

Université de Sherbrooke

Caractérisation des transporteurs de cuivre chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*
en différenciation méiotique

Par
Samuel Plante
Département de Biochimie

Mémoire présenté à
La Faculté de médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.) en biochimie

Août 2014

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	II
LISTE DES FIGURES.....	IV
TABLEAU.....	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
RÉSUMÉ.....	VII
INTRODUCTION.....	1
1. Importance de l'homéostasie du cuivre en biologie.....	1
2. Homéostasie du cuivre chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.1. Système de transport du cuivre.....	5
2.1.1. Transporteurs de haute affinité.....	5
2.1.2. Transporteurs de faible affinité.....	10
2.1.3. Transport vacuolaire.....	11
2.2. Distribution intracellulaire des ions cuivre.....	12
2.2.1. Chaperonne CCS1 et enzyme SOD1.....	12
2.2.2. Atx1 et distribution du cuivre au sentier de sécrétion.....	15
2.2.3. Distribution du cuivre à la mitochondrie.....	17
2.3. Séquestration du cuivre par les métallothionéines.....	19
2.4. Régulation de l'apport en cuivre.....	20
2.4.1. Régulation transcriptionnelle.....	20
2.4.2. Régulation post-traductionnelle.....	21
3. Homéostasie du cuivre chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	22
3.1. Acquisition du cuivre.....	24
3.1.1. Transport du cuivre extracellulaire.....	24
3.1.2. Transport vacuolaire.....	25
3.2. Distribution intracellulaire de cuivre.....	26
3.3. Régulation des transporteurs.....	28
3.3.1. Régulation transcriptionnelle par Cuf1.....	28
3.3.2. Régulation post-traductionnelle de Ctr4 et Ctr5.....	30
4. Cuproenzymes.....	30
4.1. Amine oxydase cuivre dépendante Cao1.....	31
4.2. Superoxyde dismutase 1 SOD1.....	32
5. Place de la méiose chez les eucaryotes.....	33

6. Méiose chez <i>S. pombe</i>	35
6.1. Phases de la sporulation.....	35
6.1.1. Induction de la méiose.....	35
6.1.2. Divisions méiotiques.....	38
6.1.3. Morphogénèse des spores.....	40
6.2. Vagues d'expression méiotiques.....	42
7. Importance des ions métalliques pour la méiose.....	44
7.1. Zinc chez les oocytes murins.....	44
7.2. Importance du cuivre pour la méiose chez <i>S. pombe</i>	44
8. Objectif du projet de recherche.....	45
RÉSULTATS.....	46
ARTICLE: Characterization of the <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Ctr proteins in meiotic and sporulating cells.....	46
Résumé.....	46
Contribution.....	47
Abstract.....	48
Introduction.....	48
Experimental procedures.....	50
Results.....	53
Discussion.....	57
References.....	60
Footnotes.....	63
Figure legends.....	63
Figures.....	67
DISCUSSION.....	75
1. Activation de la transcription par Cuf1 en méiose.....	77
2. Activité de la cytochrome c oxydase durant la méiose.....	79
3. Contribution de SOD1 à la méiose.....	82
4. Rôle des métalloréductases dans l'homéostasie du cuivre.....	85
5. Homéostasie du cuivre au cours de la germination.....	87
REMERCIEMENTS.....	91
RÉFÉRENCES.....	92

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. Modèle d'acquisition et de distribution du Cu chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Figure 2. Schématisation des principales caractéristiques des membres de la famille Ctr.....	7
Figure 3. Homéostasie du Cu chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i> en prolifération.....	23
Figure 4. Schématisation de la réaction catalysée par les CAOs.....	31
Figure 5. Schématisation de la disproportion des anions superoxydes par la SOD1.....	33
Figure 6. Processus méiotique chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	34

RÉSULTATS

Figure 1 The <i>cuf1+</i> gene is required for copper starvation-dependent induction of <i>ctr4+</i> and <i>ctr5+</i> transcripts during meiosis.....	67
Figure 2 Effect of <i>cuf1Δ/cuf1Δ</i> or <i>mei4Δ/mei4Δ</i> deletion on the expression of <i>ctr6+</i>	68
Figure 3 Assessment of the mRNA steady-state levels of <i>cuf1+</i> and <i>mei4+</i> during meiosis.....	69
Figure 4 Colocalization of Ctr4-GFP and Ctr5-Cherry during meiosis.....	70
Figure 5 The vacuolar copper transporter Ctr6 contributes to production of active SOD1 during mitosis.....	71
Figure 6 Subcellular localization of Ctr6-HA4 during meiosis and sporulation.....	72
Figure 7 Effect of <i>ctr4Δ/ctr4Δ</i> and <i>ctr6Δ/ctr6Δ</i> disruptions on SOD1 and CAO activities during meiosis.....	73
Figure 8 SOD1 and Cao1 enzymes require different combinations of copper transporters for their activation during meiosis.....	74

DISCUSSION

Figure 7. Modèle de l'acquisition du Cu par les Ctrs durant la méiose chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	76
Figure 8. Inhibition de la méiose causée par une déficience en SOD1.....	83
Figure 9. Ralentissement de la germination provoqué par la délétion de <i>ctr6+</i>	90

TABLEAU

Tableau 1. *S. pombe* strains genotypes.....66

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
BCS	Acide bathocuproinedisulfonique
Cao	Copper amine oxydase (amine oxydase cuivre-dépendante)
CcO	Cytochrome c oxydase
Ctr	Transporteur de cuivre
CuRE	Copper responsive elements
CuSE	Copper-signaling elements
DBD	DNA binding domain (domaine de liaison à l'ADN)
ER	Endoplasmic reticulum (réticulum endoplasmique)
FSM	Forespore membrane (membrane des spores)
GFP	Green fluorescent protein (Protéine fluorescente verte)
GSH	Glutathion réduit
IM	Inner membrane (membrane interne de la mitochondrie)
IMS	Intermembrane space (espace intermembranaire de la mitochondrie)
MREs	Metal Responsive Elements
MTs	Métallothionéines
NES	Nuclear export signal (Signal d'export nucléaire)
NLS	Nuclear localization signal (Signal de localisation nucléaire)
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide)
PKA	Protéine kinase A
ROS	Reactive oxygen species (espèce reactive de l'oxygène)
SBP	Spindle pole body (corps polaire du faisceau)
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SIN	Septation initiation network (réseau d'initiation de la fission)
SOD	Superoxyde dismutase
TOM	Transporter outer membrane (complexe de transporteur à la membrane externe de la mitochondrie)
TPQ	2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone
TTM	Tétrathiomolybdate
YES	Yeast extract plus supplements

RÉSUMÉ

Caractérisation des transporteurs de cuivre chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* en différenciation méiotique

Par
M. Samuel Plante
Département de Biochimie
Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

Il est bien connu que des cofacteurs comme le zinc et le cuivre sont essentiels pour la progression de la méiose qui permet la formation de gamètes haploïdes à partir d'une cellule diploïde.

Au laboratoire, de graves défauts dans la méiose chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* ont été observés en carence de cuivre, mais peu est connu sur son acquisition durant la différenciation méiotique. Trois transporteurs de cuivre sont connus chez *S. pombe*, soient Ctr4, Ctr5 et Ctr6. Ils ont été largement caractérisés dans un contexte mitotique, mais nous en connaissons peu sur leur contribution à l'homéostasie du cuivre en méiose.

Mes travaux avaient pour objectif de dresser un portrait global des transporteurs de cuivre au cours de la méiose. D'abord, j'ai entrepris d'évaluer le profil d'expression de ces gènes. J'ai mis en évidence des patrons différents d'expression selon les transporteurs. L'expression de ctr4+ et ctr5+ a lieu principalement durant les premières heures de la méiose en carence de cuivre alors que ctr6+ a une expression plus étendue avec un pic durant la phase médiane de la méiose. L'expression de ctr4+ et ctr5+ est dépendante uniquement de Cuf1 alors que l'expression de ctr6+ repose sur les facteurs Cuf1 et Mei4. Les deux protéines Ctr4 et Ctr5 co-localisent à la membrane plasmique rapidement durant les premières heures de la méiose en carence de cuivre. À ce moment, Ctr6 apparaît à la membrane vacuolaire. Après la première division méiotique, Ctr4 et Ctr5 disparaissent alors que Ctr6 transite de la membrane vacuolaire vers la membrane des spores où elle se localise même après la libération des spores. Une délétion des gè-

nes ctr4 et ctr6 affecte grandement l'activité d'enzymes cuivre dépendantes. Notons que dans ce mutant, l'activité superoxide dismutase est abolie et l'activité amine oxydase cuivre est grandement diminuée uniquement dans les premières étapes de la méiose.

Mes travaux ont permis de mettre en évidence des profils différents d'expression, de localisation et de contribution à l'activité d'enzymes cuivre-dépendantes. Ces observations suggèrent qu'en cours de méiose la levure à fission voit ses besoins en ion de cuivre modulés et doit adapter ses systèmes d'acquisition et de gestion de cuivre intracellulaire.

INTRODUCTION

1. Importance de l'homéostasie du cuivre en biologie

Les ions Cu ont une relation paradoxale avec les systèmes biologiques. D'une part, la capacité d'oxydoréduction du Cu lui confère un rôle de cofacteur essentiel dans la catalyse de réactions enzymatiques. Les ions Cu, présents le fréquemment aux états d'oxydation Cu¹⁺ et Cu²⁺, sont indispensables à un grand nombre d'enzymes impliquées dans une multitude de processus biologiques, souvent vitaux (Festa & Thiele, 2011, Nevitt et al, 2012). De ce nombre, il y a la cytochrome *c* oxydase (CcO, respiration cellulaire), la superoxyde dismutase 1 (SOD1, défense contre le stress oxydatif), la céruloplasmine (transport du fer, Fe), tyrosinase (synthèse de pigment), les Facteurs V et VIII (coagulation sanguine). D'autre part, si le Cu est retrouvé en trop grande quantité, ou libre, son pouvoir redox incontrôlé peut catalyser la réaction de Fenton :



L'un des produits, le radical hydroxyle ($\cdot OH$), une espèce réactive de l'oxygène (ROS), est particulièrement létal pour la cellule. Il cause des dommages oxydatifs aux lipides, aux protéines et aux acides nucléiques qui peuvent mener à la mort cellulaire (Halliwell & Gutteridge, 1992, Valko et al, 2005).

Le caractère essentiel du Cu a ainsi forcé l'évolution de mécanismes pour gérer son acquisition par les cellules à partir de leur environnement. De plus, les cellules ont dû développer des composantes pour chaperonner, détoxifier et entreposer les ions Cu dans le but d'éviter, en contrepartie, leur potentiel toxique (Kim et al, 2008).

L'importance, pour les cellules, d'assurer l'homéostasie du Cu se traduit par différentes pathologies observées chez l'humain si elle n'est pas respectée. Notons brièvement deux exemples : le syndrome de Menkes et la maladie de Wilson (Madsen & Gitlin, 2007, Schaefer & Gitlin, 1999).

Le syndrome de Menkes se définit par une déficience globale en Cu causée par une défectuosité de son assimilation dans le tractus intestinal. Il s'agit d'une maladie génétique attribuée à une mutation du transporteur de Cu ATP7a (Tumer et al, 1999). L'espérance de vie des patients qui en souffrent est de moins de 20 ans, ce qui marque l'importance d'une assimilation adéquate en Cu pour l'activité des cuproenzymes dans notre organisme.

La maladie de Wilson se manifeste principalement par des lésions hépatiques. Un défaut de l'excrétion du Cu (normalement dans la bile) cause son accumulation pathologique dans des organes clés comme le foie et le cerveau. Cette pathologie est associée à des mutations du transporteur ATP7b (Pfeiffer, 2011). Elle illustre clairement le potentiel toxique du Cu et le risque encouru par son accumulation dans un organe.

Les deux protéines homologues, ATP7a et ATP7b font partie de la même famille des ATPase de type P, ce sont des protéines à 8 domaines transmembranaires qui hydrolysent l'ATP pour le transport actif du Cu (La Fontaine & Mercer, 2007).

Des déséquilibres des niveaux de Cu, plus particulièrement au cerveau, contribueraient à des maladies neurodégénératives comme le Parkinson, la maladie d'Alzheimer, et la sclérose amyotrophique latérale (Furukawa & O'Halloran, 2005, Montes et al, 2014, Telianidis et al, 2013). De plus, des études ont montré que la protéine prion se lie au Cu ce qui suggère un lien entre l'homéostasie du Cu et les maladies à prion (Migliorini et al, 2014).

Les mécanismes qui existent dans la nature pour assurer l'homéostasie du Cu sont bien conservés à travers les espèces. Allant de la levure, aux mammifères en passant par le nematode, la drosophile et les plantes, des composantes de transport, de stockage et de trafic du Cu ont pu être identifiées (Nevitt et al, 2012). Bien que les nombreuses études chez l'homme ont l'avantage certain de chercher à comprendre directement les maladies qui nous affligent, l'utilisation d'organismes modèles s'est révélée être très utile pour l'étude mécanistique des voies de régulation du Cu et leur compréhension à l'échelle moléculaire.

Les prochaines sections de mon mémoire serviront à introduire les connaissances sur l'homéostasie du Cu mises en évidence chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. Ces organismes unicellulaires, par leur grande maniabilité génétique et leur facilité de manipulation, ont joué un rôle majeur dans l'identification des composantes cellulaires clés du transport, de la distribution, et du stockage des ions Cu.

2. Homéostasie du cuivre chez *Saccharomyces cerevisiae*

Tout d'abord, nous examinerons ce que nous a appris la levure à bourgeon, *S. cerevisiae*. Elle est l'objet d'études depuis très longtemps, et c'est pourquoi les mécanismes de contrôle des ions Cu y sont bien connus. La figure 1 résume notre compréhension actuelle des voies d'assimilation et de trafic du Cu chez cette levure. Plus de détails sur chacune de ces composantes viendront au fur de la description du chemin emprunté par le Cu de l'environnement jusqu'aux cuproenzymes, les destinations finales où son utilité physiologique sera mise en évidence.

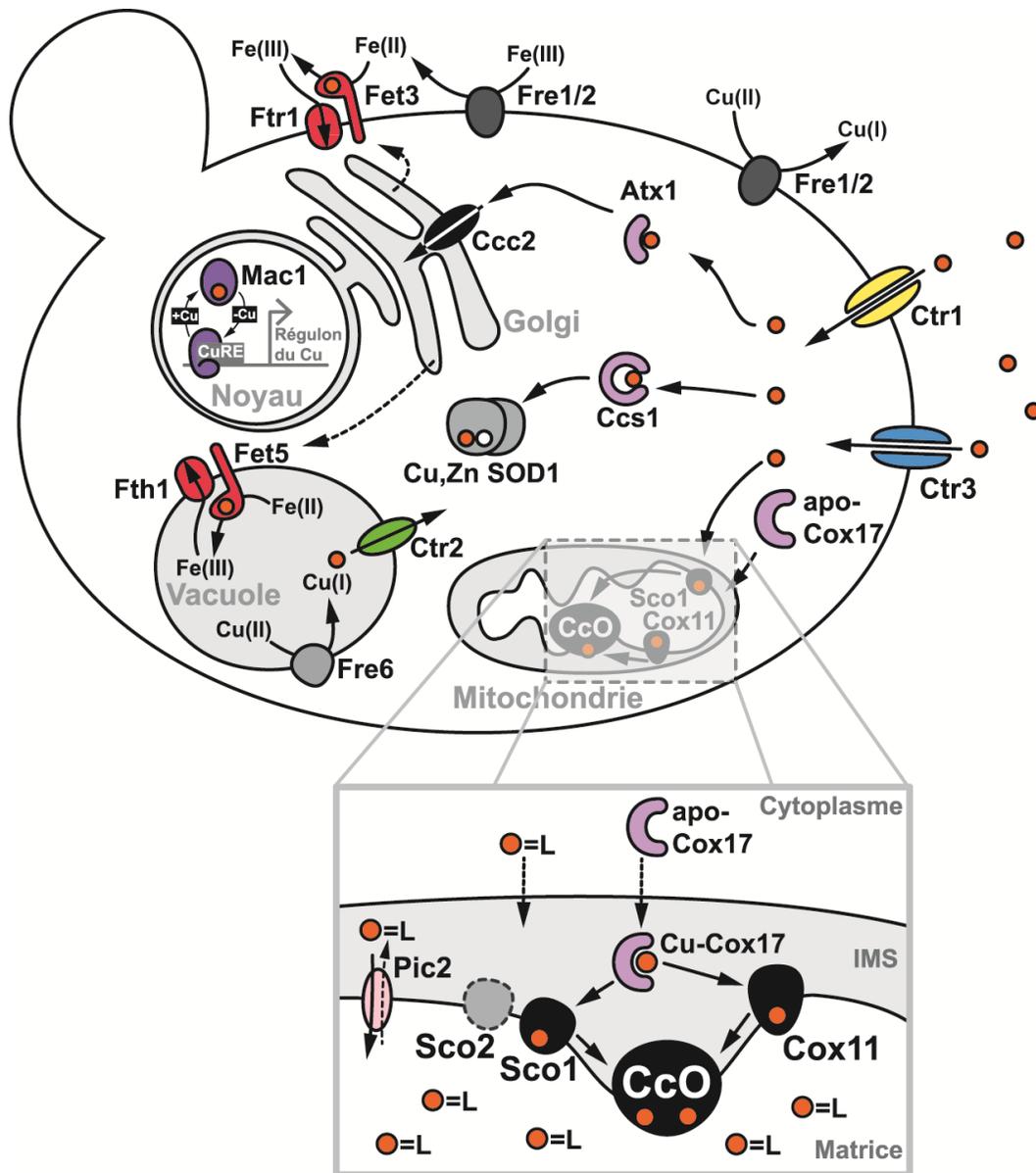


Figure 1. Modèle d'acquisition et de distribution du Cu chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le Cu(II) est d'abord réduit par les réductases de surface Fre1 et Fre2 et la réductase vacuolaire Fre6. Les ions Cu(I) sont ensuite transportés vers le cytoplasme par les transporteurs de surface Ctr1 et Ctr3, et le transporteur vacuolaire Ctr2. La chaperonne Atx1 achemine le Cu jusqu'au transporteur golgien Ccc2. Ce dernier transporte les ions Cu vers la lumière de l'appareil de Golgi où ils seront disponibles pour les cuproenzymes transitant par la voie de sécrétion incluant les multi-Cu oxydases Fet3 et Fet5. Ces enzymes catalysent l'oxydation du Fe dans l'environnement et la vacuole préalablement à son transport par Ftr1 et Fth1, respectivement. Le Cu à la mitochondrie est lié à un ligand de nature inconnue non-protéique. Le complexe Cu-ligand est concentré dans la matrice par l'activité du transporteur Pic2. Dans l'IMS, Cox17 acquiert le Cu mitochondrial et le distribue vers les protéines Cox11 et Sco1 qui livrent le Cu à la CcO, avec la participation réduite de Sco2. La cuproenzyme SOD1 est spécifiquement approvisionnée en Cu par la

chaperonne Ccs1. En carence de Cu (-Cu) le facteur de transcription Mac1 active le régulon du Cu en liant les séquences CuREs au promoteur des gènes cibles. Lorsqu'il est abondant (+Cu) le Cu lie Mac1 qui ne peut plus lier l'ADN ce qui inhibe l'expression du régulon. Cercle orange, Cu; cercle blanc, Zn; IMS, espace intermembranaire mitochondrial; L, ligand du Cu. Il est à noter que je suis l'auteur de toutes les figures présentées dans ce mémoire.

En préambule, je désire souligner les règles typographiques qui s'appliquent à la nomenclature. Chez *S. cerevisiae*, le nom des gènes est composé de trois lettres suivies d'un nombre entier. Leur nom s'écrit en fonte italique et en lettres majuscules. Pour faire référence au produit polypeptidique d'un gène, son nom doit être écrit en fonte romaine avec le premier caractère en majuscule et les suivants minuscules. La superoxyde dismutase est une exception. La graphie commune pour cette protéine est en fonte romaine avec tous les caractères majuscules.

2.1. Système de transport du cuivre.

2.1.1. Transporteurs de haute affinité.

En condition aérobie, l'environnement de *S. cerevisiae* est oxydant ce qui favorise la présence du Cu sous sa forme Cu(II). Cependant, des expériences ont mis en évidence que ce ne sont que les ions Cu(I) qui peuvent être transportés à travers la membrane (Hassett & Kosman, 1995). Le Cu(II) doit donc être réduit pour pouvoir emprunter le sentier d'acquisition de haute affinité.

La levure *S. cerevisiae* compte 8 métalloréductases (Fre1 à 8). Les protéines Fre1 et Fre2 assurent >90 % de l'activité réductase de surface. En plus du Cu, ces deux protéines catalysent aussi la réduction du Fe(III) en Fe(II), d'où le nom de cette famille (Ferric Reductase). Les protéines de surface Fre3 et Fre4 sont connues pour leur activité réductase spécifiquement sur le Fe lié aux sidérophores (Yun et al, 2001). Fre5 a été localisée à la mitochondrie, mais son rôle n'a pas été déterminé. Fre6 est localisée à la membrane vacuolaire où elle joue un rôle dans la mobilisa-

tion des réserves d'ions Fe et Cu qui y sont emmagasinés (voir section 2.1.3) (Rees & Thiele, 2007, Singh et al, 2007). Comme c'est le cas pour Fre1, la transcription de Fre7 est induite en carence de Cu, mais son activité réductase est beaucoup moins efficace (Georgatsou & Alexandraki, 1999). La dernière de la famille, Fre8, n'est ni induite en carence de Cu ou Fe, et son rôle n'est pas encore défini.

