<sup>+</sup> sauvage (possédant ou non une étiquette moléculaire TAP : *TAP-tpx1*<sup>+</sup>) ou un allèle mutant *tpx1*<sup>+</sup> *CPI/CP2 MUT* (possédant ou non une étiquette moléculaire TAP : *TAP-tpx1*<sup>+</sup> *CPI/CP2 Mut*) dans une souche *hemIΔshuIΔtpx1Δ*. Ces souches ont été cultivées dans du YES contenant 200 μM de ALA jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de 0.5 dans des conditions microaérophiliques. Puis, elles ont été traitées avec 250 μM de Dip dans du YES contenant du ALA (200 μM) jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de 1.0. A ce stade, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau puis resuspendues dans le même volume de YES ne contenant pas de ALA. Les cellules ont ensuite été diluées 1000 fois dans du YES contenant du ALA (200 μM) ou de l'hémine (0.15 μM) et 0,25 μM de Dip ou sans ALA et sans hémine (*no ALA, no hemin*). Les cultures ont été réalisées dans une condition microaérophilique. En présence de ALA, on observe une croissance similaire de toutes les souches testées. La faible concentration en oxygène n'affecte pas la capacité de croissance, mais retarde cette dernière (Figure 7A) comparativement à une condition de croissance en aérobie (Normant et al., 2018). En revanche, en présence d'hémine (0.15 μM), les souches *hemIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 1.94 ± 0.24 après 85 heures), *hemIΔshuIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 2.02 ± 0.29 après 85 heures), *hemIΔshuIΔtpx1Δtpx1*<sup>+</sup> (*A*<sub>600</sub> de 2.03 ± 0.24 après 85 heures) et *hemIΔshuIΔtpx1ΔTAP-tpx1*<sup>+</sup> (*A*<sub>600</sub> de 2.04 ± 0.24 après 85 heures) sont capables de croître, alors que l'on observe une diminution significative de la croissance lorsque la souche *hemIΔshuIΔtpx1Δ* exprime un allèle *tpx1*<sup>+</sup> *CPI/CP2 MUT* (*A*<sub>600</sub> de 0.48 ± 0.06 après 85 heures) ou *TAP-tpx1*<sup>+</sup> *CPI/CP2 MUT* (*A*<sub>600</sub> de 0.47 ± 0.02 après 85 heures) ou dans le cas de la souche *hemIΔshuIΔstr3Δ* (*A*<sub>600</sub> de 0.39 ± 0.08 après 85 heures) (Figure 7A). Ainsi, comme l'absence de *str3*<sup>+</sup> dans une souche délétée pour *hemI*<sup>+</sup> et *shuI*<sup>+</sup> (*hemIΔshuIΔstr3Δ*), la mutation de Tpx1 au niveau des motifs CP entraîne une diminution significative de la capacité à croître des souches en présence de 0.15 μM d'hémine (Figure 7B).

La délétion de *tpxI*<sup>+</sup> est non viable lorsque les cellules sont cultivées en aérobie (Jara et al., 2007). Cependant, en concentrations faibles en oxygène (microaérophilie) ou en anaérobiose stricte, il est possible de cultiver une souche nulle pour le gène *tpxI*<sup>+</sup>. Une souche mutante *tpxIΔ* a été obtenue du groupe du professeur E. Hidalgo (souche SG5 *tpxIΔ*) (Calvo et al., 2013). Cette souche a été successivement délétée pour le gène *hemI*<sup>+</sup> puis *shuI*<sup>+</sup> (*tpxIΔ hemIΔ shuIΔ*) dans laquelle nous avons réintégré le gène *tpxI*<sup>+</sup> (*tpxIΔ hemIΔ shuIΔ + tpxI*<sup>+</sup>). Ainsi, nous avons pu tester l'effet de l'absence de *tpxI*<sup>+</sup> sur la croissance cellulaire en présence de 0.15 μM d'hémine. Les cellules ont été cultivées en microaérophilie dans du YES contenant 200 μM de ALA jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de 0.5. À ce stade, elles ont été traitées avec 250 μM de Dip dans du YES contenant 200 μM de ALA pendant environ 3 heures pour atteindre une *A*<sub>600</sub> de 1.0. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau pour retirer le ALA exogène, puis diluées 1000 fois dans du YES contenant 25 μM de Dip et 200 μM de ALA ou 0.15 μM d'hémine ou sans ALA et sans hémine (*no ALA, no hemin*). L'absence de *tpxI*<sup>+</sup> dans les souches suivantes : *tpxIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 1.46 ± 0.29 après 73 heures) et *tpxIΔ hemIΔ shuIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 1.43 ± 0.20 après 73 heures), entraîne un retard dans la croissance d'environ 20 heures en présence de ALA dans des conditions microaérophiliques comparée aux souches qui expriment *tpxI*<sup>+</sup> telles, *hemIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 4.50 ± 0.27 après 73 heures) et *tpxIΔ hemIΔ shuIΔ tpxI*<sup>+</sup> (*A*<sub>600</sub> de 4.44 ± 0.39 après 73 heures). Après 120 heures de croissance, les souches *tpxIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 5.06 ± 0.37), *hemIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 5,17 ± 0.31), *tpxIΔ hemIΔ shuIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 5,10 ± 0.31) et *tpxIΔ hemIΔ shuIΔ* exprimant *tpxI*<sup>+</sup> (*A*<sub>600</sub> de 4.99 ± 0.21) ont la même densité optique en présence de ALA (Figure 7C). En présence d'hémine, la souche *tpxIΔ* atteint une phase stationnaire au bout de 100 heures (*A*<sub>600</sub> de 5.1 ± 0.38 après 120 heures) comparable à la croissance observée dans le YES supplémenté en ALA. Les souches *hemIΔ* et *tpxIΔ hemIΔ shuIΔ tpxI*<sup>+</sup> sont capables de croître en présence de 0.15 μM d'hémine jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de ~ 2.0 (*A*<sub>600</sub> de 2.13 ± 0.16 pour la souche *hemIΔ* et *A*<sub>600</sub> de 2.31 ± 0.09 pour la souche *tpxIΔ hemIΔ shuIΔ tpxI*<sup>+</sup>) après 120 heures. En revanche, la souche *tpxIΔ hemIΔ shuIΔ* (*A*<sub>600</sub> de 0.114 ± 0.02 après 120 heures) est incapable de croître en présence de 0.15 μM d'hémine, ce qui confirme la nécessité de la présence de *tpxI*<sup>+</sup> pour les cellules à cette concentration d'hémine.

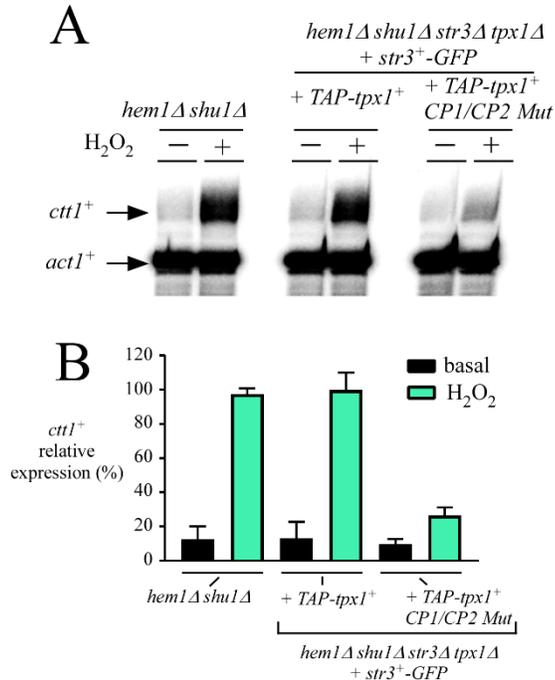
Ainsi la présence de Str3 ou de Tpx1 est requise pour la croissance d'une souche n'exprimant pas *hemI*<sup>+</sup> et *shuI*<sup>+</sup> (*hemI*Δ *shuI*Δ) en présence de 0.15 μM d'hémine.



▲ **Figure 7.** Le gène *tpx1*<sup>+</sup> est nécessaire pour l'acquisition de l'hème par une souche *hemI*Δ *shuI*Δ en absence de ALA dans un milieu supplémenté avec 0.15 μM d'hémine. A. Courbes de croissance des souches indiquées dans du milieu YES laissées non traitées (no ALA no hemin, carrés blancs) ou supplémenté avec du ALA exogène (200 μM) en conditions microaérophiles. B. Courbes de croissance des souches indiquées dans du milieu YES supplémenté avec 0.15 μM d'hémine. C-D. Courbes de croissance des souches dérivées de la souche SG5 (*tpx1*Δ) dans du YES supplémenté avec du ALA (200 μM) (C) ou supplémenté avec de l'hémine (0.15 μM) (D).

## La mutation de Tpx1 au niveau des motifs CP affecte l'expression de *ctt1*<sup>+</sup> en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les deux cystéines des domaines CP1 et CP2 de Tpx1 correspondant aux cystéines peroxydatique (incluse dans le CP1) et de résolution (incluse dans le CP2) participent à la réponse au stress oxydatif induit par exemple par le peroxyde d'hydrogène (Jara et al., 2007, 2008; Vivancos et al., 2005). Pour valider la fonctionnalité de TAP-Tpx1 et la perte de fonctionnalité pour cette voie de TAP-Tpx1 CP1/CP2, nous avons vérifié l'expression du gène *ctt1*<sup>+</sup> codant pour la catalase Ctt1 en présence d'un stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène. Les cellules ont été cultivées dans du YES contenant 200 µM de ALA. À une *A*<sub>600</sub> de 1.0, elles ont été traitées pendant 15 min avec 0.2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (+) ou non traitées (-). Les ARN totaux ont ensuite été extraits. Dans une souche exprimant *tpx1*<sup>+</sup> de façon endogène (*hem1Δ shu1Δ str3Δ str3<sup>+</sup>-GFP*), le gène *ctt1*<sup>+</sup> est induit en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ainsi le niveau d'ARNm de *ctt1*<sup>+</sup> est augmenté  $9.3 \pm 0.9$  fois dans la condition traitée au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparativement à la condition basale. Dans la souche exprimant TAP-Tpx1 (*hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ str3<sup>+</sup>-GFP TAP-tpx1<sup>+</sup>*), le gène *ctt1*<sup>+</sup> est également induit dans la condition traitée au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $10.1 \pm 1.0$  comparativement à la condition basale. Ainsi, *ctt1*<sup>+</sup> est induit de façon identique dans les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ str3<sup>+</sup>-GFP* et *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ str3<sup>+</sup>-GFP TAP-tpx1<sup>+</sup>*. En revanche en présence de TAP-Tpx1 CP1/CP2 MUT (*hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ str3<sup>+</sup>-GFP TAP-tpx1<sup>+</sup> CP1/CP2 MUT*), l'expression de *ctt1*<sup>+</sup> dans la condition traitée au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est fortement diminuée, le niveau d'ARNm de *ctt1*<sup>+</sup> est induit  $2.0 \pm 0.8$  fois dans la condition traitée en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparativement à la condition basale. Ainsi, la mutation des deux domaines CP affecte la fonction de la protéine Tpx1 à répondre au stress oxydatif induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 8).



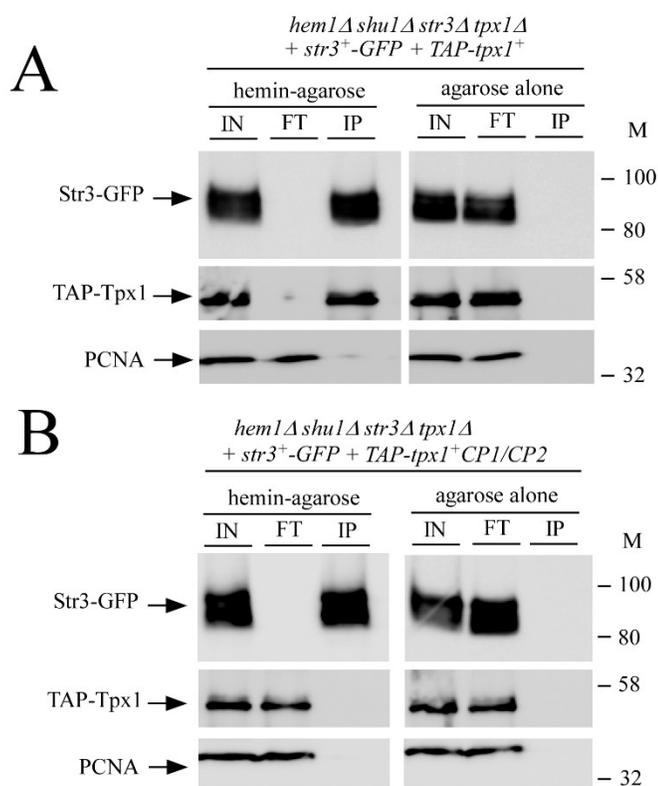
▲ **Figure 8.** L'expression de *ctt1<sup>+</sup>* est affectée en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans une souche exprimant *Tpx1* *CP1/CP2* mutant. A. Les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprimant *str3<sup>+</sup>-GFP*, *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant *str3<sup>+</sup>-GFP* et *TAP-tpx1<sup>+</sup>* et *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant *str3<sup>+</sup>-GFP* et *TAP-tpx1<sup>+</sup>* *CP1/CP2* ont été cultivées dans du YES contenant 200 μM de ALA en microaérophilie jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de 1.0 puis traitées avec 0.2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 15 minutes. Les ARN totaux ont ensuite été extraits puis analysés par protection à la RNase. Les expressions de *ctt1<sup>+</sup>* et de l'*act1<sup>+</sup>* sont indiquées par des flèches. B. Histogramme de quantification représentant la moyenne et l'écart type de trois RNase protection indépendantes dont la représentative est présentée au panel D.

**La protéine TAP-Tpx1 exprimée in vivo se lie aux billes couplées à de l'hémine tandis que la version mutée de la protéine perd cette capacité de liaison.**

Pour vérifier les résultats obtenus in vitro (Figure 5), les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ str3<sup>+</sup>-GFP* exprimant *TAP-tpx1<sup>+</sup>* ou *TAP-tpx1<sup>+</sup>* *CP1/CP2* ont été cultivées dans du YES contenant 200 μM de ALA jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de 0.5. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau pour éliminer l'excès de ALA et resuspendues dans le même volume de YES sans ALA. A ce point, les cellules ont été traitées avec 250 μM de Dip pour induire l'expression de *Str3-GFP* pendant 3 heures jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de 1.0. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon TMN150. Ensuite, 50 μg de protéine de ces extraits totaux ont été

mis en présence des billes hémine-agarose (*hemin agarose*) ou des billes d'agarose (*agarose alone*) pendant 30 minutes. Enfin, les billes ont été lavées trois fois avec du tampon TMN150 contenant 1% de Triton X-100. Les fractions protéiques totales (IN), non liées aux billes (FT) et liées aux billes (IP) ont été migrées sur un gel SDS-PAGE puis révélées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques anti-GFP (Str3), anti-IgG (Tpx1 et Tpx1 CP1/CP2 MUT) et anti-PCNA. Str3-GFP se lie aux billes hémine-agarose (IP) et n'est pas retrouvée dans la fraction non liée (FT). En revanche, elle ne se lie pas aux billes d'agarose seules, comme décrit précédemment (Normant et al., 2018). La protéine TAP-Tpx1 est également retrouvée liée aux billes hémine-agarose mais pas aux billes d'agarose (Figure 9A). En revanche, la protéine TAP-Tpx1 CP1/CP2 mutée ne se lie ni aux billes hémine-agarose ni aux billes agarose comme la protéine PCNA (Figure 9B).

Ainsi, comme pour la protéine Tpx1 produite chez *E. coli* (Figure 5), TAP-Tpx1 se lie aux billes hémine-agarose et les motifs CP1 et CP2 sont requis pour la liaison de Tpx1 à l'hémine.

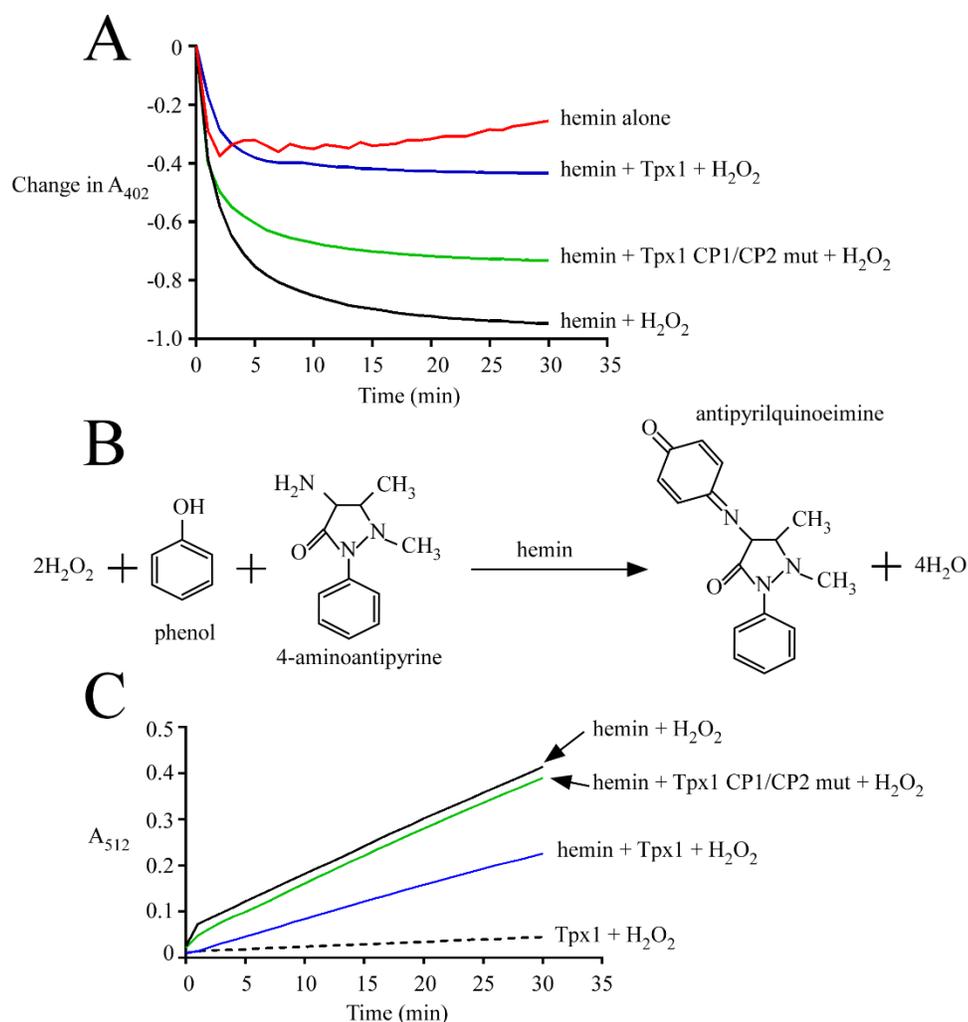


▲ **Figure 9.** Les motifs CP de *Tpx1* permettent sa liaison à l'hème. Les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant Str3-GFP et TAP-*Tpx1* (panel A) et *hem1Δ shu1Δ str3Δ tpx1Δ* exprimant Str3-GFP et TAP-*Tpx1* CP1/CP2 MUT (panel B) ont été cultivées dans du YES supplémenté en ALA (200  $\mu$ M) en microaérophilie jusqu'à une  $A_{600}$  de 0.5. Après deux lavages à l'eau, les cellules ont été resuspendues dans le même volume de YES contenant du Dip (250  $\mu$ M) sans ALA puis cultivées pendant 3 heures. Des extraits totaux de cellules (IN, input), ont été mis en présence de billes hémine-agarose pendant 30 minutes. Les fractions non liées (FT, flow through) et liées (IP) ont été migrées sur un gel SDS-PAGE puis révélées par Western blot en utilisant des anticorps anti-GFP, anti-IgG (TAP) et anti-PCNA.

### **La protéine Tpx1 protège l'hème de la dégradation par le peroxyde d'hydrogène et empêche son activité peroxydase**

La diminution d'intensité du pic de Soret (à 402 nm dans du tampon 40% DMSO HEPES 20 mM pH 7.4), permet d'évaluer la dégradation d'une quantité fixe d'hémine (Grinberg et al., 1999; Watanabe et al., 2017). Plus cette diminution est importante, plus la dégradation de l'hème est grande. Plusieurs mélanges ont été préalablement effectués dans du tampon 40% DMSO HEPES 20 mM (pH 7.4) contenant de l'hémine (5  $\mu$ M) seulement (*hemin alone*) ou auquel ont été ajoutés la protéine 6His-*Tpx1* (2.5  $\mu$ M) (*hemin + Tpx1*) ou la protéine 6His-*Tpx1* CP1/CP2 mutante (2.5  $\mu$ M) (*hemin + Tpx1 CP1/CP2 mut*). Ces différents mélanges ont été incubés 5 minutes sur glace pour permettre la liaison de 6His-*Tpx1* à l'hémine, puis mis en présence de 30  $\mu$ M de  $H_2O_2$ . A ce point, les intensités d'absorbance à 402 nm ont été mesurées toutes les minutes pendant 30 minutes. Les différences d'intensités (*Change in A<sub>402</sub>*) par rapport au temps 0 ont été reportées sur un graphique en fonction du temps (Figure 10A). Lorsque l'hémine est seule (*hemin alone*), on observe une diminution rapide (environ 0.4 unité d'absorbance après 2 minutes) de la valeur du pic de Soret puis une stabilisation jusqu'à 30 minutes. En revanche, en présence de  $H_2O_2$  (*hemin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*), cette diminution d'intensité à 402 nm est fortement augmentée (diminution d'environ 1.0 unité d'absorbance après 30 minutes). Lorsque 6His-*Tpx1* est présent en plus de l'hémine et le  $H_2O_2$ , on observe une diminution de 0.4 unités d'absorbance à 402 nm après 30 minutes en présence de  $H_2O_2$  alors que, lorsque 6His-*Tpx1* CP1/CP2 MUT est présent, la diminution d'absorbance est de 0.7 unités d'absorbance. Ainsi, les résultats suggèrent fortement que la présence de 6His-*Tpx1* protège l'hème contre la dégradation par le peroxyde d'hydrogène. En revanche, la présence de 6His-*Tpx1* CP1/CP2 mutant ne confère pas le

même niveau de protection à l'hème (Figure 10A). L'hème libre peut avoir une activité peroxydase délétère pour les cellules. Cette activité est mesurable par la formation de l'antipyrilquinoneimine (composé rouge absorbant à une longueur d'onde de 512 nm). Ainsi, en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de phénol (donneur d'électron) et de 4-aminoantipyrine (substrat réduit par l'activité peroxydase de l'hème en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la formation de antipyrilquinoneimine est suivie par lecture de l'absorbance à 512 nm qui varie de façon proportionnelle à l'activité peroxydase intrinsèque de l'hème (Figure 10B) (Grinberg et al., 1999; Watanabe et al., 2017). En présence d'hème et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on observe une augmentation de l'absorbance à 512 nm (jusqu'à 0.4 d'unité d'absorbance après 30 minutes). Cette augmentation d'absorbance est également observable en présence de la protéine 6His-Tpx1 CP1/CP2 MUT (environ 0.4 unité d'absorbance à 30 minutes). Ainsi, dans ces deux conditions, l'hémine a la même activité peroxydase. En revanche, en présence de 6His-Tpx1, l'augmentation de l'absorbance à 512 nm est diminuée par un facteur de deux (0.2 unité d'absorbance après 30 minutes), indiquant que Tpx1 sauvage prévient une partie de l'activité peroxydase de l'hème libre. En absence d'hémine mais en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de 6His-Tpx1, aucune formation de antipyrilquinoneimine n'est observée suggérant qu'il n'y a aucune activité peroxydase dans cette condition. En conclusion, la formation de l'antipyrilquinoneimine est dépendante de la présence d'hémine et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la présence de Tpx1 prévient en partie cette formation qui proviendrait de l'activité peroxydase de l'hème (Figure 10C).

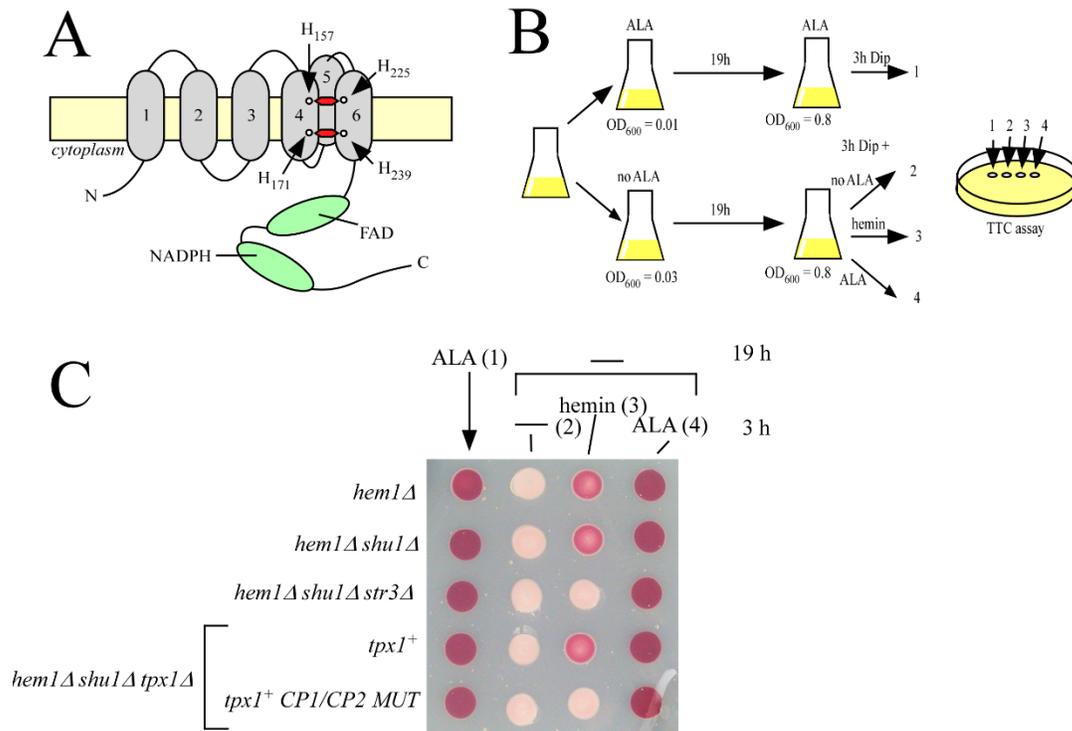


▲ **Figure 10.** La protéine *Tpx1* par sa liaison à la molécule d'hème protège cette dernière de la dégradation par le  $H_2O_2$  et empêche son activité peroxydase. A. Le changement de l'absorbance du pic de Soret à 402 nm ( $A_{402}$ ) a été suivi toutes les minutes pendant 30 minutes en présence d'hème (5  $\mu M$ ) (*hemin alone*), d'hème et de  $H_2O_2$  (30  $\mu M$ ) (*hemin + H\_2O\_2*) d'hème, de  $H_2O_2$  et de *Tpx1* (2.5  $\mu M$ ) (*hemin + Tpx1 + H\_2O\_2*), d'hème, de  $H_2O_2$  et de *Tpx1* CP1/CP2 MUT (2.5  $\mu M$ ) (*hemin + Tpx1 CP1/CP2 MUT + H\_2O\_2*). B. Le  $H_2O_2$ , le phénol et le 4-aminoantipyrine sont transformés en antipyrilquinoneimine et  $H_2O$  en présence d'hème (*hemin*). C. La formation de l'antipyrilquinoneimine (rouge) a été suivie par la mesure de l'absorbance à 512 nm toutes les minutes pendant 30 minutes en présence d'hème (5  $\mu M$ ) et de  $H_2O_2$  (360  $\mu M$ ) (*hemin + H\_2O\_2*) d'hème, de  $H_2O_2$  et de *Tpx1* (2.5  $\mu M$ ) (*hemin + Tpx1 + H\_2O\_2*), d'hème, de  $H_2O_2$  et de *Tpx1* CP1/CP2 MUT (2.5  $\mu M$ ) (*hemin + Tpx1 CP1/CP2 MUT + H\_2O\_2*) ou de *Tpx1* et de  $H_2O_2$  (*Tpx1 + H\_2O\_2*).

## L'absence de Str3 ou la mutation de Tpx1 affecte l'activité ferriréductase de Frp1

Le gène *frp1*<sup>+</sup> code pour la protéine Frp1 prédite pour être une ferriréductase de surface par homologie avec la protéine Fre1 de *S. cerevisiae*. Fre1 est une protéine à domaines transmembranaires. Elle partage une forte homologie avec la protéine gp91<sup>phox</sup> exprimée à la surface cellulaire et à la membrane des phagosomes des cellules phagocytaires humaines (Dancis et al., 1992; Roman et al., 1993). Les protéines Fre1 et gp91<sup>phox</sup> possèdent quatre histidines (His<sup>294</sup>, His<sup>308</sup>, His<sup>364</sup> et His<sup>378</sup> pour Fre1 et His<sup>101</sup>, His<sup>115</sup>, His<sup>208</sup> et His<sup>221</sup> pour gp91<sup>phox</sup>) capable de coordonner deux molécules d'hème. Ces histidines sont conservées chez *S. pombe* et correspondent aux histidines 157, 171, 225 et 239 (Finegold et al., 1996). La protéine gp91<sup>phox</sup> forme avec la protéine p22<sup>phox</sup> le flavocytochrome b558. Les protéines gp91<sup>phox</sup> et Fre1 possèdent des domaines FAD et NADPH qui permettent la transition d'électrons dans le cytoplasme vers les deux molécules d'hème, qui sont ensuite relargués dans le phagosome (gp91<sup>phox</sup>) ou dans le milieu extracellulaire (Fre1) (Wientjes and Segal, 1995). Par homologie, Frp1 possèdent un domaine FAD et un domaine NADPH (Figure 11A). L'activité de la ferriréductase est mesurable en suivant la transformation du TTC incolore en un précipité de couleur rouge de formazan (Knight and Dancis, 2006). Les cellules ont été cultivées dans du YES contenant 200 µM de ALA jusqu'à une *A*<sub>600</sub> de 1.0. Ensuite, elles ont été lavées deux fois avec de l'eau, puis resuspendues dans du YES ne contenant pas de ALA ou contenant 200 µM de ALA à une *A*<sub>600</sub> de 0.01 (ALA) ou de 0.03 (no ALA). Les différentes souches ont été cultivées dans ces milieux pendant 19 heures (*A*<sub>600</sub> de ~0.8). À ce stade, les cellules ont été traitées avec 250 µM de Dip pour induire l'expression de Frp1, avec 200 µM de ALA (Figure 11C, colonne 4), 0.5 µM d'hémine (colonne 3) ou sans ALA et sans hémine (-) (colonne 2) pendant 3 heures. Dans le cas des cellules traitées avec du ALA (colonne 1), elles ont été laissées dans le même milieu et traitées avec 250 µM de Dip (19 heures auparavant). Après trois heures de traitement, les cellules ont été culotées par centrifugation puis déposées sur une gélose YES. Après quelques minutes, elles ont été recouverte par un agar-phosphate de sodium pH 7.4 et 0.1% de TTC. Les photos ont été prise une heure après le début de la réaction (Figure 11B). Toutes les souches traitées tout au long de la manipulation (colonne 1) ou pendant 3 heures avec le ALA (colonne 4) présentent une coloration rouge intense due à une forte activité de Frp1. En

revanche, l'absence de ALA et du gène *hemI*<sup>+</sup> (*hemIΔ*) entraîne une non coloration du dépôt de cellule. Ainsi, en absence de biosynthèse endogène d'hème et de précurseur ALA, l'activité ferriréductase de Frp1 est abolie (colonne 2). Si de l'hémine exogène (colonne 3) est ajoutée pendant 3 heures à la souche *hemIΔ*, on observe une apparition de la coloration rouge du dépôt de cellules. Ce dernier est moins intense qu'en présence de ALA (colonne 4), mais suggère qu'un transporteur d'hémine permet de fournir de l'hémine nécessaire à l'activité de Frp1. Pour valider l'effet de Shu1 et/ou de Str3, les souches *hemIΔ shu1Δ* et *hemIΔ shu1Δ str3Δ* ont été utilisées. Dans le cas où *shu1*<sup>+</sup> est délété (*hemIΔ shu1Δ*), la coloration du dépôt de cellules est similaire à celui de la souche *hemIΔ* en présence d'hémine. Ainsi, l'implication de Shu1 dans l'apport d'hémine exogène à Frp1 n'apparaît pas conférer une coloration rouge plus prononcée. En revanche, on observe une perte de coloration pour la souche *hemIΔ shu1Δ str3Δ* en présence d'hémine montrant ainsi l'implication de Str3 dans l'apport d'hémine exogène, nécessaire pour l'activité de la ferriréductase Frp1 et à la coloration rouge. Pour vérifier la contribution de Tpx1 par rapport à l'activité de Frp1, deux souches ont été créées, une souche *hemIΔ shu1Δ tpx1Δ* exprimant Tpx1 et une souche *hemIΔ shu1Δ tpx1Δ* exprimant Tpx1 CP1/CP2 Mut. Ainsi, en présence de Tpx1 et d'hémine, la couleur du dépôt est rouge comme la souche *hemIΔ shu1Δ*. En revanche, en présence de Tpx1 CP1/CP2 MUT et d'hémine, le dépôt de cellules reste blanc comme pour la souche *hemIΔ shu1Δ str3Δ*, suggérant que les deux protéines Str3 et Tpx1 doivent être présentes et fonctionnelles pour que Frp1 soit active en présence d'hème exogène. Ces résultats montrent que la voie endogène de synthèse de l'hème est plus efficace que l'acquisition exogène pour nourrir la ferriréductase en hème. En outre, dans les conditions expérimentales, la voie Str3-Tpx1 est impliquée pour importer de l'hème exogène qui est nécessaire au fonctionnement de la ferriréductase Frp1. La protéine Shu1 ne semble pas impliquée au niveau de l'apport d'hème exogène à la protéine Frp1 ou à son sentier d'acquisition d'hème (Figure 11C).



▲ **Figure 11.** La voie *Str3-Tpx1* permet de nourrir la ferriréductase *Frp1* en hémine acquise par la voie exogène. A. Représentation topologique de la protéine *Frp1*. La protéine *Frp1* possède six domaines transmembranaires prédits. De plus, la portion amino-terminale de la protéine est localisée dans le cytoplasme. Des domaines FAD et NADPH se trouve dans la portion C-terminale de la protéine située dans le cytoplasme. La protéine *Frp1* possède quatre histidines conservées et qui sont retrouvées chez des protéines *FRE1* (*S. cerevisiae*) et *gp91<sup>phox</sup>* (*H. sapiens*) qui coordonnent deux molécules d'hèmes. Ces histidines sont représentées dans les domaines transmembranaires quatre et six par des ronds blancs et correspondent aux histidines 157, 171, 225 et 239. B. Les différentes souches indiquées au panel C, ont été cultivées dans du YES contenant 200  $\mu$ M de ALA jusqu'à une  $A_{600}$  de 1.0. Ensuite, après deux lavages à l'eau, les cellules ont été resuspendues dans du YES contenant 200  $\mu$ M de ALA ( $A_{600}$  de 0.01) ou dans du YES sans ALA ( $A_{600}$  de 0.03) et cultivées 19 heures. Les cellules cultivées avec ALA ont été traitées avec 250  $\mu$ M de Dip pendant 3 heures (colonne 1), les cellules cultivées sans ALA ont été traitées avec 250  $\mu$ M de Dip puis séparées en trois ; un premier groupe n'a pas reçu de ALA (colonne 2), un second groupe a été traité avec 0.5  $\mu$ M d'hémine (colonne 3) et un groupe a été traité avec 200  $\mu$ M de ALA (colonne 4) pendant 3 heures. Les cultures ont été centrifugées puis déposées sur une plaque YES. Les dépôts ont été recouverts par un agar contenant 0.01% de TTC. C. Après une heure de réaction une photo des dépôts de cellules recouvertes de TTC a été prise.

