

Université de Sherbrooke

**Étude du mécanisme d'acquisition de l'hème par le récepteur Shu1
chez *Schizosaccharomyces pombe*.**

Par
Thierry Mourer
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
Août, 2019

Membres du jury d'évaluation

P^r Frédéric Veyrier, INRS-Centre Armand-Frappier Santé-Biotechnologie
P^r Steve Jean, département d'anatomie et de biologie cellulaire
P^r Éric Massé, département de biochimie
P^r Simon Labbé, département de biochimie

© Thierry Mourer - 2019

*Je dédie cette thèse à Martine et Lucien Mourer.
À mes regrettés parents à qui je dois absolument tout.*

*Choisissez un travail que vous aimez,
et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie.*

Confucius.

RÉSUMÉ
Étude du mécanisme d'acquisition de l'hème par le récepteur Shu1
chez *Schizosaccharomyces pombe*.

Par
Thierry Mourer
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

L'hème est un micronutriment essentiel à virtuellement tous les organismes vivants. En effet, cette molécule de fer organique est utilisée comme cofacteur par des enzymes impliquées dans des processus biologiques fondamentaux comme la respiration cellulaire ou encore la protection contre le stress oxydant. Les levures sont des microorganismes prototrophes pour l'hème dans la mesure où elles possèdent une voie de biosynthèse de l'hème. Cependant, dans un milieu carencé en fer, la biosynthèse de l'hème peut devenir déficiente et insuffisante pour nourrir les hémoprotéines. Dans cette situation, les cellules fongiques doivent utiliser leurs systèmes d'acquisition d'hème pour assurer un apport en hème adéquat avec leur survie. À ce jour cependant, les composantes moléculaires utilisées par les levures pour acquérir de l'hème en provenance de l'environnement sont peu documentées. L'utilisation de la levure modèle *Schizosaccharomyces pombe* a permis de faire d'énormes progrès dans ce domaine. Effectivement, la voie de biosynthèse endogène de *S. pombe* peut facilement être interrompue par la délétion du gène *hem1*⁺ de son génome. La souche *hem1Δ* résultante est non-viable, sauf si le produit de l'enzyme codée par le gène *hem1*⁺, le ALA, est ajouté dans le milieu. L'autre alternative pour maintenir la souche *hem1Δ* en vie est de la supplémenter en hème exogène. Ainsi l'utilisation de la souche *hem1Δ*, qui bloque sélectivement la biosynthèse de l'hème, a permis de décortiquer les mécanismes d'acquisition d'hème exogène chez *S. pombe*. Nos analyses ont permis d'identifier la protéine Shu1. Cette dernière est fortement induite par la carence de fer et se localise à la surface cellulaire. De plus, au niveau de sa topologie, Shu1 possède un arrangement de quatre cystéines qui est connu pour lier de l'hème. Une souche mutante *hem1Δ shu1Δ* est très peu efficace pour utiliser l'hème exogène et croître. La réintégration de l'allèle *shu1*⁺ dans la souche *hem1Δ shu1Δ* restaure la capacité d'utilisation de l'hème exogène et valide le rôle de cette protéine dans l'acquisition d'hème chez *S. pombe*. Au niveau mécanistique, la protéine Shu1 lie directement une molécule d'hème à la surface cellulaire, puis elle subit une relocalisation aux vacuoles en apportant avec elle, le précieux micronutriment. Au niveau vacuolaire, le transporteur de type ABC Abc3 contribue à l'export de la molécule d'hème de la lumière vacuolaire vers le cytoplasme. En résumé, Shu1 permet à la levure *S. pombe* d'internaliser la molécule d'hème présente dans l'environnement pour nourrir les hémoprotéines vitales à sa survie et affronter une situation de carence de fer.

Mots clés : Hème, Levure, Protéine à ancre GPI, domaine CFEM, Shu1, ABC transporteur, Abc3, Vacuole

TABLE DES MATIERES

Résumé	iv
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction	1
1.1 Les métaux en biologie et leurs utilisations	1
1.1.1 Les métaux utilisés par les systèmes biologiques	1
1.1.2. Le fer inorganique.....	2
1.1.3 Le fer organique : la molécule d'hème.....	3
1.2 Toxicité de l'hème	4
1.3 L'homéostasie de l'hème chez les organismes vivants	6
1.3.1 Les hémoprotéines et leurs pertinences physiologiques	6
1.3.2 La voie de biosynthèse endogène de l'hème	8
1.3.3 Régulation de la voie de biosynthèse de l'hème suivant le statut en fer	11
1.3.4 Mécanismes d'acquisition de l'hème chez les organismes auxotrophes.....	11
1.3.4.1 Acquisition de l'hème chez le ver <i>C. elegans</i>	12
1.3.4.2 Acquisition de l'hème chez <i>Leishmania amazonensis</i>	14
1.3.5 Importance de la molécule d'hème pour les microorganismes pathogènes	15
1.3.6 Mécanismes d'acquisition de l'hème chez les levures pathogènes	20
1.3.6.1 Épidémiologie des fongémies.....	20
1.3.6.2 Les mécanismes moléculaires d'acquisition de l'hème chez <i>Cryptococcus neoformans</i>	20
1.3.6.3 Les mécanismes moléculaires d'acquisition de l'hème chez la levure <i>Candida albicans</i>	21
1.3.6.4 Études portant sur l'acquisition de l'hème menées sur d'autres espèces fongiques.....	24
1.3.6.5 Les composantes cellulaires requises par les levures pour acquérir de l'hème.....	25
1.4 La levure modèle <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	30
1.4.1 L'homéostasie du fer chez la levure <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	32
1.4.1.1 La régulation des gènes d'utilisation du fer par <i>Php4</i>	33
1.4.1.2 La régulation des gènes d'acquisition du fer par <i>Fep1</i>	35
1.4.1.3 Interdépendance transcriptionnelle des facteurs de transcription <i>Fep1</i> et <i>Php4</i>	37
1.4.2 Les systèmes d'acquisition du fer chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	38

1.4.3 Relation entre le métabolisme de l'hème et le statut en fer inorganique chez <i>S. pombe</i>	39
1.5 Implication de la vacuole dans l'homéostasie des ions métalliques.....	42
1.5.1 Importance de la vacuole dans l'homéostasie du fer chez <i>S. pombe</i>	43
1.5.2 Le rôle de la vacuole dans l'acquisition d'hème chez les levures.....	44
1.6 Hypothèses et objectifs de recherche	44
CHAPITRE 2	46
<i>Shu1 is a cell-surface protein involved in iron acquisition from heme in Schizosaccharomyces pombe</i>	46
2.1 ABSTRACT.....	49
2.2 INTRODUCTION.....	49
2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	52
2.4 RESULTS	60
2.5 DISCUSSION.....	78
2.6 REFERENCES	81
CHAPITRE 3	88
Heme assimilation in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> requires cell-surface-anchored protein Shu1 and Vacuolar transporter Abc3	88
3.1 ABSTRACT.....	91
3.2 INTRODUCTION.....	91
3.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	95
3.4 RESULTS	101
3.5 DISCUSSION	117
3.6 REFERENCES	121
3.7 SUPPLEMENTAL DATA	128
DISCUSSION ET RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	129
4.1 La voie d'acquisition d'hème exogène par Shu1 est ubiquitinylée en réponse à un traitement en hémine	129
4.2 L'endocytose de la protéine Shu1 dans le compartiment intracellulaire.....	133
4.2.1 Le franchissement de la membrane plasmique par la protéine Shu1.....	133
4.2.2 La relocalisation de Shu1 à la vacuole suite à son endocytose.....	137
4.3 Mobilisation de l'hème stocké dans la vacuole vers les autres compartiments cellulaires.....	141
4.4 Le devenir de la molécule d'hème après son import dans <i>S. pombe</i>	146

4.4.1 Les sentiers d'acquisition de l'hème exogène dans la levure à fission	146
4.4.2 Devenir de la molécule d'hème après son import dans la cellule	147
4.4.3 Redistribution intracellulaire de la molécule d'hème	148
4. 5 Utilisation des sentiers de nutrition hémique pour développer de nouveaux agents antifongiques	150
CONCLUSION	153
REMERCIEMENTS.....	154
Liste des références	156

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Cofacteurs de fer inorganique associés à des enzymes.	2
Figure 2. Structure de la molécule d'hème et de ses groupements fonctionnels.	4
Figure 3. La voie de biosynthèse de l'hème chez les eucaryotes.....	10
Figure 4. Mécanismes d'acquisition de l'hème chez les organismes bactériens.	20
Figure 5. Structure de la protéine Csa2 et son interaction avec la molécule d'hème.	23
Figure 6. Interaction d'une protéine avec la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI.	26
Figure 7. Régulation transcriptionnelle des gènes d'utilisation du fer par la protéine Php4.	35
Figure 8. Homéostasie du fer chez <i>S. pombe</i>	42

Chapitre 2

Figure 1. The <i>shu1</i> ⁺ gene is transcriptionally repressed by iron in a Fep1-dependent manner.	61
Figure 2. Analysis of proximal <i>shu1</i> ⁺ promoter sequences required to repress gene expression under basal and high levels of iron.	63
Figure 3. Proximal <i>shu1</i> ⁺ promoter GATA elements are sufficient to regulate a heterologous reporter gene in an iron-dependent manner.	65
Figure 4. Fep1 interacts with the <i>shu1</i> ⁺ promoter in vivo under iron-replete conditions. ...	67
Figure 5. Shu1 is a plasma membrane protein that is detected under conditions of iron starvation.....	69
Figure 6. Heme acquisition by <i>S. pombe</i> requires Shu1.	72
Figure 7. Deletion of <i>shu1</i> ⁺ leads to defects in the assimilation of ZnMP.....	73
Figure 8. Binding of Shu1 to hemin agarose.	75
Figure 9. Purified Shu1 and hemin interact with one another.	77

Chapitre 3

Figure 1. PI-PLC-mediated release of Shu1 from the membrane fraction to the supernatant.	102
Figure 2. Assimilation of ZnMP is initially detected in vacuoles and then within the cytoplasm.	104
Figure 3. Hemin-dependent internalization of Shu1 from the plasma membrane to the vacuole.	106
Figure 4. Shu1 co-purifies with yeast vacuoles in response to hemin.	108
Figure 5. Abc3 loss of function phenocopies the effect of Shu1 deletion.....	110
Figure 6. Deletion of <i>abc3</i> ⁺ leads to vacuolar accumulation of ZnMP.....	112
Figure 7. Abc3 is a hemin-binding protein.....	113
Figure 8. Subcellular localization and hemin-agarose pull-down assays with a mutant version of Abc3.	115
Figure 9. Expression of Abc3-P151A/C152A mutant protein alters ZnMP cellular distribution, leading to its vacuolar accumulation.	117
Fig. S1. Production of cellular pools of Shu1-HA ₄ and Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A- HA ₄ when their corresponding alleles are expressed under the control of the thiamine- regulatable <i>nmt41x</i> promoter.	128

Discussion

Figure 1. Les protéines associées au sentier d'acquisition de l'hème exogène par Shu1 sont ubiquitinylées en présence d'hème.....	131
Figure 2. Les souches mutantes <i>hem1Δ</i> nécessitent la présence du gène <i>ubi4</i> ⁺ pour proliférer en présence d'hémine.	133
Figure 3. Shu1 utilise le complexe ESCRT pour rejoindre la vacuole après sa liaison à l'hémine.	140
Figure 4. L'export vacuolaire de la ZnMP nécessite du glutathion.....	144
Figure 5. Proximité du motif de liaison à l'hème et du site potentiel de liaison au glutathion dans la structure de la protéine Abc3.....	145

Figure 6. Liaison de très haute affinité entre la molécule 5329150 et Shu1. 151

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

Table 1. <i>S. pombe</i> strain genotypes.....	53
--	----

Chapitre 3

Table 1 - <i>S. pombe</i> strains used in this study.....	96
---	----

Discussion et résultats supplémentaires

Table 1. Partenaires d'interaction potentiels de Shu1 à la membrane plasmique en réponse à l'hémine.	135
---	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

8-oxo-G : 8-oxoguanine
ABC : *ATP-binding cassette*
ADN : acide désoxyribonucléique
ALA : acide aminolévulinique
ALAD : acide aminolévulinique déhydratase
ALAS : acide aminolévulinique synthase
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
Bimane-GS : monochlorobimane
BioID2 : *proximity-dependent biotin identification 2*
C : cystéine
CFEM : *common in several fungal extracellular membranes*
CLIC/GEEC : *clathrin-independent carriers/glycosylphosphatidylinositol-anchored protein enriched compartments*
CO : monoxyde de carbone
Co²⁺ : cobalt
CP : cystéine-proline
CPO : coproporphyrinogène oxydase
Cu²⁺ : cuivre
Dip : 2,2'-dipyridyl
EGFP : *enhanced green fluorescent protein*/protéine fluorescente verte renforcée
EMM : *Edinburgh minimal medium*
ERMES : *endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria encounter structure*
ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport*
Fe-S : centre fer-soufre
Fe²⁺ : fer ferreux
Fe³⁺ : fer ferrique
FECH : ferrochélatase
FLVCR1b : *feline leukemia virus subgroup C cellular receptor 1b*
FRET : *fluorescence resonance energy transfer*/transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
GFP : *green fluorescent protein*/ protéine fluorescente verte
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GRX : glutarédoxine domaine
GSH : glutathion
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HA : hémagglutinine
HMOX1 : hème oxygénase
HRG : *heme responsive gene*
ILV : *intraluminal vesicles*/vésicules intraluminales
IRE : *iron-responsive element*/ éléments de réponse du fer

IRP1/IRP2 : *iron-responsive element-binding proteins 1/2* / protéine de liaison aux éléments de réponse du fer
 Isd : *iron-regulated surface determinant*/
 K_D : constant de dissociation
 LDL : lipoprotéine de basse densité
 LHR : *Leishmania heme response*
 MAM : *mitochondria associated membranes*
 MDV : *mitochondria-derived vesicles*
 MFS : *major facilitator superfamily*
 Mg^{2+} : magnésium
 Mn^{2+} : manganèse
 Mo^{6+} : molybdène
 MSD : *membrane spanning domain*
 MS : spectrométrie de masse
 MVB : corps multivésiculaire
 NBD : *nucleotide binding domain*
 NEAT : *near-iron transporter*
 Ni^{2+} : nickel
 NTE : extension N-terminale
 NVT : *Nbr1-mediated vacuolar targeting*
 O_2 : dioxygène
 $\cdot O_2^-$: anion superoxyde
 OH^- : hydroxyle
 $OH\cdot$: radical hydroxyle
 ORF : cadre de lecture ouvert
 PBGD : porphobilinogène déaminase
 PCR : *polymerase chain reaction*
 PDB : *protein data bank*
 Phu : *Pseudomonas aeruginosa heme utilization*
 PI-PLC : phosphatidylinositol phospholipase C
 PPO : protoporphyrinogène oxidase
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 TRX : thiorédoxine domaine
 UROD : l'uroporphyrinogène décarboxylase
 UROS : uroporphyrinogène synthase
 UTR : *untranslated region*/region non traduite
 Vps : *vacuolar protein sorting*
 WT : wild-type/ sauvage
 YES : *yeast extract plus supplements medium*
 ZF1/ZF2 : *zinc finger 1/2*/ doigts de zinc 1/2
 Zn^{2+} : zinc
 ZnMP : zinc mésoporphyrine
 ω : oméga

INTRODUCTION

1.1 Les métaux en biologie et leurs utilisations

1.1.1 Les métaux utilisés par les systèmes biologiques

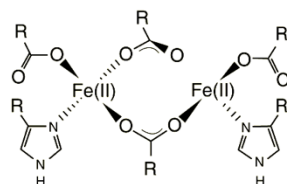
Le tableau périodique des éléments est divisé en quatre grandes familles, à savoir : (1) les métalloïdes, (2) les non-métaux, (3) les métaux et (4) les gaz nobles. Chacune de ces familles sont caractérisées par des propriétés physico-chimiques qui leurs sont propres. Les métaux conduisent le courant et donnent toujours des ions positifs, tandis que les non-métaux ont des propriétés opposées en étant des isolants du courant et en générant uniquement des ions négatifs. Les métalloïdes possèdent des propriétés intermédiaires et sont considérés comme des semi-conducteurs. Enfin, les gaz nobles sont dotés d'une couche de valence saturée, et de ce fait, chimiquement très stables. Parmi les 110 éléments qui constituent le tableau périodique, 86 appartiennent à la catégorie des métaux et seulement 13 éléments de la famille des métaux sont essentiels pour la survie des organismes vivants (Wilson, Apiyo, et Wittung-Stafshede 2004). Le sodium, le potassium, le magnésium et le calcium sont présents en grandes quantités dans les systèmes biologiques et constituent des éléments de masse. Pour ce qui est du vanadium, chromium, molybdenum, manganese, fer, cobalt, nickel, cuivre et zinc, ils sont présents à l'état de traces et ils sont inclus dans les oligo-éléments (Fenton DE, 1995). Les métaux sont retrouvés dans de nombreux processus biochimiques essentiels à la vie. Parmi ceux-ci, citons la bio-minéralisation des os, la transduction de stimuli de l'environnement à des transporteurs de surface cellulaire, l'anabolisme et le catabolisme de plusieurs composés organiques, ainsi que le transfert d'électrons présents dans de nombreuses réactions enzymatiques (Zoroddu et al., 2019). La fonction de transfert d'électrons est supportée par les métaux de transition. En effet, ces derniers possèdent une sous-couche électronique *d* incomplète qui leurs permet de facilement gagner ou donner un électron. En biologie, 6 métaux de transition sont retrouvés dans les cellules (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et le Mo^{6+}) et servent de cofacteurs à de nombreuses enzymes (Dow 2017; Tabares et al., 2014). Environ 30% des protéines cellulaires qui sont impliquées dans

divers processus biologiques variés utilisent un métal de transition comme cofacteur (Hare et al., 2013).

1.1.2. Le fer inorganique

Au sein des métaux de transition, le fer occupe une place prépondérante. En plus d'être le métal le plus abondant de la croûte terrestre, le fer est également le métal de transition le plus fréquemment rencontré chez les organismes vivants aérobiques, notamment chez l'humain, avec une quantité de fer corporelle estimée à 5 g (Zoroddu et al., 2019). D'un point de vue physico-chimique, le fer oscille entre l'état ferreux (Fe^{2+}) et l'état ferrique (Fe^{3+}) avec le gain ou la perte d'un électron, respectivement (Kosman 2013). Ainsi, de par ses propriétés électroniques, le fer est un cofacteur essentiel pour assurer de nombreuses réactions catalytiques comme les réactions d'oxydo-réductions et le transfert d'électrons entre différentes protéines ou complexes protéiques au niveau des cellules. Différentes formes adoptées par le fer inorganique sont représentées en figure 1.

A. Complexe binucléaire de fer



B. Centres Fe-S

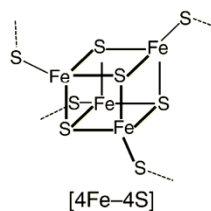
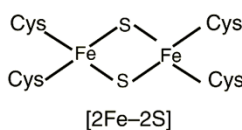


Figure 1. Cofacteurs de fer inorganique associés à des enzymes.

A, Représentation du complexe binucléaire de fer. B, Les centres Fe-S peuvent adopter différentes formes lorsqu'ils sont associés aux protéines. La variation du nombre d'atomes de Fe et de soufre engendre les centres 2Fe-2S et 4Fe-4S. Les structures de ces deux types de centres Fe-S sont montrées en exemples.

Ainsi, le fer inorganique se présente sous la forme de centre Fer-Soufre (Fe-S) ou du complexe de fer binucléaire (Rokob et al., 2016). Les centres Fe-S (4Fe-4S ; 2Fe-2S) sont synthétisés au niveau de la mitochondrie et ils sont impliqués dans des fonctions physiologiques comme la traduction, la maintenance du génome ou encore les réactions de méthylation cellulaires (Braymer et Lill 2017; Johnson et al., 2005). Le complexe binucléaire de fer, quant à lui, participe principalement à des réactions d'hydroperoxydation et de désaturation (Solomon et al., 2000).

1.1.3 Le fer organique : la molécule d'hème

Le fer inorganique peut également suivre une destinée différente et être utilisé par une voie de biosynthèse présente chez de nombreux organismes vivants qui produit un atome de fer encastré au milieu d'un noyau protoporphyrin. Ce groupement prosthétique est appelé hème (Barupala et al. 2016). À l'instar du fer inorganique, l'hème peut dans un premier temps servir de cofacteur à des hémoprotéines (protéine liée à un groupement prosthétique hème) cellulaires (Severance et Hamza 2009). Parmi celles-ci, on retrouve des enzymes telles que la catalase ou les cytochromes P450 qui sont requises au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire (Poulos 2014). Au niveau de sa structure, l'hème est une molécule complexe composée d'un cycle tétrapyrrolique, également appelé protoporphyrine IX, avec un atome de fer en son centre qui bascule entre l'état réduit (Fe^{2+}) et oxydé (Fe^{3+}). L'association de l'hème avec ses protéines cibles s'effectue par le biais de l'atome de fer et huit chaînes latérales appartenant au cycle tétrapyrrolique (Reddi et Hamza 2016). Le fer présent au centre de la molécule d'hème peut générer une liaison de coordination axiale et distale avec deux résidus protéiques appartenant à son partenaire d'interaction. Dans la majorité des cas, 2 acides aminés pouvant être l'histidine, la méthionine, la cystéine, la tyrosine ou la lysine sont impliquées dans la liaison de coordination axiale et distale avec l'hème (T. Li, Bonkovsky, et Guo 2011). De plus, la protoporphyrine IX possède 8 chaînes latérales qui sont également impliquées dans la formation du complexe hème-protéine. Ainsi, on dénombre 2 groupements vinyles, 4 groupements méthyles et 2 groupements propionates sur la protoporphyrine IX qui interviennent dans des interactions hydrophobes, des liaisons ioniques et des ponts hydrogènes, respectivement (Severance et Hamza 2009; Reddi et

Hamza 2016) (Figure 2). En plus de son rôle de cofacteur, la molécule d'hème est également une source de fer inorganique exploitée par différents organismes. Chez ces derniers, il existe une protéine nommée l'hème oxygénase qui est l'enzyme responsable de la dégradation du noyau protoporphyrine IX, qui s'accompagne de la libération de l'atome de fer (Richard, Kelley, et Johnson 2019). Pour ce faire, l'hème oxygénase utilise l'hème comme substrat pour former la molécule de verdohème avant d'ouvrir son squelette carboné et de libérer l'atome de fer. Les produits résultants de l'activité enzymatique de l'hème oxygénase sont le biliverdin, le CO et le Fe^{3+} (Richard, Kelley, et Johnson 2019). Le Fe^{3+} obtenu est recyclé par la cellule et ré-introduit au niveau du métabolisme cellulaire. Ainsi, l'hème est un micronutriment essentiel à tous les organismes aérobiques de par ses rôles comme cofacteur enzymatique et de source de fer (Gulec, Anderson, et Collins 2014; Knutson 2017).

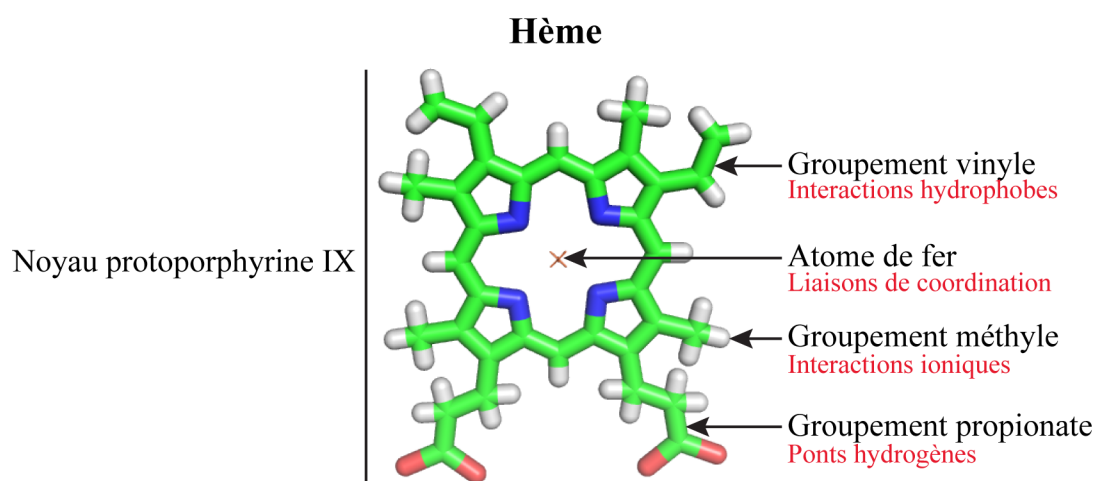


Figure 2. Structure de la molécule d'hème et de ses groupements fonctionnels.

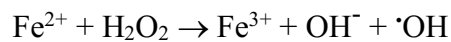
Le squelette carboné de l'hème est composé d'un noyau protoporphyrine IX qui résulte de l'assemblage enzymatique de 4 pyrroles. Au centre de la molécule d'hème se trouve un atome de fer. Les groupements vinyles, méthyles et propionates sont en périphérie du noyau protoporphyrine IX et ils contribuent aux interactions avec les hémoprotéines.

1.2 Toxicité de l'hème

Bien que l'hème soit essentiel aux systèmes biologiques, cette molécule organique se révèle extrêmement toxique sous sa forme libre, c'est à dire non associée aux hémoprotéines. En

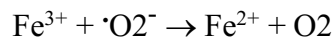
plus de posséder une activité peroxydase intrinsèque, l'hème est une molécule de nature très hydrophobe qui perturbe fortement la physiologie des membranes en se liant de façon non-spécifique de nombreuses protéines membranaires (Korolnek et Hamza 2014). Dans un environnement aérobique, l'atome de fer présent au centre de la molécule d'hème contribue fortement à la toxicité de cette dernière en générant des dérivés oxygénés qui peuvent oxyder les biomolécules (Korolnek et Hamza 2014). Ces dommages oxydatifs sont une conséquence de la production de ROS par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Koppenol 2001; Patel et Ramavataram 2012). La réaction de Fenton produit le radical hydroxyle qui est le ROS avec le pouvoir oxydant le plus fort. Les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss sont résumées dans les équations suivantes.

Équation 1, la réaction de Fenton :

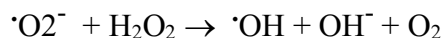


Le Fe^{3+} produit par la réaction de Fenton est utilisé par la réaction d'Haber-Weiss pour réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} et subir un nouveau cycle d'oxydation par le H_2O_2 .

Équation 2, la réaction d'Haber-Weiss :



L'addition des équations 1 et 2 résulte en l'équation 3, qui elle, correspond à la réaction nette des réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. **Équation 3** :



Ainsi la production du radical hydroxyle conduira à l'apparition de dommages oxydants sur les lipides (peroxydation lipidique), les protéines (perturbation des voies de signalisation et de l'activité des enzymes) et sur l'ADN (apparition de la 8-oxo-G favorisant la transversion C:G vers A:T) (van Loon, Markkanen, et Hübscher 2010; Gęgotek et Skrzydlewska 2019). En conséquence, une perturbation du métabolisme de l'hème, ainsi que de sa distribution

intracellulaire incontrôlée, pourraient être associées à des pathologies chez l'homme. Par exemples, la drépanocytose, les ischémies et les fausses couches sont autant de pathologies incriminant le mal fonctionnement du métabolisme de l'hème (Larsen et al., 2012). Finalement, la molécule d'hème présente une forte dualité. Les cellules ont besoin de suffisamment d'hème pour subvenir à leurs besoins cellulaires. Cependant, la molécule d'hème ne doit pas être présente en excès pour éviter sa cytotoxicité. Ce principe de maintenir une quantité d'hème adéquate est appelé l'homéostasie de l'hème.

1.3 L'homéostasie de l'hème chez les organismes vivants

1.3.1 Les hémoprotéines et leurs pertinences physiologiques

Les hémoprotéines possèdent un spectre de fonctions biologiques extrêmement large qui inclut le transport des gaz, le transfert des électrons, la régulation de l'expression génique, la production d'énergie, le métabolisme des xénobiotiques et la biosynthèse des acides aminés (Severance et Hamza 2009; Lin, Sawyer, et Wang 2013). En condition physiologique, la molécule d'hème est majoritairement associée aux hémoprotéines qui possèdent un ou des domaines nommés pochette de liaison de l'hème. Ce domaine de liaison se caractérise par un fort enrichissement en acide aminés aromatiques comme la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane qui confèrent un environnement hydrophobe très favorable à la formation de liaisons entre l'hémoprotéine et son groupement prosthétique (T. Li, Bonkovsky, et Guo 2011). De plus, la littérature rapporte que cette pochette de liaison possède une grande diversité de motifs de liaison à l'hème. Parmi ceux-ci, il peut être cité les motifs CXXCH, CXXCK et YXXXY qui sont impliqués dans la liaison de l'hème de type *c* (L. J. Smith, Kahraman, et Thornton 2010; Malmirchegini et al. 2014). L'hème de type *b* serait plutôt pris en charge par les motifs FXXGXXCXG, CP ou CFEM (T. Li, Bonkovsky, et Guo 2011; Sorgo et al., 2013).

L'interaction de la molécule d'hème avec l'hémoprotéine s'effectue selon deux modes à savoir une (i) interaction transitoire ou une (ii) interaction permanente. Ce mode d'interaction est défini par la fonction biologique de l'hémoprotéine. En effet, l'association transitoire

entre l'hème et ses protéines cibles s'effectue avec des transporteurs ou des chaperonnes de l'hème comme les protéines LHR1 ou GAPDH, respectivement (L. J. Smith, Kahraman, et Thornton 2010; Hanna et al., 2016). Les transporteurs vont permettre l'assimilation de la molécule d'hème présente dans l'environnement et l'amener dans le compartiment intracellulaire, tandis que les chaperonnes vont se charger d'amener ce groupement prosthétique aux hemoprotéines qui n'interagissent pas directement avec les transporteurs (Miguel et al., 2013; Hanna et al., 2016). Dans les deux cas, l'hème est lié, puis dans un second temps est relâché afin de permettre à la protéine d'accomplir sa fonction. À l'inverse, les protéines de transport de l'oxygène et du monoxyde d'azote s'associent de façon permanente à l'hème. De ce fait, l'hème agit en tant que groupement prosthétique et sera associé à ces protéines jusqu'à la dégradation de ces dernières (L. J. Smith, Kahraman, et Thornton 2010).

L'hème donne la capacité aux produits polypeptidiques de réaliser trois fonctions suivant le type d'hémoprotéines. Tout d'abord, l'atome de fer peut subir des variations de son potentiel d'oxydo-réduction pour oxyder les biomolécules présentes dans son voisinage. Par exemple les peroxydases sont des hémoprotéines qui utilisent le peroxyde d'hydrogène pour oxyder une grande variété de substrat comme les amines aromatiques ou la lignine (Battistuzzi et al., 2010). La molécule d'hème est également utilisée par les protéines pour ses propriétés de liaison de particule ou de gaz, ce qui permet leur transport. Certaines hémoprotéines mitochondriales comme le cytochrome c sont chargées de faire transiter les électrons par des complexes de la chaîne respiratoire pour produire l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule (Pérez-Mejías et al., 2019). De même, l'hémoglobine est une protéine impliquée dans le transport systémique de l'oxygène chez l'humain. Ainsi, via l'hème, l'hémoglobine est capable de lier l'O₂ ou le CO pour oxygéner les tissus ou éliminer les déchets métaboliques, respectivement (Helms, Gladwin, et Kim-Shapiro 2018). Finalement, l'hème intervient dans la régulation de l'activité biologique des hémoprotéines. En effet, suite à sa liaison directe avec l'hème, le répresseur transcriptionnel Bach1 est dissocié de la chromatine de ses gènes cibles et puis, il est exporté du noyau pour être par la suite éliminé par dégradation protéolytique (Igarashi et Watanabe-Matsui 2014). Il en résulte l'expression de

plusieurs gènes, incluant le gène codant pour l'hème oxygénase (Igarashi et Watanabe-Matsui 2014).

1.3.2 La voie de biosynthèse endogène de l'hème

À l'exception de certains invertébrés comme *Caenorhabditis elegans*, des parasites du genre *Leishmania* et de quelques espèces bactériennes, la majorité des organismes possèdent une voie de biosynthèse endogène de l'hème qui est extrêmement bien conservée dans le règne du vivant (Barupala et al., 2016). Chez les eucaryotes, la néo-synthèse de l'hème est un processus complexe qui fait intervenir huit réactions enzymatiques et prend place dans deux compartiments cellulaires, la mitochondrie et le cytoplasme (Hamza et Dailey 2012). Tout commence dans la matrice mitochondriale où l'enzyme codée par le gène *hemI*⁺, l'acide aminolévulinique synthase (ALAS), condense une molécule de glycine et de succinyl-CoA pour produire l'acide aminolévulinique (ALA). Par la suite, le ALA est exporté vers le cytoplasme et sert de substrat à l'acide aminolévulinique déshydratase (ALAD) pour générer une molécule de porphobilinogène. Subséquemment, quatre molécules de porphobilinogène vont être polymérisés par la porphobilinogène déaminase (PBGD) en 1-hydroxyméthylbilane. Cette molécule composée de quatre pyrroles constitue la base du squelette carboné de l'hème. Ainsi, le 1-hydroxyméthylbilane est pris en charge par l'uroporphyrinogène synthase (UROS) pour la confection d'uroporphyrinogène III. Suite à sa décarboxylation par l'uroporphyrinogène décarboxylase (UROD), l'uroporphyrinogène III est anabolisé en coproporphyrinogène III. Pour continuer le processus biosynthétique de l'hème, le coproporphyrinogène III rejoint l'espace mitochondriale via le récepteur de la membrane externe PBR (Okazaki et Glass 2017). Les trois dernières enzymes impliquées dans la néo-synthèse de l'hème sont associées à la membrane interne de la mitochondrie sous forme d'un complexe multi-protéiques pour canaliser les substrats vers les enzymes subséquentes et augmenter le rendement d'hème produit (Barupala et al. 2016). Le coproporphyrinogène III subit une décarboxylation oxydative (coproporphyrinogène oxydase ; CPO), puis une oxydation (protoporphyrinogène oxydase ; PPO) pour créer successivement le protoporphyrinogène III, puis la protoporphyrine IX, respectivement. Finalement, la protoporphyrine IX correspond au cycle tétrapyrrolique mature et sera

coordonné par un atome de fer grâce à la ferrochélatase (FECH) pour aboutir à la molécule d'hème (Hamza et Dailey 2012). Une fois synthétisée, la molécule d'hème sera directement utilisée par les hémoprotéines mitochondriales ou distribuée aux autres compartiments cellulaires pour nourrir leurs protéines hème-dépendantes. Cependant, de par sa nature chimique, l'hème n'est pas en mesure de franchir les membranes cellulaires. En effet, la présence des groupements propionates chargés négativement rend impossible la diffusion de la molécule d'hème à travers les membranes biologiques (Reddi et Hamza 2016). Actuellement, les mécanismes intracellulaires de redistribution de l'hème après sa biosynthèse sont encore nébuleux. Cependant, il a récemment été mis en évidence que le transporteur de la membrane externe mitochondriale FLVCR1b est responsable de l'export de l'hème présent dans la mitochondrie vers le cytoplasme (Mercurio et al. 2015). Pour les protéines présentes dans la voie de sécrétion, il est supposé que ces dernières acquièrent leurs hème par le biais de microdomaines où la membrane externe de la mitochondrie est en contact intime avec la membrane du réticulum endoplasmique (Korolnek et Hamza 2014). Ces microdomaines sont dénommés MAMs chez les plantes et les animaux. Ils existent également chez les levures où ils sont nommés ERMES ((Korolnek et Hamza 2014). Ainsi, les structures inter-membranaires MAMs et ERMES facilitent le passage d'ions et de molécules entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, notamment le calcium et le lipide phosphatidylsérine (Kornmann, Osman, et Walter 2011; Petrunaro et Kornmann 2019). Considérant la similarité des propriétés physico-chimique de l'hème et des lipides, il est suggéré que l'hème peut emprunter les microdomaines MAMs ou ERMES pour son transfert dans le réticulum endoplasmique (Korolnek et Hamza 2014; Reddi et Hamza 2016). L'utilisation de vésicules dérivées des mitochondries (MDVs) pour envoyer l'hème nouvellement synthétisé vers les peroxysomes ou les lysosomes est de plus en plus discutée. La mitochondrie a la capacité d'empaqueter des protéines dans les MDVs pour les transporter vers d'autres organelles. De ce fait, il est suggéré que l'hème peut rejoindre ces MDVs et suivre le trafic vésiculaire pour coloniser d'autres compartiments cellulaires (Korolnek et Hamza 2014; Reddi et Hamza 2016) (Figure 3).

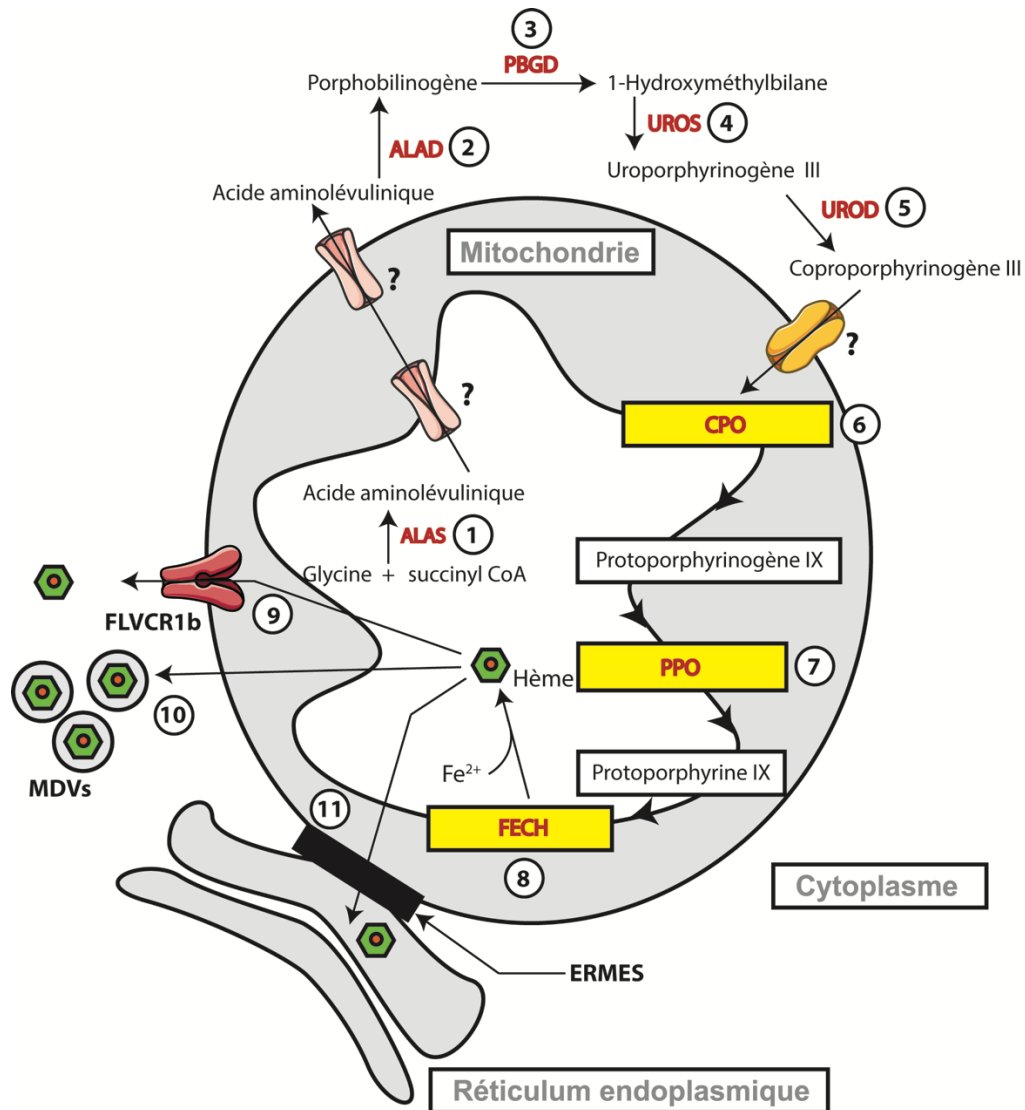


Figure 3. La voie de biosynthèse de l'hème chez les eucaryotes.

L'acide aminolévulinique est formé dans la mitochondrie suite à la condensation de la glycine et du succinyl-CoA par la ALAS (1). Suite à son export de la mitochondrie, l'acide aminolévulinique est métabolisé en porphobilinogène par l'enzyme ALAD (2). Quatre (4) molécules de porphobilinogène sont condensées en 1-hydroxyméthylbilane par l'action de PBGD (3). Le 1-hydroxyméthylbilane est transformé en uroporphyrinogène III par l'UROS (4) avant d'être décarboxylé par l'activité de l'UROD pour former du coproporphyrinogène III (5). Après cette étape le coproporphyrinogène III est importé dans la mitochondrie et décarboxylé en protoporphyrinogène IX par la CPO (6). Ensuite le noyau protoporphyrine XI est obtenu suite à l'oxydation du protoporphyrinogène XI par la PPO (7). Finalement la synthèse de la molécule d'hème s'achève avec l'incorporation d'un atome de fer au centre de la protoporphyrine XI par la FECH (8). Une fois synthétisé, l'hème est distribué aux autres compartiments cellulaires suivant 3 mécanismes moléculaires : l'export vers le cytoplasme par le transporteur FLVCR1b (9), la formation de vésicules MDVs en direction des

lysosomes (10) et le transfert de l'hème dans le réticulum endoplasmique par l'intermédiaire des domaines membranaires ERMES (11).

1.3.3 Régulation de la voie de biosynthèse de l'hème suivant le statut en fer

Chez les métazoaires, la biosynthèse de l'hème est régulée en fonction de la biodisponibilité en hème d'une part, et de la présence de fer inorganique d'autre part. Premièrement, la molécule d'hème est impliquée dans une boucle de rétrocontrôle négative post-transcriptionnelle qui affecte l'enzyme ALAS. Tout d'abord, l'hème est en mesure de lier directement l'ALAS et d'inhiber son activité enzymatique (Ikushiro et al. 2018). De plus, la formation du complexe hème-ALAS empêche la translocation de cette enzyme dans la matrice mitochondriale et favorise sa dégradation par le protéasome (Kikuchi et Hayashi 1981; Abu-Farha, Niles, et Willmore 2005). Deuxièmement, lorsque le fer est absent, les protéines IRP reconnaissent les éléments IRE présents dans l'ARNm de l'ALAS et inhibent ainsi sa traduction (Wingert et al., 2005). Enfin, le fer inorganique est absolument requis comme substrat de la FECH pour achever la biosynthèse de l'hème. Dans une situation de manque de fer, la coordination de l'atome de fer au centre du noyau protoporphyrine IX sera impossible (Barupala et al., 2016). Finalement, un manque de fer est extrêmement délétère pour la production endogène d'hème. Dans ces conditions et pour assurer leurs survies, les organismes déploient des stratégies d'acquisition d'hème exogène pour fournir le groupement prosthétique aux hémoprotéines vitales.

1.3.4 Mécanismes d'acquisition de l'hème chez les organismes auxotrophes

La majorité des organismes possèdent un sentier métabolique permettant la biosynthèse endogène de l'hème. Étrangement les helminthes comme le vers modèle *C. elegans* ou les parasites de la famille *Leishmania* sont dépourvus d'une voie de biosynthèse endogène de l'hème (Rao et al., 2005). Les analyses phylogénétiques ont révélé que *C. elegans* ne peut pas produire la molécule d'hème par manque des enzymes ALAD et PBGD (Jaffe 2003). Le constat est plus impressionnant pour le trypanosome *Leishmania amazonensis* à qui il manque toutes les enzymes du sentier de biosynthèse de l'hème, à l'exception de la FECH. Pourtant, *C. elegans* et *Leishmania amazonensis* possèdent tous deux des hémoprotéines

cruciales pour leurs besoins métaboliques. Par conséquent, ces derniers acquièrent l'hème présent dans leurs niches écologiques pour subvenir aux besoins des protéines hème-dépendantes qu'ils possèdent et ainsi assurer leurs survies (Sah et al., 2002). De plus, l'absence de production d'hème endogène fait de ces organismes des modèles de premier choix pour étudier l'import d'hème exogène, puis sa redistribution systémique pour satisfaire les besoins cellulaires.

*1.3.4.1 Acquisition de l'hème chez le ver *C. elegans**

La totalité de l'hème nécessaire aux besoins physiologiques de *C. elegans* provient de son absorption intestinale et de sa redistribution aux autres tissus. Pour ce faire, le ver *C. elegans* déploie deux systèmes d'acquisition d'hème exogène localisés au pôle apical des entérocytes. Ces systèmes pour assimiler l'hème sont alternativement utilisés par le ver en fonction de la teneur en hème du bol alimentaire. Avec un régime pauvre en hème, la perméase HRG-4 est produite et se localise à la surface des entérocytes en contact avec la lumière intestinale (Rajagopal et al., 2008). Le résidu H108 localisé dans la deuxième boucle extracellulaire de HRG-4, ainsi que le motif FARKY en C-terminale de la protéine assurent tous deux l'acquisition d'hème exogène présent dans le régime de *C. elegans* (Yuan et al., 2012). Suite à son internalisation dans les entérocytes, l'hème peut suivre deux destinées : i) le nutriment est directement incorporé aux hémoprotéines via des mécanismes cellulaires encore obscurs ; ii) l'hème est empaqueté à l'intérieur de vésicules intracellulaires. Pour mobiliser l'hème vésiculaire en cas de besoins, *C. elegans* utilise la protéine transmembranaire HRG-1 dont la localisation a été déterminée à la surface des vésicules intracellulaires contenant de l'hème (Rajagopal et al., 2008). De ce fait, l'hème est expulsé des vésicules et utilisé pour les besoins métaboliques du ver. Le deuxième système d'acquisition d'hème exogène est lui aussi localisé à la membrane plasmique des entérocytes et il utilise les protéines paralogues de HRG-4, à savoir HRG-5 et HRG-6. Dans le cadre d'une alimentation riche en hème, les transporteurs HRG-1 et HRG-4 sont réprimés au niveau transcriptionnel, laissant aux protéines HRG-5 et HRG-6 la mission d'assurer l'assimilation de l'hème à la surface des entérocytes (Sinclair et Hamza 2015).

C. elegans est un organisme pluricellulaire qui nécessite une redistribution de l'hème assimilé par les entérocytes aux tissus avoisinants. Pour ce faire, le ver possède un ABCC transporteur dénommé MRP-5 localisé à la membrane du pôle basolatérale des entérocytes qui exporte l'hème présent dans ces derniers en direction des autres tissus de l'organisme (Korolnek et al. 2014). De plus, à côté de MRP-5, les cellules intestinales produisent et sécrètent la chaperonne de l'hème HRG-3 (Chen et al., 2011). Lors de son passage dans la voie de sécrétion, 2 protéines HRG-3 lient une molécule d'hème. Subséquemment le complexe [HRG-3]₂-hème est expulsé des cellules intestinales et délivre l'hème vers les autres tissus, atteignant les ovocytes (Chen et al., 2011). Les molécules d'hèmes distribuées aux tissus extra-intestinaux de *C. elegans* à partir des entérocytes sont assimilées par les cellules via des transporteurs d'hème encore non identifiés (Sinclair et Hamza 2015). Cependant, il a été démontré que la protéine HRG-2 facilite l'acquisition d'hème par les cellules de l'hypoderme (Chen et al., 2012). HRG-2 est une protéine membranaire polytopique de type I ne possédant qu'un seul domaine transmembranaire (Chen et al., 2012). Ainsi, d'après sa topologie, il est peu probable que cette protéine soit impliquée dans le transport de l'hème au travers de la membrane cytoplasmique. Il est suggéré que HRG-2 est une réductase qui faciliterait le passage de l'hème à la membrane plasmique afin d'être importé par un transporteur de nature inconnue (Chen et al., 2012).

C. elegans ne possède aucun mécanisme connu pour éliminer activement un éventuel excès d'hème de l'organisme. De ce fait, l'homéostasie de l'hème est maintenue par une régulation de la quantité d'hème absorbée au niveau de l'intestin par l'intermédiaire de deux mécanismes. Le premier mécanisme utilise la régulation transcriptionnelle des transporteurs d'hème HRG-1 et HRG-4. En effet, HRG-4 est uniquement exprimé lorsqu'il y a une diète à faible teneur en hème (Rajagopal et al., 2008). Le constat est similaire avec HRG-1 et le mécanisme moléculaire est connu. Dans son promoteur, HRG-1 possède 5 éléments *cis* GATA et 1 élément HERE (Sinclair et Hamza 2010). Lorsque *C. elegans* est cultivé en conditions qui sont pauvres en hème, la séquence HERE localisée au niveau d'un enhancer permet de recruter les facteurs de transcription ELT-2 et ELT-4 sur les éléments GATA (Sinclair et Hamza 2010). Il en résulte une forte expression du gène *hrg-1* pour répondre à un manque d'hème. Au contraire, en conditions riches en hème, un répresseur de nature

inconnu est recruté sur la séquence HERE pour réprimer l'expression de HRG-1 (Sinclair et Hamza 2010). En marge de la régulation transcriptionnelle de ses transporteurs d'hème, *C. elegans* possède également un mécanisme de régulation systémique pour assurer l'homéostasie de l'hème. Lorsque l'apport nutritionnel en hème est faible, les cellules intestinales sécrètent la protéine HRG-7 qui est perçue dans un second temps par les neurones. Dans cette situation, les cellules neuronales sécrètent le facteur de croissance DBL-1 (Sinclair et al., 2017). À son tour, DBL-1 va communiquer avec les cellules intestinales et favoriser la répression transcriptionnelle des gènes *hrg-1* et *hrg-7* grâce à une voie de signalisation utilisant le facteur de transcription SMA-9 (Sinclair et al., 2017). Physiologiquement, la protéine HRG-7 intervient dans la régulation négative de l'expression du transporteur HRG-1. Ainsi, HRG-7 va contrebalancer l'expression de HRG-1 avec une diète pauvre en hème et éviter une accumulation toxique d'hème chez le ver (Sinclair et al., 2017).

1.3.4.2 Acquisition de l'hème chez *Leishmania amazonensis*

Leishmania amazonensis est un parasite intracellulaire qui se réplique dans les phagolysosomes présents dans les macrophages de l'hôte (Huynh et Andrews 2008). Ce parasite est une des espèces de la famille des *Leishmania* responsable des infections de type leishmaniose. Ces pathologies infectieuses créent 1 millions de nouveaux cas annuellement et se manifestent en clinique par des leishmanioses de type cutanées ou dans ses formes les plus graves sont de type viscérales, pouvant causer la mort du patient (Burza, Croft, et Boelaert 2018). Au même titre que pour *C. elegans*, *L. amazonensis* est auxotrophe pour la biosynthèse de l'hème et il possède des hémoprotéines critiques pour sa survie. En conséquence, l'acquisition d'hème exogène est obligatoire pour *L. amazonensis*, car elle représente un facteur de virulence majeur. Chez l'humain, les macrophages recyclent l'atome de fer et la molécule d'hème provenant des érythrocytes sénescents chargés en hémoglobine (Soares et Hamza 2016). De par la présence d'une forte charge en hème, les macrophages constituent un réservoir idéal pour la réplication de *L. amazonensis*. Au sein d'un phagolysosome atypique du macrophage, nommé la vacuole parasitophore, *L. amazonensis* entre en compétition avec l'hème oxygénase et l'exportateur d'hème endosomale HRG1 pour

acquérir l'hème provenant de la dégradation des globules rouges (Korolnek et Hamza 2015; Zhang et al., 2018). *L. amazonensis* possède à sa surface le transporteur d'hème LHR1 qui a été décrit comme essentiel pour la virulence du parasite (Huynh et al., 2012; Miguel et al., 2013). LHR1 se localise à la membrane plasmique de *L. amazonensis* et possède 4 domaines transmembranaires. Au sein de la séquence polypeptidique de LHR1, les résidus H36 et H105 sont requis pour la liaison de l'hème dans la lumière de la vacuole parasitophore, tandis que les acides aminés Y18, Y80 et Y129 présents dans les domaines transmembranaires permettent à l'hème de franchir la membrane plasmique de *L. amazonensis* pour rejoindre son cytoplasme (Renberg et al., 2015).

1.3.5 Importance de la molécule d'hème pour les microorganismes pathogènes

Les microorganismes ont besoin de nutriments comme le carbone, l'azote, le phosphate, le soufre, l'oxygène et les métaux pour survivre et proliférer (Colin Ratledge 2007). Ces nutriments sont exploités par les microbes dans leurs environnements immédiats. Dans le cas d'organismes pathogènes pour les animaux, et particulièrement pour l'homme, les nutriments proviennent exclusivement de l'hôte. Par conséquent, l'acquisition de l'hème est un facteur de virulence majeur retrouvé chez de nombreux microorganismes pathogènes chez les mammifères. Chez l'humain, l'hème n'est pas disponible sous forme libre pour supporter la croissance des microorganismes pathogènes. En effet, l'hème est majoritairement retrouvé comme groupement prosthétique dans l'hémoglobine chez les globules rouges. Il est estimé qu'il faut environ 10 μ M de fer, qu'il soit organique ou inorganique, pour assurer la croissance des microorganismes. Or, avec tous les moyens déployés par l'être humain pour dissimuler le fer et le rendre inaccessible aux pathogènes, la concentration corporelle en fer disponible est évaluée à 10^{-24} M (C. Ratledge et Dover 2000; Sheldon et Heinrichs 2015). La rétention des métaux essentiels pour carencer les microorganismes pathogènes et empêcher leurs proliférations dans l'hôte est appelée l'immunité nutritionnelle (Weinberg 1974, 1975).

Les septicémies représentent un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés (Dolin et al., 2019). Elles sont associées à une forte mortalité (~5 000 000 de décès par année) et des dépenses de santé élevées (Dolin et al., 2019). Les études

épidémiologiques menées en Amérique du Nord estiment que les pathogènes bactériens sont à l'origine de 63% de la totalité des septicémies diagnostiquées en clinique (Dolin et al., 2019). Lorsque les microorganismes pénètrent dans la circulation sanguine, ils doivent faire face à un milieu fortement chélaté pour le fer et l'hème, principalement dû à l'action de la transferrine, de l'hémopexine, de l'haptoglobuline et de l'hémoglobine. Tout d'abord, la transferrine est une protéine localisée dans le compartiment plasmatique et sa fonction moléculaire consiste à lier 2 atomes Fe^{3+} (Knutson 2017). D'un point de vue physiologique, la transferrine est utilisée par l'organisme humain pour délivrer les ions Fe^{3+} à toutes les cellules de l'organisme, mais également pour camoufler l'atome de fer à d'éventuels pathogènes colonisant la circulation sanguine (La et al., 2018). En ce qui concerne l'hémopexine et l'haptoglobuline, ces deux produits polypeptidiques sont également retrouvés dans le plasma et ils contribuent à la liaison de l'hème et de l'hémoglobine respectivement suite à la lyse des globules rouges (A. Smith et McCulloh 2015). Là encore, ces deux protéines séquestrent le fer sous la forme d'hème et rendent l'atome de fer non-accessible aux pathogènes. Enfin, l'hémoglobine empaquetée dans les érythrocytes lie quatre molécule d'hème (Coates et Decker 2017). De ce fait, l'hème n'est pas en contact direct avec les microorganismes lors de l'invasion sanguine. Pour pallier cette réquisition de fer et d'hème imposée par l'organisme humain, les pathogènes ont développé des stratégies ingénieuses pour dérober le fer organique présent dans l'hôte lors du processus infectieux. Ainsi, la bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* est capable de sécréter dans le compartiment sanguin les toxines HlgAB et LukED pour lyser les érythrocytes et libérer l'hémoglobine (Spaan et al., 2015). Suite à l'érythrolyse, l'hémoglobine est retrouvée sous forme libre ou sous la forme d'un complexe avec l'haptoglobuline dans la circulation sanguine. Ces deux formes d'hémoglobines seront prises en charge par le système Isd à la surface de *S. aureus* pour assurer sa nutrition hémique (Sheldon et Heinrichs 2015; Conroy et al., 2019) (Figure 4A). Le système Isd se compose de 9 protéines et forme une machinerie de capture et de transfert de l'hème à travers la paroi cellulaire de *S. aureus* (Sjodt et al., 2018). Les protéines IsdA, IsdB, IsdC et IsdH sont caractérisées par leurs localisations exclusivement pariétales et aussi par le fait qu'elles possèdent un ou plusieurs domaines NEAT. Le domaine NEAT est spécialisé dans la liaison de l'hémoglobine et dans l'extraction de sa molécule d'hème, ainsi que dans la liaison de l'hème libre (Grigg et al., 2007). IsdB et

IsdH sont les deux récepteurs à la surface de la paroi cellulaire en contact avec la circulation sanguine qui lient l'hémoglobine ou le complexe hémoglobine-haptoglobine pour en extraire l'hème (Dryla et al., 2003; Pishchany et al., 2014). Par la suite, l'hème est successivement transférée aux protéines IsdA et IsdC pour permettre à ce micronutriment de franchir la paroi cellulaire et d'atteindre le transporteur de type ABC IsdEF (Villareal et al., 2011) (Figure 4A). Au niveau de la membrane plasmique, IsdE et l'homodimère IsdF transportent l'hème dans le cytoplasme où les hèmes oxygénases non canoniques IsdI et IsdG recyclent l'atome de fer pour les exigences métaboliques du microorganisme (Matsui et al., 2013) (Figure 4A).