Le Cu(I) est ensuite pris en charge par deux membres de la famille des transporteurs de Cu de haute affinité, soit Ctr1 et Ctr3 (Dancis et al, 1994b, Pena et al, 2000). Ces transporteurs ont une forte affinité pour le Cu avec un $K_m \sim 1 - 5 \mu M$ (Puig & Thiele, 2002). Ils se localisent à la membrane plasmique sous forme homotrimerique où ils permettent le passage d'ions Cu(I) vers le cytoplasme (Puig et al, 2002). Ils sont responsables de l'entrée de la majorité des ions Cu dans la cellule. Leur activité est redondante, mais indépendante; Ctr1 pouvant compenser pour une délétion de Ctr3 et vice versa (Knight et al, 1996). L'expression des gènes *CTR1* et *CTR3* est augmentée en carence de Cu. La protéine Ctr1 est aussi régulée post-traductionnellement selon le statut en Cu, mais aucune modification post-transcriptionnelle de la protéine Ctr3 n'a été observée en présence de concentrations élevées de Cu (voir section 2.3).

Les membres de cette famille, qui tient son nom de Copper *T*ransporter, sont présents dans un grand nombre d'organismes (Lee et al, 2002). Bien qu'il y ait une faible homologie de séquence entre ces protéines, elles partagent des caractéristiques structurales distinctes qui sont illustrées à la figure 2.

Elles possèdent chacune trois domaines transmembranaires. Des expériences ont d'ailleurs permis de déterminer que la portion N-terminale de Ctr1 de *S. cerevisiae* est localisée dans le milieu extracellulaire et la portion C-terminale, dans le cytoplasme (Puig et al, 2002).

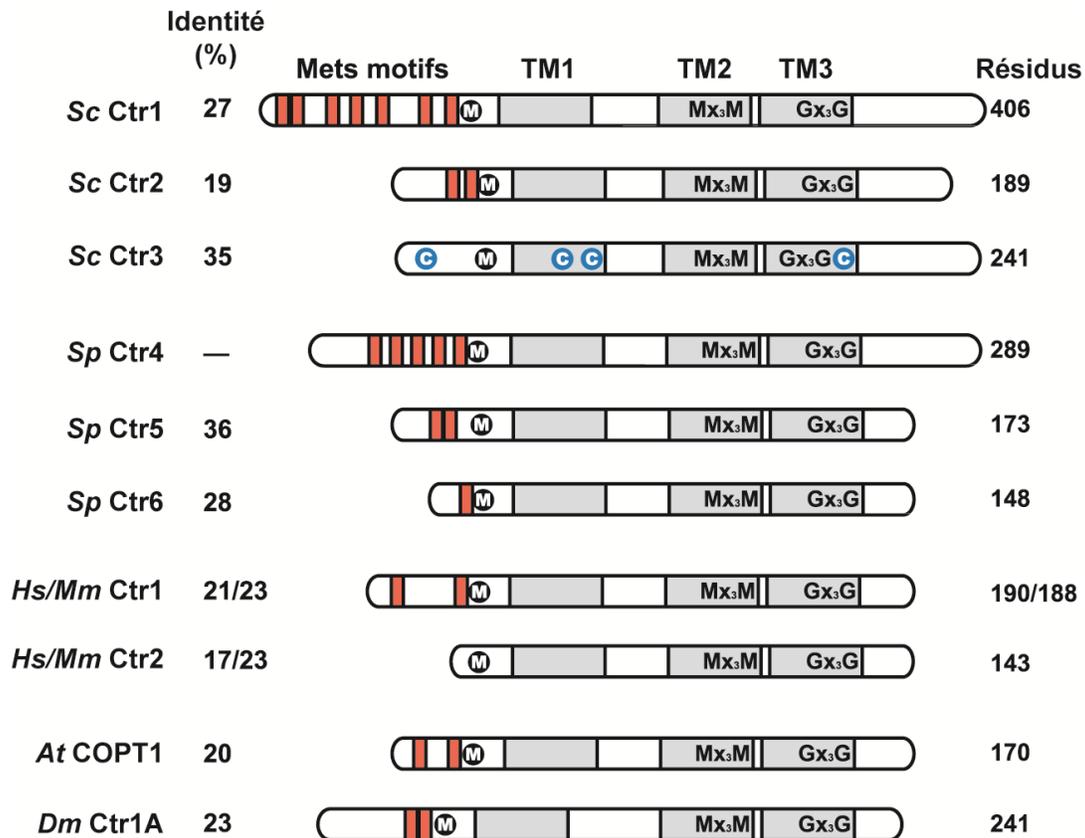


Figure 2. Schématisation des principales caractéristiques des membres de la famille Ctr. Ctr1, Ctr2 et Ctr3 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), Ctr4, Ctr5 et Ctr6 de la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), Ctr1 et Ctr2 de l'homme (Hs) et de la souris (Mm), COPT1, l'un des 6 transporteurs de Cu (COPT1-6) de la plante *Arabidopsis thaliana* (At) et Ctr1A un des trois transporteurs (Ctr1A-C) de la mouche *Drosophila melanogaster* (Dm) ont été choisis pour illustrer et comparer les transporteurs de la famille des Ctrs. Leur portion N-terminale est riche en résidus méthionines arrangés en Mets motifs (rouges) MxM ou MxxM. La protéine Ctr3 de *S. cerevisiae* ne possède pas de Mets motifs, mais quatre résidus cystéines (bleu) sont cruciaux pour son activité. Un résidu méthionine (noir) est hautement conservé à environ 20 résidus du premier des trois domaines transmembranaires (gris, TM1-3), qui sont typiques de cette famille. Dans le deuxième et troisième TM, on y retrouve de manière très conservée les motifs Mx3M et Gx3G. Les pourcentages d'identité ont été calculés par rapport à la protéine Ctr4 à l'aide du logiciel Clustal omega. Le nombre de résidus de chaque protéine est indiqué à droite.

Leur queue N-terminale est riche en résidus méthionines (M) que l'on retrouve organisés en motifs MxM ou MxxM, appelés les Mets motifs. Le nombre de ces motifs est variable d'un transporteur à l'autre chez les différentes espèces. Les protéines Ctr1 de *S. cerevisiae* et de l'homme, par exemple, possèdent huit et deux Mets motifs, respectivement. Des expériences de mutagenèse dirigée indiquent que ces résidus méthionines sont importants pour l'activité des transporteurs, puisque leur mutation diminue grandement l'entrée de Cu dans les cellules (Puig et al, 2002). La portion N-terminale de la protéine Ctr3 de *S. cerevisiae* ne présente pas de Mets motifs, mais elle possède un résidu méthionine hautement conservé à environ 20 résidus du premier domaine transmembranaire. De plus, Ctr3 est une protéine riche en résidus cystéines (C). Parmi les résidus cystéines qu'elle contient, quatre ont été identifiés comme importants pour le transport du Cu. En effet, si les résidus C16, C48, C51 et C199 sont mutés, il en résulte en une protéine non fonctionnelle (Pena et al, 2000).

Comme il a été mentionné précédemment, chez la presque totalité des Ctrs connus, un résidu méthionine, très bien conservé, est retrouvé à environ 20 résidus du premier domaine transmembranaire. Ce résidu méthionine jouerait un rôle essentiel dans la coordination du Cu avant sa translocation vers le cytoplasme (Puig et al, 2002).

Il y a également un Mets motif, MxxxM, hautement conservé qui se retrouve dans le deuxième domaine transmembranaire des protéines Ctrs. L'organisation en trimères des transporteurs de Cu forme vraisemblablement un canal, et le motif MxxxM aurait comme rôle de coordonner les ions lorsque ces derniers le traverse (De Feo et al, 2009, Puig et al, 2002).

Finalement, un motif constitué de résidus glycine (G) GxxxG est retrouvé dans le troisième domaine transmembranaire. Ce motif est essentiel pour l'activité des transporteurs. Il est impliqué dans l'assemblage sous forme trimérique des protéines (Aller et al, 2004).

Notons que la région C-terminale de Ctr1 chez l'homme contient un motif HCH. Ces résidus seraient impliqués dans le transport de l'ion à travers le pore en fournissant un site énergétiquement favorable de liaison au Cu à la sortie du transporteur (De Feo et al, 2009). Cependant, ce motif n'est pas conservé chez les autres Ctrs. La portion C-terminale de Ctr1 de *S. cerevisiae* contient aussi plusieurs résidus cystéines qui seraient impliqués dans la régulation du transport de Cu (voir section 2.4.2.)

L'activité des Ctrs ne semble pas dépendante de l'ATP, mais des données indiquent que le transport de Cu par Ctr1 chez l'homme et *S. cerevisiae* serait couplé au transport de potassium (Petris, 2004).

Une souche de *S. cerevisiae* mutante pour les transporteurs de haute affinité ($\Delta ctr1 \Delta ctr3$) exhibe des phénotypes importants, reflétant l'importance de l'acquisition du Cu. L'activité des cuproenzymes est altérée, ce qui affecte plusieurs processus cellulaires tels que la respiration mitochondriale, l'acquisition de Fe et la protection contre le stress oxydatif (Dancis et al, 1994a, Jungmann et al, 1993). De tels phénotypes corrélaient avec les observations chez la souris. Les souris homozygotes pour une délétion du transporteur Ctr1 sont non viables, leur développement s'arrêtant très tôt au stade embryonnaire (Kuo et al, 2001, Lee et al, 2001). La levure *S. cerevisiae* a servi à identifier des transporteurs de haute affinité de Cu chez l'homme (Zhou & Gitschier, 1997), la souris (Lee et al, 2000), la *Drosophila melanogaster*. (Zhou et al, 2003), et *Arabidopsis thaliana* (Kampfenkel et al, 1995). L'expression hétérologue de protéines d'autres organismes s'apparentant à Ctr1 chez une levure mutante $\Delta ctr1 \Delta ctr3$ a permis de rétablir l'acquisition de Cu et l'activité des cuproenzymes, révélant ainsi leur propriété à transporter le Cu.

2.1.2. Transporteurs de faible affinité

Le phénotype observé dans une souche de levure $\Delta ctr1 \Delta ctr3$ peut être renversé par l'ajout, au milieu de culture, de Cu à une concentration $> 30 \mu\text{M}$ (Dancis et al, 1994b, Puig & Thiele, 2002). La souche mutante pour le transport de haute affinité est incapable de croître sur un milieu non fermentable. Cette souche est sévèrement carencée en Cu ce qui compromet entre autres l'activité de la CcO, essentielle pour la phosphorylation oxydative. Cependant, l'ajout de Cu au milieu de culture rétablit la fonction mitochondriale et donc permet la croissance sur un milieu non fermentable. Une telle observation met en évidence un système d'acquisition du Cu indépendant de Ctr1 et Ctr3, mais de plus faible affinité.

La protéine Fet4 (Fe Transporter 4) a été initialement caractérisée comme un transporteur de Fe à faible affinité. Cette protéine, localisée à la membrane plasmique, ne partage aucune des caractéristiques distinctives de la famille des Ctr. Des expériences illustrent pourtant son potentiel à transporter le Cu. La surexpression de Fet4 dans une souche $\Delta ctr1 \Delta ctr3$ rétablit la fonction de l'oxydase Cu-dépendante Fet3 et donc le transport de haute affinité du Fe. Le transporteur Fet4 a une faible affinité pour le Cu. Les quantifications établissent que son K_m est d'environ $35 \mu\text{M}$ (Hassett et al, 2000, Waters & Eide, 2002).

La protéine Smf1 (Suppressor of Mitochondria import Function 1), une des trois protéines de la famille Nramp chez *S. cerevisiae* (qui compte Smf1, Smf2 et Smf3) est d'abord connue pour sa capacité à importer le manganèse (Mn). En carence de Mn, elle se localise à la membrane plasmique alors qu'en abondance de Mn, elle est plutôt dirigée vers la lumière de la vacuole pour y être dégradée. Il a aussi été mis en évidence que Smf1 peut transporter, à moindre affinité, un large spectre d'ions di — et trivalent, dont le Cu (Chen et al, 1999). Smf2 a plutôt le rôle

d'assurer la distribution du Mn vers différents organelles et protéines Mn-dépendante. Par exemple, la SOD2 qui se localise dans la matrice mitochondriale, et la Mn-manosyltransférase qui se retrouve dans l'appareil de Golgi. Finalement, Smf3, est localisée à la membrane de la vacuole où elle est impliquée dans la mobilisation des réserves vacuolaires de Fer (Cohen et al, 2000, Portnoy et al, 2002).

2.1.3. Transport vacuolaire

La protéine Ctr2 a été identifiée par homologie de séquence à partir du transporteur de haute affinité COPT1 (Copper Transporter 1) de la plante *Arabidopsis thaliana*. Contrairement à Ctr1 et à Ctr3, Ctr2 est plutôt localisée à la membrane de la vacuole. La vacuole de la levure sert, notamment, d'entrepôt à plusieurs oligoéléments, dont le Cu (Klionsky et al, 1990). Ctr2 a donc le rôle de mobiliser ces réserves, en transportant les ions de Cu de la lumière de la vacuole vers le cytoplasme (Rees et al, 2004). Ni l'expression du gène et ni le produit polypeptidique ne sont affectés de manière Cu-dépendante. Comme dans le cas des transporteurs de surface, la fonction de transport de Ctr2 requiert une métalloréductase puisqu'elle assure spécifiquement le passage d'ion Cu(I). Comme mentionné précédemment, la réductase Fre6 a été identifiée comme responsable de la réduction du Cu(II) en Cu(I) dans la vacuole préalablement à son transport. Étonnamment, aucun transporteur assurant le stockage des ions de Cu dans la vacuole n'a encore été identifié.

Un homologue de Ctr2 a été identifié chez les mammifères. La protéine humaine et murine Ctr2 (h/m Ctr2) partage 30% d'identité avec la protéine Ctr2 de *S. cerevisiae*. Malgré que h/m Ctr2 possède les motifs et domaines typiques de cette famille, elle n'a portant aucune habileté à transporter du Cu. h/m Ctr2 agirait plutôt comme un régulateur de la biogénèse d'une forme tronquée de Ctr1 qui transporte le Cu de manière moins efficace que sa forme pleine longueur.

h/m Ctr2 représente donc un niveau supplémentaire de régulation de l'acquisition de Cu chez les mammifères (Ohrvik et al, 2013).

2.2. Distribution intracellulaire des ions cuivre

Une fois dans le cytoplasme, le Cu doit être distribué aux enzymes Cu-dépendantes, mais ce n'est pas tâche facile. La concentration de Cu dans le cytoplasme atteint des valeurs bien en dessous de la valeur d'affinité de la plupart des enzymes. Ceci laissant présager que les protéines Cu-dépendantes font face à un obstacle majeur pour fixer le Cu nécessaire à leur activité. Il a été démontré chez *S. cerevisiae*, qu'il n'y a virtuellement aucun atome de Cu libre dans la cellule (Rae et al, 1999). Bien que d'apparence problématique, cette absence de Cu est en fait un avantage pour les cellules. D'une part, cela permet d'échapper à la toxicité du Cu. Le Cu est présent dans la cellule sous forme de complexe à des protéines spécialisées, appelées chaperonnes. Le trafic du Cu est ainsi assuré par ces chaperonnes qui permettent une spécificité et un contrôle sur sa distribution vers des protéines et des compartiments cellulaires précis (Field et al, 2002, Robinson & Winge, 2010). Trois chaperonnes ont été identifiées chez *S. cerevisiae*. (1) Ccs1 (Copper Chaperone for SOD) qui approvisionne la SOD1 en Cu (Culotta et al, 1997); (2) Atx1 qui fournit le Cu à l'appareil de Golgi (Lin et al, 1997); et (3) Cox17 qui permet le trafic du Cu jusqu'à la cytochrome c oxydase dans la mitochondrie (Glerum et al, 1996).

2.2.1. Chaperonne Ccs1 et enzyme SOD1

La Cu/Zn superoxyde dismutase 1 (SOD1) est une enzyme principalement cytosolique qui catalyse la disproportion de deux anions superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire (voir section 4.2) (McCord & Fridovich, 1969). Elle est impliquée dans la défense contre le stress oxydatif, car elle évite à la cellule les dommages causés par les anions superoxyde. La

SOD1 se trouve sous forme dimérique. Chaque unité contient un ion zinc (Zn) et un ion Cu, qui sont tous deux essentiels pour son activité. Le Zn a une fonction structurelle dans la protéine. L'ion Cu se trouve au centre catalytique de l'enzyme, il est directement impliqué dans la réaction de disproportion. Une levure déficiente en SOD1 ($\Delta sod1$) présente plusieurs phénotypes, dont une augmentation de la sensibilité au stress oxydatif et des défauts métaboliques importants. Il a été observé qu'une souche $\Delta sod1$, en condition aérobique, exhibe une auxotrophie pour la lysine et la méthionine (Chang et al, 1991, Wallace et al, 2004).

Le mécanisme précis par lequel le Zn est incorporé à SOD1 n'est pas connu, mais il est clairement indépendant de Ccs1 et semble survenir tôt durant sa maturation (Furukawa et al, 2004). Le Cu est apporté à la SOD1 par la chaperonne Ccs1 (Copper Chaperone for SOD1). La délétion du gène *CCS1* ($\Delta ccs1$) reproduit le phénotype de la délétion de *SOD1*, provoquant un défaut de la biosynthèse de la lysine. Le polypeptide SOD1 y est toujours détecté, mais il n'y a pas d'incorporation de Cu. L'absence de Cu n'affecte en rien la stabilité de la protéine, mais la rend catalytiquement inactive.

La digestion de Ccs1 à la trypsine a permis d'identifier trois domaines structurellement distincts. Ils sont nommés respectivement domaine I (résidus 1 à 77), domaine II (résidus 78 à 213), et domaine III (résidus 214 à 249) (Rae et al, 2001, Schmidt et al, 1999).

Le domaine I est particulièrement similaire à la chaperonne Atx1. D'abord, leur similarité vient de leur séquence en acides aminés puisqu'ils partagent 34 % d'homologie. La structure tridimensionnelle d'Atx1 et du domaine I montre une similarité d'autant plus frappante. Les deux adoptent un arrangement de feuillets β et d'hélices α de type $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (Lamb et al, 1999). La pochette qui forme le site de liaison au Cu d'Atx1 est d'ailleurs bien conservée dans le domaine I de Ccs1. Elle est formée d'un motif MxCxxC (résidus 15 à 20 de Ccs1) qui relie boucle 1 et l'hélice

1 (Pufahl et al, 1997). Cette structure est retrouvée aussi dans un domaine de liaison au Cu d'ATP7a. Cet arrangement permet de croire que le domaine I est capable de lier le Cu. *In vivo*, ce domaine n'est pas indispensable à la fonction de Ccs1. Les domaines II et III sont suffisants pour approvisionner la SOD1 en Cu. Cependant, le domaine I est nécessaire si la cellule est carencée en Cu, il agirait en *trans* avec les domaines II et III pour favoriser l'apport de Cu à la SOD1 (Lamb et al, 2001). Bien qu'Atx1 ait une forte ressemblance avec le domaine I de Ccs1, cette chaperonne ne peut pas se substituer à la fonction du domaine I en condition de carence en Cu. À l'inverse, le domaine I de Ccs1 ne peut pas substituer pour une délétion d'Atx1 dans le transport du Cu vers le sentier de sécrétion (voir section 2.2.2.) (Schmidt et al, 1999).

Le domaine II partage environ 20 % d'identité avec SOD1 du point de vu de la séquence en acides aminés. La conformation des deux polypeptides est aussi extrêmement ressemblante. Huit feuillets β s'organisent sous forme d'un tonneau (Lamb et al, 1999). Il est important de souligner que les résidus qui contribuent à la dimérisation de SOD1 sont conservés dans Ccs1. Des expériences ont confirmé qu'une interaction directe est possible entre SOD1 et Ccs1 via le domaine II, ce qui explique la spécificité de la distribution de Cu par Ccs1 (Lamb et al, 2001, Schmidt et al, 2000). De plus, il a été démontré que si cette interaction est abolie, la fonction de Ccs1 est inhibée. Cette interaction est donc nécessaire pour l'apport de Cu à la SOD1 et pour son activité. Des sept résidus qui coordonnent les ions de Zn et Cu de SOD1, seulement le résidu histidine 49 est conservé dans Ccs1 (His134). Le domaine II de Ccs1 ne peut pas lier ni du Cu ni du Zn ce qui le rend catalytiquement inactif. Il est donc peu probable que le Cu soit transféré à SOD1 à partir du domaine II. La fonction de ce domaine est de créer un complexe stable avec SOD1 le temps du transfert de l'ion métallique (Lamb et al, 1999).

La portion C-terminale de Ccs1 est dénommée le domaine III. Bien que les expériences de diffraction aux rayons-X laissent croire qu'il s'agisse d'une simple région non-structurée, elle est

pourtant essentielle pour le transfert du Cu à la SOD1 et pour son activation. Ce domaine est le mieux conservé de la protéine Ccs1 à travers les espèces. Notons la présence d'un motif CxC qui peut lier un ion Cu. Outre la fonction de métallochaperonne, Ccs1 assure aussi la maturation de SOD1 en facilitant la formation d'un pont disulfure, entre les C57 et C146. Cette modification post-traductionnelle est essentielle pour l'activité de SOD1 puisqu'une mutation de l'un ou l'autre de ces résidus cystéines abolit son activité et ce, malgré le fait que la liaison d'un ion Cu est encore possible. C'est le domaine III qui remplit cette fonction. Les C229 ou C231 de Ccs1 forment un pont disulfure transitoire avec la C57 de SOD1 lors de la formation de l'hétérodimère (Lamb et al, 2001, Rae et al, 2001).

Chez *S. cerevisiae*, l'activité de SOD1 est totalement dépendante de Ccs1. Chez la souris, par contre, une activité résiduelle d'environ 20 – 30 % est détectable même dans le cas d'une délétion de CCS1. Cette activité Ccs1 indépendante est attribuable au glutathion réduit (GSH) (Wong et al, 2000). À l'autre extrême, chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, les Zn/Cu superoxyde dismutases cytosoliques, SOD1 et SOD5, sont entièrement dépendantes du GSH (Jensen & Culotta, 2005).

2.2.2. Atx1 et distribution du Cu au sentier de sécrétion

La protéine Atx1 a d'abord été identifiée comme une molécule antioxydante (d'où son nom). Lorsqu'elle est surexprimée, cette protéine participe à la protection de la cellule contre les ROS. Il a été déterminé qu'Atx1 a une faible activité SOD intrinsèque qui peut compenser une mutation $\Delta sod1$ lorsqu'elle est surexprimée (Lin & Culotta, 1995). Cependant, à des niveaux physiologiques, Atx1 n'est pas connue pour posséder une activité SOD significative.