## Discussion

Nous avons précédemment montré que l'internalisation de l'hème par le sentier Shu1-dépendant transite d'abord par la vacuole (à 10 minutes), puis est subséquemment relargué dans le cytoplasme (Mourer et al., 2017). Ici, nous avons démontré, qu'en présence de Str3 et en absence des gènes *hem1<sup>+</sup>* et *shu1<sup>+</sup>* (*hem1Δ shu1Δ str3<sup>+</sup>*) et de 10 μM de ZnMP, cette dernière est rapidement (après 10 minutes de traitement) détectable dans le cytoplasme (Figure 1). Ainsi, la voie d'assimilation de l'hème dépendante de Str3, et donc indépendante de Shu1, ne semble pas entrer dans la cellule par les vacuoles mais entre directement dans le cytoplasme. Les deux voies d'acquisition de l'hème Shu1 et Str3 dépendantes sont dissociables. De plus, une souche *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* est capable de croître en présence de 0.15 μM, ainsi la protéine vacuolaire Abc3 n'affecte pas le transport de l'hème via Str3. Nous avons ensuite vérifié la localisation de Str3 en présence de différentes concentrations d'hémine. Le transporteur de ferrichrome Arn1 chez *S. cerevisiae* a été décrit comme possédant une localisation différentielle en fonction de la présence et de l'abondance de son ligand (Kim et al., 2002). Ainsi, en présence de ferrichrome, la protéine Arn1 est localisée à la surface cellulaire tandis qu'en absence de ferrichrome cette dernière est séquestrée au niveau des vacuoles. De plus, la protéine transite en présence de son ligand vers des compartiments intracellulaires de nature vésiculaire (Kim et al., 2002). La protéine Shu1, quant à elle, est relocalisée rapidement à la vacuole (après 10 minutes) en présence d'hème (Mourer et al., 2017). L'objectif serait d'entreposer l'hème dans la vacuole et de l'amener au cytoplasme selon les besoins de la cellule. Dans le cas de la protéine Str3, elle reste localisée à la surface cellulaire après 30 minutes de traitement en présence de différentes concentrations en hémine. Étant donné sa nature potentiellement cytotoxique, l'hème libre n'est pas prédite pour être retrouvée dans les cellules à l'état non associé à des hémoprotéines (Dutra and Bozza, 2014). Ainsi, nous avons cherché des protéines capables de prendre en charge l'hème relarguée dans le cytoplasme par Str3. Nous avons donc construit un allèle fonctionnel de *str3<sup>+</sup>* fusionné en phase avec la séquence codante de la biotine ligase de *A. aeolicus* (Kim et al., 2016). Grâce à la biotinylation de partenaires potentiels de Str3 en présence de Dip et d'hémine (Figure 3) nous avons pu mettre en évidence la protéine Tpx1. La protéine Tpx1 de *S. pombe* a été principalement décrite pour sa fonction dans la réponse

au stress oxydatif. Elle appartient à la famille des peroxyrédoxines. Cette dernière est très abondante dans la cellule (Gunaratne et al., 2013), ce qui pourrait permettre à Tpx1 de supporter plusieurs fonctions cellulaires. La protéine Tpx1 possède un fort degré de conservation avec les protéines HBP23 de rat et PRX1 humaine (Figure 4A). La protéine HBP23 isolée à partir de foie de rat, a été mise en évidence pour sa liaison à des billes d'agarose couplées à de l'hème (Iwahara et al., 1995). Plus récemment, *Watanabe et al.* ont montré que la protéine PRX1 se lie à l'hème in vitro (Watanabe et al., 2017). Les deux cystéines (péroxydatique et de résolution) des motifs CP correspondant aux deux sites actifs des protéines sont conservées. De plus, ces deux cystéines sont suivies toutes deux par un acide aminé proline, ce qui constitue un motif CP pouvant potentiellement lier de l'hème. En effet, des exemples dans la littérature révèlent que des protéines possédant ce type de motif lient de l'hème comme FeoB (*E. coli*), IRP2 et DP8 (*H. sapiens*) (Schubert et al., 2015). Chez *S. pombe*, la protéine Abc3 possède un motif CP inversé (PC) responsable de sa capacité de lier l'hème (Mourer et al., 2017). Un motif CP inversé est également retrouvé dans une boucle extracellulaire de l'exportateur d'hème humain ABCG2. La présence de ce motif est requis pour la liaison de ABCG2 à l'hème (Desuzinges-Mandon et al., 2010). Néanmoins, aucune donnée n'a démontré l'importance des deux motifs CP de HBP23 dans sa liaison à l'hème. En ce qui concerne PRX1, une étude a montré l'importance de la Cys<sup>52</sup> (incluse dans le premier motif CP de la protéine) dans la liaison à l'hème (Watanabe et al., 2017). Le gène *tpx1*<sup>+</sup> n'est pas affectée par la présence de fer ou la carence en fer contrairement à *str3*<sup>+</sup>, qui est induit en carence de fer (Figure 4B). La protéine Tpx1 a été précédemment localisée en présence ou en absence de 0.2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans ces deux conditions, la protéine est majoritairement détectable dans le cytoplasme (Calvo et al., 2013). Néanmoins, en présence de Str3 (Dip) et d'hémine, une fraction de la protéine Tpx1 s'accroche à la membrane plasmique telle que révélé par le fractionnement biochimique (Figure 5). Chez l'homme, la chaperonne de fer PCBP2 est également enrichie aux membranes. Elle est dissociée de la fraction membranaire par le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. C'est le cas également pour Tpx1 (Figure 5D). De plus, PCBP2 se lie plus fortement au transporteur de surface DMT1 en présence de fer (Yanatori et al., 2014), comme Tpx1 et Str3 en présence d'hème.

Les motifs CP1 et CP2 sont impliqués dans la liaison de deux molécules d'hème (stœchiométrie 1 :2 Tpx1 : hème). Chaque motif CP est impliqué dans une liaison à une

molécule d'hème (Figure 5 et 9). La cystéine 48 du motif CP1 correspond à la cystéine dite peroxydatique et la cystéine 169 à la cystéine dite de résolution. Ces deux cystéines sont importantes pour la réponse au stress induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jara et al., 2008). Ainsi, la mutation des motifs CP1 et CP2, entraîne un défaut dans l'induction de l'expression du gène codant pour la catalase *ctl1*<sup>+</sup>, en présence d'un stress modéré induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 mM) (Figure 8D et 8E). La protéine Tpx1 a une grande affinité pour l'hème avec une constante de dissociation (*K<sub>D</sub>*) égale à 0.26 μM, ce qui est inférieur au *K<sub>D</sub>* calculé pour Shu1 (2.2 μM) et à la boucle extracellulaire de Str3 (6.6 μM). Ainsi, l'hème lié à Str3 aurait plus d'affinité pour Tpx1 et pourrait ainsi transiter vers cette dernière. La constante de dissociation de Tpx1 pour l'hème reste cependant inférieure à celle des hémoprotéines comme les globines, les cytochromes et les catalases qui ont une affinité pour l'hème de l'ordre du 10<sup>-12</sup> à 10<sup>-15</sup> M (Sassa, 2004). On peut donc imaginer que Tpx1 peut redonner l'hème qu'elle lie à des hémoprotéines ayant une affinité plus forte. Tpx1 se lie à Str3 en présence de Dip, mais est plus abondamment liée à cette dernière en présence de Dip et d'hémine (Figure 4C). La capacité de liaison de Tpx1 à l'hème semble également affecter sa liaison à Str3, la mutation des deux domaines CP entraîne une diminution très significative de la liaison à Str3 (Figure 4D). La mutation au niveau des deux motifs CP ou la délétion du gène *tpx1*<sup>+</sup> (*tpx1Δ*) entraîne une diminution de la capacité de croissance en absence de *hem1*<sup>+</sup> et de *shu1*<sup>+</sup> (*hem1Δ shu1Δ*) en présence de 0.15 μM d'hémine et de Str3 en conditions microaérophiliques. Cette réduction de croissance est similaire à celle observée dans une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* dans des conditions microaérophiliques (Normant et al., 2018) (Figure 7). Les deux protéines Str3 et Tpx1 semblent impliquées dans une voie commune pour maintenir la viabilité cellulaire (en absence de biosynthèse d'hème endogène et en présence de 0.15 μM d'hémine) et certainement pour nourrir certaines hémoprotéines en hème. La protéine PRX1 humaine inhibe la dégradation de l'hème et bloque son activité peroxydase in vitro en présence de peroxyde d'hydrogène (Watanabe et al., 2017). Dans cette étude, nous avons montré que Tpx1 a la capacité d'inhiber la dégradation de l'hème en présence de peroxyde d'hydrogène et inhibe l'activité peroxydase de l'hème. Cette protection n'est possible que si les deux motifs CP sont conservés. Ainsi, lorsque les deux Cys<sup>48</sup> et Cys<sup>169</sup> et les deux Pro<sup>49</sup> et Pro<sup>170</sup> sont mutées en Ala, la dégradation de l'hémine et son activité peroxydase sont observées (Figure 10A et 10C). La combinaison d'un excès d'hème et de peroxyde d'hydrogène est

délétère pour la cellule. Ainsi, en présence de 10  $\mu$ M d'hémine, dose suffisante pour la croissance d'une souche *hem1 $\Delta$* , et de 0.2 mM (ou 1 mM) de peroxyde d'hydrogène, la croissance des cellules est affectée (observations non montrées). Il n'est pas possible à ce stade de définir si l'effet est totalement ou partiellement lié à Tpx1, des essais sur des gènes rapporteurs lié à la cascade d'activation via Tpx1 devront être réalisés (e.g *ctt1<sup>+</sup>*, *trr1<sup>+</sup>* *caf5<sup>+</sup>*) (Paulo et al., 2014; Veal et al., 2004). Au moins deux hypothèses peuvent être formulées. 1. La majorité de la population de la protéine Tpx1 prend en charge tout l'hème dans la cellule et n'est plus capable de répondre au stress oxydant. 2. La réponse au stress oxydatif monopolise tout le pool protéique de Tpx1, qui ne peut alors plus prendre en charge l'hème libre. La molécule d'hème libre peut alors réagir avec le peroxyde d'hydrogène et être dégradée. Ainsi elle n'est donc plus utilisable par les hémoprotéines cellulaires. Dans ces conditions, l'hème libre pourrait induire l'oxydation protéique et lipidique également toxique pour la cellule.

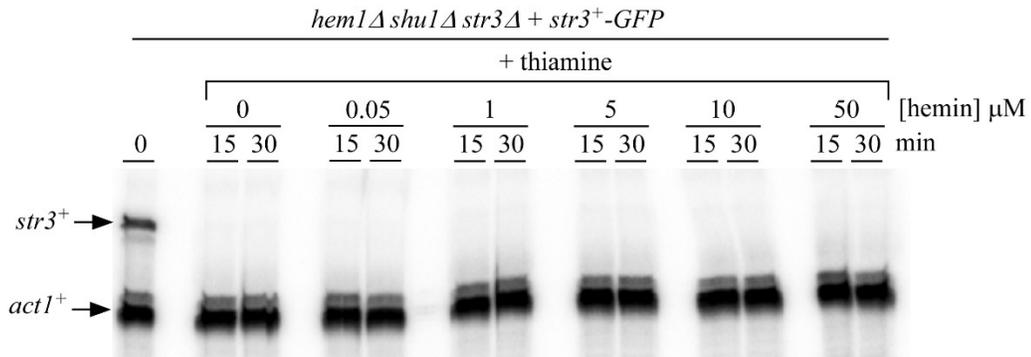
Les protéines Fre1 de *S. cerevisiae* et gp91<sup>phox</sup> humaine ont besoin de deux molécules d'hème pour fonctionner. La protéine Frp1 de *S. pombe* est homologue à ces deux protéines. De plus, elle a une activité ferriréductase comme la protéine Fre1. Par homologie avec Fre1, quatre histidines sont importantes dans la séquence de Frp1 pour coordonner deux molécules d'hème. Les His<sup>157</sup> et His<sup>225</sup> lieraient une molécule d'hème et les His<sup>171</sup> et His<sup>239</sup> lieraient la deuxième molécule d'hème. Ces histidines sont présentes dans les domaines transmembranaires quatre et six. La protéine Frp1 posséderait six domaines transmembranaires situés au début de la protéine, suivit d'un domaine FAD et d'un domaine NADPH cytoplasmique permettant un transfert électronique du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, via les deux molécules d'hème. Ce transfert électronique est nécessaire pour la réduction des ions métalliques divalents (e. g. le fer et le cuivre sous forme Fe<sup>3+</sup> et Cu<sup>2+</sup> réduit en Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup>) avant leur import cellulaire (Figure 11A). Dans cette étude, nous avons mesuré l'activité de Frp1 via un essai TTC. En présence de ALA dans une souche *hem1 $\Delta$*  traitée en Dip, on observe une forte activité ferriréductase. En revanche, en carence de ALA (~ 19 heures) l'activité ferriréductase de Frp1 est abolie. L'ajout d'hémine permet de restaurer partiellement cette activité. Cette dernière totalement restaurée par ajout de ALA (pendant 3 heures). En absence de *shu1<sup>+</sup>* et *str3<sup>+</sup>* dans une souche *hem1 $\Delta$*  (*hem1 $\Delta$*  *shu1 $\Delta$*

*str3Δ*), l'activité ferriréductase n'est observable qu'en présence de ALA mais pas en présence d'hème. Ainsi, dans ces conditions, seule la voie de biosynthèse endogène est capable de nourrir en hème la ferriréductase. L'apport exogène d'hème semble déficient dans cette condition. L'absence de *shu1*<sup>+</sup> dans une souche *hem1Δ* n'affecte pas l'activité ferriréductase de Frp1, suggérant que Shu1 n'est pas impliquée dans cette voie. En revanche, dans une condition où Tpx1 est mutée au niveau des deux motifs CP et n'est donc plus capable de lier de l'hème dans une souche *hem1Δshu1Δtpx1Δ*, aucune activité ferriréductase n'est observée. Le même résultat est observé lorsque *str3*<sup>+</sup> est délété dans une souche *hem1Δshu1Δ* (*hem1Δshu1Δstr3Δ*). En comparaison, lorsque *tpx1*<sup>+</sup> est sauvage dans la même souche *hem1Δshu1Δtpx1Δ*, l'activité ferriréductase est similaire à celle des souches *hem1Δ* et *hem1Δshu1Δ* en présence d'hème. Ainsi, les protéines Str3 et Tpx1 semblent avoir un rôle dans l'activité de Frp1 lorsque la seule source d'hème est exogène.

Les protéines transmembranaires sont acheminées à la membrane plasmique via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ainsi la protéine Fet3 chez la levure *S. cerevisiae*, oxido-réductase cuivre dépendante, est chargée en cuivre dans le réticulum endoplasmique via la protéine Ccc2 (Yuan et al., 1995, 1997). Il est possible que Frp1 acquiert son cofacteur au cours de la maturation dans le réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi. Ainsi, il pourrait exister un transporteur d'hème responsable de l'efflux d'hème dans le réticulum endoplasmique à partir du cytoplasme. Nous n'avons pas été capable de montrer une interaction entre Tpx1 et Frp1 dans nos conditions expérimentales (observations non montrées).

Tpx1 est également capable d'activer le facteur de transcription Pap1 en présence d'un stress oxydant agissant ainsi comme senseur du stress oxydatif. On peut imaginer que Tpx1 a la même fonction en présence ou en absence d'hème. Ainsi, Tpx1 pourrait activer des voies de signalisation cellulaire en absence d'hème qui abaisserait le niveau de transcription de *frp1*<sup>+</sup>, ce qui diminuerait également l'activité ferriréductase ayant moins de protéines à la surface cellulaire. En ce qui concerne le gène *FRE1*, une diminution de son expression est observable dans une souche délétée pour le gène *HEM1* (*hem1Δ*) en condition basale (Amillet et al., 1996). Cependant, dans cette étude aucun appauvrissement en ALA a été fait dans le milieu de culture.

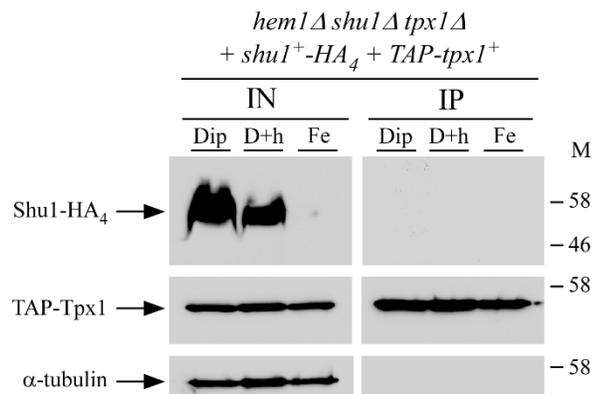
En conclusion, nous avons montré que l'import d'hème dépendant de Str3 et Tpx1 passe directement dans le cytoplasme contrairement à ce qui est observé dans le cas de Shu1 et Abc3. La fonctionnalité de la ferriréductase Frp1, est dépendante de la présence d'hème dans la cellule (synthétisée de manière endogène ou acquise de façon exogène). Ainsi, la présence de Str3 et de Tpx1 est nécessaire pour le fonctionnement de Frp1 en présence d'hème exogène seulement.



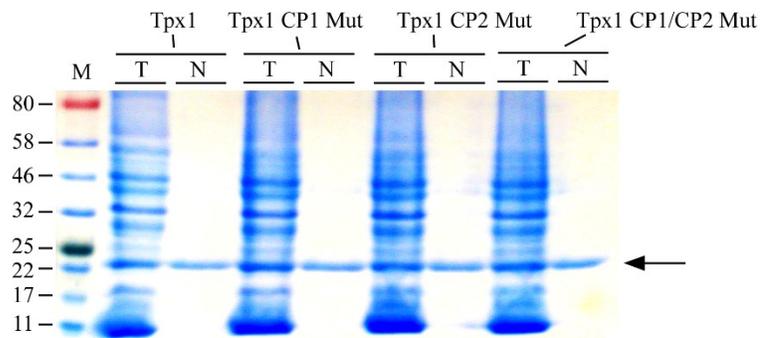
▲ **Figure S1.** Vérification de la répression du promoteur inductible *nmt1<sup>+</sup>* (*41X*) lors de la production du « pool » protéique de *Str3-GFP*. Une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprimant *str3<sup>+</sup>-GFP* sous contrôle du promoteur inductible *nmt1<sup>+</sup>* (*41X*) a été traitée avec du Dip (250 μM) pendant 3 heures après dérepression du promoteur *nmt1<sup>+</sup>* pendant 17 heures. Par la suite, les cellules ont été traitées avec différentes concentration en hémine (0, 0.05, 1, 5, 10 et 50 μM) et de la thiamine (5 μM) pour réprimer transcriptionnellement l'expression de *str3<sup>+</sup>-GFP*. Les ARN totaux ont été extraits à 0, 15 et 30 minutes après la répression transcriptionnelle par la thiamine. L'expression de *str3<sup>+</sup>-GFP* a été mesurée par protection à la RNase aux temps indiqués. L'expression de l'*act1<sup>+</sup>* a été utilisée comme contrôle interne.



▲ **Figure S2.** Alignement des protéines *Tpx1* (*S. pombe*), *HBP23* (*R. norvegicus*) et *PRX1* (*H. sapiens*). L'alignement de séquences a été réalisé avec le programme Clustal-Omega (Sievers and Higgins, 2014) puis traité avec le programme ESPrict 3.0 (Robert and Gouet, 2014). Les flèches bleues représentent les deux motifs CP.



▲ **Figure S3.** *Tpx1* et *Shu1* n'interagissent pas ensemble. Une souche *hem1Δ shu1Δ tpx1Δ* exprimant *Shu1-HA<sub>4</sub>* et *TAP-Tpx1* a été cultivée dans du YES contenant 200 μM de ALA en anaérobie jusqu'à une *A<sub>600</sub>* de 0.5. Après deux lavages à l'eau, les cellules ont été resuspendues dans du YES contenant du Dip (250 μM), du Dip (250 μM) et de l'hémine (10 μM) ou du fer (FeCl<sub>3</sub>, 100 μM). Après trois heures de traitement, les cellules ont été lysées puis une immunoprécipitation anti-IgG (TAP) a été réalisée. Les protéines ont été migrées sur un gel SDS-PAGE puis révélées par Western blot en utilisant des anticorps anti-HA (*Shu1*), anti-IgG (TAP) et anti-α-tubuline.



▲ **Figure S4.** Purification de 6His-Tpx1, 6His-Tpx1 CP1 MUT, 6His-Tpx1 CP2 MUT et 6His-Tpx1 CP1/CP2 MUT. Les extraits cellulaires solubles ont été incubés en présence des billes de Nickel nitrilotriacetic-agarose pendant deux heures. Les protéines ont ensuite été éluées dans du tampon B contenant 50 mM de Tris HCl pH 8.0, 300 mM de NaCl, 10% de glycérol et différentes concentrations d'imidazole (100, 500 en 1000 mM). Enfin, les échantillons ont été dialysés pour se débarrasser de l'imidazole puis migrés sur gel SDS-PAGE. T = extrait total, N = extrait élué de la colonne Ni-NTA puis dialysé. Les protéines His6-Tpx1 sont indiquées par la flèche.

## Références

- Amillet, J.M., Galiazzo, F., and Labbe-Bois, R. (1996). Effect of heme and vacuole deficiency on FRE1 gene expression and ferrireductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 137, 25–29.
- Calvo, I.A., Boronat, S., Domènech, A., García-Santamarina, S., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2013). Dissection of a redox relay: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent activation of the transcription factor Pap1 through the peroxidatic Tpx1-thioredoxin cycle. *Cell Rep* 5, 1413–1424.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bähler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* 14, 214–229.
- Dancis, A., Roman, D.G., Anderson, G.J., Hinnebusch, A.G., and Klausner, R.D. (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3869–3873.
- Desuzinges-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huché, F., Di Pietro, A., and Falson, P. (2010). ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J. Biol. Chem.* 285, 33123–33133.
- Dutra, F.F., and Bozza, M.T. (2014). Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* 5, 115.

- Finegold, A.A., Shatwell, K.P., Segal, A.W., Klausner, R.D., and Dancis, A. (1996). Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* *271*, 31021–31024.
- Grinberg, L.N., O'Brien, P.J., and Hrkal, Z. (1999). The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalytic activities of hemin. *Free Radic. Biol. Med.* *27*, 214–219.
- Gunaratne, J., Schmidt, A., Quandt, A., Neo, S.P., Saraç, O.S., Gracia, T., Loguercio, S., Ahrné, E., Xia, R.L.H., Tan, K.H., et al. (2013). Extensive mass spectrometry-based analysis of the fission yeast proteome: the *Schizosaccharomyces pombe* PeptideAtlas. *Mol. Cell Proteomics* *12*, 1741–1751.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* *77*, 51–59.
- Hwang, J., and Espenshade, P.J. (2016). Proximity-dependent biotin labeling in yeast using the engineered ascorbate peroxidase APEX2. *Biochem J* *473*, 2463–2469.
- Ioannoni, R., Brault, A., and Labbé, S. (2016). Cuf2 is a transcriptional co-regulator that interacts with Mei4 for timely expression of middle-phase meiotic genes. *PLoS ONE* *11*, e0151914.
- Iwahara, S., Satoh, H., Song, D.X., Webb, J., Burlingame, A.L., Nagae, Y., and Muller-Eberhard, U. (1995). Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol. *Biochemistry* *34*, 13398–13406.
- Jara, M., Vivancos, A.P., Calvo, I.A., Moldón, A., Sansó, M., and Hidalgo, E. (2007). The peroxiredoxin Tpx1 is essential as a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger during aerobic growth in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* *18*, 2288–2295.
- Jara, M., Vivancos, A.P., and Hidalgo, E. (2008). C-terminal truncation of the peroxiredoxin Tpx1 decreases its sensitivity for hydrogen peroxide without compromising its role in signal transduction. *Genes Cells* *13*, 171–179.
- Kim, D.I., Jensen, S.C., Noble, K.A., KC, B., Roux, K.H., Motamedchaboki, K., and Roux, K.J. (2016). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol Biol Cell* *27*, 1188–1196.
- Kim, Y., Yun, C.-W., and Philpott, C.C. (2002). Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *21*, 3632–3642.
- Knight, S.A.B., and Dancis, A. (2006). Reduction of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) is dependent on CaFRE10 ferric reductase for *Candida albicans* grown in unbuffered media. *Microbiology (Reading, Engl.)* *152*, 2301–2308.

- Mercier, A., Pelletier, B., and Labbé, S. (2006). A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* 5, 1866–1881.
- Mercier, A., Watt, S., Bähler, J., and Labbé, S. (2008). Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryotic Cell* 7, 493–508.
- Mourer, T., Normant, V., and Labbé, S. (2017). Heme assimilation in *Schizosaccharomyces pombe* requires cell-surface-anchored protein Shu1 and vacuolar transporter Abc3. *J. Biol. Chem.* 292, 4898–4912.
- Normant, V., Mourer, T., and Labbé, S. (2018). The major facilitator transporter Str3 is required for low-affinity heme acquisition in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 293, 6349–6362.
- Paulo, E., García-Santamarina, S., Calvo, I.A., Carmona, M., Boronat, S., Domènech, A., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2014). A genetic approach to study H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in fission yeast--distinct roles of peroxiredoxin and catalase. *Mol. Microbiol.* 92, 246–257.
- Pelletier, B., Beaudoin, J., Mukai, Y., and Labbé, S. (2002). Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 277, 22950–22958.
- Pelletier, B., Beaudoin, J., Philpott, C.C., and Labbé, S. (2003). Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. *Nucleic Acids Res.* 31, 4332–4344.
- Robert, X., and Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42, W320–W324.
- Roman, D.G., Dancis, A., Anderson, G.J., and Klausner, R.D. (1993). The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4342–4350.
- Sassa, S. (2004). Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IX $\alpha$ , and carbon monoxide? *Antioxid. Redox Signal.* 6, 819–824.
- Schubert, E., Florin, N., Duthie, F., Henning Brewitz, H., Köhl, T., Imhof, D., Hagelueken, G., and Schiemann, O. (2015). Spectroscopic studies on peptides and proteins with cysteine-containing heme regulatory motifs (HRM). *J. Inorg. Biochem.* 148, 49–56.
- Sievers, F., and Higgins, D.G. (2014). Clustal omega. *Curr Protoc Bioinformatics* 48, 3.13.1-16.
- Veal, E.A., Findlay, V.J., Day, A.M., Bozonet, S.M., Evans, J.M., Quinn, J., and Morgan, B.A. (2004). A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol. Cell* 15, 129–139.

- Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Biteau, B., Nicot, C., Ayté, J., Toledano, M.B., and Hidalgo, E. (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 8875–8880.
- Watanabe, Y., Ishimori, K., and Uchida, T. (2017). Dual role of the active-center cysteine in human peroxiredoxin 1: Peroxidase activity and heme binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *483*, 930–935.
- Wientjes, F.B., and Segal, A.W. (1995). NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin. Cell Biol.* *6*, 357–365.
- Yanatori, I., Yasui, Y., Tabuchi, M., and Kishi, F. (2014). Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochem. J.* *462*, 25–37.
- Yuan, D.S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., and Klausner, R.D. (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 2632–2636.
- Yuan, D.S., Dancis, A., and Klausner, R.D. (1997). Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* *272*, 25787–25793.

## DISCUSSION

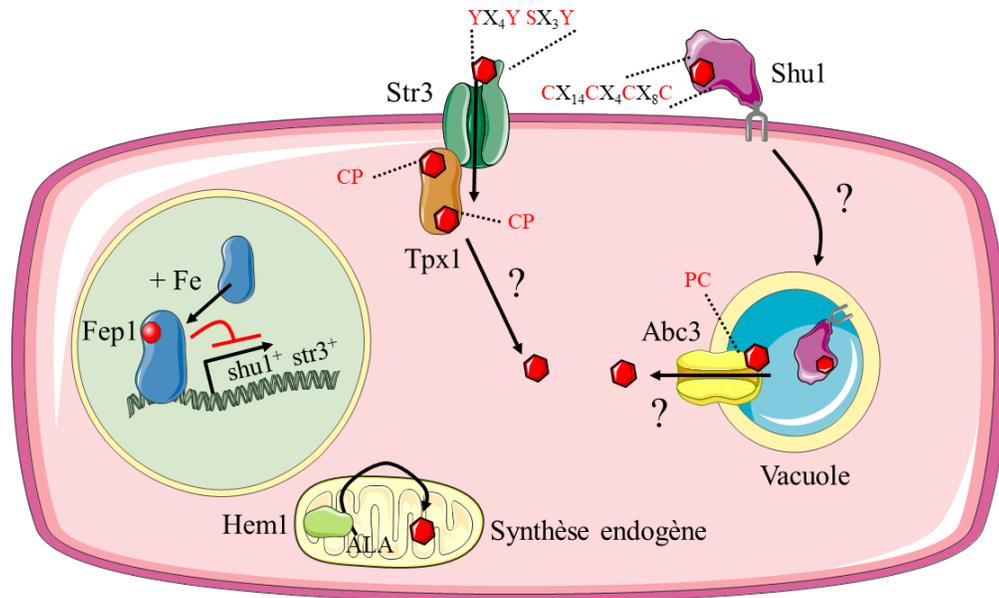
### 1. Les voies Shu1 et Str3 sont deux voies d'acquisition d'hème indépendantes

Dans cette thèse, j'ai montré l'existence d'un deuxième transporteur d'hème indépendant de la voie Shu1/Abc3 décrite précédemment chez *S. pombe* (Mourer et al., 2015, 2017). Cette étude met en lumière le premier exemple de transporteur de type MFS qui est impliqué dans l'assimilation de l'hème chez les levures. Les précédentes hémoprotéines réceptrices d'hème décrites chez *C. albicans* sont des protéines contenant des domaines CFEM et ancrées à la membrane par une ancre GPI (Kuznets et al., 2014; Weissman and Kornitzer, 2004). Chez *C. neoformans*, seul l'hémophore Cig1 a été décrit (Cadieux et al., 2013).

Chez *S. pombe*, la protéine Shu1 possède une région très hydrophobe en C-terminal qui permettrait l'attachement d'une ancre GPI liant ainsi cette dernière à la membrane plasmique. Lors de la liaison Shu1-hème, le complexe est internalisé par endocytose puis amené jusqu'à la vacuole, où la sortie de l'hème est dépendante de la présence de la protéine vacuolaire Abc3.

Contrairement à Shu1, la protéine Str3 reste localisée à la surface cellulaire après l'entrée de l'hème dans la cellule. Cette entrée est indépendante de la présence de Shu1 et de Abc3. En effet, on observe une capacité à croître pour une souche délétée pour *hem1*<sup>+</sup> (*hem1Δ*) en présence d'hème exogène et de *str3*<sup>+</sup>, alors que *shu1*<sup>+</sup> et *abc3*<sup>+</sup> sont délétés. Après son entrée dans la cellule via Str3, l'hème serait pris en charge par au moins une protéine cytoplasmique, la protéine Tpx1. Cette dernière est capable de fixer deux molécules d'hème (stochiométrie hème : Tpx1 = 2 :1). Cette liaison de Tpx1 à Str3 est dépendante de la capacité qu'a Tpx1 à lier de l'hème. En effet, si Tpx1 est mutée au niveau des deux motifs CP (CP1 et CP2), on observe une abolition de la liaison Str3/Tpx1. Par ailleurs, Tpx1 ne se lie pas à la protéine Shu1, ce qui confirme que les deux voies d'acquisition de l'hème présentent des mécanismes moléculaires différents. Enfin, l'activité de l'hémoprotéine Frp1 (ferriréductase de surface) est affectée uniquement lorsqu'une composante de la voie Str3-

Tpx1 est absente ou mutée dans une souche *hem1Δ shu1Δ*. Cela suggère que l'activité de Frp1 n'est pas significativement affectée par l'absence de Shu1 (Figure 1).



▲ **Figure 1.** Homéostasie de l'hème chez *S. pombe*. Deux protéines de surface permettent l'import d'hème chez la levure *S. pombe*. La protéine Shu1 est ancrée à la membrane plasmique par une ancre GPI. Elle fixe l'hème grâce à un motif qui est apparenté au motif CFEM, CX<sub>14</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>8</sub>C. Ensuite, la protéine Shu1 est internalisée jusqu'à la vacuole par un mécanisme inconnu. Dans la vacuole, l'hème est exporté vers le cytoplasme. Cette exportation est dépendante de la protéine Abc3, transporteur de type ABC capable de lier l'hème via un motif CP inversé, nommé PC. La protéine Str3 permet également l'import de l'hème. Elle possède une boucle extracellulaire entre les domaines TM11 et TM12 qui permet la fixation de l'hème via deux motifs qui ressemblent à ceux retrouvés chez les protéines à domaine NEAT. Ces deux motifs sont YX<sub>4</sub>Y et SX<sub>3</sub>Y. L'hème transporté par Str3 peut être pris en charge par la protéine cytoplasmique Tpx1 qui possède deux motifs CP lui permettant de lier l'hème. L'expression de *shu1*<sup>+</sup> et *str3*<sup>+</sup> est contrôlée par le facteur de transcription Fep1 qui réprime leur expression en présence de fer. En carence de fer, l'expression de *shu1*<sup>+</sup> et *str3*<sup>+</sup> est induite. La levure à fission est capable de synthétiser de l'hème de façon endogène. La première étape permet la condensation du succinyl-CoA et de la glycine en ALA qui est dépendante de la présence de la ALAS, Hem1.

## 2. Le transport de l'hème par la protéine Str3

La protéine de type MFS Str3 posséderait douze domaines transmembranaires. Des protéines de types MFS sont décrites pour transporter de l'hème chez l'homme. Il s'agit des protéines FLVCR1 (Keel et al., 2008; Quigley et al., 2004, 2005) et FLVCR2 (Duffy et al., 2010). FLVCR1 possède deux isoformes ; FLVCR1a permet l'export de l'hème chez les cellules humaines. Le transcrit de FLVCR1b correspond à celui de FLVCR1a sans le premier exon qui se retrouve épissé. Ainsi, FLVCR1b code pour une protéine de 28 kDa possédant six domaines transmembranaires qui se localise à la mitochondrie. Deux protéines FLVCR1b formeraient un homodimère formant ainsi un complexe à 12 domaines transmembranaires. Sa séquence en acides aminés correspond à la portion 277 à 555 de FLVCR1a. La fonction de FLVCR1b serait de transporter l'hème néosynthétisé de la mitochondrie vers le cytoplasme (Chiabrando et al., 2012). La protéine FLVCR2, quant à elle, est impliquée dans l'import de l'hème du milieu extracellulaire vers le cytoplasme (Duffy et al., 2010). Jusqu'ici, aucune caractérisation biochimique de FLVCR1 et de FLVCR2 n'a été réalisée. Les mécanismes d'import ou d'export d'hème par ces protéines ne sont pas connus à l'heure actuelle.

Parmi le peu d'information moléculaire, une étude a montré que la tyrosine 153 de la protéine FLVCR1a est importante pour le transport de l'hème. Cette Tyr<sup>153</sup> est prédite pour se retrouver au niveau du domaine transmembranaire TM2 de la protéine (Khan and Quigley, 2011, 2013). L'alignement de Str3 avec l'exportateur d'hème FLVCR1a montre que la tyrosine 160 de Str3 s'aligne avec la tyrosine 153 de FLVCR1a. Une prédiction bioinformatique de la structure de Str3 a été réalisée grâce au programme Phyre (Kelley and Sternberg, 2009). Cette analyse a été effectuée en utilisant comme matrice la protéine MFS GlpT (PDB : 1PW4) qui est le transporteur de glycérol-3-phosphate chez *E. coli*. Les protéines Str3 et GlpT partagent 22.2% d'identité. Ainsi, la Tyr<sup>160</sup> est prédite pour être localisée sur la face interne du domaine transmembranaire TM3, qui pourrait être en contact avec la molécule d'hème lorsque cette dernière passe à travers la protéine Str3 (Figure 2).