Les bactéries Gram négatif possèdent une barrière supplémentaire à l'acquisition de l'hème exogène en comparaison à leurs congénères Gram positif. Cette barrière est matérialisée par la présence d'une bicouche lipidique surnuméraire appelée la membrane externe qui sépare physiquement le périplasme et l'environnement direct de la bactérie. De ce fait, les bactéries Gram négatif vont déployer des stratégies additionnelles pour acquérir l'hème présent dans l'environnement. Parmi les bactéries Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* possède un système d'acquisition du fer organique bien documenté (Marvig et al., 2014). En effet, *P. aeruginosa* possède un système d'import de l'hème classique, mais en complément elle présente la particularité d'avoir l'hémophore HasA (Ochsner, Johnson, et Vasil 2000) (Figure 4B). La protéine HasA est sécrétée dans l'environnement pour extraire l'hème de l'hémoglobine. Le complexe hème-HasA est ensuite reconnu par le récepteur bactérien de la membrane externe HasR. Sa fonction est double dans l'acquisition d'hème exogène (Tong et Guo 2009). Premièrement, la liaison du complexe hème-HasA sur HasR déclenche l'inactivation du facteur anti- σ HasS et l'activation du facteur σ HasI permettant ainsi la transcription de l'opéron *hasAR*. De cette manière, HasA et HasR sont impliqués dans le « sensing » de l'hème exogène et dans une boucle de rétrocontrôle régulant leur expression transcriptionnelle (A. D. Smith et Wilks 2015). Deuxièmement, HasR permet à l'hème fourni par HasA de franchir la membrane externe pour atteindre l'espace périplasmique puis d'être prise en charge par le système *phu*, qui est le principal système d'acquisition d'hème chez *P. aeruginosa* (Mouriño et al., 2016) (Figure 4B). Un des gènes appartenant à l'opéron *phu* code pour le récepteur de la membrane externe PhuR, qui lui, travaille de concert avec HasR pour transporter l'hème vers l'espace périplasmique. À cette étape, la protéine PhuT prend en

charge l'hème et l'amène au transporteur de type ABC PhuUV localisé à la membrane plasmique (Choby et Skaar 2016). Suite à la translocation de l'hème dans le cytoplasme par PhuUV, la molécule d'hème est liée par la chaperonne d'hème PhuS et acheminée à l'hème oxygénase HemO pour être dégradée en biliverdine, CO et Fe³⁺ (O'Neill et al., 2012) (Figure 4B). Finalement, le fer est introduit dans les circuits métaboliques de *P. aeruginosa* pour répondre à ses besoins nutritionnels. En clinique, les septicémies ne sont pas exclusivement causées par des pathogènes bactériens. Les microorganismes fongiques sont eux-aussi incriminés dans les infections sanguines et ils sont responsables de >20% des septicémies retrouvées en milieu hospitalier (Morgan et al., 2005; Antinori et al., 2016).

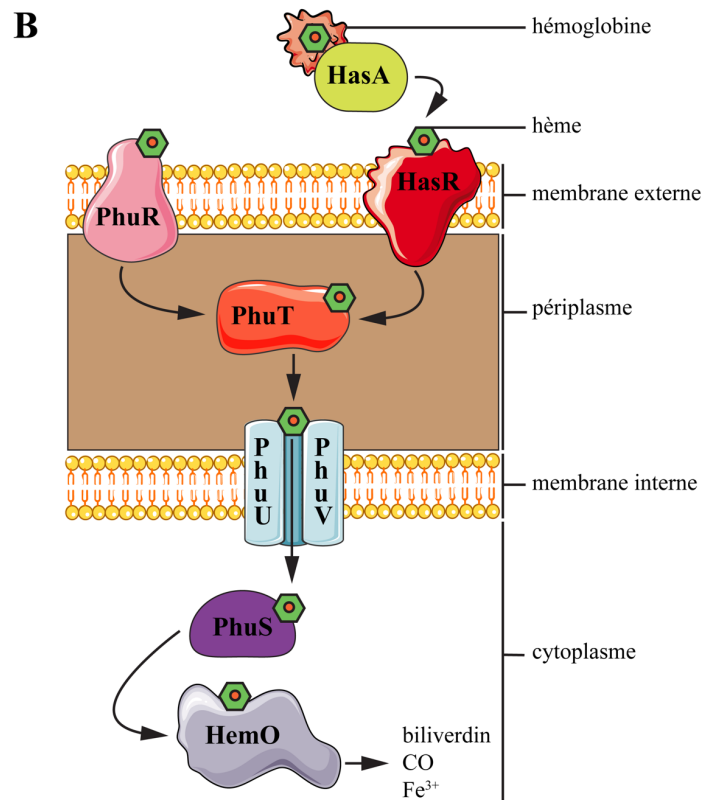
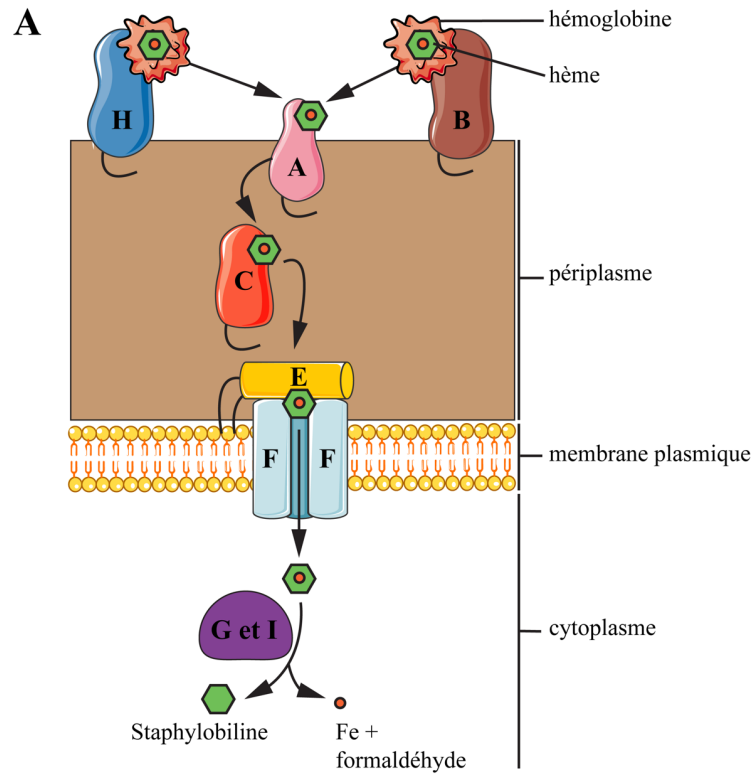


Figure 4. Mécanismes d'acquisition de l'hème chez les organismes bactériens.

Le fonctionnement des molécules présentées dans cette figure est décrit dans la section 1.3.5. *A*, les protéines d'acquisition d'hème de la bactérie Gram positif *staphylococcus aureus* sont indiquées avec une lettre majuscule et elles appartiennent toutes à la famille des protéines Isd. *B*, les protéines d'acquisition de l'hème de la bactérie Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* sont montrées à titre d'exemple.

1.3.6 Mécanismes d'acquisition de l'hème chez les levures pathogènes

1.3.6.1 Épidémiologie des fongémies

Les microorganismes fongiques, principalement les levures pathogènes, représentent un problème majeur de santé publique. En effet, ces organismes unicellulaires sont incriminés dans les infections dites nosocomiales, c'est-à-dire acquises au cours d'un épisode de soins administrés dans un service hospitalier. Dans leurs formes les plus graves, les infections nosocomiales fongiques atteignent la circulation sanguine et causent des septicémies associées à une forte mortalité (>40%). De plus, le séjour à l'hôpital est allongé et les dépenses de santé sont très élevées (Heimann et al., 2015; Magill et al., 2014; Choi et al., 2019). Parmi les champignons rencontrés en clinique, les levures du genre *Candida* sont responsables de 43% des infections fongiques invasives et elles se classent au 4^{ème} rang des microorganismes responsables des septicémies nosocomiales (Antinori et al., 2016; Bitar et al., 2014). La croissance continue de l'incidence des infections sanguines causées par les levures, de concert avec l'augmentation des résistances aux antifongiques utilisés en clinique, crée toutes deux un besoin urgent de nouvelles stratégies antifongiques (Pfaller et al., 2011; Boan et Gardam 2019). De cette urgence sanitaire, les mécanismes moléculaires fongiques pour l'acquisition d'hème émergent comme des cibles attractives et innovantes étant donné qu'ils sont requis pour la virulence des levures infectieuses.

1.3.6.2 Les mécanismes moléculaires d'acquisition de l'hème chez *Cryptococcus neoformans*

La levure pathogène *Cryptococcus neoformans* est capable d'utiliser l'hème et l'hémoglobine de l'environnement comme unique source de fer pour assurer les besoins métaboliques fer-dépendants indispensables à sa survie (Hu et al., 2013). À ce jour, aucun

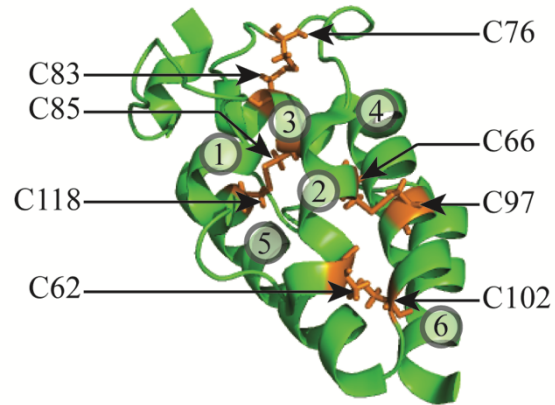
transporteur d'hème n'a été décrit chez *C. neoformans*. Cependant, certaines composantes moléculaires requises pour utiliser l'hème exogène sont connues chez *C. neoformans* et opèrent en conditions de carence de fer. Ainsi, la mannoprotéine Cig1 est sécrétée par *C. neoformans* dans l'environnement pour lier les molécules d'hème présentes. Il a été proposé que Cig1 est un hémophore dont le rôle est d'amener l'hème vers son transporteur de surface (Cadieux et al., 2013). De récentes études génétiques ont révélé que l'utilisation de l'hème et de l'hémoglobine nécessite un mécanisme d'endocytose clathrine dépendant chez *C. neoformans*. En effet, la délétion du gène *CHC1* qui code pour la chaîne lourde de la clathrine cause un défaut d'utilisation d'hème et d'hémoglobine exogène (Bairwa et al., 2019). L'incapacité à utiliser l'hème et l'hémoglobine est également observée avec des souches de *C. neoformans* délétées pour les gènes *LAS17*, *RSV161* et *RSV167* qui codent pour des protéines impliquées dans la formation de vésicules endocytiques (Bairwa et al., 2019). Enfin, il a été également rapporté que l'absence des protéines du complexe ESCRT a un impact négatif sur l'utilisation et l'assimilation d'hème. Le complexe ESCRT est un assemblage de 20 protéines à la surface des endosomes dont la fonction biologique est la génération et le tri des cargos dans les corps multivésiculés (William M. Henne, Buchkovich, et Emr 2011). Une délétion des gènes *VPS27*, *VPS23*, *VPS22*, *VPS20* et *SNF7*, codant tous pour des protéines du complexe ESCRT, est associée à un défaut sévère d'utilisation d'hème exogène pour croître chez *C. neoformans* (Hu et al., 2013, 2015). En résumé, l'acquisition d'hème chez *C. neoformans* requiert l'endocytose clathrine dépendante de la molécule d'hème ou de l'hémoglobine qui est suivie de son internalisation intracellulaire pour combler les besoins nutritionnels de *C. neoformans*.

1.3.6.3 Les mécanismes moléculaires d'acquisition de l'hème chez la levure *Candida albicans*

Candida albicans est la levure pathogène avec le système d'acquisition d'hème exogène le mieux décrit dans la littérature (Bairwa, Hee Jung, et Kronstad 2017). Les protéines de surface requises pour assimiler les molécules d'hème et d'hémoglobine chez *C. albicans* sont uniquement exprimées en condition de carence de fer (Weissman et Kornitzer 2004). Ainsi, lorsque le fer est rare dans l'environnement, les protéines Csa2, Pga7 et Rbt5 forment un

réseau de capture d'hème à la surface de *C. albicans* pour permettre à ce micronutriment de franchir la paroi cellulaire et de pénétrer dans la cellule fongique. Ces trois produits polypeptidiques appartiennent à la famille des protéines de type CFEM qui se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs domaines CFEM composés chacun de l'agencement de 8 cystéines séparés par des intervalles conservés selon le motif suivant : $PxC[A/G]_x2Cx_{8-12}Cx_{1-3}[x/T]Dx_{2-5}Cx_{9-14}Cx_{3-4}Cx_{15-16}$ (Kulkarni, Kelkar, et Dean 2003). Une des fonctions principales du domaine CFEM est de lier directement la molécule d'hème (Nasser et al., 2016). Le cristal de la protéine Csa2 a révélé que le domaine CFEM adopte une structure atypique en forme de panier hélicoïdale à 6 hélices α . Les 8 cystéines sont réparties dans les hélices n°2, 3 et 4 et interviennent dans la formation de 4 ponts disulfures dont les rôles sont de maintenir la structure tertiaire de Csa2 en place (Nasser et al., 2016) (Figure 5A). L'association du domaine CFEM avec l'hème se fait selon deux types d'interaction. Tout d'abord, les acides aminés P75, P77, W79, G82 et V86 du domaine CFEM créent une plateforme hydrophobe plane qui interagit avec le noyau protoporphyrine de la molécule d'hème suivant les forces de Van der Waals (Nasser et al., 2016). Ensuite, le résidu D80 forme une liaison de coordination axiale avec l'atome de fer situé dans la molécule d'hème. Finalement, la coordination distale du fer se fait par l'intermédiaire du résidu Y36 présent dans la longue queue N-terminale de Csa2 qui vient emprisonner l'hème sur la partie supérieure du panier hélicoïdale (Nasser et al., 2016). Il est à noter que le résidu Y36 n'appartient pas au consensus CFEM (Figure 5B).

A



B

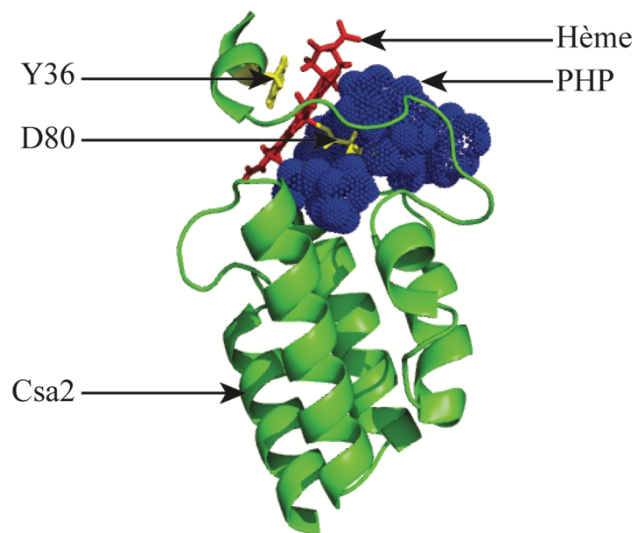


Figure 5. Structure de la protéine Csa2 et son interaction avec la molécule d'hème.

A, la protéine Csa2 est composée de 6 hélices α numérotées de 1 à 6 à l'aide des cercles gris. Les cystéines appartenant aux domaines CFEM sont indiquées en oranges et forment des ponts disulfures pour maintenir la structure tridimensionnelle de Csa2 selon l'agencement suivant : C62-C102 ; C66-C97 ; C76-C83 ; C85-C118. B, La molécule d'hème est liée à Csa2 par le biais des interactions de Van der Waals entre le noyau protoporphyrine IX et une plateforme hydrophobe plane (PHP) en périphérie de Csa2. De plus, les résidus Y36 et D80 forment deux liaisons de coordination avec l'atome de fer présent dans la molécule d'hème.

La cascade d'internalisation de l'hème exogène chez *C. albicans* se déroule en 3 temps. Premièrement, l'hémophore Csa2 est sécrété dans le milieu extracellulaire par *C. albicans* en

carence de fer (Sorgo et al., 2010; Okamoto-Shibayama et al., 2014; Nasser et al., 2016). La fonction biologique de Csa2 est de dérober la molécule d'hème présente dans l'hémoglobine et de la transférer directement à la protéine Rbt5 localisée dans la partie externe de la paroi cellulaire (Nasser et al., 2016). Deuxièmement, Rbt5 transfère la molécule d'hème fraîchement acquise à la protéine Pga7 qui partage sa localisation entre la partie interne de la paroi cellulaire et la membrane plasmique (Kuznets et al., 2014). Le transfert séquentiel de la molécule d'hème entre les protéines CFEM peut s'expliquer par leur affinité envers la molécule d'hème (Nasser et al., 2016). Les expériences de titration par colorimétrie isotherme ont évalué l'affinité de Csa2, Pga7 et Rbt5 pour l'hème à 0,27 μM (270 nM), 65 nM et 5,4 μM , respectivement (Kuznets et al., 2014; Nasser et al., 2016). Ainsi, de par sa meilleure affinité pour l'hème, Pga7 prend en charge l'hème de Csa2. Cependant, le transfert de l'hème entre Pga7 et Rbt5 ne peut s'expliquer uniquement par leurs différences d'affinité pour l'hème. Comme Rbt5 possède une affinité plus basse pour l'hème que Pga7, il est proposé qu'un partenaire de nature inconnue favorise le transfert d'hème de Pga7 vers Rbt5 (Nasser et al., 2016). Troisièmement, l'hème pénètre dans la levure par endocytose et rejoint la vacuole (Weissman et al., 2008). Le mécanisme moléculaire qui permet à l'hème ou au complexe hème-Pga7 de pénétrer dans le compartiment intracellulaire est inconnu.

1.3.6.4 Études portant sur l'acquisition de l'hème menées sur d'autres espèces fongiques

En marge des levures *C. albicans* et *C. neoformans*, d'autres organismes fongiques sont décrits pour avoir la capacité d'utiliser l'hème exogène. La levure *Candida glabrata* fait partie de ceux-ci. Bien que *C. glabrata* possède une activité hémolytique, cette levure est inapte à utiliser l'hémoglobine comme unique source de fer pour sa croissance (Nevitt et Thiele 2011; Furlaneto et al., 2018). Néanmoins, *C. glabrata* est capable d'utiliser l'hème exogène pour répondre à un épisode de carence de fer (Nevitt et Thiele 2011). Les transporteurs d'hème chez *C. glabrata* ne sont pas connus. Cependant, il est suggéré que la protéine de surface Ccw14 est impliquée dans l'acquisition d'hème exogène (Srivastava, Suneetha, et Kaur 2014). Ccw14 est une protéine retrouvée dans la paroi cellulaire de *C. glabrata* et elle occupe un rôle majeur dans la virulence de cette levure (Srivastava, Suneetha,

et Kaur 2014). Compte tenu du fait que Ccw14 possède un domaine CFEM canonique, son rôle dans l'absorption d'hème exogène est de plus en plus discuté.

La levure *Candida parapsilosis* possède 7 protéines de type CFEM. Au sein de celles-ci les protéines *CFEM2*, *CFEM3* et *CFEM6* permettent à *C. parapsilosis* de croître en présence d'hème comme unique source de fer (Ding et al., 2011). Mais ici encore, les mécanismes d'acquisition et d'utilisation de l'hème ne sont pas connus.

Enfin, la levure *Paracoccidioides lutzii* utilise préférentiellement l'hémoglobine et l'hème comme source de fer (Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão et al., 2014). Pour ce faire, *P. lutzii* possède le récepteur d'hème Rbt5 localisé dans la paroi cellulaire. L'analyse de la séquence primaire en acide aminés de Rbt5 a révélé que ce produit polypeptidique appartient la famille des protéines de type CFEM. Ainsi, *P. lutzii* utilise également un récepteur de surface qui possède un domaine CFEM pour acquérir l'hème présent dans son environnement immédiat (Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão et al., 2014; Elisa Flávia L. C. Bailão et al., 2015).

1.3.6.5 Les composantes cellulaires requises par les levures pour acquérir de l'hème

1.3.6.5.1 Les protéines à ancre GPI

À l'exception de *C. neoformans*, toutes les levures connues pour importer l'hème exogène utilisent des protéines à ancre GPI pour acquérir ce micronutriment. Les ancres GPI appartiennent à la catégorie des modifications post-traductionnelles lipidiques et elles sont exclusivement retrouvées chez les eucaryotes. Au niveau cellulaire, les ancres GPI sont impliquées dans la stabilité et la localisation des protéines auxquelles elles sont associées (Ray, Jatana, et Thukral 2017). Chez les organismes fongiques, les protéines à ancre GPI sont localisées à la membrane plasmique ou dans la paroi cellulaire (Frieman et Cormack 2003). D'un point de vue biochimique, le corps d'une ancre GPI comprend des sucres associés à une molécule de phosphatidylinositol. Ce complexe sucres-phosphatidylinositol est lié à

deux chaînes d'acides gras pour former une ancre GPI (Pierleoni, Martelli, et Casadio 2008) (Figure 6).

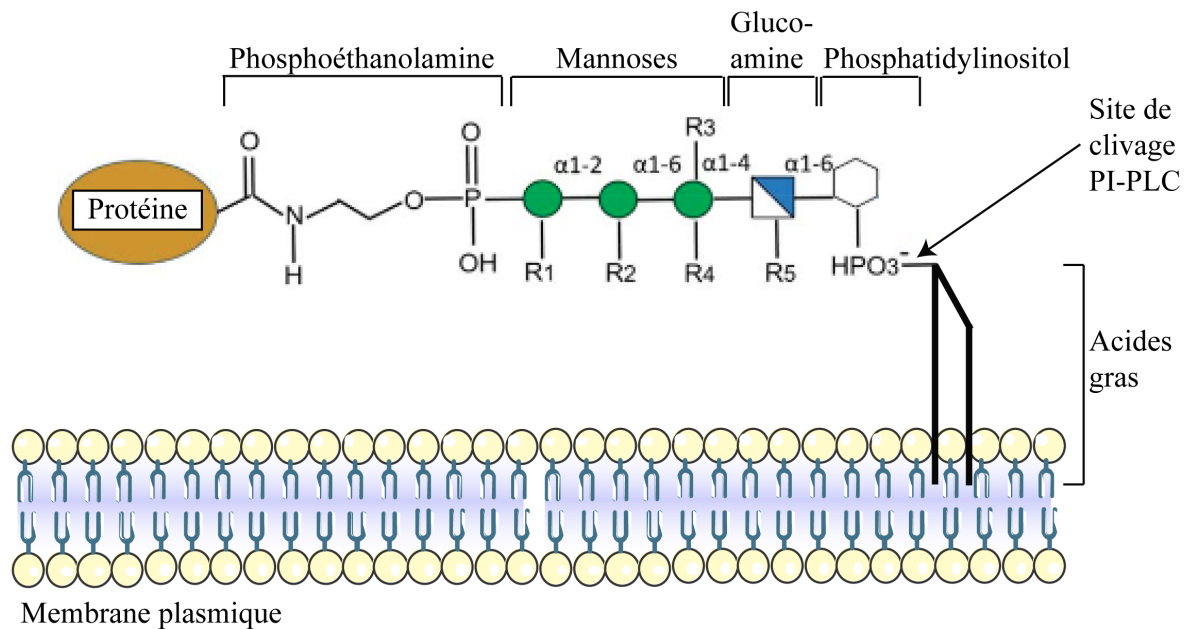


Figure 6. Interaction d'une protéine avec la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI.

L'ancre GPI est une modification post-traductionnelle lipidique constituée d'un phosphoéthanolamine, de 3 mannoses, d'un glucosamine, d'un phosphatidylinositol et de 2 acides gras. La protéine cible est associée au phosphoéthanolamine par l'intermédiaire d'une liaison peptidique. Le complexe résultant est accroché au feuillet externe de la membrane plasmique grâce à deux acides gras. Une ancre GPI peut être clivée suite à l'action d'une phospholipase, la PI-PLC. Suite à l'action de la PI-PLC, la protéine est libérée dans le milieu extracellulaire.

La biosynthèse de l'ancre GPI se déroule dans le réticulum endoplasmique suivant un schéma de 11 réactions enzymatiques (Komath et al., 2018). Une fois l'ancre GPI anabolisée, cette dernière est attachée via une liaison peptidique à une protéine dans la lumière du réticulum endoplasmique (Komath et al., 2018). Il en résulte la formation d'une protéine à ancre GPI qui va maturer dans le sentier de sécrétion et subir des réactions de glycosylation lors de son passage dans l'appareil de Golgi pour former une ancre GPI mature (Orlean et Menon 2007; Kinoshita et Fujita 2016). À la surface cellulaire, la protéine à ancre GPI est accrochée au feuillet externe de la membrane plasmique via les deux chaînes d'acides gras.

L'attachement de l'ancre GPI à une protéine cible est dicté par plusieurs régions au sein même de la séquence primaire de la dite protéine. Tout d'abord, une protéine à ancre GPI possède un peptide de sécrétion en N-terminale pour rejoindre le réticulum endoplasmique et contacter les enzymes nécessaires à sa modification post-traductionnelle. La GPI-transamidase est l'enzyme responsable de l'attachement de l'ancre GPI aux protéines cibles. En effet, cette dernière interagit avec la portion C-terminale de son substrat protéique pour cliver le pro-peptide et réaliser une liaison peptidique entre le groupement phosphoéthanolamine de l'ancre GPI et un acide aminé de la protéine cible (Eisenhaber et al., 2014). Le résidu protéique lié par une liaison peptidique à l'ancre GPI est appelé le site ω (Pierleoni, Martelli, et Casadio 2008). La nature des acides aminés avoisinants le site ω est critique pour discriminer entre une localisation destinée à la membrane plasmique et la paroi cellulaire pour une protéine à ancre GPI donnée (Frieman et Cormack 2003). La présence de deux acides aminés basiques entre les positions ω -1 et ω -4 représente un signal de rétention membranaire (Caro et al., 1997), tandis que la présence d'acides aminés hydrophobes aux positions ω -2, ω -4 et ω -5 favorisent l'incorporation de la protéine à ancre GPI dans la paroi cellulaire (Hamada et al., 1998).

Les récepteurs de nutriments appartenant à la famille des protéines à ancre GPI permettent l'entrée de l'élément nutritif à l'intérieur de la cellule par endocytose (Pal et al., 2002; Lakhan, Sabharanjak, et De 2009). Les protéines à ancre GPI ne possèdent pas de domaines transmembranaires qui pourraient être en contact direct avec le cytoplasme. À ce jour, il est difficile de concevoir le mécanisme moléculaire qui permet de transmettre à la protéine GPI le signal pour entreprendre le processus d'invagination membranaire afin d'être endocytée. De ce fait, les voies d'endocytoses empruntées par les protéines à ancre GPI sont peu connues et largement débattues. Plusieurs hypothèses sont avancées dans la littérature pour expliquer l'invagination d'une protéine à ancre GPI dans la membrane d'une cellule. Un mécanisme proposé fait référence à une endocytose clathrine-indépendante via le sentier CLIC/GEEC (A. P. A. Ferreira et Boucrot 2018). Dans ce cas, la protéine à ancre GPI entre en contact avec la Galactin-3 pour engendrer un stress mécanique à la membrane plasmique (Lakshminarayan et al., 2014). Il en résulte la formation d'une structure tubulo-vésiculaire dans la cellule appelée le CLIC. Plusieurs CLICs vont ensuite fusionner entre eux et donner

naissance à un endosome spécialisé, le GEEC, qui est caractérisé par un enrichissement en protéines à ancre GPI (Lakshminarayan et al., 2014). Subséquemment, les GEECs vont fusionner avec les endosomes de tri et ainsi délivrer les protéines à ancre à GPI au système endomembranaire pour leurs routages intracellulaires subséquents (Kalia et al., 2006). L'association des protéines à ancre GPI avec les radeaux lipidiques constitue la deuxième hypothèse pour expliquer l'endocytose de ces glycoprotéines. Les radeaux lipidiques correspondent à des domaines membranaires enrichis en stérols et sphingolipides. Ils présentent la propriété biochimique d'être résistants aux détergents (El-Sayed et Harashima 2013). L'endocytose des radeaux lipidiques est un processus complexe qui peut suivre plusieurs voies cellulaires (El-Sayed et Harashima 2013). Cependant, seule l'endocytose dépendante de la flotilline est connue pour contribuer à l'internalisation des protéines à ancre GPI. La flotilline reconnaît le cholestérol au sein du radeau lipidique et initie la vésicule d'endocytose (Meister et Tikkanen 2014). Il est démontré chez l'humain que la protéine à ancre GPI CD59 se localise dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Suite à sa liaison avec la toxine du choléra, CD59 pénètre dans la cellule par l'intermédiaire d'une endocytose flotilline-dépendante (Glebov, Bright, et Nichols 2006). Enfin, les interactions latérales avec des protéines transmembranaires de la membrane plasmique constitue le troisième modèle pour l'endocytose des protéine à ancre GPI (Lakhan, Sabharanjak, et De 2009). Les protéines transmembranaires possèdent des connections physiques avec le cytoplasme qui leurs permet de recruter les protéines nécessaires à leur endocytose. Chez l'humain, l'activateur du plasminogène μ PA se lie avec son récepteur, la protéine à ancre GPI μ PAR (Czekay et al., 2001). La formation du complexe μ PA- μ PAR déclenche une interaction physique avec le récepteur des LDL, nommé LRP. LRP est une protéine membranaire polytopique de type 1 avec une queue cytoplasmique située dans sa région N-terminale. L'association physique de cette dernière avec la protéine à ancre GPI μ PAR liée à μ PA déclenche l'endocytose de l'hétérocomplexe μ PA- μ PAR-LRP (Czekay et al. 2001). À l'inverse des mécanismes d'endocytose qui utilisent le CLIC/GEEC et la flotilline, l'internalisation dans la cellule de la protéine μ PAR est dépendante de la clathrine. En effet, la portion cytoplasmique de LRP recrute la clathrine et les protéines requises pour générer la vésicule d'endocytose et franchir la barrière lipidique (Czekay et al., 2001).

1.3.6.5.2 Le complexe ESCRT

L'implication du complexe ESCRT dans l'acquisition d'hème exogène est documentée chez les levures *C. neoformans* et *C. albicans* (Weissman et al., 2008; Hu et al., 2013). Le complexe ESCRT est composé de 5 sous-unités (ESCRT-0, -I, -II, -III et Vps4) qui s'assemblent séquentiellement à la surface des endosomes (Laidlaw et MacDonald 2018). La fonction moléculaire du complexe ESCRT est de déformer la membrane lipidique pour créer les vésicules intraluminales (ILVs) par bourgeonnement dans la lumière des endosomes et contribuer ainsi à la maturation de cette organelle en un corps multivésiculaire (MVB) (William Mike Henne, Stenmark, et Emr 2013). De ce fait, les processus biologiques associés au complexe ESCRT sont nombreux et incluent la biogénèse des vacuoles, la macroautophagie, la dégradation des polypeptides aberrants, ainsi que le tri intracellulaire des protéines (Hurley 2010). À propos de ce dernier point, il est rapporté dans la littérature que des protéines cargos initialement localisées à la membrane plasmique rejoignent les vacuoles en empruntant le complexe ESCRT (Migliano et Teis 2018). Pour suivre cette voie moléculaire, un cargo doit impérativement pénétrer dans la cellule par endocytose et subir une modification post-traductionnelle de type ubiquitination (Paez Valencia, Goodman, et Otegui 2016). Chez les organismes fongiques, le cargo ubiquitinylé est ensuite reconnue par la sous-unité ESCRT-0 qui est composée des protéines Vps27 et Hse1. En plus de constituer la porte d'entrée des cargos dans le complexe ESCRT, Vps27 et Hse1 contribuent à l'attachement de l'ESCRT-0 à la membrane des endosomes, ainsi qu'au recrutement de la sous-unité ESCRT-I (William M. Henne, Buchkovich, et Emr 2011). ESCRT-I est la deuxième sous-unité assemblée lors de la mise en place du complexe ESCRT et se constitue des protéines Sst6, Vps28, Vps37 et Mvb12. La sous-unité ESCRT-I endosse le rôle de lien entre les sous-unités ESCRT-0 et ESCRT-II en permettant de recruter cette dernière à la surface des endosomes (Raiborg et Stenmark 2009). Subséquemment, la sous-unité ESCRT-II, composée des protéines Vps36, Vps22 et Vps25, permet à son tour de recruter la sous-unités ESCRT-III (William M. Henne, Buchkovich, et Emr 2011). D'un point de vue physiologique, ESCRT-III est la sous-unités la plus importante, car elle constitue le module minimal de production des ILVs à l'intérieur des endosomes (Woodman 2016). En effet, la protéine Snf7 de la sous-unité ESCRT-III est capable de s'auto-assembler pour constituer le

filament Snf7 qui initie et allonge le bourgeon dans l'endosome (Woodman 2016). Une fois le bourgeon établi, la sous-unité Vps4 est recrutée dans le but de déstabiliser le filament Snf7 et de créer un étranglement du bourgeon au niveau du goulot. Il en résulte la fusion des membranes de l'endosome pour libérer les ILVs à l'intérieur de cette organelle (Caillat et al., 2019). La protéine cargo empaquetée dans une ILV à l'intérieur du MVB, par l'intermédiaire du complexe ESCRT, sera délivrée à la vacuole suite à la fusion de ces deux compartiments cellulaires.

En dernier lieu, les levures pathogènes possèdent des récepteurs de surface pour assurer leur nutrition en hème. Cependant, le mécanisme d'assimilation et d'utilisation de l'hème par ces microorganismes reste encore à définir au niveau moléculaire. L'utilisation de levures modèles, plus simples à manipuler, permettront de décrypter les mécanismes fongiques d'acquisition de l'hème.

1.4 La levure modèle *Schizosaccharomyces pombe*

Depuis des décennies la recherche fondamentale utilise les organismes modèles pour élucider les bases moléculaires de nombreux processus biologiques conservés chez les eucaryotes supérieurs. Le fait que les organismes modèles sont simples à cultiver, peu coûteux et génétiquement très modulables justifient leurs emplois et ce faisant accélère la compréhension de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires. La drosophile *Drosophila melanogaster*, de même que le nématode *Caenorhabditis elegans*, sont des organismes modèles très populaires en laboratoire pour comprendre une pléthore de mécanismes moléculaires comme le développement embryonnaire, la carcinogénèse et l'autophagie (Jean et al., 2015; Nigon et Félix 2017; Mirzoyan et al., 2019).

Au sein des organismes fongiques, les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* sont des organismes modèles fréquemment utilisées. Cependant, *S. cerevisiae* est une levure très peu efficace pour utiliser l'hème présent dans son environnement. Actuellement aucun importateur d'hème n'a été décrit chez *S. cerevisiae* et la faible acquisition d'hème observée ne se produit qu'en hypoxie et en carence d'hème

(Philpott et Protchenko 2008). Ainsi, *S. cerevisiae* est un modèle peu adapté à l'étude des mécanismes moléculaires qui permettent l'assimilation de l'hème, tandis que *S. pombe* également appelée la levure à fission est plus prometteuse.

Dans les années 1940, le microbiologiste Urs Leupold a établi plusieurs bases de la génétique de *S. pombe* avec ses travaux sur l'homothallisme (Hoffman, Wood, et Fantes 2015). La popularité de *S. pombe* comme levure modèle a grandi au cours des décennies suivantes pour exploser suite aux travaux de Paul Nurse sur la régulation du cycle cellulaire par les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines. Les recherches sur la régulation du cycle cellulaire de Paul Nurse (*S. pombe*), menées conjointement avec Leland H. Hartwell (*S. cerevisiae*) et Tim Hunt (embryon d'oursin de mer) ont été récompensées par le prix Nobel de physiologie et médecine en 2001. Ainsi, ce gain de popularité de *S. pombe* à travers les groupes de recherche du monde entier est visualisé par la forte augmentation du nombre de publications utilisant cette levure comme modèle, en passant de 50 publications par année en 1980, à plus de 450 publications par année au début des années 2000 (Hoffman, Wood, et Fantes 2015). Le succès grandissant de *S. pombe* comme organisme modèle est justifié par le fait que cette levure possède plus de similarités avec les eucaryotes supérieurs que *S. cerevisiae* (Valerie Wood 2006). Par exemple, les composantes moléculaires de la régulation du cycle cellulaire sont extrêmement bien conservées entre *S. pombe* et les mammifères (Yanagida 2009). De plus, *S. pombe* possède les protéines du système d'ARN interférence (Ago1, Dcr1 et Rdp1), ce que ne possède pas *S. cerevisiae* (Hoffman, Wood, et Fantes 2015).

En plus de présenter une similarité élevée avec les processus biologiques des eucaryotes supérieurs, *S. pombe* possède de nombreux avantages et d'outils moléculaires rendant sa manipulation génétique tout à fait possible (Forsburg et Rhind 2006). Tout d'abord, *S. pombe* possède un cycle cellulaire court (3 à 4 heures) et se cultive dans des milieux nutritifs bien établis. Ces deux caractéristiques permettent de produire des souches de *S. pombe* avec des génotypes précis permettant l'étude de la perte de fonction à la suite de la délétion d'un ou plusieurs gènes. De plus, *S. pombe* possède tous les outils moléculaires pour rapidement modifier plusieurs gènes d'intérêts (Siam, Dolan, et Forsburg 2004; Forsburg 2005). L'expression de gènes cibles peut également être contrôlée par une série de promoteurs

inductibles où les protocoles d'utilisation sont bien établis dans la littérature (Sabatinos et Forsburg 2010).

S. pombe possède l'énorme avantage d'avoir un génome qui a été entièrement séquencé en 2002 (V. Wood et al., 2002). En conséquence, l'ensemble des gènes de *S. pombe* sont répertoriés et leurs positions au sein du génome sont connues, facilitant ainsi le processus de manipulation génétique de cet organisme. Au fil des années, les résultats publiés sur *S. pombe* ont permis de considérablement accroître les connaissances fondamentales concernant cet organisme. Les données concernant les gènes et leurs profils transcriptionnels, leurs positions sur le génome, la fonction prédite ou validée des protéines qu'ils codent, la localisation cellulaire de la majorité des protéines et les réseaux potentiels d'interactions protéine-protéine sont classées et ordonnées dans une banque de données continuellement mise à jour dénommée PomBase (Lock et al., 2018, 2019). Ces paramètres biologiques répertoriés comptent parmi les raisons pour lesquelles *S. pombe* est un excellent modèle d'étude pour élucider le fonctionnement de processus cellulaires indispensables au fonctionnement des cellules eucaryotes comme l'homéostasie des métaux essentiels.

Dans cette thèse je vais utiliser la nomenclature standard de *S. pombe* pour nommer les gènes et les protéines. Les gènes de *S. pombe* d'une souche sauvage sont indiqués en minuscules et en italiques avec un « + » en exposant à la fin (*shu1*⁺). La nomenclature officielle de *S. pombe* pour les protéines se constitue de 3 lettres et un chiffre avec une majuscule au début (Shu1).

1.4.1 L'homéostasie du fer chez la levure Schizosaccharomyces pombe

Les travaux effectués par notre laboratoire depuis le début des années 2000 ont permis d'élaborer un modèle de la réponse homéostatique de *S. pombe* en fonction des concentrations en fer dont elle a besoin pour croître. La levure à fission utilise plusieurs mécanismes moléculaires pour réguler l'acquisition et l'utilisation du fer. Par exemple, le facteur de transcription Fep1 est utilisé par *S. pombe* en présence de fer pour réprimer les gènes codant pour des protéines d'acquisition du fer. À l'inverse, le facteur de transcription Php4 réprime les gènes d'utilisation du fer en condition de carence de fer (Brault, Mourer, et

Labbé 2015). L'action combinée de ces deux facteurs de transcription permet à la levure à fission de maintenir une quantité de fer intracellulaire adéquate pour sa croissance (Labbé, Pelletier, et Mercier 2007).

1.4.1.1 La régulation des gènes d'utilisation du fer par Php4

Dans le contexte où *S. pombe* affronte un milieu pauvre en fer, cette levure va guider le fer en priorité vers les réactions biochimiques essentielles à sa survie. Ce phénomène de priorisation du fer, lors d'un épisode de carence de fer, est appelé la « réponse économe en fer » (Philpott, Leidgens, et Frey 2012; Blaby-Haas et Merchant 2013). Ainsi en carence de fer, *S. pombe* va opérer des changements métaboliques qui sont finement orchestrés par le facteur de liaison CCAAT composé des sous-unités protéiques Php2, Php3, Php4 et Php5 (Mercier, Pelletier, et Labbé 2006) (Figure 7). Le complexe Php2/Php3/Php5 est constitutivement exprimé et représente le module de liaison à l'ADN en ciblant la séquence consensus 5'-CCAAT-3' présente en *cis* dans le promoteur de ses gènes cibles (Labbé, Khan, et Jacques 2013). De son côté, la sous-unité Php4 est uniquement exprimée en carence de fer et elle est transportée dans ces mêmes conditions au noyau par les karyophérines Sal3, Imp1 et Cut5 (Khan et al., 2014). Pour ce faire, Php4 possède deux signaux de localisation nucléaire à savoir, $^{171}\text{KRIR}^{174}$ et $^{234}\text{KSVKRVR}^{240}$, qui sont reconnus par les karyophérines sus-citées et permettent le passage de Php4 au travers du pore nucléaire (Khan et al., 2014). Une fois dans le compartiment nucléaire, Php4 s'associe avec l'hétérocomplexe Php2/Php3/Php5 pour réprimer l'expression des 86 gènes appartenant au régulon Php4 (Mercier, Pelletier, et Labbé 2006; Mercier et al., 2008). Php4 réprime l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation du fer et affecte les fonctions cellulaires suivantes : la biosynthèse des acides aminés et des centres Fe-S, la chaîne de transport mitochondriale des électrons, le stockage du fer vacuolaire via la protéine Pcl1, le cycle de Krebs, la réponse au stress oxydant ou encore, le déroulement de la méiose (Mercier et al., 2008; Brault et al., 2016).

Au niveau de sa topologie, Php4 possède plusieurs régions conservées lui permettant de réprimer l'expression de ses gènes cibles en carence de fer. Du côté N-terminale, Php4 est pourvu d'une séquence de 16 acides aminés comprise entre les résidus 26 et 41. Cette courte

région correspond au motif "CCAAT-binding complex" qui permet à Php4 d'interagir physiquement avec le complexe Php2/Php3/Php5 sur la chromatine des gènes appartenant à son régulon (Sybirna et al., 2005; H. Li et Outten 2012). De plus, entre les acides aminés 73 et 111, Php4 possède un motif « coiled-coil » prédit pour jouer un rôle clé dans la fonction, la stabilité et les interactions protéine-protéine de ce facteur de transcription (Brault, Mourer, et Labbé 2015).

Inversement, lorsque les conditions environnementales changent et que les cellules sont en présence de fer, Php4 doit être inactivé pour permettre l'expression des protéines d'utilisation du fer. L'inactivation de Php4 est un processus complexe qui nécessite la protéine Grx4 (Figure 7). Plus précisément, Grx4 appartient à la famille des monothiols glutaredoxines de type CGFS à domaine multiple qui sont caractérisées par la présence d'un domaine TRX en N-terminale et d'un domaine GRX en C-terminale (Vachon et al., 2012). Classiquement, les glutaredoxines sont des oxydoréductases impliquées dans la réduction des ponts disulfures (Chung, Kim, et Roe 2005). Mais contrairement aux glutaredoxines classiques, les monothiols glutaredoxines ne possèdent pas d'activité oxydoréductase (H. Li et Outten 2012). Cependant, grâce au motif ¹⁷²CGFS¹⁷⁵ présent dans son domaine GRX, Grx4 est en mesure de réaliser une liaison de coordination avec un centre Fe-S de type [2Fe-2S] (H. Li et Outten 2012). Ainsi, la capacité de Grx4 à lier un centre Fe-S est à la base du processus d'inactivation de Php4. En effet, Php4 et Grx4 interagissent physiquement ensemble grâce à deux points de contact. Premièrement, le domaine TRX de Grx4 interagit constitutivement avec une région en C-terminale de Php4 indépendamment du statut en fer. La C35 du motif ³¹WAXxC³⁵ présente dans le domaine TRX de Grx4 est essentielle pour permettre la formation du complexe Php4-Grx4 (Vachon et al., 2012). Deuxièmement, le domaine GRX de Grx4 interagit transitoirement avec une seconde région de Php4 en fonction du statut fer. En présence de fer, les centres Fe-S de type [2Fe-2S] sont produits et ils interagissent avec la C175 de Grx4 via une liaison de coordination. Subséquemment, la formation du complexe Grx4-[2Fe-2S] déclenche l'interaction du domaine GRX avec les Cystéines C221 et C227 de Php4 (Labbé, Khan, et Jacques 2013; Dlouhy et al., 2017). La formation de cette liaison fer-dépendante entre Php4 et Grx4 entraîne la dissociation de la sous-unité Php4 de l'hétérocomplexe Php2/Php3/Php5 pour abolir la répression transcriptionnelle appliquée par

Php4 sur ces gènes cibles. Une fois relarguée du complexe Php2/Php3/Php5, la sous-unité Php4 est exportée du noyau vers le cytoplasme par l'exportine Crm1 (Mercier et Labbé 2009) (Figure 7).

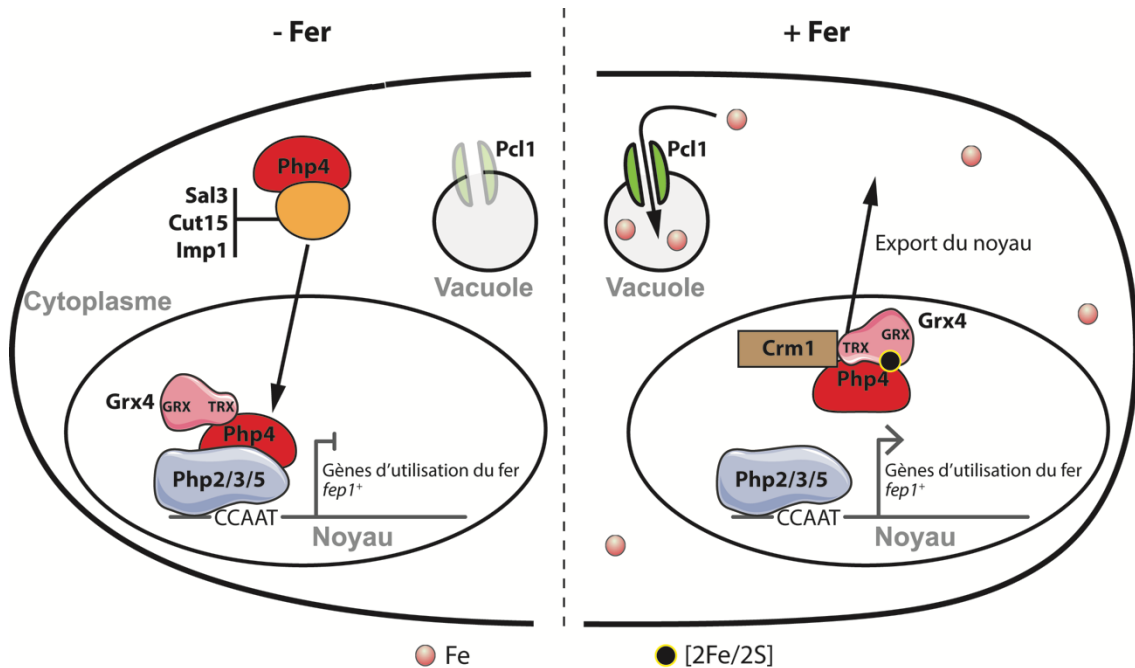


Figure 7. Régulation transcriptionnelle des gènes d'utilisation du fer par la protéine Php4.

En carence de fer, Php4 est importée au noyau par les karyophérines Sal3, Imp1 ou Cut15. Au noyau, Php4 forme un complexe avec Php2, Php3, Php5 et Grx4 via son domaine TRX. Dans ces conditions, Php4 réprime l'expression des gènes d'utilisation et de stockage du fer (Pcl1), ainsi que l'expression du gène codant pour le facteur de transcription *fep1*⁺. En présence de fer, le domaine GRX de Grx4 interagit avec Php4 par l'intermédiaire d'un centre [2Fe/2S]. Cette association déclenche l'inactivation de Php4 et son export du noyau par l'exportine Crm1.

1.4.1.2 La régulation des gènes d'acquisition du fer par Fep1

La levure *S. pombe* possède une batterie de gènes lui permettant de répondre à un manque de fer intracellulaire pour assurer sa survie. Ces gènes codent pour différents systèmes d'acquisition du fer extracellulaire et la majorité de ces derniers sont sous le contrôle du facteur de transcription Fep1. Fep1 est un répresseur transcriptionnel de type GATA qui interagit avec les éléments en *cis* 5'-(A/T)GATA(A/T)-3' présents dans le promoteur de ses

gènes cibles (Pelletier et al., 2002). La répression transcriptionnelle médiée par Fep1 est maximale lorsque les éléments GATA sont précédés des nucléotides 5'-ATC-3' et créent la séquence GATA modifiée 5'-ATC(A/T)GATA(A/T)-3' (Pouliot et al., 2010). En présence de fer, Fep1 se lie à la chromatine et réprime l'expression des gènes d'acquisition du fer. La capacité de liaison à l'ADN de Fep1 est fournie par une région en N-terminale comprise entre les résidus 1 à 241 qui regroupe deux motifs à doigts de zinc de type Cys₂/Cys₂, nommés ZF1 et ZF2. Les 2 motifs ZF1 et ZF2 sont séparés par une région riche en cystéines qui comprend 27 acides aminés (Jbel et al., 2009). Cependant, le module minimal de liaison à l'ADN qui permet à Fep1 de s'associer à la chromatine est représenté par la région riche en cystéines et ZF2 (Jbel et al., 2009). Lorsque le fer est biodisponible pour la levure à fission, les cystéines C70, C76, C85 et C86, toutes présentes dans la région riche en cystéines de Fep1 sont impliqués dans l'activation de Fep1, soit via un centre fer-soufre ou des ions de fer inorganique. L'une ou l'autre des formes de fer a été rapporté par des équipes différentes. Ce qui fait que ce point est encore débattu (Encinar del Dedo et al., 2015; H.-J. Kim et al., 2016). La formation de la forme active de Fep1 enclenche un changement de conformation dans la structure du facteur de transcription qui se répercute par une augmentation de son affinité pour les éléments GATA présents en *cis* dans le promoteur de ses gènes cibles (Labbé, Khan, et Jacques 2013). De ce fait, Fep1 se lie aux promoteurs des gènes appartenant à son régulon afin de réprimer leur expression et éviter ainsi une surcharge délétère en fer intracellulaire. La fonction de répression transcriptionnelle de Fep1 est assurée par la formation d'un hétérocomplexe avec le corépresseur Tup11 (Znaidi et al., 2004). Par l'intermédiaire de 7 motifs WD40 présents en C-terminale, Tup11 établit une interaction physique directe avec Fep1 (Znaidi et al., 2004). Ensuite, Tup11 est en mesure de recruter la protéine Ssn6 qui eux ensemble, permettent des changements moléculaires entraînant la répression de l'expression génique. Ces changements incluent potentiellement des (i) modifications épigénétiques de la chromatine, (ii) la réorganisation des nucléosomes défavorisant l'expression génique et (iii) une interférence directe avec l'ARN polymérase II empêchant son action (Fagerström-Billai et al., 2007; M. E. Ferreira et al., 2010).

Lorsque la quantité de fer intracellulaire devient trop basse et inadéquate pour les besoins cellulaires de la levure, cette dernière doit impérativement inhiber l'action de Fep1 pour

permettre l'expression des gènes d'acquisition du fer. Suivant un processus similaire à Php4, l'inactivation de Fep1 requiert la protéine Grx4 (Jbel, Mercier, et Labbé 2011) (Figure 8). Ainsi, le domaine TRX de Grx4 interagit constitutivement avec la portion C-terminale de Fep1. Ici encore, la cystéine C35 du domaine TRX est nécessaire pour la formation du complexe Grx4-Fep1 (Jbel, Mercier, et Labbé 2011). D'autre part, le domaine GRX de Grx4 interagit avec la portion N-terminale de Fep1, uniquement en carence de fer, par l'intermédiaire de la C172 de Grx4 (Jbel, Mercier, et Labbé 2011). La formation de l'hétérocomplexe Fep1-Grx4 est indispensable pour dissocier Fep1 de la chromatine et donner lieu à l'expression des gènes d'acquisition du fer (Jbel, Mercier, et Labbé 2011). Néanmoins, Grx4 n'est pas le seul acteur moléculaire responsable de l'inactivation de la fonction de Fep1. En effet, il a récemment été documenté que la protéine Fra2 intervient également dans ce processus (Jacques et al., 2014). Cette protéine de type BolA est en mesure de former un hétérodimère avec Grx4. Le modèle actuel suggère que le complexe Fra2-Grx4 possède un centre Fe-S de type [2Fe-2S] qui intervient dans la capacité de jauger la quantité de fer disponible au sein de la cellule (Encinar del Dedo et al., 2015). Par conséquent, en carence de fer, le centre Fe-S du complexe [2Fe-2S]-Fra2-Grx4 est désassemblé. Ensuite, le modèle actuel suggère que le fer présent dans la région riche en cystéine de Fep1 est transféré vers le complexe Fra2-Grx4 pour potentiellement reconstituer le centre Fe-S. La perte de l'atome de fer de Fep1 s'accompagne d'une diminution de l'affinité de ce dernier pour l'ADN et entraîne sa dissociation de la chromatine (Encinar del Dedo et al., 2015; Jacques et al., 2014). Suite à l'inhibition de Fep1 par Grx4 et Fra2, les gènes permettant à *S. pombe* d'acquérir du fer sont exprimés pour répondre à un épisode de carence de fer (Figure 8).

1.4.1.3 Interdépendance transcriptionnelle des facteurs de transcription Fep1 et Php4

L'activité des répresseurs de la transcription Fep1 et Php4 est régulée par des mécanismes post-transcriptionnels comme décrits dans les sections 4.1.1 et 4.1.2. Cependant, ces facteurs de transcription sont également régulés en fonction du statut en fer au niveau de leur transcription (Mercier, Pelletier, et Labbé 2006). En présence de fer, Fep1 va réprimer l'expression du gène codant pour la sous-unité Php4 et contribuer ainsi à l'expression des gènes d'utilisation du fer. Au sein de son promoteur, Php4 possède deux éléments GATA en

position $^{-188}\text{AGATAT}^{-183}$ et $^{-165}\text{TGATAA}^{-160}$ qui sont liés par Fep1 (Mercier, Pelletier, et Labbé 2006). En suivant le même raisonnement, le complexe Php2/Php3/Php5/Php4 va s'associer avec le motif $^{-188}\text{CCAAT}^{-184}$ présent au niveau du promoteur du gène codant pour Fep1 en réponse à la carence de fer (Mercier et al., 2008). Cette régulation Php4-dépendante de Fep1 contribue à la cascade d'évènements moléculaires permettant l'expression des gènes qui codent pour les protéines d'acquisition du fer. En conclusion, les facteurs de transcription Fep1 et Php4 sont aussi impliqués dans une boucle de rétrocontrôle transcriptionnelle pour finement réguler l'homéostasie du fer dans la levure à fission en fonction du fer disponible dans l'environnement (Mercier et al., 2008).

1.4.2 Les systèmes d'acquisition du fer chez Schizosaccharomyces pombe

En carence de fer, la levure *S. pombe* exploite principalement trois stratégies pour acquérir le fer extracellulaire. La première stratégie utilise le système d'acquisition du fer réductase dépendant. À la surface cellulaire, le Fe^{3+} présent dans le milieu extracellulaire va être réduit par la ferriréductase Frp1. Suite à la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , l'atome de fer franchit la membrane plasmique en empruntant le complexe Fio1-Fip1. Ainsi, l'oxydase Fio1 va réoxyder le Fe^{2+} en Fe^{3+} pour lui permettre d'être pris en charge par la perméase Fip1. La fonction biologique de Fip1 est de transporter le Fe^{3+} au travers de la membrane plasmique (Figure 8).

La deuxième stratégie d'acquisition du fer utilisée par *S. pombe* repose sur l'utilisation des sidérophores. La levure à fission possède les gènes codant pour les protéines qui sont responsables de la production de ferrichrome à partir de l'ornithine en suivant les réactions enzymatiques suivantes: (i) la N^5 -hydroxylation de l'ornithine par Sib2 (ii) l'acétylation de la N^5 -hydroxyornithine grâce à l'enzyme codée par le gène *SPBC17G9.06c* et (iii) une combinaison de six réactions de condensation de la N^5 -acetyl- N^5 -hydroxyornithine qui sont associées à une réaction de cyclisation par l'enzyme Sib1 de type NRPS afin de produire de l'apoferrichrome (Schwecke et al., 2006; Mercier et Labbé 2010). Suite à sa biosynthèse, l'apoferrichrome est soit utilisé comme molécule liant du fer intracellulaire ou il est excrété dans le milieu extracellulaire pour lier du Fe^{3+} biodisponible dans l'environnement (Plante et

Labbé 2019). Une fois la molécule $[\text{Fe}^{3+}]$ -ferrichrome formée, cette dernière est transportée dans la cellule par le transporteur de type MFS Str1 (Plante et Labbé 2019) (Figure 8). À côté de la protéine Str1, le MFS transporteur Str2 pourrait également intervenir dans l'assimilation des sidérophores. En effet, l'expression hétérologue de Str2 dans la souche *fet3Δarn1-4Δ* de *S. cerevisiae* a révélé que Str2 possède la capacité de transporter le $[\text{Fe}^{3+}]$ -ferrichrome et le xénosidérophore $[\text{Fe}^{3+}]$ -ferroxiamine-B (Pelletier et al., 2003) (Figure 8). Il est à noter, toutefois, que Str2 est localisé à la membrane vacuolaire chez *S. pombe* (Matsuyama et al., 2006). Il pourrait donc servir à emmagasiner des sidérophores à l'intérieur de l'organelle pour leur utilisation ultérieure lorsque les cellules en nécessitent. Des travaux futurs seront nécessaires afin de mieux comprendre le rôle physiologique de Str2.

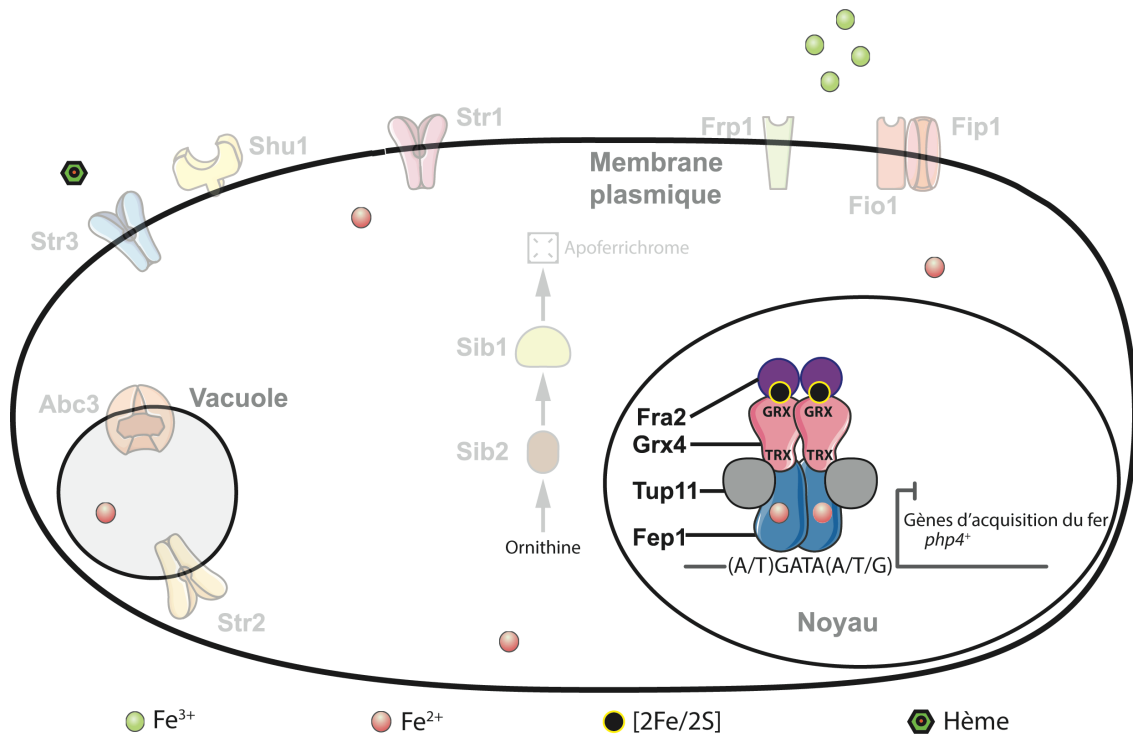
La troisième stratégie qu'utilise *S. pombe* afin d'acquérir du fer consiste à l'obtenir de l'hème. Ce moyen d'acquisition sera décrit plus en détails dans la section Résultats de la thèse étant donné que c'est le sujet principal de ma thèse.