Une délétion du gène *ATX1* ($\Delta atx1$) provoque une défaillance du transport des ions Fe (Lin et al,

1997). Ce phénotype est connu pour être lié à l'homéostasie du Cu. Le système d'acquisition du Fe de haute affinité chez *S. cerevisiae* est dépendant de l'oxydase Cu-dépendante Fet3, qui assure l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) préalablement à son transport à travers la membrane plasmique via la perméase Ftr1. De plus, la mobilisation des réserves vacuolaires de Fe par le transporteur Fth1 est dépendante de l'oxydase Cu-dépendante Fet5. Fet3 et Fet5 acquièrent leurs ions Cu durant leur trafic à travers l'appareil de Golgi. Chez *S. cerevisiae*, l'acquisition de Cu dans le sentier de sécrétion est dépendante du transporteur Ccc2, une ATPase de type P. Chez l'humain, cette fonction est assumée par ses homologues, ATP7a et ATP7b.

Atx1 est une protéine cytoplasmique se liant à un Cu(I), ce qui assure le trafic spécifique du Cu au transporteur Ccc2 (Huffman & O'Halloran, 2001, Pufahl et al, 1997). Le transfert du cargo d'Atx1 vers Ccc2 se fait par interaction directe entre les deux protéines. Plus précisément, Atx1 interagit de manière Cu-dépendante avec la portion N-terminale cytosolique de Ccc2 (Arnesano et al, 2001, Banci et al, 2006). Cette dernière possède deux domaines similaires à Atx1. Ils sont semblables, d'une part, par leur structure tertiaire, *i.e.* un arrangement d'hélices α et de feuillets β du type $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, et la conservation d'un motif de liaison au Cu, MxCxxC (Banci et al, 2001, Rosenzweig et al, 1999). L'interaction entre Atx1 et le transporteur est favorisée par des forces ioniques. Atx1 expose à sa surface des résidus basiques (K24, K28, K61, K62, et K65, chargés positivement) alors que le domaine de Ccc2 exhibe des résidus de charge négative. La mutation de ces résidus chargés, en rompant les forces ioniques favorables, diminue l'affinité des deux protéines l'une pour l'autre (Portnoy et al, 1999). Le transfert de l'ion de Cu se fait par changement successif de sa coordination entre les C15 et C18 d'Atx1, et les C13 et C16 de Ccc2.

L'hydrolyse d'une molécule d'ATP par Ccc2 permet la translocation du Cu vers la lumière du Golgi. À cet endroit, le Cu est dirigé vers les protéines Cu-dépendantes, soit destinées à la membrane plasmique, sécrétées, ou transportées vers d'autres organelles comme la vacuole

(Singh et al, 2006, Urbanowski & Piper, 1999, Yuan et al, 1995). L'homologue humain Atox1 peut compléter la mutation $\Delta atx1$. C'est le cas aussi pour les protéines homologues CCH et CUC-1 d'*A. thaliana* et de *C. elegans*, respectivement. Lorsqu'elles sont exprimées de manière hétérologue chez *S. cerevisiae*, ces protéines peuvent distribuer le Cu au transporteur Ccc2 et ainsi rétablir l'activité oxydante de Fet3 (Himelblau et al, 1998, Klomp et al, 1997, Wakabayashi et al, 1998).

L'apport de Cu à Ccc2 n'est pas strictement dépendant d'Atx1. Les phénotypes associés à la délétion $\Delta atx1$ peuvent être renversés par l'ajout de Cu exogène au milieu de culture. Un mécanisme impliquant l'internalisation du transporteur Ctr1 a été proposé comme voie Atx1-indépendante qui pourrait expliquer l'apport de Cu à Ccc2 (Lin et al, 1997).

2.2.3. Distribution du cuivre à la mitochondrie

La cytochrome c oxydase (CcO) est un complexe multiprotéique essentiel pour la génération d'énergie par la phosphorylation oxydative. Ce complexe, aussi nommé complexe IV, est un résidant de la membrane interne de la mitochondrie (IM). La CcO est la dernière étape de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie. Elle catalyse l'oxydation du cytochrome c réduit couplé à la réduction de l'oxygène en eau, et assure le transport de quatre protons vers l'espace intermembranaire (IMS) de la mitochondrie. Ce complexe est formé de treize (13) sous-unités polypeptidiques, soit pour des fonctions catalytiques, structurales ou régulatrices. Plusieurs cofacteurs sont essentiels pour son activité, dont le Cu, l'hème, le magnésium, et le sodium. Le cœur catalytique de la CcO est composé des sous-unités Cox1, Cox2, et Cox3. Seules Cox1 et Cox2 sont Cu-dépendantes. Cox1 lie un atome de Cu dans un site nommé CuB, qui est adjacent à une molécule d'hème. Cox2, de son côté, lie deux atomes de Cu dans un site nommé CuA. Puisque les sous-unités Cox1, Cox2 et Cox3 sont codées et synthétisées dans la mitochon-

drie, un pool d'ions Cu doit être disponible dans cette organelle afin d'approvisionner les cuproenzymes (Carr & Winge, 2003, Cobine et al, 2006a, Cobine et al, 2006b).

La protéine Cox17 a été la première identifiée comme une métallochaperonne pour la CcO. Il s'agit d'une protéine retrouvée à la fois dans l'IMS de la mitochondrie et dans le cytoplasme (Beers et al, 1997). Au cytoplasme, elle est retrouvée sous sa forme *apo*, dans laquelle les résidus cystéines C26 et C57, ainsi que C36 et C47 forment des ponts disulfure. Une fois dans l'IMS, Cox17 acquiert le Cu. Deux conformations ont été caractérisées; une première où le pont disulfure C26-C57 est isomérisé pour former un pont C24-C57, ce qui permet la coordination d'un atome Cu(I) par les résidus C23 et C26; une autre qui permet la coordination de quatre atomes de Cu(I) par les six résidus hautement conservés C23, C24, C26, C36, C47, et C57, impliquant la rupture des ponts disulfure (Arnesano et al, 2005). Une délétion du gène *COX17* (Δ *cox17*) altère la fonction mitochondriale. Il y a la perte de fonction de la CcO. Les cellules mutantes Δ *cox17* sont incapables de croître avec une source de carbone non-fermentable, tels le glycérol, l'éthanol, ou l'acide lactique. Ce phénotype peut être renversé par l'ajout de Cu exogène au milieu de culture (Glerum et al, 1996).

Cox17 est transloquée à l'IMS, via le complexe TOM, sous sa forme *apo* (*i.e.* sans Cu). Cela implique qu'elle doit acquérir du Cu directement dans la mitochondrie (Maxfield et al, 2004). La grande majorité (> 70 %) du Cu mitochondrial se trouve dans la matrice, sous la forme d'un complexe non-protéique (Cobine et al, 2004, Cobine et al, 2006a). Ce complexe y est emmagasiné par l'action de Pic2, un membre de la *Mitochondrial Carrier Family* (MCF) (Vest et al, 2013). Cette réserve de Cu à la matrice est disponible, notamment, pour Cox17 qui alimente en Cu la CcO, et le pool de Ccs1 qui alimente SOD1 dans l'IMS. Le transporteur qui permet la sortie du complexe de Cu de la matrice n'est pas connu, mais il n'est pas exclu que Pic2 puisse en faire le transport bidirectionnel.

Une fois lié au Cu, Cox17 le distribue à deux protéines de l'IM mitochondriale, soit Sco1 et Cox11. Sco1 est une protéine à un domaine transmembranaire qui peut lier un atome de Cu(I) via un motif CxxxC. Elle a une affinité pour la sous-unité Cox2. Sco1 transférerait spécifiquement le Cu au site CuA de Cox2 (Beers et al, 2002, Cobine et al, 2006b, Lode et al, 2000). Une délétion de *SCO1* provoque une dégradation rapide de Cox2 suite à sa synthèse, présumément puisque Sco1 participerait aussi à l'assemblage de la CcO. Une protéine homologue, Sco2, est impliquée dans une moindre mesure, à l'apport de Cu à Cox2.

Cox11 est aussi une protéine à un domaine transmembranaire qui s'associe en dimère. Chaque monomère peut lier un atome de Cu. Ce sont les résidus cystéines C111, C208, et C210 qui coordonnent l'ion métallique. Cox11 interagit directement avec la sous-unité Cox1 de la CcO. Cox11 distribue le Cu spécifiquement au site CuB de Cox1. Le transfert d'ion serait vraisemblablement couplé à la traduction de Cox1 puisqu'il a été proposé que Cox11 puisse interagir avec le ribosome mitochondrial (Banting & Glerum, 2006, Horng et al, 2004, Khalimonchuk et al, 2005). L'interface de liaison entre Cox17 et Sco1, ou entre Cox17 et Cox11 est différente puisqu'il est possible de séparer ces interactions par mutagenèse. Alors que la déficience en respiration mitochondriale, associée à une délétion de *COX17*, peut être renversée par l'ajout de Cu exogène au milieu de culture, le même phénotype observé dans les mutants *COX11* ou *SCO1* ne peut pas être complètement renversé par l'ajout exogène de Cu.

2.3. Séquestration du cuivre par les métallothionéines

À haute concentration, le Cu est cytotoxique. Il peut catalyser la formation de radicaux hydroxyle qui sont dommageables pour les biomolécules. Ils induisent la peroxydation des lipides, altèrent les chaînes latérales des acides aminés et provoquent le bris des liens phosphodiester ou des

arrêts de synthèse pour les acides nucléiques (Avery et al, 1996, Henle & Linn, 1997, Valko et al, 2005). Les ions Cu peuvent aussi déplacer d'autres ions, tel le Zn. Dans cette situation, le remplacement du Zn des métalloprotéines par le Cu inactive celles-ci (Predki & Sarkar, 1992). Les cellules ont développé des systèmes pour séquestrer le Cu dans le but d'éviter la toxicité reliée à son accumulation cellulaire.

Les métallothionéines (MTs) sont des protéines qui assurent la séquestration réversible de plusieurs ions métalliques, dont le Cu, le Zn, le cadmium, et l'argent. Elles sont riches en résidus cystéines que l'on retrouve arrangés en motifs CxxC, CxC ou CC, qui sont typiques de la coordination d'ions métalliques. Chez la levure à bourgeon, *S. cerevisiae*, deux MTs sont connues pour leur liaison au Cu; Cup1 et Crs5 (Culotta et al, 1994, Ecker et al, 1986). Elles sont responsables de la résistance au Cu. La transcription des gènes *CUP1* et *CRS5* est induite lorsque la concentration intracellulaire de Cu est élevée. La protéine responsable en *trans* de cette activation est le facteur de transcription Cup2, communément connu sous le nom Ace1. Les éléments MREs (Metal Responsive Elements) présents en nombre variable sur le promoteur des gènes cibles sont reconnus par Ace1. La liaison à l'ADN d'Ace1 est Cu-dépendante. De fait, lorsque la concentration en Cu est suffisante, Ace1 peut lier quatre atomes de Cu, ce qui rend son domaine de liaison à l'ADN fonctionnel (Dameron et al, 1993, Strain & Culotta, 1996, Thorvaldsen et al, 1993). Ace1 active aussi la transcription du gène codant pour SOD1. SOD1 qui est très abondant peut tamponner les ions de Cu dans le cytoplasme (Culotta et al, 1995).

2.4. Régulation de l'apport en cuivre

2.4.1. Régulation transcriptionnelle

Chez *S. cerevisiae*, les gènes codant pour le système d'acquisition de Cu à la surface, *i.e.* les transporteurs Ctr1 et Ctr3, et les métalloréductases Fre1 et Fre7, sont régulés transcriptionnel-

lement selon le statut cellulaire en Cu. En effet, en condition de carence en Cu, leur expression est augmentée, alors qu'en abondance de Cu, leur expression est diminuée. Mac1 est le facteur de transcription qui permet cette activation carence dépendante. (Graden & Winge, 1997) C'est une protéine nucléaire qui possède un domaine de liaison à l'ADN (DBD) dans sa portion N-terminale. Dans sa région C-terminale, Mac1 possède un domaine qui jauge la présence de Cu. Une région activatrice de la transcription est également présente. Mac1 reconnaît et lie les éléments en *cis* CuREs (Cu-Responsive Elements). Cet élément régulateur qui possède la séquence consensus 5'-TTTGC(T/G)C(A/G)-3', est retrouvé en deux copies dans le promoteur des gènes cibles, soit en répétition directe ou inversée. En carence de Cu, Mac1 est sous forme *apo*, elle peut alors lier l'ADN et activer la transcription de *CTR1*, *CTR3*, *FRE1* et *FRE7*. Lorsque la concentration intracellulaire de Cu augmente, un pool de Cu nucléaire, de nature encore inconnue, est alors disponible et Mac1 peut lier quatre atomes de Cu qui sont coordonnés par les résidus cystéines du domaine senseur de Cu. Sous sa forme liée par le Cu, Mac1 perd son habileté à lier l'ADN et transactiver les gènes cibles. À une concentration de Cu >10 µM, Mac1 est dégradé assurant ainsi son élimination rapide au niveau protéique (Graden & Winge, 1997, Jensen et al, 1998, Zhu et al, 1998).

2.4.2. Régulation post-traductionnelle de Ctr1

Cet aspect de la régulation du transport du Cu demeure encore controversé. Lorsque les cellules sont exposées à du Cu exogène, il a été rapporté que Ctr1 subit différentes régulations. Un premier groupe a décrit que Ctr1 est internalisée à de faibles concentrations en Cu (0,1 à 1 µM) et qu'à plus fortes concentrations (> 10 µM), Ctr1 est plutôt dégradée à la membrane sans être internalisée (Ooi et al, 1996). Une autre équipe de recherche a corroboré l'endocytose de Ctr1. De plus, elle a montré que cette endocytose est dépendante de l'ubiquitination de Ctr1, et qu'une fois internalisée, Ctr1 est dirigée vers la vacuole où elle est dégradée (Liu et al, 2007).

Un autre groupe n'a observé aucune dégradation, ni aucun mouvement de la protéine Ctr1, et ce, quelque soit les conditions en Cu. Ces auteurs proposent plutôt que le transporteur subit des modifications structurales induites par une abondance en Cu. Leur modèle propose que la portion C-terminale de Ctr1 agisse en tant que senseur de Cu en coordonnant le Cu via l'intermédiaire de résidus cystéines (C304, C310, C312, C363, et C365) Cette coordination des ions de Cu inhiberait le transport de ces derniers lorsqu'ils sont en concentrations trop élevées (Wu et al, 2009). D'autre part, les groupes de recherche s'entendent pour affirmer que Ctr3 n'est pas assujettie à un contrôle post-traductionnelle selon les concentrations en Cu dans le milieu (Pena et al, 2000).

3. Homéostasie du cuivre chez *Schizosaccharomyces pombe*

Nous nous intéresserons maintenant à ce qui est connu des mécanismes moléculaires de l'homéostasie du Cu chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*. Bien qu'historiquement elle ait été moins utilisée pour des études, elle présente l'avantage d'être plus ressemblante aux cellules de mammifères que la levure à bourgeon *S. cerevisiae*. Plusieurs processus biologiques, tels la division cellulaire par fission, l'épissage des ARN, l'interférence par ARN, et la méiose sont plus apparentés aux mécanismes similaires retrouvés chez les cellules de mammifères.

Un portrait global de l'homéostasie du Cu chez la levure à fission est présenté à la figure 3. La figure illustre les transporteurs de Cu, et des exemples clés de cuproenzymes approvisionnées en ion métallique par des protéines chaperonnes.

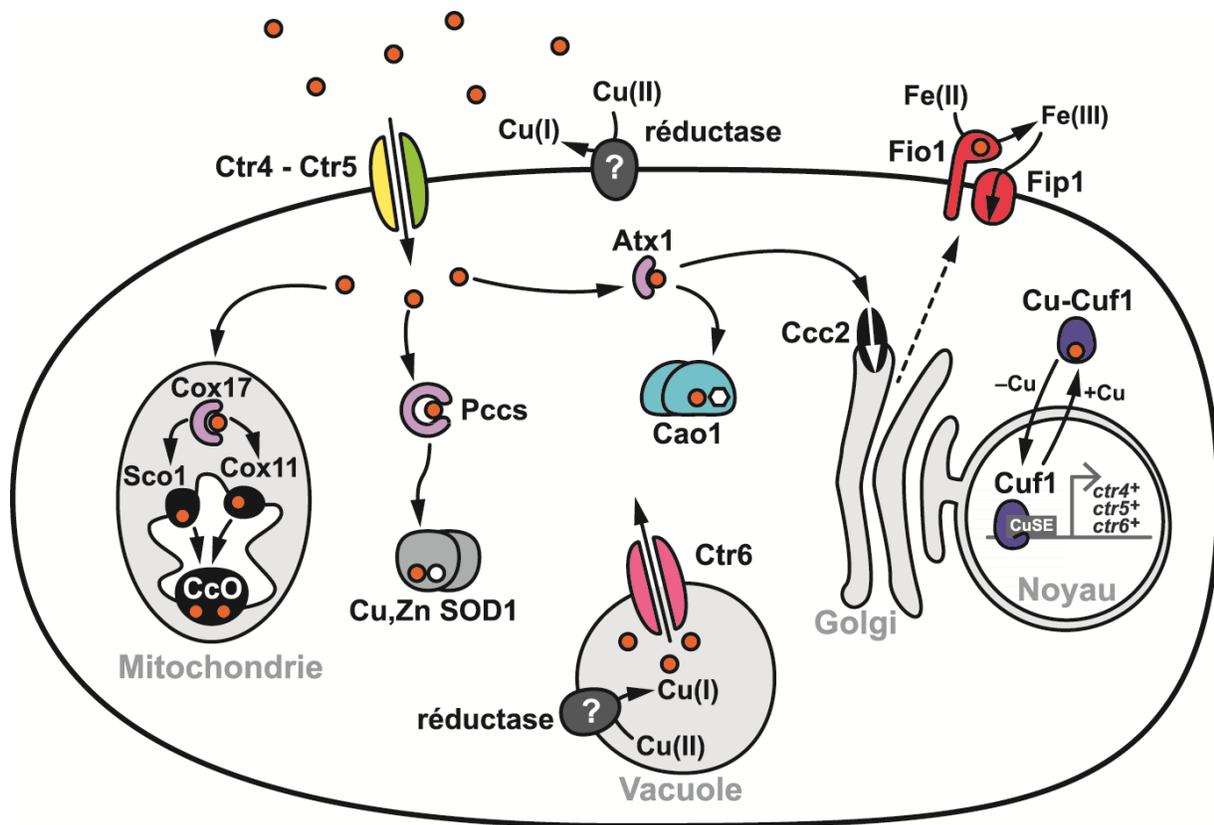


Figure 3. Homéostasie du Cu chez *Schizosaccharomyces pombe* en prolifération. Le Cu serait réduit dans l'environnement et la lumière de la vacuole par des réductases non caractérisées (?). Les ions Cu sont alors transportés vers le cytoplasme par les protéines Ctr4, Ctr5 et Ctr6. Ctr4 et Ctr5 forment un hétérocomplexe à la membrane plasmique et Ctr6 homotrimérise à la vacuole. La chaperonne Pccs fournit spécifiquement le Cu à l'enzyme Cu/Zn SOD1. Atx1 approvisionne en Cu l'amine oxydase Cu-dépendante Cao1. Atx1 est aussi impliquée dans la livraison de Cu au sentier de sécrétion, potentiellement via le transporteur golgien Ccc2, fournissant le Cu aux cuproprotéines qui y transitent telle l'oxydase Fio1. Cette enzyme catalyse l'oxydation du Fer dans l'environnement préalablement à son transport via la perméase Fip1. Cox17 est impliqué dans l'apport de Cu à la cytochrome c oxydase (CcO) avec la participation présente des protéines Cox11 et Sco1. En carence de Cu (-Cu) le facteur de transcription Cuf1 se localise au noyau et active la transcription des gènes *ctr4+*, *ctr5+* et *ctr6+* qui codent pour les transporteurs de Cu. En surplus de Cu (+Cu), Cuf1 lie le Cu et est exporté hors du noyau. Rond orange, Cu; rond blanc, Zn; hexagone blanc, TPQ.

Encore une fois, je désire attirer l'attention du lecteur sur les règles de typographie utilisées pour la nomenclature. Chez *S. pombe*, le nom des gènes est composé de trois lettres suivies d'un nombre entier. Leur nom s'écrit en fonte italique avec toutes les lettres minuscules en ajoutant le

symbole plus (+) à la fin. Pour référer à une protéine, son nom doit être écrit en fonte romaine, la première lettre majuscule et les autres minuscules. La superoxyde dismutase est une exception, du fait que la graphie commune de cette enzyme chez *S. pombe* est en fonte romaine avec tous les caractères majuscules.

3.1. Acquisition du cuivre

3.1.1. Transport de surface.

Chez *S. pombe*, l'acquisition du Cu depuis l'environnement est aussi dépendante de la réduction du Cu(II) en Cu(I). Deux métalloréductases, Frp1 et Frp2, ont été identifiées chez *S. pombe* par homologie de séquence avec les métalloréductases de *S. cerevisiae*. Un rôle pour Frp1 dans la réduction du Fe(III) en Fe(II) couplée à l'acquisition de haute affinité du Fe a déjà été décrit (Roman et al, 1993). Il est donc fort probable qu'elle soit aussi impliquée dans la réduction du Cu en surface. De son côté, Frp2 n'a pas encore été caractérisée.

Une fois réduit, le Cu dans l'environnement est transporté à travers la membrane plasmique par un hétérocomplexe composé des protéines membranaires Ctr4 et Ctr5. Contrairement aux transporteurs Ctr1 et Ctr3 de la levure à bourgeon, leur activité est interdépendante, de même que leur trafic jusqu'à la membrane plasmique. En absence d'une des sous-unités, l'autre ne peut pas assurer seule l'import du Cu dans la cellule. En absence de Ctr5, Ctr4 reste trappée dans le réticulum endoplasmique (ER). Une situation identique est observée pour Ctr5, en l'absence de Ctr4 (Zhou & Thiele, 2001). Une seule sous-unité Ctr5 et au moins deux sous-unités Ctr4 doivent s'assembler durant leur passage dans le sentier de sécrétion pour former un complexe fonctionnel à la membrane plasmique (Ioannoni et al, 2010). Il est hautement probable qu'ils forment un hétérotrimère à la surface des cellules.