A

```

Str3      .....1      10      20      30      40
FLVCR1   MARPDDEEGAAVAPGHPLAKGYLPLFRGAPVVGKESVELQNG....PKAGCTFPVNGAPRDSLAAAASCVLIG

Str3      50      60      70      80      90      100
FLVCR1   NE...Y...SKMDNSLQHRQVSKI...EA...VRDSLYONKRGMYLAYAFGLAILAGSWASAIQSSITY
          GPOTPLAPEEETQARLLPACAGAETPGRESSPLPLTALSPRRFVVTIFSLYSLVNAFQWLIQ.....

Str3      110     120     130     140     150     160     170
FLVCR1   SYQVYATASFNRSTMISTLEIATAIISVCKPILGKFSDFTSRPMITVTLVLDKVVIGFIVVASSSTLSAY
          .....YSIISNVE...GFYGVNLLHLIDW..LSMVYMLAYVPLIFPAPVWLLD
          *

Str3      180     190     200     210     220     230
FLVCR1   VIGSVFISIGSSGLDYINTLVVCDLISIKWRGFTAL.....LSTPVAVWFTCFIVQGITID
          TRGERLTALEGSGIINC LGAWKRCGSVQKRLRVTMLGQCCLCSVAQVFILGLPSRVAVWVGGPKPVSITCA

Str3      240     250     260     270     280
FLVCR1   SN...WRWQCYGMFAIIMPAVMTPAV.....TILMYLERQANKDENIKKIINQOT
          TAVLGNQDCTAVGFLLPVIVPNTQNDTNLACNISTMPYGTSAVTLLFLITAJA...FKKPRPMP

Str3      290     300     310     320     330     340
FLVCR1   EEK.....NKNKOSKWKQLWFAVLEVDLFGDLLGVGMSTLLPFLTSYAKNGWKNPMSIAMMVVGGV
          SQAQAALQDSPPEEYSYKRSIENLQFNIEFVLLI...TYGIMTGAFYS.....VS....TLLNQM

Str3      350     360     370     380     390     400     410
FLVCR1   ILLIAYSGVEMFTAPVPSCFRRVMNRTFITAVTIDFFYYTAGYIQSMYETTYTWFVLDWGYRQWTFYFNNTM
          ILLTYEGEENAG.....RIGLLLVVAGMVGSLI...CGLWIDVFKTYQOTLLIVYI.

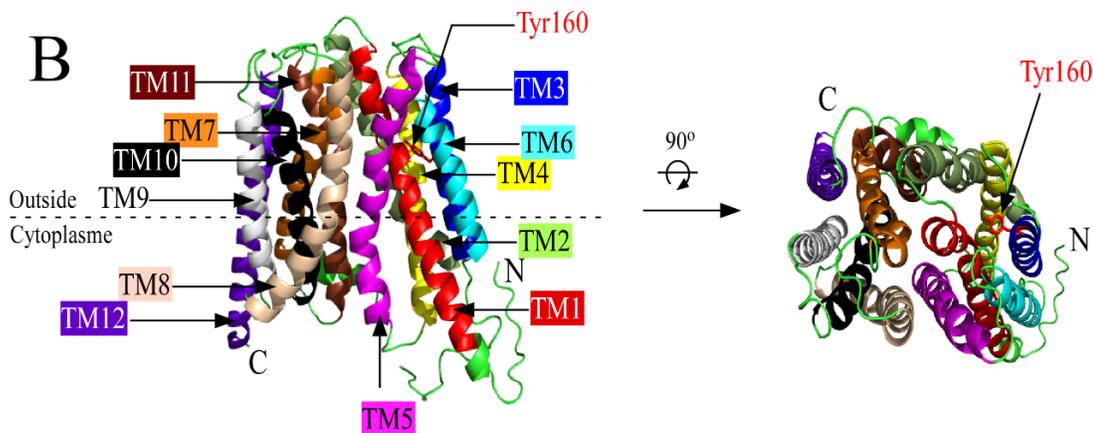
Str3      420     430     440     450     460     470     480
FLVCR1   TIALCVFVGFAGAMHRVFRHYKYLQIIGLVIKIVGYGILIRPNFAAGKVDLAWSDIIGMCGGSFSV...
          .....LGFIGMVI...FTDLRVIITVFTVGGVGLGFMT

Str3      490     500     510     520     530     540
FLVCR1   ...VCSQVSCQASVPHDDLAIASSLIPYTIIGGAIGAIAISPFPNKVFKYLRVYLPSSINDTOVYNF
          GYLPVCFEFAVEITVPESSGTSSGLLNSAQI.....FGILFVLAQCKLTSVYVGPKAGNIFLC...

Str3      550     560     570     580     590     600     610
FLVCR1   YDSSLIREYYPVGTETRDGAIKAYSRSMPFTLVPAVSLSPFIPAAAFWQSNFYVIGNQNAVEGDQDHKKK
          .....V...WMLIGIILTAL..TKSDLRRNINIGITNVVVK....AIP

Str3      620     630
FLVCR1   GDKKMTQEPKTIIT.....
          ADSPMDQEPKTVMLSKQSESAT
  
```

B



▲ **Figure 2.** *Alignement des protéines Str3 (S. pombe) et FLVCR1a (H. sapiens) et prédiction de structure de Str3.* A. L'alignement de Str3 et FLVCR1 montre que la Tyr<sup>153</sup> de FLVCR1a est conservée chez Str3 (Tyr<sup>160</sup>) (\*). L'alignement des séquences a été réalisé avec le programme Clustal-Omega (Sievers and Higgins, 2014), puis traité avec le programme ESPript 3.0 (Robert and Gouet, 2014). B. Prédiction de la structure tridimensionnelle de la protéine Str3 réalisée avec le logiciel Phyre. La Tyr<sup>160</sup> se situe dans le troisième domaine transmembranaire (TM3) et est orientée vers l'intérieur du canal formé par les douze domaines prédits (annotés par différentes couleurs).

Le modèle structural de Str3 a également été analysé par le logiciel 3D ligand site (Wass et al., 2010). La structure obtenue a tout d'abord été analysée par le logiciel MAMMOTH qui compare la structure (ici celle de Str3) avec des structures de protéines connues, liant des ligands (Ortiz et al., 2002). Ensuite, la structure est réanalysée avec le logiciel TMalign (Zhang and Skolnick, 2005) qui réaligne la structure initiale sur les structures obtenues dans MAMMOTH. Par la suite, le logiciel 3D ligand site propose les acides aminés les plus proches du ou des ligands prédits. Dans ces conditions, les logiciels utilisés arrivent seize molécules d'hème dans la structure de Str3. Parmi, les acides aminés qui ressortent à proximité de l'hème, il y a deux tyrosines qui sont : la Tyr<sup>218</sup> et la Tyr<sup>386</sup>. Ces deux tyrosines, respectivement localisées dans les domaines transmembranaires TM5 et TM7, se situent au centre de la protéine dans le canal formé entre les hélices transmembranaires. Ainsi, elles pourraient permettre le passage de l'hème du milieu extracellulaire vers le cytoplasme (Figure 2).

Chez la bactérie *Rhodobacter capsulatus*, deux motifs MXXXM et HXXXM sont importants pour la fonction du transporteur de cuivre de type MFS CcoA. Ces motifs permettent la coordination du cuivre chez plusieurs cuproprotéines. Ainsi, dans le cas de CcoA ces deux motifs sont situés dans les domaines transmembranaires TM7 et TM8 et sont situés au centre de la protéine dans le canal formé par les domaines transmembranaires. Ils permettent le passage du cuivre à travers la protéine (Khalifaoui-Hassani et al., 2016).

Par ailleurs, les logiciels prédisent que du zinc et du calcium pourraient également lier Str3, ce qui laisse penser que Str3 pourrait fonctionner comme un symporteur ou un antiporteur. Cette fonction d'antiporteur ou de symporteur n'a pas été décrite pour les protéines FLVCR1 et FLVCR2.

Les trois tyrosines seraient à muter pour valider leur fonction respective dans le transport de l'hème. Nous pourrions ainsi réintégrer les allèles mutants dans une souche délétée pour les gènes *hem1*<sup>+</sup>, *shu1*<sup>+</sup> et *str3*<sup>+</sup> (*hem1Δ shu1Δ str3Δ*) et vérifier l'efficacité de ces différents mutants à restaurer ou non la croissance de la souche en présence de 0.15 μM d'hème. Par ailleurs, la capacité de liaison à l'hème de ces différentes protéines serait à tester par pull-down grâce à des billes d'agarose liées à de l'hème.

Des chélateurs de zinc (comme le TPEN [N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylenediamine] ou le DTPA [acide diéthylétriéthylaminopentaacétique]) ou/et de calcium (comme l'EDTA ou l'EGTA) pourraient également être utilisés pour valider la fonction d'antiporteur ou de symporteur de Str3. Au contraire, du zinc et/ou du calcium pourraient être également ajouté au milieu pour vérifier si ces derniers favorisent l'entrée d'hème dans les cellules en présence de Str3.

Il faut noter que les logiciels de structure ne modélisent pas la boucle extracellulaire qui est responsable de l'attachement de l'hème. Aucun MFS possédant une boucle extracellulaire de ce genre n'a pour le moment été cristallisé. Cette boucle extracellulaire est appelée SITD (*siderophore transporter domain*) pour certains transporteurs MFS de levure comme Sit1 chez *Candida glabrata* (Nevitt and Thiele, 2011). Cette boucle est spécifique des MFS de levure et est certainement responsable de la capture du ligand dans l'environnement. Le transit de ce dernier se faisant ensuite via certains acides aminés (décrits plus haut dans le texte) dans le canal formé entre les domaines transmembranaires

Dans le cas de Str3, les acides aminés Tyr<sup>530</sup>, Tyr<sup>534</sup>, Ser<sup>552</sup> et Tyr<sup>557</sup> inclus dans la boucle extracellulaire entre les domaines transmembranaires TM11 et TM12 participent la liaison à l'hème.

Lorsque ces acides aminés sont mutés dans la protéine, on observe une liaison partielle de la protéine à l'hème suggérant que d'autres acides aminés dans la protéine, comme ceux présents dans les domaines transmembranaires, sont impliqués pour lier l'hème.

En revanche, la mutation de ces quatre acides aminés abolit la capacité de la protéine à transporter de l'hème. Cela démontre l'importance de cette boucle dans la capture et/ou l'utilisation de l'hème par Str3. En effet, en présence de 0.15 μM d'hémine, la croissance

d'une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprimant Str3-Y530A/Y534A/S552A/Y557A est compromise de façon identique à une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ*. À l'inverse, une souche *hem1Δ shu1Δ* exprimant un allèle *str3*<sup>+</sup> sauvage est capable de croître dans un milieu ayant comme seule source d'hème celle qui est fournie de façon exogène aux cellules.

La boucle extracellulaire située entre les domaines transmembranaires TM11 et TM12 (entre les acides aminés 523 et 576) de la protéine Str3 contient deux motifs (<sup>530</sup>YLREY<sup>534</sup> et <sup>552</sup>SLIREY<sup>557</sup>) permettant la liaison à l'hème à cette dernière lorsque celle-ci est exprimée et purifiée chez *E. coli*. Les trois tyrosines et la sérine sont requises pour la coordination de l'hème. Lorsque ces quatre acides aminés sont mutés en alanines, le domaine de Str3 n'est plus capable de lier de l'hème in vitro.

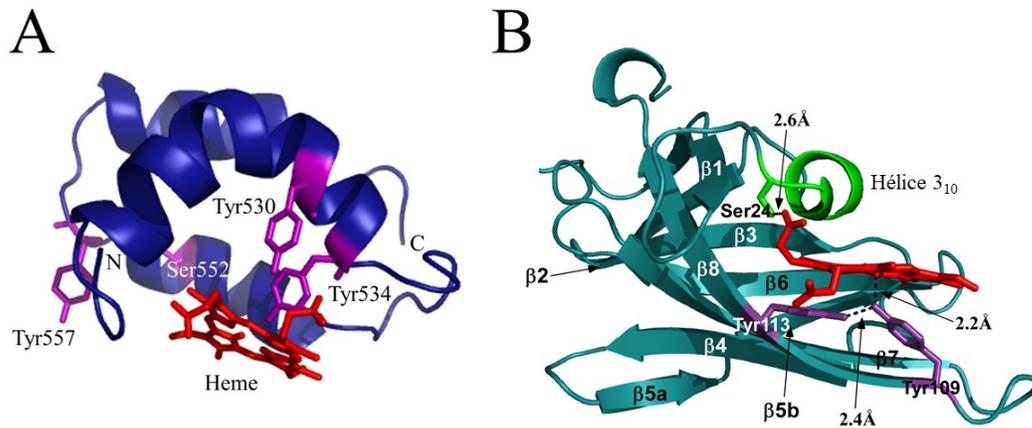
Ces deux motifs sont apparentés à des motifs importants pour la liaison à l'hème chez les protéines à domaines NEAT (*near-iron transporter*). Par exemple, les protéines Isd exprimées chez *Staphylococcus aureus* lient l'hème grâce à un ou plusieurs domaines NEAT. Les domaines NEAT sont composés d'environ 120 acides aminés. Leurs structures contiennent huit feuillets β. La molécule d'hème est coordonnée dans une poche hydrophobe par deux tyrosines dans un motif YXXXY (Grigg et al., 2007; Sharp et al., 2007). *S. aureus* possède trois protéines Isd de surface ; IsdB, IsdH et IsdA, impliquées respectivement dans la capture de l'hémoglobine, du complexe haptoglobine-hémoglobine et de l'hème. Ces trois protéines possèdent des domaines NEAT, deux pour IsdB, trois pour IsdH et un pour IsdA. L'hème est ensuite transféré sur la protéine IsdC (contenant un seul domaine NEAT), qui permet son passage à travers la paroi (Grigg et al., 2010).

Les domaines NEAT sont conservés chez plusieurs espèces bactériennes Gram positive comme chez *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Listeria monocytogenes* et *Streptococcus pyogenes* et sont impliqués dans l'assimilation de l'hème (Choby and Skaar, 2016). Le système d'acquisition de l'hème chez *B. anthracis* est proche du système Isd de *S. aureus*. La structure cristallographique de IsdX1 (PDB : 3SIK) qui est une protéine NEAT exprimée chez *B. anthracis* montre qu'outre le motif YXXXY, un résidu sérine est également important pour la liaison à l'hème. Cette sérine forme un pont hydrogène avec un des deux groupements propionates de l'hème. Les deux tyrosines du motif YXXXY permettent quant à elles de coordonner l'atome de fer de la molécule d'hème (Ekworomadu

et al., 2012). De plus, l'alignement des protéines NEAT du groupe IsdC montre que la sérine se retrouve dans un motif SXXXXY (Honsa et al., 2014).

Les deux motifs YXXXXY et SXXXXY sont impliqués dans la liaison à l'hème et sont présents dans la boucle de Str3. En revanche la structure prédite de cette dernière et la structure du motif NEAT sont différentes. La prédiction de structure de la boucle de Str3 par le logiciel I-TASSER (Roy et al., 2010) présente trois hélices  $\alpha$ . Les tyrosines 530 et 534 sont présentes dans la première hélice  $\alpha$ , tandis que la sérine 552 et la tyrosine 557 sont présentes dans la troisième hélice  $\alpha$  de la boucle. Grâce au logiciel d'arrimage moléculaire Docking Server (Bikadi and Hazai, 2009), il est possible d'arrimer une molécule d'hème à cette structure. Ainsi, l'hème se trouve à proximité des tyrosines 530 et 534, qui correspond à un motif conservé pour la liaison à l'hème dans les domaines NEAT (YXXXXY) (Figure 3).

▼ **Figure 3.** *Structure de la boucle extracellulaire de Str3 et du domaine NEAT de IsdX1 de B. anthracis.* A. La boucle extracellulaire située entre les domaines transmembranaires TM11 et TM12 qui est retrouvée entre les acides aminés 523 et 576 de la protéine Str3 a été modélisée par le logiciel I-TASSER. Les trois tyrosines et la sérine incluent dans les deux motifs  $^{530}\text{YLREY}^{534}$  et  $^{552}\text{SLIREY}^{557}$  sont marquées en violet. Les Tyr<sup>530</sup> et Tyr<sup>534</sup> sont présentes dans la première hélice  $\alpha$ , tandis que la sérine 552 et la tyrosine 557 sont présentes dans la troisième hélice  $\alpha$  de la boucle. Une molécule d'hème a été arrimée dans cette structure grâce au logiciel d'arrimage moléculaire, Docking Server. L'hème se trouve à proximité des tyrosines 530 et 534. B. Structure du domaine NEAT de la protéine IsdX1 de *B. anthracis*. Le domaine NEAT est composé de huit feuillets  $\beta$  (notées de 1 à 8) et d'une hélice 3<sub>10</sub>. Les deux tyrosines (Tyr<sup>109</sup> et Tyr<sup>113</sup>) responsables de la coordination de l'hème sont indiquées en violet. La Ser<sup>24</sup> permet la coordination d'un des deux groupement propionate de l'hème. Adapté de Honsa et al. (Honsa et al., 2014).

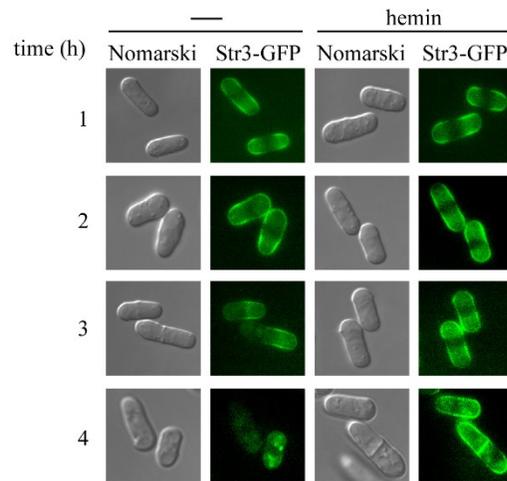


### 3. La stabilité de Str3 à la surface cellulaire

La protéine Str3 est exprimée à la surface cellulaire en présence de Dip. Cette localisation n'est pas affectée par la présence d'hème à différentes concentrations. Ainsi, contrairement à la protéine Shu1, qui en présence d'hème est rapidement internalisée vers le compartiment vacuolaire, la protéine Str3 reste présente à la surface cellulaire en présence d'hème et ce, pour quelques heures.

Les expériences présentées dans cette thèse montrent l'expression de Str3-GFP qui était sous le contrôle de son promoteur endogène. Ainsi, en présence de Dip, l'expression de *str3*<sup>+</sup> est induite. Nous avons également utilisé un promoteur inductible par l'absence de thiamine (*nmt1*<sup>+</sup>) pour contrôler l'expression de Str3-GFP. L'expression de cette dernière a été induite par la déplétion de la thiamine dans le milieu de culture pendant vingt heures. Ensuite, le promoteur *nmt1*<sup>+</sup> a été réprimé et, après 30 minutes, l'expression de Str3-GFP a été observée dans des conditions de chélation (Dip 250  $\mu$ M) en présence ou non d'hémine. Dans cet exemple (Figure 1 et 2, chapitre 2), je me suis arrêté après 30 minutes car nos résultats montrent que dans ces conditions, la ZnMP (analogue de l'hème) est déjà entrée dans la cellule. Pour vérifier si la stabilité de Str3 est affectée par la présence d'hème, cette dernière serait à mesurer à des temps plus longs après la fermeture du promoteur inductible. Mes premiers essais montrent qu'un « pool » protéique de Str3-GFP est plus stable à la surface cellulaire en présence d'hème (10  $\mu$ M) à des temps supérieurs à deux heures par

rapport à une condition basale. Ainsi, après trois et quatre heures, on observe encore de la fluorescence de Str3-GFP à la surface cellulaire en présence d'hème, alors que cette dernière est fortement diminuée et montre un changement de localisation cellulaire à ces mêmes temps en condition basale. L'hème semble donc stabiliser Str3 à la surface cellulaire (Figure 4).



▲ **Figure 4.** *Str3-GFP* est stabilisée à la surface cellulaire en présence d'hémine après trois heures de traitement. Une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprimant *str3<sup>+</sup>-GFP* sous le contrôle du promoteur *nmt1<sup>+</sup>* (*41X*) a été cultivée dans du milieu EMM sans thiamine pendant 20 heures pour induire l'expression de Str3-GFP. Ensuite, les cellules ont été centrifugées puis resuspendues dans le même volume de YES contenant 5  $\mu$ M de thiamine et traitées avec 250  $\mu$ M de Dip (-) ou 250  $\mu$ M de Dip et 10  $\mu$ M d'hémine (*hemin*). Les cellules ont été observées par microscopie aux temps indiqués sur la figure.

La stabilité de certaines perméases à oligo-nutriments peut être très affectée par la présence ou l'absence de leur ligand chez les levures. Par exemple, la protéine Arn1 est visible à la surface en présence d'une concentration donnée de ferrichrome (Kim et al., 2002). En absence de ferrichrome, cette dernière est endocytée puis dégradée ou recyclée si du ferrichrome est ajouté dans le milieu de culture. En présence d'un excès de ferrichrome la protéine Arn1 est également endocytée puis dégradée dans le but de limiter une toxicité liée à un excès de fer dans la cellule (Kim et al., 2002, 2005; Moore et al., 2003). La protéine de transport du cuivre, Ctr1 chez *S. cerevisiae* est régulée par au moins deux mécanismes distincts. À des concentrations de cuivre inférieures à 1  $\mu$ M (entre 0.1 et 1  $\mu$ M), la protéine

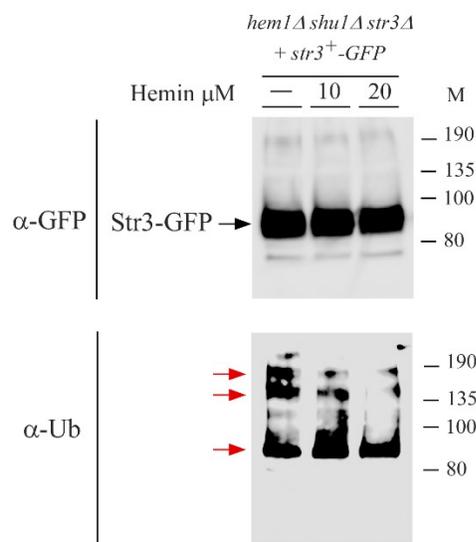
Ctr1 est internalisée dans la cellule selon un mécanisme inconnu (Ooi et al., 1996). À 10  $\mu\text{M}$  de cuivre, la protéine est dégradée directement à la membrane plasmique indépendamment de l'endocytose et des protéases vacuolaires (Ooi et al., 1996; Pena et al., 2000). Plus récemment, une étude a montré que la protéine Ctr1 est internalisée dans la cellule par endocytose à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  de cuivre. Cette endocytose est dépendante de l'ubiquitinylation de deux lysines ( $^{340}\text{Lys}$  et  $^{345}\text{Lys}$ ) situées dans la portion carboxy-terminale cytoplasmique de la protéine (Liu *et al.*, 2007). Ces résultats démontrent que dépendamment de la concentration en ligand, un même transporteur va être relocalisé dans la cellule de manière différente. En revanche, la protéine Ctr3 également impliquée dans le transport du cuivre chez *S. cerevisiae*, n'est pas affectée par la présence de cuivre (10  $\mu\text{M}$ ) et reste à la surface cellulaire (Pena et al., 2000). Le transporteur Gap1 (perméase à acides aminés) est induit en carence d'acide aminés et est dégradé en présence d'une concentration suffisante en acides aminés (Lauwers et al., 2007; Springael and André, 1998)

La localisation de Str3-GFP en fonction de différentes concentrations en hème serait à étudier d'avantage afin d'examiner quelles sont les concentrations d'hème qui sont critiques aux mouvements cellulaires de Str3. Une hypothèse est qu'en présence d'une concentration trop élevée en hème, la protéine Str3 pourrait être internalisée pour limiter la toxicité de ce dernier.

#### 4. Profil d'ubiquitinylation de Str3

Les relocalisations de Arn1 (Deng et al., 2009; Kim et al., 2005), Ctr1 (Bodiga et al., 2018; Liu et al., 2007) et Gap1 (Crapeau et al., 2014) chez *S. cerevisiae* sont dépendantes de la présence de sites d'ubiquitinylation dans les portions cytoplasmiques des transporteurs. Chez *S. pombe*, le transporteur d'uracile Fur4 colocalise avec le marqueur vacuolaire FM4-64 lorsqu'il est ubiquitinylé. En revanche, lorsqu'il est présent à la surface cellulaire, on observe une absence d'ubiquitinylation (Nishino et al., 2015). La protéine Str3 possède plusieurs lysines pouvant potentiellement être ubiquitinylées. Grâce au logiciel UpPred, j'ai identifié quatre lysines situées dans la portion cytoplasmique amino-terminale de Str3 qui

pourraient être ubiquitinylées avec un haut indice de confiance. Il s'agit des lysines 4, 20, 24 et 54 (Radivojac et al., 2010). De même, mes résultats montrent que Str3-GFP est plus ubiquitinylée en présence de Dip comparativement à deux conditions traitées en hème (10 et 20  $\mu$ M) (Figure 5). Ces résultats vont dans le sens que l'hème favorise la déubiquitinylation de Str3 et ainsi pourrait stabiliser sa présence à la surface cellulaire. À ce stade, on ne peut pas exclure également que les protéines ubiquitinylées correspondent à des partenaires protéiques de Str3 qui pourraient eux aussi subir des modifications en présence d'hème et ainsi participer à la stabilisation de Str3 à la surface cellulaire ou au transport de l'hème vers le cytoplasme.



▲ **Figure 5.** *Str3* ou ses partenaires protéiques est (sont) moins ubiquitinylée(s) en présence d'hème. Une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* exprimant Str3-GFP a une  $A_{600} = 0.5$ , a été traitée avec du Dip (250  $\mu$ M) ou du Dip supplémenté avec 10 ou 20  $\mu$ M d'hémine pendant trois heures. Ensuite les cellules ont été lysées puis la fraction membranaire a été séparée de la fraction soluble par ultracentrifugation à 100,000 X g. La fraction membranaire a été mise en présence de billes d'agarose couplées à la protéine A liée à un anticorps anti-GFP. La fraction liée aux billes a été migrées sur un gel SDS-PAGE, puis révélée par Western blot en utilisant des anticorps anti-GFP et anti-Ub (révélant les protéines ubiquitinylées). Le marqueur moléculaire (en kDa) est indiqué sur le côté droit de la figure.

La protéine Ubp5 qui code pour une déubiquitine ligase (DUB) s'est révélée enrichie en conditions traitées en Dip et hémine dans les expériences de MS/MS réalisées en présence de Str3-BioID<sub>2</sub>-HA<sub>4</sub>. Ces résultats suggèrent que Str3 pourrait interagir avec Ubp5 en

présence d'hème. La protéine Ubp5 pourrait participer à la déubiquitinylation de Str3 (ou de ses partenaires protéiques) en présence d'hème.

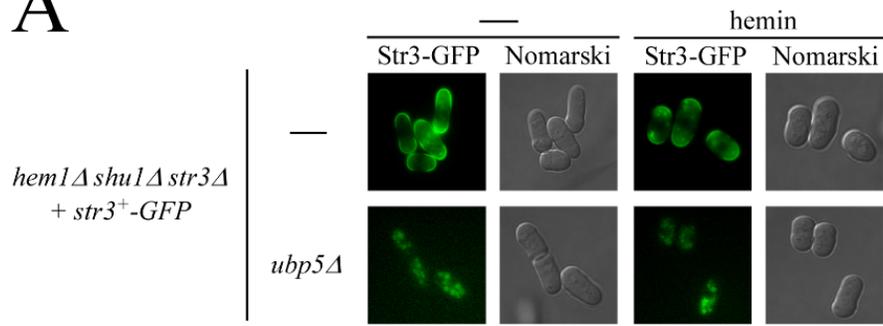
Étant donné que la protéine Ubp5 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Kouranti et al., 2010), il y a peu de chance que le contact Ubp5-Str3 ait lieu à la surface cellulaire. Ainsi, cette dernière pourrait avoir un rôle dans le recyclage de la protéine Str3, en présence d'hème dans le milieu extracellulaire. L'hypothèse du recyclage de Str3 en présence d'hème peut être appuyée par l'identification de protéines de la famille des Vps dans les expériences de MS/MS que nous avons réalisées. Ces protéines sont impliquées dans les mouvements vésiculaires entre les endosomes, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, la surface cellulaire et les vacuoles. Ainsi, dans cette condition, on retrouve les protéines Vps1, Vps8, Vps13, Vps45 et Vps54 qui pourraient interagir avec Str3.

Vps1 est une protéine de type dynamine impliquée dans le recyclage des vésicules d'endocytoses (Arlt et al., 2015; Chi et al., 2014). Les protéines Vps8, Vps13 et Vps45 sont impliquées dans le transport vésiculaire de l'appareil de Golgi vers les endosomes (Cowles et al., 1994; De et al., 2017; Horazdovsky et al., 1996; Myers and Payne, 2017). Récemment, une étude a montré que l'absence de Vps45 induit un retard important de la croissance de *C. neoformans* dans un milieu carencé en fer ne contenant que de l'hème ou de l'hémoglobine comme seule source de fer (Caza et al., 2018). Ainsi, la protéine Vps45 semble avoir un rôle dans la capacité à acquérir de l'hème chez *C. neoformans*. Vps54 est une protéine du complexe GARP (Golgi associated retrograde protein) qui permet le passage des protéines des endosomes vers l'appareil de Golgi, permettant ainsi le recyclage des protéines membranaires. Vps54 fait partie du complexe Vps52/Vps53/Vps54 qui est nécessaire au transport rétrograde des vésicules endosomales vers le réseau transgolgien (Conibear et al., 2003). Toutes ces protéines Vps sont des composantes nécessaires au transit vésiculaire entre les endosomes et le réseau transgolgien. L'hypothèse qui peut être émise ici est que ces protéines pourraient être impliquées dans le recyclage de Str3 en présence d'hème pour favoriser son retour à la membrane plasmique et ainsi limiter sa dégradation.

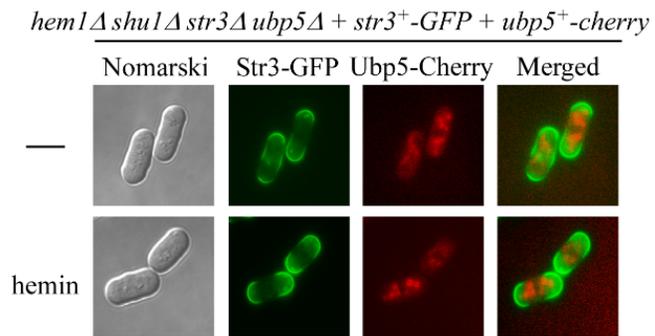
Mes résultats préliminaires montrent que l'absence de *ubp5*<sup>+</sup> dans une souche délétée pour *hem1*<sup>+</sup> et *shu1*<sup>+</sup> et exprimant Str3-GFP (*hem1Δ shu1Δ str3Δ ubp5Δ str3*<sup>+</sup>-GFP) affecte la localisation de Str3-GFP en présence de Dip et d'hémine mais aussi en présence de Dip.

Str3-GFP est très faiblement détectable et n'est pas présente à la surface cellulaire en absence de *ubp5<sup>+</sup>* (*ubp5Δ*) contrairement à une souche exprimant *ubp5<sup>+</sup>* dans laquelle Str3 est détectable à la surface cellulaire. Une hypothèse est que Str3-GFP, en absence de Ubp5, est plus fortement dégradée. La fluorescence de Str3-GFP observée en absence de Ubp5 est similaire à la localisation observée pour Ubp5-Cherry qui se localise au niveau de l'appareil de Golgi (Kouranti et al., 2010). Ainsi, il est possible qu'en absence de Ubp5, Str3 soit plus facilement dégradée et/ou retenue au niveau de l'appareil de Golgi. La localisation et le niveau d'expression de Ubp5 ne sont pas affectés par la présence d'hème. Enfin, la protéine Ubp5-Cherry est fonctionnelle car Str3-GFP se localise correctement à la surface cellulaire en sa présence. Pour valider l'effet sur la croissance cellulaire, j'ai délété le gène *ubp5<sup>+</sup>* dans une souche *hem1Δ shu1Δ* (*hem1Δ shu1Δ ubp5Δ*). Cette dernière est capable de croître dans un milieu supplémenté en ALA. En revanche, en présence d'hémine (0.15 μM) et en absence de ALA, la croissance de la souche est fortement affectée comme une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ*. Ainsi, l'absence d'expression de Str3 ou de Ubp5 affecte similairement la croissance d'une souche n'exprimant pas *hem1<sup>+</sup>* et *shu1<sup>+</sup>*. Ainsi, la protéine Ubp5 semble impliquée dans la voie d'acquisition de l'hème dépendante de Str3. Les résultats de localisation montrent que Str3 est peu exprimée et mal localisée en absence de Ubp5, ce qui expliquerait la difficulté de la souche à capturer de l'hème dans le milieu extracellulaire (Figure 6). Plusieurs expériences seraient à réaliser pour confirmer l'interaction entre Str3 et Ubp5 comme des expériences de coimmunoprécipitation ou de BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*). Une expérience de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) permettrait de mettre en lumière dans quel(s) compartiment(s) cellulaire(s) a (ont) lieu l'interaction entre Str3 et Ubp5.

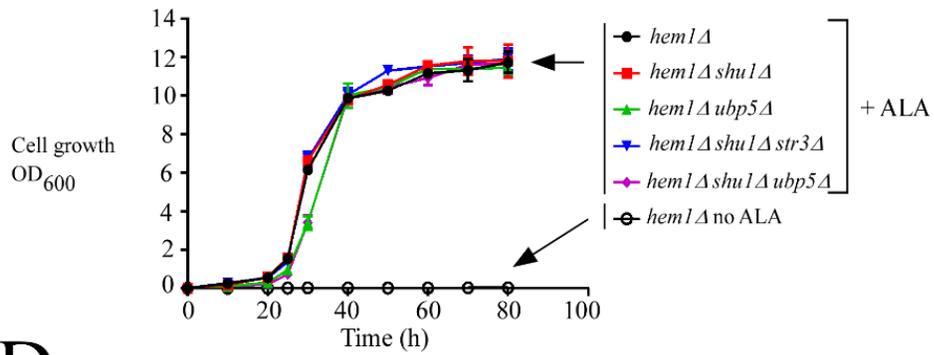
A



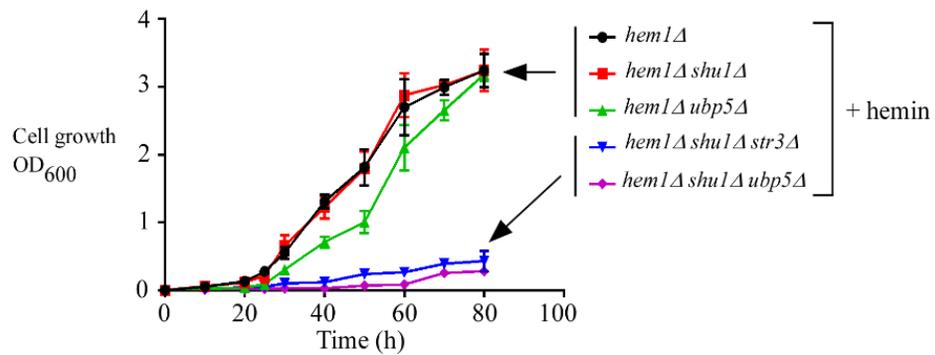
B



C



D



▲ **Figure 6.** *L'absence de ubp5+ entraîne une mauvaise localisation de Str3-GFP et un défaut de croissance en présence de 0.15 µM d'hème.* A. Les souches *hem1Δ shu1Δ str3Δ* et *hem1Δ shu1Δ str3Δ ubp5Δ* exprimant Str3-GFP ont été cultivées dans du YES contenant du ALA (200 µM) jusqu'à une  $A_{600} = 0.5$ . Ensuite, après deux lavages avec de l'eau, les cellules ont été resuspendues dans du YES contenant 250 µM de Dip avec ou sans hème (10 µM) et sans ALA pendant trois heures. La fluorescence de Str3-GFP a ensuite été observée par microscopie. B. Une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ ubp5Δ* exprimant Str3-GFP et Ubp5-Cherry a été cultivée dans les mêmes conditions puis la fluorescence de Str3-GFP et Ubp5-Cherry a été observée par microscopie. C. Courbes de croissance des souches indiquées dans du milieu YES. Ces souches ont été laissées non traitées (*no ALA*, cercles ouverts) ou supplémentées avec du ALA exogène (+ALA, 200 µM) D. Courbes de croissance des souches indiquées dans du milieu YES qui a été supplémenté avec 0.15 µM d'hème.

Des mutants spécifiques des lysines sur Str3 seraient à effectuer et à réintégrer dans une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ* pour mettre en lumière le rôle exact de l'ubiquitinylation sur la stabilité de Str3 et sa capacité à importer de l'hème.

## 5. Signalisation qui amène Tpx1 à la membrane plasmique au contact de Str3

La protéine Tpx1 répond au stress oxydatif en présence d'une faible concentration en  $H_2O_2$  en permettant sa détoxification via son activité peroxydase et induit des réponses cellulaires de défense au stress oxydatif via Pap1. Néanmoins, sa forte abondance supporte la possibilité que Tpx1 ait plusieurs rôles cellulaires (Gunaratne et al., 2013). Dans cette thèse, j'ai démontré que Tpx1 interagit avec Str3 en présence d'hème et est enrichie plus fortement à la surface des membranes dans cette condition. La liaison Tpx1-Str3 est fortement affectée lorsque Tpx1 n'est plus capable de lier de l'hème. Un signal cellulaire est certainement requis pour que Tpx1 interagisse avec Str3.

Nos expériences de MS/MS ont révélé la présence de protéines kinases et phosphatases enrichies spécifiquement dans les conditions traitées en Dip et traitées en Dip et hème. Parmi les kinases on retrouve Gad8 qui se localise à la membrane plasmique (Matsuyama et al., 2006) et Nnk1 qui se localise dans le cytoplasme et à la périphérie cellulaire (Matsuyama et al., 2006). Ces deux protéines sont des serine/thréonine kinases

enrichies spécifiquement dans la condition traitée en Dip et hème. Il y a également Pck1 qui se localise dans le cytoplasme (Matsuyama et al., 2006) et qui est enrichie dans les deux conditions Dip et Dip + hème. Deux phosphatases sont enrichies dans ces deux conditions, soit Pzh1 (uniquement en présence de Dip et d'hème) et Ppb1 (dans les deux conditions). Ppb1 est une protéine cytoplasmique (Matsuyama et al., 2006). Il a été montré qu'en absence de Pzh1, le contenu cellulaire en sodium et potassium est affecté. Ainsi, la phosphatase permettrait une modulation de l'expression des transporteurs ioniques chez *S. pombe* (Balcells et al., 1999).