1.4.3 Relation entre le métabolisme de l'hème et le statut en fer inorganique chez S. pombe

La levure à fission possède une voie de biosynthèse d'hème responsable de la production d'hème endogène pour nourrir les hémoprotéines cellulaires. Les 8 enzymes responsables de la néo-synthèse de l'hème chez *S. pombe* sont codées par les gènes suivants : *hem1⁺*, *hem2⁺*, *hem3⁺*, *ups1⁺*, *hem12⁺*, *hem13⁺*, *hem14⁺* et *hem15⁺*. Le gène *hem1⁺* est d'une importance capitale en laboratoire pour l'étude des mécanismes d'acquisition d'hème exogène. En effet, la délétion de *hem1⁺* produit une souche de *S. pombe* dépourvue de l'ALAS qui est incapable de biosynthétiser la molécule d'hème (Normant, Mourer, et Labbé 2018). En conséquence, un mutant *hem1Δ* est inviable à moins d'une supplémentation en acide aminolévulinique pour permettre à la voie de biosynthèse d'hème de reprendre à l'étape 2 et de produire le groupement prosthétique mature (D.-U. Kim et al., 2010; Normant, Mourer, et Labbé 2018). La supplémentation en hème exogène est une stratégie alternative applicable à une souche mutante *hem1Δ* afin de permettre sa survie et sa croissance (Normant, Mourer, et Labbé 2018). En effet, en absence de biosynthèse endogène d'hème (*e.g.* due à la délétion du gène *hem1Δ*), l'addition d'hème exogène est captée et transportée à l'intérieur de la cellule par 2

protéines de surface qui sont Shu1 (sujet de cette thèse) et Str3 (Normant, Mourer et Labbé 2018). Ces deux protéines possèdent des affinités différentes pour l'hème, Shu1 ayant une affinité plus grande comparativement à Str3 (Normant, Mourer et Labbé 2018). Il est à noter que la voie de biosynthèse en hème est étroitement liée au statut en fer dans la levure à fission (Mercier et al., 2008). En effet, lors d'un épisode de carence de fer, le facteur de transcription Php4 réprime l'expression des gènes *hem3⁺* et *ups1⁺* (Mercier et al., 2008). Il est suggéré que cette répression transcriptionnelle imposée par Php4 va diminuer la production d'hème endogène. Dans ces conditions, et pour sa survie, *S. pombe* déploie une stratégie faisant appel à deux protéines de surface pour acquérir l'hème exogène présent dans son environnement. Les gènes *shu1⁺* et *str3⁺* sont fortement induits par la carence de fer. Dans le cas de Str3, la protéine est produite et se localise à la membrane plasmique (Normant, Mourer, et Labbé 2018). Str3 est un transporteur de type MFS permettant l'import d'hème exogène. Cette protéine possède une boucle extracellulaire, entre les domaines transmembranaires numéro 11 et 12, qui est capable de lier l'hème avec une affinité de 6,6 μ M. Les motifs ⁵³⁰YX₃Y⁵³⁴ et ⁵⁵²SX₄Y⁵⁵⁷ qui sont présents dans cette boucle sont requis pour la capture de l'hème par Str3 (Figure 8).

+ Fer



- Fer

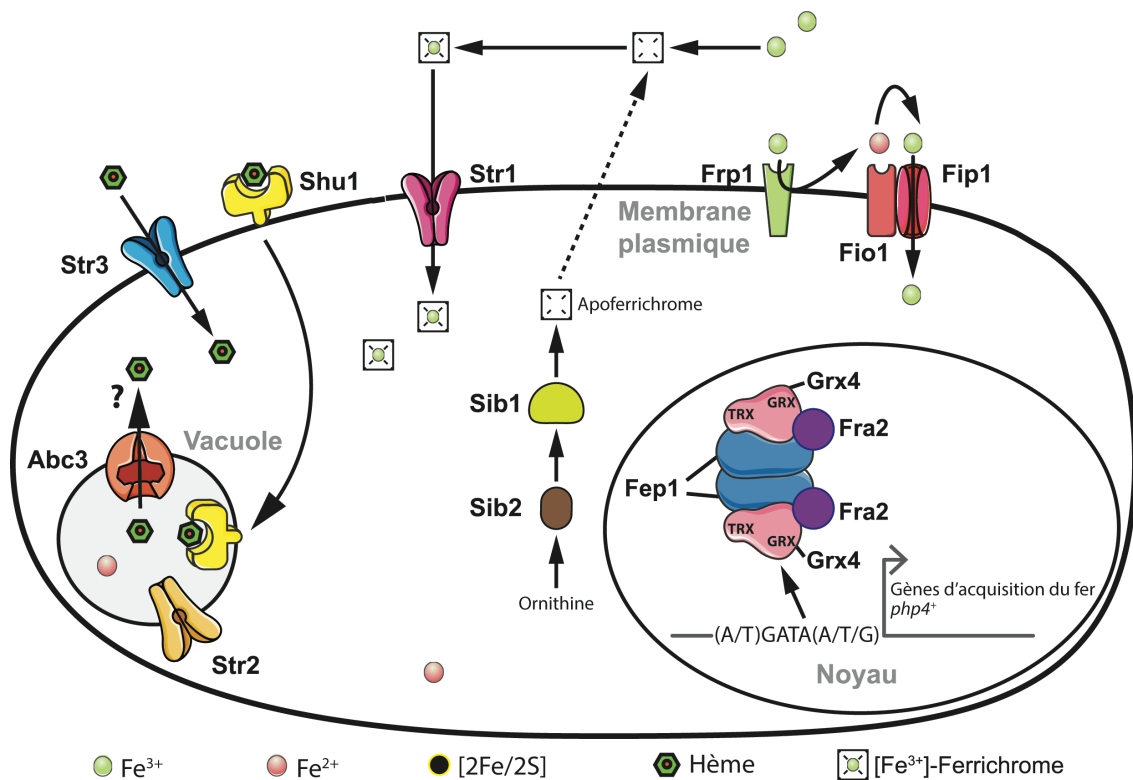


Figure 8. Homéostasie du fer chez *S. pombe*.

Les protéines illustrées dans cette figure, ainsi que leurs modes de fonctionnement, sont décrites dans les sections 1.4.1.2, 1.4.1.3, 1.4.2 et 1.4.3 de l'introduction. Shu1 est référée à la section résultats de la présente thèse.

1.5 Implication de la vacuole dans l'homéostasie des ions métalliques

Il est connu de longue date chez les organismes fongiques que la vacuole est un organe central dans l'homéostasie des ions métalliques (Ramsay et Gadd 1997; L. Li et al., 2001). En effet, le métabolisme des métaux comme le cuivre, le fer, le manganèse, le zinc, le magnésium et le calcium sont étroitement reliés au compartiment vacuolaire (Singh, Kaur, et Kosman 2007). La vacuole est utilisée par les levures pour le stockage des métaux, mais également pour éviter leurs cytotoxicités engendrées par une accumulation excessive de ces derniers dans le compartiment cytoplasmique (Cho et al., 2018). Les déterminants moléculaires présents à la vacuole contribuant à conserver l'homéostasie du fer sont bien décrits chez *S. cerevisiae*. Ainsi, en carence de fer, *S. cerevisiae* exprime deux exportateurs de fer à la membrane de la vacuole. Le premier est Smf3 qui est une protéine homologue à NRAMP2 initialement identifiée chez les cellules de mammifère. Smf3 est une protéine à 11 domaines transmembranaires qui mobilise les réserves de fer présentes dans la vacuole en direction du cytoplasme (Portnoy, Liu, et Culotta 2000). En complément de Smf3, le complexe oxidase-perméase Fet5-Fth1 se localise à la membrane vacuolaire et constitue le deuxième exportateur de fer de cette organelle (Urbanowski et Piper 1999; Liangtao Li, Vulpe, et Kaplan 2003). À l'inverse, dans un milieu riche en fer, *S. cerevisiae* emmagasine le fer dans la vacuole. D'un point de vue physiologique, l'intérêt réside dans la reconstitution des réserves vacuolaires de fer, mais également dans la prévention des dégâts oxydants causés par une éventuelle surcharge de fer cytoplasmique (Liangtao Li et Ward 2018). La protéine Ccc1 se localise à la membrane vacuolaire. Ccc1 transporte le fer en provenance du cytoplasme dans la vacuole (L. Li et al. 2001; Liangtao Li, Kaplan, et Ward 2017). Les acteurs gouvernants l'import et l'export du fer de la vacuole sont finement régulés par les facteurs de transcription Aft1/Aft2 et Yap5. En carence de fer, les facteurs de transcription Aft1 et Aft2 vont s'accumuler dans le noyau et reconnaître les éléments FeRE présents dans

les promoteurs des gènes cibles pour ainsi induire leurs transcriptions (Ramos-Alonso et al., 2018). De ce fait, Smf3 et Fet5-Fth1 seront produits et ils permettront à *S. cerevisiae* de transporter le fer hors de la vacuole afin de survivre à un épisode de carence en fer. Le facteur de transcription Yap5, quant à lui, est constitutivement localisé dans le noyau. En présence de fer des centres 2Fe-2S sont biosynthétisés et distribués à l'intérieur de la cellule. Une fraction de ces derniers se lie à Yap5 pour activer la transcription du gène *CCCI* afin de produire le transporteur qui médie à l'accumulation de fer dans la vacuole (Rietzschel et al., 2015).

1.5.1 Importance de la vacuole dans l'homéostasie du fer chez S. pombe

La levure *S. pombe* peut également mobiliser ses réserves de fer intracellulaire pour répondre à une carence de ce métal (Pouliot et al., 2010). Lorsque le fer est rare, le gène *abc3*⁺ qui code pour un ABC transporteur de la membrane vacuolaire est fortement induit dans sa transcription (Pouliot et al., 2010). À l'opposé, la transcription de cette cible de Fep1 est réprimée en présence de fer. Au niveau de sa topologie, Abc3 possède un domaine NTE composé de cinq hélices transmembranaires en N-terminale. La présence du domaine NTE dans un ABC transporteur justifie à elle seule l'appartenance de cette protéine à la sous-famille ABCC des ABC transporteurs (Prasad, Khandelwal, et Banerjee 2016). L'importance physiologique du domaine NTE est encore obscure pour le cas particulier de Abc3, cependant il a été démontré que ce domaine joue un rôle clé dans la localisation cellulaire et l'homodimérisation du transporteur HMT-1 chez *C. elegans* d'une part, ainsi que la régulation de l'activité d'efflux du transporteur Cdr1p chez *C. albicans* d'autre part (S. Kim, Selote, et Vatamaniuk 2010; Tsao et al., 2016; S. Kim, Sharma, et Vatamaniuk 2018). En plus de sa portion NTE, Abc3 possède deux domaines NBDs qui interviennent dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire à la translocation de son substrat au travers de la membrane vacuolaire (Pouliot et al., 2010). Enfin, le franchissement de la barrière lipidique est assuré par les domaines MSD1 et MSD2 qui possèdent chacun six hélices transmembranaires et ils constituent le canal emprunté par le substrat d'Abc3 pour traverser la membrane de la vacuole (Pouliot et al., 2010). Chez *S. pombe*, Abc3 est un protagoniste moléculaire critique pour répondre à la carence de fer. En effet, ce dernier

contribuerait à la mobilisation des réserves de fer stockées, dont la forme demeure à être déterminée, de la lumière vacuolaire en direction du cytoplasme pour supporter les besoins cellulaires fer-dépendant (Pouliot et al., 2010). D'autre part, la protéine Pcl1 chez *S. pombe* jouerait un rôle similaire à la protéine Ccc1 de *S. cerevisiae* et serait responsable de stocker le fer dans les vacuoles. Le gène *pcl1*⁺ est une cible de Php4 dont l'expression est observée en présence de Fer (Mercier, Pelletier, et Labbé 2006).

1.5.2 Le rôle de la vacuole dans l'acquisition d'hème chez les levures

L'implication de la vacuole dans l'assimilation d'hème exogène est peu connue chez les levures. Or, l'utilisation d'une molécule d'hémoglobine-rhodamine fluorescente a révélé que l'internalisation de l'hémoglobine et de son hème associé par la protéine CFEM Rbt5 requiert une endocytose, puis l'adressage de l'hémoglobine en direction de la vacuole chez la levure *C. albicans* (Weissman et al., 2008). L'expression hétérologue de la protéine Rbt5 confère à *S. cerevisiae* la capacité d'utiliser l'hémoglobine comme unique source de fer pour croître. Cependant, cette souche de *S. cerevisiae* perd cette faculté à utiliser l'hémoglobine suite à la délétion d'une des ATPases vacuolaires suivantes : Vma10, Vma11, Vma12, Vma13 ou encore, Vma21 (Weissman et al., 2008). Ces expériences chez *S. cerevisiae* renforcent encore plus l'hypothèse d'un rôle clé de la vacuole dans l'assimilation d'hème exogène chez les levures. Enfin, il a été suggéré chez *C. neoformans* que l'utilisation d'hème et d'hémoglobine sont toutes deux dépendantes du compartiment vacuolaire (Bairwa et al., 2019). Des évidences de l'importance des vacuoles dans l'homéostasie de l'hème sont de plus en plus présentées dans la littérature. L'utilisation d'un organisme modèle comme *S. pombe* permettra de faire la lumière sur les déterminants vacuolaires nécessaires aux levures pour utiliser la molécule d'hème et répondre à leurs besoins métaboliques.

1.6 Hypothèses et objectifs de recherche

Avant les travaux décrits dans cette thèse, aucune donnée expérimentale ne supportait le fait que la levure à fission était en mesure d'assimiler l'hème présent dans son environnement. Dû au fait que *S. pombe* est une levure modèle saprophyte, l'existence d'une voie

d'acquisition d'hème exogène est suspectée. De plus, en carence de fer, *S. pombe* exprime le gène *shu1*⁺ dont le produit polypeptidique correspondant possède les caractéristiques topologiques requises pour intervenir dans l'acquisition de la molécule d'hème. Ainsi, il a été émis en hypothèse que Shu1 serait un récepteur d'hème permettant à *S. pombe* d'acquérir ce micronutriment. L'étude de Shu1 pourrait également accélérer les connaissances des mécanismes d'acquisition d'hème chez les eucaryotes. De plus, étant donné que la propriété d'acquérir l'hème est un facteur de virulence chez les levures pathogènes, les résultats reliés à ce projet de recherche pourraient potentiellement être transposables à l'avancement des connaissances en ce qui a trait au développement de nouvelles stratégies antifongiques.

Les principaux objectifs qui ont guidé mes études doctorales ont été :

- 1- d'identifier expérimentalement un récepteur d'hème à la surface cellulaire de *S. pombe* (Mourer et al., 2015)
- 2- d'identifier des mécanismes moléculaires sous-jacents qui permettent à *S. pombe* d'utiliser les molécules d'hème présentes dans le milieu extracellulaire pour croître (Mourer, Normant et Labbé 2017).

CHAPITRE 2

SHU1 IS A CELL-SURFACE PROTEIN INVOLVED IN IRON ACQUISITION FROM HEME IN *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Auteurs de l'article:

Thierry Mourer, Jean-François Jacques, Ariane Brault, Martin Bisaillon et Simon Labbé.

Statut de l'article:

Publié dans The Journal of Biological Chemistry. 2015; 290(16): 10176-10190.

Avant-propos:

Pour la réalisation de ce manuscrit, ma contribution s'élève à plus de 90% du travail expérimental. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été réalisées et analysées conjointement avec JFJ. AB a participé à la construction de certains outils moléculaires (plasmides). Les figures ont été produites par TM (>90%) et SL. MB a participé à l'analyse des données de spectroscopie à fluorescence. J'ai participé activement à l'analyse des résultats ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

Résumé :

Le fer est un cofacteur essentiel nécessaire à de nombreux processus biologiques. En conséquence, les cellules eucaryotes ont développé plusieurs stratégies pour assurer son acquisition. Jusqu'à présent, la levure *Schizosaccharomyces pombe* était connue pour utiliser le système réductase dépendant et les sidérophores pour récupérer le fer présent dans l'environnement. Ici, nous rapportons l'identification du gène *shu1*⁺ qui code pour une protéine permettant à *S. pombe* d'acquérir l'hème extracellulaire pour croître. En carence de fer, la transcription du gène *shu1*⁺ est induite. À l'inverse, en présence de fer, la transcription de ce gène est fortement réprimée par le facteur de transcription de type GATA Fep1, qui s'associe fortement avec une région proximale dans le promoteur de *shu1*⁺ *in vivo*. La protéine Shu1-HA₄ se localise à la membrane plasmique. Lorsque la biosynthèse de l'hème

est sélectivement bloquée dans les souches de *S. pombe* (*hem1Δ*), la capacité de ces cellules à assimiler de l'hème exogène, ou la zinc mesoporphyrine IX qui est son analogue structural fluorescent, est dépendante de la présence de Shu1. Des analyses plus poussées de spectroscopie ont révélé que Shu1 interagit avec l'hémine suivant un K_D de 2,2 μ M. Pris ensemble, les résultats révèlent que *S. pombe* possède un sentier insoupçonné d'assimilation de l'hème utilisé comme source de fer pour supporter la croissance cellulaire.

**Shu1 is a cell-surface protein involved in iron acquisition from heme in
*Schizosaccharomyces pombe****

**Thierry Mourer, Jean-François Jacques, Ariane Brault, Martin Bisaillon, and Simon
Labbé.**

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

*Running title: *Schizosaccharomyces pombe* heme acquisition.

Address correspondence to: Simon Labbé, Faculté de médecine et des sciences de la santé,
3201, Pavillon Z-8, Jean Mignault Street, Sherbrooke (QC) J1E 4K8 Canada. Tel: (819)

821-8000 ext.: 75460; Fax: (819) 820-6831

E-mail: Simon.Labbe@USherbrooke.ca

Keywords: Iron metabolism, heme, cell surface protein, transcription regulation, yeast physiology.

Background: Organisms have evolved diverse strategies to scavenge extracellular iron.

Results: The iron-regulated cell-surface Shu1 protein serves as a novel component for heme acquisition.

Conclusion: This study is the first report to show that a member of Archiascomycetes can acquire exogenous heme.

Significance: Shu1 is a non-canonical heme-binding protein possessing a unique role.

2.1 ABSTRACT

Iron is an essential metal cofactor that is required for many biological processes. Eukaryotic cells have consequently developed different strategies for its acquisition. Until now, *Schizosaccharomyces pombe* was known to use reductive iron uptake and siderophore-bound iron transport to scavenge iron from the environment. Here, we report the identification of a gene designated *shu1*⁺ that encodes a protein which enables *S. pombe* to take up extracellular heme for cell growth. When iron levels are low, the transcription of *shu1*⁺ is induced, whereas its expression is repressed when iron levels rise. The iron-dependent down-regulation of *shu1*⁺ requires the GATA-type transcriptional repressor Fep1, which strongly associates with a proximal promoter region of *shu1*⁺ *in vivo* in response to iron depletion. HA₄-tagged Shu1 localizes to the plasma membrane in cells expressing a functional *shu1*⁺-HA₄ allele. When heme biosynthesis is selectively blocked in mutated *S. pombe* cells, their ability to acquire exogenous heme or the fluorescent heme analog zinc mesoporphyrin IX is dependent on the expression of Shu1. Further analysis by absorbance spectroscopy and heme-agarose pull-down assays showed that Shu1 interacts with heme, with a *K_D* of ~2.2 μM. Taken together, results reported here revealed that *S. pombe* possesses an unexpected pathway for heme assimilation, which may also serve as a source of iron for cell growth.

2.2 INTRODUCTION

Eukaryotic cells are committed to acquire iron because it is an essential component of the active center of several proteins that are associated with fundamental processes (1-3). Iron is generally found in forms that are biologically unavailable, therefore organisms have developed diverse strategies to scavenge it from their environment. Although two strategies namely, reductive iron uptake and siderophore-bound iron transport, have been most studied in fungi, heme is known to be an important source of iron. However, cellular components that are required for heme assimilation and iron acquisition from heme are still poorly understood (4, 5). One reason may be the fact that *Saccharomyces cerevisiae*, one of the most widely adopted yeast, is unable to transport exogenous heme with high affinity (6).

Heme is constituted of a protoporphyrin IX (PpIX) structure in which one atom of iron is coordinated by the imidazole rings (7). Typically, heme serves as a prosthetic group for many enzymes that are intimately linked to essential cellular functions such as respiration, antioxidative protection and synthesis and degradation of several metabolites (8). Heme biosynthesis and heme uptake are part of two different means to acquire heme in several organisms. Heme biosynthesis has been extensively studied (7). It involves eight enzymes that are located either in mitochondria or the cytoplasm, depending where their specific action occurs along the biosynthetic pathway. In *S. pombe*, these eight enzymes are respectively encoded by the following genes: *hem1*⁺, *hem2*⁺, *hem3*⁺, *ups1*⁺, *hem12*⁺, *hem13*⁺, *hem14*⁺, and *hem15*⁺. Hem1 (or δ -aminolevulinic acid synthase) catalyzes the biosynthesis of δ -aminolevulinic acid (ALA) from succinyl-CoA and glycine. ALA is then used by a second enzyme (Hem2 or porphobilinogen synthase) of the biosynthetic pathway towards heme biosynthesis (involving six additional steps). In the absence of Hem1, biosynthesis of heme is blocked. The *hem1* Δ deletion is lethal for *S. pombe* (9), unless exogenous ALA is provided, allowing heme biosynthesis from step 2 to proceed. An additional way to maintain *hem1* Δ cells alive is to add exogenous hemin (heme chloride), thereby fostering cells to use their heme uptake system. The *hem1* Δ mutant strain can thus be used to selectively block heme biosynthesis by controlling growth medium composition (absence of ALA), therefore allowing the possibility to investigate the mechanism of exogenous heme acquisition.

A number of fungal proteins containing a CFEM (Common in Fungal Extracellular Membrane) domain have been reported to bind heme and facilitate its transport (10-12). A canonical eight-Cys-containing CFEM domain corresponds to PxC[A/G]₂CX₈₋₁₂CX₁₋₃[X/T]DX₂₋₅CXCX₉₋₁₄CX₃₋₄CX₁₅₋₁₆C (where x is any amino acid residue). In *Candida albicans*, two CFEM proteins, Rbt5 and Rbt51 (also denoted Pga10), have been shown to bind hemin and hemoglobin (13). However, only deletion of *RBT5* (*rbt5* Δ) (not *rbt51* Δ) affects heme-iron acquisition, indicating that Rbt5 plays a major role for *C. albicans* growth in the presence of hemin as a sole source of iron. On the other hand, growth defect due to the absence of Rbt5 could be restored by adding increasing concentrations of hemin (or hemoglobin), suggesting the existence of additional cellular components or mechanism(s) for acquisition of heme (14). Genome sequence of *C. albicans* has revealed other genes

encoding CFEM-related proteins, including Pga7, Csa1, Csa2 and Ssr1. In the case of Pga7, its inactivation causes a greater growth defect phenotype than a *rbt5Δ* mutant in the presence of hemin or hemoglobin as a sole iron source (14). Although Pga7 exhibits a higher affinity for hemin than Rbt5, hemin can be transferred from one protein to the other (14). Pga7 and Rbt5 localize at the cell surface. However, they show distinct properties with respect to their attachment within the cell wall or cell membrane, Rbt5 being more exposed at the cell surface than Pga7. Interestingly, as opposed to Rbt5 inactivation, the loss of Pga7 attenuates virulence of *C. albicans* in a mouse model of systemic infection (14). Besides the cell surface glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins Rbt5 and Pga7, additional *C. albicans* proteins are involved in exogenous heme acquisition. These proteins include heme oxygenase Hmx1 (15, 16), vacuolar ATPase Vma11 and proteins of the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) system that may be involved in heme trafficking to the vacuole for processing and its utilization as a source of iron (17). However, the mechanism responsible for heme internalization by heme-responsive GPI-anchored proteins remains unclear because of their obvious lack of a cytoplasmic domain. Furthermore, their connection with the ESCRT system and an endocytic pathway to transport cargo to the vacuole remains unclear.

Other yeasts such as *Candida parapsilosis* and *Paracoccidioides brasiliensis* use Rbt5-like proteins to acquire heme (18, 19). In the case of *Cryptococcus neoformans*, the extracellular heme-binding glycoprotein Cig1 is required for exogenous heme uptake (20). *cig1Δ* mutant cells consistently exhibit delayed growth when heme is the sole source of iron. However, Cig1 is not a member of the CFEM family of proteins because it lacks the typical canonical eight-Cys-containing CFEM domain found in other members of this family. Nevertheless, downstream cellular components of Cig1 that participate in heme uptake may be common to those found in *C. albicans* because Vps23, a component of the *C. neoformans* ESCRT system, is also required for heme acquisition (21).

Two pathways of iron acquisition have so far been identified in *S. pombe* (22). The first pathway consists of a ferrireductase and a ferroxidase-permease complex for high-affinity elemental iron uptake (23). The ferrireductase Frp1 reduces Fe^{3+} to Fe^{2+} ions prior to uptake through transport by the Fio1-Fip1 heteromeric complex. The second pathway consists of the production and uptake of siderophores. The siderophore synthetase Sib1 and L-ornithine

N⁵-oxygenase Sib2 participate in ferrichrome synthesis, whereas Str1, Str2 and Str3 are known or predicted to function as siderophore-iron transporters (24-26). A common hallmark of *frp1*⁺, *fio1*⁺, *fip1*⁺, *sib1*⁺, *sib2*⁺, *str1*⁺, *str2*⁺ and *str3*⁺ genes is the fact that they are regulated at the transcriptional level as a function of iron availability. Their expression is induced under conditions of iron starvation, whereas repression of these genes occurs under iron-replete conditions. The iron-dependent repression of *frp1*⁺, *fio1*⁺, *fip1*⁺, *sib1*⁺, *sib2*⁺, *str1*⁺, *str2*⁺ and *str3*⁺ transcription relies on the presence of the GATA-type transcriptional repressor Fep1 (24, 25, 27). Once activated under conditions of elevated iron, Fep1 binds to chromatin containing DNA sequences known as GATA elements [5'-(A/T)GATA(A/T)-3'], which are found in the promoters of its target genes. Conversely, when iron levels are low, Fep1 fails to bind chromatin and that results in strong activation of transcription of genes encoding iron uptake proteins (28).

Genome-wide studies have identified a gene (*SPAC1F8.02c*), denoted *shu1*⁺, whose transcript is induced or repressed as a function of iron depletion or repletion (29, 30). Here, we showed that iron-mediated repression of *shu1*⁺ transcription required GATA-type elements and a functional *fep1*⁺ gene. Using a *shu1*⁺-*HA*₄ allele that retained wild-type function, microscopic analyses revealed that HA₄-tagged Shu1 is localized at the plasma membrane when iron levels are low. When a *hem1Δ shu1Δ* mutant strain was incubated in the absence of ALA and in the presence of hemin, cells were unable to grow unless an untagged *shu1*⁺ or *HA*₄-tagged *shu1*⁺ allele was re-integrated and expressed in this mutant strain. This result revealed that Shu1 allowed the *hem1Δ shu1Δ* mutant to regain its capacity to acquire hemin. As expected, cells expressing Shu1 were able to take up zinc mesoporphyrin IX (ZnMP), a heme analog. Results showed that Shu1 binds to hemin-agarose and exhibits a *K_D* value of ~2.2 μM for hemin. Taken together, these results led to the interpretation that Shu1 supports iron acquisition from extracellular heme under low-iron conditions.

2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast strains and media. Genotypes of strains used in this study are described in Table 1. All strains were maintained on YES medium containing 0.5% yeast extract, 3% glucose, and

225 mg/l of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. In addition, *hem1Δ* deletion strains were supplemented with δ -aminolevulinate (ALA, 200 μ M) under non-selective growth conditions. An alternative way to maintain *hem1Δ* cells alive in the absence of ALA was to add exogenous hemin (heme chloride, 0.075 μ M), thereby fostering cells to use their heme uptake system instead of using their own heme biosynthesis pathway. Strains used for plasmid integration were grown in synthetic Edinburgh minimal medium (EMM) in which specific amino acids were absent as required to promote a chromosomal integration event. In the case of gene expression profile analysis, *S. pombe* liquid cultures were seeded to an A_{600} of \sim 0.5, allowed to grow to exponential phase (A_{600} of \sim 0.9), and left untreated or were treated with 2,2'-dipyridyl (Dip, 250 μ M) or FeCl₃ (100 μ M) for 3 h in each case. For monitoring cell growth, pre-cultures of cells were carried out in YES medium containing 250 μ M Dip to chelate any trace of inorganic iron and in the same time, fostering Shu1 expression. During pre-cultures of cells, 200 μ M ALA was added to ensure cell growth until mid-logarithmic phase (for all indicated strains). At this point, the indicated strains were washed twice and then cell suspensions were diluted 1000-fold in YES containing 10 μ M Dip, 0.075 μ M hemin but in the absence of ALA (unless otherwise stated). Cell growth was then re-started and monitored at each of the indicated times.

Table 1. *S. pombe* strain genotypes.

Strain	Genotype	Source
FY435	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210</i>	(27)
fep1Δ	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 fep1Δ::ura4⁺</i>	(27)
fep1Δ fep1 ⁺	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 fep1⁺::KAN^r</i>	this study
fep1Δ TAP-fep1 ⁺	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 TAP-fep1⁺::KAN^r</i>	(31)
TMY1	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::KAN^r</i>	this study
TMY2	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::KAN^r</i>	this study
TMY3	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 fip1::loxP fio1::loxP hem1Δ::KAN^r</i>	this study
TMY4	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r</i>	this study
TMY5	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP</i>	this study

	<i>shu1Δ::KAN^r shu1⁺::ade6⁺</i>	
TMY6	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP</i>	this study
	<i>shu1Δ::KAN^r shu1⁺-HA4::ade6⁺</i>	
TMY7	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP</i>	this study
	<i>shu1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r shu1⁺-HA4::ade6⁺ abc3⁺-GFP::leu⁺</i>	
JSY22	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 ctr4Δ::loxP ctr5Δ::KAN^r</i>	(34)
	<i>ctr4⁺-GFP::ade6⁺ ctr5-Myc12::leu⁺</i>	

DNA constructs. To generate the pKS-5'UTR-*fep1*⁺-loxP-kanMX6-loxP-*fep1*'3'UTR plasmid, a 3,123-bp NotI-EcoRV PCR-amplified DNA segment containing the *fep1*⁺ locus starting at -1,528 from the translational initiator codon up to the stop codon was inserted into the NotI and EcoRV sites of pKSloxP-kanMX6-loxP. Similarly, a 650-bp Sall-Asp718 PCR-amplified DNA segment containing a 3'-UTR region of the *fep1*⁺ locus was inserted downstream of the second loxP sequence using the Sall and Asp718 sites of pKSloxP-kanMX6-loxP. Once generated, the 5'UTR-*fep1*⁺-loxP-kanMX6-loxP-*fep1*'3'UTR cassette was isolated using NotI and Asp718 digestion and was then integrated at the chromosomal locus of *fep1*⁺, which had previously been disrupted with the *ura4*⁺ gene (27). The *TAP-fep1*⁺ allele was constructed as described (31) and its integration at the chromosomal locus of *fep1*⁺ was performed by homologous recombination using a similar strategy as described above. Two BamHI-EcoRI PCR-amplified fragments containing 200- and 117-bp, respectively, of the promoter region of *shu1*⁺ were inserted into a YEp357R vector (32). The two promoter regions were then isolated from YEp357R*shu1*⁺-200*lacZ* and YEp357R*shu1*⁺-117*lacZ*, respectively, through digestion with BamHI and AatII. The promoter fragments were then swapped for the equivalent DNA restriction fragment in pSP1*fio1*⁺-884*lacZ* (27) to generate pSP1*shu1*⁺-200*lacZ* and pSP1*shu1*⁺-117*lacZ*, respectively. Plasmid pSP1*shu1*⁺-200*lacZ* was used to introduce mutations in all three GATA boxes (positions -122 to -127, -131 to 136, and -136 to -141 relative to the A of the ATG codon of *shu1*⁺) (CCTGTC instead of (A/T)GATAA) using the overlap-extension method (33). To create wild-type and mutant pSP1*shu1*⁺-195/-93*lacZ* fusion plasmids, 4 high-performance liquid chromatography-purified complementary oligonucleotides were annealed pairwise (wild-type strands 1 + 2, and mutated strands 3 + 4) to form double-stranded DNAs. The resulting double-stranded DNAs containing either three consensus GATA-binding sites or three mutated sites were

then amplified by PCR. Due to the fact that the primers contained NotI and SpeI restriction sites, the two purified PCR-amplified fragments were digested with these enzymes and inserted immediately upstream of the minimal *zymI*⁺ promoter gene fused to *lacZ* in pSP1*zymI*⁺-367*lacZ* (30).

PCR amplification of the *shuI*⁺ gene was performed using primers designed to generate XmaI and SacII restriction sites at the upstream and downstream termini of the open reading frame, respectively. The PCR product was digested with XmaI and SacII and cloned into the corresponding sites of pBPade6⁺ (34), generating plasmid pBP*shuI*⁺. Subsequently, the *shuI*⁺ promoter region from position -1317 upstream of the initiator codon of *shuI*⁺ was isolated by PCR amplification and was then inserted into pBP*shuI*⁺ at the ApaI and XmaI sites. This pBP*shuI*⁺ derivative was named pBP-1317*shuI*⁺ and it allowed expression of *shuI*⁺ under the control of its own promoter, once integrated in the genome. A 18-bp StuI-BspEI linker was inserted in-frame within the *shuI*⁺ gene at position +75 relative to the first nucleotide of the initiator codon. The linker was introduced by the overlap extension method. The insertion generated 6 extra amino acid residues following the Asn residue at position 25 (Asn²⁵-Arg-Pro-Asp-Thr-Ser-Gly-Glu²⁶), within a predicted hydrophilic region. We used the restriction sites StuI and BspEI created within *shuI*⁺ to swap the linker region with 4 copies of the HA epitope. To generate the HA₄ DNA fragment, a short DNA region of pSK*ctr6*⁺-HA₄ (35) (harboring 4 copies of the HA tag) was isolated by PCR using primers that contained StuI and BspEI sites. The fragment was digested and cloned into the StuI-BspEI-digested pBP-1317*shuI*⁺S-B linker vector. The resulting plasmid was named pBP-1317*shuI*⁺-HA₄. Plasmid pBP-1317*shuI*⁺-HA₄ was used to introduce mutations in the coding sequence of *shuI*⁺. Codons corresponding to Cys⁸⁷ and Cys⁹² were replaced with Ala residues. These site-specific mutations were created by a PCR overlap extension method. The resulting plasmid was designated pBP-1317*shuI*C87A/C92A-HA₄. This plasmid was used as a template to substitute the codon corresponding to Cys⁷² with an Ala codon. The PCR overlap extension strategy was repeated to generate pBP-1317*shuI*C72A/C87A/C92A-HA₄. The *shuI* mutant allele containing site-specific C72A/C87A/C92A/C101A mutations was created using a similar approach, except that the plasmid pBP-1317*shuI*C72A/C87A/C92A-HA₄ was used as a template.

RNA extraction and analysis. Total RNA was isolated using a hot phenol method as described previously (36). RNase protection assays were carried out as described previously (30). Plasmids pKSlacZ and pSKact1⁺ (37) were used to produce antisense RNA probes, allowing the detection of steady-state levels of lacZ and act1⁺ mRNAs, respectively. pSKshu1⁺ was constructed by inserting a 192-bp BamHI-EcoRI fragment of the shu1⁺ gene into the same restriction sites in pBluescript (Stratagene). The antisense RNA hybridizes to the region between positions +49 and +241 downstream of the A of the initiator codon of shu1⁺. ³²P-labeled anti-sense shu1⁺ RNA was generated using the BamHI-linearized plasmid pSKshu1⁺, [α -³²P]UTP and T7 RNA polymerase as described previously (30).

ChIP assays. *fep1* Δ *php4* Δ cells expressing untagged or TAP-tagged *fep1*⁺ alleles were precultured in the presence of the iron chelator Dip (100 μ M) to prevent iron-dependent activation of Fep1 and, consequently, repression of target gene expression. Cells were harvested from cultures (100 ml) at logarithmic phase, washed, and resuspended in the same medium containing either FeCl₃ (250 μ M) or Dip (250 μ M) for 3 h. The ChIP method was carried out essentially as described previously (38). Quantification of immunoprecipitated DNA was performed by real-time PCR (qPCR) using primers that spanned a proximal *shu1*⁺ promoter region that includes 3 GATA-type elements. As positive controls, primers that encompassed a *fio1*⁺ promoter region that contained 2 functional GATA boxes (27) were also used for qPCR analysis. TAP-tagged Fep1 density at the *shu1*⁺ or *fio1*⁺ promoter was calculated as the enrichment of the specific genomic *shu1*⁺ or *fio1*⁺ promoter region relative to a 18S ribosomal DNA coding region in which no GATA box is 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: *shu1-179* (5'-CAATCTAGAATCAATTAGTGAGGGATAGTCTG-3'), *shu1-80* (5'-GCCATCTTATATAGTACTGGAAATTCAATGAATTAAG-3'), *fio1-830* (5'-CCCCTTCTTCCAGGCATCTG-3'), and *fio1-741* (5'-GTCGGAGTTGGTGTCCACTTTG-3'). Two primers derived from a 18S ribosomal DNA coding region were used as internal background controls: 18S-a (5'-CAGCTTGCGTTGAATACGTCCC-3') and 18S-b (5'-AGCCAATCCAGAGGCCTCACTA-3'). Each qPCR experiment was performed in

triplicate, and all ChIP experiments were repeated at least three times using independent chromatin preparations.

Direct and indirect immunofluorescence microscopy. Mid-logarithmic *hem1Δ shu1Δ* cells expressing Shu1-HA₄ or Shu1C72A/C87A/C92A-HA₄ were subjected to microscopic analysis. After two washes with water to remove ALA, cells were incubated in the presence of hemin (0.075 μM) and then treated with Dip (250 μM) or FeCl₃ (100 μM) for 3 h. To detect Shu1-HA₄ in intact cells, they were fixed by adding formaldehyde immediately at the end of the experimental treatments. In the case of spheroplast preparations, cells were treated with cell wall lytic zymolase for 90 min prior to fixation with formaldehyde. Fixed cells or spheroplasts were adsorbed on poly-L-lysine-coated (0.1%) multiwall slides as described previously (34). Following a 30-min block with TNB (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% BSA, 0.02% sodium azide), cells were incubated with an anti-HA antibody (F-7) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1:250 in TNB. After a 18-h incubation period at 4°C, cells were washed with TNB and incubated for 4 h with a goat anti-mouse Alexa Fluor 546-labelled IgG antibody (Invitrogen) diluted 1:250 in TNB. In the case of *ctr4Δ ctr5Δ* cells expressing Ctr4-GFP and Ctr5-Myc₁₂, they were incubated in the presence of the copper chelator BCS (100 μM) for 3 h. Subsequent steps were carried out as described above in the case of Shu1-HA₄, except that a monoclonal anti-c-myc antibody (clone 9E10, Roche Diagnostics) was used as a primary antibody.

Live-cell imaging of fluorescent zinc mesoporphyrin IX (ZnMP) accumulation was performed using liquid cultures that were seeded to an *A*₆₀₀ of ~0.5. Mid-logarithmic-phase cultures were then incubated in ALA-deficient medium containing 250 μM Dip or 100 μM FeCl₃ for 3h. The cultures were subsequently exposed to ZnMP (2 μM) 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 were examined by fluorescence microscopy using a X1,000 magnification. Fluorescence and differential interference contrast images (Nomarski) of cells were obtained using a Nikon Eclipse E800 epifluorescent microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with a Hamamatsu ORCA-ER digital cooled camera (Hamamatsu,

Bridgewater, NJ). Fields of cells shown in this study correspond to a minimum of five independent experiments.

Preparation of S. pombe extracts, Western blot analysis and hemin-agarose pull-down assays. *hem1Δ shu1Δ* cells expressing the wild-type *shu1*⁺-HA₄ or mutant *shu1*-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ allele were grown to mid-logarithmic phase in the presence of ALA. At this point, cells were washed twice to remove ALA and then incubated in the presence of Dip (250 μM) or FeCl₃ (100 μM) for 3 h. After treatments, cells were lysed with glass beads using a RIPA buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 8 M urea, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, and a complete protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich; P8340). Cells were broken using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals). Lysates were ultracentrifuged at 100,000 Xg for 30 min at 4°C. The supernatant containing soluble proteins was set aside, whereas the pellet fraction was resuspended in a buffer consisting of 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, and the mixture of protease inhibitors. Once resuspended, the pellet fraction was incubated on ice for 30 min and then re-centrifuged at 100,000 Xg for 30 min at 4°C. The supernatant fraction that contained dissolved membrane proteins was used for Western blot analysis or hemin-agarose pull-down assays. In the case of pull-down assays with hemin-agarose, proteins (~50 μg) were incubated with 500 μl hemin-agarose beads and the suspensions were mixed end-over-end for 20 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 μl of SDS loading buffer and heated for 5 min at 95°C. Samples were resolved by electrophoresis on 9-% SDS-polyacrylamide gels. The following antibodies were used for Western blotting analysis, monoclonal anti-HA antibody F-7, monoclonal anti-GFP antibody B-2 (Santa Cruz Biotechnology), monoclonal anti-α-tubulin antibody (clone B-5-1-2) and, monoclonal anti-PCNA antibody PC10 (Sigma-Aldrich). Following incubation with primary antibodies, membranes were washed and incubated with the appropriate horseradish

peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences). Relevant proteins were revealed using an enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham Biosciences).

Purification of Shu1 expressed in E. coli. A DNA fragment containing *shu1*⁺ codons 21 to 200 was amplified by PCR, purified, and inserted in frame in pET28a at NcoI and XhoI restriction sites. When expressed in *E. coli*, this form of Shu1 (21 – 200) showed hydrophilic behavior and was soluble. The first N-terminal 20 amino acid residues of Shu1 are predicted to correspond to a signal peptide which is overall hydrophobic, whereas the last 26 amino acid residues correspond to a short transmembrane domain (or pro-peptide). Removal of these regions yielded a protein that had the required properties for purification. A similar strategy was used to create a pET28a recombinant vector expressing Shu1C72A/C87A/C92A/C101A (sequence 21 to 200) mutant protein, except that the plasmid pBP-1317*shu1C72A/C87A/C92A/C101A* was used as a template for PCR amplification. Fresh transformants of *E. coli* BL21(DE3) containing plasmid pETShu1 (21 – 200) or pETShu1C72A/C87A/C92A/C101A (21 – 200) were grown to an *A*₆₀₀ of 0.5. At this growth phase, the cells were induced with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (0.4 mM) for 20 h at 18°C in the presence of ethanol (2%). Cells were broken up by sonication in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 10% sucrose, 5 mM imidazole, 50 µg/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. Wild-type or mutant Shu1-His₆ (21-200) protein bound to the beads were eluted stepwise with buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10% glycerol) containing 75, 200, 500 and 1000 mM imidazole. Samples (200 mM imidazole eluate fractions) containing Shu1 (21-200) 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). Following filtration, the solution was diluted (1:1000) and hemin concentration was determined at 385 nm using an extinction coefficient of 58,400 liters·mol⁻¹·cm⁻¹. Association of proteins with heme was determined by adding increasing amounts of

a protein (purified wild-type or mutant Shu1, 0 to 7 μ M) to hemin (10 μ M) in 40% dimethyl sulfoxide buffered with 20 mM HEPES (pH 7.4). Differences in absorption spectra over a range of 350 to 600 nm were recorded using a DU730 spectrophotometer (Beckman Coulter). Increases in absorbance at the Soret peak served to monitor formation of the protein-heme complex. Heme-binding curves were generated to represent changes in absorbance at the Soret peak as a function of protein concentrations. Data were analyzed using the GraphPad Prism version 6.04 software.

2.4 RESULTS

Fep1 represses $shu1^+$ gene expression in response to iron. Genome profiling studies have revealed that the *SPAC1F8.02c* gene (also denoted $shu1^+$) is regulated at the level of its transcription in relationship with iron availability (29, 30). $shu1^+$ mRNA levels are induced under conditions of iron starvation and repressed under iron-replete conditions. To further determine whether Fep1 played a role in iron-mediated repression of $shu1^+$ transcription, we deleted $fep1^+$ ($fep1\Delta$). $fep1\Delta$ cells harboring an empty integrative vector exhibited sustained $shu1^+$ transcript levels without any important change in response to iron (Fig. 1). In contrast, $fep1\Delta$ cells in which a wild-type untagged or TAP-tagged $fep1^+$ allele was re-integrated regained the capacity to confer iron-dependent repression of $shu1^+$ expression (~16- and ~18-fold, respectively). These results were similar to the magnitude of iron-mediated repression of $shu1^+$ (~18-fold) observed in the parental strain (WT) (Fig. 1). Collectively, the results showed that Fep1 is required to repress $shu1^+$ gene expression in response to iron repletion.

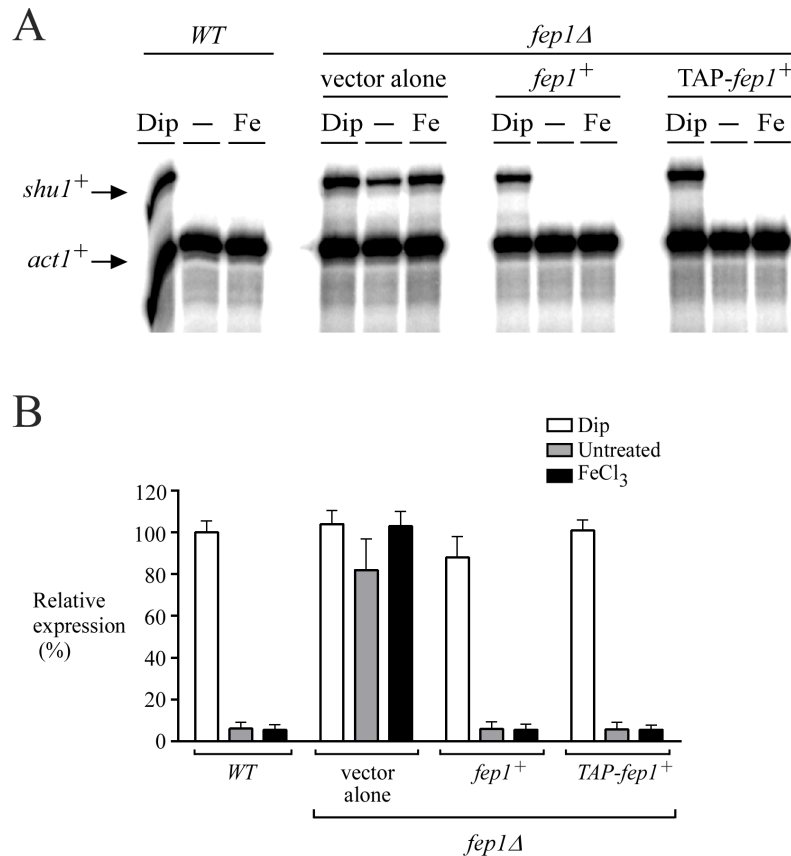


Figure 1. The *shu1*⁺ gene is transcriptionally repressed by iron in a Fep1-dependent manner.

A, Wild-type (WT) and *fep1Δ* strains were left untreated (-) or were incubated with either 2,2'-dipyridyl (Dip) (250 μM) or FeCl₃ (Fe) (100 μM) for 3 h. *fep1Δ* cells were transformed with an empty integrative plasmid (vector alone) or integrative plasmids encoding *fep1*⁺ and TAP-*fep1*⁺ alleles. Total RNA prepared from culture aliquots was assayed by RNase protection assays. The steady-state levels of *shu1*⁺ and *act1*⁺ mRNAs are indicated with arrows. *B*, Graphic representation of the quantification of results of three (n = 3) independent RNase protection assays, including the experiment shown in panel A. The histogram values represent the averages +/- SD of triplicate determinations.

Iron-dependent repression of shu1⁺ mRNA levels requires GATA sequences. We then sought to identify putative GATA *cis*-acting elements that could serve as Fep1-binding sites within the *shu1*⁺ promoter region. Eight GATA boxes containing the sequence [A/T]GATA[A/T] were identified within a promoter region 932 bp long. Three GATA boxes aligned exactly with an extended GATA-type sequence, ATC(A/T)GATA(A/T), that is known to mediate the strongest Fep1-dependent repression response (25). Among them, two elements were arranged as a direct repeat of ATC(A/T)GATA(A/T) between positions -139 to -131 and -

130 to -122 relative to the translational initiator codon of *shuI*⁺ (Fig. 2A). Furthermore, adjacent and partially overlapping these two elements, a third GATA element was identified on the complementary strand (positions -136 to -141) and was orientated in the opposite way (inverted) relative to the transcriptional direction of *shuI*⁺. The findings that these three putative regulatory sequences were adjacent (in comparison with the others that were spread out along the promoter) led us to examine a region of the *shuI*⁺ promoter up to -200 (from the initiator codon) that included them. This promoter segment was fused upstream of and in-frame to the *lacZ* gene in a reporter plasmid. Results showed that cells harboring wild-type ⁻²⁰⁰*shuI*⁺-*lacZ* fusion reporter were able to induce *lacZ* mRNA expression under conditions of iron starvation (~33-fold) (Fig. 2, B and C). In contrast, *lacZ* mRNA was barely detected under basal or iron-replete conditions. To investigate whether the three putative GATA boxes could control *lacZ* gene expression as a function of iron availability, we inserted multiple point mutations that simulated changes known to abolish binding of Fep1 to GATA boxes (27). Mutation of base pairs within the ⁻¹²⁷-AGATAA-⁻¹²² (box 1), ⁻¹³⁶-AGATAA-⁻¹³¹ (box 2), and ⁻¹³⁶-TGATAA-⁻¹⁴¹ (box 3, inverted) elements (GCCGTC instead of [T/A]GATAA) reduced the overall magnitude of *lacZ* expression. Furthermore, there was a complete lack of iron responsiveness of the reporter gene (Fig. 2, B and C). At the moment, the reason for an overall diminution of *lacZ* expression is unknown. One possibility is that, mutation of GATA elements (in this promoter context) may negatively affect the ability of putative adjacent elements to be effective in activating the reporter gene expression. As an additional control, the *shuI*⁺ promoter up to -117 from the initiator codon, which excludes the three GATA elements, was also fused to the *lacZ* gene reporter. Similarly to mutant ⁻²⁰⁰*shuI*⁺-*lacZ* fusion (M1), *lacZ* transcript levels from cells harboring ⁻¹¹⁷*shuI*⁺-*lacZ* fusion exhibited no changes in response to variations in iron levels (Fig. 2, B and C).

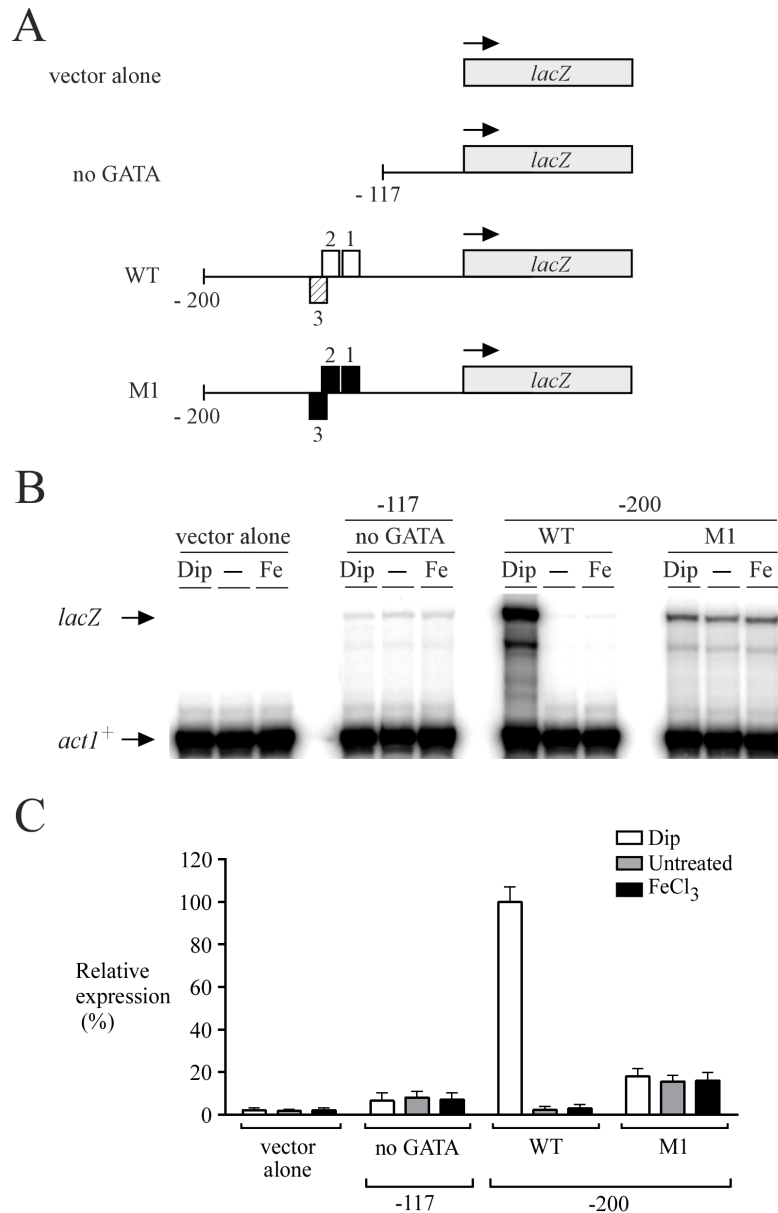


Figure 2. Analysis of proximal *shu1*⁺ promoter sequences required to repress gene expression under basal and high levels of iron.

A, Schematic representation of a 200-bp *shu1*⁺ promoter DNA fragment and its mutant derivative that were inserted upstream of the *lacZ* reporter gene. A shorter DNA segment (117-bp) derived from *shu1*⁺ promoter (lacking GATA element) was also fused to the *lacZ* reporter gene. Empty boxes (1 and 2) represent an extended strong 5'-ATC(A/T)GATA(A/T)-3' element, whereas the hatched box (3) depicts a classical GATA element [5'-(A/T)GATA(A/T)-3']. Filled boxes represent mutant versions [5'-GCCGTC-3'] of GATA elements. Nucleotide numbers (-200 and -117) refer to the positions relative to the translational initiator codon of *shu1*⁺. *B*, The wild-type strain was transformed with the indicated plasmids and grown to exponential phase. Steady-state levels of *lacZ* mRNA from wild-type (*WT*) and mutant GATA fusions (*M1*) were analyzed in the absence (-) or the

presence of Dip (250 μ M) or FeCl₃ (Fe, 100 μ M) for 3 h. *lacZ* and *act1*⁺ mRNA levels are indicated with arrows. C, RNase protection analyses were quantified based on three (n = 3) independent experiments, including the experiment shown in panel B. Values are shown as the averages of three separate determinations +/- SD.

Based on the findings that the integrity of GATA elements located in the proximal *shu1*⁺ promoter region was essential to trigger iron repression of ⁻²⁰⁰*shu1*⁺-*lacZ* fusion, we examined whether these elements could regulate a heterologous reporter gene in an iron-dependent manner. A short DNA segment derived from the *shu1*⁺ promoter (positions -195 to -93) was inserted in its natural orientation upstream of the minimal promoter of the *zym1*⁺ gene fused to *lacZ* (30). This ⁻¹⁹⁵*shu1*⁻⁹³-*zym1*⁺-*lacZ* fusion repressed *lacZ* mRNA expression under basal (untreated) and iron-replete conditions (Fig. 3). In contrast, under conditions of iron starvation, *lacZ* mRNA expression was induced (~4 to 5-fold) compared to the transcript levels detected in the case of control (untreated) or iron-treated cells (Fig. 3). When GATA elements were mutated (M2 mutant), sustained and constitutive expression of *lacZ* mRNA was observed, irrespective of cellular iron status (Fig. 3). In the absence of the short DNA segment derived from the *shu1*⁺ promoter (positions -195 to -93), low but constitutive expression of *lacZ* mRNA was detected in cells transformed with a plasmid containing only the *zym1*⁺ minimal promoter (Fig. 3). The presence of the minimal promoter may explain why low levels of *lacZ* mRNA were detected under all conditions tested. Taken together, these results clearly showed that the proximal promoter region of *shu1*⁺ contains functional GATA-type elements, which are required for the transcriptional repression of *shu1*⁺ in response to iron.

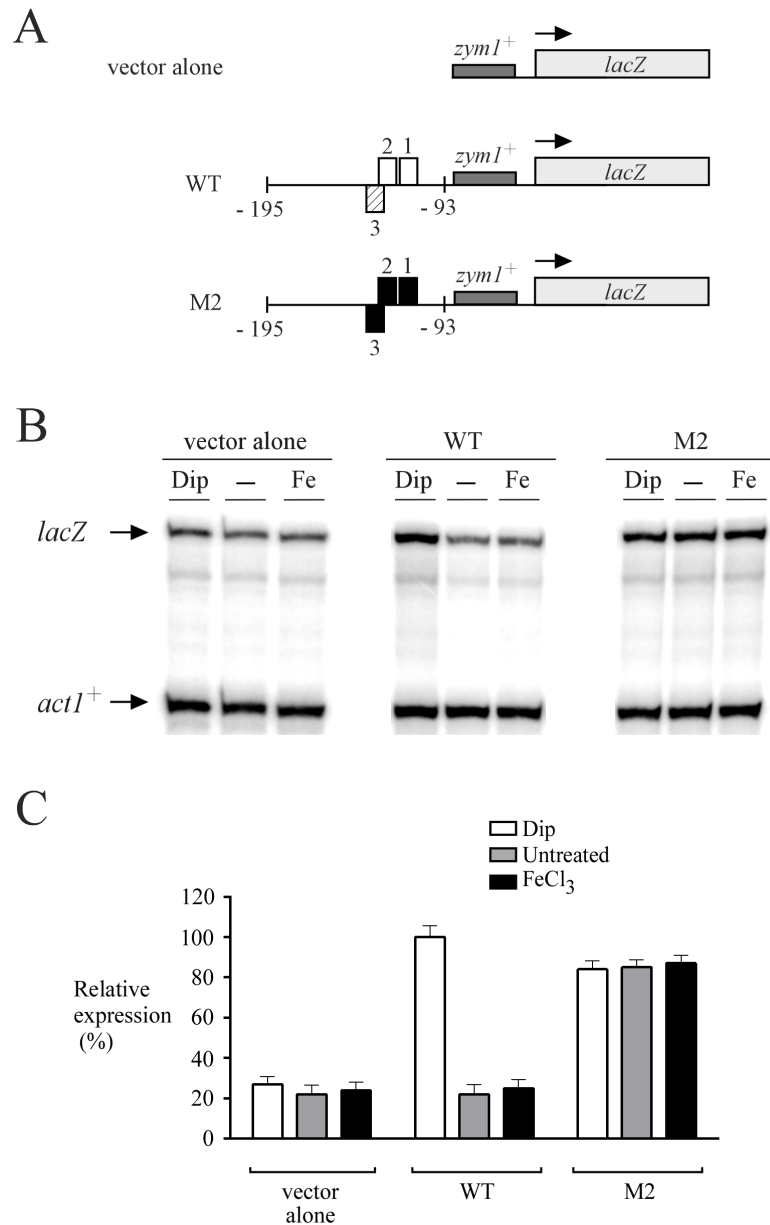


Figure 3. Proximal *shuI*⁺ promoter GATA elements are sufficient to regulate a heterologous reporter gene in an iron-dependent manner.