Ctr4 et Ctr5 présentent les caractéristiques communes de cette famille de transporteurs. Elles sont prédites pour avoir trois domaines transmembranaires, et elles présentent les différents motifs essentiels pour leurs activités. D'abord, des Mets motifs, MxM ou MxxM, dans leur portion N-terminale extracellulaire, qui sont importants pour la captation du Cu extracellulaire. Ctr4 en présente cinq, alors que Ctr5 en présente deux en plus d'un motif alternatif CxMxM. À environ 20 résidus en amont de leur premier domaine transmembranaire se retrouve un résidu méthionine conservé. Finalement, leurs deuxième et troisième domaines transmembranaires contiennent les motifs MxxxM et GxxxG, respectivement. Le motif MxxxM est requis pour le transport du Cu à travers la membrane, alors que le motif GxxxG est impliqué dans la formation de l'hétérocomplexe à la surface cellulaire (Aller et al, 2004).

L'hétérocomplexe Ctr4 – Ctr5 est responsable du transport de haute affinité du Cu par la cellule. La délétion des gènes *ctr4+* et *ctr5+* (*ctr4Δ ctr5Δ*) induit plusieurs phénotypes reliés à l'altération de l'activité d'enzymes Cu-dépendantes. La cytochrome c oxydase (CcO), la superoxyde dismutase 1 (SOD1), et l'amine oxydase Cu-dépendante 1 (Cao1) sont des exemples d'enzymes dont l'activité est affectée par l'inhibition du transport de haute affinité (Beaudoin et al, 2011b, Laliberte et al, 2004, Peter et al, 2008). Ces données révèlent l'importance de l'activité de l'hétérocomplexe Ctr4-Ctr5 pour l'approvisionnement adéquat en Cu aux cuproenzymes. L'ajout de Cu exogène (>25 µM) au milieu de culture permet de rétablir l'activité des cuproenzymes comme la CcO, la Cao1 et la SOD1. Cette observation met en lumière la présence de systèmes d'acquisition du Cu de plus faible affinité, mais les composantes moléculaires qui y participent demeurent inconnues.

3.1.2 Transport vacuolaire

Chez *S. pombe*, le transporteur Ctr6 permet la mobilisation des réserves de Cu vacuolaires. Cet-

te protéine homotrimérisée à la membrane des vacuoles où elle permet la sortie du Cu vers le cytoplasme. Ce modèle est supporté par le fait qu'une délétion du gène *ctr6+* (*ctr6Δ*) provoque une diminution de l'activité de la Cu/Zn SOD1. De plus, la surexpression de *ctr6+* augmente la sensibilité des cellules au Cu, malgré que l'acquisition du Cu depuis le milieu extracellulaire soit diminuée (Bellemare et al, 2002). Ces observations suggèrent que l'activité de Ctr6 permet d'augmenter le réservoir de Cu cytoplasmique, et que celui-ci est disponible pour les enzymes Cu-dépendantes.

3.2. Distribution intracellulaire du cuivre

Une fois que le Cu a atteint le cytoplasme, il est pris en charge par différentes chaperonnes qui assurent une distribution spécifique de l'ion métallique aux cuproenzymes. Des molécules candidates chez *S. pombe* pour le trafic du Cu ont été identifiées par homologie de séquences avec les chaperonnes de *S. cerevisiae*.

La protéine Ccs1, aussi nommée Pccs, est l'homologue de Ccs1 de *S. cerevisiae* (yCcs1) (Liberte et al, 2004). Elles partagent 30 % de similitude, mais des différences appréciables les distinguent. En effet, contrairement à yCcs1 qui contient trois domaines, Pccs en possède quatre, nommés domaines I, II, III et IV. Les trois premiers domaines sont fonctionnellement similaires aux domaines I, II et III, respectivement, de yCcs1. Les domaines I à III de Pccs (Pccs I-III) assurent, seuls, l'activation complète de la SOD1 lorsqu'ils sont exprimés dans une souche mutante pour *pccs+* (*pccsΔ*). De plus, Pccs I-III se substitue à yCcs1 puisque son expression hétérologue dans une souche de *S. cerevisiae Δccs1* rétablit l'activation de la SOD1. Malgré que le domaine I de Pccs ne contienne pas le motif de liaison au Cu MxCxxC, il est tout de même essentiel pour l'activation de la SOD1 en condition de carence en Cu. Le domaine IV de Pccs, pour sa part, est très semblable aux MTs. En effet, il est riche en résidus cystéines, qui sont organi-

sés en motif CC. L'expression du domaine IV de Pccs (Pccs IV) de manière hétérologue dans une souche de *S. cerevisiae* $\Delta ace1$, confère aux cellules une résistance au Cu. Le phénomène a aussi été observé chez *S. pombe*. L'expression de Pccs IV permet de renverser le phénotype de sensibilité au Cu associé à la surexpression de Ctr6. À l'inverse, la délétion *pccs* Δ rend les cellules moins résistantes au Cu. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que Pccs agit comme activateur de la SOD1 et contribue à la détoxification du Cu chez *S. pombe* (Laliberte et al, 2004).

Une deuxième chaperonne, Atx1, a été caractérisée chez *S. pombe* (Peter et al, 2008). Elle partage 57 % de similarité avec la chaperonne Atx1 de la levure à bourgeon (*yAtx1*). Le motif de liaison au Cu, MxCxxC et d'ailleurs retrouvé chez les deux protéines. Atx1 est importante pour l'apport du Cu à l'amine oxydase Cu-dépendante 1 (Cao1). Cette enzyme permet l'oxydation d'amines primaires en aldéhydes correspondants, en ammoniac et en peroxyde d'hydrogène (voir section 4.1). La Cao1 est une enzyme dimérique, dont chaque sous-unité lie un ion Cu. La délétion du gène *atx1+* (*atx1* Δ) affecte grandement l'activité de la Cao1. Cependant, une activité résiduelle, représentant 20 à 30 % de l'activité de type sauvage, est détectable. Cela laisse supposer qu'il existe un sentier d'approvisionnement en Cu Atx1-indépendant vers la Cao1. Ce sentier alternatif est dépendant lui aussi du transport de haute affinité puisque la délétion *ctr4* Δ *ctr5* Δ abolie complètement l'activité de la Cao1. Le phénotype associé à la délétion *atx1* Δ n'est pas totalement renversé par l'ajout de Cu exogène au milieu de culture. Atx1 et Cao1 interagissent ensemble. Atx1 possède à sa surface des résidus basiques qui créent des forces ioniques pouvant favoriser des interactions de nature protéine-protéine. Chez *S. pombe*, Atx1 possède des résidus basiques qui sont hautement conservés. La mutation des résidus arginines R20 et R24, et des lysines K55, K56 et K59 d'Atx1 altère l'interaction entre cette dernière protéine et Cao1 (Peter et al, 2008).

La protéine Ccc2 chez *S. pombe* n'a pas encore été caractérisée. Les domaines importants pour l'activité de Ccc2 sont conservés autant chez la protéine de *S. pombe* que celle de *S. cerevisiae*, ce qui laisse supposer une activité similaire pour les deux protéines. Un essai double hybride a permis d'observer une interaction entre Atx1 et le domaine N-terminal de Ccc2 (résidus 1 à 163). Cette interaction est du même ordre de grandeur que l'interaction entre Atx1 et Cao1. Ces résultats suggèrent qu'Atx1 assure également l'apport en Cu au transporteur golgien Ccc2 (Peter et al, 2008).

La chaperonne Cox17 de *S. cerevisiae* (yCox17) possède un homologue chez *S. pombe*, nommé Cox17. Elles partagent 47 % d'homologie. Les résidus cystéines essentiels à yCox17 pour la formation de ponts disulfure et la coordination du Cu sont conservés chez Cox17. Ces observations suggèrent que Cox17 a une fonction similaire chez *S. pombe*. L'inactivation du gène *cox17+* cause l'incapacité pour les cellules à croître sur un milieu non-fermentable, suggérant une fonction importante pour Cox17 dans l'apport en Cu à la CcO. Les protéines Cox1101 (ou simplement Cox11) et Sco1 sont les homologues des protéines de *S. cerevisiae* yCox11 et ySco1 respectivement. Malgré le fait que leur participation à la distribution du Cu à la CcO n'a pas encore été démontrée, leur fort pourcentage d'homologie suggère que leur fonction est apparentée aux protéines correspondantes de *S. cerevisiae*.

3.3. Régulation des transporteurs

3.3.1. Régulation transcriptionnelle

La levure à fission *S. pombe* doit ajuster adéquatement l'expression des transporteurs de Cu. D'abord pour permettre l'acquisition de Cu dans des conditions de carence, aussi, pour restreindre son entrée lorsque le Cu est abondant afin d'éviter son accumulation toxique. En carence de Cu, la transcription des gènes *ctr4+*, *ctr5+* et *ctr6+* est induite alors qu'en surplus de Cu, leur ex-

pression est réprimée. C'est le facteur de transcription Cuf1 qui est responsable de cette régulation (Labbe et al, 1999). Une souche mutante *cuf1Δ* présente des phénotypes associés à une carence en Cu; une perte de viabilité sur une source de carbone non fermentable, un défaut des activités SOD1 et Cao1, et une défaillance de l'acquisition du Fe.

L'activation de la transcription des gènes cibles de Cuf1 dépend d'éléments de régulation retrouvés au promoteur de ces gènes. Cuf1 lie les séquences consensus 5'- D(T/A)DDHGCTGD-3', nommées CuSEs (Cu Signaling Elements), retrouvées en nombre variable dans les promoteurs de *ctr4+*, *ctr5+*, et *ctr6+* (Beaudoin & Labbe, 2001).

Cuf1 est l'homologue fonctionnel de Mac1 chez *S. cerevisiae*. Les 174 premiers résidus de Cuf1 sont capables de lier les éléments CuSEs *in vitro*. Il a d'ailleurs été confirmé *in vivo*, par immunoprécipitation de la chromatine, que Cuf1 lie les CuSEs en carence de Cu, alors que l'ajout de Cu au milieu de culture provoque la libération de Cuf1 de la chromatine. Un modèle de la modulation de l'activité de Cuf1 a été proposé. En carence de Cu, le signal de localisation nucléaire (NLS, résidus 11 à 53) de Cuf1, via une importine encore inconnue, permet la localisation nucléaire de Cuf1, où il active la transcription des gènes cibles. En condition d'abondance, Cuf1 se lierait au Cu par une séquence riche en résidus cystéines (CxCxxxCxCxxCxxH, résidus 328 à 342), qui a une grande similarité au domaine senseur de Cu de Mac1. La liaison du Cu induit des changements structuraux. Cuf1 adopte alors une conformation qui masque le NLS. Ces changements provoquent l'accumulation de Cuf1 au cytoplasme. Lors de la transition de faible à haute concentration en Cu, les molécules Cuf1 déjà présentes au noyau fixent le Cu et changent de conformation de telle sorte qu'elles ne puissent plus lier l'ADN et qu'un signal d'export nucléaire (NES, résidus 349 à 358) devienne accessible. Le NES est alors reconnu par l'exportine Crm1 qui se charge de l'export de Cuf1 du noyau vers le cytoplasme (Beaudoin & Labbe, 2006, Beaudoin et al, 2013).

3.3.2. Régulation post-traductionnelle de Ctr4 et Ctr5

Il a été observé que l'hétérocomplexe Ctr4-Ctr5 est internalisé après l'ajout de Cu exogène au milieu de culture. Ce phénomène n'est cependant pas le moyen privilégié par la levure à fission pour le contrôle du transport de Cu. La régulation transcriptionnelle est beaucoup plus sensible, du fait que l'ajout de seulement 1 μM de Cu est suffisant pour la répression des gènes *ctr4+* *ctr5+*, alors que la même concentration n'a aucun effet sur la localisation des transporteurs. L'endocytose de l'hétérocomplexe est un effet à long terme. Elle s'observe un minimum de trois heures après l'ajout de Cu (Ioannoni et al, 2010). Après l'internalisation des transporteurs, si le Cu exogène est retiré et qu'un chélateur de Cu est ajouté au milieu, les transporteurs sont recyclés à la membrane plasmique. Les composantes et les mécanismes moléculaires qui sont responsables de l'endocytose et du recyclage Cu-dépendant des transporteurs sont encore inconnus.

4. Cuproenzymes

Chez les eucaryotes, un peu plus d'une trentaine d'enzymes nécessitent du Cu comme cofacteur. Parmi celles-ci, plusieurs jouent des rôles métaboliques importants expliquant la raison pour laquelle le Cu est requis au déroulement de divers processus biologiques. Les amines oxydases dépendantes du Cu (déamination d'amine primaire), la superoxyde dismutase (protection contre le stress oxydatif), la tyrosinase (pigmentation), la ferroxidase (transport du Fe), la dopamine β -mono-oxygénase (synthèse de la norépinephrine, ou noradrénaline), et la lysyl oxydase (synthèse de la matrice extracellulaire) sont des exemples de cuproenzymes. Dans les prochaines sections je décrirai un peu plus en détails deux de ces enzymes qui sont d'intérêt pour le présent mémoire. Il s'agit des amines oxydases Cu-dépendantes (CAOs), et la superoxyde dismutase.

4.1. Les amines oxydase Cu-dépendantes

Ces enzymes sont conservées de la bactérie à l'homme . Seules quelques espèces sont connues pour ne posséder aucune CAO dont la levure *S. cerevisiae*, le nématode *C. elegans*, et la mouche *Drosophila melanogaster* (Mure, 2004). Cette classe d'enzyme (EC 1.4.3.6) est active sous forme dimérique. Les CAOs catalysent l'oxydation d'amines primaires telle que la réaction schématisée à la figure 4a. Les produits de cette oxydation sont l'aldéhyde, du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniaque.

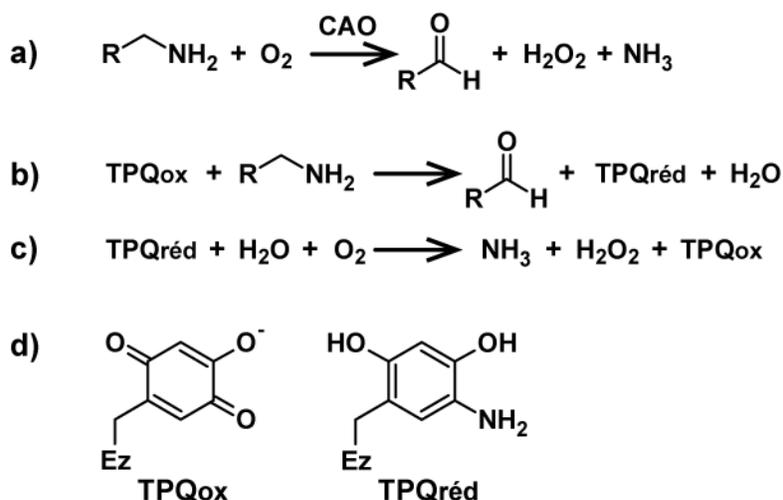


Figure 4. Schématisation de la réaction catalysée par les CAOs. (a) Réaction globale, (b) première et (c) deuxième étape de la réaction, et (d) structure des deux états du cofacteur organique, le TPQ oxydé (ox), ou réduit (red) au site actif de l'enzyme (Ez)

Les CAOs possèdent deux cofacteurs : un ion Cu(II) et un cofacteur organique, le TPQ (2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone) (Janes et al, 1992). Le TPQ est dérivé d'un résidu tyrosine situé au site catalytique de l'enzyme qui est modifiée post-traductionnellement (figure 4d). La séquence TxxNY*(D/E)Y dans laquelle le résidu tyrosine modifié se retrouve est très bien conservée au site catalytique des CAOs (Choi et al, 1996). C'est le premier résidu tyrosine de ce motif (Y*) qui est le précurseur du TPQ. Bien que les résidus de ce motif soient critiques à la

formation du TPQ, ils ne sont pas suffisants à sa formation. La participation d'un ion Cu(II) est aussi essentielle à la formation du cofacteur organique. Le Cu est coordonné par trois résidus histidines conservés. Il est positionné à proximité du site catalytique. La synthèse du TPQ est autocatalytique, et requiert la présence d'oxygène (Cai & Klinman, 1994, Chen et al, 2000, Wilmot, 2003).

La première partie de la réaction (figure 4b) implique la réduction du TPQ et la libération de l'aldéhyde. Puis, en second lieu (figure 4c), la consommation d'une molécule d'oxygène résulte en l'oxydation du TPQ, la génération de peroxyde d'hydrogène, et la libération d'ammoniac (Brazeau et al, 2004). Le Cu a le rôle de stabiliser un anion superoxyde qui apparaît comme intermédiaire durant la deuxième partie de la réaction. Pour les bactéries et les eucaryotes unicellulaires, telles les levures, les CAOs ont un rôle métabolique puisqu'ils sont une source de carbone et d'azote (Cooper et al, 1992, Corpillo et al, 2003). Chez les plantes, les CAO membranaires sont impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire. Le peroxyde d'hydrogène produit par ces enzymes est le substrat d'une peroxydase qui participe à la lignification de la paroi (Rea et al, 1998). Chez les mammifères l'activité des CAO a été associée à plusieurs processus physiologiques tels le métabolisme du glucose (Enrique-Tarancón et al, 1998), la migration des leucocytes (Salmi & Jalkanen, 1992), et la détoxification d'amines circulantes (O'Sullivan et al, 2004).

4.2. Cu/Zn superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase Cu/Zn dépendante, généralement annotée SOD1, est remarquablement bien conservée chez presque tous les organismes. Elle a un rôle crucial dans la protection des cellules contre le stress oxydatif (McCord & Fridovich, 1969). Plus récemment, un rôle pour SOD1 dans la transmission d'un signal venant du glucose et de l'oxygène pour la

répression de la respiration chez *S. cerevisiae* a été rapporté (Reddi & Culotta, 2013). SOD1 catalyse la disproportion de deux anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (figure 5a).

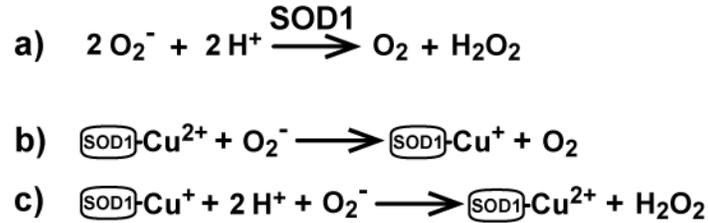


Figure 5. Schématisation de la disproportion des anions superoxydes par la SOD1. (a) Réaction globale catalysée par SOD1, et (b) première et (c) deuxième partie de la réaction.

Le Cu(II) participe à la réaction d'oxydoréduction. Il est coordonné par quatre résidus histidines (H47, H49, H64, et H121) au site catalytique. L'ion de Zn a plutôt un rôle structural, mais est tout aussi important. La réaction catalysée par SOD1 peut être divisée en deux étapes. La réduction d'un premier anion superoxyde en oxygène moléculaire est couplée à la réduction de Cu(II) en Cu(I) (figure 5b-1). Un deuxième anion superoxyde est ensuite réduit en peroxyde d'hydrogène. Cette réaction, couplée à l'oxydation du Cu(I) en Cu(II), consomme deux protons. Un premier provient du résidu histidine H64 qui est resté protoné après la première réaction, et le deuxième proton provient du solvant (Hart et al, 1999).

5. Méiose chez les eucaryotes

La méiose est un processus essentiel pour la reproduction des organismes sexués. Les gamètes de sexes opposés (spermatozoïdes chez le mâle et ovules chez la femelle) se fusionnent pour former un zygote. La méiose est la division cellulaire spécialisée qui permet la formation de quatre gamètes haploïdes à partir d'une cellule germinale diploïde. La succession de deux divisions du matériel génétique, impliquant la séparation des chromosomes homologues suivie de la ségrégation des chromatide sœur, résulte en quatre jeux haploïdes de chromosomes. La méio-

se est aussi essentielle pour la diversité génétique. L'entrée dans le cycle méiotique implique une étape de recombinaison entre les chromosomes homologues, ce qui en fait une source importante d'échange de matériel génétique. Cette étape est unique à la méiose. Après les divisions cellulaires successives, il y a une phase de maturation de chacun des gamètes et de l'enveloppe qui les entoure afin qu'ils soient fonctionnels et viables.

La levure à fission *S. pombe* est aussi un modèle couramment utilisé pour l'étude de la méiose. En effet, le processus méiotique chez *S. pombe* est très similaire à celui des eucaryotes supérieurs.