Plusieurs résidus dans la séquence de Tpx1 sont prédits ou ont été observés comme étant phosphorylés par analyse à haut débit en spectrométrie de masse. Ainsi, les sérines 2, 60, 73, 76, 105 et 148 et les thréonines 15 et 86 seraient potentiellement phosphorylées (Ingrell et al., 2007; Kettenbach et al., 2015; Swaffer et al., 2018; Wilson-Grady et al., 2008). On peut imaginer que des modifications dans le patron de phosphorylation favoriseraient l'une ou l'autre des fonctions de Tpx1 soit la réponse au stress oxydatif ou la prise en charge de l'hème transporté par Str3. De même, des acides aminés situés dans la séquence de Str3 ont été observés phosphorylés. Il s'agit des sérines 8, 10, 25, 37, 38, 44, 53, 58, 65 et 73, des thréonines 6 et 622 et de la tyrosine 46. Ces sites de phosphorylation pourraient participer au transfert de l'hème à Tpx1. Elles pourraient également stabiliser ou déstabiliser Str3 à la surface cellulaire. Pour valider cette hypothèse, des mutations spécifiques des acides aminés potentiellement phosphorylables de Tpx1 et Str3 seraient à réaliser. Les acides aminés potentiellement phosphorylés pourraient également être mutés en acides aminés phosphomimétiques pour valider leurs implications dans le transport de l'hème.

De même, les kinases et phosphatases potentiellement régulatrices seraient à déléter dans une souche *hem1Δ shu1Δ*. Les différents mutants seraient testés en courbes de croissance pour valider si leur(s) délétion(s) affecte(nt) la croissance des souches mutantes en présence d'hème exogène.

## 6. Rôle de Tpx1 dans la protection contre l'hème libre

Plusieurs études ont rapporté que d'autres protéines abondantes dans les cellules pourraient également avoir une fonction de chaperonne de l'hème comme HBP23, GAPDH, GST ou encore FABP. Mes travaux ont permis de démontrer que Tpx1 est également capable de lier de l'hème in vitro et in vivo. Cette liaison limite la réactivité de l'hème avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro empêchant ainsi sa dégradation ou son activité peroxydase. L'inhibition de réactivité de l'hème avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été observée avec la protéine humaine PRDX1 (Watanabe et al., 2017). De même, l'expression de PRDX2, une peroxyrédoxine à 2-Cys typiques, est augmentée dans les précurseurs érythroïdes des patients atteints de thalassémie β. La protéine PRDX2 lie de l'hème libre dans ces cellules. Cette liaison diminue l'activité peroxydase de l'hème (De Franceschi et al., 2011).

On peut imaginer que cette fonction est conservée in vivo. J'ai par ailleurs montré que la combinaison de l'hème (10 μM) et du peroxyde d'hydrogène (0.2 et 1 mM) est toxique pour *S. pombe*. Pour tester l'implication de Tpx1 dans le mécanisme d'inhibition de la toxicité de l'hème, il faudrait dissocier les deux fonctions de la protéine Tpx1, soit la réponse au stress oxydatif et la séquestration de l'hème labile. La protéine Tpx1 dans sa fonction de réponse au stress oxydatif induit des réponses génétiques dépendante de Pap1. Parmi les gènes induit par le stress oxydatif on retrouve notamment les gènes *ctl1*<sup>+</sup>, *trr1*<sup>+</sup>, *obr1*<sup>+</sup> et *caf5*<sup>+</sup> notamment (Paulo et al., 2014; Veal et al., 2004). Si suffisamment de molécules de Tpx1 sont bloquées par de l'hème au niveau des sites C<sub>P</sub> et C<sub>R</sub>, les réponses dépendantes de Pap1 en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> devraient être affectées. Il faudrait néanmoins s'assurer, dans un premier temps, que l'expression de ces gènes n'est pas affectée par la présence d'hème.

L'utilisation de senseurs de l'hème labile pourrait également être exploitée dans ces conditions. Deux types de senseurs d'hème labile sont utilisés dans la littérature. Le premier, consiste à faire exprimer à la cellule une HRP (*horseradish peroxidase*) ou une APX (*ascorbate peroxidase*) avec une étiquette de localisation pour un compartiment cellulaire donné. L'activité de l'enzyme est dépendante de la concentration en hème labile, ces dernières ayant une constante de dissociation inférieure au hémoprotéines cellulaires (Yuan et al., 2016). La deuxième méthode utilise un rapporteur fluorescent composé de trois

protéines, mKATE2 (standard interne de fluorescence), eGFP (fluorophore inhibé par l'hème) et la sous unité 562 du cytochrome b (qui permet de lier l'hème), l'intensité de fluorescence étant corrélé à la concentration en hème labile (Hanna et al., 2016).

Ainsi, en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une augmentation de l'hème labile pourrait être observée car une plus grande proportion de la population de Tpx1 serait impliquée dans la réponse au stress oxydatif et donc incapable de prendre en charge l'hème.

Enfin, un facteur de transcription sensible à la quantité d'hème dans la cellule pourrait être utilisé comme c'est le cas chez la levure *S. cerevisiae*. Chez cette dernière, le facteur de transcription Hap1 répond à la présence d'hème. En absence d'hème, Hap1 est retenue dans le cytoplasme dans un complexe multiprotéique appelé HMC (*high molecular weight complex*), incluant notamment la protéine Hsp90. En présence d'hème Hap1 lie directement de l'hème via un motif HRM (*heme-responsive motif*), ce qui induit sa liaison à l'ADN sur les promoteurs de ses gènes cibles. Hap1 induit la transcription de gènes codants pour des hémoprotéines comme certaines sous unités des cytochromes (*CYC1*, *CYC7* et *CYT1*), la catalase (*CTT1*) ou encore la réductase à oxyde de nitrite (*YHB1*) (Hon et al., 2005; Lee et al., 2002; Zhang and Hach, 1999). Chez *S. pombe*, aucune protéine homologue à Hap1 n'est trouvée. En revanche, on ne peut pas exclure qu'un facteur de transcription pourrait avoir une fonction similaire à Hap1 et ainsi répondre à la carence ou à la présence d'hème.

Contrairement aux travaux précédents sur les protéines cytosoliques liant de l'hème, nous avons montré une interaction directe entre Tpx1 et Str3. Nous avons montré que les acides aminés importants dans la liaison Tpx1-Str3 sont les mêmes que ceux impliqués dans la liaison à l'hème en ce qui concerne Tpx1. Les acides aminés qui favorisent cette liaison du côté de Str3 restent à définir. Il s'agit certainement d'acides aminés orientés vers le cytoplasme pour pouvoir entrer en contact avec Tpx1 si cette interaction est directe. La protéine Tpx1 est plus enrichie à la membrane en présence d'hème, favorisant certainement le contact Str3-Tpx1. Cela a déjà été observé dans le cas de la chaperonne au fer humaine PCBP2 qui se lie au transporteur DMT1 (voir discussion du chapitre 2). La protéine Frp1 est fonctionnelle si la voie de biosynthèse endogène d'hème est active (*hem1Δ* en présence de ALA) ou si Str3 ou Tpx1 sont présentes et fonctionnelles dans le contexte d'une souche *hem1Δ shu1Δ*. Dans nos conditions expérimentales, l'alimentation en hème de Frp1 est

beaucoup plus efficace quand ce dernier est synthétisé que acquis via Str3. Il serait intéressant de comprendre comment la néosynthèse est plus efficace que l'acquisition dans cette condition. Ainsi dans un premier temps, de l'hème néosynthétisé radiomarqué au  $^{14}\text{C}$  (en utilisant un précurseur ALA- $^{14}\text{C}$ ) pourrait être utilisé pour suivre le cheminement cellulaire de ce dernier (Schiffmann and Shemin, 1957). Nous pourrions ensuite immunoprécipiter une protéine fonctionnelle Frp1 marquée avec une étiquette moléculaire HA4 (HA4-Frp1). Enfin, le produit immunoprécipité serait migré sur un gel natif BN-PAGE puis révélé par autoradiographie (Palombo and Daley, 2012).

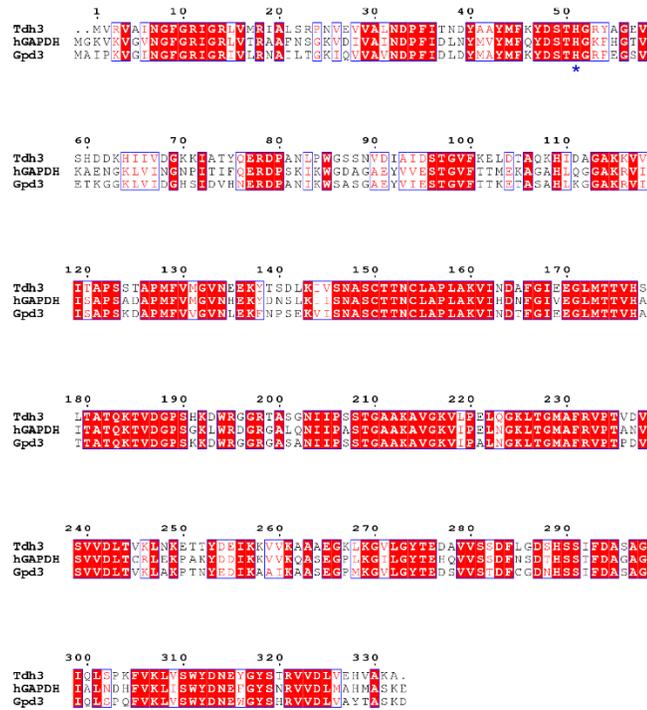
Dans un second temps, un hème radiomarqué au  $^{55}\text{Fe}$  pourrait être utilisé pour suivre l'acquisition exogène de ce dernier en présence ou en absence de Str3 et/ou Shu1. Ensuite, de la même manière, HA4-Frp1 serait immunoprécipité puis migré sur gel natif et révélé par autoradiographie (Palombo and Daley, 2012). La protéine TAP-Tpx1 pourrait également être étudiée grâce à ces deux techniques expérimentales. De ce fait, nous pourrions savoir si Tpx1 prend en charge de l'hème endogène et de l'hème exogène. Néanmoins, il semble que la mutation de Tpx1 au niveau des deux motifs CP n'affecte pas l'activité ferrereductase de Frp1 en présence de ALA, donc lorsque la voie de biosynthèse de l'hème est active. Pour écarter totalement l'absence de rôle de Tpx1 dans la délivrance d'hème endogène, il faudrait tester sa fonction sur d'autres hémoprotéines. Aussi, nous ne pouvons pas écarter la présence d'autres protéines responsables du trafic de l'hème néosynthétisé comme Gpd3 (voir section 7).

Pour mettre en lumière d'autres hémoprotéines recevant de l'hème via Tpx1, une protéine de fusion BioID<sub>2</sub>-HA4-Tpx1 pourrait être utilisée. Les protéines biotinyllées dans une condition où Tpx1 est active et ayant besoin d'hème pour fonctionner pourraient être des cibles de Tpx1.

Dans le cas de Frp1, aucune interaction entre Tpx1 et Frp1 n'a été détectée dans nos conditions expérimentales. Ce résultat suggère que l'hème n'est pas délivré directement par Tpx1 à Frp1. La protéine Frp1 peut recevoir ses deux molécules d'hème lors de sa maturation dans le réticulum endoplasmique. Si tel est le cas, il pourrait exister une protéine intermédiaire qui permet de transférer l'hème à Frp1 au niveau du réticulum endoplasmique (discuté au chapitre 2).

## 7. La GAPDH, une chaperonne de l'hème

La protéine GAPDH (glyceraldéhyde 3-phosphate dehydrogenase) est une protéine très abondante dans le cytoplasme des cellules. Son activité enzymatique permet la catalyse du glycéraldéhyde 3-phosphate en 1,3-bisphosphoglycérate. De plus, il a été récemment montré que cette dernière est capable de lier de l'hème et est importante pour réguler la quantité d'hème labile dans la cellule (Chakravarti et al., 2010; Hanna et al., 2016; Sweeny et al., 2018). Ainsi, comme pour les peroxyrédoxines, les GAPDH, en plus de leur fonction cellulaire primaire, sont capables de séquestrer et distribuer l'hème. Les GAPDH possèdent une histidine conservée permettant la liaison à la molécule d'hème. Cette histidine correspond à l'histidine 53 de la GAPDH humaine (hGAPDH). La mutation de cette histidine en alanine abolie totalement la liaison de la hGAPDH à l'hème *in vitro*. L'histidine 53 est conservée chez la GAPDH de *S. cerevisiae* (Tdh3) et correspond à l'histidine 51 de cette dernière (Sweeny et al., 2018). Par ailleurs, le changement de cet acide aminé dans ces deux protéines augmente de façon significative la quantité d'hème labile dans les cellules, ce qui implique que la GAPDH participe de manière prépondérante à la séquestration d'une grande partie de l'hème labile. Chez *S. pombe*, la GAPDH Gpd3 a été identifiée dans les expériences de MS/MS en conditions de Dip et hème. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'en plus de Tpx1, Gpd3 pourrait participer à la prise en charge de l'hème après son transport par Str3. L'histidine conservée chez l'homme et chez *S. cerevisiae* est également conservée chez *S. pombe* et correspond à l'histidine en position 53. Cette dernière pourrait permettre la fixation de l'hème par Gpd3 chez *S. pombe* (Figure 7). L'interaction entre Str3 et Gpd3 reste à confirmer par des expériences de coimmunoprécipitations. De plus, il faudrait vérifier la capacité de liaison de Gpd3 à l'hème *in vitro* et *in vivo*. Si la GAPDH est capable comme chez l'homme et chez *S. cerevisiae* de lier de l'hème, son rôle sur les activités ferriréductase Frp1 et sur la catalase Ctt1 serait également à vérifier.



▲ **Figure 7.** *Alignement des GAPDH des levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* et humaine.* La GAPDH de *S. pombe* (Gpd3) partage 69% d'identité avec celle de *S. cerevisiae* (Tdh3) et 72% avec la GAPDH humaine (hGAPDH). Les histidines 53 (hGAPDH) et 51 (Tdh3) sont conservées dans la séquence de Gpd3 (His<sup>53</sup>) (\*). L'alignement de séquences a été réalisé avec le programme Clustal-Omega (Sievers and Higgins, 2014), puis traité avec le programme ESPript 3.0 (Robert and Gouet, 2014).

Les cellules de mammifères déficientes pour la protéine GAPDH présentent une diminution de l'activité de la iNOS (*inductible nitric oxyde synthase*). La protéine iNOS est responsable de la production de NO (oxyde de nitrite) et de citrulline à partir de L-arginine et de dioxygène chez les cellules de mammifères (Alderton et al., 2001). La protéine iNOS a besoin d'une molécule d'hème comme cofacteur. Ainsi, la GAPDH est responsable de nourrir en hème la protéine iNOS (Albakri and Stuehr, 1996; Chakravarti et al., 2010). Dans les différents génomes de levures, aucun gène orthologue codant pour une protéine de type NOS n'a été identifié. Les GAPDH fongiques dotées de la capacité à lier de l'hème nourriraient potentiellement d'autres hémoprotéines.

Les espèces fongiques sont néanmoins capables de cataboliser le NO, qui peut causer des effets cellulaires très délétaires comme la nitrosylation, le stress nitrosatif et l'apoptose. Les levures possèdent des NO dioxygénases capables d'oxyder le NO en nitrate (NO<sup>3-</sup>). Ces

protéines possèdent un domaine de type globine capable de lier une molécule d'hème qui permet leur fonction (Cánovas et al., 2016). Chez *S. pombe*, il existe une NO dioxygénase possédant un domaine globine, il s'agit de Yhb1. La protéine Yhb1 est sortie enrichie dans les expériences de MS/MS dans la condition traitée en Dip et en hémine. Ainsi, nous pouvons supposer que Yhb1 vient chercher son cofacteur directement sur le transporteur Str3 ou de Gpd3 et/ou de Tpx1. Dans le cas de Gpd3 et Tpx1, ils serviraient d'intermédiaires entre Str3 et Yhb1. Des expériences d'immunoprécipitation seraient à réaliser pour confirmer cette hypothèse. De plus, les niveaux intracellulaires de NO pourraient être mesurés par cytométrie en flux en utilisant une sonde spécifique au NO, le DAF-FM DA (Astuti et al., 2016) en présence ou en absence de *shu1*<sup>+</sup> et/ou *str3*<sup>+</sup> et/ou *gpd3*<sup>+</sup> et/ou *tpx1*<sup>+</sup> dans une souche *hem1Δ*.

## 8. Effet de Str3 et Shu1 sur l'activité de la chaîne respiratoire

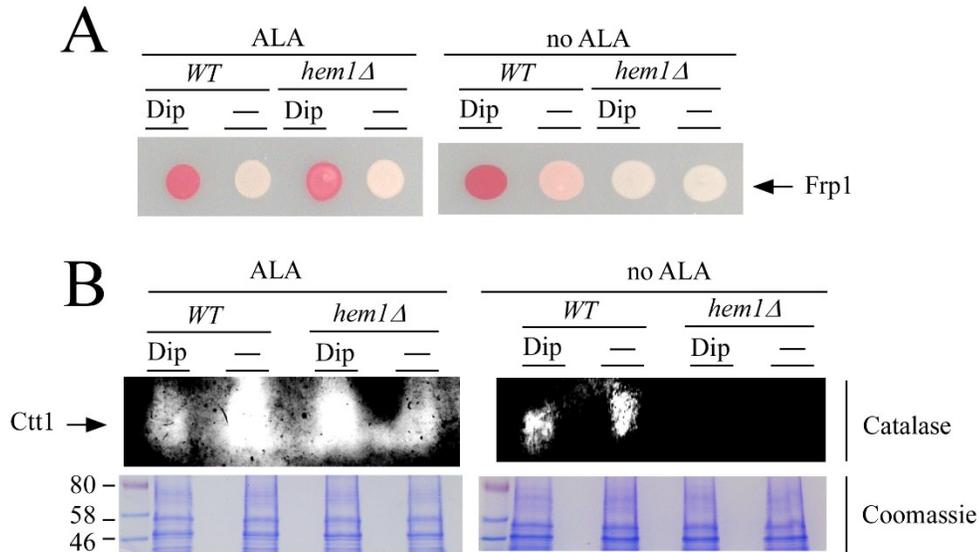
La chaîne respiratoire mitochondriale est dépendante de cuivre et d'hème pour fonctionner. Ainsi, en absence de cuivre et des transporteurs de haute affinité de cuivre Ctr4 et/ou Ctr5, la levure *S. pombe* est incapable de croître sur un milieu non fermentable (utilisation du cycle de Krebs uniquement et de la respiration mitochondriale), c'est-à-dire contenant du glycérol à la place du glucose (Beaudoin et al., 2006; Labbé et al., 1999). L'hème sert de cofacteur aux cytochromes a, b et c de la chaîne respiratoire mitochondriale (Kim et al., 2012; Saraste, 1999). Chez *S. cerevisiae*, la respiration mitochondriale est favorisée en présence d'hème. En effet, la surexpression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'hème (HEM3 et HEM12) provoque une augmentation de la respiration et de la synthèse d'ATP (Zhang et al., 2017).

En absence de biosynthèse endogène d'hème (*hem1Δ*) sur un milieu contenant une faible concentration d'hème en présence ou en absence de Shu1 et/ou de Str3, nous pourrions évaluer la contribution de l'acquisition exogène d'hème en utilisant comme essai fonctionnel le niveau d'activité de la chaîne respiratoire à obtenir l'hème comme cofacteur. En effet, sur un milieu non fermentable, la présence d'hème est certainement requise chez *S. pombe*. Par ailleurs, nous pourrions également évaluer le rôle de Tpx1 et/ou de Gpd3 dans cette fonction par l'essai fonctionnel décrit plus haut.

## 9. Étude de l'activité catalase de Ctt1 comme senseur de l'hème intracellulaire

Comme Frp1, il existe d'autres hémoprotéines qui peuvent servir de senseurs de l'hème biodisponible dans la cellule. Les catalases sont très conservées dans l'évolution. Elles forment des homotétramères et nécessitent une molécule d'hème pour disproportionner le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène. Il existe une seule catalase chez *S. pombe* appelée Ctt1. Dans une souche *hem1Δ*, carencée en ALA pendant 19 heures, on observe une diminution significative de l'activité catalase de Ctt1 mesurable sur un gel natif. Ainsi, comme Frp1, la catalase est un bon senseur de la présence d'hème intracellulaire disponible. Le lien entre la voie Str3-Tpx1 et/ou Shu1/Abc3 et la catalase reste à démontrer. De la même manière que les expériences présentées dans le chapitre deux, les différentes souches (*hem1Δ*) exprimant ou non Shu1, Str3 et Tpx1 seraient à être déplétées en ALA, puis à être supplémentées ou non avec du ALA ou de l'hème pour ensuite mesurer l'activité catalase de Ctt1 (Figure 8).

Le lien entre une peroxyrédoxine 2-Cys (AhpC) et l'activité catalase a été montré chez la bactérie *S. agalactiae*, cette dernière étant fortement affectée en absence de AhpC (Lechardeur et al., 2010). L'activité catalase peut être présentée sur gel natif mais son activité peut également être quantifiée par essai biochimique en mesurant la formation de la resorufin (570 nm) à partir du 10-acetyl-3-7-dihydroxyphenoxazine par colorimétrie (Vetrano et al., 2005).



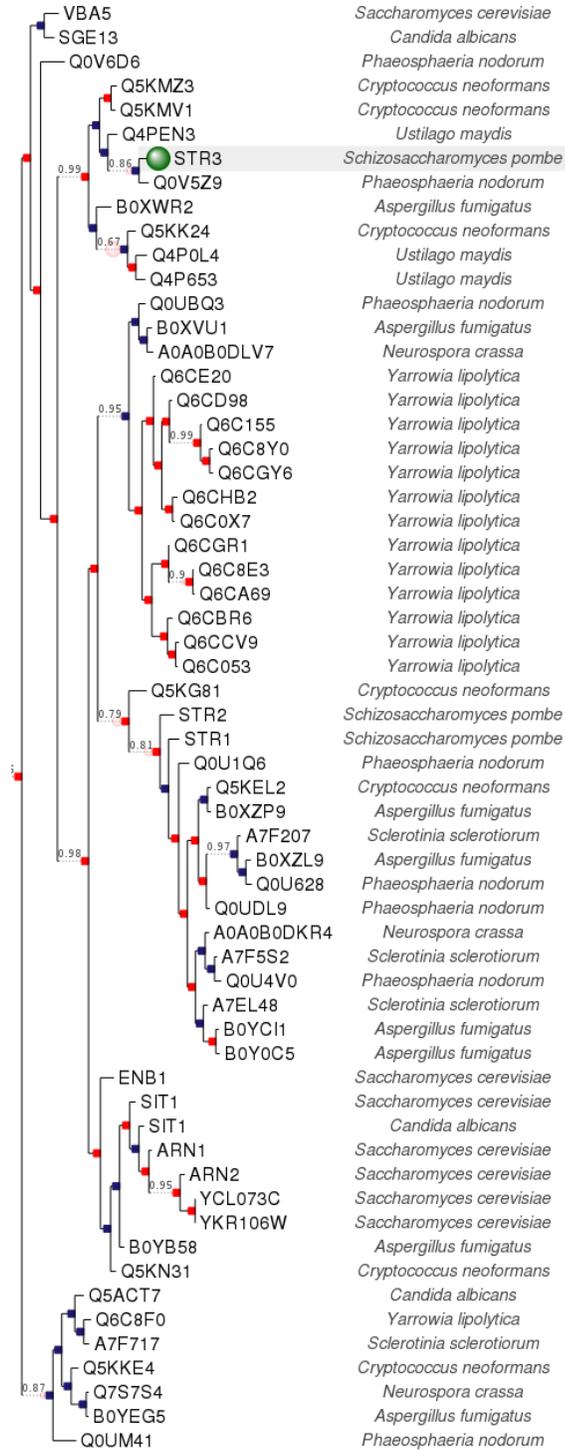
▲ **Figure 8.** L'activité catalase de *Ctt1* est abolie dans une souche *hem1Δ* déplétée en ALA. Des souches sauvage (*WT*) et *hem1Δ* ont été cultivées dans du YES contenant du ALA jusqu'à une  $A_{600} \sim 1.0$ . Ensuite, elles ont été lavées avec de l'eau puis resuspendues dans du YES contenant du ALA (200  $\mu\text{M}$ ) ou sans ALA (no ALA) et cultivées 19 heures. Les cellules ont été traitées pendant trois heures avec du Dip (250  $\mu\text{M}$ ) ou non traitées (-). Ensuite, les cellules ont été déposées sur une gélose pour effectuer un essai d'activité TTC ou des extraits protéiques totaux ont été préparés pour mesurer l'activité catalase en gel natif. Une coloration des gels au bleu de Coomassie a été réalisée comme contrôle de chargement en protéines.

## 10. Conservation de Str3 chez les levures

Les levures pathogènes humaines *C. albicans* et *C. neoformans* possèdent des protéines impliquées dans l'assimilation de l'hème. Chez *C. albicans*, les protéines à ancre GPI, Rbt5 et Pga7 ont été plus étudiées. Leur absence par délétion allélique induit une diminution de la capacité de la levure à croître en présence d'hème ou d'hémoglobine. De même, la délétion de Pga7 provoque une diminution de la virulence chez la souris (Kuznets et al., 2014). La diminution de la capacité de croissance et la diminution de la virulence sont également observables chez la levure *C. neoformans* en absence de Cig1 (Cadieux et al., 2013). Néanmoins, dans toutes ces études, les auteurs ont quand même observé une faible capacité à croître et les souches délétées ne deviennent pas totalement avirulente. Ainsi, ces dernières sont capables de monopoliser de l'hème dans l'environnement même en absence des protéines Rbt5, Pga7 et Cig1. La voie d'acquisition de l'hème étant un facteur de

virulence majeur chez les unicellulaires pathogènes de l'homme, son ciblage par des molécules pharmacologiques dans le but de traiter ces infections passe par une compréhension des mécanismes d'acquisition.

La protéine Str3 est la première protéine de type MFS à être décrite pour transporter de l'hème chez les levures. L'existence d'orthologues chez d'autres espèces de levures comme *C. albicans* ou *C. neoformans* pourrait expliquer leur capacité de croissance en présence d'hème même en absence des protéines auparavant mentionnées. Pour identifier des protéines orthologues et paralogues à Str3, j'ai soumis la séquence de Str3 à la base de données phylomeDB (Huerta-Cepas et al., 2014). Grâce à l'arbre phylogénique obtenu, on observe que des protéines potentiellement orthologues à Str3 sont présentes chez *C. neoformans* (annotées Q5KMZ3 et Q5KMV1, ces protéines pouvant être issues de gènes ayant fait l'objet d'une duplication génétique). On retrouve également plusieurs séquences paralogues à Str3 chez *C. albicans* et *C. neoformans* comme les séquences annotées Q5KK24 (*C. neoformans*) et SGE13 (*C. albicans*). Il est intéressant de noter que toutes les séquences citées plus haut ont une boucle extracellulaire prédite entre l'avant dernier et le dernier domaine transmembranaire comme c'est le cas pour Str3. Par ailleurs, la séquence annotée Q5KMZ3, possède dans cette boucle deux motifs <sup>544</sup>YLGSTY<sup>549</sup> et <sup>577</sup>YMESVS<sup>582</sup> proches de ceux retrouvés dans la boucle de Str3. Les deux autres séquences présentes chez *C. neoformans* comprennent des tyrosines et des sérines dans leur boucle non arrangées en motif conservé. La séquence exprimée chez *C. albicans*, SGE13, possède un motif <sup>600</sup>YKTIS<sup>604</sup> dans sa boucle prédite. Toutes ces données laissent penser que par leur homologie et la conservation de certains motifs ces protéines pourraient fixer et permettre l'importation d'hème chez ces deux levures pathogènes. Leur rôle dans l'acquisition de l'hème serait à vérifier en absence ou en présence de Rbt5 et/ou Pga7 et/ou Csa2 chez *C. albicans* et en absence ou en présence de Cig1 chez *C. neoformans*. De plus, les différents cadres de lecture pourraient être exprimés chez *S. pombe* (contrôlé par le promoteur de *str3*<sup>+</sup>) pour vérifier si ces derniers complètent totalement ou partiellement l'absence d'expression de *str3*<sup>+</sup> dans une souche *hem1Δ shu1Δ str3Δ*.



▲ **Figure 9.** *Phylogénie de Str3 chez les levures.* L'arbre phylogénique de *Str3* a été réalisé grâce au logiciel phylomeDB (Huerta-Cepas et al., 2014). *Str3* est représentée par le rond vert. Les nœuds de spéciation sont représentés par des carrés bleus tandis que les nœuds de duplication par les carrés rouges.

## CONCLUSION

Dans cette thèse, nous avons démontré l'existence d'une deuxième voie d'acquisition de l'hème chez la levure à fission *S. pombe*. Cette nouvelle voie fait intervenir le transporteur de type MFS Str3 localisé à la surface cellulaire ainsi que la protéine cytoplasmique Tpx1. Cette voie d'acquisition est indépendante de la voie d'assimilation de l'hème via Shu1.

Str3 est la première protéine de type MFS décrite comme pouvant transporter de l'hème chez les levures. Cela pourrait impliquer l'existence d'autres protéines MFS impliquées dans l'import de l'hème chez les levures pathogènes notamment comme *C. albicans* et *C. neoformans*. Une fois transporté par Str3, l'hème est pris en charge par la protéine Tpx1, qui est très conservée chez les eucaryotes. Tpx1 a été initialement décrite chez les eucaryotes et chez *S. pombe* pour répondre au stress oxydant. Les protéines cytoplasmiques liant de l'hème sont très importantes pour limiter la proportion d'hème libre dans le cytoplasme et inhiber ainsi sa toxicité. Dans cette thèse, nous avons montré que la liaison de Tpx1 à l'hème limite l'activité peroxydase intrinsèque de l'hème. La protéine Tpx1 pourrait également avoir un rôle direct ou indirect dans sa bio-distribution aux hémoprotéines cellulaires comme la ferriréductase Frp1 ou la catalase Ctt1.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Pr Simon Labbé de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir laissé une très grande liberté dans mes projets.

Je remercie également les évaluateurs de cette thèse, Pr François Bachand, Pr Claude Asselin et Pr Bernard Turcotte. Je tiens particulièrement à remercier Pr François Bachand en tant que mentor, ses nombreux conseils et ses connaissances ont été déterminants pour le bon déroulement de certains de mes projets.

Je remercie aussi Jude Beaudoin pour son très grand soutien technique et ses innombrables conseils. Un grand merci également à Thierry Mourer, pour sa collaboration scientifique. Merci également à vous deux pour votre bonne humeur.

Je remercie Marc Larochelle, Dominique Lévesque, Léonid Volkov et Jean-François Jacques pour le soutien technique autour de mes différents projets.

Un grand merci à ma famille, mes parents et ma sœur Élodie pour leur soutien moral et leurs nombreux encouragements malgré la distance.

Enfin, un énorme merci à Marie de m'avoir accompagné dans cette aventure. Merci pour tout ton support, tes conseils et tes idées scientifiques (ou non scientifiques).

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., and Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* *301*, 610–615.
- Albakri, Q.A., and Stuehr, D.J. (1996). Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability. *J. Biol. Chem.* *271*, 5414–5421.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* *357*, 593–615.
- Almeida, R.S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J.E., Filler, S.G., and Hube, B. (2008). The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog.* *4*, e1000217.
- Almeida, R.S., Wilson, D., and Hube, B. (2009). *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res* *9*, 1000–1012.
- Amorim-Vaz, S., Tran, V.D.T., Pradervand, S., Pagni, M., Coste, A.T., and Sanglard, D. (2015). RNA enrichment method for quantitative transcriptional analysis of pathogens in vivo applied to the fungus *Candida albicans*. *MBio* *6*, e00942-00915.
- Anderson, G.J., and Frazer, D.M. (2017). Current understanding of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* *106*, 1559S-1566S.
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L., and Thornton, J.M. (2008). Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* *13*, 1205–1218.
- Anzaldi, L.L., and Skaar, E.P. (2010). Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect Immun* *78*, 4977–4989.
- Aran, M., Ferrero, D.S., Pagano, E., and Wolosiuk, R.A. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins--modulation by covalent transformations and noncovalent interactions. *FEBS J.* *276*, 2478–2493.
- Ardon, O., Bussey, H., Philpott, C., Ward, D.M., Davis-Kaplan, S., Verroneau, S., Jiang, B., and Kaplan, J. (2001). Identification of a *Candida albicans* ferrichrome transporter and its characterization by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *276*, 43049–43055.

- Arlt, H., Reggiori, F., and Ungermann, C. (2015). Retromer and the dynamin Vps1 cooperate in the retrieval of transmembrane proteins from vacuoles. *J. Cell. Sci.* *128*, 645–655.
- Askwith, C., and Kaplan, J. (1997). An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *272*, 401–405.
- Astuti, R.I., Watanabe, D., and Takagi, H. (2016). Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric Oxide* *52*, 29–40.
- Bairwa, G., Jung, W.H., and Kronstad, J.W. (2017). Iron acquisition in fungal pathogens of humans. *Metallomics* *9*, 215–227.
- Balcells, L., Calero, F., Gómez, N., Ramos, J., and Ariño, J. (1999). The *Schizosaccharomyces pombe* Pzh1 protein phosphatase regulates Na<sup>+</sup> ion influx in a Trk1-independent fashion. *Eur. J. Biochem.* *260*, 31–37.
- Barber, M.F., and Elde, N.C. (2015). Buried treasure: evolutionary perspectives on microbial iron piracy. *Trends in Genetics* *31*, 627–636.
- Beaudoin, J., Laliberté, J., and Labbé, S. (2006). Functional dissection of Ctr4 and Ctr5 amino-terminal regions reveals motifs with redundant roles in copper transport. *Microbiology (Reading, Engl.)* *152*, 209–222.
- Bikadi, Z., and Hazai, E. (2009). Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *Journal of Cheminformatics* *1*, 15.
- Bodiga, S., Vemuri, P.K., and Bodiga, V.L. (2018). Low Ctr1p, due to lack of Sco1p results in lowered cisplatin uptake and mediates insensitivity of rho0 yeast to cisplatin. *J. Inorg. Biochem.* *187*, 14–24.
- Bonnah, R.A., and Schryvers, A.B. (1998). Preparation and characterization of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in production of the human lactoferrin-binding proteins LbpA and LbpB. *J. Bacteriol.* *180*, 3080–3090.
- Boronat, S., Domènech, A., Paulo, E., Calvo, I.A., García-Santamarina, S., García, P., Encinar Del Dedo, J., Barcons, A., Serrano, E., Carmona, M., et al. (2014). Thiol-based H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling in microbial systems. *Redox Biol* *2*, 395–399.
- Boulton, I.C., Gorringe, A.R., Shergill, J.K., Joannou, C.L., and Evans, R.W. (1999). A dynamic model of the meningococcal transferrin receptor. *J. Theor. Biol.* *198*, 497–505.
- Brown, J.D., Day, A.M., Taylor, S.R., Tomalin, L.E., Morgan, B.A., and Veal, E.A. (2013). A peroxiredoxin promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling and oxidative stress resistance by oxidizing a thioredoxin family protein. *Cell Rep* *5*, 1425–1435.

- Bullen, J.J., and Rogers, H.J. (1968). Effect of haemoglobin on experimental infections with *Pasteurella septia* and *Escherichia coli*. *Nature* 217, 86–86.
- Cadieux, B., Lian, T., Hu, G., Wang, J., Biondo, C., Teti, G., Liu, V., Murphy, M.E.P., Creagh, A.L., and Kronstad, J.W. (2013). The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.* 207, 1339–1347.
- Calvo, I.A., Boronat, S., Domènech, A., García-Santamarina, S., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2013). Dissection of a redox relay: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent activation of the transcription factor Pap1 through the peroxidatic Tpx1-thioredoxin cycle. *Cell Rep* 5, 1413–1424.
- Campbell, M.R., Karaca, M., Adamski, K.N., Chorley, B.N., Wang, X., and Bell, D.A. (2013). Novel hematopoietic target genes in the NRF2-mediated transcriptional pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 120305.
- Cánovas, D., Marcos, J.F., Marcos, A.T., and Strauss, J. (2016). Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel? *Curr Genet* 62, 513–518.
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., and Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* 3, 17071.
- Cassat, J.E., and Skaar, E.P. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* 13, 509–519.
- Caza, M., Hu, G., Nielson, E.D., Cho, M., Jung, W.H., and Kronstad, J.W. (2018). The Sec1/Munc18 (SM) protein Vps45 is involved in iron uptake, mitochondrial function and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 14, e1007220.
- Chae, H.Z., Chung, S.J., and Rhee, S.G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 27670–27678.
- Chakravarti, R., Aulak, K.S., Fox, P.L., and Stuehr, D.J. (2010). GAPDH regulates cellular heme insertion into inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18004–18009.
- Chang, C.-H., Lo, W.-Y., and Lee, T.-H. (2016). The antioxidant peroxiredoxin 6 (Prdx6) exhibits different profiles in the livers of seawater- and fresh water-acclimated Milkfish, *Chanos chanos*, upon hypothermal challenge. *Frontiers in Physiology* 7.
- Chang, J.W., Jeon, H.B., Lee, J.H., Yoo, J.S., Chun, J.S., Kim, J.H., and Yoo, Y.J. (2001). Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 507–512.