A, Scheme of a short 102-bp *shuI*⁺ promoter region that harbors three GATA sequences, including two containing nine bp [5'-ATC(A/T)GATA(A/T)-3'] (empty boxes; 1 and 2) and one containing six bp [5'-(A/T)GATA(A/T)-3'] (hatched box; 3). This *shuI*⁺ DNA fragment was inserted upstream of a minimal promoter of the *zymI*⁺ gene fused to *lacZ*. Filled boxes (*M2*) represent mutant versions [5'-GCCGTC-3'] of GATA sequences. As a control, a third plasmid (vector alone) contained only the minimal *zymI*⁺ promoter fused to *lacZ*. *B*, Wild-type cells harboring the indicated heterologous reporter plasmid were left untreated (-) or were treated with Dip (250 μ M) or FeCl₃ (Fe, 100 μ M) for 3 h. Total RNA was isolated and steady-state mRNA levels of *lacZ* and *act1*⁺ (indicated with arrows) were analyzed by RNase

protection assays. C, RNase protection analyses were quantified based on three (n = 3) independent experiments. Data are shown as the averages of triplicate determinations +/- SD.

*Fep1 interacts with the *shu1*⁺ promoter in vivo in an iron-dependent manner.* In previous studies, we had created a *fep1Δ php4Δ* double mutant strain in which the expression of a functional *TAP-fep1*⁺ allele was disengaged from its transcriptional regulation by Php4, therefore ensuring its constitutive expression irrespective of the cellular iron status (28). Taking advantage of this mutant, we used a ChIP approach to test whether TAP-Fep1 interacted with the *shu1*⁺ promoter *in vivo*. Results showed that when cells were treated with iron, TAP-Fep1 occupied the *shu1*⁺ promoter at high levels with a ~6.5-fold enrichment relative to a 18S ribosomal DNA coding region in which no GATA box was present (used as a negative control) (Fig. 4). Furthermore, the binding was iron dependent, exhibiting much higher levels of *shu1*⁺ promoter DNA immunoprecipitated when chromatin was obtained from cells grown in the presence of iron than in the presence of Dip (Fig. 4). As a negative control, untagged Fep1 immunoprecipitated only background levels of the *shu1*⁺ promoter region. As a positive control, the association of TAP-Fep1 with the *fio1*⁺ promoter was highly enriched under high iron conditions (~8.6-fold) (relative to a 18S ribosomal DNA coding region without GATA element). This level of enrichment was elevated (~2.9-fold higher) in comparison with that of a strain incubated under low iron conditions. Furthermore, only background levels of *fio1*⁺ promoter was immunoprecipitated when ChIP assays were performed in a strain expressing untagged Fep1 (Fig. 4). Taken together, these results indicated that, under iron-replete conditions, Fep1 occupies the proximal *shu1*⁺ promoter region, therefore mediating transcriptional repression of gene expression.

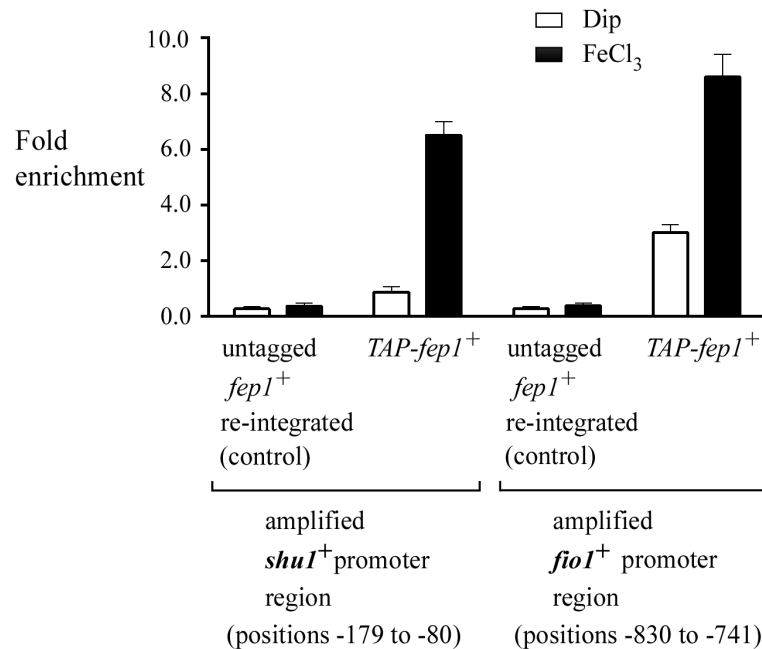


Figure 4. Fep1 interacts with the *shu1*⁺ promoter in vivo under iron-replete conditions.

ChIP analysis was performed on the *shu1*⁺ promoter in *fep1* Δ *php4* Δ cells carrying an integrated untagged or TAP-tagged *fep1*⁺ allele. Chromatin was immunoprecipitated and a region of the *shu1*⁺ promoter (positions -179 to -80) was analyzed by qPCR to determine Fep1 occupancy. Binding of TAP-Fep1 to the *shu1*⁺ promoter was calculated as the enrichment of a specific *shu1*⁺ promoter region relative to a 18S ribosomal DNA coding region in which no GATA box was present. ChIP data were calculated as values of the largest amount of chromatin measured (fold enrichment). Results are shown as the averages \pm SD of a minimum of three ($n = 3$) independent experiments. ChIP analysis was also performed on the *fio1*⁺ promoter under the same conditions. The *fio1*⁺ promoter region -858 to -753 (relative to the initiator codon of the *fio1*⁺ gene) included functional GATA boxes. This analysis was performed as a control experiment because it is known that the *fio1*⁺ promoter is bound by Fep1 in an iron-dependent manner.

Cellular location and expression of Shu1. *shu1*⁺ encodes a protein composed of 226 amino acid residues with a predicted molecular mass of 25 kDa (Fig. 5A). Based on protein structure predictions, the first 20 amino acids of Shu1 correspond to a signal peptide for targeting to the secretory pathway. The last 26 amino acid residues may correspond to a short transmembrane region or pro-peptide. Shu1 is also predicted to be a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein in which Ser-199 is the GPI-attachment site (39). Shu1 was successfully tagged (without loss of function) by inserting 4 tandem repeats of the HA epitope within a predicted hydrophilic region located between amino acid

residues 25 and 26. To determine the cellular location of Shu1-HA₄, indirect immunofluorescence microscopy was performed using anti-HA antibody. When *S. pombe hem1Δ shu1Δ* cells expressing the *shu1-HA₄* allele were incubated under low iron, in the absence of δ -aminolevulinate (ALA) and in the presence of hemin (0.075 μ M), Shu1-HA₄ fluorescence was detected at the cell periphery (Fig. 5B). In contrast, the fluorescence signal was absent when cells expressing Shu1-HA₄ were exposed to high levels of iron (Fig. 5B). To determine whether Shu1-HA₄ was incorporated into the cell wall or attached to the plasma membrane, the cell wall of iron-starved Shu1-HA₄ cells was enzymatically removed prior to fluorescent antibody labeling. Under these conditions, spheroplasted cells expressing Shu1-HA₄ exhibited a clear plasma membrane pattern of localization (Fig. 5C). Conversely, the fluorescence signal was lost when spheroplasts were prepared from cells grown in the presence of iron (Fig. 5C). Cells expressing the Ctr5-Myc₁₂ protein, which is known to localize in the plasma membrane under low-copper conditions (34), was used as a control in parallel experiments (Fig. 5B). As observed in the case of Shu1-HA₄, spheroplasts from cells expressing Ctr5-Myc₁₂ exhibited a clear plasma membrane pattern of localization (Fig. 5C). We next analyzed Shu1-HA₄ protein levels in untreated, iron-starved or iron-replete cells. *shu1⁺-HA₄* and *abc3⁺-GFP* (40) fusion alleles expressed under the control of their own promoters were co-transformed in a *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* mutant strain. Cultures grown to mid-logarithmic phase were washed to remove δ -aminolevulinate (ALA) followed by incubation in the presence of hemin (0.075 μ M). The cells were then left untreated or exposed to Dip or iron for 3 h. Cell membranes were obtained by ultracentrifugation of whole-cell extracts and were treated with Triton X-100 to release membrane proteins. Results of immunoblotting with an antibody directed against HA showed that Shu1-HA₄ was detected in cells grown under iron-limiting conditions (Fig. 5D). In contrast, and consistent with the regulation of *shu1⁺* transcript levels, Shu1-HA₄ protein levels were undetectable under basal and high-iron conditions (Fig. 5D). Similar results were obtained using an antibody directed against GFP since it is known that the expression of Abc3 (or Abc3-GFP) is induced by iron deficiency but repressed under basal and iron-replete conditions (Fig. 5D) (40). Taken together, the results suggested that Shu1 is a plasma membrane protein induced by iron deficiency.

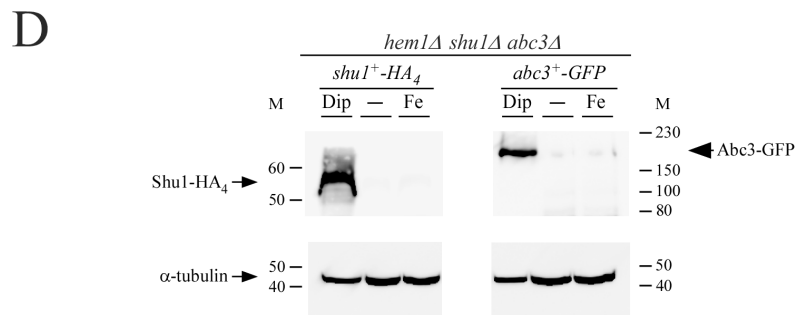
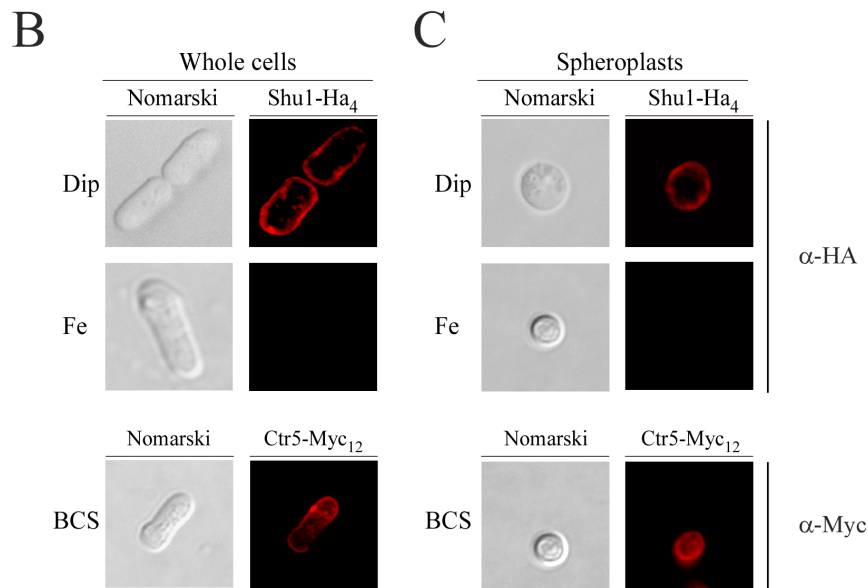
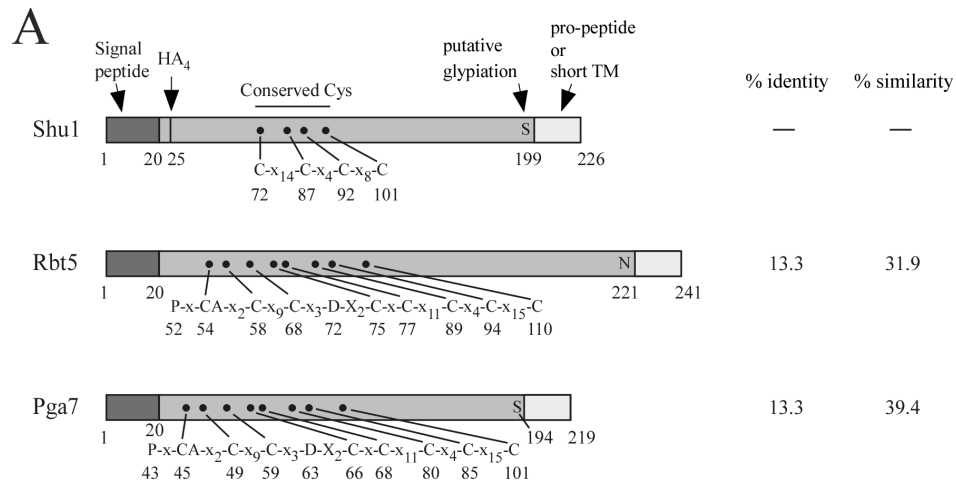


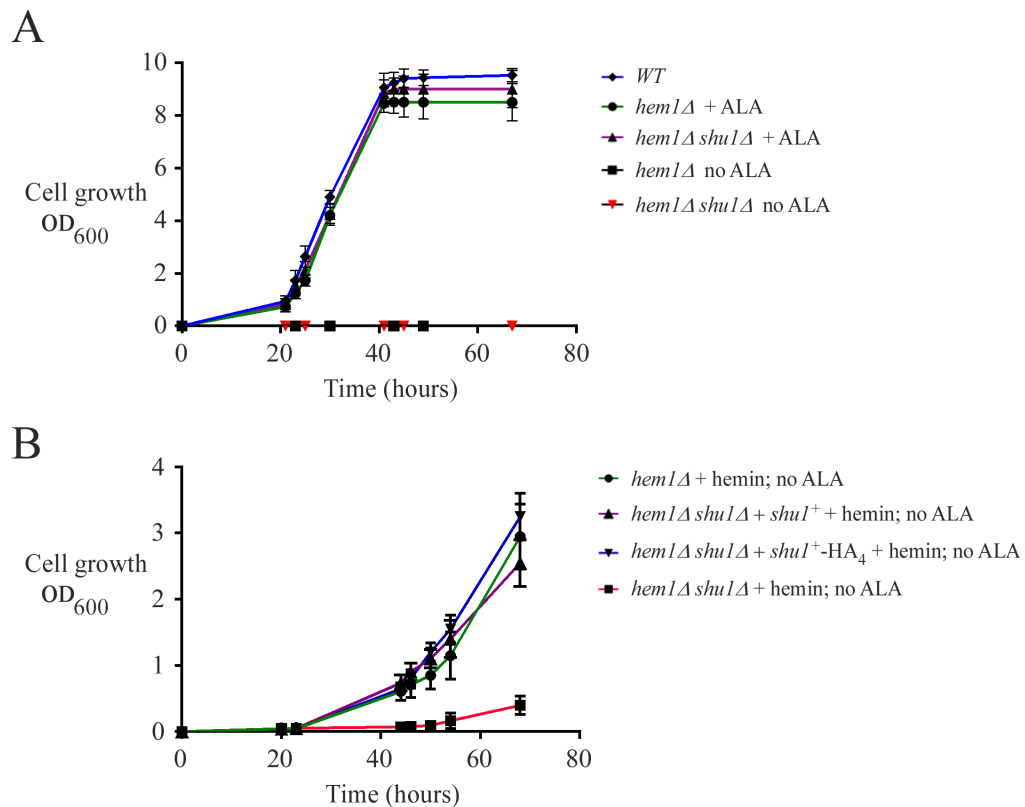
Figure 5. Shu1 is a plasma membrane protein that is detected under conditions of iron starvation.

A, Shu1 (*S. pombe*) exhibits 13.3 % sequence identity with Rbt5 and Pga7 (*C. albicans*). The percentage of amino acid similarity between Shu1 and Rbt5 or Shu1 and Pga7 is 31.9 and 39.4, respectively. Conserved predicted features are represented such as an N-terminal signal

peptide, a glypiation site and a C-terminal pro-peptide or short transmembrane (TM) region. The location of the HA-tag (four copies) inserted in-frame into Shu1 is indicated. The black dots show positions of Cys residues that are included in a CFEM domain, PxC[A/G]_{X2}CX₈₋₁₂CX₁₋₃[X/T]DX₂₋₅CXCX₉₋₁₄CX₃₋₄CX₁₅₋₁₆C. In the case of Shu1, four Cys are conserved. Amino acid sequence numbers refer to the position relative to the first amino acid of each indicated protein. *B-C*, Indirect immunofluorescence microscopy was performed on strains expressing HA₄-tagged Shu1 and Myc₁₂-tagged Ctr5. In the case of *hem1Δ shu1Δ* cells expressing Shu1-HA₄, they were treated with Dip (250 μM) or FeCl₃ (Fe, 100 μM) for 3 h. In the case of *ctr4Δ ctr5Δ* cells harboring Ctr4-GFP and Ctr5-Myc₁₂, they were incubated in the presence of the copper chelator BCS for 3 h. *Panel A*, Fixed cells were directly incubated with the indicated primary antibody to detect cell surface protein when cell wall was intact. *Panel B*, Cells were treated with cell wall lytic zymolase for 90 min prior to be fixed and incubated with the indicated primary antibody to detect plasma membrane protein on spheroplasts. Cell morphology was examined using Nomarski optics. Results are representative of five (n = 5) independent experiments. *D*, *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells expressing *shu1⁺-HA₄* and *abc3⁺-GFP* alleles were grown in the presence of hemin (0.075 μM) and then treated with Dip (250 μM) or FeCl₃ (Fe, 100 μM), or were left untreated for 3 h. Triton X-100 solubilized extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-HA, anti-GFP, or anti- α -tubulin antibodies. Shu1-HA₄, Abc3-GFP and α -tubulin are indicated with arrows.

Shu1 is required for assimilation of exogenous hemin. Heme biosynthesis and heme uptake represent two different ways to acquire heme in several organisms. Although heme biosynthesis has been extensively studied, there is relatively few studies concerning its uptake in eukaryotic cells. One reason may be that it is difficult to dissociate its transport from on-going biosynthesis. To address this challenge, we generated a strain in which the *hem1⁺* gene encoding the first enzyme of the heme biosynthetic pathway was disrupted (*hem1Δ*). In the absence of Hem1, biosynthesis of heme was blocked. Results showed that *hem1Δ* deletion was lethal for *S. pombe* (Fig. 6A), unless exogenous ALA was added, allowing heme biosynthesis starting at the second step of the biosynthetic pathway. In the presence of ALA, *hem1Δ* or *hem1Δ shu1Δ* cells exhibited similar growth compared to wild-type strain (Fig. 6A). An additional way to maintain *hem1Δ* cells alive was to add exogenous hemin (heme chloride), thereby fostering cells to use their own heme uptake system (Fig. 6B). This second approach (*hem1Δ* + hemin) selectively blocked heme biosynthesis, allowing study of heme acquisition. To investigate if Shu1 was involved in heme acquisition, *hem1Δ shu1Δ* cells were incubated in the absence of ALA and in the presence of hemin. Under these conditions, *hem1Δ shu1Δ* cells exhibited poor growth as compared to *hem1Δ* cells containing an endogenous *shu1⁺* gene or *hem1Δ shu1Δ* cells in which functional

untagged *shu1*⁺ and *HA4*-tagged *shu1*⁺ alleles were re-integrated (Fig. 6B). After 68 h, the *hem1Δ shu1Δ* strain displayed ~6 to 8-fold less growth compared to strains that expressed functional *shu1*⁺ alleles (Fig. 6B). To further define the role of Shu1 in heme versus iron acquisition, *hem1Δ fip1Δ fio1Δ* cells were incubated in the absence of ALA and in the presence of hemin. Under these conditions, *hem1Δ fip1Δ fio1Δ shu1*⁺ cells exhibited similar growth compared to *hem1Δ fip1*⁺ *fio1*⁺ *shu1*⁺ cells, revealing that Shu1 function was unaffected by the absence of Fip1-Fio1 heteromeric complex, which is required for high-affinity elemental iron uptake (Fig. 6C). Furthermore, in the absence of hemin and ALA, *hem1Δ shu1*⁺ cells were unable to grow in the presence of exogenous iron, showing the inability of Shu1 to support iron acquisition from elemental iron (Fig. 6C). These data confirmed that the strategic approach used here allowed us to conclude that Shu1 is required for assimilation of exogenous heme by *S. pombe* in the absence of heme biosynthesis.



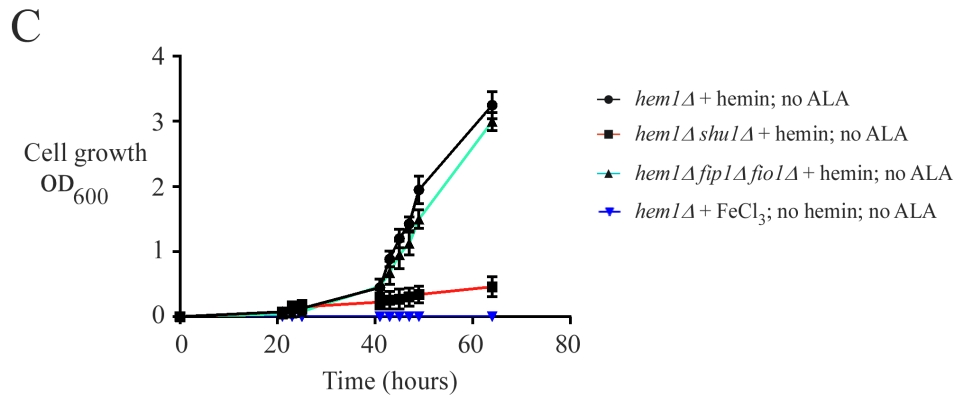


Figure 6. Heme acquisition by *S. pombe* requires Shu1.

A, Growth of the indicated yeast strains was assessed in YES medium that was either left untreated (no ALA) or supplemented with exogenous ALA (200 μ M). Strain color codes are, blue (wild-type, *WT*), green (*hem1Δ* + ALA), black (*hem1Δ* without ALA), violet (*hem1Δ shu1Δ* + ALA), and red (*hem1Δ shu1Δ* without ALA). *B*, Isogenic *hem1Δ* and *hem1Δ shu1Δ* strains were transformed with an empty plasmid or a plasmid harboring an untagged *shu1*⁺ or HA₄-tagged *shu1*⁺ allele. Growth of strains was assessed in the presence of hemin (0.075 μ M) but in the absence of ALA. Strain color codes are, green (*hem1Δ*), violet (*hem1Δ shu1Δ* expressing *shu1*⁺), blue (*hem1Δ shu1Δ* expressing *shu1*⁺-HA₄), and red (*hem1Δ shu1Δ*). *C*, Growth of the indicated yeast strains was monitored in YES medium lacking ALA (no ALA) and supplemented with hemin (0.075 μ M) or FeCl₃ (100 μ M). Strain color codes are, black (*hem1Δ*), red (*hem1Δ shu1Δ*), green (*hem1Δ fip1Δ fio1Δ*), and blue (*hem1Δ* + FeCl₃).

Shu1 is required for assimilation of the heme analog ZnMP. To obtain further evidence that Shu1 supported heme assimilation, we investigated whether the presence of Shu1 led to cellular accumulation of fluorescent zinc mesoporphyrin IX (ZnMP), a heme analog (41-43). After removal of ALA to repress heme biosynthesis, *hem1Δ shu1Δ* mutant cells were pre-incubated for 3 h under iron-deficient or iron-replete conditions. Cells were then incubated for 90 min in the presence of ZnMP (2 μ M). Under low-iron conditions, *hem1Δ shu1*⁺ cells generated a high intracellular ZnMP fluorescence signal that was predominantly located in the cytosol and that was, in most cells, largely excluded from the nucleus (Fig. 7A). In contrast, deletion of the *shu1*⁺ gene in a strain lacking *hem1*⁺ (*hem1Δ shu1Δ* mutant) dramatically lowered the ZnMP fluorescent signal as compared to a *hem1Δ* single mutant expressing an endogenous *shu1*⁺ allele or a *hem1Δ shu1Δ* mutant in which a wild-type *shu1*⁺ allele was re-integrated (Fig. 7A). There was an absence of ZnMP fluorescent signal in

hem1Δ shu1⁺, *hem1Δ shu1Δ*, or *hem1Δ shu1Δ + shu1⁺* cells when they had been pre-cultured under high levels of iron (Fig. 7B). Thus, under low-iron conditions, the Shu1 protein plays a physiological function in taking up heme as suggested by its ability to mediate uptake of ZnMP.

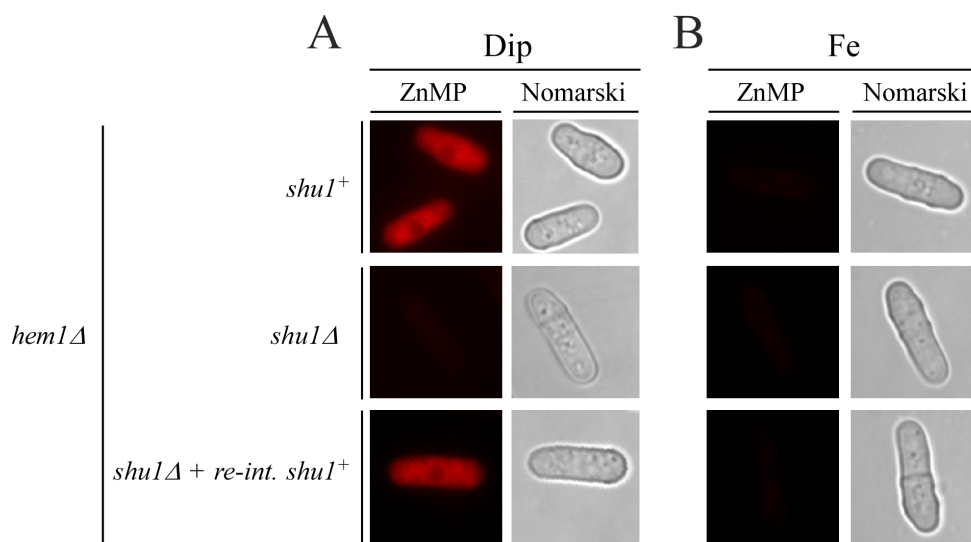


Figure 7. Deletion of *shu1⁺* leads to defects in the assimilation of ZnMP.

Mid-logarithmic-phase cultures of strains harboring either a wild-type or an inactivated *shu1⁺* allele in a *hem1Δ* null background were treated with Dip (250 μ M) (panel A) or FeCl₃ (Fe, 100 μ M) (panel B) for 3 h. Subsequently, these cultures were incubated in the presence of ZnMP (2 μ M) for 90 min. A *hem1Δ shu1Δ* double mutant strain in which a wild-type copy of the *shu1⁺* gene was reintegrated (*re-int.*) was cultured in an identical manner. Cells were analyzed by fluorescence microscopy for accumulation of fluorescent ZnMP (left side). Nomarski pictures of the cells are shown on the right side of each panel.

Shu1 expressed in *S. pombe* binds to hemin agarose. To further investigate the capacity of Shu1 to bind heme, a wild-type *shu1⁺-HA₄* allele was transformed and expressed in a *hem1Δ shu1Δ* double mutant strain. When cells had grown to mid-logarithmic phase, they were washed to remove ALA and then incubated in the presence of Dip (250 μ M) or iron (100 μ M) for 3 h. Whole extracts from these cells were prepared and cell membranes were obtained by ultracentrifugation. Soluble proteins in the supernatants were precipitated and kept on ice before analysis by immunoblot assays (Fig. 8A). Pellet fractions were treated with Triton X-100 (1%) and then re-fractionated by performing a second ultracentrifugation.

Treatment with Triton X-100 released Shu1-HA₄ and the extract was treated with hemin-agarose or agarose beads (control). Results showed that Shu1-HA₄ expressed in iron-starved cells was strongly retained on hemin-agarose beads (Fig. 8A; bound fraction). Only a weak signal of Shu1-HA₄ was detected in the flow-through fraction (Fig. 8A; unbound). In contrast, Shu1-HA₄ was primarily found in the unretained fraction (flow-through) when agarose beads (control) were used (Fig. 8A). As expected, no Shu1-HA₄ protein was retained on hemin-agarose beads when extracts had been prepared from cells grown under iron-replete conditions (Fig. 8A). Soluble PCNA was only detected in the first supernatant fraction of extracts prepared from cells grown in the presence of Dip or iron (Fig. 8A).

To gain insight into the nature of key amino acid residues that were required for the heme binding properties of Shu1, four Cys residues (positions 72, 87, 92 and 101) within the CX₁₄CX₄CX₈C region of Shu1 were replaced with alanine residues. When expressed in *hem1Δ shu1Δ* cells that had been washed to remove ALA (mid-log phase) and then incubated in the presence of Dip (3 h), the Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ mutant protein was located at the cell surface as observed in the case of wild-type HA₄-tagged Shu1 protein (Fig. 8, B and C). Membrane fractions were solubilized (Triton X-100) and pull-down assays using hemin agarose were performed. Results showed that Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ was primarily detected in the unbound fraction, suggesting a low affinity for hemin (Fig. 8B). Only a very minor fraction of the mutant protein (Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄) was detected with hemin-agarose beads (Fig. 8B). Consistent with iron-mediated repression of *shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄* mRNA levels (under the control of *shu1*⁺ promoter), Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ was not detected in membrane protein fractions that were prepared from iron-treated cells (Fig. 8, B and C). Taken together, these results showed that Shu1 interacts with hemin and that Cys72, Cys87, Cys92 and Cys101 residues or at least some subset of these residues are important for the binding to hemin.

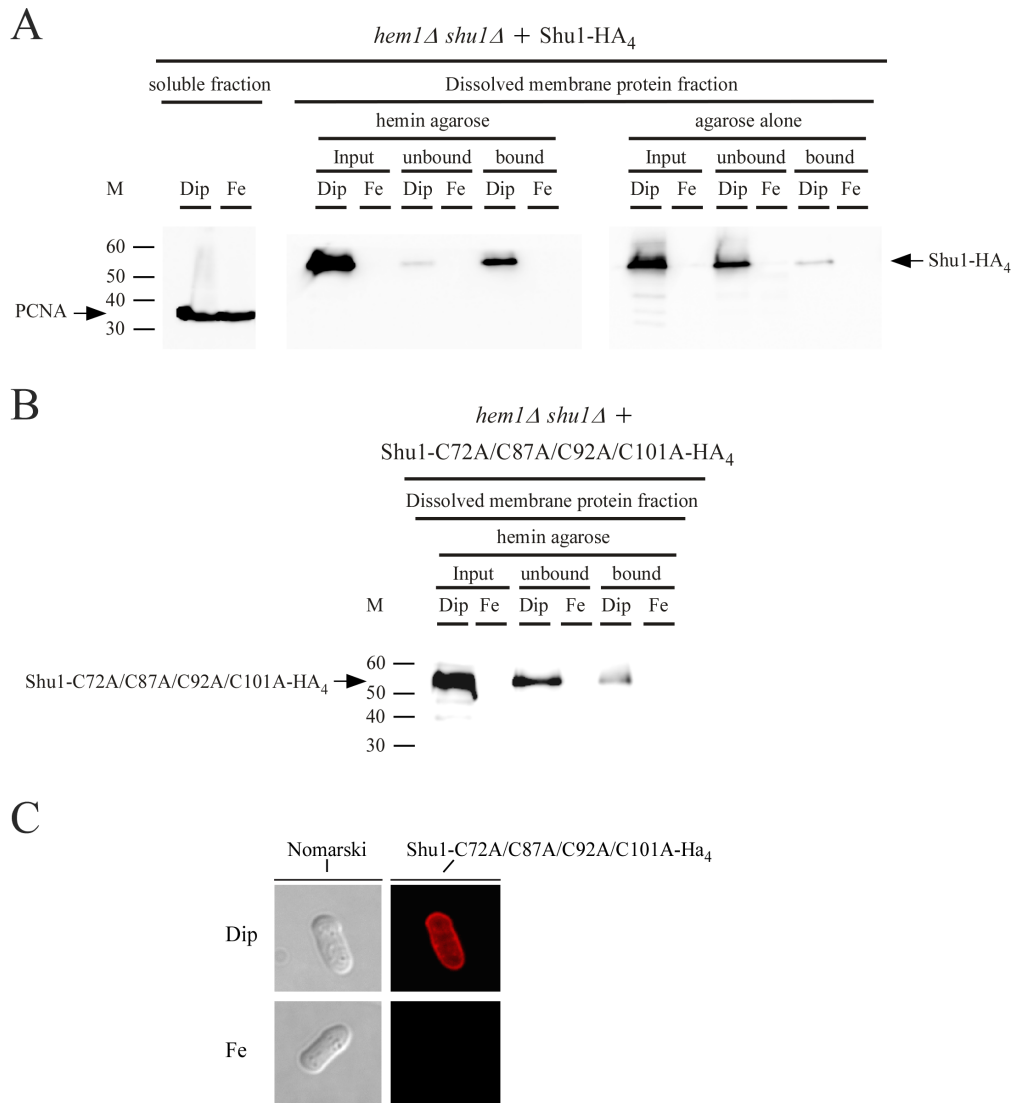


Figure 8. Binding of Shu1 to hemin agarose.

A, *hem1Δ shu1Δ* cells were transformed with HA₄-tagged full-length Shu1. Cells were cultured in the presence of ALA (200 μM) until they reached mid-logarithmic phase growth, and then returned to ALA-free media. At this point, they were treated with Dip (250 μM) or FeCl₃ (Fe) (100 μM) for 3 h. Supernatant (soluble proteins) and pellet (membrane proteins) fractions were prepared from cell lysates. Triton X-100-solubilized membrane proteins (input) were subjected to hemin pull-down assays using hemin-agarose or agarose alone. Unbound and bound fractions were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and then subjected to Western blotting. Proteins were revealed using an anti-HA or anti-PCNA antibody. *B*, *hem1Δ shu1Δ* cells expressing HA₄-tagged Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A mutant protein were cultured in the same manner as cells producing wild-type Shu1-HA₄. Protein fractionation, pull-down assays with hemin-agarose and immunoblotting were performed as indicated above for panel A. *C*, Indirect

immunofluorescence microscopy of cellular location of HA₄-tagged Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A that was expressed in *hem1Δ shu1Δ* cells under low (250 μM Dip) or high (100 μM FeCl₃) levels of iron. Nomarski optics was used to monitor cell morphology.

Purified Shu1 binds hemin. Hemin-agarose pull-down experiments of *S. pombe* extracts could not rule out the possibility that interaction of Shu1 and hemin could be mediated by a protein partner. To determine whether Shu1 interacted directly with hemin, we investigated the ability of purified wild-type and mutated Shu1 produced in *E. coli* to associate with hemin-agarose beads. The region of Shu1 corresponding to residues 21 to 200 was fused to His₆ tag. A mutant version of Shu1 (21-200) in which Cys72, Cys87, Cys92 and Cys101 were substituted by Ala residues was also generated and fused to His₆. The two fusion proteins (wild-type and mutant) were purified using two successive rounds of affinity chromatography on Ni²⁺-agarose beads. Results showed that the wild-type version of Shu1 (21-200) was retained on hemin-agarose beads, with almost no protein found in the flow-through (unbound) fraction (Fig. 9A). In contrast, the mutant form of Shu1 (containing C72A/C87A/C92A/C101A substitutions) accumulated primarily in the flow-through (unbound) fraction and only traces were retained by hemin-agarose beads (Fig. 9A). Additional evidence that Shu1 bound hemin was obtained by spectroscopy. Absorbance spectra of addition of increasing concentrations of purified Shu1 (21-200) (0 to 7 μM) to a fixed concentration of hemin (10 μM) were recorded. In the absence of Shu1 (21-200) (hemin alone), results showed an absorption peak corresponding to 388 – 391 nm. After addition of Shu1, maximum absorption shifted to ~407 nm and absorbance at this peak (Soret peak) increased as a function of increasing concentrations of Shu1 (Fig. 9B). In contrast, similar experiments performed with mutated Shu1 did not show a shift of absorbance of ~388/391 nm to ~407 nm. Furthermore, the intensity of the peak did not show significant changes as a function of an increasing concentration of Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A (Fig. 9B). Analysis of the data yielded a value for the constant of dissociation (K_D) of 2.2×10^{-6} M. In contrast, lack of interaction between Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A and hemin did not allow a K_D to be determined (Fig. 9C). The His₆ tag did not play a role in the observed heme binding by Shu1 because the mutant form of Shu1 (Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A, which also contained the His₆ tag) failed to bind hemin with high affinity. Collectively, these

results provided additional evidence that Shu1 interacts directly with hemin without the need for an additional partner.

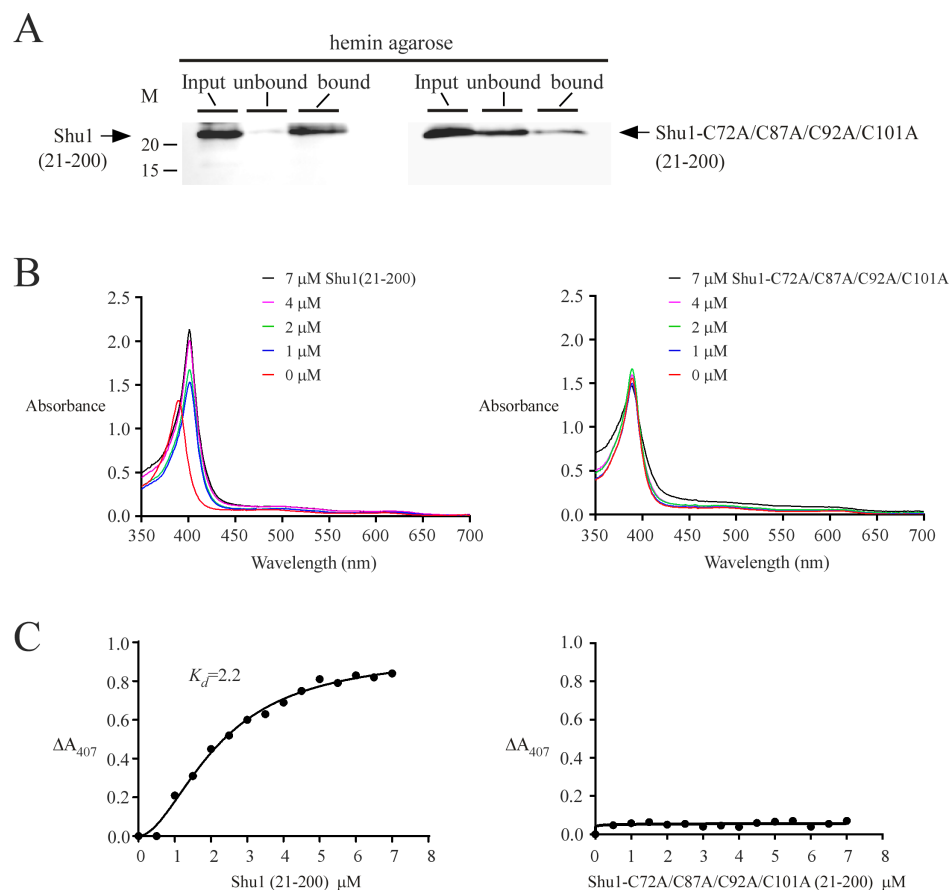


Figure 9. Purified Shu1 and hemin interact with one another.

A, Purified wild-type Shu1 (21-200) (left side) or Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A (21-200) mutant (right side) (Input) was incubated with hemin-agarose beads. Immunoblot assays showed that wild-type form of Shu1 was detected in the bound fraction, whereas mutated Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A was mostly found in the unbound fraction. *B*, Differential spectral titration of wild-type Shu1-hemin association (left side) using 10 μM of hemin and increasing concentrations of Shu1 (0 to 7 μM). Similar titration (right side) performed with Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A (21-200) mutant. *C*, Hemin-binding curves for wild-type (left side) and mutant (right side) Shu1 (21-200) obtained by plotting the changes in absorbance at the Soret peak as a function of Shu1 concentrations. Wild-type Shu1 associated to hemin with a K_D of 2.2×10^{-6} M.

2.5 DISCUSSION

Heme and hemoglobin represent an important source of iron in mammals. Heme is also essential for growth of pathogenic fungi such as *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. neoformans*, which have evolved mechanisms to acquire iron from this source (12). In the cases of *C. albicans* and *C. parapsilosis*, a group of proteins involved in this process are members of the CFEM family (14, 18). These CFEM proteins are thought to be anchored to the cell wall or attached to the plasma membrane of fungal cells through putative GPI structures. Expression of *CFEM2*, *CFEM3*, *CFEM4* and *CFEM6* in *C. parapsilosis*, as well as *RBT5*, *RBT51* and *PGA7* in *C. albicans* is transcriptionally induced under low-iron conditions (14, 18). In *C. albicans*, the proposed model involves at least two CFEM-type proteins, Rbt5 and Pga7. These two proteins act as heme receptors and cooperate in a protein-protein relay mechanism, which presumably promotes an internalization event of heme via endocytosis. Once internalized, heme is degraded by an intracellular heme oxygenase or is delivered by way of an as yet undefined endocytic pathway into vacuoles for storage or processing (14, 17). It has been proposed that the role of CFEM proteins in iron acquisition from heme is likely to be conserved between *C. albicans* and *C. parapsilosis* (18). In *C. neoformans*, the extracellular glycoprotein Cig1 binds heme and supports iron acquisition from this prosthetic compound (iron-protoporphyrin) (20). Analogous to *RBT5/51* and *PGA7* genes in *C. albicans*, transcript levels of *CIG1* are strongly induced under conditions of iron starvation (44, 45). However, unlike Rbt5/51 and Pga7 proteins, Cig1 does not contain a CFEM domain or any known conserved heme-binding motif (20). Therefore, its property as a hemophore remains to be established.

In the present study, *S. pombe shu1*⁺ transcript levels were induced in iron-starved cells. These observations were reminiscent of the iron-dependent transcriptional regulation of *RBT5/51*, *PGA7*, *CFEM2/3/4/6* and *CIG1* genes involved in heme-iron acquisition in *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. neoformans*, respectively. Conversely, in cells undergoing transition from low to high iron, *shu1*⁺ gene expression was repressed by the iron sensor Fep1. The fact that Fep1 was required for iron-dependent repression of *shu1*⁺ suggested that cellular handling of iron and heme was closely interconnected, reinforcing the concept that exogenous heme provides an iron source for *S. pombe* cells. The existence of a gene in *S. pombe* that encodes a cell-surface heme-binding protein raises an intriguing question with

respect to the advantage for *S. pombe* to be able to take up iron from heme as this yeast is not a pathogenic fungus for humans or warm blooded organisms. *S. pombe* was originally isolated from East African millet beer, but subsequent natural strains have been found in various alcoholic beverages, cultivated fruits such as apples and grapes, and leaves used to produce tea (46-48). Although the natural ecology of *S. pombe* is not well understood, it is possible that yeast strains can pick up unbound prosthetic groups from degraded hemoproteins, which are released from decomposed organic matter. Laboratory *S. pombe* strains are almost all derivatives of strains 968, 972 and 975 that were isolated from an over-sulfurized sample of French wine (49). This finding suggests that these strains had been in contact with vining leaves and plants, which can liberate iron-porphyrin complexes (or heme-based molecules) following death and rupture of plant cells and the degradation of cellular hemoproteins. Direct heme uptake systems have been identified in other microorganisms that are not obligate microbes for animals. For instance, several marine bacteria have been found to be able to acquire exogenous heme from their environment such as lysed phytoplankton (50). It would be of interest to study a collection of *S. pombe* isolates to determine if the pathway of heme-iron acquisition is conserved in relationship to their ability to grow in various environments.

Based on results reported here, *S. pombe* should be considered to have three distinct systems for iron acquisition. The first one takes up reduced iron through a heteroprotein complex that consists of the ferroxidase Fio1 and the permease Fip1. The second system mediates the uptake of siderophore-bound iron through siderophore-specific transporters, including Str1 and Str2. The third system mediates Shu1-dependent iron assimilation from exogenous heme. Upon addition of the iron chelator Dip (250 μ M), we observed that mRNA levels of *fio1*⁺ (or *fip1*⁺) and *str1*⁺ were rapidly induced within 30 min of treatment ((38) and unpublished results). This step was followed by a sustained induction of *fio1*⁺ and *str1*⁺ mRNA levels for at least 4 h. In the case of *shu1*⁺, under the same conditions, mRNA levels were detected at later times, being detected only 90 min after treatment. After 4 h of iron starvation-dependent induction, *shu1*⁺ mRNA levels were at their maximum levels (unpublished results). This observation suggests a temporal regulation of *S. pombe* iron acquisition systems, reflecting a source-dependent iron preference among distinct uptake systems that would favor transport of iron according to the sequence: free iron ions,

siderophore-bound chelates and then heme. Although the pathway for heme acquisition in *S. pombe* remains to be elucidated, its activity is independent of the Fio1/Fip1 oxidase/permease complex because a *hem1Δ fip1Δ fio1Δ* mutant strain was able to grow at the same level as *hem1Δ* cells (unpublished data) in the absence of ALA and in the presence of hemin as the sole source of iron.

Examination of global gene expression by DNA microarray analysis has shown that, under low-iron conditions, *hem3⁺* and *ups1⁺* expression was decreased 3.2- and 1.7-fold, respectively, compared to the basal levels observed in a wild-type strain (30). *hem3⁺* and *ups1⁺* encode the third (hydroxymethylbilane synthase) and fourth (uroporphyrinogen decarboxylase) enzyme of the heme biosynthetic pathway, respectively. This finding reveals that iron deprivation negatively regulates heme biosynthesis. To counterbalance this response, fission yeast induces the expression of *shu1⁺*, which participates in transport of exogenous heme from the environment. Consistent with the iron starvation-mediated repression of the Hem3/Ups1 pathway, the inactivation of Fep1 under iron starvation resulted in the induction of the Shu1-mediated action. Increased Shu1 activity would therefore favor heme acquisition from the environment and would complement the loss of heme production inherent to the Php4-dependent repression of the Hem3/Ups1 pathway.

Microscopic and biochemical analyses have revealed that functional HA₄-tagged Shu1 localized to the plasma membrane when iron levels are low. After enzymatic digestion of the cell wall, Shu1 was still located at the plasma membrane. Shu1 is predicted to contain a GPI anchor, which would serve to attach it to the cell membrane. In the case of Rbt5, its localization has been reported in plasma membrane and in cell wall (13, 14). Although the localization of Pga7 is less defined, its cellular distribution suggests that the protein may be located more internally when compared with Rbt5 (14). Cellular location of Cig1 or CFEM2, 3, 4 or 6 has not yet been reported. Although Shu1 contains 7 Cys residues (positions 72, 87, 92, 101, 130, 172 and 214), their arrangement does not correspond to that of PxC[A/G]₂CX₈₋₁₂CX₁₋₃[X/T]DX₂₋₅CXCX₉₋₁₄CX₃₋₄CX₁₅₋₁₆C that is found in canonical eight-Cys-containing CFEM domains (10). However, 4 of these Cys residues (positions 72, 87, 92 and 101) exhibit an arrangement reminiscent of a partial CFEM domain, with a CX₁₄CX₄CX₈C configuration in Shu1 as compared to a CX₁₁CX₄CX₁₅C configuration in Rbt5/51 or Pga7. When these 4 Cys residues were mutated in Shu1 (Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A), *hem1Δ shu1Δ* cells

expressing the *shu1-C72A/C87A/C92A/C101A* allele were unable to grow in the absence of ALA and in the presence of hemin as a sole source of iron. This defect was not due to protein mislocalization because results showed that the HA₄-tagged Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A localized to the cell surface in a manner similar to that of wild-type protein. Pull-down assays using protein lysates prepared from cells expressing Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A showed that substitutions of the 4 Cys residues strongly decreased Shu1 binding to hemin-agarose. Furthermore, this mutant did not possess significant ability to bind heme when subjected to absorbance spectroscopy. These results suggested that these Cys residues or at least some of them, participate in heme coordination in Shu1. However, definition of their respective contribution will require structural studies of the hemoprotein.

It has been suggested that Rbt5 mediates heme endocytosis in *C. albicans*, which subsequently, allowed heme to be delivered to the vacuole (17). Once in vacuoles, heme would undergo further degradation, resulting in the release of iron from PpIX. This series of events would constitute a specialized pathway and make the vacuole an important site for intracellular iron stores. *S. pombe* is one of the yeast species that does not have heme oxygenase, therefore leaving open the possibility for the existence of an endocytic pathway for iron acquisition from heme (as reported in *C. albicans*). Future studies are required to determine the nature of the mechanisms by which Shu1 and potential partners operate with respect to heme assimilation as well as its utilization as a source of iron.

2.6 REFERENCES

1. Philpott, C.C., Leidgens, S., and Frey, A.G. (2012) Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. *Biochim.Biophys.Acta.* **1823**, 1509-1520
2. Paul, V.D., and Lill, R. (2015) Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim.Biophys.Acta.* Epub ahead of print January 10, 2015
3. Kaplan, J., and Ward, D.M. (2013) The essential nature of iron usage and regulation. *Curr.Biol.* **23**, R642-646

4. 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
5. 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
6. 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*. *Eukaryot.Cell.* **7**, 859-871
7. Severance, S., and Hamza, I. (2009) Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chem.Rev.* **109**, 4596-4616
8. 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**, article 126
9. Kim, D.U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H.O., Won, M., Yoo, H.S., Duhig, T., Nam, M., Palmer, G., Han, S., Jeffery, L., Baek, S.T., Lee, H., Shim, Y.S., Lee, M., Kim, L., Heo, K.S., Noh, E.J., Lee, A.R., Jang, Y.J., Chung, K.S., Choi, S.J., Park, J.Y., Park, Y., Kim, H.M., Park, S.K., Park, H.J., Kang, E.J., Kim, H.B., Kang, H.S., Park, H.M., Kim, K., Song, K., Song, K.B., Nurse, P., and Hoe, K.L. (2010) Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat.Biotechnol.* **28**, 617-623
10. 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
11. Kornitzer, D. (2009) Fungal mechanisms for host iron acquisition. *Curr.Opin.Microbiol.* **12**, 377-383
12. Kronstad, J.W., Cadieux, B., and Jung, W.H. (2013) Pathogenic yeasts deploy cell surface receptors to acquire iron in vertebrate hosts. *PLoS Pathog.* **9**, e1003498

13. 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
14. 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
15. 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.* **149**, 579-588
16. Pendrak, M.L., Chao, M.P., Yan, S.S., and Roberts, D.D. (2004) Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to alpha-biliverdin. *J.Biol.Chem.* **279**, 3426-3433
17. 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
18. Ding, C., Vidanes, G.M., Maguire, S.L., Guida, A., Synnott, J.M., Andes, D.R., and Butler, G. (2011) Conserved and divergent roles of Bcr1 and CFEM proteins in *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS One.* **6**, e28151
19. Bailao, E.F., Parente, J.A., Pigosso, L.L., de Castro, K.P., Fonseca, F.L., Silva-Bailao, M.G., Bao, S.N., Bailao, A.M., Rodrigues, M.L., Hernandez, O., McEwen, J.G., and Soares, C.M. (2014) Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides spp.* is receptor-mediated. *PLoS Negl Trop.Dis.* **8**, e2856
20. Cadieux, B., Lian, T., Hu, G., Wang, J., Biondo, C., Teti, G., Liu, V., Murphy, M.E., 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

21. Hu, G., Caza, M., Cadieux, B., Chan, V., Liu, V., and Kronstad, J. (2013) *Cryptococcus neoformans* requires the ESCRT protein Vps23 for iron acquisition from heme, for capsule formation, and for virulence. *Infect.Immun.* **81**, 292-302
22. Labbé, S., Khan, M.G., and Jacques, J.F. (2013) Iron uptake and regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr.Opin.Microbiol.* **16**, 669-676
23. 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
24. 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
25. Mercier, A., and Labbé, S. (2010) Iron-dependent remodeling of fungal metabolic pathways associated with ferrichrome biosynthesis. *Appl.Environ.Microbiol.* **76**, 3806-3817
26. Schrettl, M., Winkelmann, G., and Haas, H. (2004 Dec) Ferrichrome in *Schizosaccharomyces pombe*, an iron transport and iron storage compound. *Biometals.* **17**, 647-654
27. 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
28. 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
29. Rustici, G., van Bakel, H., Lackner, D.H., Holstege, F.C., Wijmenga, C., Bahler, J., and Brazma, A. (2007) Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. *Genome Biol.* **8**, R73

30. 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
31. 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
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. 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
35. 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
36. 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
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. 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

39. De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast*. **20**, 781-796
40. 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
41. Worthington, M.T., Cohn, S.M., Miller, S.K., Luo, R.Q., and Berg, C.L. (2001) Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol*. **280**, G1172-7
42. 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
43. Desuzinges-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huche, 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
44. Lian, T., Simmer, M.I., D'Souza, C.A., Steen, B.R., Zuyderduyn, S.D., Jones, S.J., Marra, M.A., and Kronstad, J.W. (2005) Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol.Microbiol*. **55**, 1452-1472
45. Jung, W.H., Sham, A., White, R., and Kronstad, J.W. (2006) Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol*. **4**, e410
46. Linder, P. (1893) *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gahrungserreger. *Wochenschrift fur Brauerei*. **10**, 1298-1300
47. Teoh, A.L., Heard, G., and Cox, J. (2004) Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microbiol*. **95**, 119-126

48. Brown, W.R., Liti, G., Rosa, C., James, S., Roberts, I., Robert, V., Jolly, N., Tang, W., Baumann, P., Green, C., Schlegel, K., Young, J., Hirschfeld, F., Leek, S., Thomas, G., Blomberg, A., and Warringer, J. (2011) A Geographically Diverse Collection of *Schizosaccharomyces pombe* Isolates Shows Limited Phenotypic Variation but Extensive Karyotypic Diversity. *G3 (Bethesda)*. **1**, 615-626
49. Leupold, U. (1950) Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Cr. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol.* **24**, 381-480
50. Hogle, S.L., Barbeau, K.A., and Gledhill, M. (2014) Heme in the marine environment: from cells to the iron cycle. *Metallomics*. **6**, 1107-1120

FOOTNOTES

Acknowledgments. We are grateful to Dr. Gilles Dupuis for critically reading the manuscript and for his valuable comments. This study was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Grants MOP-238238-2010-15 and MOP-396029-2010-DAS to S.L.

Abbreviations used are: ALA, δ -aminolevulinate; bp, base pair(s); Dip, 2,2'-dipyridyl; EMM, Edinburgh minimal medium; GFP, green fluorescent protein; GPI, glycosylphosphatidylinositol; K_D , equilibrium dissociation constant; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; SD, standard deviation; UTR, untranslated region; WT, wild-type; YES, yeast extract plus supplements; ZnMP, zinc (II) mesoporphyrin IX.

CHAPITRE 3

HEME ASSIMILATION IN *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE* REQUIRES CELL-SURFACE-ANCHORED PROTEIN SHU1 AND VACUOLAR TRANSPORTER ABC3

Auteurs de l'article:

Thierry Mourer, Vincent Normant et Simon Labbé

Statut de l'article:

Publié dans The Journal of Biological Chemistry. 2017; 292(12): 4898-4912.

Avant-propos:

Dans le présent manuscrit, je suis l'auteur de l'intégralité des expériences. Les souches de levures ainsi que les plasmides utilisés ont été construits conjointement par TM (95%) et VN. Les figures ont été produites par TM. TM a participé activement à l'écriture du manuscrit.

Résumé :

La protéine Shu1 permet à la levure *Schizosaccharomyces pombe* d'assimiler l'hème exogène. Dans cette étude, nous avons montré que Shu1 est libéré d'une préparation membranaire après son incubation avec la phospholipase spécifique des phosphoinositides C (PI-PLC). Le fait que Shu1 est clivé par la PI-PLC suggère fortement que ce récepteur d'hème est une protéine à ancre GPI. Les cellules *hem1Δ*, où la voie de biosynthèse en hème est interrompue, assimilent la zinc mesoporphyrine IX (ZnMP) par la protéine Shu1 et l'accumulent dans un premier temps à l'intérieur des vacuoles. Dans un second temps, l'hème est expulsé vers le compartiment cytoplasmique. La protéine Shu1-HA₄ se localise à la membrane plasmique lorsque la concentration en hémine est faible. Cependant, en présence d'une forte concentration en hémine, Shu1-HA₄ est relocalisé à la membrane des vacuoles. L'inactivation du gène *abc3⁺*, qui code pour un transporteur de la membrane

vacuolaire, génère une souche *hem1Δabc3Δ* qui est incapable d'utiliser l'hémine exogène pour assurer sa croissance. De plus, la souche *hem1Δabc3Δ* est en mesure d'accumuler la ZnMP dans la lumière des vacuoles, mais elle est incapable de redistribuer cette molécule dans le cytoplasme par la suite. En cohérence avec le rôle d'Abc3 dans l'export vacuolaire de l'hémine, les résultats de pulldown hémine agarose démontrent que ce transporteur se lie à l'hémine. À l'inverse, une version mutante de la protéine Abc3, dans laquelle le motif Cystéine-Proline a été substitué par deux alanines, ne se lie plus à l'hémine. Les résultats présentés ici démontrent que la protéine Shu1 subit une relocalisation de la membrane plasmique aux vacuoles après sa liaison à la molécule d'hème. Une fois l'hème amené à la vacuole par Shu1, le transporteur Abc3 mobilise l'hème présent dans la lumière vacuolaire vers les autres compartiments cellulaires.

Heme assimilation in *Schizosaccharomyces pombe* requires cell surface-anchored protein Shu1 and vacuolar transporter Abc3

Thierry Mourer, Vincent Normant, and Simon Labbé*.

From Département de Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1E 4K8, Canada.
Running title: Shu1 and Abc3 are involved in heme acquisition.

*Address correspondence to: Simon Labbé, Faculté de médecine et des sciences de la santé, 3201, Pavillon Z-8, Jean Mignault Street, Sherbrooke (QC) J1E 4K8 Canada. Tel: (819) 821-8000 ext.: 75460; Fax: (819) 820-6831
E-mail: Simon.Labbe@USherbrooke.ca

Keywords: ABC transporter, glycosylphosphatidylinositol (GPI-anchor), heme, metal homeostasis, yeast physiology, fission yeast.