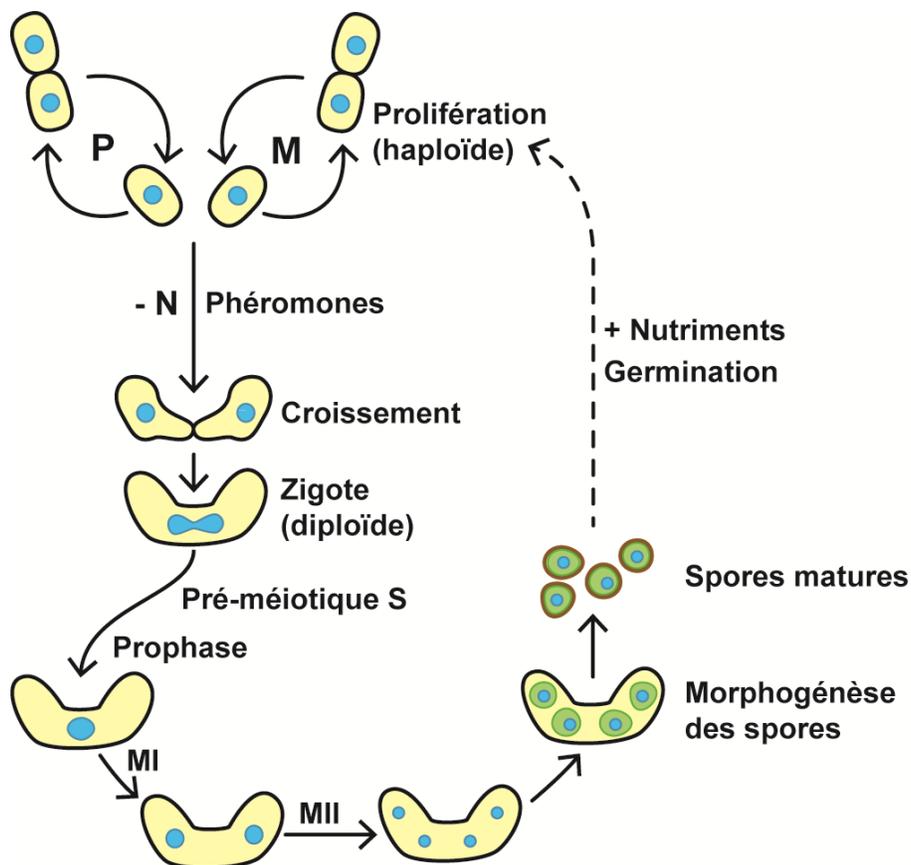


Figure 6. Processus méiotique chez *Schizosaccharomyces pombe*. Les cellules haploïdes prolifèrent par mitoses successives. La réponse des cellules à une carence en azote (-N), via la communication par les phéromones est le croisement des cellules de types sexuels opposés (P et M). Le croisement forme une

cellule diploïde. La phase pré-méiotique S et la prophase préparent la cellule diploïde aux deux divisions méiotiques (MI, MII). La morphogénèse des spores qui suit les divisions méiotiques est l'étape de maturation des gamètes afin d'assurer leur viabilité dans l'environnement après leur libération de l'ascus. Le retour à des conditions optimales de croissance (+Nutriments) se traduit par la germination des spores qui retourneront à un état de cellules en prolifération. Bleu, matériel génétique; vert, membrane des spores; brun, parois des spores.

6. Méiose chez *S. pombe*

Chez la levure à fission, au terme de la méiose, les gamètes matures sont appelés spores. Ils sont résistants à un grand nombre de stress, dont la chaleur, la digestion enzymatique et plusieurs solvants organiques (e.g. éthanol et éthoxyéthane). Cette résistance est due à la paroi des spores qui est plus épaisse et de composition différente de la paroi des cellules végétatives (Yoo et al, 1973). Si les conditions optimales de croissance sont réunies, les spores germent et forment des cellules végétatives qui proliféreront. La sporulation est un processus cellulaire global qui est le chevauchement de la méiose et de la morphogénèse des spores. Les prochaines sections décrivent les différentes étapes de la sporulation chez *S. pombe* : (1) induction de la méiose, (2) divisions méiotiques, et (3) morphogénèse des spores. Un portrait global de ce processus est présenté à la figure 6. Les étapes clés de la sporulation depuis l'induction de la différenciation chez les cellules végétatives jusqu'à la libération des spores matures et leur germination sont illustrées.

6.1. Phases de la sporulation

6.1.1. Induction de la méiose

Chez *S. pombe*, la disponibilité des nutriments, plus particulièrement le carbone et l'azote, dicte le programme cellulaire à privilégier par les cellules. Lorsqu'ils sont abondants, les cellules en

état végétatif se divisent par mitoses successives. Dans ces conditions optimales de croissance, le facteur de transcription clé de la transition de la prolifération cellulaire vers la différenciation sexuelle, *Ste11*, est très faiblement exprimé (Qin et al, 2003, Yamamoto, 2004). L'abondance de glucose et d'azote dans l'environnement sont des signaux qui participent à la répression du gène *ste11+*. Lorsque le glucose est abondant, la sous-unité α , Gpa2, d'une protéine G hétérotrimérique est activée par le récepteur putatif du glucose Git3. La suite de la cascade d'activation entraîne l'accumulation d'AMP cyclique (AMPC), et conséquemment l'activation de la protéine kinase AMPC-dépendante Pka1. Cette dernière régule négativement la transcription de *ste11+* par phosphorylation et inactivation du facteur de transcription à doigts de Zn Rst2. L'abondance en azote a plutôt comme conséquence d'activer le complexe TORC1, essentiel à la répression de *ste11+* (Otsubo & Yamamoto, 2012). À l'opposé, si les cellules sont carencées en glucose et en azote, l'expression de *ste11+* est augmentée. D'abord, parce que ces conditions favorisent l'inactivation de Pka1 et du complexe TORC1. De plus, le stress métabolique causé par la carence active la cascade de signalisation stress-dépendante des MAP kinases (MAPKs) Mcs4, Wis4 et Wis1. Cette cascade est cruciale à la phosphorylation du résidu sérine S2 (S2P) des heptades répétées du domaine C-terminal de la Pol II (CTD Pol II) par la CTDK-1. La phosphorylation S2P est associée à une activation de l'expression de *ste11+* (Coudreuse et al, 2010, Sukegawa et al, 2011).

Ste11 est le facteur de transcription majeur qui assure, d'une part l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, et d'autre part, l'induction de la différenciation méiotique. *Ste11* active notamment les gènes de type sexuel. Le locus *mat1+* est la région active transcriptionnellement qui code pour les gènes de différenciation sexuelle. Ils sont de deux types, soit P (*mat1-P*) ou M (*mat1-M*) (Otsubo & Yamamoto, 2012). Une souche est dite homothallique (h90) lorsque les cellules peuvent interchanger de type sexuel par transposition. Par contre, elle est dite hétérothallique si les cellules ne peuvent pas changer de type (h+, pour une souche strictement de type P, ou h- pour une

souche strictement de type M).

Les phéromones ont un rôle essentiel dans la communication intercellulaire préalablement à l'initiation de la méiose. Les protéines Mat1-Pc et Mat1-Mc, codées par l'un des deux gènes au locus *mat1*, régulent la production des phéromones et de leur récepteur. Une cellule de type P exprime alors à sa surface le récepteur aux phéromones M Map3, et libère dans son environnement la phéromone P, un dérivé polypeptidique de la protéine Map2. Une cellule de type M exprime à sa surface le récepteur aux phéromones P Mam2, et libère la phéromone M, un dérivé des protéines Mfm1 à 3. La stimulation d'un récepteur par la liaison d'une phéromone active la sous-unité α , Gpa1, d'une protéine G hétérotrimérique. Il y a alors transmission d'un signal par la cascade des MAPKs Byr2 et Byr1 jusqu'à Spk1 qui active la transcription de *ste11+* (Hiragaya & Yamamoto, 2007, Nielsen, 2004). De plus, cette cascade de signalisation est nécessaire à la transcription de l'autre gène des locus *mat1*, soit *mat1-Pi+* et *mat1-Mi+*.

La stimulation par les phéromones entraîne une croissance polarisée de la cellule. Le régulateur de la polarisation Cdc42 est responsable de diriger la projection en croissance vers la source des phéromones (Bendezu & Martin, 2013). Cette croissance est observée chez les deux types sexuels. Lorsque les projections de deux cellules de types opposés à proximité l'une de l'autre se rencontrent, il y a fusion des cellules (Merlini et al, 2013). La fusion de leur noyau, la caryogamie, conclut la formation du zygote diploïde. L'expression simultanée de *mat1-Pi+* et *mat1-Mi+* dans un zygote est nécessaire à l'expression de *mei3+*. La protéine Mei3 sert de pseudo substrat à la kinase Ran1, plus communément connue sous le nom Pat1, qui phosphoryle notamment Mei2 (McLeod & Beach, 1988). La transcription du gène *mei2+* est activée par Ste11. La phosphorylation de Mei2 conduit à sa dégradation par le protéasome, ce qui prévient l'entrée hâtive des cellules dans le cycle méiotique. L'inactivation de la kinase Pat1 par Mei3, dans les zygotes diploïdes, entraîne subséquemment l'accumulation de Mei2. La liaison de Mei2 à ses

ARNs cibles est primordiale à l'entrée irréversible des cellules en méiose (Harigaya & Yamamoto, 2007). L'activité de Mei2 assure la progression de la phase pré-méiotique S, durant laquelle il y a duplication du matériel génétique de la cellule diploïde. Cette dernière étape est suivie de la prophase méiotique qui compte les événements de recombinaison entre les chromosomes homologues.

Après la fusion de cellules haploïdes de types sexuels opposés, si la carence en nutriments persiste, les zygotes sont entraînés rapidement dans le cycle méiotique. Dans ces conditions, la méiose est dite zygotique. Alternativement, si les zygotes fraîchement obtenus retrouvent un milieu riche, ils s'engagent alors dans le cycle mitotique. Les cellules diploïdes peuvent ainsi proliférer transitoirement de manière végétative. Une carence soudaine en nutriments engage alors ces cellules diploïdes en méiose qui est dite azygotique. L'entrée en méiose azygotique se fait de manière plus synchronisée que la méiose zygotique. La méiose induite par Pat1, est couramment utilisée pour une meilleure synchronisation des cellules. Un des points critiques de l'induction de la méiose est l'inactivation de la kinase Pat1 en réponse à la carence d'azote. L'allèle pat1-114 code pour une kinase Pat1 thermosensible (Bahler et al, 1991). À la température de restriction (34 °C), Pat1-114 est inactivée et la croissance des cellules qui l'expriment est inhibée, permettant à ces dernières de s'engager dans le cycle méiotique et la sporulation. À température plus basse, (e.g. 25 °C) Pat1-114 est active ce qui permet une croissance végétative normale. Ce système d'induction de la méiose permet une excellente synchronisation des cellules. Il s'est avéré être un outil important dans l'étude de l'activité transcriptionnelle lors de la méiose (Bahler et al, 1991, Beaudoin et al, 2011a, Ioannoni et al, 2012).

6.1.2. Divisions méiotiques

Après une étape de réplication de l'ADN, le zygote compte deux copies de chacun des trois

chromosomes issus des deux cellules qui ont fusionnées. La tâche sera de les ségréger en quatre jeux haploïdes de chromosomes. Deux divisions successives permettent en premier lieu la séparation des chromosomes homologues (méiose I, MI), et finalement la ségrégation des chromatines sœurs (méiose II, MII). Les mouvements chromosomiques sont gouvernés par les microtubules méiotiques. Ce sont des structures analogues au faisceau mitotique qui sépare les chromosomes homologues durant la mitose. Les microtubules méiotiques ne commencent à se former qu'aux métaphases I et II, c'est-à-dire à l'alignement des chromosomes à l'équateur des noyaux. La polymérisation des microtubules est régulée par le corps polaire du faisceau (*Spindle Pole Body*, SPB) (Funaya et al, 2012). Il s'agit d'une structure protéique équivalente au centrosome chez les eucaryotes supérieurs. Chez la levure *S. pombe*, il agit comme un centre régulateur des microtubules, mais il participe à d'autres fonctions, notamment la régulation du cycle cellulaire et les points de contrôle des dommages à l'ADN. Durant l'interphase, le SPB réside au cytoplasme, à proximité du noyau. C'est seulement à la phase pré-méiotique S que le SPB est inséré de part en part de la double membrane nucléaire.

Durant tout le processus méiotique, les composantes protéiques du SPB sont en constante réorganisation afin d'accomplir de manière coordonnée les différentes fonctions dont il est responsable (Ohta et al, 2012). Durant l'initiation de la méiose, la caryogamie est un processus qui est initié par la fusion des SPB des noyaux parentaux. Suivant la phase de réplication du matériel génétique, la protéine Hrs1, transitoirement localisée au SPB, entraîne des mouvements oscillatoires du noyau. La déformation typique du noyau rappelant la forme d'une queue de cheval (*horse-tail*) est une caractéristique de la prophase chez *S. pombe* (Funaya et al, 2012). Cet événement promeut les recombinaisons méiotiques entre chromosomes homologues. Au début de la métaphase, le recrutement de la kinase Plo1 au SPB est essentiel pour la duplication et la migration des SPBs jusqu'aux pôles du noyau (Ohta et al, 2012). De là, les SPBs guident la polymérisation de la tubuline nucléaire en microtubules, formant un faisceau polarisé qui est rattaché

aux centromères par un complexe protéique, le kinétochore. Le raccourcissement des microtubules du faisceau entraîne avec eux les chromosomes jusqu'aux pôles nucléaires. Le cycle de duplication du SPB et la formation d'un faisceau polarisé sont repris pour la complétion de la méiose II.

La méiose chez *S. pombe* est dite fermée, ce qui sous entend que la membrane nucléaire demeure plus ou moins intacte tout au long du processus (Asakawa et al, 2010, Sazer, 2010). Cette observation contraste avec la méiose chez les eucaryotes supérieurs durant laquelle l'enveloppe nucléaire est dissoute puis reconstruite seulement à la fin des deux divisions méiotiques. L'important remodelage de l'enveloppe nucléaire au cours de la méiose demande un apport en membranes qui sont fournies sous forme de vésicules transportées de manière Spo14-dépendante depuis l'ER et le Golgi (Arai et al, 2010, Gonzalez et al, 2009). L'intégrité, la croissance et les déformations de la membrane nucléaire sont coordonnées avec les mouvements chromosomiques grâce au SPB et la Ran-GTPase Spi1.

6.1.3. Morphogénèse des spores

Les spores sont la forme mature des gamètes chez *S. pombe*. La première étape de leur maturation est l'inclusion de chaque noyau haploïde dans de doubles membranes intracellulaires, nommées *forespore membranes* (FSMs) qui deviendront les membranes plasmiques. Les spores, contrairement aux gamètes des mammifères, sont maturées au sein de la cellule germinale qui est nommée ascus.

La formation de la FSM chevauche la fin de la deuxième division méiotique. Elle débute à la métaphase II et son expansion est complétée peu après la fin de la ségrégation des chromatides sœurs. Le complexe SPB recrute, au début de la méiose II les protéines Spo15, Spo2, Spo13 et

Spo7 qui servent de sites d'échafaudage à la formation de la FSM (Nakase et al, 2008, Shimoda, 2004). L'extension subséquente de la FSM est attribuable à la fusion de vésicules de sécrétion. Les protéines Spo14 et Spo20 contribuent au transport des vésicules du ER au Golgi et de la formation de vésicule à partir du *trans* Golgi, respectivement (Shimoda, 2004). Ce sentier de distribution membranaire est essentiel à la croissance de la FSM. La protéine SNARE Psy1, relocalisée à partir de la membrane plasmique par endocytose jusqu'à la FSM en formation, est impliquée dans la fusion des vésicules (Kashiwazaki et al, 2011). Les SPBs recrutent la protéine Meu14 aux extrémités de la FSM en formation afin d'orienter correctement son expansion autour de chacun des noyaux (Okuzaki et al, 2003). La Ras-GTPase Spg1 et la protéine kinase Cdc7 sont des membres de la cascade de signalisation *septation initiation network* (SIN) recrutés aux SPBs. L'activation de cette cascade est nécessaire à la cytokinèse durant la mitose. Elle contribue également à la régulation de la croissance de la FSM en méiose (Krapp et al, 2006).

Suivant l'inclusion des noyaux, une paroi se forme en s'accumulant dans l'espace entre la membrane interne et externe des FSMs. Une analyse par microscopie immunoélectronique a révélé que la couche interne de la paroi est composée de 1,3- β -glucane (Tougan et al, 2002). Des analyses génétiques ont indiqué que les composantes majeures de la paroi des spores sont le glucane et le chitosane (Arellano et al, 2000, Garcia et al, 2006). La métalloprotéase Mde10 est impliquée dans la formation de la paroi (Nakamura et al, 2004). Récemment, la couche extérieure de la paroi a été caractérisée. Elle est composée principalement de la protéine Isp3. Cette protéine s'accumule en premier dans le cytoplasme des pré-spores en maturation. Elle est ensuite exportée à leur surface. Il a été suggéré que la palmitoylation d'Isp3 est importante pour sa redistribution. À la surface des spores, les protéines Isp3 s'auto-assemblent vraisemblablement par des ponts disulfures. Isp3 est importante du fait qu'elle est la source de résistance des spores à la digestion enzymatique (Fukunishi et al, 2014). Après la finalisation de la paroi, la membrane externe des pré-spores se lyse, laissant la membrane interne comme membrane plasmique.

que des spores matures.

6.2. Vagues d'expression méiotiques

Les événements de différenciation méiotique et de sporulation sont accompagnés et conduits par un important programme d'expression génique. Au cours de ce programme, la majorité des gènes voient leur expression induite ou réprimée à des étapes précises (Mata et al, 2007). Une étude à l'échelle du génome a identifié quatre groupes importants de gènes induits successivement au cours du processus de différenciation et de sporulation. Les vagues d'expression géniques coïncident avec des phases biologiques de la sporulation. Il y a les gènes d'initiation de la méiose (réponse à la carence en nutriments et aux phéromones), les gènes précoces (phase pré-méiotique S, et recombinaison), les gènes médians (divisions méiotiques), et les gènes tardifs (maturation des spores) (Mata et al, 2002). La progression de ces phases d'expression génique est possible grâce à une cascade transcriptionnelle. Un ou plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés comme régulateurs importants pour chacune de ces phases. Des régulations mutuelles entre facteurs de transcription expliquent en partie le patron temporel des vagues d'expression. Par exemple, au moment où un facteur active l'expression d'une vague de gènes, la vague précédente est réprimée par ce même facteur ou un autre facteur dédié à cette tâche, et les gènes codant pour les facteurs de transcription qui déclencheront la vague suivante sont induits (Mata et al, 2007).

Les gènes d'initiation (un groupe d'environ 40), comptent la majorité des gènes requis pour la communication via les phéromones et l'entrée en méiose. Les gènes de type sexuel, les régulateurs de la méiose (*mei2+* et *pat1+*), et le gène *fus1+* qui est impliqué dans la fusion cellulaire sont des exemples de gènes d'initiation. Ils sont majoritairement sous le contrôle du facteur de transcription Ste11 (Mata et al, 2007).

Les gènes précoces sont induits aux étapes précédant les divisions méiotiques. Ceci inclut la phase de réplication de l'ADN et les recombinaisons homologues. Ce groupe compte une centaine de gènes. Les gènes précoces codent pour des régulateurs du cycle cellulaire, des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, dans la recombinaison homologue, mouvements nucléaires et l'alignement des chromosomes. Environ 47 % de ces gènes sont régulés par le facteur Rep1. D'autres facteurs de transcription comme Cdc10 et Res2 coopèrent avec Rep1 afin d'induire l'expression de ce groupe de gènes (Mata et al, 2007).

Les gènes médians sont un large groupe d'environ 561 gènes induits durant les divisions méiotiques. Ces gènes codent pour plusieurs protéines incluant celles qui participent à la ségrégation du matériel génétique, les composantes du SPB, les régulateurs du cytosquelette, et les protéines impliquées dans la redistribution membranaire et la formation de la FSM. Le facteur de transcription de la famille *forkhead* Mei4 est responsable de l'induction de 55 % des gènes médians. Mei4 lie le promoteur des gènes cibles à une séquence consensus 5'- GTAAAYA -3' nommée FLEX. Dans une souche *mei4Δ*, environ 90 % des gènes médians voit leur expression diminuée. Cela implique que la presque totalité des gènes médians sont des cibles directes ou indirectes de Mei4 (Mata et al, 2007).

Finalement, les gènes tardifs sont induits à la fin des divisions méiotiques et leur expression reste élevée jusqu'à la fin de la maturation des spores. Environ 133 gènes tardifs codent pour des protéines impliquées dans diverses fonctions incluant la synthèse de la paroi des spores, la protection à divers stress et le ralentissement du métabolisme afin de favoriser une latence cellulaire. La coopération des facteurs de transcription Atf21 et Atf31 est nécessaire à l'induction de ce groupe de gènes (Mata et al, 2002).

7. Importance des ions métalliques pour la méiose

7.1. Zinc chez les ovocytes murins.

Les ovocytes sont les cellules germinales précurseurs des gamètes femelles. Ils sont produits dans les ovaires. Leur noyau intact est maintenu en prophase I jusqu'à ce qu'ils soient recrutés pour l'ovulation. Leur recrutement induit le développement des ovocytes qui entre en maturation méiotique. Ils complètent la première division jusqu'à un arrêt méiotique à la métaphase II. Les cellules à ce stade sont nommées les œufs. Ils sont prêts pour la fécondation, qui induira alors la complétion de la méiose. Le matériel génétique en surplus est expulsé de l'ovocyte en maturation, pour ne laisser qu'un noyau haploïde. L'analyse des métaux de transition chez les ovocytes murins en maturation a permis de mettre en lumière une possible contribution du Zn à ce processus. Des trois métaux de transition analysés (Cu, Fe, et Zn), le Zn était le plus abondant et celui qui présentait les plus importantes modulations entre les étapes développementales. La chélation du Zn intracellulaire des ovocytes en maturation provoque une interruption prématurée de la méiose à la télophase I. Une fois la méiose interrompue, le retour à des conditions d'abondance en Zn ou la fécondation des ovocytes conduit à des stades anormaux de développement qui sont non viables. Cependant, si du Zn est ajouté avant l'arrêt en télophase, il y a réactivation de la maturation, et la fertilisation permet la formation d'un zygote viable. Ces premiers résultats ont révélé l'importance des métaux de transition tel le Zn pour la méiose chez les mammifères (Bernhardt et al, 2012, Kim et al, 2010).

7.2. Importance du cuivre pour la méiose chez *S. pombe*.

Il a été observé dans le cas de la levure à fission que la carence en Cu provoquait une interruption de la méiose. La perturbation du Cu intracellulaire par le chélateur tétrathiomolybdate (TTM)

provoque un arrêt précoce de la méiose. Le processus ne se continue pas après la métaphase I. L'ajout de Cu exogène au milieu de culture permet de rétablir la progression de la méiose. Ces observations illustrent la contribution importante des ions Cu à la méiose chez *S. pombe*. Une analyse par micropuce à ADN a permis d'identifier un nouveau transporteur de Cu spécifique à la méiose nommé Mfc1 (Beaudoin et al, 2011a). Ce transporteur se localise à la FSM. Il est crucial à la progression de méiose en condition de carence en Cu. Son activité permet l'accumulation de Cu dans les spores. Le Cu transporté par Mfc1 est d'ailleurs disponible pour des cuproenzymes telles que Cao1. Ces données révèlent l'importance de l'homéostasie du Cu au cours de la méiose chez *S. pombe* (Beaudoin et al, 2011a).