- Chi, R.J., Liu, J., West, M., Wang, J., Odorizzi, G., and Burd, C.G. (2014). Fission of SNX-BAR-coated endosomal retrograde transport carriers is promoted by the dynamin-related protein Vps1. *J Cell Biol* 204, 793–806.
- Chiabrande, D., Marro, S., Mercurio, S., Giorgi, C., Petrillo, S., Vinchi, F., Fiorito, V., Fagoonee, S., Camporeale, A., Turco, E., et al. (2012). The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J. Clin. Invest.* 122, 4569–4579.
- Choby, J.E., and Skaar, E.P. (2016). Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens. *J. Mol. Biol.* 428, 3408–3428.
- Chua, A.C.G., Drake, S.F., Herbison, C.E., Olynyk, J.K., Leedman, P.J., and Trinder, D. (2006). Limited iron export by hepatocytes contributes to hepatic iron-loading in the Hfe knockout mouse. *J. Hepatol.* 44, 176–182.
- Chung, Y.M., Yoo, Y.D., Park, J.K., Kim, Y.T., and Kim, H.J. (2001). Increased expression of peroxiredoxin II confers resistance to cisplatin. *Anticancer Res.* 21, 1129–1133.
- Conibear, E., Cleck, J.N., and Stevens, T.H. (2003). Vps51p mediates the association of the GARP (Vps52/53/54) complex with the late Golgi t-SNARE Tlg1p. *Mol. Biol. Cell* 14, 1610–1623.
- Copley, S.D., Novak, W.R.P., and Babbitt, P.C. (2004). Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43, 13981–13995.
- Cowles, C.R., Emr, S.D., and Horazdovsky, B.F. (1994). Mutations in the VPS45 gene, a SEC1 homologue, result in vacuolar protein sorting defects and accumulation of membrane vesicles. *J. Cell. Sci.* 107 (Pt 12), 3449–3459.
- Crapeau, M., Merhi, A., and André, B. (2014). Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like Bul and Aly proteins. *J. Biol. Chem.* 289, 22103–22116.
- Dancis, A. (1998). Genetic analysis of iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Pediatr.* 132, S24-29.
- Dang, S., Sun, L., Huang, Y., Lu, F., Liu, Y., Gong, H., Wang, J., and Yan, N. (2010). Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature* 467, 734–738.
- Day, A.M., Brown, J.D., Taylor, S.R., Rand, J.D., Morgan, B.A., and Veal, E.A. (2012). Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Mol. Cell* 45, 398–408.
- De, M., Oleskie, A.N., Ayyash, M., Dutta, S., Mancour, L., Abazeed, M.E., Brace, E.J., Skinotis, G., and Fuller, R.S. (2017). The Vps13p–Cdc31p complex is directly required for

TGN late endosome transport and TGN homotypic fusion. *The Journal of Cell Biology* 216, 425–439.

De Domenico, I., Ward, D.M., Langelier, C., Vaughn, M.B., Nemeth, E., Sundquist, W.I., Ganz, T., Musci, G., and Kaplan, J. (2007). The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol. Biol. Cell* 18, 2569–2578.

De Franceschi, L., Bertoldi, M., De Falco, L., Santos Franco, S., Ronzoni, L., Turrini, F., Colancecco, A., Camaschella, C., Cappellini, M.D., and Iolascon, A. (2011). Oxidative stress modulates heme synthesis and induces peroxiredoxin-2 as a novel cytoprotective response in  $\beta$ -thalassemic erythropoiesis. *Haematologica* 96, 1595–1604.

Dean, C.R., and Poole, K. (1993). Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (pfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175, 317–324.

Deng, Y., Guo, Y., Watson, H., Au, W.-C., Shakoury-Elizeh, M., Basrai, M.A., Bonifacino, J.S., and Philpott, C.C. (2009). Gga2 mediates sequential ubiquitin-independent and ubiquitin-dependent steps in the trafficking of Arn1 from the trans-Golgi network to the vacuole. *J. Biol. Chem.* 284, 23830–23841.

Desuzinges-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huché, F., Di Pietro, A., and Falson, P. (2010). ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J. Biol. Chem.* 285, 33123–33133.

Detienne, G., De Haes, W., Mergan, L., Edwards, S.L., Temmerman, L., and Van Bael, S. (2018). Beyond ROS clearance: Peroxiredoxins in stress signaling and aging. *Ageing Res. Rev.* 44, 33–48.

Dlouhy, A.C., Beaudoin, J., Labbé, S., and Outten, C.E. (2017). *Schizosaccharomyces pombe* Grx4 regulates the transcriptional repressor Php4 via [2Fe-2S] cluster binding. *Metallomics* 9, 1096–1105.

Drakesmith, H., Nemeth, E., and Ganz, T. (2015). Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* 22, 777–787.

Duffy, S.P., Shing, J., Saraon, P., Berger, L.C., Eiden, M.V., Wilde, A., and Tailor, C.S. (2010). The Fowler syndrome-associated protein FLVCR2 is an importer of heme. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5318–5324.

Dupont, C.L., Yang, S., Palenik, B., and Bourne, P.E. (2006). Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17822–17827.

Ekworomadu, M.T., Poor, C.B., Owens, C.P., Balderas, M.A., Fabian, M., Olson, J.S., Murphy, F., Bakkalbasi, E., Balkabasi, E., Honsa, E.S., et al. (2012). Differential function of

lip residues in the mechanism and biology of an anthrax hemophore. *PLoS Pathog.* *8*, e1002559.

Encinar del Dedo, J., Gabrielli, N., Carmona, M., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2015). A cascade of iron-containing proteins governs the genetic iron starvation response to promote iron uptake and inhibit iron storage in fission yeast. *PLoS Genet.* *11*, e1005106.

Flannery, A.R., Renberg, R.L., and Andrews, N.W. (2013). Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania*. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 716–721.

Foster, A.W., Osman, D., and Robinson, N.J. (2014). Metal preferences and metallation. *J. Biol. Chem.* *289*, 28095–28103.

Frazer, D.M., and Anderson, G.J. (2014). The regulation of iron transport. *Biofactors* *40*, 206–214.

Fuqua, B.K., Vulpe, C.D., and Anderson, G.J. (2012). Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol* *26*, 115–119.

Ganz, T. (2011). Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* *117*, 4425–4433.

Ganz, T. (2012). Macrophages and systemic iron homeostasis. *J Innate Immun* *4*, 446–453.

Ghysels, B., Ochsner, U., Möllman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P., and Matthijs, S. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* *pirA* gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* *246*, 167–174.

Grigg, J.C., Vermeiren, C.L., Heinrichs, D.E., and Murphy, M.E.P. (2007). Haem recognition by a *Staphylococcus aureus* NEAT domain. *Mol. Microbiol.* *63*, 139–149.

Grigg, J.C., Ukpabi, G., Gaudin, C.F.M., and Murphy, M.E.P. (2010). Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J. Inorg. Biochem.* *104*, 341–348.

Gruss, A., Borezée-Durant, E., and Lechardeur, D. (2012). Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* *61*, 69–124.

Gulec, S., Anderson, G.J., and Collins, J.F. (2014). Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *307*, G397–409.

Gunaratne, J., Schmidt, A., Quandt, A., Neo, S.P., Saraç, O.S., Gracia, T., Loguercio, S., Ahrné, E., Xia, R.L.H., Tan, K.H., et al. (2013). Extensive mass spectrometry-based analysis of the fission yeast proteome: the *Schizosaccharomyces pombe* PeptideAtlas. *Mol. Cell Proteomics* *12*, 1741–1751.

Hall, A., Parsonage, D., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2010). Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition state stabilization. *J Mol Biol* *402*, 194–209.

- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters* 307, 108–112.
- Hammacott, J.E., Williams, P.H., and Cashmore, A.M. (2000). *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* fre1 mutant. *Microbiology (Reading, Engl.)* 146 ( Pt 4), 869–876.
- Hamza, I. (2006). Intracellular Trafficking of Porphyrins. *ACS Chem Biol* 1, 627–629.
- Hamza, I., and Dailey, H.A. (2012). One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1617–1632.
- Han, O. (2011). Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics* 3, 103–109.
- Hanna, D.A., Harvey, R.M., Martinez-Guzman, O., Yuan, X., Chandrasekharan, B., Raju, G., Outten, F.W., Hamza, I., and Reddi, A.R. (2016). Heme dynamics and trafficking factors revealed by genetically encoded fluorescent heme sensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 7539–7544.
- Hannibal, L., Collins, D., Brassard, J., Chakravarti, R., Vempati, R., Dorlet, P., Santolini, J., Dawson, J.H., and Stuehr, D.J. (2012). Heme binding properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 51, 8514–8529.
- Hassett, R.F., Yuan, D.S., and Kosman, D.J. (1998). Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. *J. Biol. Chem.* 273, 23274–23282.
- Heymann, P., Ernst, J.F., and Winkelmann, G. (2000). Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 221–227.
- Heymann, P., Gerads, M., Schaller, M., Dromer, F., Winkelmann, G., and Ernst, J.F. (2002). The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect. Immun.* 70, 5246–5255.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509–547.
- Hon, T., Lee, H.C., Hu, Z., Iyer, V.R., and Zhang, L. (2005). The heme activator protein Hap1 represses transcription by a heme-independent mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 169, 1343–1352.

- Honsa, E.S., Maresso, A.W., and Highlander, S.K. (2014). Molecular and evolutionary analysis of NEAr-iron Transporter (NEAT) domains. *PLoS ONE* *9*, e104794.
- Hood, M.I., and Skaar, E.P. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology* *10*, 525–537.
- Horazdovsky, B.F., Cowles, C.R., Mustol, P., Holmes, M., and Emr, S.D. (1996). A novel RING finger protein, Vps8p, functionally interacts with the small GTPase, Vps21p, to facilitate soluble vacuolar protein localization. *J. Biol. Chem.* *271*, 33607–33615.
- Hu, G., Caza, M., Cadieux, B., Bakkeren, E., Do, E., Jung, W.H., and Kronstad, J.W. (2015). The endosomal sorting complex required for transport machinery influences haem uptake and capsule elaboration in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* *96*, 973–992.
- Huerta-Cepas, J., Capella-Gutiérrez, S., Pryszcz, L.P., Marcet-Houben, M., and Gabaldón, T. (2014). PhylomeDB v4: zooming into the plurality of evolutionary histories of a genome. *Nucleic Acids Res.* *42*, D897–902.
- Hvidberg, V., Maniecki, M.B., Jacobsen, C., Højrup, P., Møller, H.J., and Moestrup, S.K. (2005). Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* *106*, 2572–2579.
- Ingrell, C.R., Miller, M.L., Jensen, O.N., and Blom, N. (2007). NetPhosYeast: prediction of protein phosphorylation sites in yeast. *Bioinformatics* *23*, 895–897.
- Irving, H., and Williams, R.J.P. (1948). Order of Stability of Metal Complexes. *Nature* *162*, 746–747.
- Iwahara, S., Satoh, H., Song, D.X., Webb, J., Burlingame, A.L., Nagae, Y., and Muller-Eberhard, U. (1995). Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol. *Biochemistry* *34*, 13398–13406.
- Jacob, C., Holme, A.L., and Fry, F.H. (2004). The sulfinic acid switch in proteins. *Org. Biomol. Chem.* *2*, 1953–1956.
- Jacques, J.-F., Mercier, A., Brault, A., Mourer, T., and Labbé, S. (2014). Fra2 is a co-regulator of Fep1 inhibition in response to iron starvation. *PLoS ONE* *9*, e98959.
- Jara, M., Vivancos, A.P., and Hidalgo, E. (2008). C-terminal truncation of the peroxiredoxin Tpx1 decreases its sensitivity for hydrogen peroxide without compromising its role in signal transduction. *Genes Cells* *13*, 171–179.
- Jardetzky, O. (1966). Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* *211*, 969–970.
- Jbel, M., Mercier, A., Pelletier, B., Beaudoin, J., and Labbé, S. (2009). Iron activates in vivo DNA binding of *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Fep1 through its amino-terminal region. *Eukaryotic Cell* *8*, 649–664.

- Jbel, M., Mercier, A., and Labbé, S. (2011). Grx4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1. *Eukaryotic Cell* 10, 629–645.
- Jönsson, T.J., Johnson, L.C., and Lowther, W.T. (2008). Structure of the sulphiredoxin-peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature* 451, 98–101.
- Jung, W.H., Hu, G., Kuo, W., and Kronstad, J.W. (2009). Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 8, 1511–1520.
- Kang, S.W., Chae, H.Z., Seo, M.S., Kim, K., Baines, I.C., and Rhee, S.G. (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 273, 6297–6302.
- Kaplan, J., and Ward, D.M. (2013). The essential nature of iron usage and regulation. *Curr. Biol.* 23, R642-646.
- Keel, S.B., Doty, R.T., Yang, Z., Quigley, J.G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P.D., De Domenico, I., Vaughn, M.B., Kaplan, J., et al. (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319, 825–828.
- Kelley, L.A., and Sternberg, M.J.E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4, 363–371.
- Ketley, J.N., Habig, W.H., and Jakoby, W.B. (1975). Binding of nonsubstrate ligands to the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 250, 8670–8673.
- Kettenbach, A.N., Deng, L., Wu, Y., Baldissard, S., Adamo, M.E., Gerber, S.A., and Moseley, J.B. (2015). Quantitative phosphoproteomics reveals pathways for coordination of cell growth and division by the conserved fission yeast kinase pom1. *Mol. Cell Proteomics* 14, 1275–1287.
- Khalifaoui-Hassani, B., Verissimo, A.F., Koch, H.-G., and Daldal, F. (2016). Uncovering the transmembrane metal binding site of the novel bacterial major facilitator superfamily-type copper Importer CcoA. *MBio* 7, e01981-01915.
- Khan, A.A., and Quigley, J.G. (2011). Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 668–682.
- Khan, A.A., and Quigley, J.G. (2013). Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Mol. Aspects Med.* 34, 669–682.
- Khan, M.G.M., Jacques, J.-F., Beaudoin, J., and Labbé, S. (2014). Characterization of the nuclear import mechanism of the CCAAT-regulatory subunit Php4. *PLoS ONE* 9, e110721.
- Kim, H.J., Khalimonchuk, O., Smith, P.M., and Winge, D.R. (2012). Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1604–1616.

- Kim, H.-J., Lee, K.-L., Kim, K.-D., and Roe, J.-H. (2016). The iron uptake repressor Fep1 in the fission yeast binds Fe-S cluster through conserved cysteines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *478*, 187–192.
- Kim, J.S., Bang, M.-A., Lee, S., Chae, H.Z., and Kim, K. (2010). Distinct functional roles of peroxiredoxin isozymes and glutathione peroxidase from fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *BMB Rep* *43*, 170–175.
- Kim, Y., Yun, C.-W., and Philpott, C.C. (2002). Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *21*, 3632–3642.
- Kim, Y., Lampert, S.M., and Philpott, C.C. (2005). A receptor domain controls the intracellular sorting of the ferrichrome transporter, Arn1. *EMBO J.* *24*, 952–962.
- Knight, S.A.B., Lesuisse, E., Stearman, R., Klausner, R.D., and Dancis, A. (2002). Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. *Microbiology (Reading, Engl.)* *148*, 29–40.
- Knutson, M.D., Oukka, M., Koss, L.M., Aydemir, F., and Wessling-Resnick, M. (2005). Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 1324–1328.
- Kochan, I. (1973). The role of iron in bacterial infections, with special consideration of host-tubercle bacillus interaction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *60*, 1–30.
- Kořený, L., Oborník, M., and Lukeš, J. (2013). Make It, take It, or leave It: heme metabolism of parasites. *PLOS Pathogens* *9*, e1003088.
- Korolnek, T., and Hamza, I. (2014). Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism. *Front Pharmacol* *5*, 126.
- Korolnek, T., and Hamza, I. (2015). Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood* *125*, 2893–2897.
- Kouranti, I., McLean, J.R., Feoktistova, A., Liang, P., Johnson, A.E., Roberts-Galbraith, R.H., and Gould, K.L. (2010). A global census of fission yeast deubiquitinating enzyme localization and interaction networks reveals distinct compartmentalization profiles and overlapping functions in endocytosis and polarity. *PLoS Biol.* *8*.
- Kresge, N., Simoni, R.D., and Hill, R.L. (2006). A pathway for heme biosynthesis: the work of David Shemin. *J. Biol. Chem.* *281*, e28–e28.

- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* *409*, 198–201.
- Kulkarni, R.D., and Dean, R.A. (2004). Identification of proteins that interact with two regulators of appressorium development, adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase A, in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Genet. Genomics* *270*, 497–508.
- Kulkarni, R.D., Kelkar, H.S., and Dean, R.A. (2003). An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 118–121.
- Kuznets, G., Vigonsky, E., Weissman, Z., Lalli, D., Gildor, T., Kauffman, S.J., Turano, P., Becker, J., Lewinson, O., and Kornitzer, D. (2014). A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog.* *10*, e1004407.
- Labbé, S., Peña, M.M., Fernandes, A.R., and Thiele, D.J. (1999). A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* *274*, 36252–36260.
- Lane, D.J.R., Bae, D.-H., Merlot, A.M., Sahni, S., and Richardson, D.R. (2015). Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. *Nutrients* *7*, 2274–2296.
- Lauwers, E., Grossmann, G., and André, B. (2007). Evidence for coupled biogenesis of yeast Gap1 permease and sphingolipids: essential role in transport activity and normal control by ubiquitination. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3068–3080.
- Law, C.J., Maloney, P.C., and Wang, D.-N. (2008). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu. Rev. Microbiol.* *62*, 289–305.
- Le Blanc, S., Garrick, M.D., and Arredondo, M. (2012). Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *302*, C1780–1785.
- Lechardeur, D., Fernandez, A., Robert, B., Gaudu, P., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., and Gruss, A. (2010). The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase c binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*. *J. Biol. Chem.* *285*, 16032–16041.
- Lee, H.C., Hon, T., and Zhang, L. (2002). The molecular chaperone Hsp90 mediates heme activation of the yeast transcriptional activator Hap1. *J. Biol. Chem.* *277*, 7430–7437.
- Leimberg, M.J., Prus, E., Konijn, A.M., and Fibach, E. (2008). Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *J. Cell. Biochem.* *103*, 1211–1218.

- Liu, J., Sitaram, A., and Burd, C.G. (2007). Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic* 8, 1375–1384.
- Liu, X.-B., Nguyen, N.-B.H., Marquess, K.D., Yang, F., and Haile, D.J. (2005). Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 47–56.
- Mamouei, Z., Zeng, G., Wang, Y.-M., and Wang, Y. (2017). *Candida albicans* possess a highly versatile and dynamic high-affinity iron transport system important for its commensal-pathogenic lifestyle. *Mol. Microbiol.* 106, 986–998.
- Manevich, Y., Feinstein, S.I., and Fisher, A.B. (2004). Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3780–3785.
- Martínez-Pastor, M.T., de Llanos, R., Romero, A.M., and Puig, S. (2013). Post-transcriptional regulation of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Mol Sci* 14, 15785–15809.
- Martins, L.J., Jensen, L.T., Simon, J.R., Keller, G.L., Winge, D.R., and Simons, J.R. (1998). Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 23716–23721.
- Massé, E., Salvail, H., Desnoyers, G., and Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 140–145.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., et al. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* 24, 841–847.
- Mayer, F.L., Wilson, D., and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4, 119–128.
- McDermid, J.M., and Prentice, A.M. (2006). Iron and infection: effects of host iron status and the iron-regulatory genes haptoglobin and NRAMP1 (SLC11A1) on host-pathogen interactions in tuberculosis and HIV. *Clin. Sci.* 110, 503–524.
- Mercier, A., and Labbé, S. (2009). Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1. *J. Biol. Chem.* 284, 20249–20262.
- Mercier, A., and Labbé, S. (2010). Iron-dependent remodeling of fungal metabolic pathways associated with ferrichrome biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3806–3817.

- Mercier, A., Watt, S., Bähler, J., and Labbé, S. (2008). Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryotic Cell* 7, 493–508.
- Michels, K., Nemeth, E., Ganz, T., and Mehrad, B. (2015). Heparin and host defense against infectious diseases. *PLoS Pathog.* 11, e1004998.
- Miller, A.-F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 586, 585–595.
- Mochon, A.B., Jin, Y., Ye, J., Kayala, M.A., Wingard, J.R., Clancy, C.J., Nguyen, M.H., Felgner, P., Baldi, P., and Liu, H. (2010). Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathog.* 6, e1000827.
- Moore, R.E., Kim, Y., and Philpott, C.C. (2003). The mechanism of ferrichrome transport through Arn1p and its metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5664–5669.
- Mourer, T., Jacques, J.-F., Brault, A., Bisailon, M., and Labbé, S. (2015). Shu1 is a cell-surface protein involved in iron acquisition from heme in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 290, 10176–10190.
- Mourer, T., Normant, V., and Labbé, S. (2017). Heme assimilation in *Schizosaccharomyces pombe* requires cell-surface-anchored protein Shu1 and vacuolar transporter Abc3. *J. Biol. Chem.* 292, 4898–4912.
- Mu, Z.M., Yin, X.Y., and Prochownik, E.V. (2002). Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression. *J. Biol. Chem.* 277, 43175–43184.
- Myers, M.D., and Payne, G.S. (2017). Vps13 and Cdc31/centrin: puzzling partners in membrane traffic. *The Journal of Cell Biology* 216, 299–301.
- Nasser, L., Weissman, Z., Pinsky, M., Amartely, H., Dvir, H., and Kornitzer, D. (2016). Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. *Nat Microbiol* 1, 16156.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., and Kaplan, J. (2004). Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090–2093.
- Neumann, C.A., Krause, D.S., Carman, C.V., Das, S., Dubey, D.P., Abraham, J.L., Bronson, R.T., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., and Van Etten, R.A. (2003). Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 424, 561–565.

- Nevitt, T., and Thiele, D.J. (2011). Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. *PLoS Pathog.* *7*, e1001322.
- Nicolussi, A., D’Inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G., and Coppa, A. (2017). The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol* *6*, 139–153.
- Nielsen, M.J., and Moestrup, S.K. (2009). Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. *Blood* *114*, 764–771.
- Nishino, K., Kushima, M., Matsuo, Y., Matsuo, Y., and Kawamukai, M. (2015). Cell Lysis in *S. pombe* *ura4* Mutants Is Suppressed by Loss of Functional Pub1, Which Regulates the Uracil Transporter Fur4. *PLoS ONE* *10*, e0141796.
- Noh, D.Y., Ahn, S.J., Lee, R.A., Kim, S.W., Park, I.A., and Chae, H.Z. (2001). Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res.* *21*, 2085–2090.
- Nonn, L., Berggren, M., and Powis, G. (2003). Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol. Cancer Res.* *1*, 682–689.
- de Oliveira Santos, G.C., Vasconcelos, C.C., Lopes, A.J.O., de Sousa Cartágenes, M. do S., Filho, A.K.D.B., do Nascimento, F.R.F., Ramos, R.M., Pires, E.R.R.B., de Andrade, M.S., Rocha, F.M.G., et al. (2018). *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Front Microbiol* *9*, 1351.
- Ooi, C.E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. (1996). Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* *15*, 3515–3523.
- Ortiz, A.R., Strauss, C.E.M., and Olmea, O. (2002). MAMMOTH (matching molecular models obtained from theory): an automated method for model comparison. *Protein Sci.* *11*, 2606–2621.
- Palis, J. (2014). Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front. Physiol.* *5*.
- Palmer, L.D., and Skaar, E.P. (2016). Transition metals and virulence in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* *50*, 67–91.
- Palombo, I., and Daley, D.O. (2012). Heme incorporation into the cytochrome bo3 occurs at a late stage of assembly. *FEBS Lett.* *586*, 4197–4202.
- Papanikolaou, G., and Pantopoulos, K. (2017). Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB Life* *69*, 399–413.
- Park, S.H., Chung, Y.M., Lee, Y.S., Kim, H.J., Kim, J.S., Chae, H.Z., and Yoo, Y.D. (2000). Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. *Clin. Cancer Res.* *6*, 4915–4920.

- Paulo, E., García-Santamarina, S., Calvo, I.A., Carmona, M., Boronat, S., Domènech, A., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2014). A genetic approach to study H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in fission yeast--distinct roles of peroxiredoxin and catalase. *Mol. Microbiol.* *92*, 246–257.
- Pelletier, B., Beaudoin, J., Philpott, C.C., and Labbé, S. (2003). Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. *Nucleic Acids Res.* *31*, 4332–4344.
- Pelletier, B., Trott, A., Morano, K.A., and Labbé, S. (2005). Functional characterization of the iron-regulatory transcription factor Fep1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* *280*, 25146–25161.
- Pena, M.M., Puig, S., and Thiele, D.J. (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J. Biol. Chem.* *275*, 33244–33251.
- Pérez, A., Pedrós, B., Murgui, A., Casanova, M., López-Ribot, J.L., and Martínez, J.P. (2006). Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. *FEMS Yeast Res.* *6*, 1074–1084.
- Perkins, A., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2014). Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles. *Biochemistry* *53*, 7693–7705.
- Petrak, J., and Vyoral, D. (2005). Hephaestin--a ferroxidase of cellular iron export. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *37*, 1173–1178.
- Pietrangelo, A. (2017). Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica* *102*, 1972–1984.
- Poss, K.D., and Tonegawa, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 10925–10930.
- Protchenko, O., Shakoury-Elizeh, M., Keane, P., Storey, J., Androphy, R., and Philpott, C.C. (2008). Role of PUG1 in inducible porphyrin and heme transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* *7*, 859–871.
- Quigley, J.G., Burns, C.C., Anderson, M.M., Lynch, E.D., Sabo, K.M., Overbaugh, J., and Abkowitz, J.L. (2000). Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood* *95*, 1093–1099.
- Quigley, J.G., Yang, Z., Worthington, M.T., Phillips, J.D., Sabo, K.M., Sabath, D.E., Berg, C.L., Sassa, S., Wood, B.L., and Abkowitz, J.L. (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* *118*, 757–766.
- Quigley, J.G., Gazda, H., Yang, Z., Ball, S., Sieff, C.A., and Abkowitz, J.L. (2005). Investigation of a putative role for FLVCR, a cytoplasmic heme exporter, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood Cells Mol. Dis.* *35*, 189–192.

- Quistgaard, E.M., Löw, C., Guettou, F., and Nordlund, P. (2016). Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 123–132.
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G., and Iakoucheva, L.M. (2010). Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* *78*, 365–380.
- Rajagopal, A., Rao, A.U., Amigo, J., Tian, M., Upadhyay, S.K., Hall, C., Uhm, S., Mathew, M.K., Fleming, M.D., Paw, B.H., et al. (2008). Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* *453*, 1127–1131.
- Ramanan, N., and Wang, Y. (2000). A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* *288*, 1062–1064.
- Rao, A.U., Carta, L.K., Lesuisse, E., and Hamza, I. (2005). Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 4270–4275.
- Renberg, R.L., Yuan, X., Samuel, T.K., Miguel, D.C., Hamza, I., Andrews, N.W., and Flannery, A.R. (2015). The heme transport capacity of LHR1 determines the extent of virulence in *Leishmania amazonensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* *9*, e0003804.
- Rhee, S.G., Chae, H.Z., and Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* *38*, 1543–1552.
- Robert, X., and Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* *42*, W320–W324.
- Rolfs, A., and Hediger, M.A. (1999). Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications. *J Physiol* *518*, 1–12.
- Roman, D.G., Dancis, A., Anderson, G.J., and Klausner, R.D. (1993). The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4342–4350.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* *5*, 725–738.
- Sabatinos, S.A., and Forsburg, S.L. (2010). Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth. Enzymol.* *470*, 759–795.
- Saikia, S., Oliveira, D., Hu, G., and Kronstad, J. (2014). Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* *82*, 839–850.

- Sakurada, T., and Matsumura, H. (1966). Effects of glucose on heme biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Keio J Med* 15, 51–53.
- Santos, R., Buisson, N., Knight, S., Dancis, A., Camadro, J.-M., and Lesuisse, E. (2003). Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 579–588.
- Saraste, M. (1999). Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283, 1488–1493.
- Sardi, J.C.O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., and Mendes Giannini, M.J.S. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* 62, 10–24.
- Schade, A.L., and Caroline, L. (1944). Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 100, 14–15.
- Schaer, C.A., Vallelian, F., Imhof, A., Schoedon, G., and Schaer, D.J. (2008). Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 83, 325–333.
- Schalk, I.J., and Cunrath, O. (2016). An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 18, 3227–3246.
- Schiffmann, E., and Shemin, D. (1957). Further studies on the utilization of delta-aminolevulinic acid for porphyrin synthesis. *J. Biol. Chem.* 225, 623–628.
- Schryvers, A.B., and Stojiljkovic, I. (1999). Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* 32, 1117–1123.
- Severance, S., Chakraborty, S., and Kosman, D.J. (2004). The Ftr1p iron permease in the yeast plasma membrane: orientation, topology and structure-function relationships. *Biochem. J.* 380, 487–496.
- Sharp, K.H., Schneider, S., Cockayne, A., and Paoli, M. (2007). Crystal structure of the heme-IsdC complex, the central conduit of the Isd iron/heme uptake system in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 282, 10625–10631.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., et al. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122, 789–801.
- Sheldon, J.R., Laakso, H.A., and Heinrichs, D.E. (2016). Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. *Microbiol Spectr* 4.
- Shi, Y. (2013). Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys* 42, 51–72.

- Sievers, F., and Higgins, D.G. (2014). Clustal omega. *Curr Protoc Bioinformatics* 48, 3.13.1-16.
- Spiro, T.G., Allerton, S.E., Renner, J., Terzis, A., Bils, R., and Saltman, P. (1966). The hydrolytic polymerization of iron(III). *Journal of the American Chemical Society* 88, 2721–2726.
- Spizzo, T., Byersdorfer, C., Duesterhoeft, S., and Eide, D. (1997). The yeast FET5 gene encodes a FET3-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol. Gen. Genet.* 256, 547–556.
- Springael, J.Y., and André, B. (1998). Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 1253–1263.
- Swaffer, M.P., Jones, A.W., Flynn, H.R., Snijders, A.P., and Nurse, P. (2018). Quantitative phosphoproteomics reveals the signaling dynamics of cell-cycle kinases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Rep* 24, 503–514.
- Sweeny, E.A., Singh, A.B., Chakravarti, R., Martinez-Guzman, O., Saini, A., Haque, M.M., Garee, G., Dans, P.D., Hannibal, L., Reddi, A.R., et al. (2018). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a chaperone that allocates labile heme in cells. *J. Biol. Chem.*
- Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K., Yoshida, T., and Kishi, F. (2000). Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 22220–22228.
- Taylor, C.S., Willett, B.J., and Kabat, D. (1999). A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. *J. Virol.* 73, 6500–6505.
- Thomsen, J.H., Etzerodt, A., Svendsen, P., and Moestrup, S.K. (2013). The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 523652.
- Tripodi, K.E.J., Menendez Bravo, S.M., and Cricco, J.A. (2011). Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *Enzyme Res* 2011, 873230.
- Vachon, P., Mercier, A., Jbel, M., and Labbé, S. (2012). The monothiol glutaredoxin Grx4 exerts an iron-dependent inhibitory effect on Php4 function. *Eukaryotic Cell* 11, 806–819.
- Veal, E.A., Findlay, V.J., Day, A.M., Bozonet, S.M., Evans, J.M., Quinn, J., and Morgan, B.A. (2004). A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol. Cell* 15, 129–139.

- Veal, E.A., Tomalin, L.E., Morgan, B.A., and Day, A.M. (2014). The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a model to understand how peroxiredoxins influence cell responses to hydrogen peroxide. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 909–916.
- Vetrano, A.M., Heck, D.E., Mariano, T.M., Mishin, V., Laskin, D.L., and Laskin, J.D. (2005). Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *J. Biol. Chem.* *280*, 35372–35381.
- Vincent, S.H., and Muller-Eberhard, U. (1985). A protein of the Z class of liver cytosolic proteins in the rat that preferentially binds heme. *J. Biol. Chem.* *260*, 14521–14528.
- Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Biteau, B., Nicot, C., Ayté, J., Toledano, M.B., and Hidalgo, E. (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 8875–8880.
- Vivancos, A.P., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M., and Hidalgo, E. (2006). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Mol. Genet. Genomics* *276*, 495–502.
- Waldron, K.J., Rutherford, J.C., Ford, D., and Robinson, N.J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. *Nature* *460*, 823–830.
- Wass, M.N., Kelley, L.A., and Sternberg, M.J.E. (2010). 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Res.* *38*, W469-473.
- Watanabe, Y., Ishimori, K., and Uchida, T. (2017). Dual role of the active-center cysteine in human peroxiredoxin 1: Peroxidase activity and heme binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *483*, 930–935.
- Weissman, Z., and Kornitzer, D. (2004). A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Mol. Microbiol.* *53*, 1209–1220.
- Weissman, Z., Shemer, R., Conibear, E., and Kornitzer, D. (2008). An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* *69*, 201–217.
- White, C., Yuan, X., Schmidt, P.J., Bresciani, E., Samuel, T.K., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M.L., Lapierre, A., et al. (2013). HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metab.* *17*, 261–270.
- Wilson-Grady, J.T., Villén, J., and Gygi, S.P. (2008). Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J. Proteome Res.* *7*, 1088–1097.

- Wonsey, D.R., Zeller, K.I., and Dang, C.V. (2002). The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 6649–6654.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* *300*, 650–653.
- Yamada-Okabe, T., Shimmi, O., Doi, R., Mizumoto, K., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1996). Isolation of the mRNA-capping enzyme and ferric-reductase-related genes from *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)* *142 ( Pt 9)*, 2515–2523.
- Yan, N. (2015). Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annu Rev Biophys* *44*, 257–283.
- Yang, F., Liu, X.-B., Quinones, M., Melby, P.C., Ghio, A., and Haile, D.J. (2002). Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *J. Biol. Chem.* *277*, 39786–39791.
- Yin, Y., He, X., Szewczyk, P., Nguyen, T., and Chang, G. (2006). Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science* *312*, 741–744.
- Yuan, X., Rietzschel, N., Kwon, H., Walter Nuno, A.B., Hanna, D.A., Phillips, J.D., Raven, E.L., Reddi, A.R., and Hamza, I. (2016). Regulation of intracellular heme trafficking revealed by subcellular reporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *113*, E5144–5152.
- Zhang, L., and Hach, A. (1999). Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell. Mol. Life Sci.* *56*, 415–426.
- Zhang, Y., and Skolnick, J. (2005). TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2302–2309.
- Zhang, T., Bu, P., Zeng, J., and Vancura, A. (2017). Increased heme synthesis in yeast induces a metabolic switch from fermentation to respiration even under conditions of glucose repression. *J. Biol. Chem.* *292*, 16942–16954.
- Ziegler, L., Terzulli, A., Gaur, R., McCarthy, R., and Kosman, D.J. (2011). Functional characterization of the ferroxidase, permease high-affinity iron transport complex from *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* *81*, 473–485.
- Znaidi, S., Pelletier, B., Mukai, Y., and Labbé, S. (2004). The *Schizosaccharomyces pombe* corepressor Tup11 interacts with the iron-responsive transcription factor Fep1. *J. Biol. Chem.* *279*, 9462–9474.