3.1 ABSTRACT

The *Schizosaccharomyces pombe shu1*⁺ gene encodes a cell-surface protein required for assimilation of exogenous heme. In this study, shaving experiments showed that Shu1 is released from membrane preparations when spheroplast lysates are incubated with phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC). Shu1 cleavability by PI-PLC and its predicted hydropathy profile strongly suggested that Shu1 is a glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein. When heme biosynthesis is selectively blocked in *hem1Δ* mutant cells, the heme analog zinc mesoporphyrin IX (ZnMP) first accumulates into vacuoles and then subsequently, within the cytoplasm in a rapid and Shu1-dependent manner. An HA₄-tagged *shu1*⁺ allele that retained wild-type function localizes to the cell surface in response to low hemin concentrations, but under high hemin concentrations, Shu1-HA₄ re-localizes to the vacuolar membrane. Inactivation of *abc3*⁺, encoding a vacuolar membrane transporter, results in *hem1Δ abc3Δ* mutant cells being unable to grow in the presence of hemin as the sole iron source. In *hem1Δ abc3Δ* cells, ZnMP accumulates primarily in vacuoles and does not sequentially accumulate in the cytosol. Consistent with a role for Abc3 as vacuolar hemin exporter, results with hemin-agarose pull-down assays showed that Abc3 binds to hemin. In contrast, an Abc3 mutant in which an inverted CysPro motif had been replaced with Ala residues fails to bind hemin with high affinity. Taken together, these results show that Shu1 undergoes rapid hemin-induced internalization from the cell surface to the vacuolar membrane and that the transporter Abc3 participates in the mobilization of stored heme from the vacuole to the cytosol.

3.2 INTRODUCTION

The transition metal ion iron is well-known to serve as catalytic cofactor for many enzymes that are intimately associated with essential cellular functions (1-3). Iron is also required to form heme, which is a prosthetic group that is composed of a protoporphyrin ring with an iron atom at its center (4). Hemoproteins such as cytochromes, hemoglobin, and catalases

are required in fundamental biochemical processes, such as respiration, oxygen transport, and disproportionation of hydrogen peroxide, respectively. As a consequence of the importance to fulfill heme requirement for growth, several organisms have evolved with different means to obtain heme (5,6). For instance, in the case of heme prototrophs, these organisms possess a heme biosynthetic pathway that involves eight conserved enzymes which are distributed in mitochondria and cytoplasm where their actions occur at specific steps of the biosynthetic pathway. A second strategy used by a number of organisms is to acquire heme from the environment. In these cases, molecules involved in acquisition of exogenous heme include Hrg-1 and Hrg-4 in *Caenorhabditis elegans* (7,8), Lhr1 in *Leishmania amazonensis* (9), Hrg-1 in *Dania rerio* (zebrafish) (7) and Hrg-1, Hcp1, and FLVCR2 in mammals (8,10,11). Although the heme biosynthetic pathway has been extensively studied, the cellular components that are required for acquisition of exogenous heme and their mechanisms of action are much less well understood.

In many fungal species, a conserved eight cysteine-containing domain has been found in cell surface-anchored proteins (12,13). Proteins containing this domain are members of the CFEM (common in fungal extracellular membranes) family (12). The CFEM domain is unique to fungal proteins and contains the following $PxC(A/G)_x_2C_{x_{8-12}}C_{x_{1-3}}(x/T)D_{x_{2-5}}CxC_{x_{9-14}}C_{x_{3-4}}C_{x_{15-16}}C$ motif where x is any amino acid residue (12,13). In *Candida albicans*, studies have shown that four CFEM proteins, Rbt5, Rbt51 (or Pga10), Pga7, and Csa2, possess the ability to bind hemin (14-16). Genetic analyses of different *C. albicans* mutant strains have revealed that only Rbt5, Pga7, and Csa2 are required for optimal assimilation of exogenous hemin. In the case of Csa2, the crystal structure of the protein has revealed that the CFEM domain adopts a novel "helical-basket" fold that consists of six α -helices (15). Based on this three-dimensional structure of a CFEM protein, disulfide bonds formed by the eight conserved Cys residues are predicted to stabilize the helical-basket fold, which itself would serve as a flat platform in which a planar heme molecule would sit at the top of the structure. Furthermore, a long N-terminal loop of Csa2 has been suggested to cover the heme prosthetic group and stabilize its association with the platform. It is also predicted that a conserved aspartic acid residue (Asp80) of the CFEM domain is exposed on the top of the platform to provide a critical contact point for heme binding (15). As a secreted hemophore-like protein, Csa2 is predicted to extract heme from hemoglobin

and then behaves as carrier to deliver heme to the cell-surface-anchored CFEM proteins Rbt5 and Pga7, which are located in the cell wall and cell membrane (14,16,17).

Although Rbt5 plays an important role for *C. albicans* growth in the presence of hemoglobin or hemin as a sole source of iron, *rbt5* Δ/Δ cells are only partially defective in hemin assimilation (16). One possible explanation is that Pga7 also participates, along with Rbt5, in hemin acquisition (14). Studies have shown that Rbt5 and Pga7 exhibit distinct properties with respect to their cell-surface attachment, namely that Rbt5 is more accessible than Pga7 at the cell surface (14). Furthermore, Rbt5 exhibits a lower affinity for hemin than Pga7. This property may explain why *pga7* Δ/Δ inactivation attenuates virulence of *C. albicans* in a mouse model of systemic infection, although this is not the case for the loss of Rbt5 (14). According to a current model of hemin capture and uptake, Rbt5 would receive hemin from Csa2 at the cell surface and then would mediate its transfer to Pga7 through a relay pathway. Utilization of hemin in *C. albicans* also depends of other cellular components, including heme oxygenase Hmx1 (18,19), type I-myosin Myo5, proteins of the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) system, and vacuolar ATPase Vma11 (17). In the case of Hmx1, it would mediate the release of iron from the iron-protoporphyrin IX ring, producing the α isomer of biliverdin. In the case of Myo5 and ESCRT complex components, their involvement in heme assimilation suggests the existence of an endocytic pathway for heme internalization and delivery to the vacuole where it may undergo proteolytic processing (*e.g.* Vma11) and subsequent release into the cytoplasm (17).

Rbt5- and Pga7-like proteins are found in fungal species other than *C. albicans*. For instance, putative Rbt5 and Pga7 orthologs have been shown to be required for hemin assimilation in *C. parapsilosis* and *Paracoccidioides brasiliensis* (20,21). In *Cryptococcus neoformans*, the extracellular mannoprotein Cig1 binds hemin when produced as a recombinant protein in *E. coli* (22). *C. neoformans* cells lacking Cig1 consistently exhibit delayed growth when hemin is the sole source of iron (22). Although Cig1 shares a similar hydropathy profile with Rbt5 and Pga7, it is not a member of the CFEM family. In fact, Cig1 is devoid of a canonical eight-Cys-containing CFEM domain. Interestingly, some downstream cellular components of the Cig1-dependent pathway involved in hemin acquisition are common to those identified in the *C. albicans* Rbt5/Pga7 pathway. For instance, Vps23, a component of the *C. neoformans* ESCRT-I complex that is required for

intracellular trafficking of endocytic vesicles, is required for hemin acquisition as it is the case in *C. albicans* (17,23,24).

In *Schizosaccharomyces pombe*, iron-regulated cell-surface Shu1 protein (226 residues) is required for assimilation of exogenous hemin (25). Analysis of its sequence reveals that the N-terminal 20 amino acid residues correspond to a putative signal peptide that targets the protein to the secretory pathway. In addition, the C-terminal portion encompassing the last 26 amino acid residues corresponds to a hydrophobic region that contains Ser199 which may serve as an attachment site for a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. Although Shu1 contains 7 Cys residues, their arrangement does not correspond to that of a canonical eight-Cys-containing CFEM motif. However, 4 of these Cys residues (positions 72, 87, 92 and 101) exhibit an arrangement reminiscent of a partial CFEM motif, with a C_{X14}C_{X4}C_{X8}C configuration in Shu1 as compared to a C_{X11}C_{X4}C_{X15}C configuration in *C. albicans* Rbt5 and Pga7. Absorbance spectroscopy and hemin-agarose pulldown experiments have demonstrated that Shu1 binds to hemin (25). When iron levels are low and heme biosynthesis is selectively blocked, Shu1 localizes to the plasma membrane where it mediates acquisition of exogenous heme. Under similar conditions, *shu1Δ* mutant cells in which the heme biosynthetic pathway is selectively inactivated are unable to grow in the presence of exogenous hemin as a sole source of iron (25).

In *C. albicans*, studies have suggested that Rbt5-mediated heme assimilation involves an endocytic mechanism that results in the delivery of heme to the vacuole (17). Studies of the yeast vacuole have shown that this organelle can serve as a storage compartment for micronutrients, including metal ions (26-28). In the case of redox active metal ions, vacuolar storage could prevent their accumulation to toxic levels in the cytosol. Moreover, assuming that vacuolar metal ions are present in a usable form, the vacuole represents a reservoir of metals that could be redistributed throughout the cell under metal-deficient conditions (29-34). In the case of *S. pombe*, knowledge is lacking concerning transport systems capable of extracting metal or heme from the vacuole. With respect to iron homeostasis, transcriptional analyses have revealed that the expression of the ABC-type transporter Abc3 is induced under low-iron conditions (35). Under these conditions, Abc3 localizes to the membrane vacuole where it may participate in the redistribution of stored inorganic iron or organic iron conjugates from the vacuole to the cytosol (35).

In the present report, we show that Shu1 is a membrane-bound protein that is sensitive to the action of phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC). Under low hemin conditions, Shu1 localizes at the cell surface. However, in the presence of high concentrations of hemin, Shu1 undergoes internalization from the cell surface to the vacuole. Disruption of the iron-regulated vacuolar transporter *abc3*⁺ in cells lacking a functional heme biosynthetic pathway (*hem1Δ*) results in an inability of these mutant cells (*hem1Δ abc3Δ*) to grow in the presence of hemin as a sole source of iron. Microscopic analyses of *hem1Δ abc3Δ* mutant cells in the presence of ZnMP showed that this heme analog accumulates within the cell but is restricted to vacuoles in comparison with wild-type cells in which case ZnMP successively accumulates in the vacuoles and then the cytoplasm. Analysis by hemin-agarose pull-down assays showed that Abc3 interacts with hemin. Site-directed mutagenesis identified an inverted CysPro motif (residues 151-152) within a hydrophilic loop region of Abc3 that is required for its association with hemin. Collectively, these results describe novel features of the Shu1-dependent heme acquisition pathway, including the discovery of the role of Abc3 in the mobilization of vacuolar heme stores.

3.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and growth conditions. Genotypes of *S. pombe* strains used in this study are listed in Table 1. Under non selective conditions, all strains were grown on yeast extract medium (YES) containing 0.5% yeast extract, 3% glucose, and 225 mg/l of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. Strains for which plasmid integration or transformation was required were grown on synthetic Edinburgh minimal medium (EMM) missing specific nutrients that allowed selection and maintenance of the integrated DNA fragment or plasmid (56). In the case of *hem1Δ* deletion strains, they were supplemented with δ -aminolevulinate (ALA, 200 μ M) to allow heme biosynthesis starting at the second step of the biosynthetic pathway. An alternative way to maintain *hem1Δ* cells alive in the absence of ALA was to add exogenous hemin (heme chloride, 0.075 μ M) to foster cells to use their heme uptake system instead of their own heme biosynthesis pathway. For monitoring cell growth, pre-cultures of cells were carried out in YES medium containing 2,2'-dipyridyl (Dip; 50 μ M) to chelate iron and, at the same time, fostering up-regulation of iron-dependent genes, including

shu1⁺ and *abc3*⁺. During pre-cultures of cells, ALA (200 μM) 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 (250 μM) and hemin (0.075 μM) but in the absence of ALA (unless otherwise stated). Cell cultures were then initiated and monitored (*A*₆₀₀) at each of the indicated times.

Table 1 - *S. pombe* strains used in this study

Strain	Genotype	Reference or source
FY435	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210</i>	(60)
TMY1	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::KAN^r</i>	(25)
TMY2	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::KAN^r</i>	(25)
TMY4	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r</i>	(25)
TMY5	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::KAN^r shu1⁺::ade6⁺</i>	(25)
TMY6	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::KAN^r shu1⁺-HA₄::ade6⁺</i>	(25)
TMY7	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r shu1⁺-HA₄::ade6⁺ abc3⁺-GFP::leu⁺</i>	(25)
TMY9	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄::ade6⁺ abc3⁺-GFP::leu⁺</i>	this study
TMY10	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r nmt41x-shu1⁺-HA₄::ade6⁺ abc3⁺-GFP::leu⁺</i>	this study
TMY11	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r nmt41x-shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄::ade6⁺ abc3⁺-GFP::leu⁺</i>	this study
TMY12	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r</i>	this study
TMY13	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r abc3⁺::leu⁺</i>	this study
TMY14	<i>h</i> ⁺ <i>his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r</i>	this study

	<i>abc3⁺-GFP::leu⁺</i>	
TMY15	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP shu1Δ::loxP</i>	this study
	<i>abc3Δ::KAN^r shu1⁺-HA₄::ade6⁺ abc3-P151A/C152A-GFP::leu⁺</i>	
TMY16	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 hem1Δ::loxP abc3Δ::KAN^r</i>	this study
	<i>abc3-P151A/C152A-GFP::leu⁺</i>	

Plasmids. Plasmids pBP-1317*shu1⁺-HA₄*, pBP-1317*shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄*, pSP1*abc3⁺*, and pSP1*abc3⁺-GFP* have been described previously (25,35). The *nmt1⁺* promoter region up to position -1178 from the initiator codon of the *nmt1⁺* gene was isolated from pREP41x by PCR (37). PCR amplification was performed using primers designed to generate ApaI and XmaI sites at the 5' and 3' termini of the promoter region. Subsequently, the ApaI-XmaI *nmt1⁺* promoter fragment was exchanged to replace the *shu1⁺* promoter using the ApaI and XmaI restriction sites found in plasmids pBP-1317*shu1⁺-HA₄* and pBP-1317*shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄*. The resulting plasmids were denoted pBP*nmt41x-shu1⁺-HA₄* and pBP*nmt41x-shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄*, respectively. Plasmid pSP1*abc3⁺-GFP* was used to introduce mutations in the coding sequence of *abc3⁺*. Codons corresponding to Pro¹⁵¹ and Cys¹⁵² were replaced by nucleotide triplets that encode alanine. These site-specific mutations were created by a PCR overlap extension method (57). The resulting PCR fragment containing the *abc3* mutant allele with P151A and C152A mutations was then swapped for the equivalent SpeI-XhoI DNA fragment in pSP1*abc3⁺-GFP*, creating pSP1*abc3P151A/C152A-GFP* plasmid.

Phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) treatment. *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells co-expressing *shu1⁺-HA₄* and *abc3⁺-GFP* alleles were treated with Dip (250 μM) for 6 h. After centrifugation, cells were resuspended in buffer F (100 mM Tris-HCl, pH 9.4, and 20 mM β-mercaptoethanol) as a pretreatment. Cells were harvested and incubated in the presence of zymolyase (1 mg/ml) and novozyme (3 mg/ml) using a buffer containing 10 mM β-mercaptoethanol, 1.2 M sorbitol and 20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.5. Spheroplast preparations were washed, resuspended in HEGN100 buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, and protease inhibitors) and disrupted using FastPrep lysing glass beads.

Lysates were ultracentrifuged (100,000 x g) for 30 min at 4°C. The supernatant containing soluble proteins was set aside, whereas the pellet fraction was divided into two equal fractions that were respectively used for PI-PLC treatment (0.5 U/100 µg of protein) and control (lack of enzyme treatment). Following incubation at 30°C for 2.5 h, PI-PLC-treated and untreated fractions were centrifuged (100,000 x g) to obtain a supernatant containing proteins that had been released from the membrane. In the case of untreated fractions, proteins were still membrane-bound. Samples were added to 2X sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 15% SDS, 0.01% bromophenol blue) containing 8.0 M urea and 4% β-mercaptoethanol, unless otherwise indicated. After incubation for 30 min at 37°C, samples were resolved by electrophoresis on 10% (Shu1-HA₄) and 6% (Abc3-GFP) SDS-polyacrylamide gels and were transferred on membrane for Western blot analysis. The following antibodies were used for immunodetection of Shu1-HA₄, Abc3-GFP, α-tubulin and PCNA: monoclonal anti-HA antibody F-7; monoclonal anti-GFP antibody B-2 (Santa Cruz Biotechnology); monoclonal anti-α-tubulin antibody (clone B-5-1-2, Sigma-Aldrich); and, monoclonal anti-PCNA antibody PC10 (Sigma-Aldrich). Following incubation, membranes were washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences), developed with enhanced chemiluminescence (ECL) reagents (Amersham Biosciences), and visualized by chemiluminescence using an ImageQuant LAS 4000 instrument (GE Healthcare) equipped with a Fujifilm High Sensitivity F0.85 43 mm camera.

Fluorescence microscopy. For detection of fluorescent zinc mesoporphyrin IX (ZnMP) and bimane-GS accumulation within cells, liquid cultures of the indicated strains were seeded to an A_{600} of ~0.3. The cultures were then incubated in ALA-deficient medium containing Dip (250 µM) or FeCl₃ (100 µM) for 6 h. At mid-logarithmic phase, monochlorobimane (100 µM) was first added to cells for 3 h and then ZnMP (2 µM) was added for 0, 10, and 30 min, unless otherwise indicated. ZnMP accumulation was stopped by adding 5 volumes of ice-cold 5% bovin serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS). After centrifugation, cells were resuspended in ice-cold 2% BSA in PBS and were examined by fluorescence microscopy using a 1,000x magnification and concanavalin A-coated glass

slides. Fluorescence and differential interference contrast images (Nomarski) of cells were obtained using a Nikon Eclipse E800 epifluorescent microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with a Hamamatsu ORCA-ER digital cooled camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Fields of cells shown in this study correspond to a minimum of five independent experiments.

Indirect immunofluorescence microscopy. *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells were co-transformed with pBPnmt41x-*shu1*⁺-HA₄ + pSP1abc3⁺-GFP or pBPnmt41x-*shu1*-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ + pSP1abc3⁺-GFP. Co-transformed cells were precultivated in the presence of thiamine (5 μM) and ALA (200 μM) to an *A*₆₀₀ of 1.0. At this growth point, the cells were washed twice to remove thiamine and diluted 10-fold in EMM containing Dip (50 μM). After 18 h, cells were transferred to ALA-free and thiamine-replete medium to stop *shu1*⁺-HA₄ or *shu1*-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ gene expression. At this time point, the pool of plasma membrane Shu1-HA₄ or Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ was analyzed in the absence or presence of exogenous hemin (0.05, 1, 5, 10, or 50 μM) for 0 and 30 min. Cells were fixed by adding formaldehyde (3.7%) as described previously (58). Fixed cells were harvested and washed with 0.1 M K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6.5 buffer, containing 1.2 M sorbitol. Cells were spheroplasted using zymolase (30 mg/ml), β-mercaptoethanol (10 mM) and Triton X-100 (1%) as described previously (25). Spheroplasts were adsorbed on poly-*L*-lysine-coated (0.1%) multiwall slides as described previously (25). After a 30 min block with TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% BSA, and 0.02% sodium azide), cells were incubated with anti-HA antibody F-7 (for Shu1-HA₄) or anti-GFP antibody B-2 (for Abc3-GFP) diluted 1:250 in TBS. After a 18-h reaction, cells were washed with TBS and incubated for 90 min with goat anti-mouse Alexa Fluor 546 conjugate diluted 1:250 in TBS. The cells were viewed with a Nikon Eclipse E800 epifluorescent microscope. Fields of cells shown in this study correspond to a minimum of five independent experiments.

Isolation of intact vacuoles. Early logarithmic-phase *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells harboring pBPnmt41x-*shu1*⁺-HA₄ and pSP1abc3⁺-GFP plasmids were incubated in the presence of Dip (50 μM) and monochlorobimane (100 μM). When an *A*₆₀₀ value of 0.025 was reached, cells

were divided into four aliquots for the following treatments: ALA (200 μ M), thiamine (15 μ M) and no hemin (group 1); ALA (200 μ M), no thiamine and no hemin (group 2); hemin (10 μ M), thiamine (15 μ M) and no ALA (group 3); hemin (10 μ M), no thiamine and no ALA (group 4). After 18 h, cells were subjected to cell wall digestion, disruption, and fractionation by differential centrifugation as described previously (59). After the second Percoll step gradient (50%, v/v), which is one of the last steps of vacuole isolation, the integrity of vacuole preparations was assessed by monitoring their ability to retain the fluorescent glutathione S-conjugate of monochlorobimane (bimane-GS). This approach is based on the fact that free, unsubstituted monochlorobimane is membrane permeant and nonfluorescent. However, when it is S-conjugated to glutathione by cytosolic glutathione S-transferases, the bimane-GS product becomes fluorescent and is actively transported into and sequestered within the vacuole of intact cells.

Hemin-agarose pull-down assays. To investigate the capacity of Abc3 to bind heme, *hem1 Δ shu1 Δ abc3 Δ* cells expressing *shu1⁺-HA₄ + abc3⁺-GFP* or *shu1⁺-HA₄ + abc3-P151A/C152A-GFP* were grown to early logarithmic phase. At this point, cells were washed to remove ALA and then incubated in the presence of Dip (250 μ M) or FeCl₃ (100 μ M) for 6 h. Whole extracts were prepared with glass beads using a RIPA buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 8 M urea, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM dithiothreitol, and a complete protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich; P8340). Whole cell extracts were ultracentrifuged (100,000 x g) for 30 min at 4°C. The supernatant containing soluble proteins was kept, whereas the pellet fraction was resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol and protease inhibitors) and treated with Triton X-100 (1%). Once resuspended, the pellet fraction was kept on ice and then re-fractionated by performing a second ultracentrifugation. In the presence of Triton X-100, a nonionic detergent that solubilizes membranes, Shu1-HA₄, Abc3-GFP and Abc3-P151A/C152A-GFP were largely released from membranes, and the supernatant preparation was treated with hemin-agarose or agarose beads as described previously (25). The immunoprecipitates and unbound material were resuspended and mixed, respectively, with loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M β -

mercaptoethanol, 140 mM SDS, 5 mM EDTA, 8M urea and 0.72 mM bromophenol blue) and heated for 30 min at 37°C. Samples were resolved by electrophoresis on 10% (Shu1-HA₄) and 6% (Abc3-GFP and Abc3-P151A/C152A-GFP-GFP) SDS-polyacrylamide gels and were transferred to membrane for Western blot analysis.

3.4 RESULTS

Shu1 is a membrane protein that exhibits PI-PLC sensitivity. Microscopic analysis using spheroplasts have previously shown that Shu1 is a plasma membrane protein (25). Based on protein structure predictions, Shu1 (226 residues) contains a GPI-anchoring signal that comprises a GPI-attachment site (or ω-site; Ser¹⁹⁹) followed by two amino acid residues with relatively short side chains (Ser²⁰⁰ and Ala²⁰¹), a spacer region of 13 amino acid residues and a hydrophobic carboxyl-terminal tail of 12 amino acid residues. We performed experiments to test the validity of these predicted properties. We initially conducted protein shaving experiments using treatment with PI-PLC. *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells co-expressing *shu1⁺-HA₄* and *abc3⁺-GFP* alleles were grown in ALA-free medium containing hemin (0.075 μM) and Dip (250 μM). Spheroplasts were produced and a membrane fraction isolated by ultracentrifugation. This fraction was divided into two aliquots of equal sizes, one was left untreated whereas the other one was treated with PI-PLC. Results showed that in the absence of PI-PLC treatment, Shu1-HA₄ and Abc3-GFP were present only in the pellet fraction (containing membrane proteins) (Fig. 1). However, membrane treatment with PI-PLC resulted in the release of a large proportion of Shu1-HA₄ in the supernatant fraction (Fig. 1). Only a small proportion of Shu1-HA₄ remained associated with the pellet fraction. In the case of Abc3-GFP that is predicted to possess membrane spans, results showed that the protein was resistant to PI-PLC treatment and was exclusively detected in the pellet fraction (Fig. 1). In conclusion, considering a previous demonstration that Shu1 localizes to the plasma membrane (25), these results strongly suggested that Shu1 is attached to the membrane via a GPI anchor that is sensitive to the activity of PI-PLC, an enzyme which removes the GPI moiety from GPI-anchored proteins.

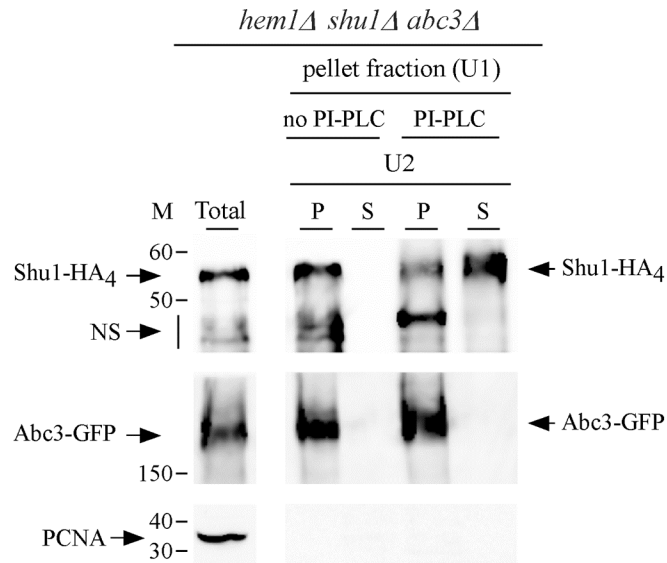


Figure 1. PI-PLC-mediated release of Shu1 from the membrane fraction to the supernatant.

A triple-disruption strain (*hem1Δ shu1Δ abc3Δ*) was co-transformed with functional *shu1⁺-HA₄* and *abc3⁺-GFP* alleles and was pre-cultured in the presence of Dip (50 μM) and ALA (200 μM). Mid-logarithmic-phase cells were incubated in ALA-free medium containing Dip (250 μM) for 6 h. Whole cell extract was prepared and ultracentrifuged (U1) to obtain a pellet fraction (P) of membrane proteins. The membrane-containing pellet fraction was treated with PI-PLC phospholipase or left untreated, and then ultracentrifuged (U2) a second time. The supernatant (S) and pellet (P) fractions were resolved on SDS-polyacrylamide gels and analyzed by immunoblotting using anti-HA, anti-GFP, and anti-PCNA antibodies. Abc3-GFP, a PI-PLC-resistant transmembrane protein was used as control. The positions of the molecular weight (M) of protein standards (in kDa) are indicated on the left-hand side. NS, non-specific signal. Results are representative of three independent experiments.

Shu1-mediated pathway involves delivery of the heme analog ZnMP into vacuoles, followed by its transfer within the cytoplasm. We have previously reported that the presence of Shu1 led to cellular accumulation of fluorescent ZnMP, a heme analog (25). To gain insight into the pathway by which ZnMP was assimilated, *hem1Δ shu1Δ* cells expressing a wild-type *shu1⁺* allele were treated for 6 h in the presence of Dip (250 μM) or iron (100 μM) in the absence of ALA and hemin. Subsequently, monochlorobimane (100 μM) was first added for 3 h and then ZnMP (2 μM) was added for 0, 10, and 30 min. Under low-iron conditions and after 10 min in the presence of ZnMP, *hem1Δ shu1Δ* cells expressing Shu1 produced a ZnMP fluorescence signal that was primarily located in vacuoles (Fig. 2). To further confirm

that ZnMP-associated fluorescence was detected in vacuoles, the vacuolar-sequestered fluorescent compound bimane-GS was used as a marker (36). At the 10-min time point, ZnMP and bimane-GS exhibited equivalent subcellular localization patterns within the cells, as well as fluorescence signals that corresponded to vacuoles (Fig. 2). At the 30-min time point, ZnMP-associated fluorescence was predominantly located in the cytoplasm and was, in most cells, largely excluded from the nucleus (Fig. 2). In the case of bimane-GS, its fluorescence signal remained in vacuoles (30-min time point). Although a *hem1Δ shu1Δ* double mutant harboring an empty integrating plasmid accumulated bimane-GS in vacuoles, this mutant failed to significantly increase ZnMP concentrations within the cell. In fact, its fluorescence signal was negligible as compared with a *hem1Δ shu1Δ* double mutant in which a wild-type *shu1*⁺ allele was expressed (Fig. 2). There was an absence of ZnMP fluorescent signal in *hem1Δ shu1Δ* or *hem1Δ shu1Δ* + *shu1*⁺ cells when they had been incubated in the presence of high iron concentrations (Fig. 2). Taken together, these results revealed that Shu1-mediated cellular accumulation of the heme analog ZnMP occurs sequentially, starting in the vacuoles and migrating later to the cytoplasm.

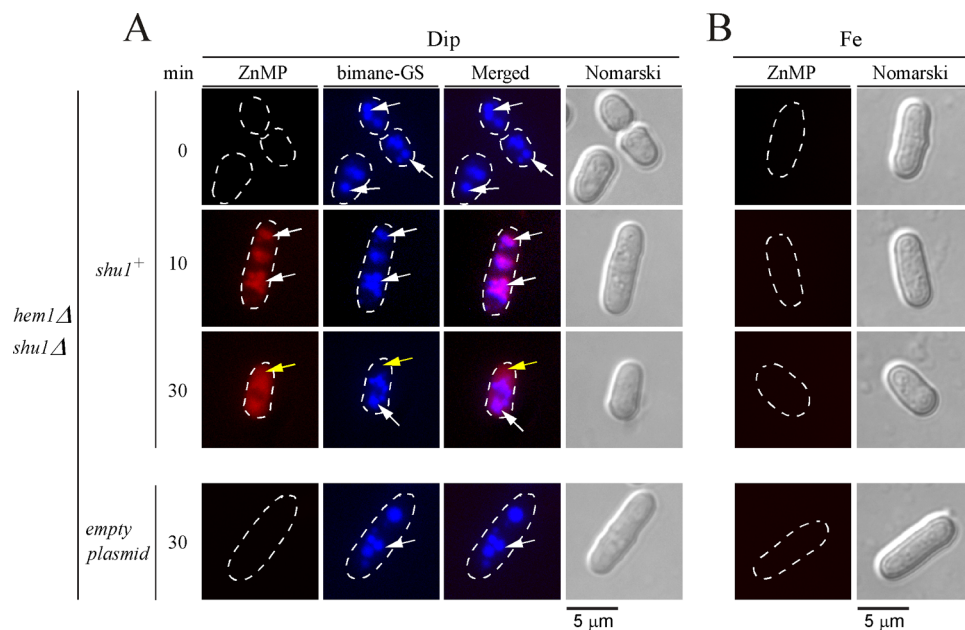


Figure 2. Assimilation of ZnMP is initially detected in vacuoles and then within the cytoplasm.

hem1Δ shu1Δ mutant cells expressing Shu1 were pre-cultured in the presence of Dip (50 μM) or FeCl₃ (100 μM), and ALA (200 μM). Cells were washed and incubated in ALA-free medium containing Dip (250 μM) or FeCl₃ (100 μM) for 6 h. In the final 3 h of treatment, monochlorobimane (100 μM) was added and then ZnMP (2 μM) was added for the indicated times. A *hem1Δ shu1Δ* double mutant strain in which an empty plasmid was reintegrated (*bottom row*) was cultured and treated in an identical manner. *A*, Iron-starved (Dip) cells were analyzed by fluorescence microscopy for accumulation of fluorescent ZnMP (*far left*) and bimane-GS (*center left*). The merged images are shown in the *center right* panels. Normarski optics (*far right*) was used to examine cell morphology. *B*, As negative controls, iron-treated (Fe) cells are shown since *shu1*⁺ gene is known to be repressed under iron-replete conditions. White arrows indicate examples of vacuoles, whereas yellow arrows depict the cytoplasm where ZnMP was detected after 30 min. Results of microscopy are representative of five independent experiments.

Hemin triggers the traffic of Shu1 from the cell surface to the vacuole. We next sought to determine whether Shu1 permanently resides at the plasma membrane or whether it could undergo cellular relocation in response to hemin. This question was addressed using the *nmt*⁺*41x* inducible/repressible promoter system (37). An integrative plasmid harboring *shu1*⁺-HA₄ or *shu1*-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ mutant gene expressed under the control of the *nmt*⁺*41x* promoter was cotransformed with pSP1*abc3*⁺-GFP in *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells. Cultures were grown in a thiamine-free medium containing Dip (50 μM) to create a pool of either Shu1-HA₄ or Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ protein and to ensure the biosynthesis of Abc3-GFP (under the control of its own promoter) that was used as a vacuolar transmembrane resident marker (35). Cotransformed cells were then transferred to thiamine-replete and ALA-free medium for 0 and 30 min. After addition of thiamine to repress further synthesis of Shu1-HA₄ or Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄, results showed that the pool of Shu1-HA₄ or its mutant derivative was localized at the plasma membrane (Fig. 3A). Results further showed that *shu1*⁺-HA₄ or *shu1*-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ mRNA levels were extinguished after addition of thiamine compared to their levels of expression observed in cells at the zero time point (supplemental Fig. S1). The effect of hemin on the subcellular localization of Shu1-HA₄ or Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ was assessed as follows. Cells were transferred in the same thiamine-replete and ALA-free medium, except that the medium was supplemented with hemin (50 μM) for 0 and 30 min. Results showed that after 30 min in the presence of hemin, Shu1-HA₄ underwent relocation from

the plasma membrane to the vacuolar membrane (Fig. 3B). In contrast, the Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ mutant remained located at the cell surface under the same conditions that were used for the wild-type protein (Fig. 3B). To gain insight into the hemin concentrations that were required for triggering trafficking of Shu1-HA₄, cells that had been transferred to thiamine-replete and ALA-free medium were treated with different concentrations of hemin (0.05, 1, 5, 10, and 50 μ M) for 30 min. Results showed that 10 and 50 μ M hemin fostered an effective translocation of Shu1-HA₄ from the plasma membrane to the vacuolar membrane (Fig. 3C). Although 1 and 5 μ M hemin altered Shu1-HA₄ localization pattern as compared to that of untreated cells (Fig. 3A), it was unclear whether Shu1-HA₄ accumulated at the vacuolar membrane with reference to the vacuolar transmembrane resident marker Abc3 (Fig. 3C). Results showed that 0.05 μ M hemin did not alter Shu1-HA₄ localization pattern and was, for the most part, detected at the plasma membrane (Fig. 3C). Taken together, the results indicated that exposure of *S. pombe* to concentration of hemin higher than 10 μ M induces internalization of Shu1 from the cell surface to the vacuolar membrane.

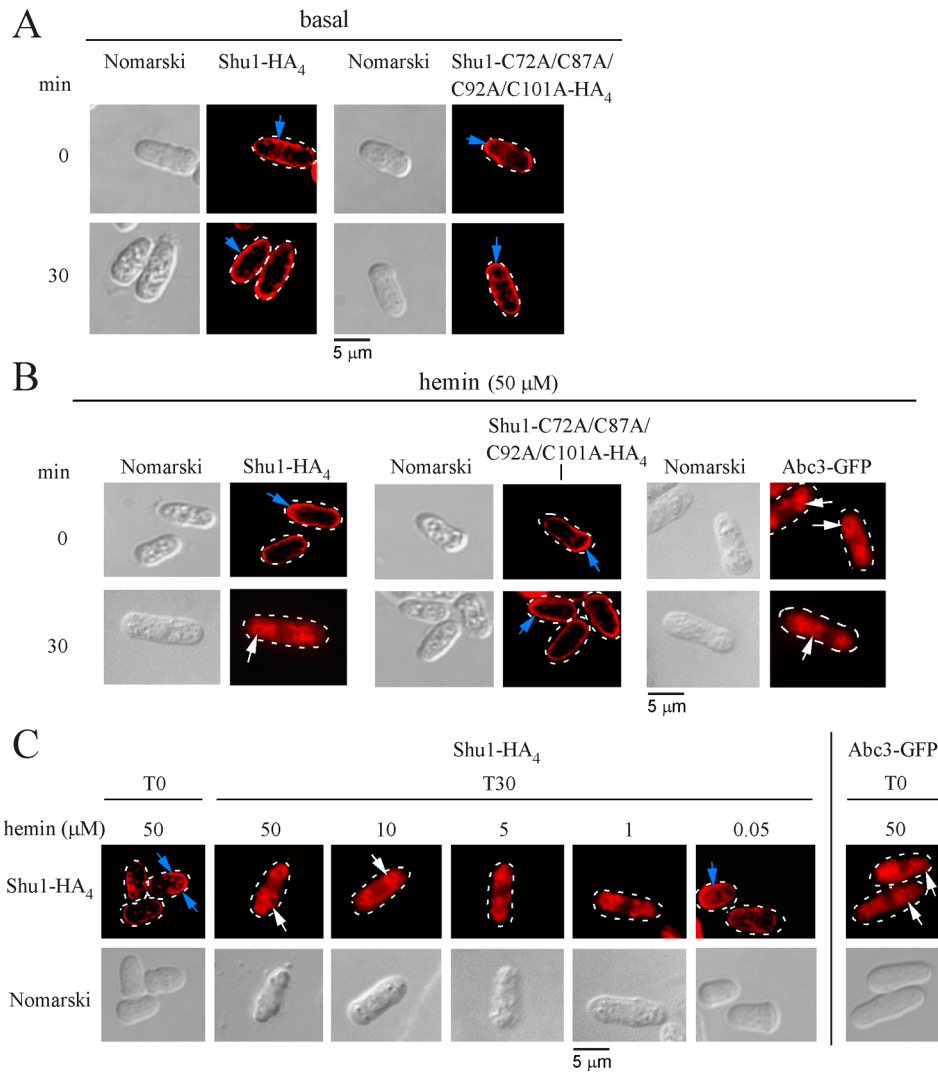


Figure 3. Hemin-dependent internalization of Shu1 from the plasma membrane to the vacuole.

A, *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* mutant cells were co-transformed with pSP1*abc3*⁺-*GFP* + pBP*nmt41x-shu1*⁺-*HA*₄ or pSP1*abc3*⁺-*GFP* + pBP*nmt41x-shu1*C72A/C87A/C92A/C101A-*HA*₄ plasmids and were pre-cultured in medium containing ALA (200 μM) and thiamine (5 μM). After washes, cultures were grown in thiamine-free medium containing Dip (50 μM) for 18 h. The cells were then transferred to thiamine-replete and ALA-free medium for 0 and 30 min. Indirect immunofluorescence microscopy was performed to visualize cellular location of Shu1-HA₄ and its mutant derivative. Cell morphology was examined using Nomarski optics. *B*, Co-transformed cells were cultured as described for *panel A*, except that they were treated with 50 μM hemin for 0 and 30 min. Cellular location of Abc3-GFP was determined by indirect immunofluorescence microscopy (Alexa Fluor red dye as a vacuolar membrane protein marker). *C*, *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells co-transformed with pSP1*abc3*⁺-*GFP* and pBP*nmt41x-shu1*⁺-*HA*₄ were grown under the same conditions as described for *panel A*, except that they were treated with 50, 10, 5, 1, and 0.05 μM hemin for

0 and 30 min. Blue arrows indicate the plasma membrane, whereas white arrows show examples of vacuoles. Results of microscopy are representative of five independent experiments.

To further assess vacuolar localization of Shu1 in response to high hemin concentrations, yeast vacuoles were isolated from *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells co-expressing Shu1-HA₄ and Abc3-GFP. In these experiments, the expression of an integrated *shu1⁺-HA₄* allele was under the control of the *nmt⁺41x* promoter, whereas *abc3⁺-GFP* was under the control of its own promoter. Thiamine- and ALA-replete cells were initially incubated in the presence of Dip (50 μM) and monochlorobimane that allowed Abc3-GFP expression and vacuolar bimane-GS accumulation, respectively. Cells were subsequently divided into four treatment groups as follows: ALA, thiamine and absence of hemin (group 1); ALA, absence of thiamine and hemin (group 2); absence of ALA but addition of thiamine and hemin (group 3); and, absence of ALA and thiamine but addition of hemin (group 4). After 18 h, analyses of cells by fluorescence microscopy revealed that bimane-GS was sequestered in vacuoles of cells in each experimental group (Fig. 4A). Vacuoles were purified from these different cultures and their integrity was analyzed in two ways. First, vacuole morphology was assessed by differential interference contrast (Nomarski) (Fig. 4B). Second, owing to the fact that cells were cultured in the presence of monochlorobimane, which resulted in vacuolar accumulation of its fluorescent derivative bimane-GS, we observed that vacuoles maintained their integrity throughout the purification procedure as the bimane-GS-associated fluorescence was retained by the vast majority of the isolated vacuoles (Fig. 4B). Immunoblotting analysis of vacuole preparations from experimental group 4 showed that Shu1-HA₄ co-fractionated with Abc3-GFP, a known resident vacuolar membrane protein (Fig. 4C). These observations led to the conclusion that removal of thiamine fostered Shu1-HA₄ expression whereas the presence of hemin triggered its trafficking from the plasma membrane to the vacuole, thereby explaining its detection in vacuoles (Fig. 4C). Furthermore, the data supported previous observations of indirect fluorescence microscopy of vacuolar localization (Fig. 3, B and C). Immunoblotting analysis of experimental groups 1 and 3 in which thiamine was present to shut off *shu1⁺-HA₄* expression, consistently failed to show the presence of Shu1-HA₄ in vacuole and whole cell extract preparations (Fig. 4C). Immunoblotting analysis of vacuole preparations from experimental group 2 showed that

these vacuolar preparations were negative for the presence of Shu1-HA₄ (Fig. 4C), confirming that in the absence of hemin Shu1-HA₄ did not undergo relocalization from the cell surface to the vacuole (Fig. 3A). However, the absence of thiamine allowed expression and therefore detection of Shu1-HA₄ in whole cell extracts (Fig. 4C).

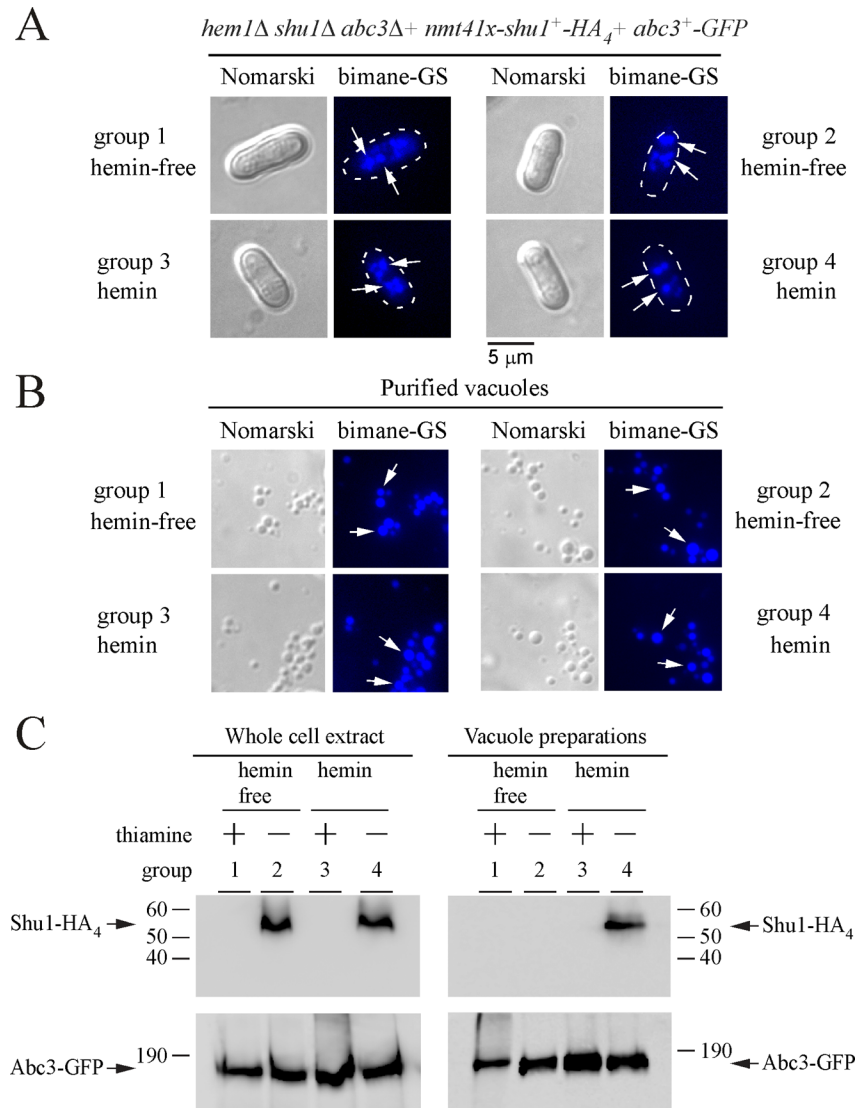


Figure 4. Shu1 co-purifies with yeast vacuoles in response to hemin.

A, A strain harboring a *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* triple deletion was co-transformed with pBP*nmt41x-shu1⁺-HA₄* and pSP1*abc3⁺-GFP* plasmids. Co-transformed cells were pre-cultured in medium containing ALA (200 μM) and thiamine (5 μM). After washing, cells incubated in the presence of Dip (50 μM) and monochlorobimane (100 μM) were divided

into four treatment groups: ALA (200 μ M), thiamine (15 μ M) and no hemin (group 1); ALA (200 μ M), no thiamine and no hemin (group 2); hemin (10 μ M), thiamine (15 μ M) and no ALA (group 3); hemin (10 μ M), no thiamine and no ALA (group 4). After 18 h, cells were analyzed by fluorescence microscopy to visualize their morphology and to detect bimane-GS fluorescence (vacuole marker). *B*, Vacuoles were purified from each group of cultures described in *panel A* and were visualized by microscopy to observe bimane-GS fluorescence. White arrows indicate examples of vacuoles. Results of microscopy are representative of five independent experiments. *C*, Vacuole preparations from each group of cultures described in *panel A* were analyzed by immunoblotting using anti-HA and anti-GFP antibodies. Abc3-GFP was used as vacuolar membrane protein marker and loading control for proteins. The positions of molecular weight standards are indicated on the *left*. Shu1-HA₄ and Abc3-GFP are indicated with arrows.

Shu1 and Abc3 are required for assimilation of exogenous hemin. In a previous study and results reported here, we showed that an *S. pombe hem1* Δ mutant strain could be maintained alive by adding exogenous ALA, which is the metabolic product that normally generates the Hem1 protein when present and functional (Fig. 5A) (25). The presence of ALA allows heme biosynthesis to start at the second step of the biosynthetic pathway. A second way to keep *hem1* Δ cells alive is to supplement the mutant cells with exogenous hemin (Fig. 5B). This strategy fosters *hem1* Δ cells to use their own heme uptake system. This experimental design (*hem1* Δ + hemin) ensures that heme biosynthesis is blocked, setting conditions to investigate heme acquisition by these cells. Results showed that under these experimental conditions, the heme analog ZnMP was first delivered into the vacuole and then redistributed within the cytoplasm (Fig. 2). Based on the knowledge that Abc3 is an iron-regulated vacuolar transporter in *S. pombe* and that its expression is required under low iron concentrations (35), we created a *hem1* Δ *abc3* Δ double mutant strain to investigate whether Abc3 may function in heme acquisition. *hem1* Δ *abc3* Δ cells were incubated in the absence of ALA and in the presence of hemin. Under these conditions, *hem1* Δ *abc3* Δ cells exhibited poor growth as compared to *hem1* Δ cells containing an endogenous *abc3*⁺ gene or *hem1* Δ *abc3* Δ cells in which functional untagged *abc3*⁺ and GFP-tagged *abc3*⁺ alleles were re-integrated (Fig. 5B). After 73 h, the *hem1* Δ *abc3* Δ strain displayed ~7–8-fold less growth compared to strains that expressed functional *abc3*⁺ alleles (Fig. 5B). This phenotype (poor growth) of *hem1* Δ cells lacking *abc3* (*abc3* Δ) in the absence of ALA and in the presence of hemin was reminiscent to the phenotype previously reported for *hem1* Δ *shu1* Δ cells (Fig.

5B) (25). When growth assays were performed using *hem1Δ shu1Δ* and *hem1Δ abc3Δ* cells containing HA₄-tagged *shu1-C72A/C87A/C92A/C101A* and GFP-tagged *abc3-P151A/C152A* mutant alleles, respectively, results showed that these mutant strains exhibited poor growth as compared to *hem1Δ shu1Δ* and *hem1Δ abc3Δ* cells expressing functional *shu1⁺-HA₄* and *abc3⁺-GFP* alleles (Fig. 5B).

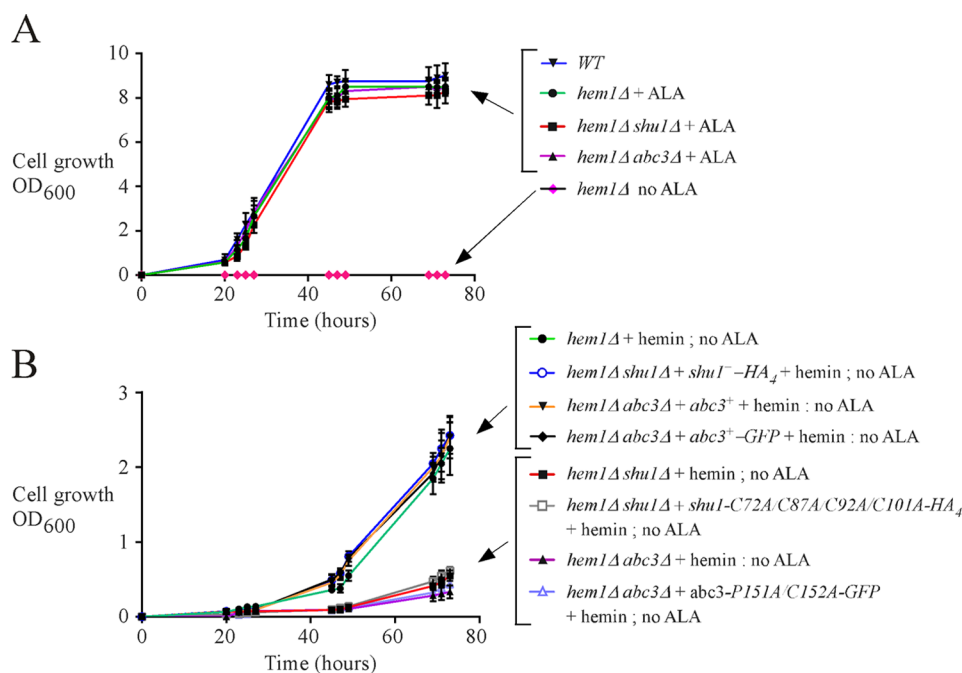


Figure 5. *Abc3* loss of function phenocopies the effect of *Shu1* deletion.

A, Growth of the indicated yeast strains was assessed in YES medium that was supplemented with exogenous ALA (200 μM). In the case of the parental (*WT*) strain and a *hem1Δ* mutant (last strain at the bottom depicted with pink diamond forms), no exogenous ALA was added. Strain color curve codes are: wild-type (*WT*) in blue; *hem1Δ* in green (+ALA) and pink (no ALA); *hem1Δ shu1Δ* in red (ALA); and, *hem1Δ abc3Δ* in violet (ALA). *B*, Isogenic *hem1Δ*, *hem1Δ shu1Δ*, and *hem1Δ abc3Δ* strains were assessed in ALA-free medium. In the case of *hem1Δ shu1Δ* cells, they were transformed with an empty plasmid or a plasmid harboring a HA₄-tagged *shu1⁺* or HA₄-tagged *shu1-C72A/C87A/C92A/C101A* allele. In the case of *hem1Δ abc3Δ* cells, they were transformed with an empty plasmid or a plasmid harboring an untagged *abc3⁺*, GFP-tagged *abc3⁺* or GFP-tagged *abc3-P151A/C152A* allele. Growth of strains was assessed in the presence of hemin (0.075 μM) but in the absence of ALA. Strain color codes are: *hem1Δ* in green; *hem1Δ shu1Δ* in red; *hem1Δ abc3Δ* in violet; *hem1Δ shu1Δ* expressing *shu1⁺-HA₄* in blue (unfilled circle); *hem1Δ shu1Δ* expressing *shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄* in grey (empty square); *hem1Δ abc3Δ* expressing *abc3⁺* in orange; *hem1Δ abc3Δ* expressing *abc3⁺-GFP* in black; and, *hem1Δ abc3Δ* expressing *abc3-P151A/C152A-GFP* in pale purple (unfilled triangle).

Given the similar growth phenotypes of the respective *hem1Δ abc3Δ* and *hem1Δ shu1Δ* mutants in a medium lacking ALA and supplemented with low hemin concentrations (0.075 μM), we tested a potential relationship between Shu1 and Abc3 to ascertain whether they could operate in the same hemin mobilization pathway. The following isogenic strains were used for that purpose: *hem1Δ shu1Δ* expressing *shu1*⁺ and *abc3*⁺, *hem1Δ shu1Δ* harboring an empty plasmid and *abc3*⁺, *hem1Δ abc3Δ* expressing *shu1*⁺ and *abc3*⁺, and *hem1Δ abc3Δ* containing an empty plasmid and *shu1*⁺. When these strains had grown to mid-logarithmic phase, they were washed to remove ALA and then incubated in the presence of Dip (250 μM) or iron (100 μM) for 6 h. The two treatment groups were subsequently incubated in the presence of monochlorobimane (100 μM) for 3 h and then ZnMP (2 μM) for 30 min. Results consistently showed an absence of ZnMP fluorescence signal in a strain lacking *shu1* (*hem1Δ shu1Δ* with plasmid alone and *abc3*⁺) (Fig. 6A). In contrast, when *abc3* was deleted (*hem1Δ abc3Δ* with plasmid alone and *shu1*⁺), there was cellular accumulation of fluorescent ZnMP but it was restricted to vacuoles even after 30 min (Fig. 6A). In these cells, both ZnMP and bimane-GS fluorescent compounds were selectively accumulated in vacuoles as there was superimposition of their respective fluorescent signals (Fig. 6A). These data were consistent with Abc3 acting downstream of Shu1 and suggested that, in the absence of Abc3, there was vacuolar accumulation of ZnMP due to the inability of yeast cells to mobilize stored ZnMP from the vacuole to replenish the cytoplasm. In the case of *hem1Δ shu1Δ shu1*⁺ *abc3*⁺ and *hem1Δ abc3Δ shu1*⁺ *abc3*⁺ cells that had been incubated in the presence of Dip, intracellular ZnMP fluorescent signal was primarily located in the cytoplasm over a time period of 30 min (Fig. 6A). There was an absence of ZnMP fluorescent signal in all of the above-mentioned strains when they had been treated under iron-replete conditions (Fig. 6B). Taken together, these data suggested that Abc3 is required to provide bioavailable heme analog ZnMP via its mobilization from the vacuole to the cytoplasm.

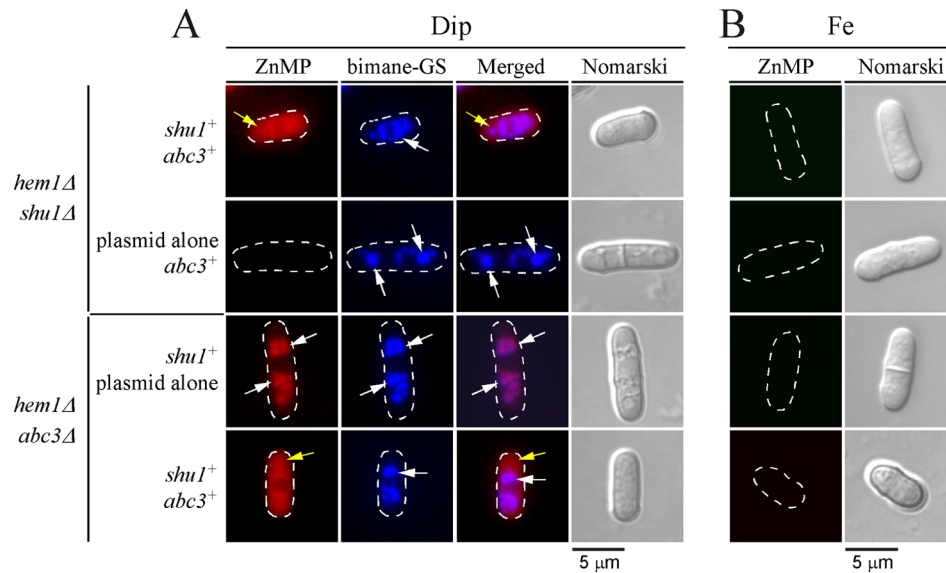


Figure 6. Deletion of *abc3*⁺ leads to vacuolar accumulation of ZnMP.

The indicated isogenic yeast strains were pre-cultured in the presence of Dip (50 μM) or FeCl₃ (Fe, 100 μM), and ALA (200 μM). Cells were washed and incubated in ALA-free medium and treated with Dip (250 μM) or FeCl₃ (100 μM) for 6 h. Monochlorobimane (100 μM) was then added for the last 3 h of culture. Subsequently, ZnMP (2 μM) was added for 30 min. *A*, Iron-starved (Dip) cells were analyzed by fluorescence microscopy for accumulation of fluorescent ZnMP (*far left*) and bimane-GS (*center left*). The merged images are shown in the *center right* panels. Normarski optics (*far right*) was used to ascertain cell morphology. *B*, As negative controls, iron-treated strains are shown since *shu1*⁺ and *abc3*⁺ genes are known to be repressed under iron-replete conditions. White arrows indicate examples of vacuoles where bimane-GS was sequestered. Yellow arrows depict cytoplasmic accumulation of ZnMP. Results of microscopy are representative of five independent experiments.

Binding of Abc3 to hemin-agarose. To determine whether Abc3 was able to interact with hemin, wild-type *shu1*⁺-HA₄ and *abc3*⁺-GFP fusion alleles were co-transformed in a *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* triple mutant strain. When cells had grown to mid-log phase, they were washed to remove ALA and then incubated in the presence of Dip (250 μM) or FeCl₃ (100 μM) for 6 h. Whole protein extracts from these cells were prepared and cell membranes were fractionated and isolated by ultracentrifugation. Membrane preparations were solubilized with Triton X-100 and then re-fractionated by performing a second ultracentrifugation. Dissolved membrane protein fraction that contained released Shu1-HA₄ and Abc3-GFP proteins was mixed with hemin-agarose or agarose (control) beads. Results showed that Abc3-GFP isolated from iron-starved cells was retained on hemin-agarose beads (Fig. 7,

bound). Only a small fraction of Abc3-GFP was detected in the flow-through fraction (Fig. 7, unbound). As a control of known heme-binding protein, Shu1-HA₄ was retained on hemin-agarose beads (Fig. 7, bound). Only a minor fraction of Shu1-HA₄ was detected in the unbound fraction (Fig. 7). On the other hand, Abc3-GFP and Shu1-HA₄ were primarily detected in the unbound fraction (flow-through) when agarose beads (control) were used (Fig. 7). Consistent with iron-mediated repression of *abc3*⁺-GFP and *shu1*⁺-HA₄ mRNA levels (under the control of *abc3*⁺ and *shu1*⁺ promoters, respectively), Abc3-GFP and Shu1-HA₄ proteins were barely or not detected in membrane protein fractions that had been prepared from iron-replete cells (Fig. 7). Taken together, these results showed that Abc3 expressed in *S. pombe* interacts with hemin, supporting the proposed model that Abc3 is required as a means to mobilize stored heme from the vacuole to the cytoplasm.