8. Objectif du projet de recherche

La contribution des autres transporteurs de Cu connus chez la levure à fission, soient Ctr4, Ctr5 et Ctr6, n'a pas été investiguée dans les cellules en méiose. Mon projet de recherche a donc été la caractérisation des Ctrs chez les cellules méiotiques. Leur expression, localisation, et contribution à fournir du Cu aux cuproenzymes ont été explorés pour la première fois.

RÉSULTATS

Résumé

La méiose requiert du Cu dans le but de poursuivre la division spécialisée qui produit des gamètes haploïdes à partir d'un précurseur diploïde. Chez *Schizosaccharomyces pombe*, le Cu est transporté par trois membres de la famille des transporteurs de Cu (Ctrs), nommés Ctr4, Ctr5, et Ctr6. Malgré leur place centrale pour la différenciation sexuelle, très peu est connu sur le profil d'expression, la localisation cellulaire et la contribution physiologique des Ctrs dans la méiose. L'analyse de l'expression des gènes *ctr4+* et *ctr5+* révèle qu'ils sont exprimés durant la phase précoce de la méiose. En ce qui concerne *ctr6+*, son expression est plus étendue, puisque le transcrit peut être détecté tout au long de la méiose, mais elle s'accroît en phase médiane et tardive. Alors que l'expression de *ctr4+* et de *ctr5+* est exclusivement dépendante de la présence de Cuf1, l'expression de *ctr6+* repose sur deux régulateurs, soient Cuf1 et Mei4. Les protéines Ctr4 et Ctr5 co-localisent brièvement à la membrane plasmique au début de l'induction de la méiose, alors que la protéine Ctr6 localise à la membrane vacuolaire. Après les divisions méiotiques, Ctr4 et Ctr5 disparaissent de la surface de la cellule et Ctr6 subit une relocalisation intracellulaire qui l'amènera à co-localiser avec le FSM. Dans un environnement pauvre en Cu, la délétion de *ctr4+* et *ctr6+* abolit l'activité de la SOD1. Ces mutations affectent aussi de manière notable l'activité de la Cao1 surtout en phase médiane et tardive. Collectivement, ces résultats mettent en lumière les différences de profils d'expression, de localisation, et de contribution d'apport en Cu aux enzymes SOD1 et Cao1 par les différents Ctrs.

Contribution

Mes travaux ont généré 80% des résultats qui sont présentés dans l'article suivant. La grande majorité des constructions moléculaires et des souches utilisées dans les expériences sont le fruit de mon travail. J'ai participé de manière importante au montage des figures. J'ai aussi contribué à la rédaction du manuscrit.

CHARACTERIZATION OF *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE* COPPER TRANSPORTER PROTEINS IN MEIOTIC AND SPORULATING CELLS*

Samuel Plante, Raphaël Ioannoni, Jude Beaudoin, 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: Cu transporters during meiotic differentiation.

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

E-mail: Simon.Labbe@USherbrooke.ca

Keywords: Copper, meiosis, copper-dependent gene regulation, copper-requiring proteins, fission yeast.

Background: Despite a requirement for copper during meiosis, the role of copper transporters (Ctrs) in this process remains poorly understood. **Results:** Ctrs exhibit temporal and dynamic cellular localization patterns during meiotic differentiation.

Conclusion: Whereas Ctr4/5 is primarily involved during early meiosis, Ctr6 is present throughout the entire program and is associated with a non-canonical cellular location.

Significance: A dynamic interplay between copper transport systems occurs during meiosis.

Abstract

Meiosis requires copper to undertake its program in which haploid gametes are produced from diploid precursor cells. In *Schizosaccharomyces pombe*, copper is transported by three members of the copper transporter (Ctr) family, namely Ctr4, Ctr5 and Ctr6. Although central for sexual differentiation, very little is known about the expression profile, cellular localization and physiological contribution of the Ctr proteins during meiosis. Analysis of gene expression of *ctr4*⁺ and *ctr5*⁺ revealed that they are primarily expressed in early meiosis under low copper conditions. In the case of *ctr6*⁺, its expression is broader, being detected throughout the entire meiotic process with an increase during middle- and late-phase meiosis. Whereas the expression of *ctr4*⁺ and *ctr5*⁺ is exclusively dependent on the presence of Cuf1, *ctr6*⁺ gene expression relies on two distinct regulators, Cuf1 and Mei4. Ctr4 and Ctr5 proteins co-localize at the plasma membrane shortly after meiotic induction, whereas Ctr6 is located on the membrane of vacuoles. After meiotic divisions, Ctr4 and Ctr5 dis-

appear from the cell surface, whereas Ctr6 undergoes an intracellular re-location to co-localize with the forespore membrane. Under copper-limiting conditions, disruption of *ctr4*⁺ and *ctr6*⁺ results in altered SOD1 activity, whereas these mutant cells exhibit substantially decreased levels of CAO activity mostly in early- and middle-phase meiosis. Collectively, these results emphasize the notion that Ctr proteins exhibit differential expression, localization and contribution in delivering copper to SOD1 and Cao1 proteins during meiosis.

Introduction

Copper transport is essential for a number of biological processes, including respiration, antioxidant defense, xenobiotic amine metabolism, and meiosis (1, 2). Because of its property to lose and accept one electron, copper is not only required as a catalytic cofactor, but it can also participate in Fenton-like reactions that generate the highly toxic hydroxyl radical that may cause cellular damage (3). To balance the need for copper while at the same time preventing its accumulation to cytotoxic levels, organisms have developed mechanisms to control their internal copper load, including the use of specialized copper transporters.

In *Schizosaccharomyces pombe*, three proteins are members of the copper transporter (Ctr) family (4). Two of these, Ctr4 and Ctr5, form a heteroprotein complex at the plasma membrane of cells that grow mitotically (vegetative growth) under low copper conditions. Ctr4 and Ctr5 are interdependent for maturation through the secretory pathway and for copper transport activity when present at the cell surface (5). As is the

case for most members of the Ctr family, Ctr4 and Ctr5 harbor extracellular N-terminal hydrophilic regions that contain methionine residues organized as Met-X₂-Met and/or Met-X-Met motifs (denoted Mets motifs) (6). The primary structure of Ctr4 and Ctr5 also contains three transmembrane domains (TMDs), a Met-X₃-Met motif within their second TMD and a Gly-X₃-Gly motif within their third TMD. The last two motifs are predicted to play key roles in copper uptake and assembly of Ctr4-Ctr5 as a heterotrimeric complex, respectively (7-9). Bimolecular fluorescence complementation experiments have shown that the assembly of a functional heterotrimeric Ctr4-Ctr5 complex at the cell surface requires a combination of two Ctr4 molecules with one Ctr5 molecule (10). As expected, cells containing a deletion of *ctr4*⁺ or *ctr5*⁺ gene exhibit copper starvation phenotypes characterized by their inability to take up ⁶⁴Cu, poor cell growth on low copper medium, and alterations in copper-dependent enzymes activity (e.g. SOD1, copper amine oxidase 1 (Cao1) and cytochrome *c* oxidase) (5, 11, 12).

A third member of the Ctr family, denoted Ctr6, localizes on the membrane of vacuoles in cells proliferating in mitosis under low copper conditions (13). The N-terminal region of Ctr6 contains a Met-X-His-Cys-X-Met-X-Met motif that is involved in the process of copper transport. The predicted topology of Ctr6 suggests that the protein possesses three TMDs and conserved motifs found in the Ctr family of copper transporters, including a Met-X₃-Met motif in TMD2 and a Gly-X₃-Gly motif in TMD3 that may be responsible for the assembly of Ctr6 as a homotrimer. The use of mutant strains has revealed that the inactivation of *ctr6*⁺ (*ctr6Δ*) within the context of a *ctr4Δ* mutant strain results in a complete loss of SOD1 activity, revealing a function for Ctr6 in providing copper to at least one cytosolic copper-dependent enzyme, under low copper conditions (13). On the basis of studies on Ctr6 and its ortholog Ctr2 in *S. cerevisiae* (14, 15), a current model suggests that Ctr6 mediates the efflux of copper from the vacuole into the cytosol when cells undergo a transition from copper-sufficient to copper-limiting conditions.

Meiosis is a specialized mode of cell division by which precursor diploid cells produce haploid gametes (16, 17). To achieve this, diploid cells

replicate their chromosomal DNA, generating pairs of homologous chromosomes that are subsequently subjected to homologous recombination. Following this process, homologous chromosomes and sister chromatids are successively separated during the first (MI) and second (MII) meiotic divisions, respectively. Once, MI and MII divisions are completed, a differentiation phase occurs in order to produce four mature gametes that are competent for fertilization or germination. Studies in yeast and mice have shown that metal ions such as zinc and copper are essential for normal progression of meiosis (18-20). Insufficient concentrations of these metal ions lead to meiotic arrests as well as errors during meiosis. Despite the known essential role for copper during meiotic differentiation, copper requirement and copper transport proteins involved in this developmental process remain poorly understood.

S. pombe is a genetically amenable organism that is commonly used for identifying and characterizing cellular components that regulate molecular aspects of meiosis (21). This yeast is of special interest since growth conditions and temperature-sensitive mutants have been developed that allow synchronization of cells for their entry into the meiotic program (22, 23). Under conditions of nitrogen starvation, haploid cells arrest in the G₁ phase of the cell cycle. If cells of the opposite mating type are found together under these conditions, haploid cells conjugate to form diploid cells and the resulting zygotes usually undergo meiosis by a process called zygotic meiosis. If the resulting zygotes are transferred to a nitrogen-rich medium immediately after conjugation, cells can grow as diploids for a period of time. Over this period of time, if these diploid cells undergo a second transition from high to low nitrogen, their commitment to meiosis occurs quickly and in a more efficacious and synchronous manner in comparison with zygotic meiosis. This process is called azygotic meiosis. During the mitotic cell cycle, cells express the Pat1 kinase that inhibits the initiation of meiosis by phosphorylating the meiotic transcription factor Ste11 and the meiosis-specific inducer Mei2 (21). A mutant strain carrying a temperature-sensitive *pat1-114* allele produces a thermolabile Pat1 kinase. Following a heat shock at 34°C, Pat1 is readily inactivated, fostering the cell cycle switch from mitosis to

meiosis in a highly efficient and synchronous manner. This latter system called *pat1*-induced meiosis is more synchronous than azygotic meiosis. Initiation as well as progression and conclusion of meiosis involve four successive waves of gene expression that are mainly controlled by meiosis-specific transcription factors (24, 25). A first wave of expressed genes includes those that are induced by nitrogen starvation and pheromones. Several of these genes are under the control of Ste11 and are primarily involved in initiating meiosis. Subsequently, a second wave of genes (denoted early genes) is activated by Rep1. Products of these genes are involved in premeiotic DNA replication and recombination. Following this stage, Mei4 activates expression of middle meiotic genes (third wave) whose products are involved in meiotic divisions and early steps of spore formation. The expression of many several middle genes is subsequently repressed by the transcription factor Cuf2 (26). Late gene expression (fourth wave) is controlled by several transcription factors, including Rev2, Atf21 and Atf31. The products of these genes are required for spore maturation.

Investigation of copper starvation response during meiosis has revealed that the expression of *ctr4*⁺ is induced after 30 min of meiotic induction, followed by its repression 3 h after entry into meiosis (19). Consistent with meiotic *ctr4*⁺ transcript levels, a functional GFP epitope-tagged Ctr4 protein is detected at the cell surface of zygotic cells within the first hour of meiosis and remains there until the 3 h meiotic time point is reached and then it disappears from the cell surface (19). At that stage, a meiosis-specific gene, *mfc1*⁺, is induced in response to copper starvation and remains expressed throughout the meiotic program (19). *mfc1*⁺ encodes a putative major facilitator superfamily-type transporter. At the 3-h meiotic time point, a functional Cherry epitope-tagged Mfc1 protein is first observed on membranes of small intracellular vesicles. At the 6-h meiotic time point, Mfc1-Cherry-associated fluorescence localizes at the forespore membrane where it plays an important role for copper accumulation into forespores and the production of fully active Cao1 (copper amine oxidase 1), which localized primarily in the forespores of asci (19).

In the present study, proteins involved in copper transport during meiosis and the profiles of expression of *ctr5*⁺ and *ctr6*⁺ were determined and compared to that of *ctr4*⁺. Although Cuf1 was required for expression of *ctr4*⁺ and *ctr5*⁺ during meiosis, *ctr6*⁺ expression required the presence of Mei4 in addition to Cuf1. As opposed to *ctr4*⁺ and *ctr5*⁺ that are primarily expressed under low copper conditions, *ctr6*⁺ mRNA levels were detected in meiotic cells under standard, copper-depleted and copper-replete conditions. Consistent with their gene expression profiles, Ctr4 and Ctr5 proteins co-localized at the plasma membrane shortly after induction of meiosis and then progressively disappeared after 3 h of meiotic induction. In the case of Ctr6, the protein localized to vacuolar membranes in early meiosis and then underwent a re-distribution in a time-dependent manner to reach forespore membranes where it persisted until sporulation. Under copper starvation conditions, meiotic *ctr4Δ ctr6Δ* cells were defective in SOD1 activity. Although these cells (*ctr4Δ ctr6Δ*) exhibited a lower level of CAO activity in early meiosis, their CAO activity significantly increased after 6 h of meiotic induction. The increase of CAO activity was due to the presence of Mfc1 since a triple mutant *ctr4Δ ctr6Δ mfc1Δ* strain was unable to exhibit an increase of CAO activity (6 h following induction of meiosis). Together, the results revealed that during the meiotic program, copper transporters are expressed and localized in a time-dependent manner, exhibiting distinct contributions in delivering copper to two meiotic copper-dependent enzymes, SOD1 and Cao1.

Experimental Procedures

Strains and media. *S. pombe* strains used in this study are listed in Table 1. Standard methods were used for growth, mating and sporulation of cells (27). Under nonselective conditions, cells were grown on yeast extract plus supplements (YES) containing 0.5% yeast extract, 2% glucose and 225 mg/l of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. To integrate or transform plasmids into strains, Edinburgh minimal medium (EMM) supplemented with 225 mg/l of the required amino acids was used. Unsupplemented EMM medium contained 160 nM copper. The *h*⁺/*h*⁺ diploid strains used for azygotic meiosis were iso-

lated as described previously (26) and the resulting zygotes were returned to rich media (YES) before commitment to meiosis. Diploid cells underwent azygotic meiosis following a synchronized nitrogen-starvation shock in which EMM lacking nitrogen (EMM-N) was supplemented with 10 mg/l of adenine or 10 mg/l of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. Diploid strains homozygous for the mating type (h^+/h^+) were generated by incubating mid-logarithmic cultures of haploid cells with 20 μ g/ml carben-dazim (Sigma-Aldrich) as described previously (28). To synchronize *pat1-114^{ts}* diploid cells for their entry into meiosis, they were pre-cultured in EMM supplemented with adenine (225 mg/l) at 25°C for 48 h. At mid-logarithmic phase (cell titer of $\sim 1 \times 10^7$ cells/ml), cells were harvested, washed twice and transferred to EMM-N supplemented with 10 mg/l of adenine. After incubation for 16 h at 25°C, NH_4Cl (5 mg/l) was added to the culture medium and cells were splitted and treated with either ammonium tetrathiomolybdate (TTM) (Sigma-Aldrich) or CuSO_4 or were left untreated. At this point, the temperature was rapidly raised (to 34°C) to induce meiosis, as described previously (19). Meiosis progression of zygotes was monitored by adding 5 μ g/ml of Hoechst 33342 stain (Invitrogen) at different times following meiotic induction at 34°C.

Plasmids. To create a plasmid that possessed the *ctr6⁺* promoter driving expression of the *ctr6⁺-HA₄* fusion allele, *ctr6⁺* 5' regulatory region (positions -650 to -1) was amplified by PCR and inserted immediately upstream of the ATG codon of the *ctr6⁺-HA₄* gene into the *ApaI/XhoI*-digested *pctr6⁺-HA₄* plasmid (13). Subsequently, the *ApaI-BamHI* DNA fragment containing the *ctr6⁺* promoter and the coding region of *ctr6⁺-HA₄* was cloned into the corresponding sites of pJK148 (29). The integrative plasmid pJK*ctr4⁺-GFP* was generated by subcloning the *PstI-SpeI* fragment from pBP*ctr4⁺-GFP* (6), containing the entire *ctr4⁺-GFP* fusion gene under the control of its own promoter (positions -737 to -1), into the corresponding sites of pJK148. To create pJK*prom-ctr5⁺*, a *PstI-XmaI* PCR-amplified fragment containing the *ctr5⁺* gene along with its promoter (up to -815 from the initiator codon) was cloned into pJK210 (29). The *Cherry* coding sequence derived from BM46*SITmCherry* (30)

was isolated by PCR using primers designed to produce *XmaI* and *SacI* sites at the 5'- and 3'-termini of the *Cherry* gene. The resulting DNA fragment was used to clone the *Cherry* coding sequence into pJK*prom-ctr5⁺* plasmid to which *XmaI* and *SacI* restriction sites had previously been introduced by PCR and placed immediately upstream of the *ctr5⁺* stop codon. For this construct, denoted pJK*ctr5⁺-Cherry*, the *XmaI-SacI* *Cherry*-encoded fragment was inserted in-frame with the C-terminal region of *Ctr5*. The *cao1⁺-GFP* fusion gene with its own promoter and terminator was isolated from the pSP1*cao1⁺-GFP* plasmid (12) using *SpeI* and *ApaI*. Once purified, the DNA fragment was inserted into the corresponding restriction sites of pJK148, generating pJK*cao1⁺-GFP*. *ctr6⁺-lacZ* fusion plasmids were created using similar DNA molecular cloning approaches as described previously (13).

RNA isolation and analysis. Total RNA was extracted by a hot phenol method as described previously (31). RNA samples were quantified by spectrophotometry, and 15 μ g of RNA per sample were used for the RNase protection assays, which were performed as described previously (32). To detect *ctr6⁺* mRNA levels, plasmid pSK*ctr6⁺-v2* was generated by inserting a 198-bp *BamHI-EcoRI* fragment from the *ctr6⁺* gene into the same restriction sites of pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, CA). The antisense RNA hybridizes to the region between positions +95 and +293 downstream of the first base of the translational start codon of *ctr6⁺*. To create pSK*ctr5⁺-v1*, a 187-bp fragment from the *ctr5⁺* gene (corresponding to the coding region between positions +301 and +482) was amplified and cloned into the *BamHI-EcoRI* sites of pBluescript SK. Plasmids pSK*ctr4⁺* (33), pSK*cuf1⁺-v7* (19), pSK*mei4⁺* (26), pSK*lacZ* and pSK*act1⁺* (34) were used to produce antisense RNA probes, allowing the detection of steady-state levels of *ctr4⁺*, *cuf1⁺*, *mei4⁺*, *lacZ* and *act1⁺* mRNAs, respectively. ³²P-labeled antisense RNA probes were produced from the above-mentioned *BamHI*-linearized plasmids, and with the use of [α -³²P]UTP and the T7 RNA polymerase. The *act1⁺* riboprobe was used to detect *act1⁺* mRNA as an internal control for normalization during quantification of the RNase protection products.

Direct and indirect immunofluorescence microscopy. Diploid $h^+/h^- ctr4\Delta/ctr4\Delta ctr5\Delta/ctr5\Delta$ cells co-expressing $ctr4^+-GFP/ctr4^+-GFP$ and $ctr5^+-Cherry/ctr5^+-Cherry$ were synchronously induced to enter in azygotic meiosis. At zero time point, when cells had just entered meiosis and for the subsequent time points, culture aliquots were retrieved every hour. At each time point, Hoechst 33342 stain (5 $\mu\text{g/ml}$) was added to analyze progression of meiosis of individual cells. At the indicated times, cells were subjected to microscopic analysis using a 1,000X magnification and the following filters: 340 to 380 nm (Hoechst 33342), 465 to 495 nm (GFP) and 510 to 560 nm (Cherry). For localization of Ctr6 in mitotically growing cells, $ctr6\Delta$ mutant cells were transformed with the integrative plasmid $pctr6^+-HA_4$, which expresses a functional HA_4 epitope-tagged Ctr6 protein (13). Indirect immunofluorescence microscopy was performed as described previously (6, 13), except that cells were fixed with formaldehyde (methanol-free) after a 3-h incubation in the presence of bathocuproinedisulfonic acid (BCS). In the case of Ctr6- HA_4 localization during the meiotic program, $h^+/h^- ctr6\Delta/ctr6\Delta$ diploid cells expressing $ctr6^+-HA_4 / ctr6^+-HA_4$ were induced in azygotic meiosis and were separated into different lots which were left untreated or treated with TTM and CuSO_4 . At the indicated meiotic phase, cells were fixed and adsorbed on poly-L-lysine-coated (0.1%) multiwell slides as described previously (13). After 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 anti-HA antibody (F-7) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1:250 in TNB. After an 18-h incubation 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. After cells were washed, mounting media (Invitrogen) containing Hoechst 33342 stain was added to each well, unless otherwise stated. Vacuole membrane staining using FM4-64 (Sigma-Aldrich) was performed as described previously (35). Briefly, mid-logarithmic copper-starved cells were harvested and resuspended in YES medium containing BCS (100 μM) and FM4-64 (16 μM) for 30 min at 30°C. Cells were pelleted, washed, resuspended in fresh BCS-

containing YES medium, and incubated at 30°C for an additional 30 min. Fluorescence and differential interference contrast images of the cells were obtained using a Nikon Eclipse E800 epifluorescent microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with a Hamamatsu ORCA-ER digital cooled charge-coupled device (CCD) camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Fields shown in this study are representative of at least five independent experiments. Merged images were obtained using the Simple PCI software version 5.3.0.1102 (Compix, Sewickly, PA).