## ANNEXES

### ARTICLE 2

#### **An antisense RNA-mediated mechanism eliminates a meiosis-specific copper-regulated transcript in mitotic cells.**

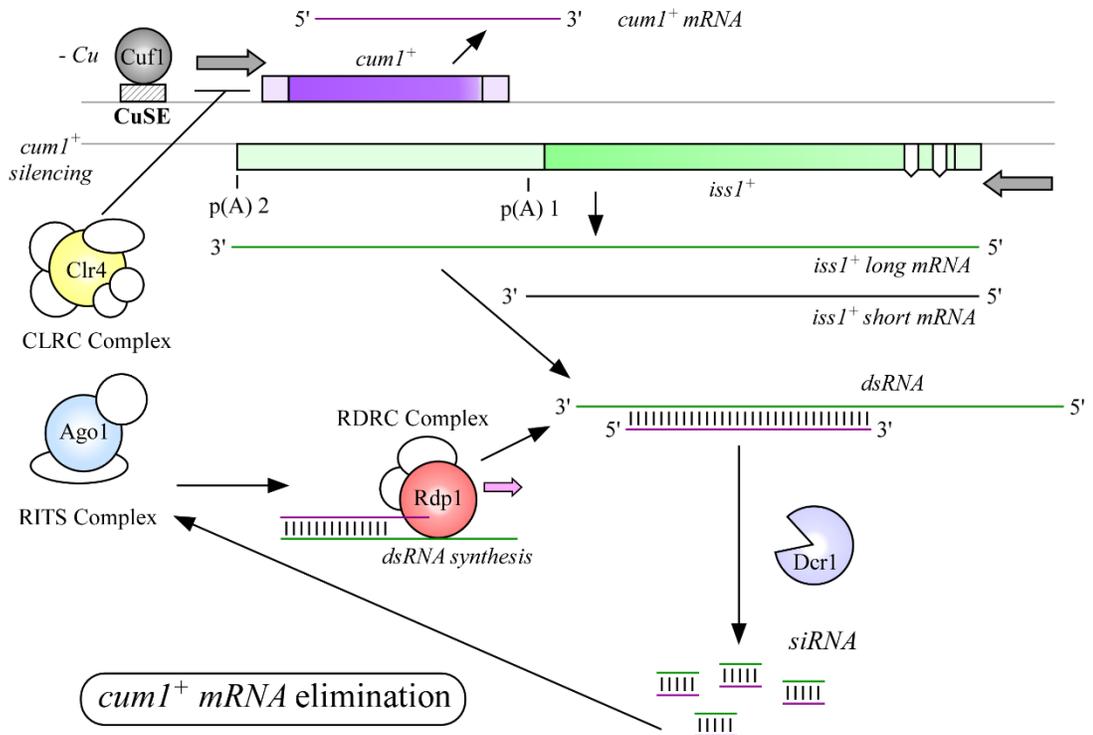
**Auteurs de l'article :** Vincent Normant, Jude Beaudoin et Simon Labbé

**Statut de l'article :** publié dans *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 11; 290(37) : 22622-22637.

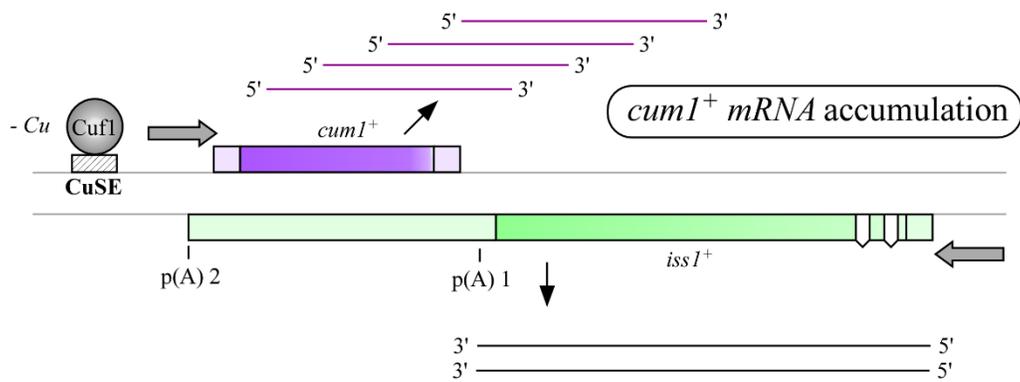
**Avant-propos :** J'ai généré 90% des données présentées dans les figures de ce manuscrit. Certaines souches et outils moléculaires ont été produits par JB. Les figures finales ont été produites par VN et SL. J'ai participé activement à l'écriture du manuscrit.

**Résumé :** Dans cette étude, nous avons montré que le gène *issI*<sup>+</sup> produit deux transcrits, l'un possédant une longue région 3'UTR et l'autre une courte. La longue région 3'UTR de *issI*<sup>+</sup> est complémentaire à la séquence codante du gène *cumI*<sup>+</sup> et inhibe son expression dans les cellules en phase végétative. Le gène *cumI*<sup>+</sup> est spécifiquement exprimé en méiose et n'est pas détectable dans les cellules végétatives mitotiques. Le promoteur de *cumI*<sup>+</sup> possède des éléments CuSE (*copper signaling elements*) qui permettent la liaison de Cuf1 à ce dernier en carence de cuivre. Le découplage de la région promotrice de *cumI*<sup>+</sup> permet l'expression d'un gène rapporteur hétérologue *lacZ* régulé de façon cuivre et Cuf1-dépendante. L'insertion d'un PAS (*polyadenylation signal*) immédiatement en aval de la séquence codante de *issI*<sup>+</sup> induit une accumulation d'ARNm de *cumI*<sup>+</sup> en mitose en absence de cuivre. La délétion de certains gènes codants pour des composantes de la machinerie d'ARN interférence (ARNi) provoque également une accumulation d'ARNm de *cumI*<sup>+</sup> en absence de cuivre. Ces résultats suggèrent la formation d'un hétéro duplexe ARN-ARN entre *cumI*<sup>+</sup> et le long transcrit de *issI*<sup>+</sup> qui serait ensuite pris en charge par la machinerie ARNi. Ces résultats démontrent pour la première fois l'existence d'un gène méiotique régulé de façon cuivre dépendante et éliminé en mitose par un mécanisme de transcription antisens.

## Mitosis



## Meiosis



## ABSTRACT

Sense and antisense transcripts produced from convergent gene pairs could interfere with the expression of either partner gene. In *Schizosaccharomyces pombe*, we found that the *iss1*<sup>+</sup> gene produces two transcript isoforms, including a long antisense mRNA that is complementary to the meiotic *cum1*<sup>+</sup> sense transcript, inhibiting *cum1*<sup>+</sup> expression in vegetative cells. Inhibition of *cum1*<sup>+</sup> transcription was not at the level of its initiation because fusion of the *cum1*<sup>+</sup> promoter to the *lacZ* gene showed that activation of the reporter gene occurs in response to low copper conditions. Further analysis showed that the transcription factor Cuf1 and conserved copper-signaling elements (CuSEs) are required for induction of *cum1*<sup>+</sup>-*lacZ* transcription under copper deficiency. Insertion of a multipartite polyadenylation signal immediately downstream of *iss1*<sup>+</sup> led to the exclusive production of a shorter *iss1*<sup>+</sup> mRNA isoform, thereby allowing accumulation of *cum1*<sup>+</sup> sense mRNA in copper-limited vegetative cells. This finding suggested that the long *iss1*<sup>+</sup> antisense mRNA could pair with *cum1*<sup>+</sup> sense mRNA, thereby producing double-stranded RNA molecules, which could induce RNAi. We consistently found that mutant strains for RNAi (*dcr1Δ*, *ago1Δ*, *rdp1Δ*, and *clr4Δ*) are defective in selectively eliminating *cum1*<sup>+</sup> sense transcript in the G1 phase of the cell cycle. Taken together, these results describe the first example of a copper-regulated meiotic gene represses by an antisense transcription mechanism in vegetative cells.

## INTRODUCTION

During most of its life cycle, the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is haploid and undergoes mitotic proliferation (1). Under poor nitrogen supply conditions, *S. pombe* cells arrest in the G1 phase of the cell cycle and conjugate with cells of the opposite mating type. Conjugation leads to the formation of precursor diploid cells that can undergo the meiotic program. Once in meiosis, diploid cells replicate their genetic material, producing pairs of homologous chromosomes. Following genetic recombination between homologous chromosomes, two successive nuclear divisions occur without an intervening S-phase, generating four haploid sets of chromosomes, termed chromatids. Each set of chromatids is then enclosed in a forespore, resulting in four spores that are protected within an ascus. Although the meiotic program requires general components (e.g. spindles, centrosomes and

kinetochores) as the mitotic program, several genes encode proteins that are unique to meiosis (2,3). Importantly, it has been shown that untimely expression of meiotic genes in cells undergoing mitotic proliferation could be detrimental (4,5). Therefore, cells have developed different mechanisms to ensure elimination of meiosis-specific transcripts in cells undergoing mitotic growth.

One mechanism of mRNA elimination involves a region denoted DSR (*Determinant for Selective Removal*) that is found in several meiosis-specific transcripts in fission yeast (6,7). In cells undergoing mitotic growth, RNA-binding protein Mmi1 binds to a DSR region and then triggers transcript elimination with the aid of an RNA-degradation system (5,8,9). In the case of cells entering into meiosis, meiotic protein Mei2 sequesters Mmi1 in a nuclear dot structure, preventing its action, thus allowing meiosis-specific transcripts to become stable and competent to be expressed in meiotic and sporulating cells.

An additional mechanism involves production of RNA molecules that are antisense to protein coding transcripts (mRNAs) (10,11). The open reading frame or DNA region that produces an antisense transcript can be located in the neighborhood (e.g. on the opposite DNA strand) of the gene from which the sense mRNA strand is produced (12-14). An antisense transcript can also be produced at a distinct genomic locus from its sense partner RNA, thereby acting in *trans* to regulate sense transcription (13,15). Control of gene expression by antisense transcripts could involve different regulators and modes of action. Studies have shown that transcription of an antisense strand inhibits transcription on a sense strand by blocking progression of a sense strand RNA polymerase (collision model) (16). Transcriptional interference could also function through the action of histone/chromatin-modifying enzymes (17,18). Antisense/sense double-stranded RNAs could negatively affect splicing, stability and translation of sense mRNAs (14,18). Repression of sense transcription of meiotic genes in mitotic cells is also partially under the control of the forkhead transcription factor Fkh2 (19). A genome-wide analysis has shown that 229 genes exhibit increased sense RNA levels in mitotic cells deficient in Fkh2 gene expression. Over 75% of these genes are normally expressed exclusively during middle-phase meiosis and not expressed during mitosis (19).

As observed in the case of several genomes of prokaryotes and eukaryotes, *S. pombe* genes are frequently organized into convergent pairs (20,21). This arrangement is recognized when two genes are in proximity of one another with their transcription orientated one towards the other. When these convergent genes are transcribed in *cis* from opposing DNA strands, they produce sense and antisense transcripts that are often partially complementary to each other. In many cases, perturbation of expression of sense mRNA (from gene 1) occurs due to the presence of the corresponding antisense RNA (from gene 2). In fission yeast, sense/antisense RNA duplexes accumulate in G1 phase of the cell cycle, especially in regions where convergent genes are present (22). In G1, transcription of several convergent genes fails to terminate after their proximal cleavage and polyadenylation sites, thereby resulting in a transcriptional read-through that produces long sense/antisense transcripts. Accumulation of long sense/antisense RNA duplexes activates the RNAi pathway, which leads to gene silencing and heterochromatin formation over convergent gene regions. Transient heterochromatin is then recognized by Swi6 (23). In subsequent S and G2 phases, Swi6 recruits cohesin loading complexes in regions between convergent genes. This mechanism has been found to promote proximal transcription termination of convergent gene pairs and significantly decrease transcriptional interference between convergent genes (22). In the case of some convergent genes, it has been shown that the mechanism of transcriptional interference is independent of the RNAi machinery. In those cases, however, the molecular basis of antisense-mediated repression of gene expression is unclear (19).

Cuf1 is a major regulator of copper homeostasis in *S. pombe* (24). When mitotic cells are grown under conditions of copper starvation, the transcription factor Cuf1 is located in the nucleus where it activates genes encoding components of the copper transport pathway, including Ctr4, Ctr5 and Ctr6 (25,26). This transcriptional activation involves *cis*-acting promoter regulatory elements with the consensus sequence 5'-(T/A)DDHGCTG-3' (D = A, G, or T; H = A, C, or T), which are denoted CuSEs (Copper Signaling Elements) (25). In contrast, in cells undergoing a transition from low to sufficient copper concentration, Cuf1 is inactivated and that results in repression of copper transport genes. Following its inactivation, Crm1 exportin interacts with Cuf1 via its nuclear export sequence, leading to export of the transcription factor to the cytoplasm (27).

A previous genome-wide study has identified a gene (*SPAC22G7.11c*), denoted *cum1*<sup>+</sup>, whose transcript is induced in copper-starved meiotic cells (28). *cum1*<sup>+</sup> encodes a small polypeptide of 140 amino acid residues with a predicted molecular mass of 15.4 kDa. Cum1 is highly hydrophilic and contains two CON-6-type domains. CON-6-like proteins are mostly found in sporulating cells and, conidia in fungi (29). Although their functions are still unclear, they may be activated under low-water conditions, which would favor adoption of their active conformation. Once activated, CON-6 proteins may play a role in resistance to desiccation stress.

Although a potential role of Cum1 in copper homeostasis has not yet been ascertained, in the present work we found that its copper-dependent regulation requires the presence of CuSEs and Cuf1. *cum1*<sup>+</sup> is expressed exclusively during meiosis. However, results showed that when a reporter gene is expressed under the control of the wild-type *cum1*<sup>+</sup> promoter, its copper-dependent expression is detected in mitotically growing cells. These findings supported the notion that an elimination of *cum1*<sup>+</sup> mRNA occurs after its transcriptional initiation in mitotic cells. Northern blot analyses revealed that the *iss1*<sup>+</sup> gene in proximity to *cum1*<sup>+</sup> produces two antisense transcripts, including a longer one that is complementary to the sense *cum1*<sup>+</sup> mRNA. We showed that the insertion of a multipartite polyadenylation signal (PAS) immediately downstream of *iss1*<sup>+</sup> allows *cum1*<sup>+</sup> sense mRNA expression during vegetative growth, markedly under low copper conditions. Using G1-synchronized wild-type and *dcr1Δ*, *ago1Δ*, *rpd1Δ*, and *clr4Δ* mutant cells, we determined that components of the RNAi pathway are involved in antisense-mediated repression of *cum1*<sup>+</sup> transcription, especially during the G1 phase of the cell cycle.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Strains and growth conditions.* Strains undergoing vegetative growth were isogenic derivatives of FY435 (Table 1). In the case of strains that entered into meiosis, we used two isogenic strains (JSY3 and JSY84) in which the *pat1-114* temperature-sensitive mutation allowed synchronization of cells in terms of their entry into the meiotic program (Table 1). Under non selective conditions, all strains were grown on YES medium containing 0.5% yeast extract, 3% glucose, and 225 mg/l of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. Strains for which DNA fragment or plasmid integration was required were grown on

synthetic EMM missing specific nutrients that allowed selection and maintenance of the integrated DNA fragment or plasmid (1). In the case of liquid cultures of cells proliferating in mitosis, unless otherwise stated, cells were seeded to an  $A_{600}$  of 0.5, grown to exponential phase ( $A_{600}$  of  $\sim 1.0$ ) and left untreated or were treated with ammonium tetrathiomolybdate (TTM) (250 $\mu$ M) or CuSO<sub>4</sub> (100 $\mu$ M) for 90 min. Synchronous meiosis of pat1-114/pat1-114 diploid cells was carried out, as described previously (28). Treatments of meiotic cells were performed using low concentrations of TTM (150  $\mu$ M) and CuSO<sub>4</sub> (50  $\mu$ M), as described previously (30). Monitoring progression of meiotic cells throughout the differentiation program was performed as described previously (31).

*Plasmids.* DNA fragments containing 1608-, 376-, or 174-bp of the 5'-noncoding region and the first 10 codons of the *cum1*<sup>+</sup> gene were isolated by PCR. The first set of primers were designed to generate BamHI and ApaI restriction sites at the 5' termini of the PCR products, whereas the second set of primers were engineered to generate an EcoRI restriction site at the 3' end of the PCR-amplified DNA fragments. Each PCR product was purified, digested with BamHI and EcoRI, and then introduced into Yep357R vector (32). The indicated *cum1*<sup>+</sup> promoter region was isolated from Yep357R*cum1*<sup>+</sup>-1608*lacZ*, Yep357R*cum1*<sup>+</sup>-376*lacZ*, and Yep357R*cum1*<sup>+</sup>-174*lacZ* after digestion with ApaI and Bsu36I (an unique restriction site into *lacZ*). Each of these promoter regions was then swapped for the equivalent DNA restriction fragment in pBPade6*mfc1*<sup>+</sup>-109*lacZ* (30), creating pBPade6*cum1*<sup>+</sup>-1608*lacZ*, pBPade6*cum1*<sup>+</sup>-376*lacZ*, and pBPade6*cum1*<sup>+</sup>-174*lacZ*. Using the *ctr4*<sup>+</sup> promoter (up to -737 from the initiator codon) and the first 10 codons of the *ctr4*<sup>+</sup> gene, an identical molecular cloning strategy (as described above) was applied to create Yep357R*ctr4*<sup>+</sup>-737*lacZ* and pBPade6*ctr4*<sup>+</sup>-737*lacZ*, respectively.

A *cum1*<sup>+</sup> promoter region encompassing positions -100 to -351 (with respect to A of the ATG codon of *cum1*<sup>+</sup>) was amplified by PCR. Primers were designed to generate XmaI and ApaI sites at the 5' end of the PCR fragment, whereas a XhoI site was introduced at the 3' end of that fragment. After purification, the DNA fragment was digested with XmaI and XhoI and cloned into the corresponding sites of *CYC1-lacZ* fusion plasmid pCF83 (25), creating plasmid pCF83*cum1*<sup>+</sup>-351/-100*CYC1-lacZ*. Subsequently, pCF83*cum1*<sup>+</sup>-351/-

100*CYCI-lacZ* was digested with *ApaI* and *Bsu36I*, allowing purification of the *cumI*<sup>+</sup>-351/-100*CYCI-lacZ* DNA fragment that was swapped for a DNA restriction fragment in pBPade6*cumI*<sup>+</sup>-174*lacZ*, producing plasmid pBPade6*cumI*<sup>+</sup>-351/-100*CYCI-lacZ*. In the case of pBPade6*cumI*<sup>+</sup>-351/-100*CYCI-lacZ* containing mutated CuSE elements, it was created by a PCR overlap extension method as described previously (33).

We generated strains in which a multipartite polyadenylation signal (PAS) derived from *ura4*<sup>+</sup> (34) was integrated at the 3' end of *issI*<sup>+</sup>. The *ura4*<sup>+</sup> PAS located downstream of the stop codon of *ura4*<sup>+</sup> was isolated by PCR and then inserted into pKSloxP-KAN-loxP at the *BamHI* and *EcoRV* sites. This plasmid was designated pKSura4PASloxP-KAN-loxP. A 513-bp *SacII*-*BamHI* fragment from the *issI*<sup>+</sup> gene (starting at +614 after the start codon up to +1127) was amplified and cloned into the same sites of pKSura4PASloxP-KAN-loxP. The resulting plasmid was named pKSiss1<sub>614-1127</sub>-ura4PASloxP-KAN-loxP. A 846-bp *XhoI*-*Asp718* fragment from the *issI*<sup>+</sup> 3' untranslated region was amplified and cloned into the corresponding sites of pKSiss1<sub>614-1127</sub>-ura4PASloxP-KAN-loxP, creating plasmid pKSiss1<sub>614-1127</sub>-ura4PASloxP-KAN-loxP-iss1<sub>1128-1974</sub>. The plasmid was subsequently digested with *XmaI* and *ClaI* (for which the restriction sites are unique and found within DNA regions 614-1127 and 1128-1974, respectively) to produce a DNA fragment that allowed homologous integration of *ura4*<sup>+</sup> PAS at the chromosomal locus of *issI*<sup>+</sup>, thereby replacing its wild-type terminator by the *ura4*<sup>+</sup> terminator.

*RNA analysis.* Total RNA was extracted using a hot phenol method as described previously (35). RNase protection assays were performed as described previously (36). Plasmids pKSlacZ, pSKctr4<sup>+</sup>, and pSKact1<sup>+</sup> were used to produce antisense RNA probes that served to determine *lacZ*, *ctr4*<sup>+</sup>, and *act1*<sup>+</sup> mRNA levels, respectively (25,37). pSKcumI<sup>+</sup> was constructed by inserting a 199-bp *BamHI*-*EcoRI* fragment of the *cumI*<sup>+</sup> gene into the same restriction sites in pBluescript SK (Stratagene). The resulting antisense RNA hybridizes to the region between positions +115 and +324 downstream of the A of the initiator codon of *cumI*<sup>+</sup>. <sup>32</sup>P-labeled anti-sense RNA probes were generated using either *HindIII*- (pKSlacZ) or *BamHI*-linearized plasmids (pSKctr4<sup>+</sup>, pSKcumI<sup>+</sup> and pSKact1<sup>+</sup>), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP and T7 RNA polymerase as described previously (36). In the case of Northern blot analysis, total

RNA (25 µg per sample) was resolved on 1.25% agarose-formaldehyde gels and transferred to and immobilized on nylon membranes. Prehybridation and hybridation were carried out in Church's buffer (1% bovine serum albumin, 1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO<sub>4</sub> pH 7.2, 7% SDS). In the case of prehybridation experiments, freshly denatured herring sperm DNA (50 µg/ml) was added to Church's buffer in which membranes were soaked. After the hybridation step with <sup>32</sup>P-labeled DNA-specific probes, washes were performed in 2X SSC (0.15 M NaCl, 15 mM trisodium citrate, pH 7.0) containing 0.1% SDS, and then in 0.1X SSC at the same SDS concentration (0.1%). AS1 and AS3 probes hybridized to regions between positions +292 and +525 and +1529 and +1790, respectively, downstream from A of the start codon of *iss1*<sup>+</sup>. In the case of S1 probe, it paired to the region between positions +142 and +428 downstream from A of the initiator codon of *cum1*<sup>+</sup>. The *act1*<sup>+</sup> probe (internal control) hybridized to the coding region between positions +472 and +702 downstream from A of the ATG codon of *act1*<sup>+</sup>.

*ChIP experiments.* *cuf1Δ* cells expressing untagged or Myc<sub>12</sub>-tagged *cuf1*<sup>+</sup> alleles were grown to logarithmic phase. Cells were harvested, washed, and aliquoted in 50 ml cultures that were grown in the presence of TTM (250 µM) or CuSO<sub>4</sub> (100 µM) for 90 min. Formaldehyde treatment of cultures and their subsequent neutralization with glycine were performed as described previously (38,39). Cell lysates were prepared and subsequently sonicated 10 times (10 s cycles at 20 amplitude microns [20%]) using a Branson 450 sonicator in order to shear chromatin DNA into fragments of ~400 to 800 bp. Immunoprecipitation of Myc<sub>12</sub>-tagged Cuf1 bound to chromatin, protein G-Sepharose beads washings and elution, reversed cross-linking and DNA precipitation were performed as described previously (38,40). Quantification of immunoprecipitated DNA was performed by real-time PCR (qPCR) using primers that spanned a proximal *cum1*<sup>+</sup> promoter region, which includes 3 elements that match the CuSE consensus motif (25). As positive controls, primers that encompassed a *ctr4*<sup>+</sup> promoter region that contains functional CuSEs (25) were also used for qPCR analysis. Myc<sub>12</sub>-tagged Cuf1 density at the *cum1*<sup>+</sup> or *ctr4*<sup>+</sup> promoter was calculated as the enrichment of the specific genomic *cum1*<sup>+</sup> or *ctr4*<sup>+</sup> promoter region relative to a 18S ribosomal DNA coding region in which no CuSE was present. Primers were

designated by the name of the gene promoter, followed by the position of their 5' ends relative to that of the translational initiation codon: *cum1-344* (5'-GCATCGATAGAGCTGCTAGTTTC-3'), *cum1-165* (5'-TTCCATCCCATTTCAGCATTTTC-3'), *ctr4-737* (5'-GAAATGTCAGTGTGTTGTGATGCTG-3'), and *ctr4-584* (5'-CAGCTCTTTTACACGGCAATAATAC-3'). Two primers derived from a 18S ribosomal DNA coding region were used as internal background controls: 18S-1 (5'-GCCCTATCAACTTTCGATGGTAG-3') and 18S-2 (5'-GATGTGGTAGCCGTTTCTCAG-3'). Each qPCR experiment was performed in triplicate, and all ChIP experiments were repeated at least three times using independent chromatin preparations.

*Flow cytometry analysis.* Cells were precultured in YES media. At log phase ( $A_{600}$  of ~1.0), cells were harvested, washed twice, and transferred to EMM nitrogen-deficient medium to arrest cells at the G1 phase. After incubation for 24 h at 30°C, cells were transferred to a nitrogen-replenished medium (YES), divided into subcultures that were treated with TTM (250  $\mu$ M), CuSO<sub>4</sub> (100  $\mu$ M), or left untreated. At this point, cells were handled and fixed for flow cytometry assays as described previously (41). Stained cells with propidium iodide were analyzed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) with an argon laser tuned to 488 nm. The FL3 detector with a 670 nm long pass filter was used to collect propidium iodide fluorescence. Results were analyzed using the FlowJo-v10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR).

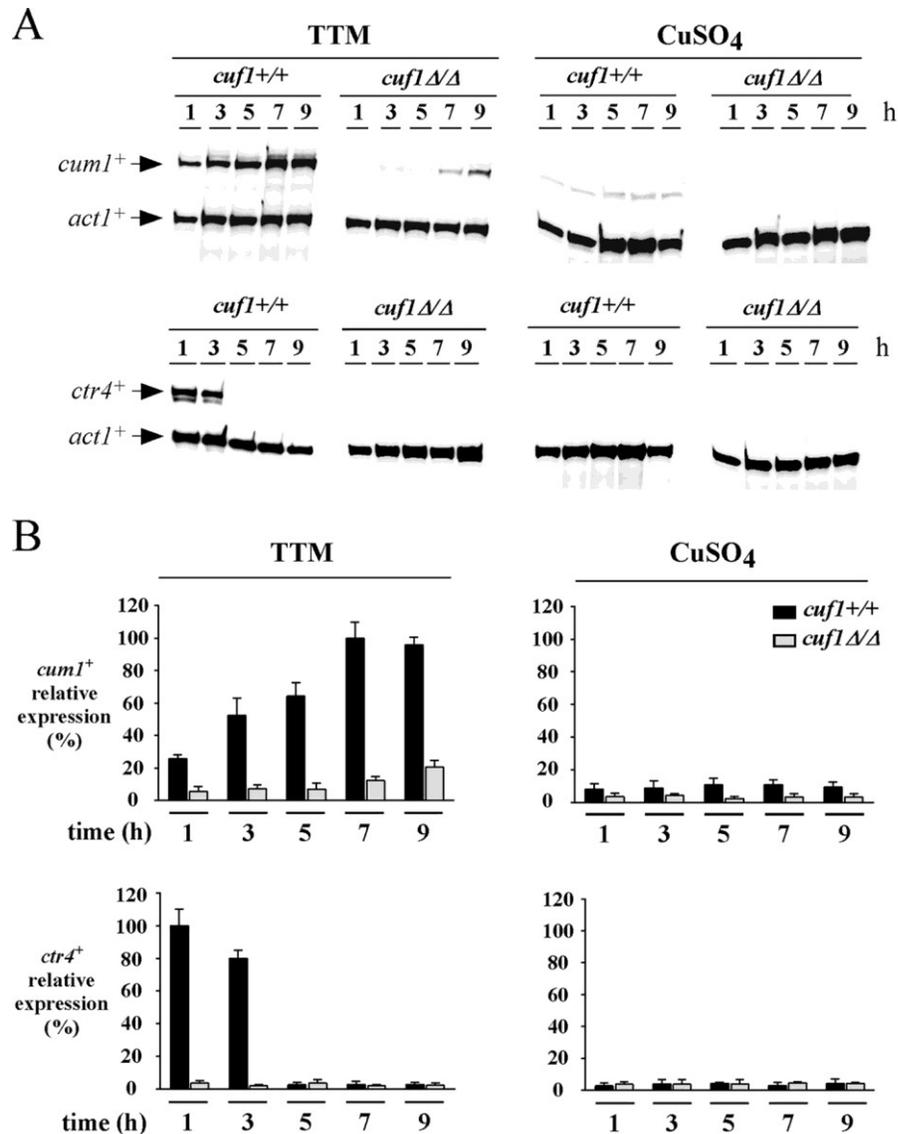
▼ **Table 1.** *S. pombe* strains genotypes.

Strain	Genotype	Source
FY435	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210</i>	(49)
JSY484	<i>h<sup>+</sup> pat1-114 ade6-M210</i>	(50)
JSY3	<i>h<sup>+</sup> pat1-114 ade6-M210 cuf1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	
<i>cuf1Δ cuf1<sup>+</sup></i>	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 cuf1Δ::loxP cuf1<sup>+</sup>::ura4<sup>+</sup></i>	this study
<i>cuf1Δ</i>	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 cuf1Δ::loxP</i>	this study
<i>cuf1<sup>+</sup>-Myc<sub>12</sub></i>	<i>cuf1<sup>+</sup>-Myc<sub>12</sub>::ura4<sup>+</sup></i>	
JSY17	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 cuf1Δ::ura4<sup>+</sup></i>	this study
AMY52	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 dcr1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	this study
VNY3	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 dcr1Δ::loxP cuf1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	this study
VNY4	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 ago1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	this study
<i>dcr1Δ cuf1Δ</i>	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 dcr1Δ::loxP cuf1<sup>+</sup> cuf1Δ::KAN<sup>r</sup> cuf1<sup>+</sup>::ura4<sup>+</sup></i>	this study
VNY6	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 iss1<sup>+</sup>-ura4PAS::KAN<sup>r</sup></i>	this study
VNY7	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 cuf1Δ::loxP iss1<sup>+</sup>- ura4PAS::KAN<sup>r</sup></i>	this study
VNY8	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 rpd1Δ::KAN<sup>r</sup></i>	this study
VNY9	<i>h<sup>+</sup> his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 clr4Δ::KAN<sup>r</sup></i>	this study

## RESULTS

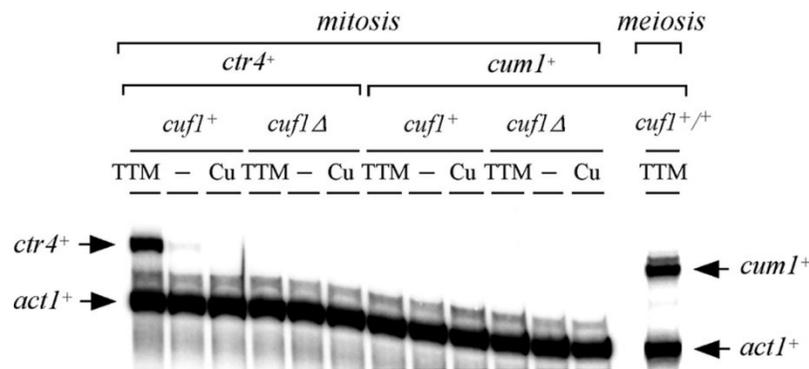
*cum1<sup>+</sup>* is regulated in a copper- and Cuf1-dependent manner in meiotic cells. Genome profiling studies have revealed that *cum1<sup>+</sup>* exhibited higher levels of expression in copper-starved meiotic cells (28). To further characterize the expression profile of *cum1<sup>+</sup>* during meiosis in relationship with copper and Cuf1 availability, *pat1-114/pat1-114 (cuf1<sup>+</sup>/cuf1<sup>+</sup>)* and *pat1-114/pat1-114 cuf1Δ/cuf1Δ* diploid strains were pre-synchronized in G1 mitotic phase by nitrogen starvation at 25°C. The temperature was then shifted to 34°C, triggering inactivation of Pat1 and allowing cells to undergo synchronous meiosis. Immediately prior

to temperature shift, cells were treated with the copper chelator TTM (150  $\mu$ M) or with  $\text{CuSO}_4$  (50  $\mu$ M). Aliquots of cell cultures were taken 1, 3, 5, 7 and 9 h after meiotic induction, and steady-state levels of *cum1*<sup>+</sup> mRNA were analyzed by RNase protection assays. Under low-copper conditions, transcript levels of *cum1*<sup>+</sup> were induced in *cuf1*<sup>+</sup>/*cuf1*<sup>+</sup> cells (Fig. 1). The magnitude of *cum1*<sup>+</sup> gene expression increased throughout the meiotic program and was more robust under TTM conditions (Fig. 1). In contrast, mRNA levels of *cum1*<sup>+</sup> remained very low under copper-replete conditions. RNA samples prepared from a *pat1-114/pat1-114 cuf1* $\Delta$ /*cuf1* $\Delta$  deletion strain showed very weak *cum1*<sup>+</sup> mRNA levels in TTM-treated cells. Although in *cuf1* $\Delta$ /*cuf1* $\Delta$  cells *cum1*<sup>+</sup> mRNA levels were slightly increased after 9 h of meiotic induction (compared to levels observed after 1 h of meiotic induction), these levels corresponded to poor induction of *cum1*<sup>+</sup> mRNA compared to levels observed with *cuf1*<sup>+</sup>/*cuf1*<sup>+</sup> cells that had been exposed to TTM. Furthermore, *cuf1* $\Delta$ /*cuf1* $\Delta$  cells showed loss of *cum1*<sup>+</sup> expression under copper-replete conditions (Fig. 1). As a control and known copper- and Cuf1-regulated gene, *ctr4*<sup>+</sup> expression was measured in the same strains under the conditions described above. Results showed that, under low-copper conditions, *ctr4*<sup>+</sup> mRNA levels were induced shortly after induction of meiosis and then were strongly reduced within  $\sim$ 5 h (Fig. 1) (28,42). There was a lack of induction of *ctr4*<sup>+</sup> mRNA under copper-replete conditions. Furthermore, *ctr4*<sup>+</sup> transcripts were absent in mutant cells lacking Cuf1 (*cuf1* $\Delta$ /*cuf1* $\Delta$ ) (Fig. 1) (28,42). Collectively, results showed that, under low-copper conditions, Cuf1 is required to robustly activate *cum1*<sup>+</sup> gene expression during meiosis, especially in mid- and late-phases of the program.



▲ **Figure 1.** *cuf1*<sup>+</sup> is required for maximal expression of *cum1*<sup>+</sup> in meiotic cells under copper-deficient conditions. *A*, Representative expression profiles of *cum1*<sup>+</sup> and *ctr4*<sup>+</sup> transcripts in *pat1-114/pat1-114 cuf1*<sup>+/+</sup> and *pat1-114/pat1-114 cuf1*<sup>Δ/Δ</sup> cells that were induced to undergo synchronous meiosis. Cells were incubated in the presence of TTM (150 μM) or CuSO<sub>4</sub> (50 μM). Total RNA was isolated from culture aliquots taken at the indicated time points. *cum1*<sup>+</sup>, *ctr4*<sup>+</sup> and *act1*<sup>+</sup> steady-state mRNA levels were analyzed by RNase protection assays. *ctr4*<sup>+</sup> mRNA steady-state levels were probed as a control transcript known to be induced in early meiosis under low-copper conditions. *B*, Graphic representations of quantification of the results of three independent RNase protection assays, including the experiment shown in panel *A*. Values indicate the normalized *cum1*<sup>+</sup> and *ctr4*<sup>+</sup> transcript levels relative to *act1*<sup>+</sup> mRNA levels. The histogram values represent the averages +/- SD.

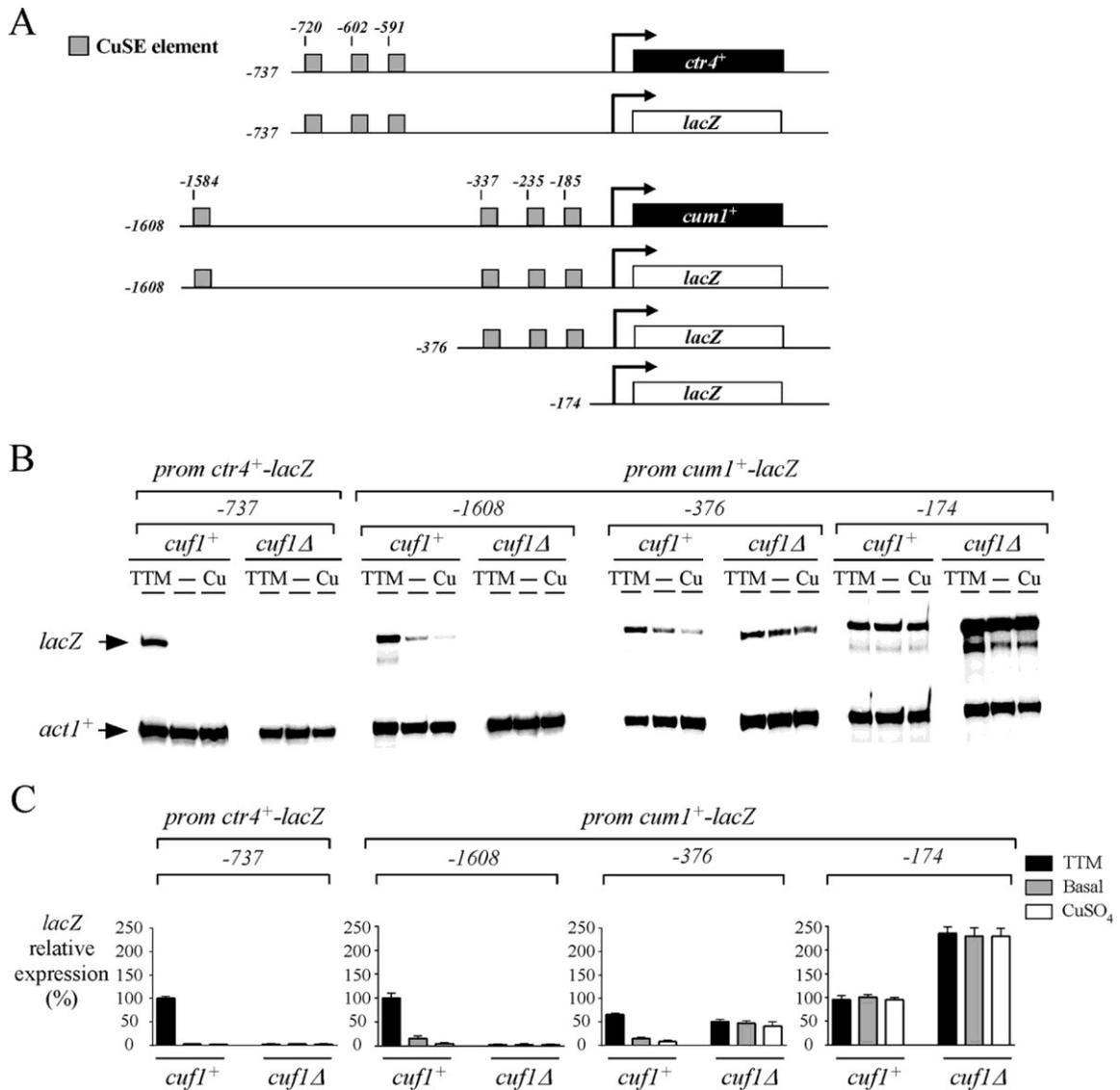
*cum1*<sup>+</sup> transcripts are detected exclusively during meiosis. We next analyzed mRNA levels of *cum1*<sup>+</sup> in mitotically growing cells as a function of copper and Cuf1 availability. Logarithmic-phase cultures of wild-type (*cuf1*<sup>+</sup>) and *cuf1*Δ strains were grown in the absence or presence of TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (100 μM) for 90 min. RNA analysis experiments failed to detect *cum1*<sup>+</sup> transcripts regardless of cellular copper or Cuf1 status (Fig. 2). In the case of the expression of *ctr4*<sup>+</sup> (assayed as a control), its steady-state mRNA levels were up- and down-regulated after treatment with TTM and copper, respectively, as compared to basal conditions (Fig. 2). In the absence of Cuf1 (*cuf1*Δ), *ctr4*<sup>+</sup> mRNA was not detected because its expression is dependent of Cuf1 (28,42). Together, the results revealed that *cum1*<sup>+</sup> transcripts are found exclusively during meiosis.