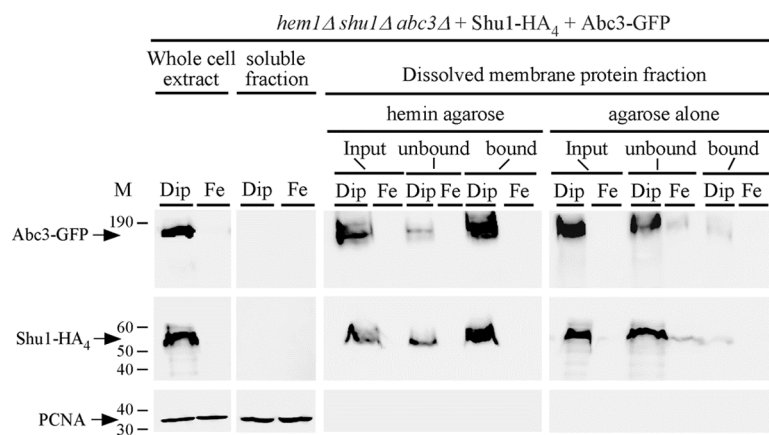


Figure 7. Abc3 is a hemin-binding protein.

A, *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells expressing HA₄-tagged Shu1 and GFP-tagged Abc3 were pre-cultured in the presence of ALA (200 μM) and Dip (50 μM). After washing, cells were transferred to ALA-free media. At this point, they were treated with Dip (250 μM) or FeCl₃ (100 μM) for 6 h and then whole cell extracts were prepared. Cell membranes were obtained by ultracentrifugation of whole cell extracts and were treated with Triton X-100 to release membrane proteins. Triton X-100-solubilized membrane proteins (input) were subjected to hemin pull-down 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. Soluble fraction contains proteins found in the supernatant after ultracentrifugation of whole cell extract preparations. The positions of molecular weight standards are indicated on the *left*. Abc3-GFP, Shu1-HA₄, and PCNA are indicated with arrows.

An inverted CP motif (Pro151-Cys152) is present within the sequence of a predicted loop region of Abc3. CP motif and some cases of inverted CP motif (Pro-Cys) have been reported to exhibit heme-binding propensity (38-43). We therefore assessed whether Pro151 and Cys152 residues were involved in the ability of Abc3 to interact with hemin. Pro151 and Cys152 residues were replaced with alanine residues and the mutated protein expressed in *hem1Δ shu1Δ abc3Δ shu1⁺-HA₄* cells. Cultures were washed to remove ALA and then incubated for 6 h in the presence of Dip (250 μM) or iron (100 μM). Under low iron conditions, the Abc3-P151A/C152A-GFP mutant protein was located on the membrane of vacuoles, as observed in the case of the wild-type Abc3-GFP protein (Fig. 8A). However, there was an absence of fluorescent signal in the case of wild-type or mutant form of GFP-tagged Abc3 in iron-treated cells (Fig. 8A). Membrane fractions collected after ultracentrifugation were treated with Triton X-100 and the solubilized membrane proteins were subjected to pull-down assays using hemin-agarose beads. Results showed that Abc3-P151A/C152A-GFP was almost exclusively detected in the unbound (flow-through) fraction, consistent with a loss of affinity for hemin (Fig. 8B). There was undetectable amount of Abc3-P151A/C152A-GFP in the dissolved membrane fractions of iron-treated cells (Fig. 8B). As a control, Shu1-HA₄ was retained on hemin-agarose beads (Fig. 8B, bound). Only a minor fraction of Shu1-HA₄ was detected in the unbound fraction (Fig. 8B). As an additional control for specificity of the resin, Abc3-GFP and Shu1-HA₄ were mainly detected in the unbound fraction when agarose beads were used (Fig. 8B). Together, these results strongly suggested that the inverted CP motif (residues 151-152) of Abc3 is required for its ability to bind hemin.

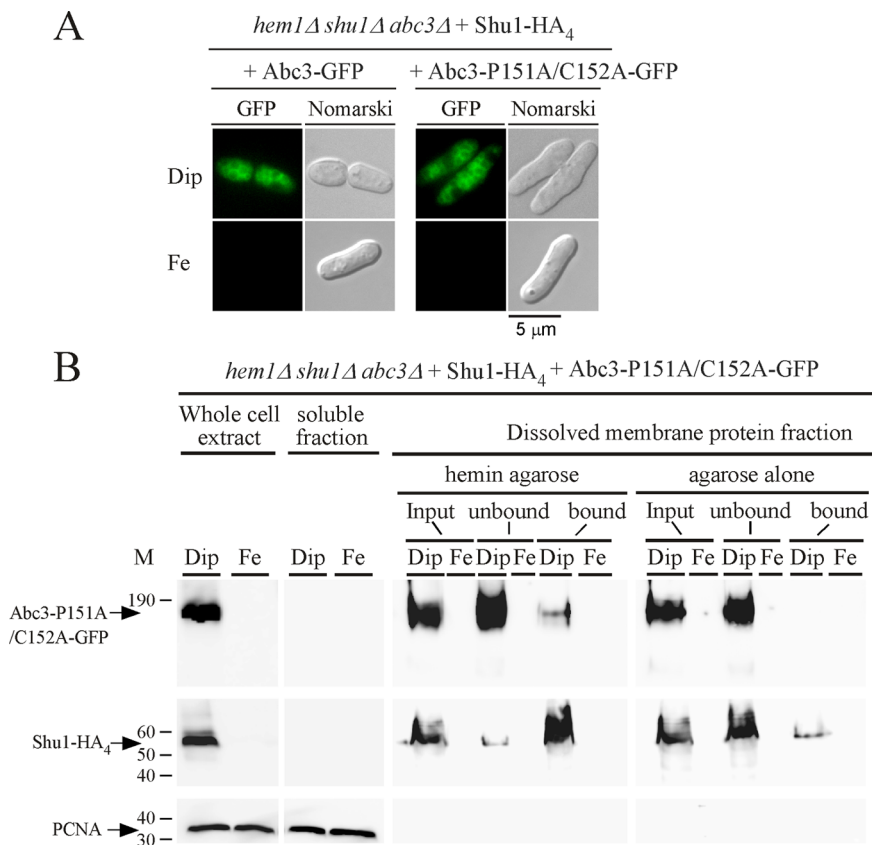


Figure 8. Subcellular localization and hemin-agarose pull-down assays with a mutant version of Abc3.

A, Fluorescence microscopy of subcellular location of Abc3-GFP or Abc3-P151A/C152A-GFP that was co-expressed with Shu1-HA₄ in *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* cells in the presence of Dip (250 μM) or FeCl₃ (Fe, 100 μM). Nomarski optics were used to monitor cell morphology. Results of microscopy are representative of five independent experiments. *B*, Whole cell extracts were prepared from cells expressing the mutant version of Abc3 under conditions described above for *panel A*. Supernatant (soluble proteins) and pellet (membrane proteins) fractions were prepared by ultracentrifugation from whole cell extracts. Triton X-100-solubilized proteins (input) were subjected to hemin pull-down assays using hemin-agarose or agarose. Unbound and bound fractions were analyzed by Western blots. Proteins were revealed using an anti-GFP, anti-HA or anti-PCNA antibody. The positions of molecular weight standards are indicated on the *left*. Abc3-GFP, Shu1-HA₄, and PCNA are indicated with arrows.

To further assess the effect of the P151A and C152A mutations on Abc3 function, a plasmid harboring the wild-type *abc3*⁺ or *abc3-P151A/C152A-GFP* mutant or an empty plasmid was transformed into a *hem1Δ abc3Δ shu1*⁺ strain. Mid-logarithmic cell cultures were washed to remove ALA and then treated with Dip (250 μM) or iron (100 μM) for 6 h. During the

last 3 h of growth, cultures were incubated in the presence of monochlorobimane (100 μ M) and then treated with ZnMP (2 μ M) for 30 min. Results showed that in the case of cells expressing wild-type *abc3*⁺ allele under low-iron conditions, ZnMP-associated fluorescence was predominantly detected in the cytosol 30 min after ZnMP treatment (Fig. 9A). Under the same conditions, *hem1* Δ *abc3* Δ *shu1*⁺ cells expressing *abc3-P151A/C152A-GFP* mutant allele or an empty plasmid exhibited cellular accumulation of fluorescent ZnMP in vacuoles (Fig. 9A). The resulting fluorescent ZnMP pattern was identical to that of the bimane-GS fluorescent compound, which is known to selectively accumulate in vacuoles (Fig. 9A). As controls, *hem1* Δ *shu1* Δ *abc3*⁺ cells were transformed with a plasmid expressing *shu1*⁺ or an empty plasmid and were subsequently cultured under conditions identical to those described above for *hem1* Δ *abc3* Δ *shu1*⁺ cells. In the case of cells expressing wild-type *shu1*⁺, intracellular ZnMP fluorescent signal was seen primarily in the cytoplasm after 30 min of ZnMP treatment (Fig. 9A). In contrast, in the case of cells lacking Shu1 and harboring an empty plasmid, they failed to accumulate the ZnMP fluorescent compound in comparison with *hem1* Δ *shu1* Δ *abc3*⁺ cells expressing a wild-type *shu1*⁺ that was re-integrated (Fig. 9A). There was an absence of ZnMP fluorescent signal in all the transformed strains when they had been pre-treated with high concentrations of iron (Fig. 9B). Taken together, these results suggested that mobilization of a heme analogue (ZnMP) from the vacuole to the cytosol requires Abc3 and involves an inverted CP motif (residues 151-152) within its amino-terminal region.

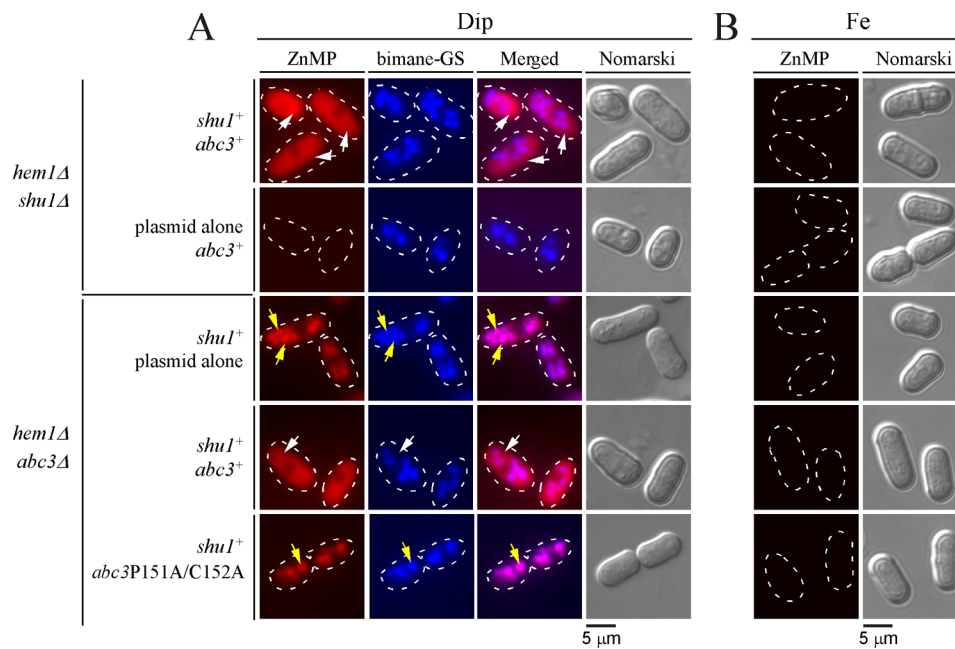


Figure 9. Expression of Abc3-P151A/C152A mutant protein alters ZnMP cellular distribution, leading to its vacuolar accumulation.

A, The indicated isogenic yeast strains were cultured in the same manner as described in Fig. 6. After a 30-min treatment with ZnMP, iron-starved cells were examined by fluorescence microscopy to visualize cellular distribution of fluorescent ZnMP (*far left*). Vacuoles were detected by bimane-GS staining and cell morphology by Nomarski optics (Nomarski). Merged images of ZnMP and bimane-GS fluorescent signals (*center right*) are shown next to Nomarski microscope images. *B*, As negative controls, iron-treated strains are shown since *shu1*⁺ and *abc3*⁺ genes are known to be repressed under iron-replete conditions. White arrows indicate examples of vacuoles where bimane-GS was sequestered, whereas yellow arrows depict cytoplasmic accumulation of ZnMP. Results of microscopy are representative of five independent experiments.

3.5 DISCUSSION

Although heme is an essential prosthetic group for several proteins and can serve as a source of iron, cellular components that are required for heme assimilation and iron acquisition from heme are still poorly understood. Using the model organism *S. pombe*, our previous studies have identified Shu1 as a novel cell membrane protein involved in assimilation of exogenous heme (25). Shu1 is predicted to contain a GPI anchor that attaches the protein to the membrane (44). If this were the case, exposing the cell membranes to exogenous PI-PLC should release Shu1 from its anchor. Here, results showed that a PI-PLC treatment triggered

the release of Shu1, suggesting removal of membrane-bound Shu1 from its GPI anchor. These results lent support to the prediction of a Shu1-associated GPI-attachment site (ω -site) corresponding to Ser199. In the case of Shu1, the ω -site is followed by 2 relatively short side chain amino acid residues (Ser200 and Ala201), especially in the case of $\omega+2$ position (Ala201). This motif is known to favor the addition of a GPI anchor at a Ser residue. One additional favorable feature is that the polypeptide region downstream of the ω , $\omega+1$, and $\omega+2$ residues of Shu1 is constituted of a putative spacer region of ~ 13 amino acid residues, followed by a predicted hydrophobic tail of 12 residues. Overall, the predicted Shu1 GPI attachment site and its downstream region exhibit characteristics that are commonly found in GPI-anchored proteins.

Our previous studies have shown that *shu1*⁺ is regulated at the level of gene transcription (25). It is induced under conditions of iron starvation and turned off under iron-replete conditions. To investigate whether Shu1 underwent post-translational regulation, we studied changes in Shu1 localization in the presence of low (0.075 μM) and high (50 μM) hemin concentrations. A functional *shu1*⁺-*HA*₄ allele was expressed under the control of a thiamine-sensitive *nmt*⁺ promoter to address this question. Biosynthesis of Shu1-*HA*₄ occurred in absence of thiamine but the addition of thiamine repressed further synthesis. We then investigated the effect of hemin on the subcellular localization of Shu1-*HA*₄. When cells were treated with low concentrations of hemin, Shu1 localized at the cell surface whereas under conditions of high concentrations of hemin, Shu1 was detected on vacuolar membrane. Consistent with these results, we observed that the activity of Shu1 led to vacuolar accumulation of ZnMP after 10 min. Subsequently, ZnMP fluorescent signal was progressively found in the cytoplasm after 30 min. These results were reminiscent of findings for *C. albicans* Rbt5. Using fluorescently rhodamine-tagged hemoglobin (RB-Hb), *C. albicans* cells expressing Rbt5 accumulate RB-Hb in the vacuoles and then to a lesser extent in the cytosol (17).

After it has reached the plasma membrane, Shu1 then internalized in response to heme. The mechanism of Shu1 internalization remains unclear at this point since its anchoring to the membrane by a GPI structure yields a protein that lacks a cytoplasmic domain that could be used as a target by an endocytic pathway. One possible explanation is that Shu1 is involved in lateral interactions with other plasma membrane components, which could serve as direct

targets to be modified and taken up as a heteromeric plasma membrane complex in endocytic vesicles. Alternatively, there are a few reported cases of GPI-anchored proteins as in the case of the prion protein that leave plasma membrane lipid "raft" domains to enter clathrin-coated pits and then undergo endocytosis in coated vesicles (45). In the case of the prion protein, its amino-terminal domain is sufficient to trigger internalization within the cell (46). Although most cell surface proteins appear to be internalized by dynamin-dependent pathways that include the clathrin-coated-mediated pathway, a large proportion of GPI-anchored proteins are selectively internalized through a dynamin-independent pathway (45,47). These findings have led to the proposal that several GPI-anchored proteins are endocytosed by pinocytosis through specialized early endosomal compartments known as GEECs (GPI-anchored-protein-enriched early endosomal compartments) (45,48). Because GEECs result from fusion of primary uncoated clathrin-independent vesicular carriers called CLICs (derived from the cell surface), this process is called the CLIC/GEEC pathway (47). However, the CLIC/GEEC pathway has not yet been described in fungi, including *S. pombe* which makes this process of internalization speculative to explain endocytic internalization Shu1.

Although the mechanism by which heme-dependent GPI-anchored CFEM-like proteins undergo cellular internalization remains unclear, it appears that the endocytic process may involve the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery (49,50). The ESCRT machinery is composed of four complexes, ESCRT-0, -I, -II, and -III, and other cellular components such as the Vps4 complex (51). ESCRT complexes capture endosomal membrane proteins that are monoubiquitinated and deliver them to the multivesicular body (MVB) compartment and, from there, to the vacuole (yeast) or lysosome (mammalian cell), where ubiquitinated cargos are degraded. In *C. albicans*, the cell-surface GPI-anchored Rbt5 and Rbt51 proteins bind hemin and hemoglobin (16). These proteins are absent in *Saccharomyces cerevisiae*, which is unable to take up exogenous hemin or hemoglobin. Interestingly, heterologous expression of *C. albicans* Rbt51 in *S. cerevisiae* enables acquisition and utilization of exogenous hemoglobin (17). However, *S. cerevisiae* mutants lacking ESCRT-II and -III components (such as Vps22 and Vps32) are defective in assimilation of exogenous hemoglobin (17). Furthermore, *C. albicans* ESCRT complex mutants exhibit significant growth defects in media containing hemoglobin as the sole iron

source (17). Proteins of the ESCRT pathway have also been found to be required for hemin use in *C. neoformans* (23,24). In addition to ESCRT-II (Vps22) and -III (Vps20 and Vps32) components, the subunit Vps23 of the ESCRT-I complex contributes to hemin uptake (24). However, there is yet absence of evidence that Rbt5/51 and Cig1 represent ubiquitinated cargos of the *C. albicans* and *C. neoformans* ESCRT proteins, respectively. Given that the ESCRT machinery is committed to targeting of membrane proteins to the vacuole and the fact that Shu1 undergoes relocalization from the cell surface to the vacuole in response to hemin, it is likely that components of the ESCRT machinery are required for Shu1 internalization. If this were the case, then Shu1 may become ubiquitinated upon its association with hemin. However, it is far from clear how would Shu1 become ubiquitinated. In *S. pombe*, an alternative route for cargos to reach the ESCRT pathway is through an association with Nbr1 (52,53). Upon formation of a cargo-Nbr1 complex, there is ubiquitination of Nbr1 and that results in the sequestration of the cargo-Nbr1 complex inside of MBVs in a ESCRT-dependent manner. Subsequently, the cargo-Nbr1 complex is delivered to the vacuole where the proteins that are bound by Nbr1 are released into the vacuole (52).

Our results revealed that Shu1 is required for internalization of hemin or ZnMP, which is then delivered to the vacuole. Once in vacuoles, hemin (or ZnMP) may undergo further degradation, resulting in the release of iron (or zinc) from the protoporphyrin ring. This series of events would constitute a specialized pathway and make the vacuole an important site for intracellular hemin and iron stores. *S. pombe* is one of the yeast species that does not express homologs of *S. cerevisiae* vacuolar iron transporters (Smf3, Fth1, and Fet5) or heme oxygenase (Hmx1) like that found in *C. albicans*. Instead, we have previously shown that when *S. pombe* undergoes a transition from high to low iron concentrations, the vacuolar transmembrane protein Abc3 is highly induced and participates in the mobilization of stored iron sources from the vacuole (35). However, the nature of the usable form of iron that can be transported by Abc3 remains unclear. Results of pull-down assays using hemin-agarose showed that Abc3-GFP expressed in iron-starved cells was specifically retained on the beads. This observation was in agreement with the fact that Abc3 possesses an inverted CP motif that is predicted to be located at the beginning of an exposed hydrophilic linker region (denoted L0), which separates the N-terminal NTE domain of Abc3 from its ABC core

domain. According to a predicted 3D-model by I-TASSER (54), the inverted CP motif (Pro151 and Cys152) of Abc3 is oriented towards the vacuolar side. In several hemoproteins such as FeoB (*E. coli*), IRP2 (*human*) and DP8 (*human*), the CP motif is part of a central heme-binding domain due to the presence of the Pro side chain that fosters a distinct conformation of the Cys thiol group. This property enables Cys to coordinate heme through its thiol group. Other examples of hemoproteins that include GlpF (*E. coli*) and DGCR8 (*human*) exhibit an inverted CP motif that is sufficient to confer heme binding capacity (42). Here, when the inverted CP motif (P¹⁵¹C¹⁵²) was mutated in Abc3, cells expressing the *abc3-P151A/C152A* allele selectively accumulated the heme analog ZnMP in vacuoles and were unable to subsequently trigger its redistribution in the cytoplasm in comparison to cells expressing a wild-type *abc3*⁺ allele. Furthermore, pull-down assays using protein lysates prepared from cells expressing Abc3-P151A/C152A showed that substitutions of P¹⁵¹C¹⁵² residues (in Ala) strongly decreased Abc3 binding to hemin-agarose. These results suggested that the inverted CP motif (P¹⁵¹C¹⁵²) participates in hemin coordination in Abc3. However, whether one residue contributes more than another or whether there is influence of additional amino acid residues flanking the motif or elsewhere will require additional studies.

Data reported here concerning Abc3 are reminiscent of those observed in the case of the human ABCG2 protein, which is an ABC transporter known to be involved in the export of heme, hemin, and ZnMP (38,55). Although Abc3 and ABCG2 are members of different ABC protein subfamilies, they possess a large loop that contains an inverted CP motif. In the case of ABCG2, the ECL3 loop located between transmembrane domains 5 and 6 contains an inverted CP motif (P⁶⁰²C⁶⁰³) (38). Studies showed that a single-point mutation C603A inside ECL3 dramatically decreases the binding of hemin to ABCG2 (38). Given the fact that results described in this report as well as previous studies (17) have implicated the vacuole as a player in heme assimilation and assuming that vacuolar heme is present in a usable form, we suggest that Abc3 is an intracellular transporter that mobilizes stores of heme from this organelle for redistribution within the cytoplasm when cells face heme/iron deprivation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Gilles Dupuis for critical reading of the manuscript and for his valuable comments. We thank Ariane Millette-St-Hilaire for excellent technical assistance. 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

T.M. planned, designed, and performed most of the experiments. V.N. produced several DNA constructs, including Abc3-GFP mutant plasmids and performed immunoblotting experiments. T.M., V.N., and S.L. analyzed data. T.M. and S.L. conceptualized research and wrote the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

3.6 REFERENCES

1. Kaplan, J., and Ward, D. M. (2013) The essential nature of iron usage and regulation. *Curr. Biol.* **23**, R642-646
2. Paul, V. D., and Lill, R. (2015) Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1528-1539
3. Philpott, C. C., Leidgens, S., and Frey, A. G. (2012) Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1509-1520
4. Severance, S., and Hamza, I. (2009) Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chem. Rev.* **109**, 4596-4616
5. 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

6. Reddi, A. R., and Hamza, I. (2016) Heme mobilization in animals: A Metallolipid's Journey. *Acc. Chem. Res.* **49**, 1104-1110
7. 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., Krause, M., and Hamza, I. (2008) Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* **453**, 1127-1131
8. White, C., Yuan, X., Schmidt, P. J., Bresciani, E., Samuel, T. K., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M. L., Lapierre, A., Ward, D. M., Liu, P., Fleming, M. D., and Hamza, I. (2013) HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metab.* **17**, 261-270
9. Huynh, C., Yuan, X., Miguel, D. C., Renberg, R. L., Protchenko, O., Philpott, C. C., Hamza, I., and Andrews, N. W. (2012) Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1. *PLoS Pathog.* **8**, e1002795
10. 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
11. 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., Frazer, D. M., Anderson, G. J., Vulpe, C. D., Simpson, R. J., and McKie, A. T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122**, 789-801
12. 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
13. Zhang, Z. N., Wu, Q. Y., Zhang, G. Z., Zhu, Y. Y., Murphy, R. W., Liu, Z., and Zou, C. G. (2015) Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in fungi. *Sci. Rep.* **5**, 13032
14. 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

15. 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
16. 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
17. 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
18. Pendrak, M. L., Chao, M. P., Yan, S. S., and Roberts, D. D. (2004) Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to alpha-biliverdin. *J. Biol. Chem.* **279**, 3426-3433
19. 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* **149**, 579-588
20. Bailao, E. F., Parente, J. A., Pigosso, L. L., de Castro, K. P., Fonseca, F. L., Silva-Bailao, M. G., Bao, S. N., Bailao, A. M., Rodrigues, M. L., Hernandez, O., McEwen, J. G., and Soares, C. M. (2014) Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides spp.* is receptor-mediated. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2856
21. Ding, C., Vidanes, G. M., Maguire, S. L., Guida, A., Synnott, J. M., Andes, D. R., and Butler, G. (2011) Conserved and divergent roles of Bcr1 and CFEM proteins in *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PloS One* **6**, e28151
22. Cadieux, B., Lian, T., Hu, G., Wang, J., Biondo, C., Teti, G., Liu, V., Murphy, M. E., 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
23. 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

24. Hu, G., Caza, M., Cadieux, B., Chan, V., Liu, V., and Kronstad, J. (2013) *Cryptococcus neoformans* requires the ESCRT protein Vps23 for iron acquisition from heme, for capsule formation, and for virulence. *Infect. Immun.* **81**, 292-302
25. 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
26. Li, L., Chen, O. S., McVey Ward, D., and Kaplan, J. (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 29515-29519
27. Ramsay, L. M., and Gadd, G. M. (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**, 293-298
28. Simm, C., Lahner, B., Salt, D., LeFurgey, A., Ingram, P., Yandell, B., and Eide, D. J. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryot. Cell* **6**, 1166-1177
29. 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
30. MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A., and Eide, D. (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**, 2845-2855
31. Rees, E. M., Lee, J., and Thiele, D. J. (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar copper transporter. *J. Biol. Chem.* **279**, 54221-54229
32. Rees, E. M., and Thiele, D. J. (2007) Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. *J. Biol. Chem.* **282**, 21629-21638
33. Singh, A., Kaur, N., and Kosman, D. J. (2007) The metalloreductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* **282**, 28619-28626
34. Urbanowski, J. L., and Piper, R. C. (1999) The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 38061-38070

35. 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
36. Sarry, J. E., Chen, S., Collum, R. P., Liang, S., Peng, M., Lang, A., Naumann, B., Dzierszynski, F., Yuan, C. X., Hippler, M., and Rea, P. A. (2007) Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* **274**, 4287-4305
37. Forsburg, S. L. (1993) Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucl. Acids Res.* **21**, 2955-2956
38. Desuzinges-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huche, 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
39. Igarashi, J., Murase, M., Iizuka, A., Pichierri, F., Martinkova, M., and Shimizu, T. (2008) Elucidation of the heme binding site of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 18782-18791
40. Ishikawa, H., Kato, M., Hori, H., Ishimori, K., Kirisako, T., Tokunaga, F., and Iwai, K. (2005) Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. *Mol. Cell* **19**, 171-181
41. Kuhl, T., Wissbrock, A., Goradia, N., Sahoo, N., Galler, K., Neugebauer, U., Popp, J., Heinemann, S. H., Ohlenschlager, O., and Imhof, D. (2013) Analysis of Fe(III) heme binding to cysteine-containing heme-regulatory motifs in proteins. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1785-1793
42. Schubert, E., Florin, N., Duthie, F., Henning Brewitz, H., Kuhl, 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
43. Yang, J., Kim, K. D., Lucas, A., Drahos, K. E., Santos, C. S., Mury, S. P., Capelluto, D. G., and Finkielstein, C. V. (2008) A novel heme-regulatory motif mediates heme-dependent degradation of the circadian factor period 2. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4697-4711

44. De Groot, P. W., Hellingwerf, K. J., and Klis, F. M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**, 781-796
45. Mayor, S., and Riezman, H. (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 110-120
46. Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M. W., and Morris, R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* **22**, 3591-3601
47. Mayor, S., Parton, R. G., and Donaldson, J. G. (2014) Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016758
48. Nichols, B. (2009) Endocytosis of lipid-anchored proteins: excluding GEECs from the crowd. *J. Cell Biol.* **186**, 457-459
49. Henne, W. M., Buchkovich, N. J., and Emr, S. D. (2011) The ESCRT pathway. *Dev. Cell* **21**, 77-91
50. Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445-452
51. Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C., and Stenmark, H. (2017) Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 42-56
52. Liu, X. M., Sun, L. L., Hu, W., Ding, Y. H., Dong, M. Q., and Du, L. L. (2015) ESCRTs Cooperate with a Selective Autophagy Receptor to Mediate Vacuolar Targeting of Soluble Cargos. *Mol. Cell* **59**, 1035-1042
53. Mizushima, N. (2015) Nbr1, a Receptor for ESCRT-Dependent Endosomal Microautophagy in Fission Yeast. *Mol. Cell* **59**, 887-889
54. 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
55. Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P., and Schuetz, J. D. (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* **279**, 24218-24225
56. Sabatinos, S. A., and Forsburg, S. L. (2010) Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **470**, 759-795

57. 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
58. 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
59. Sooksa-Nguan, T., Yakubov, B., Kozlovskyy, V. I., Barkume, C. M., Howe, K. J., Thannhauser, T. W., Rutzke, M. A., Hart, J. J., Kochian, L. V., Rea, P. A., and Vatamaniuk, O. K. (2009) Drosophila ABC transporter, DmHMT-1, confers tolerance to cadmium. DmHMT-1 and its yeast homolog, SpHMT-1, are not essential for vacuolar phytochelatin sequestration. *J. Biol. Chem.* **284**, 354-362
60. 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

FOOTNOTES

¹ The abbreviations used are: ALA, δ -aminolevulinate; bp, base pair(s); Dip, 2,2'-dipyridyl; EMM, Edinburgh minimal medium; GFP, green fluorescent protein; GPI, glycosylphosphatidylinositol; ORF, open reading frame; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI-PLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; PCR, polymerase chain reaction; WT, wild-type; YES, yeast extract plus supplements; ZnMP, zinc (II) mesoporphyrin IX.

3.7 SUPPLEMENTAL DATA

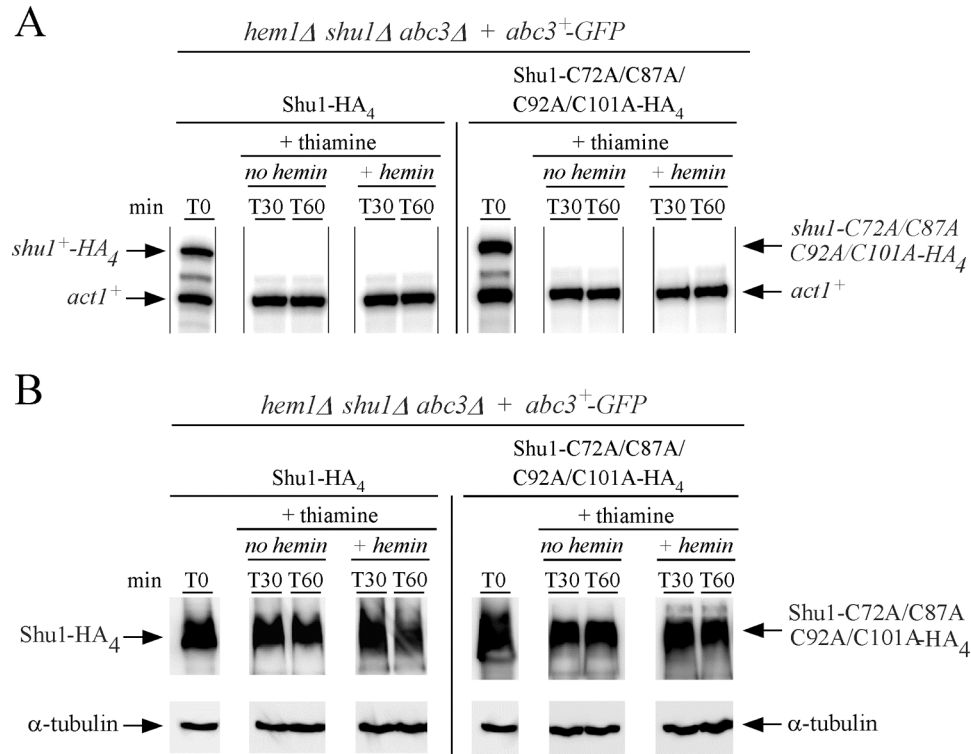


Fig. S1. Production of cellular pools of Shu1-HA₄ and Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ when their corresponding alleles are expressed under the control of the thiamine-regulatable *nmt41x* promoter.

A, Cells harboring *hem1Δ shu1Δ abc3Δ* deletions were co-transformed with pSP1*abc3⁺-GFP* + pBP*nmt41x-shu1⁺-HA₄* or pSP1*abc3⁺-GFP* + pBP*nmt41x-shu1C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄* plasmids and were grown in thiamine-free medium containing Dip (50 μ M) for 18 h. Cultures were then transferred to ALA-free and thiamine-replete medium to repress further Shu1-HA₄ or Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ protein synthesis (T0) and grown further in the presence (50 μ M) or absence of hemin for 30 (T30) and 60 (T60) min. Total RNA was prepared and used in RNase protection assays to determine *shu1⁺-HA₄*, *shu1C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄* and *act1⁺* mRNA levels. Results are representative of three independent experiments. *B*, Aliquots of the cultures described in panel A were taken at the indicated time points and whole-cell extracts were analyzed by immunoblotting. Shu1-HA₄ and Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A-HA₄ were detected using anti-HA antibody. As an internal control, total extract preparations were probed with anti- α -tubulin antibody.

DISCUSSION ET RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Les deux manuscrits utilisés pour accomplir la présente thèse de doctorat ont chacun déjà abordé plusieurs points de discussion. Cette section approfondira, dans un premier temps, les hypothèses associées à l'endocytose de Shu1 qui ont été brièvement abordées dans les publications. De plus, de nouveaux points de discussion ciblant le trafic intracellulaire de Shu1 ainsi que le mécanisme d'expulsion vacuolaire de l'hème seront traités. Enfin, la véracité du sentier d'acquisition de l'hème par Shu1 comme modèle de travail pour le développement de nouveaux antifongiques sera discutée.

4.1 La voie d'acquisition d'hème exogène par Shu1 est ubiquitinylée en réponse à un traitement en hémine

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent clairement que la levure *S. pombe* possède les composantes moléculaires requises pour assurer l'assimilation de l'hème exogène en carence de fer et survivre (Mourer et al., 2015). Dans ces conditions, le gène *shu1*⁺ est fortement exprimé lorsque la levure à fission est cultivée avec le chélateur de fer nommé le 2,2'-dipyridyl. La régulation fer-dépendante de l'expression du gène *shu1*⁺ est sous le contrôle du facteur de transcription Fep1. En effet, ce dernier se lie en *cis* sur le promoteur de *shu1*⁺ dans une région comprise entre les positions -195 et -93 par rapport au codon initiateur de la traduction (Mourer et al., 2015). Ainsi, en carence de fer, la protéine à ancre GPI Shu1 est produite, puis elle rejoint la voie de sécrétion pour se localiser au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique où elle lie directement une molécule d'hème ($K_D=2,2 \mu\text{M}$) (Mourer et al., 2015). Une souche *hem1Δ* de *S. pombe* dans laquelle la voie de biosynthèse endogène de l'hème est non fonctionnelle, est capable d'utiliser l'hème présent dans son environnement pour survivre et proliférer. Cependant la délétion du gène *shu1*⁺ génère une souche *hem1Δ shu1Δ* incapable de croître en présence d'hème ($0,075\mu\text{M}$) comme unique source de fer (Mourer et al., 2015). Cette étude génétique pointe directement du doigt la protéine Shu1 comme le tout premier récepteur d'hème identifié dans la levure à fission. Or, Shu1 est une protéine à ancre GPI qui ne possède pas de connexion directe avec le cytoplasme. Par conséquent, cette dernière pénètre par endocytose dans la cellule pour

délivrer le micronutriment dans le compartiment intracellulaire (Mourer, Normant, et Labbé 2017). Il est très bien documenté dans la littérature que l'endocytose des protéines de la membrane plasmique, ainsi que leurs trafic intracellulaire subséquent, nécessite tous deux une modification post-traductionnelle du cargo à savoir l'ubiquitinylation (Okamoto et al., 2006; Nakase et al., 2012; Foot, Henshall, et Kumar 2017). Pour clarifier l'implication de l'ubiquitine dans le sentier de nutrition hémique Shu1-dépendant, une souche *hem1Δ shu1Δ* a été réintégré avec un allèle fonctionnel *shu1⁺-HA₄*, puis mise en contact avec un chélateur de fer(2,2'-dipyridyl) pour induire l'expression de Shu1-HA₄. Suite à l'induction du récepteur d'hème, les cellules ont été traitées avec de l'hémine pour 30 minutes additionnelles. À l'issue du traitement à l'hémine, le profil d'ubiquitinylation résultant a été analysé par immunobuvardage de type western pour chacune des souches. En guise de contrôle négatif, la souche *hem1Δshu1Δ* a été réintégré avec un vecteur vide puis cultivée dans les mêmes conditions expérimentales que la souche *hem1Δshu1Δ + shu1⁺-HA₄*. Ainsi, l'analyse des différents extraits cellulaires totaux ont révélé que la présence d'hémine déclenche une forte vague d'ubiquitinylation qui affecte de nombreuses protéines de la cellule fongique. De façon inattendue, ce profil d'ubiquitinylation est également observé sur des cellules n'exprimant pas Shu1-HA₄, mais en contact avec l'hémine (Figure 1). Dans le but d'investiguer plus spécifiquement la présence d'évènements d'ubiquitinylation associés à la voie nutritionnelle de Shu1 en réponse à l'hème exogène, des expériences de pulldown avec un anticorps α -HA ont été réalisées. Les expériences d'immunoprécipitation indiquent qu'au moins 7 protéines spécifiques au sentier nutritionnel Shu1 sont ubiquitinylées à la suite du traitement à l'hémine (ronds noirs, Figure 1).

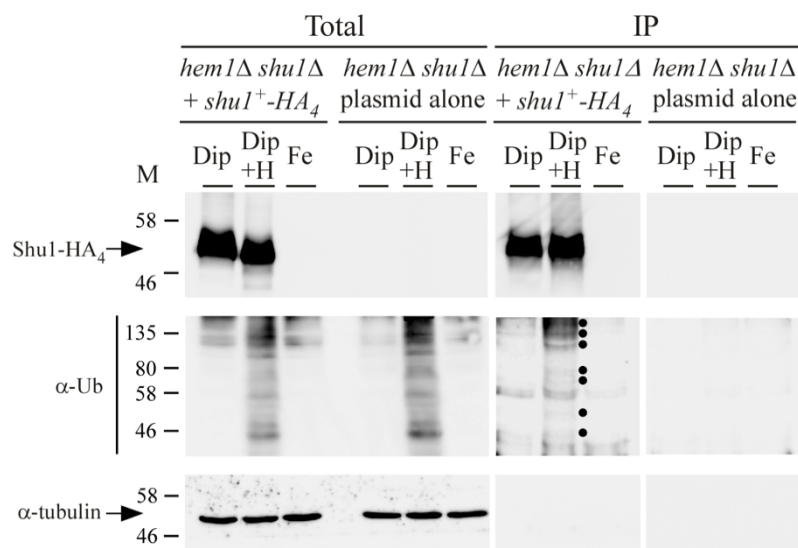


Figure 1. Les protéines associées au sentier d'acquisition de l'hème exogène par Shu1 sont ubiquitinylées en présence d'hème.

Les souches *hem1Δ shu1Δ* exprimant soit l'allèle *shu1⁺-HA₄* soit un vecteur vide ont été traitées avec du Dip (250 μM) ou du FeCl₃ (100 μM) pendant quatre heures. À la suite de ces traitements, les cultures incubées avec le Dip ont été séparées en deux et traitées ou non avec de l'hémine (50 μM) pour 30 min supplémentaires. Ensuite, les cellules ont été lysées en condition native et un aliquote de l'extrait total de chacune des conditions a été analysé. Subséquemment, la protéine Shu1 a été immunoprécipitée grâce à une résine IgG sépharose couplée à un anticorps α-HA. Finalement, les protéines provenant de l'extrait cellulaire brut (Total), ainsi que les protéines co-immunoprécipitées avec Shu1 (IP) ont été résolues par immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps α-HA (pour visualiser Shu1-HA₄) et α-Ub (pour visualiser les protéines ubiquitinylées). L'anticorps α-tubuline a été utilisé pour valider l'étape de fractionnement. Le marqueur moléculaire (kDa) est représenté sur la gauche de la figure (M).

Ces résultats suggèrent que l'ubiquitylation des protéines associées au mécanisme d'acquisition de l'hème par Shu1 est requise pour permettre à ce sentier nutritionnel de fonctionner. Il est à noter que 5 gènes ont le potentiel de produire le(s) donneur(s) de groupement(s) ubiquitine nécessaire à l'ubiquitylation des protéines en carence de fer et en présence d'hémine. Ainsi, les gènes *ubi1⁺*, *ubi3⁺*, *ubi5⁺* et *uep1⁺* codent tous pour des protéines engagées dans la constitution des ribosomes. La particularité des quatre polypeptides résultants est qu'ils sont tous fusionnés à un monomère d'ubiquitine (Kim et al., 2010). Lorsque les cellules eucaryotes en ont besoin, ces monomères d'ubiquitine sont clivés par des protéases spécialisées, les déubiquitinases, puis transférés sur les protéines

cibles par les ubiquitines ligases (Gemayel et al., 2017). En marge de ces 4 protéines, *S. pombe* utilise également une cinquième source d'ubiquitine matérialisée par la polyubiquitine Ubi4 (Okazaki, Okayama, et Niwa 2000). Le polypeptide Ubi4 est composé de l'enchaînement de 5 monomères d'ubiquitine et il est utilisé par la levure à fission pour l'ubiquitinylation des protéines cellulaires en réponse à plusieurs conditions de stress. D'un point de vue transcriptionnel, l'expression des gènes *ubi1⁺*, *ubi3⁺*, *ubi5⁺* et *uep1⁺* se déroule principalement au cours de la croissance exponentielle des cellules. Ces gènes sont fortement exprimés lorsque les cellules prolifèrent de façon optimales, mais ils sont fortement réprimés par une situation de stress comme le stress thermique, le stress oxydant, la phase stationnaire et le carence de zinc (MacDiarmid et al., 2016; Gemayel et al., 2017; Zhao et al., 2018). Dans ces mêmes conditions, le gène *UBI4* est quant à lui fortement induit et permet à la levure d'affronter les stress éprouvés pour survivre (Zhao et al., 2018). Chez *S. pombe*, la carence de fer est une situation de stress qui se manifeste par l'expression du récepteur d'hème Shu1. L'hypothèse que le gène *ubi4⁺* est employé par la levure à fission comme réservoir d'ubiquitine pour lutter contre la carence de fer, par l'intermédiaire de l'acquisition d'hème exogène par Shu1, est attrayante et se doit d'être explorée. Pour ce faire, la capacité d'une souche mutante *hem1Δ ubi4Δ* à acquérir de l'hémine exogène a été testée par courbe de croissance, puis comparée au contrôle positif *hem1Δ* de même qu'au contrôle négatif *hem1Δ shu1Δ*. Les résultats démontrent que la délétion du gène *ubi4⁺* a une répercussion majeure sur l'acquisition d'hémine exogène. En effet, la souche *hem1Δ ubi4Δ* a de grandes difficultés à croître en présence d'hémine et elle arbore un profil de croissance similaire à la souche *hem1Δ shu1Δ* (Figure 2). La réintégration du gène *ubi4⁺* dans un contexte *hem1Δ ubi4Δ* restaure la capacité de cette souche à acquérir de l'hème à un niveau semblable à la souche *hem1Δ* (Figure 2).

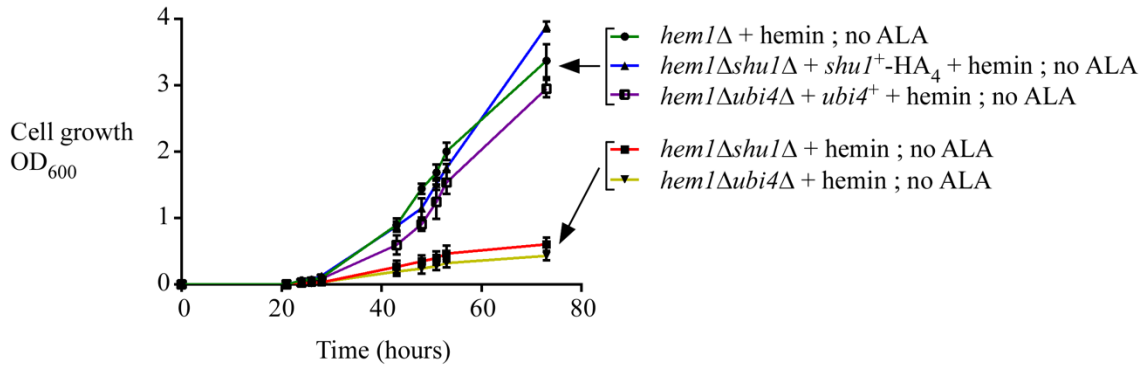


Figure 2. Les souches mutantes *hem1Δ* nécessitent la présence du gène *ubi4*⁺ pour proliférer en présence d'hémine.

La croissance cellulaire des souches indiquées a été suivie dans un milieu YES supplémenté en hémine (0,075μM), mais en absence de ALA. Le code de couleurs utilisé pour les différentes souches est le suivant : vert (*hem1Δ*) ; bleu (*hem1Δshu1Δ* + *shu1*⁺-HA₄) ; violet (*hem1Δubi4Δ* + *ubi4*⁺) ; rouge (*hem1Δshu1Δ*) ; ou (*hem1Δubi4Δ*).

Ainsi, les groupements ubiquitines fournis par la polyubiquitine Ubi4 sont indispensables pour la nutrition hémique Shu1-dépendante. Tenant compte du fait que la protéine Shu1 transite de la membrane plasmique vers les vacuoles, l'ubiquitine peut intervenir à différents stades dans le processus d'endocytose et de relocalisation vacuolaire du complexe Shu1-hème. La place potentiellement occupée par le groupement ubiquitine dans le sentier d'acquisition de l'hème par Shu1 sera discutée dans la section suivante.

4.2 L'endocytose de la protéine Shu1 dans le compartiment intracellulaire

4.2.1 Le franchissement de la membrane plasmique par la protéine Shu1

Dans le but d'élucider le devenir de la protéine Shu1 suite à sa liaison avec une molécule d'hème nous avons entrepris une série de travaux visant à suivre par immunofluorescence un « pool » de protéine Shu1-HA₄. Pour ce faire, nous avons placé *shu1*⁺-HA₄ sous le contrôle du promoteur inductible *nmt41x*, dont l'activité est dictée par la présence ou l'absence de thiamine. Par conséquent, en présence de thiamine le promoteur *nmt41x* est réprimé, tandis qu'en absence de thiamine ce promoteur est actif en permettant la transcription de l'allèle *shu1*⁺-HA₄ et la production de la protéine Shu1-HA₄. Suite à la formation du « pool » de

Shu1-HA₄ à la surface de *S. pombe*, la néo-synthèse de ce récepteur d'hème a été stoppée par ajout de la thiamine et les cellules traitées avec un excès d'hémine ou non. Les résultats révèlent que Shu1-HA₄ reste localisé à la membrane plasmique pour autant que l'hémine n'est pas mise en contact avec les cellules fongiques. Cependant, en présence d'hémine Shu1-HA₄ subit une relocalisation de la membrane plasmique en direction des vacuoles (Mourer, Normant, et Labbé 2017). De manière frappante, une version mutante de la protéine Shu1 dans laquelle les quatre cystéines du domaine de liaison à l'hème sont substituées par des alanines reste localisée à la membrane plasmique et ce, même en présence d'hémine dans le milieu. Ces résultats suggèrent que la molécule d'hème déclenche l'endocytose du récepteur Shu1 suite à la formation du complexe Shu1-hème. Le fait que Shu1 est une protéine à ancre GPI et qu'elle ne communique pas physiquement avec le cytoplasme rend le signal de l'enclenchement de son endocytose difficile à expliquer. Malgré tout, trois hypothèses décrites dans la section introduction tentent d'expliquer l'endocytose des protéines à ancre GPI. En ce qui concerne deux d'entre elles, à savoir l'endocytose par le sentier CLIC/GEEC et l'endocytose dépendante de la flotilline, aucune preuve de leurs existences dans une levure n'a été rapportée dans la littérature à l'heure actuelle. Ainsi l'implication de ces deux modes d'endocytose pour expliquer l'internalisation de Shu1 dans le milieu intracellulaire en réponse à l'hémine est purement spéculative. Dans ce contexte, l'interaction latérale de Shu1 avec une protéine résidente de la membrane plasmique qui possède des domaines cytoplasmiques prend de plus en plus d'importance. Pour explorer cette hypothèse, des expériences de spectrométrie de masse ont été entreprises. Une souche *hem1Δ shu1Δ* a été transformée avec l'allèle *shu1⁺-HA₄* ou un vecteur vide utilisé comme contrôle négatif. Les souches résultantes ont été traitées avec du Dip (250 μM) ou du fer (100 μM) sur une période de 4h. À l'issue du traitement, la moitié des cellules traitées en Dip ont été incubées avec de l'hémine (50 μM) pour 30 min additionnelles. Les extraits protéiques provenant de chacune des souches ont été immunoprécipités avec une résine couplée à un anticorps α-HA. Les partenaires d'interaction pertinents de Shu1 identifiés par spectrométrie de masse en tandem sont résumés dans la table 1.

	<i>hem1Δshu1Δ</i> + <i>shu1+-HA4</i>			<i>hem1Δshu1Δ</i> + VV			
Nom du gène	Dip	Dip + hème	Fer	Dip + hème	Fonction moléculaire	Localisation	Ubiquitine
Dnf2	0,00E+00	7,17E+07	0,00E+00	0,00E+00	Translocase de Phospholipide	Membrane plasmique	non prédite
Amt2	0,00E+00	6,06E+06	0,00E+00	0,00E+00	Transporteur d'ammonium	Membrane plasmique	K470 et K498

Table 1. Partenaires d'interaction potentiels de Shu1 à la membrane plasmique en réponse à l'hémine.

L'intensité relative à la présence des peptides Dnf2 et Amt2 est indiquée pour chacun des traitements dans les deux contextes génétiques étudiés. La fonction moléculaire ainsi que la localisation cellulaire de Dnf2 et de Amt2 sont indiquées dans la colonne correspondante. Enfin, les sites d'ubiquitylation prédits sont indiqués pour les deux protéines d'après les simulations du prédicteur d'ubiquitylation UbPred (<http://www.ubpred.org/>) (Radivojac et al., 2010).

Les analyses de spectrométrie de masse en tandem ont identifié 72 partenaires protéiques potentiels de Shu1 en présence d'hémine. Parmi ceux-ci, seules deux protéines de la membrane plasmique ont été identifiées, à savoir Dnf2 et Amt2. Il est à noter que les protéines Dnf2 et Amt2 possèdent chacune des boucles cytoplasmiques solubles entre les domaines transmembranaires leurs permettant ainsi de communiquer avec le cytoplasme de la cellule. De ce fait, lorsque les hypothétiques complexes Dnf2-Shu1 ou Amt2-Shu1 seraient formés à la membrane plasmique, Dnf2 et Amt2 auraient chacune la capacité de faire pénétrer Shu1 dans le compartiment intracellulaire suivant une voie d'endocytose.

Tout d'abord, Dnf2 est une phospholipide flippase de la famille des ATPase P4. Cette enzyme catalyse le transfert des phospholipides du feuillet externe de la membrane plasmique vers le feuillet interne par hydrolyse de l'ATP (Roland et al., 2019). Il est intéressant de noter que les protéines à ancre GPI sont attachées au feuillet externe de la membrane plasmique par un phospholipide dénommé le phosphatidylinositol phosphate (Muñiz et Riezman 2016). L'hypothèse selon laquelle Dnf2 interagit avec le complexe Shu1-hème pour catalyser

le transfert de ce dernier du feuillet externe de la membrane plasmique vers le feuillet interne est attrayante. En effet, à la suite de sa relocalisation dans le feuillet interne de la membrane plasmique, la portion protéique de Shu1 serait en contact avec le cytoplasme et toutes les composantes moléculaires nécessaires à son endocytose. Cette hypothèse est parfaitement conciliable avec le besoin d'ubiquitine pour permettre l'acquisition d'hème exogène par la voie nutritionnelle Shu1. En effet, d'après les prédictions d'UbPred, la lysine en position 185 de Shu1 serait ubiquitinylée avec une confiance aussi élevée que 93%. Il est connu chez les levures que l'apposition d'une marque ubiquitine sur une protéine transmembranaire est suffisante pour recruter les acteurs moléculaires nécessaires à la formation du manteau de clathrine et de la vésicule d'endocytose subséquente (Lu, Drubin, et Sun 2016). En outre, l'implication de l'endocytose médiée par la clathrine est appuyée par le fait que l'acquisition d'hème exogène chez *Cryptococcus neoformans* requiert obligatoirement la présence de clathrine dans la cellule fongique (Bairwa et al., 2019). En somme, le postulat énonçant que la liaison de l'hème à Shu1 déclenche une interaction protéique latérale avec Dnf2 pour relocaliser le complexe Shu1-hème au feuillet interne de la membrane plasmique avant son ubiquitinylation, puis son endocytose clathrine-dépendante se doit d'être approfondie plus en détails. Pour répondre à cette hypothèse, une souche *hem1Δ dnf2Δ* sera construite et sa capacité à utiliser l'hème exogène sera testée par courbe de croissance.

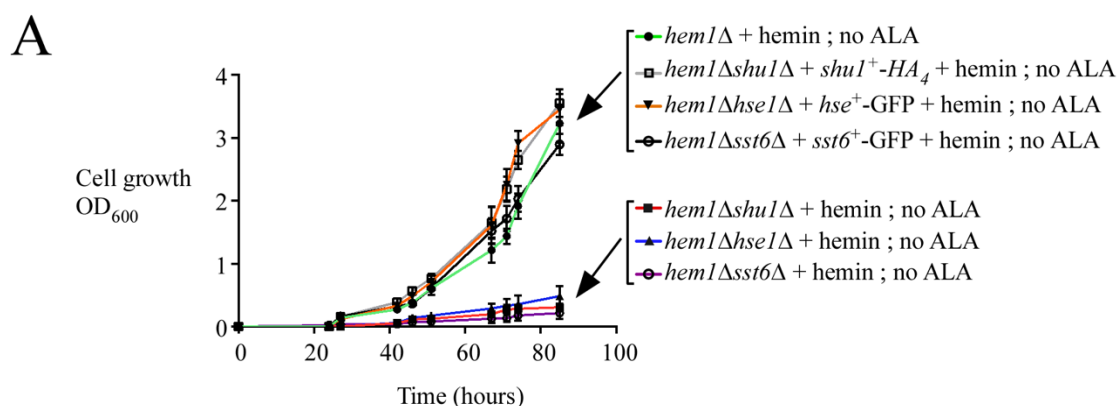
Deuxièmement, l'interaction latérale de Shu1 avec la protéine Amt2 est une piste alternative à explorer. Le gène *amt2⁺* code pour un transporteur d'ammonium à onze domaines transmembranaires qui se localise à la membrane plasmique (Mitsuzawa 2006). La protéine Amt2 possède 5 boucles intracellulaires entre ses domaines transmembranaires ainsi qu'une longue queue C-terminale présente dans le cytoplasme de *S. pombe* (Mitsuzawa 2006). Les simulations du server UbPred prédisent 2 sites d'ubiquitinylation au sein de la queue C-terminale de Amt2. Les résidus potentiellement ubiquitinylés correspondent aux lysines 470 et 498 avec une confiance évaluée à 67% et 83%, respectivement. Ainsi, il est envisageable que la liaison de Shu1 à l'hème déclenche son interaction latérale avec Amt2. Par la suite, la protéine Amt2 via son ou ses résidu(s) ubiquitinylé(s) subit une endocytose pour pénétrer dans le compartiment intracellulaire en emmenant avec elle le complexe Shu1-hème. L'endocytose des transporteurs de nutriments ubiquitinylés présents à la membrane

plasmique de *S. pombe* est très bien connu dans la littérature. Parmi ceux-ci, l'exemple le mieux décrit concerne la perméase d'acide aminé Aat1 (Nakase et al., 2012). En effet, en carence d'azote la portion cytosolique N-terminale de Aat1 est ubiquitinylée sur les lysines 4, 18 et 26 pour déclencher son endocytose en direction des vacuoles (Nakase et al., 2012). Ainsi, l'idée de l'internalisation du complexe Shu1-hème par l'intermédiaire de Amt2 se doit d'être étudiée par des études génétiques et microscopiques pour être infirmée ou validée. Ainsi, une souche *hem1Δ amt2Δ* sera construite et analysée dans sa capacité à utiliser l'hème exogène.