SOD and CAO activity assays. Protein extracts were prepared from mid-logarithmic cells that had been incubated for 16 h with either BCS (100 μM) or CuSO_4 (50 μM), unless otherwise stated. After treatments, cells were harvested and washed with lysis buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 0.1 mM Na_3VO_4 and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich; P8340). Once washed, cells were suspended in 200 μl of lysis buffer, and then disrupted with an equivalent volume of glass beads using a Fastprep instrument (MP Biomedicals). Lysates were centrifuged at 13,000 x g for 15 min at 4°C and then the supernatants that contained soluble proteins were partially purified using Spin-X centrifuge tube filters (Costar-Corning; 8161). Equal concentrations of lysates were analyzed on 10% native polyacrylamide gels as described previously (36), and SOD activity assays were carried out using in-gel nitro blue tetrazolium staining as described previously (11). Spectrophotometric determination of SOD activity was performed using a cytochrome *c*/xanthine oxidase method (13). CAO activity was determined by spectrophotometry as described previously (12). In these assays, hydrogen peroxide that is released is quantitated using 4-aminoantipyrine and vanillic acid to generate a quinoneimine dye, which is detected at 498 nm.

Immunoblotting and ChIP. For Western blotting experiments, protein extracts were resolved on 12% or 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. For protein expression analysis of SOD1, Cao1, and α -tubulin, the following primary antibodies were used for immunodetection: monoclonal anti-SOD1 antibody (SOD-100; Stressgen), monoclonal anti-His₅ antibody (penta-His; Qiagen), and monoclonal anti-

α -tubulin antibody (clone B-5-1-2; Sigma-Aldrich), respectively. Following incubation with primary antibodies, membranes were washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences), developed with ECL reagents (Amersham Biosciences), and visualized by chemiluminescence. Cao1 was detected by immunoblotting using an anti-His₅ antibody due to the presence of an endogenous cluster that contains 5 His residues located within the N-terminal residues 10 to 14 of Cao1 (12). ChIP experiments were carried out as described previously (4).

Results

ctr4⁺ and ctr5⁺ mRNA levels are induced in response to low levels of copper in a Cuf1-dependent manner in early-phase meiosis. As previously observed (19) and as shown in Fig. 1, when a diploid parental strain *pat1-114/pat1-114* was synchronized through meiosis under copper-deficient conditions, *ctr4⁺* mRNA levels were induced ~16-fold compared to basal levels observed in untreated cells after 1 h of meiotic induction (Fig. 1). After 3 h of the meiotic program, *ctr4⁺* mRNA levels were reduced and subsequently repressed within ~5 to 7 h. RNA samples prepared from a *pat1-114/pat1-114 cuf1Δ/cuf1Δ* mutant strain showed loss of copper starvation-dependent induction of *ctr4⁺* gene expression (Fig. 1). A second member of the Ctr family, Ctr5, is known to assemble with Ctr4 to form the high affinity copper transport complex at the cell surface in fission yeast. Expression of *ctr5⁺* gene was also analyzed as a function of time during meiosis (Fig. 1). Consistently, *ctr5⁺* mRNA levels were co-induced with the transcript levels of *ctr4⁺*, except that they were lower than *ctr4⁺* levels. To further examine whether *ctr5⁺* transcription was controlled by Cuf1, a *pat1-114/pat1-114 cuf1Δ/cuf1Δ* deletion strain was incubated in the absence or presence of the copper chelator TTM (50 μ M) or CuSO₄ (50 μ M). As observed in the case of *ctr4⁺*, deletion of *cuf1⁺* impaired the induction of *ctr5⁺* during meiosis (Fig. 1). We therefore concluded that *ctr4⁺* and *ctr5⁺* genes exhibit a similar meiotic temporal expression profile and that Cuf1 transcription factor is required for induction of both genes in response to copper starvation.

The ctr6⁺ gene is transcriptionally regulated by Cuf1 and Mei4 during meiosis. *ctr6⁺* encodes for a third member of the Ctr family in *S. pombe*. In cells proliferating in mitosis, its expression is induced under low levels of copper in a Cuf1-dependent manner (13). In contrast, *ctr6⁺* is negatively regulated when cells are exposed to exogenous copper. It is currently unknown whether *ctr6⁺* is expressed in meiotic cells. To investigate this question, *pat1-114/pat1-114* diploid cells were synchronously induced into meiosis and left untreated or were treated with either TTM (50 μ M) or CuSO₄ (50 μ M). Aliquots of cultures were taken following meiotic induction, and the steady-state levels of *ctr6⁺* mRNA were analyzed by RNase protection assays. Results showed that the steady-state levels of *ctr6⁺* mRNA under basal (untreated) and copper-starved (50 μ M TTM) conditions were primarily increased between 3 and 9 h following meiotic induction (Fig. 2A). Surprisingly, in the presence of exogenous copper (50 μ M), *ctr6⁺* transcript levels were detected after 5 h of meiotic induction, but to a lesser extent in comparison with transcript levels observed in untreated cells (Fig. 2A). To assess whether Cuf1 was required for expression of *ctr6⁺* during meiosis, the *ctr6⁺* transcript was probed in a *pat1-114/pat1-114 cuf1Δ/cuf1Δ* mutant strain throughout meiosis. Under all conditions tested, disruption of *cuf1⁺* resulted in strongly reduced *ctr6⁺* mRNA levels (~4- to 12-fold) in comparison with those recorded in the case of wild-type cells grown under the same conditions (Fig. 2B). Weak *ctr6⁺* mRNA levels were primarily observed after 5 or 7 h of meiotic induction, which corresponds to the time of expression of several middle-phase genes. Because the meiotic transcription factor Mei4 is known to be required for the induction of several middle meiosis-specific genes (25), RNase protection assays were performed using a *pat1-114/pat1-114 mei4Δ/mei4Δ* mutant strain. Results were compared to those obtained with a *pat1-114/pat1-114* control strain. In the case of *mei4Δ/mei4Δ* cells, *ctr6⁺* transcript levels were only detected in response to copper starvation conditions and were absent under basal and copper-replete conditions (Fig. 2C). When a *cuf1Δ/cuf1Δ mei4Δ/mei4Δ* double mutant strain was examined, *ctr6⁺* transcript was not detected under all experimental conditions, including basal, copper-starved and

copper-replete conditions (Fig. 2D). Analysis of the *ctr6*⁺ promoter revealed that it contains a putative consensus Mei4-binding FLEX sequence (40) and three Cuf1-binding CuSEs (Fig. 2E). To ascertain whether the FLEX element plays a role in *ctr6*⁺ regulation during meiosis, we constructed a *ctr6*⁺ promoter-*lacZ* fusion gene harboring a 620-bp fragment from the *ctr6*⁺ promoter in which the three CuSEs elements have been mutagenized. Subsequently, we used this reporter construct that contained one FLEX element, or the same promoter fragment in which the FLEX box has been mutated. As shown in Fig. 2E, *ctr6*⁺-*lacZ* expression from the reporter plasmid containing the FLEX box exhibited a meiotic gene time-dependent expression profile, peaking ~7-9 h after meiotic induction. In contrast, meiotic-dependent expression of *lacZ* mRNA was abrogated in the absence of the FLEX sequence. Furthermore, ChIP analysis showed that Mei4-TAP was enriched ~2.3-fold at the *ctr6*⁺ promoter region encompassing the FLEX element in comparison with a non-transcribed intergenic region that served as a negative control (Fig. 2F). Untagged Mei4 immunoprecipitated only background levels of the *ctr6*⁺ promoter region (~0.7-fold). Consistent with the fact that the Mei4 transcription factor is required for *cuf2*⁺ gene expression during meiosis (26), Mei4-TAP occupied the *cuf2*⁺ promoter with ~4.2-fold enrichment (used as a positive control) (Fig. 2F). Taken together, these results indicate that, the meiotic-dependent expression of *ctr6*⁺ transcript requires both transcription factors, Cuf1 and Mei4, although Cuf1 has a greater contribution under copper-limiting conditions than Mei4.

cuf1⁺ and *mei4*⁺ gene expression profiles as a function of changes in copper levels during meiosis. We next analyzed steady-state mRNA levels of *cuf1*⁺ and *mei4*⁺ as a function of copper availability during meiosis. A *pat1-114/pat1-114* diploid strain was synchronized to initiate and proceed through the meiotic program. Prior to their entry into meiosis, cells were left untreated or exposed to TTM (50 μM) or CuSO₄ (50 μM). Aliquots of cultures were picked up at distinct time points following meiotic induction, and steady-state levels of *cuf1*⁺ and *mei4*⁺ mRNAs were analyzed by RNase protection assays. Results showed that *cuf1*⁺ and *mei4*⁺ transcripts were detected under basal, copper-starved, or copper-

replete conditions (Fig. 3). *cuf1*⁺ mRNAs were seen at each time point and were slightly increased after 5 and 7 h of meiotic induction (~2-3-fold compared to levels observed after 1 h of meiotic induction). In the case of *mei4*⁺ mRNAs, their steady-state levels were absent after 1 h of meiotic induction. Subsequently, a slight increase of *mei4*⁺ expression was observed after 3 h and it became more pronounced 5 and 7 h after meiotic induction (Fig. 3). After cell entrance into meiosis, the expression profile of *mei4*⁺ revealed that it reached a maximum 5 to 7 h after meiotic induction, indicating that its presence was primarily required during the middle meiotic phase. In the case of *cuf1*⁺, its expression profile as a function of time suggested a broader role during the differentiation process. In response to copper (50 μM), *cuf1*⁺ and *mei4*⁺ were expressed to a slightly lesser degree overtime. However, their overall expression profiles were unchanged as compared to those observed under basal and copper-depleted conditions (Fig. 3). This observation was likely related to a general effect of copper on meiosis instead of a specific effect of copper on *cuf1*⁺ and *mei4*⁺ transcripts.

Ctr4-GFP and Ctr5-Cherry colocalize at the cell surface during the first stages of meiosis. When cells grow mitotically under low levels of copper, Ctr4 and Ctr5 colocalize at the plasma membrane where they form a heteroprotein complex, which mediates high affinity copper transport (5, 6). Our previous studies reported location of Ctr4 at the plasma membrane shortly following induction of meiosis (19). After 3 h of meiotic induction, Ctr4-GFP-associated fluorescence progressively disappeared, a result that was consistent with decreased *ctr4*⁺ mRNA levels at the same stage of the meiotic program. To further characterize the location of Ctr4 and Ctr5 during meiosis, functional *ctr4*⁺-GFP and *ctr5*⁺-Cherry alleles were integrated into *h*⁻ *ctr4*Δ *ctr5*Δ and *h*⁺ *ctr4*Δ *ctr5*Δ cells. After mating, *h*⁻/*h*⁺ *ctr4*Δ/*ctr4*Δ *ctr5*Δ/*ctr5*Δ *ctr4*⁺-GFP/*ctr4*⁺-GFP *ctr5*⁺-Cherry/*ctr5*⁺-Cherry diploid cells were cultured to undergo azygotic synchronous meiosis. Under copper-limiting conditions (50 μM TTM), Ctr4-GFP and Ctr5-Cherry fluorescent proteins were rapidly co-detected, exhibiting fluorescence in prophase I, horse tail and metaphase I (Fig. 4). At metaphase II, the Ctr4-GFP and Ctr5-Cherry fluorescent signals progressively decreased and

then virtually disappeared during forespore membrane formation and sporulation (Fig. 4). Consistent with the existence of a clear interdependence between Ctr4 and Ctr5, the Ctr4-GFP- and Ctr5-Cherry-associated fluorescent signals were consistently co-localized (Fig. 4). Because transcription of the *ctr4*⁺-GFP and *ctr5*⁺-Cherry genes were repressed under high copper conditions (50 μ M CuSO₄), there was an absence of fluorescent signals in copper-treated zygotic cells (data not shown). Collectively, microscopic analyses of meiotic cells revealed that Ctr4-GFP and Ctr5-Cherry fusion proteins co-localize with each other. Furthermore, these two proteins are observed at the cell surface within 30 min after meiotic induction and remain at the cell periphery until the first meiotic division occurs.

A functional vacuolar Ctr6 transporter is required for the production of a fully active SOD1. As previously observed (13) and as shown in Fig. 5A, cells harboring a double deletion of *ctr4*⁺ and *ctr6*⁺ (*ctr4* Δ *ctr6* Δ) are defective in SOD1 activity under copper starvation conditions. Loss of endogenous SOD1 activity was restored to ~40% that of wild-type parental strain (FY435) by addition of exogenous copper (50 μ M CuSO₄) (Fig. 5B). Under low copper conditions, disruption of the *ctr4*⁺ gene (*ctr4* Δ) dramatically reduced SOD1 activity, resulting in a weak, but significant proportion of SOD1 activity that reflected the contribution of Ctr6 in activating SOD1 (Fig. 5A). This result was used as a positive control to test whether *ctr4* Δ *ctr6* Δ cells expressing an untagged or HA₄-tagged *ctr6*⁺ allele could acquire levels of SOD1 that were comparable to those found in the *ctr4* Δ strain. Results showed that Ctr6-HA₄ functionally complemented SOD1 deficiency of the double *ctr4* Δ *ctr6* Δ mutant strain at the same level as did untagged Ctr6 (Fig. 5A). We then used *ctr4* Δ *ctr6* Δ cells expressing the Ctr6-HA₄ fusion protein under low copper conditions and performed indirect immunofluorescence microscopy using anti-HA antibody. Results showed that Ctr6-HA₄ localized to the membrane of vacuoles in cells proliferating in mitosis under copper-limiting conditions (Fig. 5C). Conveniently, when *ctr6*⁺-HA₄ was induced by copper starvation, the number and size of the vacuoles decreased and became bigger in size, respectively, as a consequence of nutrient limitation (data not shown) (13), facilitating Ctr6-HA₄

localization. To further confirm that Ctr6-HA₄-associated fluorescence was detected in the vacuole membranes of cells, the vacuole-staining dye FM4-64 was used as a marker. Ctr6-HA₄ and FM4-64 exhibited similar subcellular localization patterns within the cells (Fig. 5C). Because the vacuole has been shown to play an important role for metal ion storage (14, 37-39), one model has proposed that Ctr6 mobilizes stores of copper from the organelle to provide it to SOD1, thereby contributing to its activation (13).

Analysis of Ctr6 localization during meiotic program. To further investigate the role of Ctr6 during meiosis, a functional *ctr6*⁺-HA₄ allele was integrated into *h*⁻ *ctr6* Δ and *h*⁺ *ctr6* Δ cells. Following mating, *h*⁻/*h*⁺ *ctr6* Δ /*ctr6* Δ *ctr6*⁺-HA₄/*ctr6*⁺-HA₄ diploid cells were cultured under conditions to induce azygotic synchronous meiosis. Under basal or low copper conditions, Ctr6-HA₄ was detected in the vacuole membranes of cells at prophase I (data not shown) and metaphase I (3-h time point) (Fig. 6). At the 3-h time point, Ctr6-HA₄-associated fluorescence was more prominent in cells starved for copper compared to cells incubated under basal conditions. When azygotic meiosis was synchronously induced in the presence of copper, Ctr6-HA₄ fluorescent signal was barely detected during the first 3 h of meiosis (Fig. 6). During meiotic metaphase II (5-h time point) and forespore membrane formation (7-h time point), zygotic cells displayed Ctr6-HA₄ fluorescence in smaller vacuole or vesicle membranes. At these stages, the strength of the fluorescent signals was strong regardless of copper conditions. After 9 h of meiotic induction (sporulation), Ctr6-HA₄ generated a fluorescent signal at the spore membrane, suggesting a novel role for the Ctr6 transporter at the spore surface. To validate that Ctr6-HA₄ located at the forespore membrane during late meiosis, we analyzed (under the same conditions) cells expressing a GFP-Psy1 protein, an intrinsic component of forespore membrane. Both proteins exhibited similar fluorescent patterns (Fig. 6). Additional evidence supporting the presence of Ctr6 at the membrane of spores was obtained by findings that Ctr6-HA₄-associated fluorescence was detected at the surface of spores that had been newly released from asci after 12 h of meiotic induction (Fig. 6). Taken together, data from microscopic analysis of meiotic cells revealed that a functional Ctr6-

HA₄ protein localizes in the vacuole membranes of cells that had undergone meiotic divisions, and that it becomes resident of the spore membrane during the forespore membrane formation.

Ctr4 and *Ctr6* are required for the synthesis of fully active SOD1, whereas an additional contribution by *Mfc1* is necessary for full activation of CAO in late-phase meiosis. To determine whether *Ctr4* or *Ctr6* were required for providing copper to SOD1 during meiosis, we used isogenic diploid strains harboring wild-type genes or insertionally inactivated *ctr4Δ/ctr4Δ*, *ctr6Δ/ctr6Δ* (Fig. 7) or *ctr4Δ ctr6Δ/ctr4Δ ctr6Δ* alleles (Fig. 8). In the presence of TTM (25 μM), *ctr4Δ/ctr4Δ* cells exhibited SOD1 activity that was significantly lower (~5.3-fold) than that of wild-type cells (Fig. 7). In the case of *ctr6Δ/ctr6Δ* cells, SOD1 activity was less (~2.2-fold) than that of the wild-type cells, but higher (~2.4-fold) than that of *ctr4Δ/ctr4Δ* cells (Fig. 7). Under copper starvation conditions (25 μM TTM), no measurable SOD1 activity was observed in the case of *ctr4Δ ctr6Δ/ctr4Δ ctr6Δ* double mutant strain (Fig. 8), revealing a critical role for both *Ctr4* and *Ctr6* in conferring SOD1 activity during meiosis. To verify that the SOD1 protein was present in wild-type and mutant strains, total protein extracts were analyzed by immunoblotting at the indicated meiotic time points (Figs 7 and 8). Results showed that detectable levels of SOD1 protein were present in all strains, indicating that the decrease or lack of activity was not due to the absence of SOD1 expression. As expected, SOD1 activity could be restored by addition of high exogenous copper concentrations (25 μM) to the cell cultures (Figs 7 and 8). This effect was likely due to the fact that copper ions were taken up by way of a low-affinity copper transport system, thereby bypassing requirements for high-affinity copper transporters.

The above-mentioned strains were also used to monitor CAO activity during meiosis. Two genes encode members of the CAO family in *S. pombe*. However, only one gene (*cao1*⁺) encodes an active enzyme (12). Diploid wild-type cells were synchronized through meiosis in the presence of either TTM (25 μM) or CuSO₄ (25 μM). Under copper-limiting conditions, results showed that levels of CAO activity increased as a function of time to reach maximal activity within 6 h, at which point CAO activity levels remained high

until the end of the meiotic program (Figs 7 and 8). In the case of *ctr4Δ/ctr4Δ* mutant cells, they exhibited an activity ~3- to 3.7-fold weaker than wild-type cells after 1 h of meiotic induction under low copper conditions (Fig. 7). Although CAO activity slightly increased after 3 and 6 h of meiotic induction, *ctr4Δ/ctr4Δ* null cells displayed an activity that was ~3.1 to 3.6-fold weaker than that of wild-type cells. Following the 6-h time point, we observed that CAO activity levels were significantly up-regulated (~27%), although this increase was insufficient to reach levels observed in the case of wild-type cells (Fig. 7). After 1 h of meiotic induction, copper-starved *ctr6Δ/ctr6Δ* mutant cells exhibited CAO activity comparable to that of the wild-type strain (Fig. 7). However, levels of CAO activity were quickly reduced ~4.9-fold within the next 3 h (Fig. 7). Results showed that CAO activity increased after 6 h of meiotic induction (~3-fold compared to levels observed after 3 h of meiotic induction). This increased activity was followed by a second increase (~2.4-fold compared to levels after 6 h of meiotic induction) within 9 h of TTM treatment (Fig. 7). CAO activity of *ctr4Δ/ctr4Δ* and *ctr6Δ/ctr6Δ* cells was restored by supplementing the medium with 25 μM of exogenous copper (Fig. 7). This effect was likely due to mobilization of copper via a low-affinity copper uptake system, which bypasses the requirement for *Ctr4* and *Ctr6* transport systems. To ensure that the decrease of CAO activity in the *ctr4Δ/ctr4Δ* and *ctr6Δ/ctr6Δ* mutant strains grown under low copper conditions was not due to a defect in *Cao1* expression, we analyzed the steady-state protein levels of *Cao1* by immunoblotting. We found that *Cao1* was produced at similar steady-state levels in wild-type and mutant strains (data not shown).

Once early-phase meiosis has been initiated under conditions of copper starvation (25 μM TTM), *ctr4Δ ctr6Δ/ctr4Δ ctr6Δ* double mutant cells exhibited a decrease in CAO activity that was reminiscent of cells bearing a single *ctr4Δ* deletion (~4.2-fold weaker activity compared to wild-type strain) (Fig. 8). This was followed by a modest increase of CAO activity after 3 h (~2.1-fold) and 6 h (~1.2-fold) of meiotic induction in comparison with double mutant cells at the 1-h and 3-h time points, respectively. As observed in

the case of *ctr4Δ/ctr4Δ* mutant strain, CAO activity levels of *ctr4Δ ctr6Δ/ctr4Δ ctr6Δ* mutant cells were markedly up-regulated (~39%) between 6 and 9 h, suggesting that another protein participated in delivering copper to Cao1. Because previous results had shown that Mfc1 was required for production of fully active CAO during meiosis (19), a *ctr4Δ ctr6Δ mfc1Δ/ctr4Δ ctr6Δ mfc1Δ* triple mutant was generated and induced to undergo synchronous meiosis. After 9 h of meiotic induction, results showed that inactivation of *mfc1⁺* (*mfc1Δ*) in the context of *ctr4Δ ctr6Δ* resulted in ~43% and ~79% less CAO activity as compared to *ctr4Δ ctr6Δ/ctr4Δ ctr6Δ* double mutant and wild-type cells, respectively. Consistent with the restoration of CAO activity following addition of exogenous copper (25 μM), double and triple mutant strains displayed an increase in CAO activity up to ~93% and ~82% of the levels observed in the case of wild-type strain, respectively (Fig. 8). To ensure that the decrease of CAO activity in mutant strains grown under copper-limiting conditions was not due to a defect in CAO expression, steady-state levels of Cao1 were analyzed and found to remain present at similar levels throughout the entire period of meiosis in all strains (data not shown). Taken together, the results revealed a distinct requirement of copper transporters for activation of SOD1 and CAO enzymes under conditions of copper starvation during meiosis. Whereas Ctr4 and Ctr6 transporters are required to produce a fully active SOD1 enzyme, the presence of the additional transporter Mfc1 is needed to ensure maximal CAO activity throughout the entire meiotic program.