▲ **Figure 2.** *cum1*<sup>+</sup> is expressed exclusively during meiosis. Vegetatively logarithmic growing cells expressing or lacking *cuf1*<sup>+</sup> were incubated in the absence (-) or presence of TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (Cu, 100 μM) for 90 min. Shown are representative RNase protection assays of *ctr4*<sup>+</sup>, *cum1*<sup>+</sup>, and *act1*<sup>+</sup> mRNA steady-state levels during mitosis. As a control for *cum1*<sup>+</sup> mRNA signal, azygotic meiotic *cuf1*<sup>+/+</sup> cells were induced to undergo meiosis under low copper conditions. Five hours after meiotic induction, *cum1*<sup>+</sup> steady-state mRNA levels were analyzed by RNase protection assays (far right, meiosis).

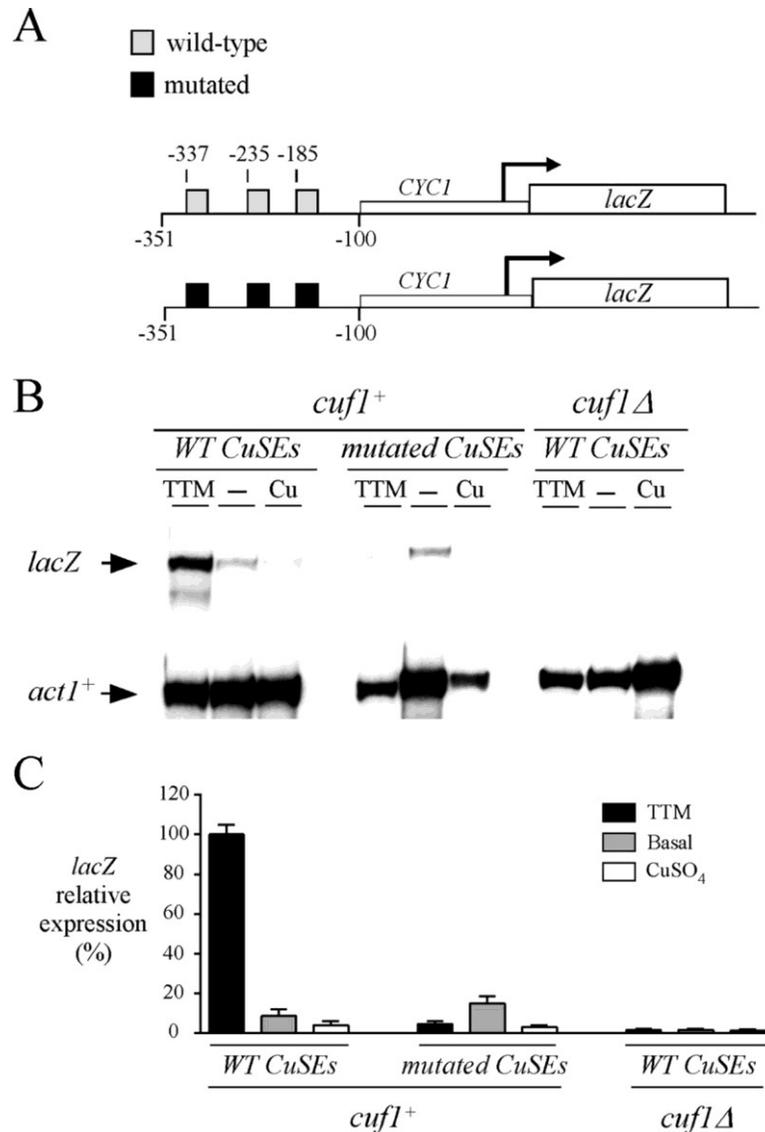
*Copper-responsiveness of cum1*<sup>+</sup> promoter. Although *cum1*<sup>+</sup> was not expressed in wild-type mitotically growing cells, four CuSEs containing the sequence 5'-(T/A)DDHGCTG-3' (D = A, G, or T; H = A, C, or T) were identified within a promoter region of 1608 bp. Among these CuSEs, three were arranged as a direct repeat of 5'-(T/A)DDHGCTG-3' between positions -337 to -330, -235 to -228 and -185 to -178 relative to the translational initiator codon of *cum1*<sup>+</sup> (Fig. 3A). A fourth element was also orientated in the same direction relative to the transcription of *cum1*<sup>+</sup>, but it was located further upstream between positions

-1584 to -1577 from the initiator codon. To test whether these CuSEs could confer copper-dependent regulation of gene expression in a different genomic context, three *cumI*<sup>+</sup> promoter segments were fused upstream of and in-frame with the *lacZ* gene in a reporter plasmid. Surprisingly, results showed that wild-type cells harboring <sup>-1608</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* and <sup>-376</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* reporter plasmids were able to induce *lacZ* mRNA expression under conditions of copper starvation (Fig. 3, B and C). In fact, *lacZ* mRNA expression was induced ~6.3- (<sup>-1608</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ*) and ~4.3-fold (<sup>-376</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ*) compared to transcript levels detected in untreated cells (Fig. 3, B and C). In contrast, *lacZ* mRNA was poorly expressed in wild-type cells treated with copper. When <sup>-174</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* fusion plasmid was transformed in wild-type cells, there was a lack of significant up- or down-regulation of *lacZ* mRNA levels as a function of copper availability (Fig. 3, B and C). Intriguingly, we observed that the overall magnitude of *lacZ* constitutive expression was higher for this transformant as compared to other transformants (containing other *lacZ* fusion derivatives). When <sup>-1608</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* plasmid was expressed in *cufI*Δ cells, *lacZ* mRNA expression was absent, revealing that CufI was required for induction of <sup>-1608</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* transcription in response to copper starvation. In the case of <sup>-376</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* plasmid, its transformation in *cufI*Δ cells resulted in constitutive *lacZ* gene expression without any significant changes in response to the presence of TTM or copper (Fig. 3, B and C). The fact that *lacZ* mRNA was constitutively expressed when it was under control of the <sup>-376</sup>*cumI*<sup>+</sup> promoter may be due to the loss of negative cis-acting regulatory elements located between positions -1608 and -377 within the promoter. Similarly to <sup>-376</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* fusion reporter, *lacZ* transcript levels from *cufI*Δ cells harboring <sup>-174</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* plasmid did not exhibit changes in response to variations in copper levels, except that the overall magnitude of *lacZ* expression was high. In fact, it was higher than the same fusion plasmid expressed in wild-type cells (Fig. 3, B and C). Results observed for <sup>-376</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* and <sup>-174</sup>*cumI*<sup>+</sup>-*lacZ* fusion plasmids suggested that regulation of *cumI*<sup>+</sup> transcription is complicated and may involve additional *trans*-acting regulators.



**▲ Figure 3.** Fusion of *cum1*<sup>+</sup> promoter regions to a reporter gene resulted in its regulated expression by *Cuf1* in a *CuSE*-dependent manner. *A*, Schematic representation of *ctr4*<sup>+</sup> and *cum1*<sup>+</sup> promoter regions. Nucleotide numbers refer to positions relative to initiator codons of *ctr4*<sup>+</sup> and *cum1*<sup>+</sup> genes. Gray boxes represent *CuSE* elements. The empty box indicates the *lacZ* gene, whereas the filled box refers to *ctr4*<sup>+</sup> or *cum1*<sup>+</sup> gene. *B*, Logarithmic-phase cultures of wild-type (*WT*) and *cuf1*Δ cells harboring the indicated reporter plasmid that were left untreated (-) or treated with TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (Cu, 100 μM) for 90 min. Total RNA was isolated and steady-state mRNA levels of *lacZ* and *act1*<sup>+</sup> were analyzed by RNase protection assays. *C*, RNase protection assays were quantified. Values indicate the normalized *lacZ* transcript levels relative to *act1*<sup>+</sup> mRNA levels. Data are averages of triplicate determinations of three independent experiments +/- SD.

To further characterize the ability of the proximal  $^{-376}cumI^+$  promoter to mediate copper starvation-dependent induction when it was dissociated from its own locus and fused to *lacZ* in the presence of Cuf1, a short DNA segment derived from the *cumI*<sup>+</sup> promoter (positions -100 to -351) was inserted upstream of the minimal promoter of the *CYCI* gene fused to *lacZ* (Fig. 4A). This  $^{-351}cumI^{-100}$ -*CYCI-lacZ* fusion containing 3 CuSEs (positions -337 to -330, -235 to -228 and -185 to -178) induced *lacZ* mRNA expression (~8.3-fold) under copper-limiting conditions compared to the transcript levels detected in the case of control (untreated) or copper-treated cells (Fig. 4, B and C). When the 3 CuSEs were mutated in the fusion reporter, very weak expression of *lacZ* mRNA was observed in *cuf1*<sup>+</sup> cells, irrespective of cellular copper status (Fig. 4, B and C). In the case of *cuf1*Δ mutant cells harboring the  $^{-351}cumI^{-100}$ -*CYCI-lacZ* fusion plasmid containing wild-type CuSEs, results showed that transcript levels of *lacZ* mRNA were not observed under basal (untreated), copper-starved, or copper-replete conditions (Fig. 4, B and C). Taken together, these results strongly suggested that, under low copper conditions, CuSE promoter sequences found in the 5' proximal untranslated region of *cumI*<sup>+</sup> are functional and could be recognized and used by the transcription factor Cuf1.



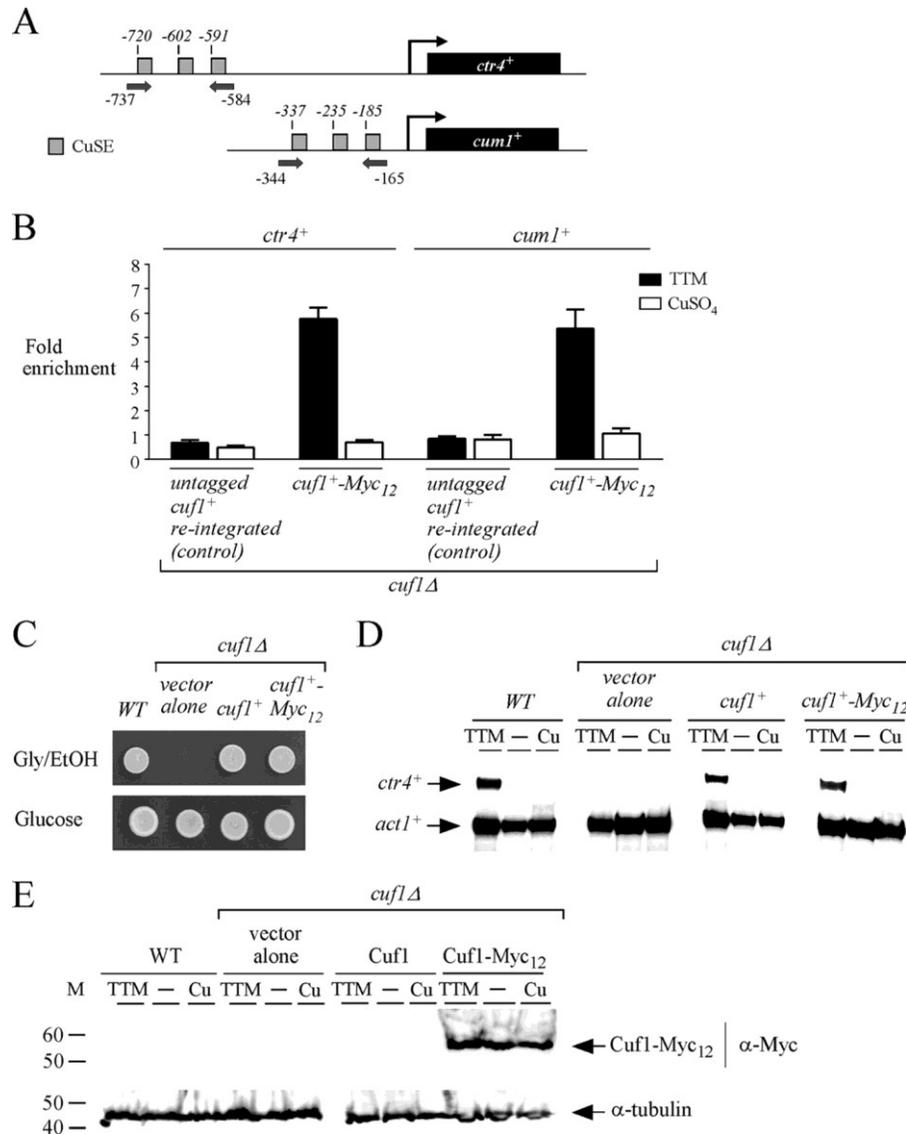
▲ **Figure 4.** *CuSE* elements of *cum1*<sup>+</sup> promoter are required for induction of gene expression in a *Cuf1*-dependent manner under copper-limiting conditions. *A*, Scheme of a 251-bp *cum1*<sup>+</sup> promoter DNA fragment and its mutant derivative that were inserted into the minimal promoter of the *CYC1* gene fused to *lacZ*. Gray boxes indicate wild-type *CuSE* elements [5'-(T/A)DDHGCTG-3', D = A, G or T; H = A, C, or T], whereas filled boxes depict mutated versions [5'-(C/G)DDHTCAT-3']. Nucleotide numbers refer to the positions relative to the translational initiator codon of *cum1*<sup>+</sup>. *B*, Wild-type (*cuf1*<sup>+</sup>) and *cuf1*Δ cells were transformed with the indicated *cum1*<sup>+</sup>-*CYC1*-*lacZ* heterologous reporter plasmid. Total RNA was isolated from control (-), TTM- (250 μM), or CuSO<sub>4</sub>- (Cu, 100 μM) treated cultures. Shown is a representative RNase protection assay of *lacZ* and *act1*<sup>+</sup> mRNA steady-state levels. *C*, The histogram shows quantification of *lacZ* mRNA levels relative to *act1*<sup>+</sup> transcript levels after treatments shown in panel *B*. Values are the averages of triplicate determinations +/- SD.

*Cuf1 interacts with the cum1<sup>+</sup> promoter in vivo under low copper conditions.* Despite the fact that there was no detection of *cum1<sup>+</sup>* transcripts in cells proliferating in mitosis under low copper conditions, we tested whether Cuf1 could possibly bind to *cum1<sup>+</sup>* promoter *in vivo*. *cuf1Δ* cells expressing an integrated untagged or Myc<sub>12</sub>-tagged *cuf1<sup>+</sup>* allele were precultured until they reached the logarithmic phase. Cells were harvested, washed and resuspended in media containing TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (100 μM) for 90 min. Results from ChIP analysis showed that in the case of cells treated with TTM, Cuf1-Myc<sub>12</sub> occupied *cum1<sup>+</sup>* and *ctr4<sup>+</sup>* promoters at high levels with ~5.4- and ~5.8-fold enrichments, respectively, relative to a control 18S ribosomal DNA coding region that did not harbor CuSE (Fig. 4, A and B). Conversely, when cells were incubated in the presence of copper, very low levels of *cum1<sup>+</sup>* and *ctr4<sup>+</sup>* promoter fragments were immunoprecipitated. These low levels of immunoprecipitated chromatin were similar to the background signals observed when ChIP assays were performed in a *cuf1Δ* strain expressing an untagged *cuf1<sup>+</sup>* allele, which had been re-integrated (Fig. 4B).

To test whether insertion of the epitope Myc<sub>12</sub> tag interfered with Cuf1 function, the untagged (*cuf1<sup>+</sup>*) and tagged (*cuf1<sup>+</sup>-Myc<sub>12</sub>*) alleles were separately expressed in *cuf1Δ* cells. *S. pombe* cells harboring disrupted *cuf1<sup>+</sup>* gene (*cuf1Δ*) exhibited phenotypes linked with copper insufficiency, including the inability to grow on respiratory carbon sources due to a failure to provide copper to cytochrome *c* oxidase, resulting from a defect in copper acquisition. A *cuf1Δ* mutant strain in which an empty vector was transformed failed to grow in the presence of glycerol and ethanol as the sole sources of carbon (Fig. 5C). However, the growth defect was reversed when *cuf1Δ* mutant cells were transformed with wild-type or with Myc<sub>12</sub> epitope-tagged *cuf1<sup>+</sup>* allele (Fig. 5C). These results indicated that expression of Cuf1 or Cuf1-Myc<sub>12</sub> complemented *cuf1Δ* growth defect in glycerol and ethanol as sources of respiratory carbon.

To further ensure that fusion of Myc<sub>12</sub> to the C terminus of Cuf1 did not interfere with its function, we analyzed if copper starvation-dependent induction of *ctr4<sup>+</sup>* gene expression was restored in *cuf1Δ* cells carrying a wild-type or Myc<sub>12</sub> epitope-tagged *cuf1<sup>+</sup>* allele. Results showed that cells expressing Cuf1-Myc<sub>12</sub> fostered induction of *ctr4<sup>+</sup>* mRNA levels under low copper conditions in a manner similar to that of cells expressing an untagged Cuf1 (Fig.

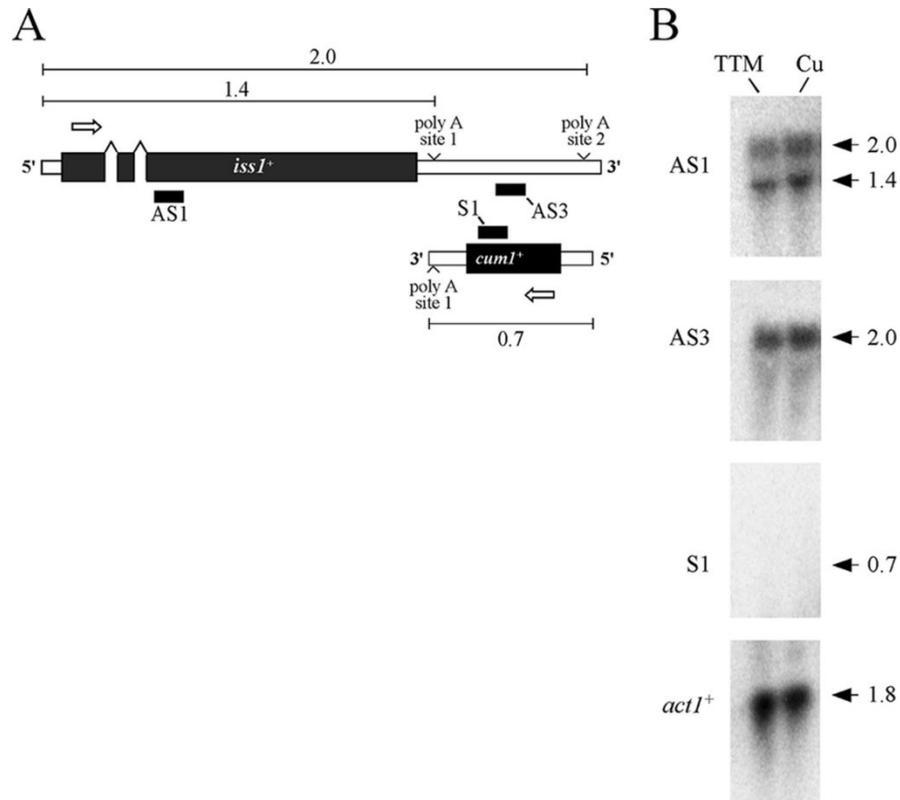
5D). As expected, *ctr4<sup>+</sup>* expression was down-regulated in cells harboring the same alleles under untreated (basal) and copper-replete conditions. Analysis of Cuf1-Myc<sub>12</sub> expressed in cells grown under low and high concentrations of copper for 90 min revealed that the fusion protein was stable and present in similar relative amounts irrespective of cellular copper status (Fig. 5E). Taken together, these results indicated that, although there was no detection of *cum1<sup>+</sup>* transcripts in copper-starved mitotically growing cells, the *cum1<sup>+</sup>* promoter was occupied by Cuf1 under conditions of low copper levels.



**▲ Figure 5.** *Cuf1* binds to the *cum1*<sup>+</sup> promoter in vegetative cells under copper-limiting conditions. *A*, Schematic representation of *ctr4*<sup>+</sup> and *cum1*<sup>+</sup> promoter regions. Gray boxes represent CuSEs elements that are numbered relative to the initiator codon of each gene (*ctr4*<sup>+</sup> or *cum1*<sup>+</sup>). Arrows indicate locations of the primers for qPCR analysis. *B*, ChIP analysis of *ctr4*<sup>+</sup> and *cum1*<sup>+</sup> promoters in a *cuf1Δ* mutant strain expressing an integrated untagged or Myc<sub>12</sub>-tagged *cuf1*<sup>+</sup> allele. Cells were treated with TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (100 μM) for 90 min. Chromatin was immunoprecipitated using anti-*c-myc* antibodies. Specific regions of *ctr4*<sup>+</sup> and *cum1*<sup>+</sup> promoters were analyzed by qPCR to determine Cuf1 occupancy. Binding of Cuf1-Myc<sub>12</sub> to *ctr4*<sup>+</sup> and *cum1*<sup>+</sup> promoters was calculated as the enrichment of specific *ctr4*<sup>+</sup> and *cum1*<sup>+</sup> promoter regions relative to a 18S ribosomal DNA coding region that lacked CuSE. ChIP data were calculated as values of the largest amount of chromatin measured (fold enrichment). Results are shown as the averages +/- SD of a minimum of three independent experiments. *C*, Cells carrying a disrupted *cuf1Δ* allele were transformed with an empty vector (vector alone), *cuf1*<sup>+</sup> and *cuf1*<sup>+</sup>-Myc<sub>12</sub>. Cultures were spotted onto YES media containing glucose or glycerol/ethanol (Gly/EtOH). *WT*, isogenic parental strain FY435 (*cuf1*<sup>+</sup>). *D*, Aliquots of the cultures described for panel C were grown to logarithmic phase in media containing glucose and then were left untreated (-) or incubated with TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (Cu, 100 μM) for 90 min. Total RNA was isolated and steady-state *ctr4*<sup>+</sup> and *act1*<sup>+</sup> mRNA levels were analyzed by RNase protection assays. *E*, Whole cell extracts were prepared from aliquots of cultures used in panel D and analyzed by immunoblotting using an anti-Myc antibody (α-Myc) and anti-tubulin antibody (α-tubulin). M, reference marker.

*iss1*<sup>+</sup> produces two transcripts including one that is partially complementary with the *cum1*<sup>+</sup> transcript. Based on genome-wide transcriptome and genome sequence data, *iss1*<sup>+</sup> and *cum1*<sup>+</sup> genes are arranged with their transcription orientated convergently (43,44). Furthermore, a long 3' untranslated region (UTR) of *iss1*<sup>+</sup> was predicted to overlap the *cum1*<sup>+</sup> open reading frame found in the opposite DNA strand (Fig. 6A). To validate the existence of the long *iss1*<sup>+</sup> transcript isoform, we used two distinct probes. The first probe (denoted AS1) hybridized in the coding sequence of *iss1*<sup>+</sup> (positions +292 to +525 from the first base of the initiator codon), whereas the second probe (termed AS3) paired in the 3' UTR of *iss1*<sup>+</sup> (positions +1529 to +1790) (Fig. 6A). Cells proliferating in mitosis were exposed to TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (100 μM) for 90 min. Total RNA was then isolated and analyzed for quantitation of steady-state levels of *iss1*<sup>+</sup>, *cum1*<sup>+</sup>, and *act1*<sup>+</sup> transcripts. RNA preparations probed with AS1 revealed two forms of *iss1*<sup>+</sup> transcripts (Fig. 6B). A long ~2.0-kb transcript matched the predicted size of *iss1*<sup>+</sup> transcript from genome-wide mapping studies (44). The 3' UTR of this antisense transcript overlapped with *cum1*<sup>+</sup> sense mRNA. In addition, a shorter ~1.4-kb transcript was detected, revealing the presence of an alternative polyadenylation site which led to the production of a second transcript isoform

(Fig. 6B). According to its size, the second transcript isoform did not appear to overlap with *cumI*<sup>+</sup> sense mRNA. RNA preparations hybridized with AS3 probe revealed that only the long *issI*<sup>+</sup> transcript (~2.0-kb) was detected (Fig. 6B). Experiments using RNA preparations from cells grown under copper-deficient or copper-replete conditions showed that steady-state levels of both isoforms of *issI*<sup>+</sup> mRNA were not significantly affected by either TTM or exogenous copper (Fig. 6B). We were unable to detect the *cumI*<sup>+</sup> transcript (~0.7-kb) (S1 probe) in cells grown under standard conditions (low or high copper) in which two *issI*<sup>+</sup> mRNA isoforms (~2.0 and ~1.4-kb) were produced (Fig. 6B). Based on apparent absence of *cumI*<sup>+</sup> transcript detection, we predicted that long *issI*<sup>+</sup> mRNAs (~2.0-kb) could form antisense transcripts with *cumI*<sup>+</sup> sense mRNAs, thereby preventing their detection by an uncharacterized inhibitory mechanism. Potential mechanisms may include (i) that the antisense transcript could result *in vivo* degradation of the *cumI*<sup>+</sup> transcript; (ii) that the antisense transcript could result in early transcriptional termination of the *cumI*<sup>+</sup> transcript; or (iii) RNAi-mediated heterochromatin formation could decrease *cumI*<sup>+</sup> transcription.

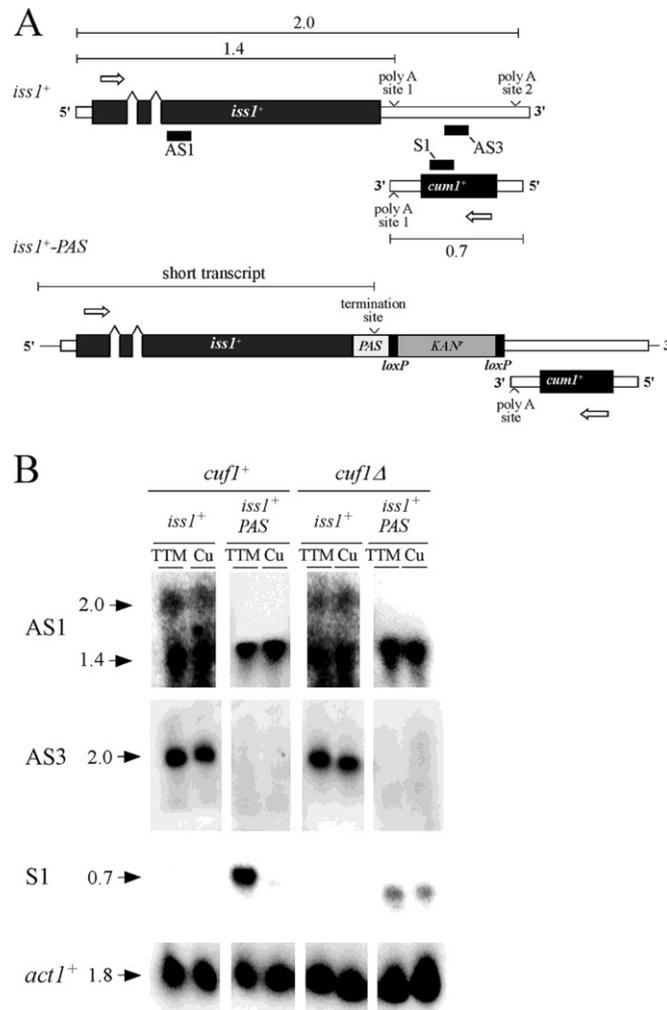


**▲ Figure 6.** *Expression of  $iss1^+$  produces two different sizes of transcripts.* *A*, Diagram of the arrangement of  $iss1^+$  and  $cum1^+$  genes. Putative polyadenylation sites are indicated with arrowheads. White arrows indicate the direction of transcription. Filled rectangles show the positions of radiolabeled strand-specific probes (AS1, AS3, and S1) that were used to detect  $iss1^+$  and  $cum1^+$  mRNA steady-state levels. Numbers refer to the predicted sizes of transcripts. *B*, Total RNA was isolated from cultures treated with TTM (250  $\mu$ M) or  $\text{CuSO}_4$  (Cu, 100  $\mu$ M) and then analyzed by Northern blot assays. AS1, AS3, S1, and  $act1^+$  probes are indicated on the left, whereas approximate transcript sizes (in kilobases) are shown on the right.

*cum1<sup>+</sup> transcripts are detected in copper-starved mitotic cells when the long  $iss1^+$  antisense transcript is absent.* To obtain further evidence that the long transcript isoform produced by  $iss1^+$  overlapped with  $cum1^+$  sense transcript, we generated mutant cells containing a multipartite polyadenylation signal (PAS) integrated immediately at the 3'-end of the chromosomal locus of  $iss1^+$  (Fig. 7A). Results showed that this approach led to exclusive production of a short  $iss1^+$  mRNA isoform (~1.4-kb) (Fig. 7B). When these cells (+PAS) in which Cuf1 ( $cuf1^+$ ) was expressed were assayed, results showed that  $cum1^+$  mRNAs were highly induced under conditions of copper starvation (~8-fold) (Fig. 7B). In contrast,  $cum1^+$  transcripts were repressed in  $cuf1^+$  cells grown under copper-replete conditions. To test whether Cuf1 was required for induction of  $cum1^+$  expression in copper-starved cells

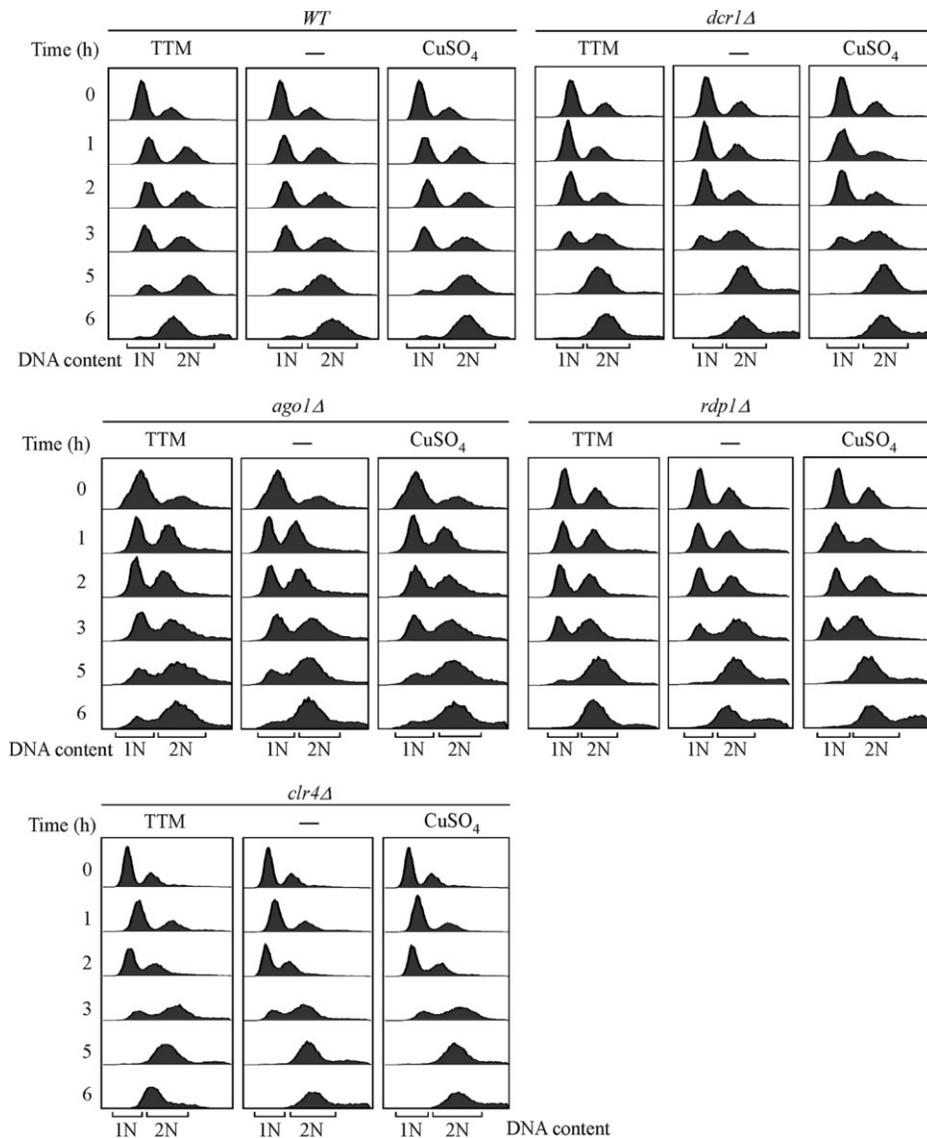
harboring PAS, we deleted the *cufI*<sup>+</sup> gene (*cufI*Δ). Inactivation of *cufI*<sup>+</sup> resulted in strongly reduced (~7.5-fold) *cumI*<sup>+</sup> mRNA levels in comparison to those seen with *cufI*<sup>+</sup> (*issI*<sup>+</sup>PAS) cells grown under the same copper-limited conditions (Fig. 7B). When *cufI*Δ cells containing PAS were incubated in the presence of copper, they exhibited very weak levels of *cumI*<sup>+</sup> transcript that were similar to those observed with the same cells (*cufI*Δ *issI*<sup>+</sup>PAS) grown under copper starvation. Wild-type (*cufI*<sup>+</sup>) and *cufI*Δ mutant strains in which the long *issI*<sup>+</sup> transcript isoform was produced (no PAS) failed to generate significant amounts of *cumI*<sup>+</sup> mRNAs when incubated in the presence of TTM and CuSO<sub>4</sub> (Fig. 7B).

To validate the effect of the presence of PAS integrated at the 3'-end region of *issI*<sup>+</sup>, we probed total RNA isolated from copper-deficient and copper-replete cells with AS1 probe. Cells bearing the *issI*<sup>+</sup>-PAS allele produced a unique mRNA species that corresponded to a short transcript isoform (~1.4-kb) irrespective of cellular copper status (Fig. 7B). In the case of cells in which PAS was not integrated at the 3'-end region of *issI*<sup>+</sup>, two forms of *issI*<sup>+</sup> transcripts were detected (~2.0 and ~1.4-kb) (Fig. 7B). When the same RNA preparations were hybridized with AS3 probe, we only detected the long transcript isoform (~2.0-kb) in cells lacking the PAS signal. As expected, cells expressing *issI*<sup>+</sup>-PAS allele failed to produce the long transcript isoform (Fig. 7B). Taken together, these results revealed that production of the long *issI*<sup>+</sup> antisense transcript precludes detection of *cumI*<sup>+</sup> sense mRNA in vegetative cells.