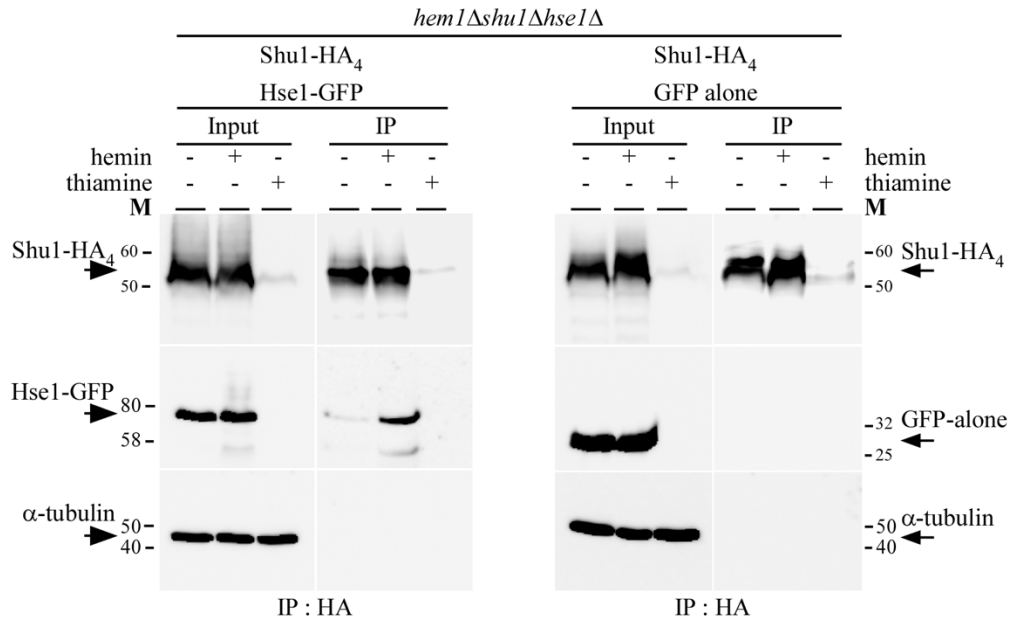
4.2.2 La relocalisation de Shu1 à la vacuole suite à son endocytose

Après son internalisation dans la cellule fongique, le complexe Shu1-hème est dirigé à la membrane vacuolaire (Mourer, Normant, et Labbé 2017). Or, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adressage de Shu1 à la vacuole suite à son endocytose ne sont pas connus. Des études génétiques réalisées chez *C. albicans* et *C. neoformans* ont pointé du doigt le rôle du complexe ESCRT dans l'utilisation de l'hémoglobine et de l'hème exogène comme sources de fer pour assurer la croissance de ces levures. En effet, la délétion des gènes *VPS22* (ESCRT-II) et *SNF7* (ESCRT-III) altère la capacité à acquérir de l'hème à partir de l'hémoglobine chez *C. albicans* (Weissman et al., 2008). De même, la délétion des gènes *VPS27* (ESCRT-0), *VPS23* (ESCRT-I), *VPS22* (ESCRT-II), *VPS20* (ESCRT-III), *SNF7* (ESCRT-III) et *VPS4* se répercute chez *C. neoformans* par un défaut d'utilisation de l'hème exogène pour croître (Hu et al., 2013, 2015). Si l'on considère également le fait que l'ubiquitine est tout aussi critique au transport d'un cargo par le complexe ESCRT qu'à l'acquisition d'hème par Shu1 dans *S. pombe*, il est plausible que le complexe Shu1-hème soit guidé à la vacuole par le complexe ESCRT. Pour vérifier cela, des essais génétiques, biochimiques et microscopiques ont été entrepris dans la levure à fission. Les résultats démontrent que les souches *hem1Δ hse1Δ* et *hem1Δ sst6Δ*, où les gènes codants pour les composantes moléculaires de ESCRT-0 et ESCRT-I, respectivement, ont été délétés sont incapables de croître en absence d'ALA et en présence d'hème (Figure 3A). La réintégration des gènes *hse1⁺* et *sst6⁺* dans les souches *hem1Δ hse1Δ* et *hem1Δ sst6Δ*, respectivement, restaure l'habilité des cellules à assimiler l'hème exogène pour croître et

survivre (Figure 3A). Après avoir validé l'implication physiologique de Hse1 et Sst6 pour la nutrition en hème via Shu1, nous avons investigué si l'interaction physique entre Shu1 et Hse1 est possible par co-immunoprécipitation. Les résultats démontrent que la protéine Hse1-GFP est co-immunoprécipitée avec Shu1-HA₄ en présence d'hémine. En contrôle négatif, aucune interaction physique n'est observée entre Shu1-HA₄ et la GFP seule à la suite du traitement avec l'hémine (Figure 3B). Ainsi, en réponse à la présence d'hémine dans l'environnement, Shu1 internalise dans la cellule par endocytose et interagit physiquement avec la protéine Hse1 (ESCRT-0). Le complexe ESCRT intervient dans la formation des ILVs à la surface des endosomes pour former le corps multivésiculaire. Il est connu que des cargos protéiques en provenance de la membrane plasmique utilisent le complexe ESCRT pour pénétrer dans le corps multivésiculaire et rejoindre la vacuole (Jones et al., 2012). L'éventualité que Shu1 emprunte le sentier ESCRT pour rejoindre la vacuole en présence d'hémine a été analysée par immunofluorescence. En l'absence des protéines Hse1 ou Sst6, les cellules de *S. pombe* sont incapables d'envoyer le complexe Shu1-hème à la membrane vacuolaire. Dans ces conditions, la majorité du signal de Shu1-HA₄ est détecté dans le cytoplasme ainsi qu'à l'intérieur de petites vésicules (Figure 3C). À l'opposé, les cellules qui possèdent Hse1 et Sst6 dirigent parfaitement le complexe Shu1-hème à la vacuole. En résumé, le récepteur d'hème Shu1 internalise dans la cellule fongique par endocytose après sa liaison à une molécule d'hème et il est ensuite dirigé à la vacuole par le complexe ESCRT.



B



C

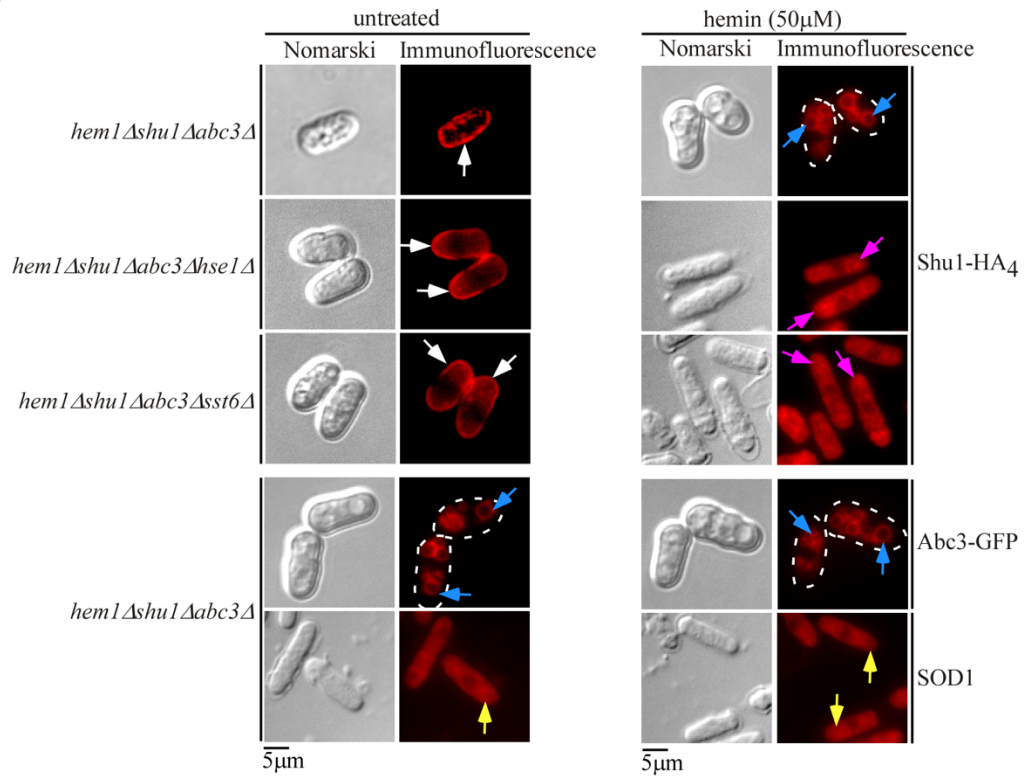


Figure 3. Shu1 utilise le complexe ESCRT pour rejoindre la vacuole après sa liaison à l'hémine.

A, la capacité des souches de levures indiquées à proliférer a été testée dans un milieu YES contenant de l'hémine (0,075µM) mais en absence de ALA. Les différentes souches sont associées au présent code de couleur : vert (*hem1Δ*) ; rouge (*hem1Δ shu1Δ*) ; gris (*hem1Δ shu1Δ + shu1⁺-HA₄*) ; orange (*hem1Δ hse1Δ + hse1⁺-GFP*) ; noir (*hem1Δ sst6Δ + sst6⁺-GFP*) ; bleu (*hem1Δ hse1Δ*) ; mauve (*hem1Δ sst6Δ*). B, les cellules *hem1Δ shu1Δ nbr1Δ* co-expriment les allèles *shu1⁺-HA₄* et *hse1⁺-GFP* ou *shu1⁺-HA₄* et *GFP* seule, tous sous le contrôle du promoteur *nmt41x*. Les souches résultantes ont été cultivées en présence ou en absence de thiamine pour 20 h. Puis, les cellules ont été traitées avec 0 ou 50 µM d'hémine. Subséquemment, les extraits cellulaires ont été incubés avec une résine protéin G-Sepharose couplée à un anticorps α-HA. Après plusieurs lavages, les fractions immunoprécipitées ont été analysées par immunobuvardage de type Western à l'aide des anticorps α-HA et α-GFP. Les marqueurs de poids moléculaires (M) sont indiqués sur la gauche et la droite du panneau. C, toutes les souches indiquées ont été co-transformées avec les allèles *nmt41xshu1⁺-HA₄* et *abc3⁺-GFP* et pré-cultivées dans un milieu contenant du ALA (200 µM) et de la thiamine (5 µM). Après plusieurs lavages, les cellules ont été incubées dans un milieu dépourvu de thiamine mais contenant du Dip (50µM) et de l'ALA (200µM) pour 18 h. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un milieu dépourvu de thiamine et de ALA, et traitées ou non avec de l'hémine pour 30 min additionnelles. Une immunofluorescence a été réalisée pour visualiser Shu1-HA₄ dans les différentes souches étudiées, ainsi que Abc3-GFP (marqueur vacuolaire) et SOD1 (marqueur cytoplasmique). Les flèches blanches indiquent la membrane plasmique, les flèches bleues montrent des signaux vacuolaires, les flèches jaunes pointent le cytoplasme, alors que les flèches mauves montrent un signal majoritairement cytoplasmique avec des vésicules.

Immédiatement après son internalisation dans le compartiment intracellulaire, Shu1 se retrouverait à l'intérieur de vésicules d'endocytose localisées dans le cytoplasme. La manière dont la protéine Shu1 est subséquemment amenée au contact du complexe ESCRT à la surface des endosomes est inconnue. Cependant, une toute nouvelle voie chargée de transférer des cargos cytoplasmiques vers les vacuoles a récemment été découverte dans la levure à fission. Cette voie est appelée le sentier NVT et elle nécessite la mise en place du complexe NVT (Liu et al., 2015). Pour ce faire, la protéine Nbr1 forme un hétérotrimère avec deux aminopeptidases Lap2 et Ape2 dans le cytoplasme. Par la suite, Nbr1 est poly-ubiquitinylé par les ubiquitines ligases Pub1 et Pub2 (Liu et al., 2015). Cette poly-ubiquitinylation de Nbr1 est obligatoire pour sa reconnaissance par le complexe ESCRT et la poursuite du sentier NVT. Ainsi, l'hétérocomplexe Nbr1-Lap2-Ape2 sera empaqueté dans les ILVs via les groupements ubiquitines de Nbr1 reconnus par la sous-unité ESCRT-0 du complexe ESCRT. Une fois dans le corps multivésiculaire, Nbr1 et ses protéines associées

seront délivrées aux vacuoles lors de la fusion des deux compartiments cellulaires (Liu et Du 2015). Après son endocytose, il se peut que Shu1 contacte le complexe NVT. De ce fait, Shu1 sera en mesure de communiquer avec le complexe ESCRT et d'atteindre la vacuole. L'invalidation du gène *nbr1*⁺ dans une souche *hem1Δ* serait informative sur la capacité de ce mutant à utiliser l'hème exogène et l'implication de Nbr1 dans la voie nutritionnelle de Shu1. De plus, une analyse par immunofluorescence devrait infirmer ou confirmer le rôle de Nbr1 dans le trafic de Shu1 à la vacuole en présence d'hème. Ces résultats sont présentement en cours dans le laboratoire avec des résultats préliminaires positifs.

4.3 Mobilisation de l'hème stocké dans la vacuole vers les autres compartiments cellulaires

La ZnMP est un analogue structural fluorescent de la molécule d'hème au sein duquel l'atome de fer a été remplacé par un atome de zinc. Cette différence de composition chimique permet à la molécule de ZnMP de fluorescer dans le rouge et d'être facilement visualisée à l'aide d'un microscope. Ainsi, les expériences de microscopie à fluorescence directe ont révélé que la ZnMP suit la même destinée que Shu1 en carence de fer. En effet, les cellules déplétées en fer accumulent en premier lieu la ZnMP (T=10 min) dans la lumière des vacuoles. Dans le cas de la souche *hem1Δshu1Δ*, aucune accumulation de ZnMP n'est observée dans les vacuoles, arguant du fait que cette accumulation vacuolaire précoce de ZnMP est dépendante de Shu1. Suite à son import par le récepteur d'hème Shu1 dans la vacuole, la ZnMP est relocalisée vers le cytoplasme dans un second temps (T=30 min). L'export vacuolaire de la ZnMP est étroitement associé à la présence du transporteur Abc3. L'observation microscopique d'une souche *hem1Δ abc3Δ* en carence de fer a révélé que la ZnMP reste emmagasinée dans la lumière vacuolaire et est incapable de quitter cette dernière. De plus, une souche ne possédant pas le transporteur Abc3 est inapte à utiliser l'hème exogène pour assurer sa croissance (Mourer, Normant, et Labbé 2017). L'étude de la séquence primaire d'Abc3 a révélé la présence du motif ¹⁵¹PC¹⁵² connu pour sa propriété à pouvoir lier la molécule d'hème (Desuzinges-Mandon et al., 2010; Mourer, Normant, et Labbé 2017). La mutation du motif ¹⁵¹PC¹⁵² phénocopie l'effet de la perte du gène *abc3*⁺ sur

l'acquisition d'hème exogène. Ainsi, une souche *hem1Δ abc3Δ + abc3-P151A/C152A* est inapte à expulser la ZnMP de la vacuole et à utiliser l'hémine pour survivre et proliférer.

En somme, lorsque le fer est rare, Shu1 lie une molécule d'hème à la surface de *S. pombe* puis l'internalise par endocytose jusqu'au compartiment vacuolaire. Ici, Abc3 contribue à l'expulsion du nutriment hémique vers le cytoplasme et potentiellement les autres organelles pour assurer l'approvisionnement en hème aux hémoprotéines vitales de la cellule (Mourer, Normant, et Labbé 2017). Cependant, d'après les connaissances mécanistiques obtenues sur les ABC transporteurs, il est peu probable que la protéine Abc3 permette à l'hème de franchir directement la membrane vacuolaire. En effet, les ABC transporteurs utilisent un mécanisme actif d'hydrolyse de l'ATP pour mobiliser leurs substrats au travers des membranes biologiques (Kapoor et al., 2018). Cette fonction moléculaire d'hydrolyse de l'ATP est assurée par deux domaines NBDs, qui se retrouveraient pour le cas précis d'Abc3, dans le cytoplasme (Pouliot et al., 2010). Par ailleurs, les domaines NBDs ne peuvent pas se situer dans le compartiment vacuolaire, où le pH acide (pH \approx 5,7) ne permet pas la réaction d'hydrolyse de l'ATP nécessaire à la fonction de transport d'Abc3 (Alberty, Smith, et Bock 1951; Diakov, Tarsio, et Kane 2013). De plus, des récentes données de biologie structurale ont démontré que les ABC transporteurs eucaryotes mobilisent leurs substrats à partir du compartiment cellulaire où sont présents les domaines NBDs vers le compartiment adjacent (Beis 2015; Ford et Beis 2019). Ainsi, selon cette prémisse, Abc3 transporterait une ou plusieurs molécules en provenance du cytoplasme vers la lumière vacuolaire. D'après ce qu'il vient d'être énoncé, est-il possible de concilier l'import vacuolaire d'un substrat par Abc3 avec son implication dans l'export de la molécule d'hème de ce même compartiment cellulaire ? Ces deux affirmations sont effectivement conciliables si une molécule de glutathion est insérée dans l'équation. Le glutathion est un tripeptide (glutamate-cystéine-glycine) retrouvé en forte concentration (>1 mM) chez tous les eucaryotes (Oestreicher et Morgan 2019). Par ailleurs, il est connu de longue date chez les organismes fongiques que le glutathion dispose d'un rôle clé dans l'homéostasie du fer (Mercier et al., 2008; Kumar et al., 2011). Tout d'abord, le glutathion peut former un complexe avec un centre [2Fe-2S] pour être expulsé de la mitochondrie par le transporteur de type ABC Atm1 chez *S. cerevisiae* (Srinivasan, Pierik, et Lill 2014). En absence de glutathion, le centre [2Fe-2S] reste séquestré

dans la mitochondrie et non-utilisable pour les besoins physiologiques de la levure (Srinivasan, Pierik, et Lill 2014). Dans un second temps, il est à noter qu'une souche *gcs1Δ* de *S. pombe* dans laquelle la production endogène de glutathion est interrompue est incapable de réguler l'expression des gènes d'acquisition et d'utilisation du fer en fonction du statut intracellulaire de cet ion métallique (Mercier et al., 2008). En marge de ces deux phénomènes moléculaires liants le glutathion à l'homéostasie du fer, nous avons testé si la délétion du gène *gcs1Δ* se répercute sur l'export vacuolaire de la ZnMP. De manière frappante, les cellules déplétées en glutathion (*gcs1Δ*) sont incapables d'expulser la ZnMP de la vacuole et présentent un phénotype de rétention vacuolaire de ZnMP similaire à la souche *hem1Δ abc3Δ* (Figure 4). L'ajout du glutathion sur les cellules *gcs1Δ* restaure l'habilité de cette souche à mobiliser la ZnMP vers le cytoplasme. Dans ces conditions, et à l'instar de la souche *hem1Δ*, la ZnMP est majoritairement retrouvé dans le cytoplasme (Figure 4).

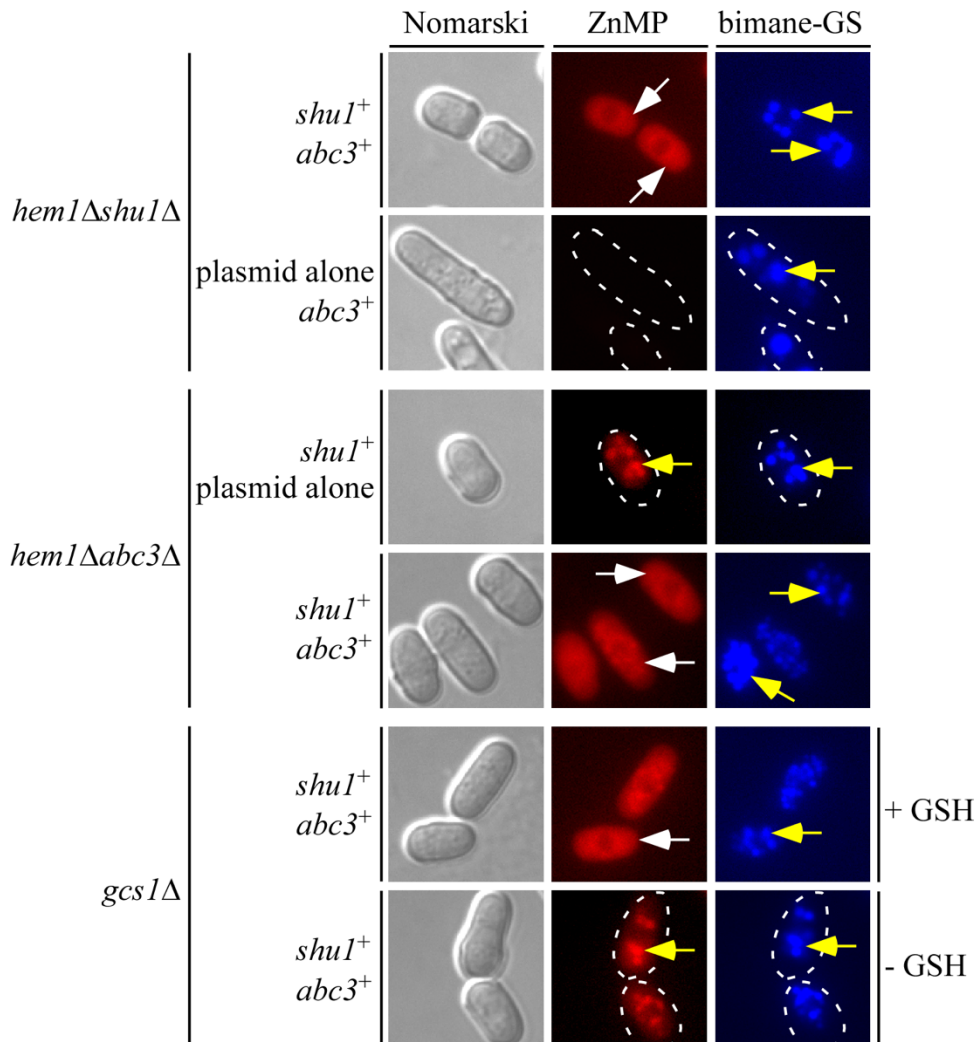


Figure 4. L'export vacuolaire de la ZnMP nécessite du glutathion.

Toutes les souches indiquées ont été pré-cultivées dans un milieu contenant du Dip (50 μ M) et supplémentées en ALA (200 μ M). Par la suite, les cellules ont été lavées et traitées en Dip (250 μ M) sur une période de 6 h. Trois heures avant la fin du traitement le Monochlorobimane (100 μ M) a été ajouté aux cultures pour marquer les vacuoles. À l'issue des 6 h de traitement en Dip, le ZnMP (2 μ M) a été ajouté aux cultures pour une durée de 30 min. Les cellules ont ensuite été analysées par microscopie à fluorescence directe pour observer l'accumulation intracellulaire de ZnMP (centre) et bimane-GS (droite). Le Nomarski (gauche) a été utilisé pour vérifier la morphologie des cellules. Les flèches jaunes indiquent des exemples de vacuoles, où le bimane-GS s'accumule, tandis que les flèches blanches correspondent à l'accumulation cytoplasmique de ZnMP.

Ces résultats confirment l'implication du glutathion dans l'export vacuolaire de la molécule d'hème. Néanmoins, le mécanisme moléculaire sous-jacent est encore très énigmatique. Une

explication rationnelle proviendrait du fait que la protéine Abc3 serait utilisée comme une plateforme pour la formation d'un complexe hème-glutathion avant que ce dernier soit expulsé de la vacuole par un transporteur de nature inconnue. Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse. (i) En premier lieu, nous avons généré la protéine de fusion Abc3-BioID2-HA₄ dans le but d'identifier les partenaires protéiques d'Abc3 en présence d'hème. BioID2 est une biotine ligase qui va biotinyler les protéines en contact intime avec Abc3 (D. I. Kim et al., 2016). Subséquemment, les protéines modifiées par un groupement biotine seront purifiées sur une résine streptavidine puis identifiées par spectrométrie de masse en tandem. Par conséquent, en présence d'hème, la glutathion S-transférase SPBC460.02c a été identifiée comme un partenaire potentiel du transporteur Abc3. Compte tenu du fait qu'il est très peu probable que la protéine Abc3 exporte des molécules provenant de la lumière vacuolaire, le précédent résultat suggère que Abc3 serait impliqué dans le transport de glutathion du cytoplasme vers la vacuole. (ii) L'analyse de la structure tertiaire de la protéine Abc3 révèle une forte proximité entre le site de liaison de l'hème et un site probable de liaison au glutathion. Ainsi l'hème lié au motif ¹⁵¹PC¹⁵² d'Abc3 serait en contact intime avec une molécule de glutathion (Figure 5).

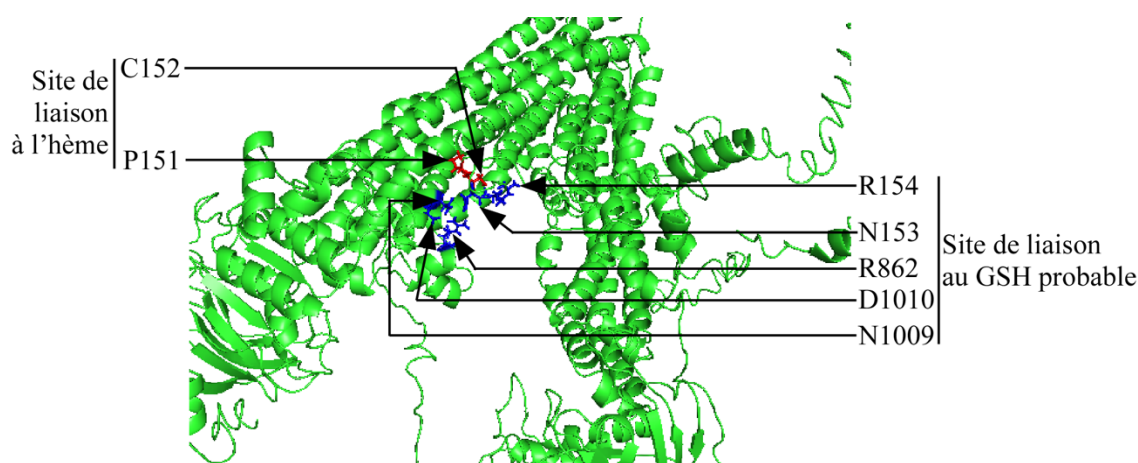


Figure 5. Proximité du motif de liaison à l'hème et du site potentiel de liaison au glutathion dans la structure de la protéine Abc3.

La structure du transporteur Abc3 a été modélisée par homologie sur le serveur I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Le site de liaison à l'hème correspondant au motif ¹⁵¹PC¹⁵² est indiqué en rouge (gauche). Les acides aminés composant le site probable de liaison au glutathion (GSH) sont indiqués en bleu. La structure de la protéine Abc3 a été visualisée sur le logiciel PyMOL.

(iii) De plus, il est très bien rapporté dans la littérature que la formation d'un complexe hème-glutathion peut se faire de manière spontanée et ne requiert pas d'activité enzymatique particulière (Sakurai, Shimomura, et Ishizu 1981). L'ensemble de ces données laisse suggérer que la protéine Abc3 importe une molécule de glutathion dans la vacuole selon un procédé nécessitant l'hydrolyse de l'ATP. Lors de son passage au travers de son transporteur, le glutathion peut s'associer à une molécule d'hème liée au motif $^{151}\text{PC}^{152}$. Ensuite, le complexe hème-glutathion est éventuellement libéré dans la lumière vacuolaire pour être pris en charge par un transporteur non identifié à ce jour. Si cette hypothèse est véridique, une souche ne possédant pas le gène *SPBC460.02c* (codant pour la glutathione S-transférase) devrait présenter un phénotype associé à un défaut d'utilisation d'hémine exogène similaire à la souche *hem1Δ shu1Δ*. En somme, la capacité d'une souche *hem1Δ SPBC460.02cΔ* à utiliser l'hémine exogène pour croître, ainsi que son habilité à extraire la ZnMP de la vacuole devraient toutes deux être explorées. Les retombés de cette étude permettront de faire la lumière sur le mécanisme d'export vacuolaire de l'hème retrouvé chez les microorganismes fongiques.

4.4 Le devenir de la molécule d'hème après son import dans *S. pombe*

4.4.1 Les sentiers d'acquisition de l'hème exogène dans la levure à fission

En carence de fer, la levure *Schizosaccharomyces pombe* déploie deux stratégies pour assurer sa nutrition hémique. La première a été très largement décrite dans la présente thèse et fait intervenir le récepteur d'hème Shu1 (Mourer et al., 2015; Mourer, Normant, et Labbé 2017). La seconde utilise le transporteur d'hème Str3 présent à la membrane plasmique (Normant, Mourer, et Labbé 2018). L'existence de deux voies d'acquisition de la molécule d'hème au sein d'un seul et unique organisme laisse en suspens la question à savoir si ces sentiers nutritionnels fonctionnent indépendamment l'un de l'autre. Ainsi en carence de fer, une souche *hem1Δ shu1Δ* dans laquelle *str3⁺* est exprimé, est capable d'utiliser l'hémine exogène pour croître (à partir de 0,15 μM) en plus d'avoir la capacité d'assimiler la ZnMP (à partir de 10 μM). Par ailleurs, une souche *hem1Δ str3Δ* dans laquelle *shu1⁺* est exprimé de manière

endogène, croît en présence d'hémine (à partir de 0,075 μM) et assimile la ZnMP (à partir de 2 μM). L'absence d'une de ces deux composantes n'affecte pas la capacité de l'autre à acquérir de l'hème pour la croissance des cellules en autant que la concentration minimum d'hème exogène se retrouve dans le milieu, soit 0,075 μM pour Shu1 et 0,15 μM pour Str3). Donc, *S. pombe* possède deux voies indépendantes d'acquisition d'hème exogène et ces voies sont actives à des affinités différentes pour l'hème.

4.4.2 Devenir de la molécule d'hème après son import dans la cellule

À la suite de son internalisation par une cellule, la molécule d'hème peut embrasser deux destinées. La première est d'être catabolisée par l'hème oxygénase pour recycler l'atome de fer présent à l'intérieur du noyau protoporphyrine IX. La seconde option est que la molécule d'hème est conservée intacte afin d'assumer son rôle de groupement prosthétique dans le site catalytique des hémoprotéines. Ainsi, le devenir de l'hème en tant que cofacteur (groupement prosthétique) ou donneur de Fe^{2+} est encore très nébuleux chez la levure à fission. Le fait que *S. pombe* ne possède aucune enzyme s'apparentant à l'hème oxygénase (basée sur les données de séquençage de son génome) suggère qu'un arrivage exogène d'hème serait utilisé principalement comme groupement prosthétique à l'intérieur de la cellule. La rupture du noyau protoporphyrine IX pour libérer le Fe^{2+} n'est en aucun cas une réaction spontanée et elle requiert l'action d'une enzyme telle l'hème oxygénase. Les hème oxygénases sont conservées chez les bactéries, les levures et les mammifères et ce, tant au niveau de leurs séquences primaires que de leurs structures (D. Kim et al., 2006; Shekhawat et Verma 2010). Jusqu'ici, l'analyse des produits polypeptidiques issus (déduts à partir des données du génome séquencé) de *S. pombe* par BLAST n'a révélé aucune protéine qui correspondrait à une hème oxygénase telle que HO-1, Hmx1, HemO, IsdG/I, ChuS, ou HmuO (Shekhawat et Verma 2010). Cette observation suggère que la levure à fission ne possède pas les composantes moléculaires nécessaires à la dégradation de l'hème et qu'elle utiliserait directement le groupement prosthétique comme cofacteur pour nourrir les hémoprotéines. Cette observation pourrait être validée expérimentalement par le biais de la souche *hem1Δ str3Δ* carencée en fer et traitée avec de l'hémine. En effet, dans ces conditions, le facteur de transcription Php4 va réprimer l'expression des gènes d'utilisation du fer comme *pcl1⁺*. Si

S. pombe possède une activité hème oxygénase, l'hème acquis par Shu1 subira une dégradation enzymatique. Les atomes de Fe^{2+} résultants seront recyclés dans les circuits métaboliques de la levure à fission et perçus par Php4 qui lèvera son inhibition sur les gènes d'utilisation du fer dont *pcl1*⁺. De ce fait, l'étude du profil transcriptionnel des gènes appartenant au régulon Php4 serait informatif sur les modalités d'utilisation de l'hème par *S. pombe*. En marge de ces expériences concentrées sur Php4, la mesure de l'activité enzymatique de protéines hème-dépendante comme la catalase serait envisageable pour corroborer les résultats obtenus avec les analyses d'expression génique.

4.4.3 Redistribution intracellulaire de la molécule d'hème

La molécule d'hème est de plus en plus perçue dans la littérature comme une molécule qui requiert un trafic intracellulaire qualifié de dynamique, et non plus seulement comme un cofacteur statique cloîtré dans le site actif des hémoprotéines (Hanna et al., 2016). Qui plus est, deux populations d'hème ont récemment été identifiées chez *S. cerevisiae*. La première fait référence à l'hème dite inerte (Hanna et al., 2016). Au sein de cette population, l'hème est associé aux hémoprotéines avec une très forte affinité et par conséquent non échangeable. En ce qui concerne les autres molécules d'hème, elles sont regroupées sous l'appellation d'hème labile et elles constituent la deuxième population d'hème présente dans les cellules. À la différence de la première population, l'hème labile est associé de manière transitoire à la chaperonne GAPDH pour être utilisée ultérieurement comme hème libre pour les hémoprotéines (Hanna et al., 2016; Sweeny et al., 2018). L'hème labile contient les molécules d'hème échangeables en provenance de sa voie de biosynthèse endogène, mais elle comprend également l'hème assimilé de l'environnement par des transporteurs spécifiques (Hanna et al., 2016; Yuan et al., 2016).

En ce qui concerne la levure à fission, l'hème est internalisé ou transporté par la protéine Shu1 ou Str3 avant d'être redistribuée éventuellement dans la cellule. La redistribution de l'hème est obligatoire pour combler les besoins des hémoprotéines. Les bases moléculaires de la redistribution de l'hème aux protéines cellulaires ne sont pas encore clairement définis. Ce point pourrait être investigué par l'utilisation d'un senseur d'hème labile fluorescent. Ce

senseur d'hème est une protéine de fusion correspondant à l'assemblage en phase de 3 polypeptides, à savoir *Cytb₅₆₂-EGFP-mKATE2* (Hanna et al., 2016). Chacun de ces polypeptides possède une fonction moléculaire bien spécifique et obligatoire à la fonction du senseur. Ainsi, le *Cytb₅₆₂* représente le récepteur de la molécule d'hème via un site de liaison impliquant une méthionine et une histidine pour la coordination axiale et distale de l'hème respectivement. L'EGFP correspond à un fluorophore vert qui travaille de concert avec le *Cytb₅₆₂* pour constituer un fluorophore sensible à la présence d'hème. En effet, lorsque le *Cytb₅₆₂* lie une molécule d'hème, il devient un accepteur de l'énergie de résonance émise par l'EGFP et vient quencher la fluorescence de ce dernier selon le principe du FRET (Hanna et al., 2016). Le polypeptide mKATE2, quant à lui, correspond à un fluorophore rouge insensible à la présence d'hème et il est employé à titre de contrôle interne. La fluorescence émise par chacun des fluorophores est mesurée, puis le ratio (fluorescence EGFP)/(fluorescence mKATE2) est utilisé pour calculer la concentration en hème dans le compartiment cellulaire désiré. Dans le cas d'une cellule carencée en hème, le *Cytb₅₆₂* est retrouvé sous sa forme *apo* et ne quench pas la fluorescence de l'EGFP. Dans ces conditions, le ratio (fluorescence EGFP)/(fluorescence mKATE2) est >1 et indique la pauvreté en hème dans la cellule fongique. Dans le cas contraire, c'est à dire en présence d'hème, le *Cytb₅₆₂* est présent sous sa forme *holo* et quench la fluorescence de l'EGFP pour aboutir à un ratio <1 qui indique la présence d'hème dans l'organelle étudiée. L'utilisation du senseur d'hème décrit ci-dessus serait pertinent pour visualiser les patrons d'assimilation de l'hème par les protéines Shu1 et Str3. Ainsi, l'utilisation des souches adéquates de *S. pombe* (*hem1Δ* ; *hem1Δshu1Δstr3Δ* ; *hem1Δshu1Δstr3Δ+shu1⁺* ; *hem1Δshu1Δstr3Δ+str3⁺*) qui expriment toutes le senseur d'hème *Cytb₅₆₂-EGFP-mKATE2* sous le contrôle du promoteur *nmt41x* permettrait de monitorer la quantité d'hème importée par les sentiers Shu1 et Str3 respectifs dans la levure à fission. En outre, de par le fait que *Cytb₅₆₂-EGFP-mKATE2* est une molécule fluorescente, les compartiments cellulaires approvisionnés en hème suite à l'assimilation de ce nutriment par Shu1 et Str3 seront identifiés par microscopie à fluorescence. De ce fait, les similarités et spécificités nutritionnelles de chacun des sentiers d'acquisition d'hème exogène seront observés. Bien que les mécanismes moléculaires permettant l'import de l'hème par Shu1 et Str3 dans *S. pombe* semblent indépendants, cette étude permettra de définir si les hémoprotéines nourries par les transporteurs d'hème sont communes ou non.

4. 5 Utilisation des sentiers de nutrition hémique pour développer de nouveaux agents antifongiques

L'utilisation des sentiers d'acquisition du fer des microorganismes pathogènes comme une nouvelle stratégie antifongique ou antibactérienne est de plus en plus discutée dans la littérature (Balhara et al., 2016; Schalk 2018). Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre les infections fongiques est une urgence sanitaire étant donné l'explosion des espèces de levure résistantes aux antifongiques classiques (Perlin, Rautemaa-Richardson, et Alastruey-Izquierdo 2017). À cause de l'importance des mécanismes d'acquisition de l'hème pour la virulence des levures pathogènes, ces derniers représentent une avenue thérapeutique à investiguer pour lutter plus efficacement contre les fongémies. En effet, une stratégie qui vise à bloquer par voie pharmacologique l'action des protéines d'acquisition de l'hème pour faire mourir la levure pathogène est très attrayante. De plus, les récepteurs d'hème présentent deux avantages majeurs : (i) ils sont localisés à la surface des levures, donc facilement accessibles par des molécules à propriétés thérapeutiques et (ii) ils ne sont pas conservés chez les mammifères, ce qui limite le risque d'effets secondaires chez les patients infectés.

Les levures *S. pombe* et *C. albicans* partagent une forte similarité tant au niveau des récepteurs d'hème qu'elles possèdent à leurs surfaces cellulaires que pour les mécanismes moléculaires sous-jacents permettant l'import de ce nutriment dans les cellules (Mourer et al., 2015; Mourer, Normant, et Labbé 2017; Nasser et al., 2016). C'est pourquoi l'utilisation de *S. pombe*, et plus particulièrement de Shu1, est justifiée pour identifier une molécule à caractère antifongique qui bloque la croissance cellulaire en inhibant la nutrition hémique. Pour ce faire, nous avons construit une librairie qui regroupe la structure de toutes les molécules organiques possédant une similarité de 80% ou plus avec l'hème. Cette librairie contient 893 molécules et chacune d'entre elles possèdent les propriétés physico-chimiques adéquates à un usage pharmacologique. En parallèle, nous avons modélisé la structure *ab initio* de Shu1 à partir du logiciel ROSETTA (Moretti et al., 2018). L'hème et les 893 composés qui lui sont similaires ont tous été utilisés pour des simulations d'arrimage

moléculaire afin de calculer le K_D théorique de ces molécules pour Shu1. Ces simulations ont été réalisées à haut débit en utilisant le Molecular Docking Server (Bikadi et Hazai 2009). La molécule d'hème a été employée ici à des fins de contrôle positif et les simulations informatiques ont évaluées son $K_D=1,73\mu\text{M}$ pour Shu1. Cette valeur est très proche du K_D expérimental ($2,2\mu\text{M}$) de ces deux composantes, ce qui accorde du crédit à ces expériences purement informatiques. Au sein de cette librairie, le composé 5329150 a attiré notre attention de par son $K_D=140,5\text{ nM}$ pour Shu1 (Figure 6).

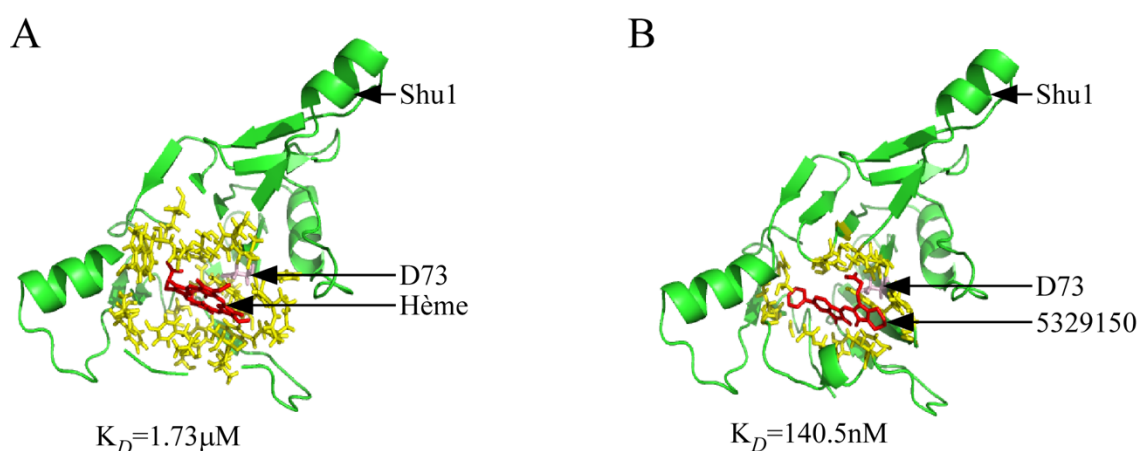


Figure 6. Liaison de très haute affinité entre la molécule 5329150 et Shu1.

A, La structure tridimensionnelle de Shu1 a été obtenue *ab initio* sur le logiciel ROSETTA à partir de sa séquence primaire en acides aminés téléchargée depuis Pombase. La librairie contenant les 893 composés organiques utilisés dans cette étude a été obtenue sur Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) en appliquant les filtres suivants : (i) similarité à 80% ou plus avec la molécule d'hème, (ii) respecter les règles de Lipinski et (iii) être commercialement disponible. Les expériences d'arrimage moléculaire à haut débit ont été réalisées sur le Molecular Docking Server (<https://www.dockingserver.com>) en utilisant la structure de Shu1 et les 893 molécules de la librairie une à une. L'arrimage moléculaire entre l'hème et Shu1, ainsi que le K_D associé à cette liaison sont montrés en exemples. La structure de Shu1 est représentée en vert, la molécule d'hème en rouge, les acides aminés intervenant dans la liaison de l'hème en jaune et la D73 en rose. B, l'arrimage moléculaire illustré ici rapporte les mêmes informations que la partie A de la figure, excepté que l'hème a été remplacé par la molécule 5329150 pour les simulations informatiques.

En effet, la molécule 5329150 possède une affinité 12,3X supérieure à l'hème pour Shu1. Pour visualiser la capacité de 5329150 à entrer en compétition avec l'hème et bloquer son

internalisation Shu1-dépendante, des essais de compétition avec la ZnMP ont été réalisés. La souche *hem1Δ shu1Δ* est capable d'internaliser la ZnMP lorsqu'elle est utilisée afin de ré-intégrer l'allèle *shu1⁺* ou les allèles qui codent pour les récepteurs d'hème Rbt5 et Pga7 de *C. albicans*. De manière frappante, l'ajout de la molécule 5329150 sur les souches ci-haut citées bloque totalement l'import de ZnMP dans les cellules, suggérant que le composé 5329150 peut inhiber le nutrition hémique et bloquer la croissance fongique (Figure 7).

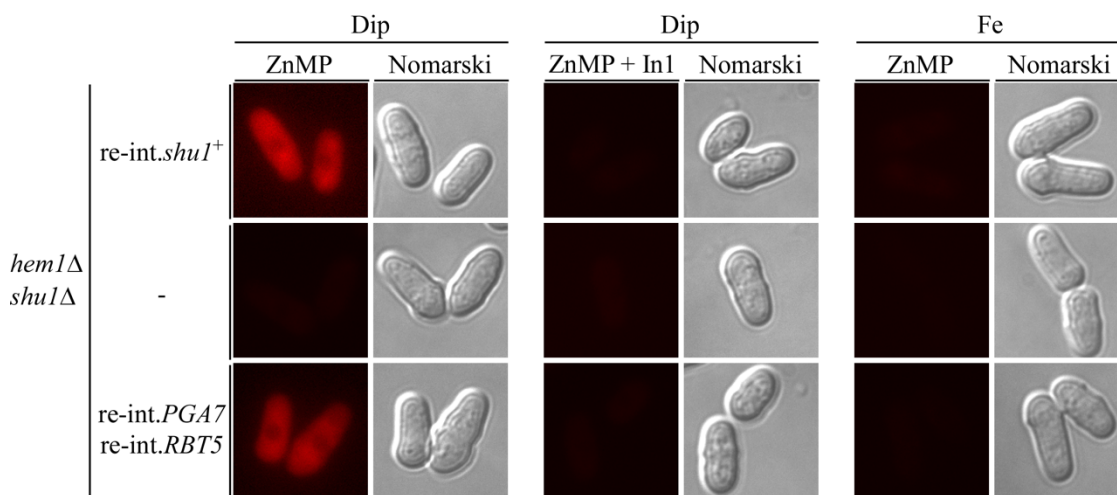


Figure 7. La molécule 5329150 inhibe l'acquisition de ZnMP chez *S. pombe*.

Les cellules *hem1Δ shu1Δ* réintégréées avec l'allèle *shu1⁺* ou les allèles *PGA7* et *RBT5*, ou un vecteur vide, ont été cultivées dans les mêmes conditions que décrites dans la légende de la Fig. 4 avec les modifications suivantes. Tout d'abord, les souches ont également été cultivées avec du fer avant leur traitement à la ZnMP et elles ont été utilisées comme contrôle négatif pour l'acquisition de ZnMP. Ensuite, l'ensemble des souches ont été traitées avec du ZnMP seul ou avec la combinaison de ZnMP + la molécule 5329150 (In1) pour une durée de 30 min. À l'issue de ces traitements, les levures ont été observées par microscopie à fluorescence pour visualiser l'incorporation intracellulaire de ZnMP.

Ceci étant dit, la molécule 5329150 semble prometteuse et sa plausible vertu antifongique nécessitera plus d'investigation. Tout d'abord, la capacité de souches *hem1Δ shu1Δ + shu1⁺-HA₄*, *hem1Δ shu1Δ* et *hem1Δ shu1Δ + RBT5* ou + *PGA7* à assimiler l'hème exogène avec et sans l'inhibiteur 5329150 sera testée par courbe de croissance. Advenant les résultats d'un effet physiologique de l'inhibiteur 5329150 sur la croissance de *S. pombe*, la capacité de cette molécule à lier les peptides Shu1, Shu1-C72A/C87A/C92A/C101A, Rbt5 et Pga7 sera testée par titration de calorimétrie isotherme. Ultimement, des essais d'atténuation de virulence de

la levure *C. albicans* seront conduits chez la souris. La souche KC645 de *C. albicans* sera injectée dans la circulation sanguine des rongeurs avec un placebo ou l'inhibiteur 5329150. La survie des animaux sera monitorée sur une durée de deux semaines (Kuznets et al., 2014). Ces résultats *in vitro* et *in vivo* permettront de juger de la véracité du composé 5329150 comme nouvelle stratégie antifongique.

CONCLUSION

Dans les prémisses de mes études doctorales, la possibilité que la levure *S. pombe* puisse utiliser la molécule d'hème exogène comme source de fer pour proliférer était purement spéculative. Mes résultats ont permis de faire la lumière sur la capacité de cette levure à assimiler l'hème présent dans son environnement, ainsi que sur les mécanismes moléculaires sous-jacents. De ce fait, la protéine Shu1 a été la toute première biomolécule décrite pour assimiler de l'hème dans la levure à fission. Shu1 est une protéine présente à la surface cellulaire et spécialisée dans l'acquisition de la molécule d'hème exogène. Au niveau de son mécanisme d'action, Shu1 subit une endocytose pour délivrer la molécule d'hème dans les vacuoles, où le transporteur Abc3 contribue à l'export de ce micronutriment vers le cytoplasme pour une éventuelle redistribution vers d'autres compartiments cellulaires. L'ensemble de mes données illustrent l'importance capitale de la protéine Shu1 pour répondre à une situation de carence de fer et permettre à la levure à fission de nourrir les hémoprotéines essentielles à sa survie. De plus, la grande conservation de ce sentier nutritionnel entre *S. pombe* et la levure pathogène *C. albicans* positionne la levure à fission comme un modèle de choix pour approfondir les connaissances sur les mécanismes d'acquisition de l'hème chez les microorganismes responsables de fongémies, et élaborer de nouvelles stratégies antifongiques.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le professeur Simon Labbé, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci d'avoir fait de moi un bien meilleur scientifique que je ne l'étais en arrivant au Québec.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui me font l'honneur de participer à l'examen de cette thèse de doctorat. Ainsi, Pr Frédéric Veyrier et Pr Steve Jean, merci d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je tiens tout particulièrement à remercier le Pr Éric Massé pour la lecture de ce document, pour tous les conseils que tu m'as donné et de m'avoir accompagné dans la recherche de mon postdoctorat.

Je tiens également à remercier le Pr Martin Bisailon en tant que mentor de doctorat. Merci d'avoir été à l'écoute sur les sujets scientifiques (et aussi non scientifiques). Ton avis éclairé m'a permis de mûrir à tous les niveaux et d'être prêt à embrasser une carrière de scientifique.

Un énorme merci pour Jean-François Jacques et Jude Beaudoin. Jean-François tu as été la personne qui m'a formé dans le laboratoire. En plus de ta bonne humeur au quotidien, tu m'as donné les armes pour réussir ce doctorat. Messire Jude beaubeaubeaubeaubeaudoiiiiiiiiiii, tes conseils au fil de ces années ont été d'un grand secours pour la réussite de mes études et pour mon installation au Québec. Merci pour ta franchise, ton aide et également pour les innombrables discussions qui ont égayé les longues journées de manips ! À vous deux, merci d'avoir été des superviseurs d'exception et je vous souhaite juste le meilleur pour le futur !

Je tiens également à remercier toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer dans le laboratoire (*alumni* et présents). Vous m'avez permis d'apprendre beaucoup sur moi-même et sur la science en général. Mes remerciements se dirige particulièrement vers Raphaël « gnocchi » Ioannoni. Berlou, que dire à part que tu as été une rencontre marquante de mon aventure en Amérique du Nord. Merci d'avoir été un super coloc et d'avoir fait de moi un épicurien (au grand dam de Marie qui ne comprend pas encore ce qu'il y'a de mauvais dans le « cooking wine »). Berlou j'ai hâte que tu me rendes visite en France pour aller déguster du vrai bon vin ! Un gros merci également à Vincent Normant, ta collaboration, tes idées, ta compagnie et ta camaraderie ont permis de passer à travers ces 6 ans de thèse sans trop d'embuches, à $2k\pi$ près. On se reprend en France !

Je tiens à remercier les personnes du PRAC qui m'ont soutenu dans la réalisation de cette thèse. Elles se reconnaîtront ! Marie-Chantal, Anne et Martin, un merci très spécial à vous, nous avons passés de très bons moments ! Gulam, thank you for your support as well as for your introduction to Bengali slang!

Oli et Jenn, je ne sais que dire à part que vous êtes deux personnes incroyables. MERCI à vous deux pour votre soutien sans failles et tous les excellents moments passés ensemble. Oli, merci d'avoir été mon fournisseur officiel d'original et de truites ! Ces années à vos côtés

ont été bien trop courtes et j'espère qu'elles ne sont que le début d'une longue amitié. Je vous souhaite le meilleur !

Merci à Kathleen et Dave, également connus sous l'appellation de Minoue et Minou. Vous êtes de super colocs. Le quotidien est bien plus fun à vos côtés et avec les amis à quatre pattes !

Je tiens tout particulièrement à remercier la communauté de Québec ville qui m'a soutenu dans cette aventure. À Sarah, et son petit homme Jule, merci pour votre camaraderie et les moments inoubliables passés à St Narcisse de Beaurivage ! Les parties de washer resteront gravées dans ma mémoire. Leo et Anne So, merci pour les nombreuses fois que vous nous avez accueilli chez vous. Merci pour les supers moments que nous avons passé ensemble ! Leo, j'espère que l'on continuera à sauver le monde sur Halo avec ton frère même si le décalage horaire ne sera pas si évident à gérer. Justin, Mathieu, Élise, Alex, c'est honneur de vous connaître.

Merci à tous les amis qu'il me reste en France. Malgré la distance et les années vous êtes toujours là. Merci aux personnes incroyables rencontrées au lycée et à l'université pour votre soutien. Matthieu, un merci spécial à toi pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je tiens à remercier tous les membres de ma famille qui m'ont permis d'aller au bout de cette thèse. Cette thèse a été marquée par des épreuves terribles. Merci à tous sans exceptions pour votre support incroyable. Merci à mon frère Cédric, à sa conjointe Cindy et ses filles Marine et Lisa. Merci à vous d'être si présent malgré la distance. Merci Cédric d'être le frère que tu es, merci d'être un modèle et un guide. J'ai hâte de vous revoir plus souvent !

Enfin, mes remerciements se tournent vers la personne qui partage ma vie depuis tant d'années maintenant. Marie, merci d'être à mes côtés et de me soutenir depuis tout ce temps maintenant. Les raisons de te remercier sont trop nombreuses pour être énoncées, mais tu es en grande partie responsable de mon épanouissement et de la personne que je suis devenue. Nous avons vécu beaucoup de choses ensemble, des bonnes comme des mauvaises, et j'ai hâte de savoir ce que la vie nous réserve pour le futur. Merci également aux membres de ta famille, sans exception aucune, pour leur sollicitude, leur présence, leur soutien et leurs attentions au fil de ces années.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abu-Farha, Mohamed, Jacques Niles, et William G. Willmore. 2005. « Erythroid-Specific 5-Aminolevulinate Synthase Protein Is Stabilized by Low Oxygen and Proteasomal Inhibition ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 83 (5): 620-30. <https://doi.org/10.1139/o05-045>.
- Alberty, Robert A., Rex M. Smith, et Robert M. Bock. 1951. « The Apparent Ionization Constants of the Adenosinephosphates and Related Compounds ». *Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 425-34.
- Antinori, Spinello, Laura Milazzo, Salvatore Sollima, Massimo Galli, et Mario Corbellino. 2016. « Candidemia and Invasive Candidiasis in Adults: A Narrative Review ». *European Journal of Internal Medicine* 34 (octobre): 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>.
- Bailão, Elisa Flávia L. C., Patrícia de Sousa Lima, Mirelle G. Silva-Bailão, Alexandre M. Bailão, Gabriel da Rocha Fernandes, Daniel J. Kosman, et Célia Maria de Almeida Soares. 2015. « Paracoccidioides Spp. Ferrous and Ferric Iron Assimilation Pathways ». *Frontiers in Microbiology* 6: 821. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00821>.
- Bailão, Elisa Flávia Luiz Cardoso, Juliana Alves Parente, Laurine Lacerda Pigosso, Kelly Pacheco de Castro, Fernanda Lopes Fonseca, Mirelle Garcia Silva-Bailão, Sônia Nair Bão, et al. 2014. « Hemoglobin Uptake by Paracoccidioides Spp. Is Receptor-Mediated ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (5): e2856. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002856>.
- Bairwa, Gaurav, Mélissa Caza, Linda Horianopoulos, Guanggan Hu, et James Kronstad. 2019. « Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in the Use of Heme and Hemoglobin by the Fungal Pathogen Cryptococcus Neoformans ». *Cellular Microbiology* 21 (3): e12961. <https://doi.org/10.1111/cmi.12961>.
- Bairwa, Gaurav, Won Hee Jung, et James W. Kronstad. 2017. « Iron Acquisition in Fungal Pathogens of Humans ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 9 (3): 215-27. <https://doi.org/10.1039/c6mt00301j>.
- Balhara, Meenakshi, Renu Chaudhary, Sonam Ruhil, Bharat Singh, Nisha Dahiya, Virinder S. Parmar, Pawan K. Jaiwal, et Anil K. Chhillar. 2016. « Siderophores; Iron Scavengers: The Novel & Promising Targets for Pathogen Specific Antifungal Therapy ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 20 (12): 1477-89. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1254196>.
- Barupala, Dulmini P., Stephen P. Dzul, Pamela Jo Riggs-Gelasco, et Timothy L. Stemmler. 2016. « Synthesis, Delivery and Regulation of Eukaryotic Heme and Fe-S Cluster Cofactors ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 592 (février): 60-75. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.01.010>.

Battistuzzi, Gianantonio, Marzia Bellei, Carlo Augusto Bortolotti, et Marco Sola. 2010. « Redox Properties of Heme Peroxidases ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500 (1): 21-36. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.002>.

Beis, Konstantinos. 2015. « Structural Basis for the Mechanism of ABC Transporters ». *Biochemical Society Transactions* 43 (5): 889-93. <https://doi.org/10.1042/BST20150047>.
Bikadi, Zsolt, et Eszter Hazai. 2009. « Application of the PM6 Semi-Empirical Method to Modeling Proteins Enhances Docking Accuracy of AutoDock ». *Journal of Cheminformatics* 1 (septembre): 15. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-1-15>.

Bitar, Dounia, Olivier Lortholary, Yann Le Strat, Javier Nicolau, Bruno Coignard, Pierre Tattevin, Didier Che, et Françoise Dromer. 2014. « Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001-2010 ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (7): 1149-55. <https://doi.org/10.3201/eid2007.140087>.

Blaby-Haas, Crysten E., et Sabeeha S. Merchant. 2013. « Iron Sparing and Recycling in a Compartmentalized Cell ». *Current Opinion in Microbiology* 16 (6): 677-85. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.019>.

Boan, Peter, et Dianne Gardam. 2019. « Epidemiology and Antifungal Susceptibility Patterns of Candidemia from a Tertiary Centre in Western Australia ». *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, avril, 1-4. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1595895>.

Brault, Ariane, Thierry Mourer, et Simon Labbé. 2015. « Molecular Basis of the Regulation of Iron Homeostasis in Fission and Filamentous Yeasts ». *IUBMB Life* 67 (11): 801-15. <https://doi.org/10.1002/iub.1441>.

Brault, Ariane, Charalampos Rallis, Vincent Normant, Jean-Michel Garant, Jürg Bähler, et Simon Labbé. 2016. « Php4 Is a Key Player for Iron Economy in Meiotic and Sporulating Cells ». *G3 (Bethesda, Md.)* 6 (10): 3077-95. <https://doi.org/10.1534/g3.116.031898>.

Braymer, Joseph J., et Roland Lill. 2017. « Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Trafficking in Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (31): 12754-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.787101>.

Burza, Sakib, Simon L. Croft, et Marleen Boelaert. 2018. « Leishmaniasis ». *Lancet (London, England)* 392 (10151): 951-70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).

Cadieux, Brigitte, Tianshun Lian, Guanggan Hu, Joyce Wang, Carmelo Biondo, Giuseppe Teti, Victor Liu, Michael E. P. Murphy, A. Louise Creagh, et James W. Kronstad. 2013. « The Mannoprotein Cig1 Supports Iron Acquisition from Heme and Virulence in the Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans* ». *The Journal of Infectious Diseases* 207 (8): 1339-47. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit029>.

Caillat, Christophe, Sourav Maity, Nolwenn Miguet, Wouter H. Roos, et Winfried Weissenhorn. 2019. « The Role of VPS4 in ESCRT-III Polymer Remodeling ». *Biochemical Society Transactions* 47 (1): 441-48. <https://doi.org/10.1042/BST20180026>.

Caro, L. H., H. Tettelin, J. H. Vossen, A. F. Ram, H. van den Ende, et F. M. Klis. 1997. « In Silico Identification of Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Plasma-Membrane and Cell Wall Proteins of *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Yeast (Chichester, England)* 13 (15): 1477-89. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199712\)13:15<1477::AID-YEA184>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199712)13:15<1477::AID-YEA184>3.0.CO;2-L).

Chen, Caiyong, Tamika K. Samuel, Michael Krause, Harry A. Dailey, et Iqbal Hamza. 2012. « Heme Utilization in the *Caenorhabditis Elegans* Hypodermal Cells Is Facilitated by Heme-Responsive Gene-2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (12): 9601-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.307694>.