▲ **Figure 7.** Elimination of the long *issI*<sup>+</sup> transcript leads to derepression of *cumI*<sup>+</sup> mRNA in a TTM- and *CufI*-dependent manner. *A*, Schematic arrangement of *issI*<sup>+</sup>, *issI*<sup>+</sup>-*PAS* and *cumI*<sup>+</sup> alleles. Putative polyadenylation or transcription termination sites are indicated with arrowheads. White arrows indicate the direction of transcription. Filled rectangles depict the positions of radiolabeled strand-specific probes (AS1, AS3, and S1) that were used to detect *issI*<sup>+</sup> and *cumI*<sup>+</sup> transcripts. Numbers refer to the predicted sizes of transcripts. The *PAS* sequence derived from the *ura4*<sup>+</sup> 3' UTR was integrated at the chromosomal locus of *issI*<sup>+</sup> to trigger its immediate transcription termination at a proximal site downstream of the gene. *B*, Logarithmic-phase cultures of wild-type (*cufI*<sup>+</sup>) and *cufI*Δ strains expressing the indicated *issI*<sup>+</sup> or *issI*<sup>+</sup>-*PAS* allele were exposed to TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (Cu, 100 μM) for 90 min. Following RNA isolation, *issI*<sup>+</sup> and *cumI*<sup>+</sup> steady-state mRNA levels were analyzed by Northern blot assays. *AS1*, *AS3*, *S1*, and *actI*<sup>+</sup> probes as well as approximate transcript sizes (in kilobases) are indicated on the left.

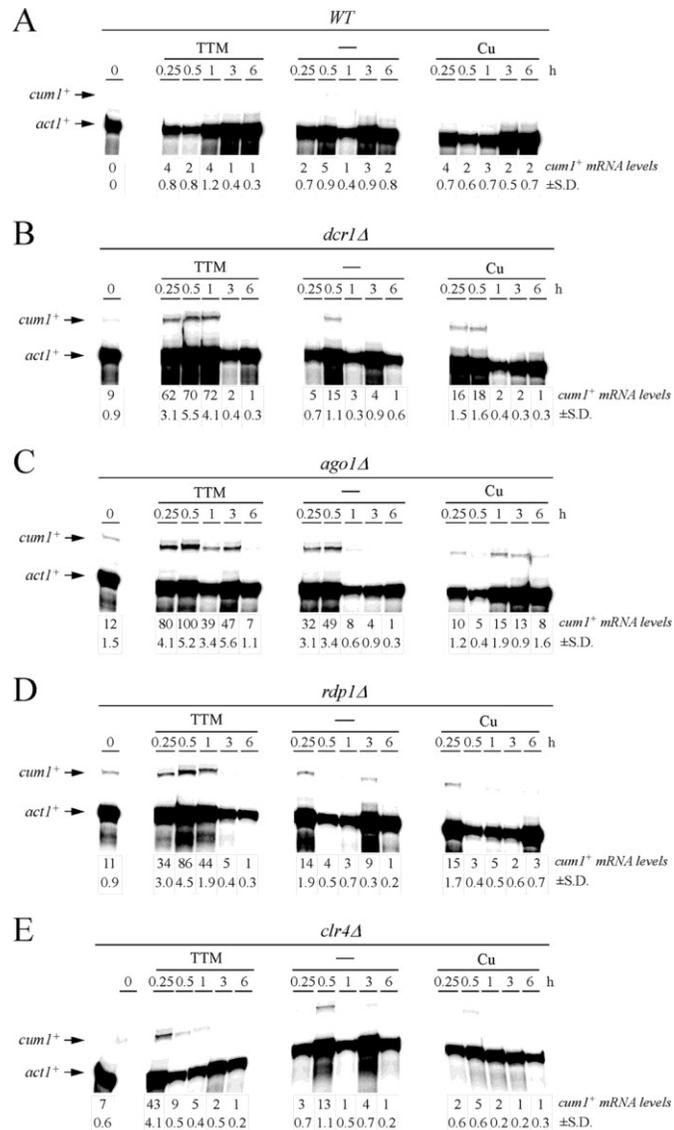
*A role for the RNAi machinery in silencing cum1<sup>+</sup> transcription in the G1 phase of the cell cycle.* Transcription of several convergent genes in *S. pombe* produces overlapping transcripts, resulting in long double-stranded RNA (dsRNA) molecules. Long dsRNA molecules could be recognized and cut by Dicer (Dcr1), producing small interfering RNAs (siRNA) that activate the RNA interference (RNAi) pathway, which could lead to gene silencing (22). Studies have shown that transcriptional interference between sense and antisense transcripts of convergent genes occurs mainly in the G1 phase of the *S. pombe* cell cycle (20,22). To assess involvement of the RNAi machinery in silencing *cum1<sup>+</sup>* transcription, we probed *cum1<sup>+</sup>* mRNA levels in four mutants that affect the RNAi pathway. Cells were blocked in G1 using nitrogen starvation and then they underwent synchronized mitosis in the presence of TTM, copper or were left untreated. These mutants were *dcr1Δ* (dicer), *ago1Δ* (argonaute), *rdp1Δ* (RNA-dependent RNA polymerase) and *clr4Δ* (histone H3 lysine methyltransferase). DNA content was determined by flow cytometry (FACS) analysis to assess that cell populations were largely restricted to G1 (1N) at the zero point time and after 30 min of mitotic induction, whereas cells were primarily in G2 phase at 6 h (Fig. 8).



**▲ Figure 8.** *Synchronization of wild-type and mutant strains using nitrogen starvation.* The indicated isogenic strains were arrested at the G1 phase using growth conditions lacking nitrogen. Strains were maintained in nitrogen-deficient medium for 24 h and then shifted to a nitrogen-replete medium. At this step, strains were treated with TTM (250  $\mu$ M) or CuSO<sub>4</sub> (Cu, 100  $\mu$ M), or were left untreated (-) for the indicated times. FACS analysis showed mitotic progression of cell populations after their transferred in nitrogen-replenished medium as a function of time. G1 (1N) cells were detected shortly after switching medium during the first 60 minutes, whereas G2 (2N) cells were predominantly found after ~5 – 6 h of mitotic induction.

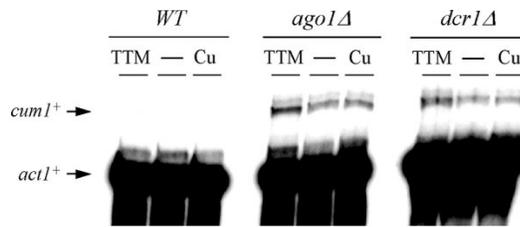
Experiments using wild-type cells, either in the G1 or G2 phase, failed to detect *cum1*<sup>+</sup> mRNA as a function of copper availability (Fig. 9). When *dcr1Δ*, *ago1Δ*, *rdp1Δ*, and *clr4Δ* mutant strains were blocked in G1 and then synchronously cultured in nitrogen-replenished

medium under low copper conditions, sense *cumI*<sup>+</sup> mRNA levels were detected after 30 min of mitotic entry, with an induction of ~2.9- (*dcr1Δ*), ~6.3- (*ago1Δ*), and ~5.1-fold (*rdp1Δ*) compared to that observed in the case of the wild-type strain (background threshold) (Fig. 9). In the case of *clr4Δ* mutant, *cumI*<sup>+</sup> expression was induced ~2.4-fold after 15 min of mitotic induction. Sense *cumI*<sup>+</sup> mRNA was also observed in the case of the above-mentioned mutants under basal and copper-replete conditions. However, its derepression was less in comparison with transcript levels observed in copper-starved mutant cells (Fig. 9). In the case of G2 cells at the 6 h time point, there was no significant increase of sense *cumI*<sup>+</sup> transcript in *dcr1Δ*, *rdp1Δ*, and *clr4Δ* mutants under all three experimental conditions (TTM, CuSO<sub>4</sub>, and untreated) (Fig. 9).



▲ **Figure 9.** Elimination of *cumI*<sup>+</sup> mRNA in G1 cells requires components of the RNAi machinery. Wild-type (WT) (panel A) and isogenic *dcr1Δ* (panel B), *ago1Δ* (panel C), *rdp1Δ* (panel D), and *clr4Δ* (panel E) mutant strains were blocked at G1 phase by nitrogen deprivation and then (at time point 0) induced to undergo synchronous mitosis. Cells underwent mitosis in the absence (-) or presence of TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (Cu, 100 μM). Total RNA was isolated from culture aliquots taken at the indicated time points. *cumI*<sup>+</sup> and *actI*<sup>+</sup> steady-state mRNA levels were analyzed by RNase protections assays. RNase protection analyses were quantified based on three (n = 3) independent experiments ± S.D. (including experiments shown in panels A to E). Values indicate the normalized *cumI*<sup>+</sup> levels relative to *actI*<sup>+</sup>. The highest value was assigned to a 100-percent.

With respect to *ago1Δ* mutant, only a very weak level of sense *cumI*<sup>+</sup> expression was observed after 6 h of mitotic induction. Using unsynchronized cells, *cumI*<sup>+</sup> mRNA was also detected in *ago1Δ* and *dcr1Δ* mutant strains (Fig. 10).

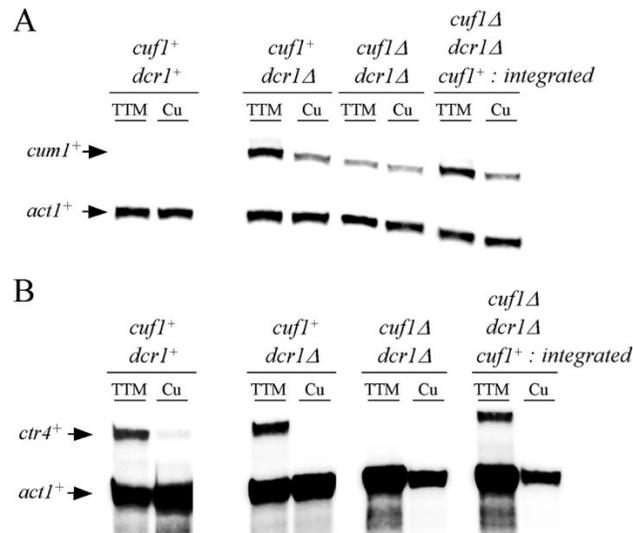


**▲ Figure 10.** Silencing *cum1*<sup>+</sup> expression in unsynchronized vegetative cells requires RNAi components. The indicated isogenic strains were grown to logarithmic phase. Cultures were incubated in the absence (-) or presence of TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (Cu, 100 μM) for 90 min. Total RNA was isolated and steady-state mRNA levels of *cum1*<sup>+</sup> and *act1*<sup>+</sup> were analyzed by RNase protection assays. Results shown are representative of three independent experiments.

However, derepression of *cum1*<sup>+</sup> observed in these cells could not be associated with a specific phase of the cell cycle. Taken together, these results revealed that RNAi components such as Dcr1, Ago1, Rdp1, and Clr4 are involved in the antisense repression of *cum1*<sup>+</sup> transcription in mitotic cells, especially cells undergoing G1 cell-cycle phase.

Due to the fact that *cum1*<sup>+</sup> mRNA levels were induced in copper-starved RNAi mutant strains that were synchronously cultured in G1 phase, we sought to ascertain if this induction was Cuf1-dependent. To obtain evidence of the requirement of Cuf1, the *cuf1*<sup>+</sup> gene was deleted in a *dcr1Δ* mutant strain, creating a *dcr1Δ cuf1Δ* double mutant strain. In another series of experiments, a functional *cuf1*<sup>+</sup> allele was reintegrated into *dcr1Δ cuf1Δ* cells. Wild-type (*cuf1*<sup>+</sup> *dcr1*<sup>+</sup>), *cuf1*<sup>+</sup> *dcr1Δ*, *cuf1Δ dcr1Δ*, and *cuf1Δ dcr1Δ* + *cuf1*<sup>+</sup> strains were cultured in a way that they underwent synchronous mitosis. After mitosis had occurred, cells were incubated in the presence of TTM or CuSO<sub>4</sub> for 1 h. Results showed that inactivation of *cuf1*<sup>+</sup> (*cuf1Δ*) in a *dcr1Δ* strain resulted in a loss of TTM-dependent activation of *cum1*<sup>+</sup> expression in response to low copper conditions (Fig. 11A). When RNA samples were prepared from *dcr1Δ cuf1Δ* cells in which a wild-type copy of *cuf1*<sup>+</sup> allele was returned by integration, cells regained the capacity to induce *cum1*<sup>+</sup> gene expression in response to copper starvation (Fig. 11A). Indeed, the up-regulated levels of *cum1*<sup>+</sup> in the *cuf1Δ dcr1Δ* + *cuf1*<sup>+</sup> strain were similar to that of *dcr1Δ* mutant cells (containing an endogenous *cuf1*<sup>+</sup> gene). These observations confirmed a role of Cuf1 in TTM-mediated activation of *cum1*<sup>+</sup> expression when the RNAi system was defective in cells undergoing G1 cell-cycle phase.

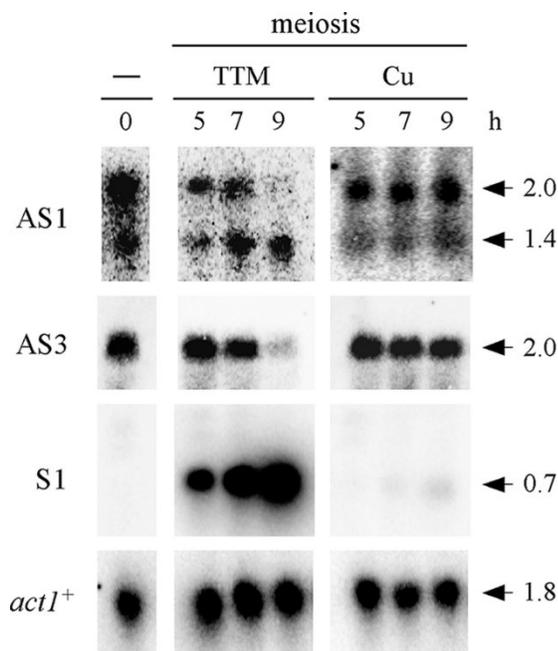
As expected, *ctr4<sup>+</sup>* mRNA levels (assayed as a control) were up- and down-regulated after treatment with TTM and copper, respectively (Fig. 11B). Furthermore, Cuf1 was required for induction of *ctr4<sup>+</sup>* mRNA levels under low copper conditions. Conversely, no TTM-dependent induction of *ctr4<sup>+</sup>* transcription was observed in *cuf1Δ dcr1Δ* double mutant cells.



**▲ Figure 11.** *cuf1<sup>+</sup>* is required for TTM-dependent induction of *cumI<sup>+</sup>* mRNA in a *dcr1Δ* mutant strain undergoing G1 cell-cycle phase. *A*, Cultures of *dcr1<sup>+</sup> cuf1<sup>+</sup>*, *dcr1Δ cuf1<sup>+</sup>*, *dcr1Δ cuf1Δ*, and *dcr1Δ cuf1Δ + cuf1<sup>+</sup>* cells were arrested in G1 using nitrogen starvation. Once blocked, cultures were simultaneously switched to nitrogen-replete conditions, allowing their synchronous entry into mitosis. Cells were incubated in the presence of TTM (250 μM) or CuSO<sub>4</sub> (Cu, 100 μM). Cultures were taken after 1 h of the mitotic program and total RNA was extracted and analyzed for steady-state levels of *cumI<sup>+</sup>* and *actI<sup>+</sup>* mRNAs. Results shown are representative of three independent experiments. *B*, The indicated isogenic strains were cultured as described in *panel A*. *ctr4<sup>+</sup>* (used as a control gene known to be regulated by Cuf1 as a function of copper availability) and *actI<sup>+</sup>* mRNA levels were determined by RNase protection assays.

*cumI<sup>+</sup>* and the long *issI<sup>+</sup>* RNA isoform are expressed in the opposite direction relative to each other during meiosis. Since *cumI<sup>+</sup>* is induced in copper-starved meiotic cells, we investigated its profile of expression compared with profiles of the two *issI<sup>+</sup>* RNA isoforms during meiosis. *pat1-114/pat1-114* diploid cells were synchronized through meiosis in the absence or the presence of either TTM or CuSO<sub>4</sub>. Aliquots of cultures were picked up at representative time points after meiotic induction, and steady-state levels of *cumI<sup>+</sup>* and *issI<sup>+</sup>* mRNAs were analyzed by Northern blot assays. *cumI<sup>+</sup>* expression was primarily detected

in cells treated with TTM, peaking 9 h after meiotic induction (S1 probe, Fig. 12). There was a lack of induction of *cumI*<sup>+</sup> mRNA under copper-replete conditions. When copper levels were low, the long *issI*<sup>+</sup> RNA isoform (~2.0-kb) was detected after 5 and 7 h of meiotic induction and then its expression was strongly reduced within 9 h (AS1 and AS3 probes, Fig. 12). These results led us to observe that abundance of the long *issI*<sup>+</sup> antisense transcript was anti-correlated with abundance of *cumI*<sup>+</sup> sense mRNA. Consistent with this observation, under copper-replete conditions, results showed that steady-state levels of the long *issI*<sup>+</sup> isoform remained high through the meiotic program (even after 9 h) (Fig. 12). In the case of the short *issI*<sup>+</sup> isoform (~1.4-kb), results showed that its expression changed in the opposite direction relative to the long *issI*<sup>+</sup> isoform under copper-starved and copper-replete conditions (Fig. 12). Taken together, these results strengthened that production of the long *issI*<sup>+</sup> isoform negatively regulates *cumI*<sup>+</sup> transcript abundance *in vivo*.



▲ **Figure 12.** Copper starvation represses the long *issI*<sup>+</sup> RNA isoform at the end of meiosis. *pat1-114/pat1-114* cells underwent synchronous meiosis under copper-depleted (TTM, 150  $\mu$ M) and copper-replete (Cu, 50  $\mu$ M) conditions. At the indicated time points, *issI*<sup>+</sup> (AS1 and AS3 probes), *cumI*<sup>+</sup> (S1 probe), and *actI*<sup>+</sup> steady-state mRNA levels were analyzed by Northern blot assays. Approximate transcript sizes (in kilobases) are indicated. As a control, an untreated (-) culture was maintained in mitosis at 25°C.

## DISCUSSION

*cumI*<sup>+</sup> is a copper-regulated meiotic gene that is under the control of copper-dependent transcription factor Cuf1. Although *cumI*<sup>+</sup> expression was detected exclusively in meiotic and sporulating cells, its promoter region was occupied by Cuf1 in mitotically growing cells under low copper conditions. The puzzling absence of *cumI*<sup>+</sup> transcript in copper-starved growing vegetative cells prompted us to look for a mechanism responsible for its selective elimination. Based on genomic sequence analysis, it has been established that *cumI*<sup>+</sup> and *issI*<sup>+</sup> genes are arranged in convergent orientation and are transcribed from opposing DNA strands. Furthermore, genome-wide transcriptome data suggested that *issI*<sup>+</sup> produces a long antisense transcript (~2.0-kb), which can hybridize with *cumI*<sup>+</sup> sense mRNA. In *S. pombe*, *issI*<sup>+</sup> is an essential gene that is predicted to encode a critical subunit of the pre-mRNA polyadenylation factor complex (45). Our findings have uncovered not only the presence of a long transcript (~2.0-kb), but also the existence of a short transcript (~1.4-kb) that comes from the *issI*<sup>+</sup> gene. Results showed that the relative abundance of *issI*<sup>+</sup> mRNA isoforms is not significantly affected in response to changes in copper levels. This observation was different than that of the *adhI*<sup>+</sup> antisense transcript (*adhIAS*) in *S. pombe* (11,46). The *adhIAS* is generated at the *adhI*<sup>+</sup> locus in zinc-limited cells. It serves to suppress sense RNA transcription of *adhI*<sup>+</sup>, which encodes an abundant zinc-binding protein that is required for the conversion of acetaldehyde to ethanol. As a result, *adhIAS* down-regulates *adhI*<sup>+</sup> expression presumably to avoid a futile expenditure of energy in producing Adh1 that lacks its necessary cofactor (zinc) to function. Thus, the *adhIAS* transcript (induced under low zinc) shows a reciprocal expression pattern to that of the *adhI*<sup>+</sup> sense mRNA (which is abundant under high zinc conditions). Although increased expression of the *adhIAS* transcript leads to reduced levels of the *adhI*<sup>+</sup> sense transcript, the mechanism to eliminate this paired antisense/sense transcripts remains unclear. Another distinction between the two gene pairs, *cumI*<sup>+</sup>/*issI*<sup>+</sup> and *adhI*<sup>+</sup>/*adhAS*, is the nature of the biological process that is involved. In the case of *adhI*<sup>+</sup>/*adhAS*, the transcriptional interference mechanism is important for maintaining zinc homeostasis during vegetative growth (mitosis). In the case of *cumI*<sup>+</sup>/*issI*<sup>+</sup>, action of the long *issI*<sup>+</sup> antisense transcript is important for maintaining tight vegetative (mitotic) repression of the meiosis-specific *cumI*<sup>+</sup> gene.

In *S. pombe*, other examples of sense/antisense genes have been reported in which a continuous extension of a 3' UTR of an annotated gene on the opposite strand covered the

entire coding region of a meiosis-specific gene, thereby preventing sense transcription of the meiotic gene during vegetative growth (19). Examples include *spo6<sup>+</sup>/SPBC1778.05c* and *mug28<sup>+</sup>/mrp17<sup>+</sup>*. In a manner similar to *cum1<sup>+</sup>/iss1<sup>+</sup>*, insertion of a transcription terminator into *SPBC1778.05c* (the source of antisense RNA for *spo6<sup>+</sup>*) led to a corresponding increase in *spo6<sup>+</sup>* sense mRNA levels in vegetative cells (19). However, the levels of *spo6<sup>+</sup>* expression (in mitosis) remained low compared to levels of the *spo6<sup>+</sup>* sense transcripts in meiotic cells. In the case of *spo6<sup>+</sup>*, this finding suggests that its maximum level of expression in meiosis requires additional meiosis-specific transcription factor(s) and that the *SPBC1778.05c* antisense transcript in vegetative cells may only serve to prevent low-level *spo6<sup>+</sup>* expression.

To eliminate *cum1<sup>+</sup>* sense transcripts in vegetative cells, the mechanism of antisense-mediated transcriptional repression should be efficient, especially under low copper conditions. In this situation, *cum1<sup>+</sup>* mRNA levels are induced by Cuf1 which is active during both mitotic and meiotic cell division programs (28,42). One possibility is that the long *iss1<sup>+</sup>* antisense transcript is synthesized in sufficiently high concentrations to hybridize with all *cum1<sup>+</sup>* sense mRNAs under all conditions, especially when copper is scarce. Other possibilities include the participation of additional mechanisms. One of them could involve RNA interference because pairing between *cum1<sup>+</sup>* sense and *iss1<sup>+</sup>* antisense transcripts could be processed into double stranded small RNAs, which would induce the RNAi pathway. *S. pombe* possesses a canonical RNAi machinery that has been reported to be involved in processing sense/antisense RNA duplexes produced from convergent gene pairs. Therefore, we examined the effect of inactivating components of the RNAi pathway on the ability of *iss1<sup>+</sup>* antisense RNA to inhibit *cum1<sup>+</sup>* sense mRNA in the G1 phase of the cell cycle. Synchronization in the G1 phase revealed an increase of *cum1<sup>+</sup>* sense transcripts in four mutants (*dcr1Δ*, *ago1Δ*, *rdp1Δ*, and *clr4Δ*) that affect the RNAi pathway as compared to a wild-type strain. These results were reminiscent of those observed with *mei4/act1* and *nmt2/avn2* convergent gene pairs for which *dcr1* and *ago1* mutations promote readthrough transcription into the intergenic regions of convergent genes (22). In contrast, in the case of some convergent gene pairs (*spo6<sup>+</sup>/SPBC1778.05c* and *mug28<sup>+</sup>/mrp17<sup>+</sup>*), components of the RNAi machinery do not seem to be required for antisense transcript regulation (19). One caveat, however, is the fact that cells were not synchronized in the cases of

*spo6<sup>+</sup>/SPBC1778.05c* and *mug28<sup>+</sup>/mrp17<sup>+</sup>*, and that may have prevented detection of a functional contribution from RNAi in their regulation. Genomic RNA sequencing of small interfering RNAs has failed to detect significant small RNAs derived from meiotic genes that have antisense transcripts (47). It is possible that the short and transient G1 phase of the *S. pombe* cell cycle hinders detection of small RNAs derived from convergent genes. Furthermore, these experiments were not carried out under low copper conditions, which represent an optimal context to produce *cum1<sup>+</sup>* sense mRNA that would hybridize with long *iss1<sup>+</sup>* antisense transcript. In *Drosophila*, it has been found that a number of small interfering RNAs were derived from some convergent genes (48). One condition to observe RNA interference is that sense RNA has to be transcribed to a detectable level so that the antisense RNA partner can pair with it (sense transcript), thereby generating enough double-stranded RNA substrates for their recognition by the RNAi machinery. In the cases of *spo6<sup>+</sup>* and *mug28<sup>+</sup>*, their levels of sense transcription in vegetative cells were very low, suggesting that the levels were not high enough to allow robust sense/antisense duplex formation. In contrast, *cum1<sup>+</sup>* sense transcription was highly induced in vegetative copper-starved cells. Under this latter condition, accumulation of *cum1<sup>+</sup>* mRNA generated sufficient amounts of sense transcripts for their hybridization with *iss1<sup>+</sup>* antisense transcripts, thereby allowing formation of RNA duplexes and recognition of these duplexes by the RNAi machinery. These possibilities lead ground to the proposal of a novel function for Cuf1, which is to ensure high levels of *cum1<sup>+</sup>* transcription in vegetative cells under low copper conditions, therefore fostering *cum1<sup>+</sup>* mRNA elimination in the G1 phase of the cell cycle.

In the present study, production of long *iss1<sup>+</sup>* antisense and *cum1<sup>+</sup>* sense transcripts could result in double-stranded RNA production. This in turn could activate the RNAi pathway and then induce transient heterochromatin formation. Based on previous studies on regulation of *S. pombe* convergent genes in G1 cells, transient heterochromatin formation involves histone H3 lysine 9 di- tri-methylation and recruitment of proteins, including Swi6 and Ctr4 (22). This mechanism could be the same for silencing *cum1<sup>+</sup>* in cells undergoing G1 phase. However, it has been proposed that after S phase, cohesin is recruited by convergent gene heterochromatin to block further synthesis of long antisense transcript, thereby fostering gene-proximal transcription termination, which causes heterochromatin loss in the G2 phase. However, in the case of *cum1<sup>+</sup>*, its transcript was consistently

undetectable throughout the cell cycle, suggesting the existence of additional mechanisms which inhibit its transcript. The forkhead transcription factor Fkh2 has been reported to be involved in vegetative repression of some meiotic genes (19). Therefore, we have examined if deletion of *fkh2*<sup>+</sup> (either *fkh2Δ* single or *fkh2Δ mei4Δ* double mutant) could foster derepression of *cum1*<sup>+</sup> sense transcript during mitosis. Under our experimental conditions, we could not detect induction of *cum1*<sup>+</sup> sense mRNA in any of the two mutants (unpublished results).

Interestingly, we have observed that when cells undergo synchronous meiosis under low copper conditions, the two *iss1*<sup>+</sup> antisense RNA isoforms were present as observed in vegetative cells (mitosis) (unpublished data). After 5 h of meiotic induction, the long *iss1*<sup>+</sup> isoform (~2.0-kb) was more abundant than the short isoform (~1.4-kb). As a consequence, *cum1*<sup>+</sup> sense transcript exhibited only moderate levels of transcription. At the end of meiosis, however, expression of the long *iss1*<sup>+</sup> isoform was markedly decrease, which led to an increase expression of *cum1*<sup>+</sup> sense transcript which was not affected by the presence of the short *iss1*<sup>+</sup> isoform. These findings led us to conclude that a decrease in expression of the long *iss1*<sup>+</sup> isoform leads to upregulated expression of *cum1*<sup>+</sup> sense transcript, the two transcripts changing in the opposite direction relative to each other. This observation was in agreement with the fact that interference with the long *iss1*<sup>+</sup> antisense transcript (by insertion of PAS) in mitosis resulted in detectable levels of vegetative *cum1*<sup>+</sup> sense mRNA, especially under low copper conditions. Further studies of how antisense transcript levels are regulated and formed antisense/sense duplexes are likely to provide new insight into the mechanisms of repression between pairs of convergent genes, especially those encoding one meiosis-specific component and one ubiquitous component.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to Dr. Gilles Dupuis for critical reading of the manuscript and for his valuable comments. We gratefully acknowledge Dr. Léonid Volkov for his excellent assistance in flow cytometry experiments. This study was supported by a grant (MOP-114986) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) awarded to SL.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

VN, JB, and SL conceived, designed, performed and analyzed the experiments. VN and SL wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

## REFERENCES

1. Sabatinos, S. A., and Forsburg, S. L. (2010) Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **470**, 759-795
2. Mata, J., Lyne, R., Burns, G., and Bahler, J. (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat. Genet.* **32**, 143-147
3. Mata, J., Wilbrey, A., and Bahler, J. (2007) Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol.* **8**, R217
4. Moldon, A., and AYTE, J. (2009) At the (3') end, you'll turn to meiosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 350-351
5. Yamanaka, S., Yamashita, A., Harigaya, Y., Iwata, R., and Yamamoto, M. (2010) Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. *EMBO J.* **29**, 2173-2181
6. Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2006) Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* **442**, 45-50
7. Yamashita, A., Shichino, Y., Tanaka, H., Hiriart, E., Touat-Todeschini, L., Vavasseur, A., Ding, D. Q., Hiraoka, Y., Verdell, A., and Yamamoto, M. (2012) Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. *Open Biol.* **2**, 120014
8. Yamashita, A., Takayama, T., Iwata, R., and Yamamoto, M. (2013) A novel factor Iss10 regulates Mmi-mediated selective elimination of meiotic transcripts. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9680-9687
9. St-André, O., Lemieux, C., Perreault, A., Lackner, D. H., Bahler, J., and Bachand, F. (2010) Negative regulation of meiotic gene expression by the nuclear poly(A)-binding protein in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **285**, 27859-27868
10. Mazo, A., Hodgson, J. W., Petruk, S., Sedkov, Y., and Brock, H. W. (2007) Transcriptional interference: an unexpected layer of complexity in gene regulation. *J. Cell Sci.* **120**, 2755-2761
11. Ehrensberger, K. M., Mason, C., Corkins, M. E., Anderson, C., Dutrow, N., Cairns, B. R., Dalley, B., Milash, B., and Bird, A. J. (2013) Zinc-dependent regulation of the Adh1 antisense transcript in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **288**, 759-769
12. Chen, H. M., and Neiman, A. M. (2011) A conserved regulatory role for antisense RNA in meiotic gene expression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 655-659
13. Wang, L., Jiang, N., Wang, L., Fang, O., Leach, L. J., Hu, X., and Luo, Z. (2014) 3' Untranslated regions mediate transcriptional interference between convergent genes both locally and ectopically in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **10**, e1004021
14. Werner, A., and Sayer, J. A. (2009) Naturally occurring antisense RNA: function and mechanisms of action. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **18**, 343-349

15. Li, J. T., Zhang, Y., Kong, L., Liu, Q. R., and Wei, L. (2008) Trans-natural antisense transcripts including noncoding RNAs in 10 species: implications for expression regulation. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4833-4844
16. Prescott, E. M., and Proudfoot, N. J. (2002) Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 8796-8801
17. Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppois, G., and Stutz, F. (2007) Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* **131**, 706-717
18. Faghihi, M. A., and Wahlestedt, C. (2009) Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**, 637-643
19. Chen, H. M., Rosebrock, A. P., Khan, S. R., Fitcher, B., and Leatherwood, J. K. (2012) Repression of meiotic genes by antisense transcription and by Fkh2 transcription factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **7**, e29917
20. Gullerova, M., Moazed, D., and Proudfoot, N. J. (2011) Autoregulation of convergent RNAi genes in fission yeast. *Genes Dev.* **25**, 556-568
21. Singleton, T. L., and Levin, H. L. (2002) A long terminal repeat retrotransposon of fission yeast has strong preferences for specific sites of insertion. *Eukaryot. Cell* **1**, 44-55
22. Gullerova, M., and Proudfoot, N. J. (2008) Cohesin complex promotes transcriptional termination between convergent genes in *S. pombe*. *Cell* **132**, 983-995
23. Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A., and Grewal, S. I. (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* **297**, 2232-2237
24. Beaudoin, J., Ekici, S., Daldal, F., Ait-Mohand, S., Guérin, B., and Labbé, S. (2013) Copper transport and regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1679-1686
25. Beaudoin, J., and Labbé, S. (2001) The fission yeast copper-sensing transcription factor Cuf1 regulates the copper transporter gene expression through an Ace1/Amt1-like recognition sequence. *J. Biol. Chem.* **276**, 15472-15480
26. Bellemare, D. R., Shaner, L., Morano, K. A., Beaudoin, J., Langlois, R., and Labbé, S. (2002) Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 46676-46686
27. Beaudoin, J., and Labbé, S. (2007) Crml-mediated nuclear export of the *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations. *Eukaryot. Cell* **6**, 764-775
28. Beaudoin, J., Ioannoni, R., Lopez-Maury, L., Bahler, J., Ait-Mohand, S., Guérin, B., Dodani, S. C., Chang, C. J., and Labbé, S. (2011) Mfc1 is a novel forespore membrane copper transporter in meiotic and sporulating cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 34356-34372
29. Suzuki, S., Sarikaya Bayram, O., Bayram, O., and Braus, G. H. (2013) conF and conJ contribute to conidia germination and stress response in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **56**, 42-53
30. Beaudoin, J., Ioannoni, R., Mailloux, S., Plante, S., and Labbé, S. (2013) Transcriptional regulation of the copper transporter Mfc1 in meiotic cells. *Eukaryot. Cell* **12**, 575-590
31. Ioannoni, R., Beaudoin, J., Lopez-Maury, L., Codlin, S., Bahler, J., and Labbé, S. (2012) Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation. *PLoS One* **7**, e36338
32. Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., and Lusty, C. J. (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**, 299-310
33. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59
34. Aranda, A., and Proudfoot, N. J. (1999) Definition of transcriptional pause elements in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1251-1261

35. Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* **14**, 214-229
36. Mercier, A., Watt, S., Bahler, J., and Labbé, S. (2008) Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryot. Cell* **7**, 493-508
37. Mercier, A., Pelletier, B., and Labbé, S. (2006) A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **5**, 1866-1881
38. Jbel, M., Mercier, A., Pelletier, B., Beaudoin, J., and Labbé, S. (2009) Iron activates *in vivo* DNA binding of *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Fep1 through its amino-terminal region. *Eukaryot. Cell* **8**, 649-664
39. Larochelle, M., Lemay, J. F., and Bachand, F. (2012) The THO complex cooperates with the nuclear RNA surveillance machinery to control small nucleolar RNA expression. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10240-10253
40. Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2001) H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6270-6279
41. Sabatinos, S. A., and Forsburg, S. L. (2009) Measuring DNA content by flow cytometry in fission yeast. *Methods Mol. Biol.* **521**, 449-461
42. Plante, S., Ioannoni, R., Beaudoin, J., and Labbé, S. (2014) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* copper transporter proteins in meiotic and sporulating cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 10168-10181
43. Dutrow, N., Nix, D. A., Holt, D., Milash, B., Dalley, B., Westbroek, E., Parnell, T. J., and Cairns, B. R. (2008) Dynamic transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe* shown by RNA-DNA hybrid mapping. *Nat. Genet.* **40**, 977-986
44. Rhind, N., Chen, Z., Yassour, M., Thompson, D. A., Haas, B. J., Habib, N., Wapinski, I., Roy, S., Lin, M. F., Heiman, D. I., Young, S. K., Furuya, K., Guo, Y., Pidoux, A., Chen, H. M., *et al.* (2011) Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science* **332**, 930-936
45. Preker, P. J., Lingner, J., Minvielle-Sebastia, L., and Keller, W. (1995) The *FIP1* gene encodes a component of a yeast pre-mRNA polyadenylation factor that directly interacts with poly(A) polymerase. *Cell* **81**, 379-389
46. Choi, S., and Bird, A. J. (2014) Zinc'ing sensibly: controlling zinc homeostasis at the transcriptional level. *Metallomics* **6**, 1198-1215
47. Buhler, M., Spies, N., Bartel, D. P., and Moazed, D. (2008) TRAMP-mediated RNA surveillance prevents spurious entry of RNAs into the *Schizosaccharomyces pombe* siRNA pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1015-1023
48. Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J. A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J., and Brennecke, J. (2008) An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* **453**, 798-802
49. Pelletier, B., Beaudoin, J., Mukai, Y., and Labbé, S. (2002) Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 22950-22958
50. Bahler, J., Schuchert, P., Grimm, C., and Kohli, J. (1991) Synchronized meiosis and recombination in fission yeast: observations with *pat1-114* diploid cells. *Current genetics* **19**, 445-451

## **FOOTNOTES**

*Abbreviations used are:* bp, base pair(s); DSE, downstream element involved in polymerase pausing; EMM, Edinburgh minimal medium; FACS, fluorescence-activated flow cytometry; GFP, green fluorescent protein; ORF, open reading frame; PAS, multipartite polyadenylation signal; PCR, polymerase chain reaction; SD, standard deviation; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, saline-sodium citrate; TTM, ammonium tetrathiomolybdate; UTR, untranslated region; WT, wild-type; YES, yeast extract plus supplements.