Chen, Caiyong, Tamika K. Samuel, Jason Sinclair, Harry A. Dailey, et Iqbal Hamza. 2011. « An Intercellular Heme-Trafficking Protein Delivers Maternal Heme to the Embryo during Development in *C. Elegans* ». *Cell* 145 (5): 720-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.025>.

Cho, Minsu, Guanggan Hu, Mélissa Caza, Linda C. Horianopoulos, James W. Kronstad, et Won Hee Jung. 2018. « Vacuolar Zinc Transporter Zrc1 Is Required for Detoxification of Excess Intracellular Zinc in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans* ». *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 56 (1): 65-71. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7475-y>.

Choby, Jacob E., et Eric P. Skaar. 2016. « Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens ». *Journal of Molecular Biology* 428 (17): 3408-28. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.018>.

Choi, Heun, Jung Ho Kim, Hye Seong, Woonji Lee, Wooyong Jeong, Jin Young Ahn, Su Jin Jeong, et al. 2019. « Changes in the utilization patterns of antifungal agents, medical cost and clinical outcomes of candidemia from the health-care benefit expansion to include newer antifungal agents ». *International Journal of Infectious Diseases*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.03.039>.

Chung, Woo-Hyun, Kyoung-Dong Kim, et Jung-Hye Roe. 2005. « Localization and Function of Three Monothiol Glutaredoxins in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330 (2): 604-10. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.183>.

Coates, Christopher J., et Heinz Decker. 2017. « Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (2): 293-317. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2326-7>.

Conroy, Brigid S., Jason C. Grigg, Maxim Kolesnikov, L. Daniela Morales, et Michael E. P. Murphy. 2019. « *Staphylococcus Aureus* Heme and Siderophore-Iron Acquisition Pathways ». *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, mars. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00188-2>.

Czekay, R. P., T. A. Kuemmel, R. A. Orlando, et M. G. Farquhar. 2001. « Direct Binding of Occupied Urokinase Receptor (UPAR) to LDL Receptor-Related Protein Is Required for Endocytosis of UPAR and Regulation of Cell Surface Urokinase Activity ». *Molecular Biology of the Cell* 12 (5): 1467-79. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1467>.

Desuzinges-Mandon, Elodie, Ophélie Arnaud, Lorena Martinez, Frédéric Huché, Attilio Di Pietro, et Pierre Falson. 2010. « ABCG2 Transports and Transfers Heme to Albumin through Its Large Extracellular Loop ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (43): 33123-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.139170>.

Diakov, Theodore T., Maureen Tarsio, et Patricia M. Kane. 2013. « Measurement of Vacuolar and Cytosolic pH In Vivo in Yeast Cell Suspensions ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n° 74 (avril). <https://doi.org/10.3791/50261>.

Ding, Chen, Genevieve M. Vidanes, Sarah L. Maguire, Alessandro Guida, John M. Synnott, David R. Andes, et Geraldine Butler. 2011. « Conserved and Divergent Roles of Bcr1 and CFEM Proteins in Candida Parapsilosis and Candida Albicans ». *PloS One* 6 (12): e28151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028151>.

Dlouhy, Adrienne C., Jude Beaudoin, Simon Labbé, et Caryn E. Outten. 2017. « Schizosaccharomyces Pombe Grx4 Regulates the Transcriptional Repressor Php4 via [2Fe-2S] Cluster Binding ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 9 (8): 1096-1105. <https://doi.org/10.1039/c7mt00144d>.

Dolin, Hallie H., Thomas J. Papadimos, Xiaohuan Chen, et Zhixing K. Pan. 2019. « Characterization of Pathogenic Sepsis Etiologies and Patient Profiles: A Novel Approach to Triage and Treatment ». *Microbiology Insights* 12: 1178636118825081. <https://doi.org/10.1177/1178636118825081>.

Dow, Julian At. 2017. « The Essential Roles of Metal Ions in Insect Homeostasis and Physiology ». *Current Opinion in Insect Science* 23: 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.07.001>.

Dryla, Agnieszka, Dieter Gelbmann, Alexander von Gabain, et Eszter Nagy. 2003. « Identification of a Novel Iron Regulated Staphylococcal Surface Protein with Haptoglobin-Haemoglobin Binding Activity ». *Molecular Microbiology* 49 (1): 37-53.

Eisenhaber, Birgit, Stephan Eisenhaber, Toh Yew Kwang, Gerhard Grüber, et Frank Eisenhaber. 2014. « Transamidase Subunit GAA1/GPAA1 Is a M28 Family Metallo-Peptide-Synthetase That Catalyzes the Peptide Bond Formation between the Substrate Protein's Omega-Site and the GPI Lipid Anchor's Phosphoethanolamine ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 13 (12): 1912-17. <https://doi.org/10.4161/cc.28761>.

El-Sayed, Ayman, et Hideyoshi Harashima. 2013. « Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin-Dependent to Lipid Raft-Mediated Endocytosis ». *Molecular Therapy: The*

Journal of the American Society of Gene Therapy 21 (6): 1118-30.
<https://doi.org/10.1038/mt.2013.54>.

Encinar del Dedo, Javier, Natalia Gabrielli, Mercè Carmona, José Ayté, et Elena Hidalgo. 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 Genetics* 11 (3): e1005106. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005106>.

Fagerström-Billai, Fredrik, Mikaël Durand-Dubief, Karl Ekwall, et Anthony P. H. Wright. 2007. « Individual Subunits of the Ssn6-Tup11/12 Corepressor Are Selectively Required for Repression of Different Target Genes ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (3): 1069-82. <https://doi.org/10.1128/MCB.01674-06>.

Ferreira, Antonio P. A., et Emmanuel Boucrot. 2018. « Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis ». *Trends in Cell Biology* 28 (3): 188-200. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.11.004>.

Ferreira, Monica E., Kurt D. Berndt, Johan Nilsson, et Anthony P. H. Wright. 2010. « WD40 Domain Divergence Is Important for Functional Differences between the Fission Yeast Tup11 and Tup12 Co-Repressor Proteins ». *PloS One* 5 (6): e11009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011009>.

Foot, Natalie, Tanya Henshall, et Sharad Kumar. 2017. « Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins ». *Physiological Reviews* 97 (1): 253-81. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2016>.

Ford, Robert C., et Konstantinos Beis. 2019. « Learning the ABCs One at a Time: Structure and Mechanism of ABC Transporters ». *Biochemical Society Transactions* 47 (1): 23-36. <https://doi.org/10.1042/BST20180147>.

Forsburg, Susan L. 2005. « The Yeasts *Saccharomyces Cerevisiae* and *Schizosaccharomyces Pombe*: Models for Cell Biology Research ». *Gravitational and Space Biology Bulletin: Publication of the American Society for Gravitational and Space Biology* 18 (2): 3-9.

Forsburg, Susan L., et Nicholas Rhind. 2006. « Basic Methods for Fission Yeast ». *Yeast (Chichester, England)* 23 (3): 173-83. <https://doi.org/10.1002/yea.1347>.

Frieman, Matthew B., et Brendan P. Cormack. 2003a. « The ω -Site Sequence of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae* Can Determine Distribution between the Membrane and the Cell Wall ». *Molecular Microbiology* 50 (3): 883-96. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03722.x>.

Furlaneto, Márcia C., Helena P. Góes, Hugo F. Perini, Renan C. Dos Santos, et Luciana Furlaneto-Maia. 2018. « How Much Do We Know about Hemolytic Capability of Pathogenic *Candida* Species? » *Folia Microbiologica* 63 (4): 405-12. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0584-5>.

Gęgotek, Agnieszka, et Elżbieta Skrzydlewska. 2019. « Biological Effect of Protein Modifications by Lipid Peroxidation Products ». *Chemistry and Physics of Lipids* 221 (juillet): 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011>.

Gemayel, Rita, Yudi Yang, Maria C. Dzialo, Jacek Kominek, Jakob Vowinckel, Veerle Saels, Leen Van Huffel, et al. 2017. « Variable Repeats in the Eukaryotic Polyubiquitin Gene Ubi4 Modulate Proteostasis and Stress Survival ». *Nature Communications* 8 (1): 397. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00533-4>.

Glebov, Oleg O., Nicholas A. Bright, et Benjamin J. Nichols. 2006. « Flotillin-1 Defines a Clathrin-Independent Endocytic Pathway in Mammalian Cells ». *Nature Cell Biology* 8 (1): 46-54. <https://doi.org/10.1038/ncb1342>.

Grigg, Jason C., Christie L. Vermeiren, David E. Heinrichs, et Michael E. P. Murphy. 2007. « Haem Recognition by a Staphylococcus Aureus NEAT Domain ». *Molecular Microbiology* 63 (1): 139-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05502.x>.

Gulec, Sukru, Gregory J. Anderson, et James F. Collins. 2014. « Mechanistic and Regulatory Aspects of Intestinal Iron Absorption ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 307 (4): G397-409. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00348.2013>.

Hamada, K., H. Terashima, M. Arisawa, et K. Kitada. 1998. « Amino Acid Sequence Requirement for Efficient Incorporation of Glycosylphosphatidylinositol-Associated Proteins into the Cell Wall of *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26946-53. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26946>.

Hamza, Iqbal, et Harry A. Dailey. 2012. « One ring to rule them all: Trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans ». *Biochimica et biophysica acta* 1823 (9): 1617-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.009>.

Hanna, David A., Raven M. Harvey, Osiris Martinez-Guzman, Xiaojing Yuan, Bindu Chandrasekharan, Gheevarghese Raju, F. Wayne Outten, Iqbal Hamza, et Amit R. Reddi. 2016. « Heme Dynamics and Trafficking Factors Revealed by Genetically Encoded Fluorescent Heme Sensors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (27): 7539-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523802113>.

Hare, Dominic J., Alexandra Grubman, Timothy M. Ryan, Amber Lothian, Jeffrey R. Liddell, Rudolf Grimm, Toshiaki Matsuda, et al. 2013. « Profiling the Iron, Copper and Zinc Content in Primary Neuron and Astrocyte Cultures by Rapid Online Quantitative Size Exclusion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 5 (12): 1656-62. <https://doi.org/10.1039/c3mt00227f>.

Heimann, S. M., O. A. Cornely, H. Wisplinghoff, M. Kochanek, D. Stippel, S. A. Padosch, G. Langebartels, et al. 2015. « Candidemia in the Intensive Care Unit: Analysis of Direct

Treatment Costs and Clinical Outcome in Patients Treated with Echinocandins or Fluconazole ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 34 (2): 331-38. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2230-8>.

Helms, Christine C., Mark T. Gladwin, et Daniel B. Kim-Shapiro. 2018. « Erythrocytes and Vascular Function: Oxygen and Nitric Oxide ». *Frontiers in Physiology* 9 (février). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00125>.

Henne, William M., Nicholas J. Buchkovich, et Scott D. Emr. 2011. « The ESCRT Pathway ». *Developmental Cell* 21 (1): 77-91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>.

Henne, William Mike, Harald Stenmark, et Scott D. Emr. 2013. « Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016766>.

Hoffman, Charles S., Valerie Wood, et Peter A. Fantes. 2015. « An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System ». *Genetics* 201 (2): 403-23. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181503>.

Hu, Guanggan, Mélissa Caza, Brigitte Cadieux, Erik Bakkeren, Eunsoo Do, Won Hee Jung, et James W. Kronstad. 2015. « The Endosomal Sorting Complex Required for Transport Machinery Influences Haem Uptake and Capsule Elaboration in *Cryptococcus Neoformans* ». *Molecular Microbiology* 96 (5): 973-92. <https://doi.org/10.1111/mmi.12985>.

Hu, Guanggan, Mélissa Caza, Brigitte Cadieux, Vivienne Chan, Victor Liu, et James Kronstad. 2013. « *Cryptococcus Neoformans* Requires the ESCRT Protein Vps23 for Iron Acquisition from Heme, for Capsule Formation, and for Virulence ». *Infection and Immunity* 81 (1): 292-302. <https://doi.org/10.1128/IAI.01037-12>.

Hurley, James H. 2010. « The ESCRT Complexes ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45 (6): 463-87. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.502516>.

Huynh, Chau, et Norma W. Andrews. 2008. « Iron Acquisition within Host Cells and the Pathogenicity of *Leishmania* ». *Cellular Microbiology* 10 (2): 293-300. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01095.x>.

Huynh, Chau, Xiaojing Yuan, Danilo C. Miguel, Rebecca L. Renberg, Olga Protchenko, Caroline C. Philpott, Iqbal Hamza, et Norma W. Andrews. 2012. « Heme Uptake by *Leishmania Amazonensis* Is Mediated by the Transmembrane Protein LHR1 ». *PLoS Pathogens* 8 (7): e1002795. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002795>.

Igarashi, Kazuhiko, et Miki Watanabe-Matsui. 2014. « Wearing Red for Signaling: The Heme-Bach Axis in Heme Metabolism, Oxidative Stress Response and Iron Immunology ». *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 232 (4): 229-53.

Ikushiro, Hiroko, Atsushi Nagami, Tomoko Takai, Taiki Sawai, Yuki Shimeno, Hiroshi Hori, Ikuko Miyahara, Nobuo Kamiya, et Takato Yano. 2018. « Heme-Dependent Inactivation of

5-Aminolevulinate Synthase from *Caulobacter Crescentus* ». *Scientific Reports* 8 (1): 14228. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32591-z>.

Jacques, Jean-François, Alexandre Mercier, Ariane Brault, Thierry Mourer, et Simon Labbé. 2014. « Fra2 Is a Co-Regulator of Fep1 Inhibition in Response to Iron Starvation ». *PloS One* 9 (6): e98959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098959>.

Jaffe, Eileen K. 2003. « An Unusual Phylogenetic Variation in the Metal Ion Binding Sites of Porphobilinogen Synthase ». *Chemistry & Biology* 10 (1): 25-34.

Jbel, Mehdi, Alexandre Mercier, et Simon Labbé. 2011. « Grx4 Monothiol Glutaredoxin Is Required for Iron Limitation-Dependent Inhibition of Fep1 ». *Eukaryotic Cell* 10 (5): 629-45. <https://doi.org/10.1128/EC.00015-11>.

Jbel, Mehdi, Alexandre Mercier, Benoit Pelletier, Jude Beaudoin, et Simon Labbé. 2009. « Iron Activates in Vivo DNA Binding of *Schizosaccharomyces Pombe* Transcription Factor Fep1 through Its Amino-Terminal Region ». *Eukaryotic Cell* 8 (4): 649-64. <https://doi.org/10.1128/EC.00001-09>.

Jean, Steve, Sarah Cox, Sonya Nassari, et Amy A Kiger. 2015. « Starvation-induced MTMR13 and RAB21 activity regulates VAMP8 to promote autophagosome–lysosome fusion ». *EMBO Reports* 16 (3): 297-311. <https://doi.org/10.15252/embr.201439464>.

Jones, Charles B., Elizabeth M. Ott, Justin M. Keener, Matt Curtiss, Virginie Sandrin, et Markus Babst. 2012. « Regulation of Membrane Protein Degradation by Starvation-Response Pathways ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (3): 468-82. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01314.x>.

Johnson, Deborah C., Dennis R. Dean, Archer D. Smith, et Michael K. Johnson. 2005. « Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters ». *Annual Review of Biochemistry* 74: 247-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518>.

Kalia, Manjula, Sudha Kumari, Rahul Chadda, Michelle M. Hill, Robert G. Parton, et Satyajit Mayor. 2006. « Arf6-Independent GPI-Anchored Protein-Enriched Early Endosomal Compartments Fuse with Sorting Endosomes via a Rab5/Phosphatidylinositol-3'-Kinase-Dependent Machinery ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (8): 3689-3704. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-10-0980>.

Khan, Md Gulam Musawwir, Jean-François Jacques, Jude Beaudoin, et Simon Labbé. 2014. « Characterization of the Nuclear Import Mechanism of the CCAAT-Regulatory Subunit Php4 ». *PloS One* 9 (10): e110721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110721>.

Kapoor, Parth, Aaron J. Horsey, Megan H. Cox, et Ian D. Kerr. 2018. « ABCG2: Does Resolving Its Structure Elucidate the Mechanism? » *Biochemical Society Transactions* 46 (6): 1485-94. <https://doi.org/10.1042/BST20180145>.

Kikuchi, G., et N. Hayashi. 1981. « Regulation by Heme of Synthesis and Intracellular Translocation of Delta-Aminolevulinic Synthase in the Liver ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 37 (1): 27-41.

Kim, Dae In, Samuel C. Jensen, Kyle A. Noble, Birendra Kc, Kenneth H. Roux, Khatereh Motamedchaboki, et Kyle J. Roux. 2016. « An Improved Smaller Biotin Ligase for BioID Proximity Labeling ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (8): 1188-96. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0844>.

Kim, Donghak, Erik T. Yukl, Pierre Moënne-Loccoz, et Paul R. Ortiz de Montellano. 2006. « Fungal Heme Oxygenases: Functional Expression and Characterization of Hmx1 from *Saccharomyces Cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida Albicans* ». *Biochemistry* 45 (49): 14772-80. <https://doi.org/10.1021/bi061429r>.

Kim, Dong-Uk, Jacqueline Hayles, Dongsup Kim, Valerie Wood, Han-Oh Park, Misun Won, Hyang-Sook Yoo, et al. 2010. « Analysis of a Genome-Wide Set of Gene Deletions in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Nature Biotechnology* 28 (6): 617-23. <https://doi.org/10.1038/nbt.1628>.

Kim, Hyo-Jin, Kang-Lok Lee, Kyoung-Dong Kim, et Jung-Hye Roe. 2016. « The Iron Uptake Repressor Fep1 in the Fission Yeast Binds Fe-S Cluster through Conserved Cysteines ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478 (1): 187-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.070>.

Kim, Sungjin, Devarshi S. Selote, et Olena K. Vatamaniuk. 2010. « The N-Terminal Extension Domain of the *C. Elegans* Half-Molecule ABC Transporter, HMT-1, Is Required for Protein-Protein Interactions and Function ». *PloS One* 5 (9): e12938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012938>.

Kim, Sungjin, Anuj K. Sharma, et Olena K. Vatamaniuk. 2018. « N-Terminal Extension and C-Terminal Domains Are Required for ABCB6/HMT-1 Protein Interactions, Function in Cadmium Detoxification, and Localization to the Endosomal-Recycling System in *Caenorhabditis Elegans* ». *Frontiers in Physiology* 9: 885. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00885>.

Kinoshita, Taroh, et Morihisa Fujita. 2016. « Biosynthesis of GPI-Anchored Proteins: Special Emphasis on GPI Lipid Remodeling ». *Journal of Lipid Research* 57 (1): 6-24. <https://doi.org/10.1194/jlr.R063313>.

Knutson, Mitchell D. 2017. « Iron Transport Proteins: Gateways of Cellular and Systemic Iron Homeostasis ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (31): 12735-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.786632>.

Komath, Sneha Sudha, Sneh Lata Singh, Vavilala A. Pratyusha, et Sudisht Kumar Sah. 2018. « Generating Anchors Only to Lose Them: The Unusual Story of Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthesis and Remodeling in Yeast and Fungi ».

IUBMB Life 70 (5): 355-83. <https://doi.org/10.1002/iub.1734>.

Koppenol, W. H. 2001. « The Haber-Weiss Cycle--70 Years Later ». *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 6 (4): 229-34. <https://doi.org/10.1179/135100001101536373>.

Kornmann, Benoît, Christof Osman, et Peter Walter. 2011. « The Conserved GTPase Gem1 Regulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Connections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (34): 14151-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111314108>.

Korolnek, Tamara, et Iqbal Hamza. 2014. « Like Iron in the Blood of the People: The Requirement for Heme Trafficking in Iron Metabolism ». *Frontiers in Pharmacology* 5: 126. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00126>.

Korolnek, Tamara, Jianbing Zhang, Simon Beardsley, George L. Scheffer, et Iqbal Hamza. 2014. « Control of Metazoan Heme Homeostasis by a Conserved Multidrug Resistance Protein ». *Cell Metabolism* 19 (6): 1008-19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.030>.

Kosman, Daniel J. 2013. « Iron Metabolism in Aerobes: Managing Ferric Iron Hydrolysis and Ferrous Iron Autoxidation ». *Coordination Chemistry Reviews* 257 (1): 210-17. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.030>.

Kulkarni, Resham D., Hemant S. Kelkar, et Ralph A. Dean. 2003. « An Eight-Cysteine-Containing CFEM Domain Unique to a Group of Fungal Membrane Proteins ». *Trends in Biochemical Sciences* 28 (3): 118-21. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00025-2).

Kumar, Chitranshu, Aeid Igbaria, Benoît D'Autreaux, Anne-Gaëlle Planson, Christophe Junot, Emmanuel Godat, Anand K. Bachhawat, Agnès Delaunay-Moisan, et Michel B. Toledano. 2011. « Glutathione Revisited: A Vital Function in Iron Metabolism and Ancillary Role in Thiol-Redox Control ». *The EMBO Journal* 30 (10): 2044-56. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.105>.

Kuznets, Galit, Elena Vigonsky, Ziva Weissman, Daniela Lalli, Tsvia Gildor, Sarah J. Kauffman, Paola Turano, Jeffrey Becker, Oded Lewinson, et Daniel Kornitzer. 2014. « A Relay Network of Extracellular Heme-Binding Proteins Drives *C. Albicans* Iron Acquisition from Hemoglobin ». *PLoS Pathogens* 10 (10): e1004407. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004407>.

La, A., T. Nguyen, K. Tran, E. Sauble, D. Tu, A. Gonzalez, T. Z. Kidane, et al. 2018. « Mobilization of Iron from Ferritin: New Steps and Details ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 10 (1): 154-68. <https://doi.org/10.1039/c7mt00284j>.

Labbé, Simon, Md Gulam Musawwir Khan, et Jean-François Jacques. 2013. « Iron Uptake and Regulation in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Current Opinion in Microbiology* 16 (6): 669-76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.007>.

Labbé, Simon, Benoit Pelletier, et Alexandre Mercier. 2007. « Iron Homeostasis in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 20 (3-4): 523-37. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9056-5>.

Laidlaw, Kamilla M. E., et Chris MacDonald. 2018. « Endosomal Trafficking of Yeast Membrane Proteins ». *Biochemical Society Transactions* 46 (6): 1551-58. <https://doi.org/10.1042/BST20180258>.

Lakhan, Shaheen E., Shefali Sabharanjak, et Ananya De. 2009. « Endocytosis of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins ». *Journal of Biomedical Science* 16 (octobre): 93. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-93>.

Lakshminarayan, Ramya, Christian Wunder, Ulrike Becken, Mark T. Howes, Carola Benzing, Senthil Arumugam, Susanne Sales, et al. 2014. « Galectin-3 Drives Glycosphingolipid-Dependent Biogenesis of Clathrin-Independent Carriers ». *Nature Cell Biology* 16 (6): 595-606. <https://doi.org/10.1038/ncb2970>.

Larsen, Rasmus, Zélia Gouveia, Miguel P. Soares, et Raffaella Gozzelino. 2012. « Heme Cytotoxicity and the Pathogenesis of Immune-Mediated Inflammatory Diseases ». *Frontiers in Pharmacology* 3: 77. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00077>.

Li, Haoran, et Caryn E. Outten. 2012. « Monothiol CGFS Glutaredoxins and BolA-like Proteins: [2Fe-2S] Binding Partners in Iron Homeostasis ». *Biochemistry* 51 (22): 4377-89. <https://doi.org/10.1021/bi300393z>.

Li, L., O. S. Chen, D. McVey Ward, et J. Kaplan. 2001. « CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (31): 29515-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103944200>.

Li, Liangtao, Jerry Kaplan, et Diane M. Ward. 2017. « The glucose sensor Snf1 and the transcription factors Msn2 and Msn4 regulate transcription of the vacuolar iron importer gene CCC1 and iron resistance in yeast ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (37): 15577-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802504>.

Li, Liangtao, Chris D Vulpe, et Jerry Kaplan. 2003. « Functional studies of hephaestin in yeast: evidence for multicopper oxidase activity in the endocytic pathway. » *Biochemical Journal* 375 (Pt 3): 793-98. <https://doi.org/10.1042/BJ20030866>.

Li, Liangtao, et Diane M. Ward. 2018. « Iron toxicity in yeast: transcriptional regulation of the vacuolar iron importer Ccc1 ». *Current genetics* 64 (2): 413-16. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0767-7>.

Li, Ting, Herbert L. Bonkovsky, et Jun-tao Guo. 2011. « Structural Analysis of Heme Proteins: Implications for Design and Prediction ». *BMC Structural Biology* 11 (mars): 13.

<https://doi.org/10.1186/1472-6807-11-13>.

Lin, Ying-Wu, Elizabeth B. Sawyer, et Jiangyun Wang. 2013. « Rational Heme Protein Design: All Roads Lead to Rome ». *Chemistry, an Asian Journal* 8 (11): 2534-44. <https://doi.org/10.1002/asia.201300291>.

Liu, Xiao-Man, et Li-Lin Du. 2015. « A selective autophagy pathway takes an unconventional route ». *Autophagy* 11 (12): 2381-82. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1110669>.

Liu, Xiao-Man, Ling-Ling Sun, Wen Hu, Yue-He Ding, Meng-Qiu Dong, et Li-Lin Du. 2015. « ESCRTs Cooperate with a Selective Autophagy Receptor to Mediate Vacuolar Targeting of Soluble Cargos ». *Molecular Cell* 59 (6): 1035-42. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.034>.

Lock, Antonia, Kim Rutherford, Midori A. Harris, Jacqueline Hayles, Stephen G. Oliver, Jürg Bähler, et Valerie Wood. 2019. « PomBase 2018: User-Driven Reimplementation of the Fission Yeast Database Provides Rapid and Intuitive Access to Diverse, Interconnected Information ». *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D821-27. <https://doi.org/10.1093/nar/gky961>.

Lock, Antonia, Kim Rutherford, Midori A. Harris, et Valerie Wood. 2018. « PomBase: The Scientific Resource for Fission Yeast ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1757: 49-68. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7737-6_4.

Loon, Barbara van, Enni Markkanen, et Ulrich Hübscher. 2010. « Oxygen as a Friend and Enemy: How to Combat the Mutational Potential of 8-Oxo-Guanine ». *DNA Repair* 9 (6): 604-16. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.03.004>.

Lu, Rebecca, David G. Drubin, et Yidi Sun. 2016. « Clathrin-Mediated Endocytosis in Budding Yeast at a Glance ». *Journal of Cell Science* 129 (8): 1531-36. <https://doi.org/10.1242/jcs.182303>.

MacDiarmid, Colin W., Janet Taggart, Jeeyon Jeong, Kittikhun Kerdsomboon, et David J. Eide. 2016. « Activation of the Yeast UBI4 Polyubiquitin Gene by Zap1 Transcription Factor via an Intragenic Promoter Is Critical for Zinc-Deficient Growth ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (36): 18880-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.743120>.

Magill, Shelley S., Jonathan R. Edwards, Wendy Bamberg, Zintars G. Beldavs, Ghinwa Dumyati, Marion A. Kainer, Ruth Lynfield, et al. 2014. « Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections ». *The New England Journal of Medicine* 370 (13): 1198-1208. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306801>.

Malmirchegini, G. Reza, Megan Sjodt, Sergey Shnitkind, Michael R. Sawaya, Justin Rosinski, Salet M. Newton, Phillip E. Klebba, et Robert T. Clubb. 2014. « Novel Mechanism of Hemin Capture by Hbp2, the Hemoglobin-Binding Hemophore from *Listeria*

Monocytogenes ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34886-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583013>.

Marvig, Rasmus Lykke, Søren Damkiær, S. M. Hossein Khademi, Trine M. Markussen, Søren Molin, et Lars Jelsbak. 2014. « Within-Host Evolution of *Pseudomonas Aeruginosa* Reveals Adaptation toward Iron Acquisition from Hemoglobin ». *MBio* 5 (3): e00966-00914. <https://doi.org/10.1128/mBio.00966-14>.

Matsui, Toshitaka, Shusuke Nambu, Yukari Ono, Celia W. Goulding, Kouhei Tsumoto, et Masao Ikeda-Saito. 2013. « Heme Degradation by *Staphylococcus Aureus* IsdG and IsdI Liberates Formaldehyde Rather than Carbon Monoxide ». *Biochemistry* 52 (18): 3025-27. <https://doi.org/10.1021/bi400382p>.

Matsuyama, Akihisa, Ritsuko Arai, Yoko Yashiroda, Atsuko Shirai, Ayako Kamata, Shigeko Sekido, Yumiko Kobayashi, et al. 2006. « ORFeome Cloning and Global Analysis of Protein Localization in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Nature Biotechnology* 24 (7): 841-47. <https://doi.org/10.1038/nbt1222>.

Meister, Melanie, et Ritva Tikkanen. 2014. « Endocytic Trafficking of Membrane-Bound Cargo: A Flotillin Point of View ». *Membranes* 4 (3): 356-71. <https://doi.org/10.3390/membranes4030356>.

Mercier, Alexandre, et Simon Labbé. 2009. « Both Php4 Function and Subcellular Localization Are Regulated by Iron via a Multistep Mechanism Involving the Glutaredoxin Grx4 and the Exportin Crm1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (30): 20249-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009563>.

Mercier, Alexandre et Simon Labbé. 2010. « Iron-Dependent Remodeling of Fungal Metabolic Pathways Associated with Ferrichrome Biosynthesis ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (12): 3806-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00659-10>.

Mercier, Alexandre, Benoit Pelletier, et Simon Labbé. 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 (11): 1866-81. <https://doi.org/10.1128/EC.00199-06>.

Mercier, Alexandre, Stephen Watt, Jürg Bähler, et Simon Labbé. 2008. « Key Function for the CCAAT-Binding Factor Php4 to Regulate Gene Expression in Response to Iron Deficiency in Fission Yeast ». *Eukaryotic Cell* 7 (3): 493-508. <https://doi.org/10.1128/EC.00446-07>.

Mercurio, Sonia, Sara Petrillo, Deborah Chiabrando, Zuni Irma Bassi, Dafne Gays, Annalisa Camporeale, Andrei Vacaru, et al. 2015. « The Heme Exporter Flvcr1 Regulates Expansion and Differentiation of Committed Erythroid Progenitors by Controlling Intracellular Heme Accumulation ». *Haematologica* 100 (6): 720-29. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.114488>.

Migliano, Simona M., et David Teis. 2018. «ESCRT and Membrane Protein Ubiquitination». *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 57: 107-35. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96704-2_4.

Miguel, Danilo C., Andrew R. Flannery, Bidyottam Mitra, et Norma W. Andrews. 2013. «Heme Uptake Mediated by LHR1 Is Essential for Leishmania Amazonensis Virulence». *Infection and Immunity* 81 (10): 3620-26. <https://doi.org/10.1128/IAI.00687-13>.

Mirzoyan, Zhasmine, Manuela Sollazzo, Mariateresa Allocca, Alice Maria Valenza, Daniela Grifoni, et Paola Bellosta. 2019. «Drosophila melanogaster: A Model Organism to Study Cancer». *Frontiers in Genetics* 10 (mars). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>.

Mitsuzawa, Hiroshi. 2006. «Ammonium Transporter Genes in the Fission Yeast Schizosaccharomyces Pombe: Role in Ammonium Uptake and a Morphological Transition». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 11 (10): 1183-95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.01014.x>.

Moretti, Rocco, Sergey Lyskov, Rhiju Das, Jens Meiler, et Jeffrey J. Gray. 2018. «Web-Accessible Molecular Modeling with Rosetta: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE)». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 27 (1): 259-68. <https://doi.org/10.1002/pro.3313>.

Morgan, Juliette, Martin I. Meltzer, Brian D. Plikaytis, Andre N. Sofair, Sharon Huie-White, Steven Wilcox, Lee H. Harrison, Eric C. Seaberg, Rana A. Hajjeh, et Steven M. Teutsch. 2005. «Excess Mortality, Hospital Stay, and Cost Due to Candidemia: A Case-Control Study Using Data from Population-Based Candidemia Surveillance». *Infection Control and Hospital Epidemiology* 26 (6): 540-47. <https://doi.org/10.1086/502581>.

Mourer, Thierry, Jean-François Jacques, Ariane Brault, Martin Bisailon, et Simon Labbé. 2015. «Shu1 Is a Cell-Surface Protein Involved in Iron Acquisition from Heme in Schizosaccharomyces Pombe». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (16): 10176-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642058>.

Mourer, Thierry, Vincent Normant, et Simon Labbé. 2017. «Heme Assimilation in Schizosaccharomyces Pombe Requires Cell-Surface-Anchored Protein Shu1 and Vacuolar Transporter Abc3». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (12): 4898-4912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.776807>.

Mouriño, Susana, Bennett J. Giardina, Hermes Reyes-Caballero, et Angela Wilks. 2016. «Metabolite-Driven Regulation of Heme Uptake by the Biliverdin IX β / δ -Selective Heme Oxygenase (HemO) of Pseudomonas Aeruginosa». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (39): 20503-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.728527>.

Muñiz, Manuel, et Howard Riezman. 2016. «Trafficking of Glycosylphosphatidylinositol Anchored Proteins from the Endoplasmic Reticulum to the Cell Surface». *Journal of Lipid*

Research 57 (3): 352-60. <https://doi.org/10.1194/jlr.R062760>.

Nakase, Mai, Yukiko Nakase, Soracom Chardwiriyaapreecha, Yoshimi Kakinuma, Tomohiro Matsumoto, et Kaoru Takegawa. 2012. « Intracellular Trafficking and Ubiquitination of the Schizosaccharomyces Pombe Amino Acid Permease Aat1p ». *Microbiology (Reading, England)* 158 (Pt 3): 659-73. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053389-0>.

Nasser, Lena, Ziva Weissman, Mariel Pinsky, Hadar Amartely, Hay Dvir, et Daniel Kornitzer. 2016. « Structural Basis of Haem-Iron Acquisition by Fungal Pathogens ». *Nature Microbiology* 1 (11): 16156. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.156>.

Nevitt, Tracy, et Dennis J. Thiele. 2011. « Host Iron Withholding Demands Siderophore Utilization for Candida Glabrata to Survive Macrophage Killing ». *PLoS Pathogens* 7 (3): e1001322. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001322>.

Nigon, Victor Marc, et Marie-Anne Félix. 2017. « History of Research on C. Elegans and Other Free-Living Nematodes as Model Organisms ». *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology* 2017: 1-84. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.181.1>.

Normant, Vincent, Thierry Mourer, et Simon Labbé. 2018. « The Major Facilitator Transporter Str3 Is Required for Low-Affinity Heme Acquisition in Schizosaccharomyces Pombe ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (17): 6349-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002132>.

Ochsner, U. A., Z. Johnson, et M. L. Vasil. 2000. « Genetics and Regulation of Two Distinct Haem-Uptake Systems, Phu and Has, in Pseudomonas Aeruginosa ». *Microbiology (Reading, England)* 146 (Pt1) (janvier): 185-98. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-185>.

Oestreicher, Julian, et Bruce Morgan. 2019. « Glutathione: Subcellular Distribution and Membrane Transport 1 ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 97 (3): 270-89. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0189>.

Okamoto, Michiyo, Takehiko Yoko-o, Mariko Umemura, Ken-Ichi Nakayama, et Yoshifumi Jigami. 2006. « Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins Are Required for the Transport of Detergent-Resistant Microdomain-Associated Membrane Proteins Tat2p and Fur4p ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (7): 4013-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504684200>.

Okamoto-Shibayama, Kazuko, Yuichiro Kikuchi, Eitoyo Kokubu, Yutaka Sato, et Kazuyuki Ishihara. 2014. « Csa2, a Member of the Rbt5 Protein Family, Is Involved in the Utilization of Iron from Human Hemoglobin during Candida Albicans Hyphal Growth ». *FEMS Yeast Research* 14 (4): 674-77. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12160>.

Okazaki, K., H. Okayama, et O. Niwa. 2000. « The Polyubiquitin Gene Is Essential for Meiosis in Fission Yeast ». *Experimental Cell Research* 254 (1): 143-52.

<https://doi.org/10.1006/excr.1999.4728>.

Okazaki, Yasumasa, et Jonathan Glass. 2017. « Protoporphyrin IX regulates peripheral benzodiazepine receptor associated protein 7 (PAP7) and divalent metal transporter 1 (DMT1) in K562 cells ». *Biochemistry and Biophysics Reports* 10 (février): 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.007>.

O'Neill, Maura J., Mehul N. Bhakta, Karen G. Fleming, et Angela Wilks. 2012. « Induced Fit on Heme Binding to the Pseudomonas Aeruginosa Cytoplasmic Protein (PhuS) Drives Interaction with Heme Oxygenase (HemO) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (15): 5639-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121549109>.

Orlean, Peter, et Anant K. Menon. 2007. « Thematic Review Series: Lipid Posttranslational Modifications. GPI Anchoring of Protein in Yeast and Mammalian Cells, or: How We Learned to Stop Worrying and Love Glycophospholipids ». *Journal of Lipid Research* 48 (5): 993-1011. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700002-JLR200>.

Paez Valencia, Julio, Kaija Goodman, et Marisa S. Otegui. 2016. « Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants ». *Annual Review of Plant Biology* 67: 309-35. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112242>.

Pal, Arun, Belinda S. Hall, Darren N. Nesbeth, Helen I. Field, et Mark C. Field. 2002. « Differential Endocytic Functions of Trypanosoma Brucei Rab5 Isoforms Reveal a Glycosylphosphatidylinositol-Specific Endosomal Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (11): 9529-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110055200>.

Patel, Meghna, et D. V. S. S. Ramavataram. 2012. « Non Transferrin Bound Iron: Nature, Manifestations and Analytical Approaches for Estimation ». *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB* 27 (4): 322-32. <https://doi.org/10.1007/s12291-012-0250-7>.

Pelletier, Benoit, Jude Beaudoin, Yukio Mukai, et Simon Labbé. 2002. « Fep1, an Iron Sensor Regulating Iron Transporter Gene Expression in Schizosaccharomyces Pombe ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (25): 22950-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202682200>.

Pelletier, Benoit, Jude Beaudoin, Caroline C. Philpott, et Simon Labbé. 2003. « Fep1 Represses Expression of the Fission Yeast Schizosaccharomyces Pombe Siderophore-Iron Transport System ». *Nucleic Acids Research* 31 (15): 4332-44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg647>.

Pérez-Mejías, Gonzalo, Alejandra Guerra-Castellano, Antonio Díaz-Quintana, Miguel A. De la Rosa, et Irene Díaz-Moreno. 2019. « Cytochrome c: Surfing Off of the Mitochondrial Membrane on the Tops of Complexes III and IV ». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17 (mai): 654-60. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.05.002>.

- Perlin, David S., Riina Rautemaa-Richardson, et Ana Alastruey-Izquierdo. 2017. « The Global Problem of Antifungal Resistance: Prevalence, Mechanisms, and Management ». *The Lancet. Infectious Diseases* 17 (12): e383-92. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X).
- Petrungaro, Carmelina, et Benoît Kornmann. 2019. « Lipid Exchange at ER-Mitochondria Contact Sites: A Puzzle Falling into Place with Quite a Few Pieces Missing ». *Current Opinion in Cell Biology* 57 (avril): 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.11.005>.
- Pfaller, Michael A., Gary J. Moet, Shawn A. Messer, Ronald N. Jones, et Mariana Castanheira. 2011. « Geographic Variations in Species Distribution and Echinocandin and Azole Antifungal Resistance Rates among Candida Bloodstream Infection Isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009) ». *Journal of Clinical Microbiology* 49 (1): 396-99. <https://doi.org/10.1128/JCM.01398-10>.
- Philpott, Caroline C., Sébastien Leidgens, et Avery G. Frey. 2012. « Metabolic Remodeling in Iron-Deficient Fungi ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1823 (9): 1509-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.012>.
- Philpott, Caroline C., et Olga Protchenko. 2008. « Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Eukaryotic Cell* 7 (1): 20-27. <https://doi.org/10.1128/EC.00354-07>.
- Pierleoni, Andrea, Pier Luigi Martelli, et Rita Casadio. 2008. « PredGPI: A GPI-Anchor Predictor ». *BMC Bioinformatics* 9 (septembre): 392. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-392>.
- Pishchany, Gleb, Jessica R. Sheldon, Claire F. Dickson, Md Tauqeer Alam, Timothy D. Read, David A. Gell, David E. Heinrichs, et Eric P. Skaar. 2014. « IsdB-Dependent Hemoglobin Binding Is Required for Acquisition of Heme by *Staphylococcus Aureus* ». *The Journal of Infectious Diseases* 209 (11): 1764-72. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit817>.
- Plante, Samuel, et Simon Labbé. 2019. « Spore Germination Requires Ferrichrome Biosynthesis and the Siderophore Transporter Str1 in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Genetics* 211 (3): 893-911. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301843>.
- Portnoy, M. E., X. F. Liu, et V. C. Culotta. 2000. « *Saccharomyces Cerevisiae* Expresses Three Functionally Distinct Homologues of the Nramp Family of Metal Transporters ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (21): 7893-7902. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.21.7893-7902.2000>.
- Pouliot, Benoît, Mehdi Jbel, Alexandre Mercier, et Simon Labbé. 2010. « Abc3+ Encodes an Iron-Regulated Vacuolar ABC-Type Transporter in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Eukaryotic Cell* 9 (1): 59-73. <https://doi.org/10.1128/EC.00262-09>.

- Poulos, Thomas L. 2014. « Heme Enzyme Structure and Function ». *Chemical Reviews* 114 (7): 3919-62. <https://doi.org/10.1021/cr400415k>.
- Prasad, Rajendra, Nitesh Kumar Khandelwal, et Atanu Banerjee. 2016. « Yeast ABC Transporters in Lipid Trafficking ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 93: 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.05.008>.
- Radivojac, Predrag, Vladimir Vacic, Chad Haynes, Ross R. Cocklin, Amrita Mohan, Joshua W. Heyen, Mark G. Goebel, et Lilia M. Iakoucheva. 2010. « Identification, Analysis, and Prediction of Protein Ubiquitination Sites ». *Proteins* 78 (2): 365-80. <https://doi.org/10.1002/prot.22555>.
- Raiborg, Camilla, et Harald Stenmark. 2009. « The ESCRT Machinery in Endosomal Sorting of Ubiquitylated Membrane Proteins ». *Nature* 458 (7237): 445-52. <https://doi.org/10.1038/nature07961>.
- Rajagopal, Abhirami, Anita U. Rao, Julio Amigo, Meng Tian, Sanjeev K. Upadhyay, Caitlin Hall, Suji Uhm, et al. 2008. « Haem Homeostasis Is Regulated by the Conserved and Concerted Functions of HRG-1 Proteins ». *Nature* 453 (7198): 1127-31. <https://doi.org/10.1038/nature06934>.
- Ramos-Alonso, Lucía, Nadine Wittmaack, Isabel Mulet, Carlos A. Martínez-Garay, Josep Fita-Torró, María Jesús Lozano, Antonia M. Romero, Carlos García-Ferris, María Teresa Martínez-Pastor, et Sergi Puig. 2018. « Molecular Strategies to Increase Yeast Iron Accumulation and Resistance ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 10 (9): 1245-56. <https://doi.org/10.1039/c8mt00124c>.
- Ramsay, L. M., et G. M. Gadd. 1997. « Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae* Defective in Vacuolar Function Confirm a Role for the Vacuole in Toxic Metal Ion Detoxification ». *FEMS Microbiology Letters* 152 (2): 293-98. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10442.x>.
- Rao, Anita U., Lynn K. Carta, Emmanuel Lesuisse, et Iqbal Hamza. 2005. « Lack of Heme Synthesis in a Free-Living Eukaryote ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (12): 4270-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500877102>.
- Ratledge, C., et L. G. Dover. 2000. « Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria ». *Annual Review of Microbiology* 54: 881-941. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.881>.
- Ratledge, Colin. 2007. « Iron Metabolism and Infection ». *Food and Nutrition Bulletin* 28 (4 Suppl): S515-523. <https://doi.org/10.1177/15648265070284S405>.
- Ray, Arjun, Nidhi Jatana, et Lipi Thukral. 2017. « Lipidated Proteins: Spotlight on Protein-Membrane Binding Interfaces ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 128: 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.01.002>.

Reddi, Amit R., et Iqbal Hamza. 2016. « Heme Mobilization in Animals: A Metallolipid's Journey ». *Accounts of Chemical Research* 49 (6): 1104-10. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00553>.

Renberg, Rebecca L., Xiaojing Yuan, Tamika K. Samuel, Danilo C. Miguel, Iqbal Hamza, Norma W. Andrews, et Andrew R. Flannery. 2015. « The Heme Transport Capacity of LHR1 Determines the Extent of Virulence in *Leishmania Amazonensis* ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (5): e0003804. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003804>.

Richard, Kaylie L., Brittni R. Kelley, et Jeremiah G. Johnson. 2019. « Heme Uptake and Utilization by Gram-Negative Bacterial Pathogens ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9 (mars). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00081>.

Rietzschel, Nicole, Antonio J. Pierik, Eckhard Bill, Roland Lill, et Ulrich Mühlenhoff. 2015. « The Basic Leucine Zipper Stress Response Regulator Yap5 Senses High-Iron Conditions by Coordination of [2Fe-2S] Clusters ». *Molecular and Cellular Biology* 35 (2): 370-78. <https://doi.org/10.1128/MCB.01033-14>.

Rokob, Tibor András, Jakub Chalupský, Daniel Bím, Prokopis C. Andrikopoulos, Martin Srnc, et Lubomír Rulíšek. 2016. « Mono- and Binuclear Non-Heme Iron Chemistry from a Theoretical Perspective ». *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 21 (5-6): 619-44. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1357-8>.

Roland, Bartholomew P., Tomoki Naito, Jordan T. Best, Cayetana Arnaiz-Yépez, Hiroyuki Takatsu, Roger J. Yu, Hye-Won Shin, et Todd R. Graham. 2019. « Yeast and Human P4-ATPases Transport Glycosphingolipids Using Conserved Structural Motifs ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (6): 1794-1806. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005876>.

Sabatinos, Sarah A., et Susan L. Forsburg. 2010. « Molecular Genetics of *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Methods in Enzymology* 470: 759-95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70032-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70032-X).

Sah, Jerome Franklin, Hiroya Ito, Bala Krishna Kolli, Daniel A. Peterson, Shigeru Sassa, et Kwang-Poo Chang. 2002. « Genetic Rescue of *Leishmania* Deficiency in Porphyrin Biosynthesis Creates Mutants Suitable for Analysis of Cellular Events in Uroporphyrin and for Photodynamic Therapy ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (17): 14902-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200107200>.

Sakurai, H., S. Shimomura, et K. Ishizu. 1981. « Glutathione-Hemin Complex as a Cytochrome P-450 Model Characterization of the Complex and Its Aromatic Oxidation Activities ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 101 (4): 1102-8. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(81\)91561-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(81)91561-8).

Schalk, Isabelle J. 2018. « A Trojan-Horse Strategy Including a Bacterial Suicide Action for the Efficient Use of a Specific Gram-Positive Antibiotic on Gram-Negative Bacteria ».

Journal of Medicinal Chemistry 61 (9): 3842-44.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00522>.

Schwecke, Torsten, Kirsten Göttling, Pawel Durek, Ines Dueñas, Norbert F. Käufer, Susanne Zock-Emmenthal, Eike Staub, Torsten Neuhof, Ralf Dieckmann, et Hans von Döhren. 2006. « Nonribosomal Peptide Synthesis in *Schizosaccharomyces Pombe* and the Architectures of Ferrichrome-Type Siderophore Synthetases in Fungi ». *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 7 (4): 612-22. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500301>.

Severance, Scott, et Iqbal Hamza. 2009. « Trafficking of Heme and Porphyrins in Metazoa ». *Chemical Reviews* 109 (10): 4596-4616. <https://doi.org/10.1021/cr9001116>.

Sheldon, Jessica R., et David E. Heinrichs. 2015. « Recent Developments in Understanding the Iron Acquisition Strategies of Gram Positive Pathogens ». *FEMS Microbiology Reviews* 39 (4): 592-630. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv009>.

Shekhawat, G. S., et Kusum Verma. 2010. « Haem Oxygenase (HO): An Overlooked Enzyme of Plant Metabolism and Defence ». *Journal of Experimental Botany* 61 (9): 2255-70. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq074>.

Siam, Rania, William P. Dolan, et Susan L. Forsburg. 2004. « Choosing and Using *Schizosaccharomyces Pombe* Plasmids ». *Methods (San Diego, Calif.)* 33 (3): 189-98. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.013>.

Sinclair, Jason, et Iqbal Hamza. 2010. « A Novel Heme-Responsive Element Mediates Transcriptional Regulation in *Caenorhabditis Elegans* ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (50): 39536-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167619>.

Sinclair, Jason et Iqbal Hamza. 2015. « Lessons from Bloodless Worms: Heme Homeostasis in *C. Elegans* ». *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 28 (3): 481-89. <https://doi.org/10.1007/s10534-015-9841-0>.

Sinclair, Jason, Katherine Pinter, Tamika Samuel, Simon Beardsley, Xiaojing Yuan, Jianbing Zhang, Kevin Meng, Sijung Yun, Michael Krause, et Iqbal Hamza. 2017. « Inter-Organ Signalling by HRG-7 Promotes Systemic Haem Homeostasis ». *Nature Cell Biology* 19 (7): 799-807. <https://doi.org/10.1038/ncb3539>.

Singh, Arvinder, Navjot Kaur, et Daniel J. Kosman. 2007. « The Metalloreductase Fre6p in Fe-Efflux from the Yeast Vacuole ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (39): 28619-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703398200>.

Sjodt, Megan, Ramsay Macdonald, Joanna D. Marshall, Joseph Clayton, John S. Olson, Martin Phillips, David A. Gell, Jeff Wereszczynski, et Robert T. Clubb. 2018. « Energetics Underlying Hemin Extraction from Human Hemoglobin by *Staphylococcus Aureus* ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (18): 6942-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000803>.

Smith, Aaron D., et Angela Wilks. 2015. « Differential Contributions of the Outer Membrane Receptors PhuR and HasR to Heme Acquisition in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (12): 7756-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633495>.

Smith, Ann, et Russell J. McCulloh. 2015. « Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders ». *Frontiers in Physiology* 6 (juin). <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00187>.

Smith, Lorna J., Abdullah Kahraman, et Janet M. Thornton. 2010. « Heme Proteins--Diversity in Structural Characteristics, Function, and Folding ». *Proteins* 78 (10): 2349-68. <https://doi.org/10.1002/prot.22747>.

Soares, Miguel P., et Iqbal Hamza. 2016. « Macrophages and Iron Metabolism ». *Immunity* 44 (3): 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.016>.

Solomon, E. I., T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S. K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y. S. Yang, et J. Zhou. 2000. « Geometric and Electronic Structure/Function Correlations in Non-Heme Iron Enzymes ». *Chemical Reviews* 100 (1): 235-350.

Sorgo, Alice G., Stanley Brul, Chris G. de Koster, Leo J. de Koning, et Frans M. Klis. 2013. « Iron Restriction-Induced Adaptations in the Wall Proteome of *Candida Albicans* ». *Microbiology (Reading, England)* 159 (Pt 8): 1673-82. <https://doi.org/10.1099/mic.0.065599-0>.

Sorgo, Alice G., Clemens J. Heilmann, Henk L. Dekker, Stanley Brul, Chris G. de Koster, et Frans M. Klis. 2010. « Mass Spectrometric Analysis of the Secretome of *Candida Albicans* ». *Yeast (Chichester, England)* 27 (8): 661-72. <https://doi.org/10.1002/yea.1775>.

Spaan, Andrés N., Tamara Reyes-Robles, Cédric Badiou, Sylvie Cochet, Kristina M. Boguslawski, Pauline Yoong, Christopher J. Day, et al. 2015. « *Staphylococcus Aureus* Targets the Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) to Lyse Erythrocytes ». *Cell Host & Microbe* 18 (3): 363-70. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.08.001>.

Srinivasan, Vasundara, Antonio J. Pierik, et Roland Lill. 2014. « Crystal Structures of Nucleotide-Free and Glutathione-Bound Mitochondrial ABC Transporter Atm1 ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6175): 1137-40. <https://doi.org/10.1126/science.1246729>.

Sweeny, Elizabeth A., Anuradha Bharara Singh, Ritu Chakravarti, Osiris Martinez-Guzman, Arushi Saini, Mohammad Mahfuzul Haque, Greer Garee, et al. 2018. « Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is a Chaperone That Allocates Labile Heme in Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (37): 14557-68. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004169>.

Srivastava, Vivek Kumar, Korivi Jyothiraj Suneetha, et Rupinder Kaur. 2014. « A Systematic Analysis Reveals an Essential Role for High-Affinity Iron Uptake System, Haemolysin and

CFEM Domain-Containing Protein in Iron Homeostasis and Virulence in *Candida Glabrata* ». *The Biochemical Journal* 463 (1): 103-14. <https://doi.org/10.1042/BJ20140598>.

Sybirna, K., B. Guiard, Y. F. Li, W. G. Bao, M. Bolotin-Fukuhara, et A. Delahodde. 2005. « A New *Hansenula Polymorpha* HAP4 Homologue Which Contains Only the N-Terminal Conserved Domain of the Protein Is Fully Functional in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Current Genetics* 47 (3): 172-81. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0556-y>.

Tabares, Leandro C., Ankur Gupta, Thijs J. Aartsma, et Gerard W. Canters. 2014. « Tracking Electrons in Biological Macromolecules: From Ensemble to Single Molecule ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 19 (8): 11660-78. <https://doi.org/10.3390/molecules190811660>.

Tong, Yong, et Maolin Guo. 2009. « Bacterial Heme-Transport Proteins and Their Heme-Coordination Modes ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 481 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.10.013>.

Tsao, Sarah, Sandra Weber, Christine Cameron, Dominic Nehme, Elaheh Ahmadzadeh, et Martine Raymond. 2016. « Positive Regulation of the *Candida Albicans* Multidrug Efflux Pump Cdr1p Function by Phosphorylation of Its N-Terminal Extension ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (11): 3125-34. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw252>.

Urbanowski, J. L., et R. C. Piper. 1999. « The Iron Transporter Fth1p Forms a Complex with the Fet5 Iron Oxidase and Resides on the Vacuolar Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (53): 38061-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.38061>.

Vachon, Philippe, Alexandre Mercier, Mehdi Jbel, et Simon Labbé. 2012. « The Monothiol Glutaredoxin Grx4 Exerts an Iron-Dependent Inhibitory Effect on Php4 Function ». *Eukaryotic Cell* 11 (6): 806-19. <https://doi.org/10.1128/EC.00060-12>.

Villareal, Valerie A., Thomas Spirig, Scott A. Robson, Mengyao Liu, Benfang Lei, et Robert T. Clubb. 2011. « Transient Weak Protein-Protein Complexes Transfer Heme across the Cell Wall of *Staphylococcus Aureus* ». *Journal of the American Chemical Society* 133 (36): 14176-79. <https://doi.org/10.1021/ja203805b>.

Weinberg, E. D. 1974. « Iron and Susceptibility to Infectious Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 184 (4140): 952-56.

Weinberg, E.D. 1975. « Nutritional Immunity. Host's Attempt to Withhold Iron from Microbial Invaders ». *JAMA* 231 (1): 39-41.

Weissman, Ziva, et Daniel Kornitzer. 2004. « A Family of *Candida* Cell Surface Haem-Binding Proteins Involved in Haemin and Haemoglobin-Iron Utilization ». *Molecular Microbiology* 53 (4): 1209-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04199.x>.

Weissman, Ziva, Revital Shemer, Elizabeth Conibear, et Daniel Kornitzer. 2008. « An Endocytic Mechanism for Haemoglobin-Iron Acquisition in *Candida Albicans* ». *Molecular*

Microbiology 69 (1): 201-17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06277.x>.

Wilson, Corey J., David Apiyo, et Pernilla Wittung-Stafshede. 2004. « Role of Cofactors in Metalloprotein Folding ». *Quarterly Reviews of Biophysics; Cambridge* 37 (3-4): 285-314.
Wingert, Rebecca A., Jenna L. Galloway, Bruce Barut, Helen Foott, Paula Fraenkel, Jennifer L. Axe, Gerhard J. Weber, et al. 2005. « Deficiency of Glutaredoxin 5 Reveals Fe-S Clusters Are Required for Vertebrate Haem Synthesis ». *Nature* 436 (7053): 1035-39. <https://doi.org/10.1038/nature03887>.

Wood, V., R. Gwilliam, M.-A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, et al. 2002. « The Genome Sequence of *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Nature* 415 (6874): 871-80. <https://doi.org/10.1038/nature724>.

Wood, Valerie. 2006. « How to Get the Most from Fission Yeast Genome Data: A Report from the 2006 European Fission Yeast Meeting Computing Workshop ». *Yeast (Chichester, England)* 23 (13): 905-12. <https://doi.org/10.1002/yea.1419>.

Woodman, Philip. 2016. « ESCRT-III on Endosomes: New Functions, New Activation Pathway ». *The Biochemical Journal* 473 (2): e5-8. <https://doi.org/10.1042/BJ20151115>.
Yanagida, Mitsuhiro. 2009. « Cellular Quiescence: Are Controlling Genes Conserved? » *Trends in Cell Biology* 19 (12): 705-15. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.09.006>.

Yuan, Xiaojing, Olga Protchenko, Caroline C. Philpott, et Iqbal Hamza. 2012. « Topologically Conserved Residues Direct Heme Transport in HRG-1-Related Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (7): 4914-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.326785>.

Yuan, Xiaojing, Nicole Rietzschel, Hanna Kwon, Ana Beatriz Walter Nuno, David A. Hanna, John D. Phillips, Emma L. Raven, Amit R. Reddi, et Iqbal Hamza. 2016. « Regulation of Intracellular Heme Trafficking Revealed by Subcellular Reporters ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (35): E5144-5152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609865113>.

Zhang, Jianbing, Ian Chambers, Sijung Yun, John Phillips, Michael Krause, et Iqbal Hamza. 2018. « Hrg1 Promotes Heme-Iron Recycling during Hemolysis in the Zebrafish Kidney ». *PLoS Genetics* 14 (9): e1007665. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007665>.

Zhao, Wei, Tao Zhou, Hua-Zhen Zheng, Kun-Pei Qiu, Hong-Jing Cui, Hui Yu, et Xin-Guang Liu. 2018. « Yeast polyubiquitin gene UBI4 deficiency leads to early induction of apoptosis and shortened replicative lifespan ». *Cell Stress & Chaperones* 23 (4): 527-37. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0860-3>.

Znaidi, Sadri, Benoit Pelletier, Yukio Mukai, et Simon Labbé. 2004. « The *Schizosaccharomyces Pombe* Corepressor Tup11 Interacts with the Iron-Responsive Transcription Factor Fep1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (10): 9462-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312787200>.

Zoroddu, Maria Antonietta, Jan Aaseth, Guido Crisponi, Serenella Medici, Massimiliano Peana, et Valeria Marina Nurchi. 2019. « The Essential Metals for Humans: A Brief Overview ». *Journal of Inorganic Biochemistry* 195 (mars): 120-29. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>.