Discussion

The biosynthesis of copper transporters Ctr4 and Ctr5 is dependent on the presence of the copper-sensing transcription factor Cuf1, which itself is activated under low-copper conditions during the mitotic cell cycle (5, 11, 33). Under these conditions, Ctr4 and Ctr5 are co-expressed and are assembled as a heteromeric complex at the cell surface where it mediates high affinity copper transport. When cells switch from mitosis to meiosis, expression profiles of *ctr4⁺* and *ctr5⁺* revealed that the two genes are still co-expressed and colocalized at the cell surface, but only during the early steps of the meiotic program. Once pre-

meiotic DNA replication and recombination are completed, both transcript and protein levels of Ctr4 and Ctr5 decrease progressively, suggesting that high affinity copper transport mediated by the Ctr4-Ctr5 complex is primarily needed in early meiosis. Possible explanations may be that one or more copper-dependent enzyme(s) is required for early steps of meiosis or copper ions need to be transported with very high efficacy from the environment during early meiosis, thereby allowing storage for subsequent usage during middle and late meiosis. As observed in the case of mitotic cells, expression of *ctr4⁺* and *ctr5⁺* in meiotic cells was copper starvation- and Cuf1-dependent. During meiosis, *ccc2⁺* that encodes a putative copper-transporting P-type ATPase exhibited a constitutive transcription as a function of time or copper needs during meiosis (data not shown), eliminating any correlation between changes in expression profiles of *ctr4⁺/ctr5⁺* genes and transcriptional levels of *ccc2⁺*.

In the case of *cuf1⁺*, its meiotic expression profile differed from that of *ctr4⁺* and *ctr5⁺*. Although *cuf1⁺* mRNA levels were detected in early meiosis, its transcript levels remained expressed throughout the meiotic division and spore maturation processes. They were slightly increased 5 and 7 h after meiotic induction, which corresponds to the end of the second meiotic division and the biogenesis of forespore membrane. The fact that the expression of *cuf1⁺* was sustained throughout the meiotic program suggested the existence of additional Cuf1-dependent target genes along with *ctr4⁺* and *ctr5⁺*. One candidate gene was *ctr6⁺* since its mitotic copper-dependent expression is regulated by Cuf1 (13). Furthermore, as opposed to the expression profiles of *ctr4⁺* and *ctr5⁺*, *ctr6⁺* transcripts were detected during early, middle and late phases of meiosis. The nature of the mechanism by which Cuf1 stops to activate *ctr4⁺* and *ctr5⁺* after early meiosis, but still activate *ctr6⁺* during middle and late phases is unknown. Nonetheless, deletion of *cuf1⁺* (*cuf1Δ/cuf1Δ*) led to a substantial decrease of *ctr6⁺* mRNA levels. Surprisingly, its expression was not completely abolished and remained detectable during and after meiotic divisions. On the basis of this observation, *ctr6⁺* expression was analyzed in a *mei4Δ/mei4Δ* mutant strain, which lacks the transcription regulator Mei4 that

is required for the induction of several middle meiosis-specific genes (25). The results showed that *ctr6*⁺ transcription relies on Mei4 during the meiotic divisions and the process of spore formation, especially under basal and copper-replete conditions. These observations led to the conclusion that meiotic differentiation requires a dual regulation of *ctr6*⁺ by two distinct transcription factors and that ensures the continuous presence of Ctr6 during the developmental program.

In cells undergoing vegetative growth (mitosis), Ctr6 localizes to the vacuolar membrane under conditions of low copper availability. Following cell entry into meiosis, microscopic analyses revealed that Ctr6 localized to the vacuolar membrane before completion of the first meiotic division. After completion of meiosis I, Ctr6 intracellular distribution had the appearance of cytoplasmic vesicular staining within the zygote. After the second meiotic division, zygotic cells exhibited Ctr6 fluorescence as large vesicular structures that appeared to progressively surround the chromosomal material. After forespore membrane closure, Ctr6 resided at the prespore membrane in which the chromosomal DNA is packed. On the basis of these observations, we propose that Ctr6 moves from the vacuolar membrane to the forespore membrane over the course of the meiotic program. Another *S. pombe* protein, Psy1, has been reported to be differentially located in cells proliferating in mitosis as opposed to meiosis (41). In the case of Psy1, it localizes to the plasma membrane in mitotic cells but to the forespore membrane of developing asci (42). Previous experiments using the fluorescent copper-binding tracker Coppensor-1 (43, 44) have shown that forespores accumulate labile cellular copper in sporulating cells (19). This observation was consistent with a need for translocation of Ctr6 from the vacuolar membrane to the forespore membrane. Ctr6 may transport stored copper from the prespore to the cytosol where meiotic copper-dependent enzymes can be found such as the SOD1 (data not shown). It is known that the forespore membrane expands by membrane vesicle fusion. Studies have reported that these vesicles are derived from the endoplasmic reticulum via the Golgi network (45-48). However, recent studies have shown that vacuolar proteins participate in forespore membrane assembly and may involve vacuolar membranous

structures for forespore membrane formation (49, 50). This mechanism may contribute to relocation of Ctr6 to the nascent forespore membrane where it would serve to mobilize intracellular pools of labile copper. The localization of Ctr6 on the spore membrane at the end of sporulation may also suggest a role for Ctr6 in spore germination. In agreement with this possibility, we have observed that isolated spores from *ctr6Δ/ctr6Δ* asci exhibited a decrease in viability as compared those of *ctr6*⁺/*ctr6*⁺ when returned for germination under low-copper conditions (data not shown).

In order to characterize the functional importance of the presence of Ctr4 and Ctr6 during meiosis, copper-dependent SOD1 and CAO activities were monitored during spore formation. Results showed that under conditions of copper starvation, cells lacking Ctr4 (*ctr4Δ*) exhibited a dramatic decrease in SOD1 activity compared to that of wild-type cells. Under the same conditions, a *ctr6Δ* single mutant displayed less SOD1 activity, but the decrease was less pronounced compared to a *ctr4Δ* single mutant. In copper-starved *ctr4Δ ctr6Δ* double mutant cells, SOD1 activity was undetectable, suggesting that both Ctr4 and Ctr6 represent two key players for delivering copper to SOD1 during meiosis. The fact that Ctr4 and Ctr6 exhibited a distinct meiotic temporal expression profile may help to ensure a constant source of copper for SOD1. In *S. cerevisiae*, it has been reported that sporulation in homozygous *sod1Δ/sod1Δ* diploids is decreased ~100-fold in comparison with homozygous wild-type (*SOD1/SOD1*) diploids (51), suggesting an important role of SOD1 in meiosis. In addition to scavenging reactive superoxide anions that are produced during meiosis, SOD1 may participate in other functions that are required during meiotic differentiation. On the basis of the results, we conclude that SOD1 must already be active or rapidly activated following induction of meiosis and that, Ctr4 and Ctr6 play an important role in delivering copper to SOD1 for its activation.

To further analyze the relative contribution of Ctr4 and Ctr6 during meiosis, CAO activity was analyzed in wild-type and *ctr4Δ/ctr4Δ*, *ctr6Δ/ctr6Δ*, and *ctr4Δ ctr6Δ/ ctr4Δ ctr6Δ* mutant cells. Following induction of meiosis under low-copper conditions, we observed that the presence

of Ctr4 was required for providing copper to Cao1 (the sole active CAO in *S. pombe*) at the initial stage of meiosis. Although the presence of Ctr6 was also important, its contribution was not detected at the same time in comparison with that of Ctr4, and was mainly seen after 3 h of meiotic induction. Intriguingly, but consistently with its meiotic temporal expression profile (19), the meiosis-specific copper transporter Mfc1 participated in the production of active CAO, but only after 6 h of meiotic induction. Taken together, our results argue in favor of a model in which the three copper transporters Ctr4, Ctr6 and Mfc1 participate in the delivery of copper to CAO in a time-dependent manner, thereby ensuring that an active CAO is present throughout the entire meiotic program. One can envision that Ctr4, which is a major component of the heteromeric Ctr4-Ctr5 complex at the cell surface during the early stages of meiosis, plays a critical role for the acquisition of the primary pool of copper from the environment. When the Ctr4-Ctr5 heterocomplex is no longer present at the cell surface, Ctr6 serves to mobilize intravacuolar stores of copper, participating in the delivery of copper to cytosolic copper-dependent enzymes. After forespore membrane closure, Mfc1 would mediate copper accumulation into prespores, participating in the activation of Cao1 that localizes to the spore at this meiotic stage. During the sporulation process, a proportion of Ctr6 migrates from the vacuole to the forespore membrane where its presence may be required to counterbalance the action of Mfc1, therefore ensuring that a fraction of copper could be delivered in the cytoplasmic region of the ascus. Although future studies will be required to demonstrate this model, results presented here are consistent with the existence of a dynamic interplay between the copper transport systems during meiosis of *S. pombe*.

REFERENCES

1. Nevitt, T., Ohrvik, H., and Thiele, D.J. (2012) Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim. Biophys. Acta.* **1823**, 1580-1593
2. Beaudoin, J., Ekici, S., Daldal, F., Ait-Mohand, S., Guérin, B., and Labbé, S. (2013) Copper transport and regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1679-1686
3. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* **307**, 108-112
4. Labbé, S., Beaudoin, J., and Ioannoni, R. (2013) "Copper transport in fungi". In *Metals in Cells*, edited by Culotta, V.C. and Scott, R.S. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 163-174
5. Zhou, H., and Thiele, D.J. (2001) Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **276**, 20529-20535
6. 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
7. Puig, S., Lee, J., Lau, M., and Thiele, D.J. (2002) Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* **277**, 26021-26030
8. Aller, S.G., Eng, E.T., De Feo, C.J., and Unger, V.M. (2004) Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *J. Biol. Chem.* **279**, 53435-53441
9. Beaudoin, J., Thiele, D.J., Labbé, S., and Puig, S. (2011) Dissection of the relative contribution of the *Schizosaccharomyces pombe* Ctr4 and Ctr5 proteins to the copper transport and cell surface delivery functions. *Microbiology.* **157**, 1021-1031
10. Ioannoni, R., Beaudoin, J., Mercier, A., and Labbé, S. (2010) Copper-dependent trafficking of the Ctr4-Ctr5 copper transporting complex. *PLoS One.* **5**, e11964
11. Labbé, S., Pena, M.M.O., Fernandes, A.R., and Thiele, D.J. (1999) A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **274**, 36252-36260
12. Peter, C., Laliberté, J., Beaudoin, J., and Labbé, S. (2008) Copper distributed by Atx1 is available to copper amine oxidase 1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell.* **7**, 1781-1794
13. 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

14. 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
15. 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
16. Marston, A.L., and Amon, A. (2004) Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 983-997
17. Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (2010) Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 124-136
18. Kim, A.M., Vogt, S., O'Halloran, T.V., and Woodruff, T.K. (2010) Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 674-681
19. Beaudoin, J., Ioannoni, R., Lopez-Maury, L., Bahler, J., Ait-Mohand, S., Guérin, B., Dodani, S.C., Chang, C.J., and Labbé, S. (2011) Mfc1 is a novel forespore membrane copper transporter in meiotic and sporulating cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 34356-34372
20. Bernhardt, M.L., Kong, B.Y., Kim, A.M., O'Halloran, T.V., and Woodruff, T.K. (2012) A zinc-dependent mechanism regulates meiotic progression in mammalian oocytes. *Biol. Reprod.* **86**, 114
21. Harigaya, Y., and Yamamoto, M. (2007) Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res.* **15**, 523-537
22. Bahler, J., Schuchert, P., Grimm, C., and Kohli, J. (1991) Synchronized meiosis and recombination in fission yeast: observations with *pat1-114* diploid cells. *Curr. Genet.* **19**, 445-451
23. Doll, E., Molnar, M., Cuanoud, G., Octobre, G., Latypov, V., Ludin, K., and Kohli, J. (2008) Cohesin and recombination proteins influence the G1-to-S transition in azygotic meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* **180**, 727-740
24. Mata, J., Lyne, R., Burns, G., and Bahler, J. (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat. Genet.* **32**, 143-147
25. Mata, J., Wilbrey, A., and Bahler, J. (2007) Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol.* **8**, R217
26. Ioannoni, R., Beaudoin, J., Lopez-Maury, L., Codlin, S., Bahler, J., and Labbé, S. (2012) Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation. *PLoS One.* **7**, e36338
27. Sabatinos, S.A., and Forsburg, S.L. (2010) Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **470**, 759-795
28. Zhang, M.M., Wu, P.Y., Kelly, F.D., Nurse, P., and Hang, H.C. (2013) Quantitative control of protein S-palmitoylation regulates meiotic entry in fission yeast. *PLoS Biol.* **11**, e1001597
29. Keeney, J.B., and Boeke, J.D. (1994) Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* **136**, 849-856

30. Nevitt, T., and Thiele, D.J. (2011) Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. *PLoS Pathog.* **7**, e1001322
31. 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
32. 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
33. Beaudoin, J., and Labbé, S. (2001) The fission yeast copper-sensing transcription factor Cuf1 regulates the copper transporter gene expression through an Ace1/Amt1-like recognition sequence. *J. Biol. Chem.* **276**, 15472-15480
34. 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
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. Laliberté, J., Whitson, L.J., Beaudoin, J., Holloway, S.P., Hart, P.J., and Labbé, S. (2004) The *Schizosaccharomyces pombe* Pccs protein functions in both copper trafficking and metal detoxification pathways. *J. Biol. Chem.* **279**, 28744-28755
37. 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
38. MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A., and Eide, D.J. (2002) Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 39187-39194
39. 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
40. Abe, H., and Shimoda, C. (2000) Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics.* **154**, 1497-1508
41. Nakamura, T., Nakamura-Kubo, M., Hirata, A., and Shimoda, C. (2001) The *Schizosaccharomyces pombe spo3⁺* gene is required for assembly of the forespore membrane and genetically interacts with *psyl(+)*-encoding syntaxin-like protein. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 3955-3972
42. Nakamura, T., Asakawa, H., Nakase, Y., Kashiwazaki, J., Hiraoka, Y., and Shimoda, C. (2008) Live observation of forespore membrane formation in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 3544-3553
43. Miller, E.W., Zeng, L., Domaille, D.W., and Chang, C.J. (2006) Preparation and use of Coppensor-1, a synthetic fluorophore for live-cell copper imaging. *Nat. Protoc.* **1**, 824-827

44. Zeng, L., Miller, E.W., Pralle, A., Isacoff, E.Y., and Chang, C.J. (2006) A selective turn-on fluorescent sensor for imaging copper in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10-11
45. Nakamura, T., Nakamura-Kubo, M., Hirata, A., and Shimoda, C. (2001) The *Schizosaccharomyces pombe spo3⁺* gene is required for assembly of the forespore membrane and genetically interacts with *psy1⁽⁺⁾*-encoding syntaxin-like protein. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 3955-3972
46. Nakase, Y., Nakamura, T., Hirata, A., Routt, S.M., Skinner, H.B., Bankaitis, V.A., and Shimoda, C. (2001) The *Schizosaccharomyces pombe spo20⁽⁺⁾* gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Sec14 plays an important role in forespore membrane formation. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 901-917
47. Nakamura-Kubo, M., Nakamura, T., Hirata, A., and Shimoda, C. (2003) The fission yeast *spo14⁺* gene encoding a functional homologue of budding yeast Sec12 is required for the development of fore-spore membranes. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 1109-1124
48. Nakamura, T., Kashiwazaki, J., and Shimoda, C. (2005) A fission yeast SNAP-25 homologue, SpSec9, is essential for cytokinesis and sporulation. *Cell Struct. Funct.* **30**, 15-24
49. Takegawa, K., Iwaki, T., Fujita, Y., Morita, T., Hosomi, A., and Tanaka, N. (2003) Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Struct. Funct.* **28**, 399-417
50. Ohtaka, A., Okuzaki, D., and Nojima, H. (2008) Mug27 is a meiosis-specific protein kinase that functions in fission yeast meiosis II and sporulation. *J. Cell. Sci.* **121**, 1547-1558
51. Liu, X.F., Elashvili, I., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Lapinskas, P., and Culotta, V.C. (1992) Yeast lacking superoxide dismutase. Isolation of genetic suppressors. *J. Biol. Chem.* **267**, 18298-18302

FOOTNOTES

Acknowledgments. We are grateful to Dr. Gilles Dupuis for critically reading the manuscript and for his valuable comments. We thank Raymund Wellinger for the use of his micromanipulator in the tetrad dissections. S.P. and R.I. were recipients of studentships from the Foundation of Stars for Children's Health Research and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, respectively. This study was supported by the grant MOP-CP-243929 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to S.L.

Abbreviations used are: BCS, bathocuproinedisulfonic acid; bp, base pair(s); CAO, copper amine oxidase; Cherry, red fluorescent protein; Ctr, copper transporter; Cuf1, copper factor 1; EMM, Edinburgh minimal medium; FSM, forespore membrane; GFP, green fluorescent protein; Mfc1, major facilitator copper transporter 1; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; TTM, ammonium tetrathiomolybdate; YES, yeast extract plus supplements; WT, wild-type.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The *cuf1⁺* gene is required for copper starvation-dependent induction of *ctr4⁺* and *ctr5⁺* transcripts during meiosis. Representative expression profiles of *ctr4⁺* and *ctr5⁺* transcripts in *pat1-114/pat1-114 cuf1⁺/cuf1⁺* and *pat1-114/pat1-114 cuf1Δ/cuf1Δ* cells that were induced to undergo syn-

chronous meiosis. Cells were either left untreated (-), or incubated in the presence of TTM (50 μ M) or CuSO_4 (50 μ M). At the indicated times following meiotic induction, *ctr4*⁺, *ctr5*⁺ and *act1*⁺ (internal control) mRNA levels were analyzed in control strain (*cuf1*⁺/*cuf1*⁺) (panels A and C) and isogenic strain lacking the *cuf1*⁺ alleles (*cuf1* Δ /*cuf1* Δ) (panels B and D).

Figure 2. Effect of *cuf1* Δ /*cuf1* Δ or *mei4* Δ /*mei4* Δ deletion on the expression of *ctr6*⁺. Cultures of *pat1-114/pat1-114 cuf1*⁺/*cuf1*⁺ *mei4*⁺/*mei4*⁺ (panel A), *pat1-114/pat1-114 cuf1* Δ /*cuf1* Δ *mei4*⁺/*mei4*⁺ (panel B), *pat1-114/pat1-114 cuf1*⁺/*cuf1*⁺ *mei4* Δ /*mei4* Δ (panel C), and *pat1-114/pat1-114 cuf1* Δ /*cuf1* Δ *mei4* Δ /*mei4* Δ (panel D) cells were induced to initiate and proceed through meiosis. Cells were left untreated (-) or incubated in the presence of TTM (50 μ M) or CuSO_4 (50 μ M). Total RNA was isolated from culture aliquots taken at the indicated time points. *ctr6*⁺ and *act1*⁺ steady-state mRNA levels were analyzed by RNase protection assays. E, Diagram representation of a 620-bp *ctr6*⁺ promoter DNA fragment and its mutant derivative that were fused upstream of the *lacZ* gene. The white box indicates the wild-type FLEX element, whereas the black ones represent mutant versions of FLEX and CuSEs elements. The nucleotide numbers refer to the positions of the *cis*-acting elements relative to that of the *ctr6*⁺ initiator codon. Steady-state levels of *lacZ* and *act1*⁺ mRNAs were analyzed at different time points after meiotic induction under basal conditions. F, CHIP assays were performed using untagged and TAP-tagged versions of Mei4. CHIP results are presented as the fold enrichment at the *ctr6*⁺ or *cuf2*⁺ promoter encompassing a FLEX element in comparison with a non-transcribed intergenic region. The data and error bars represent the average and standard deviation from at least three biological replicates.

Figure 3. Assessment of the mRNA steady-state levels of *cuf1*⁺ and *mei4*⁺ during meiosis. *pat1-114/pat1-114 cuf1*⁺/*cuf1*⁺ *mei4*⁺/*mei4*⁺ cells underwent synchronous meiosis under basal (-), copper-depleted, and copper-replete conditions. At the indicated time points, *cuf1*⁺, *mei4*⁺, and *act1*⁺ mRNA levels were analyzed by RNase protection assays.

Figure 4. Colocalization of *Ctr4*-GFP and *Ctr5*-Cherry during meiosis. Diploid *h*⁺/*h*⁺ *ctr4* Δ /*ctr4* Δ *ctr5* Δ /*ctr5* Δ cells co-expressing functional *ctr4*⁺-GFP and *ctr5*⁺-Cherry alleles were induced to undergo azygotic meiosis. Once induced, cells were differentiated in the presence of 50 μ M TTM. Fluorescence signals of *Ctr4*-GFP and *Ctr5*-Cherry were observed at different stages of meiosis (center left). The merged images are shown in the center right panels. Nomarski optics (far left) were used to ascertain cell morphology and Hoechst 33342 staining to visualize DNA (far right).

Figure 5. The vacuolar copper transporter *Ctr6* contributes to production of active SOD1 during mitosis. A, Representative in-gel activity assay of *S. pombe* strain (FY435) harboring a disrupted *ctr4* Δ allele exhibiting strong reduction of SOD1 activity under low copper conditions (100 μ M BCS). Under the same conditions, a *ctr4* Δ *ctr6* Δ double mutant strain was devoid of measurable SOD1 activity, unless the *ctr6*⁺ or *ctr6*⁺-HA₄ allele was returned by integration. Protein extracts prepared from these strains were analyzed for steady-state levels of SOD1 by immunoblotting using anti-SOD1 and anti- α -tubulin antibodies. B, SOD1 activity and steady-state protein levels were determined in the same strains of panel A in the presence of excess CuSO_4 (50 μ M). C, Cells were analyzed by indirect immunofluorescence microscopy for vacuolar localization of a functional *Ctr6*-HA₄ fusion protein that was expressed in *ctr4* Δ *ctr6* Δ cells grown under copper-limiting conditions (100 μ M BCS) (left). FM4-64 staining (right) was visualized by fluorescence microscopy as a marker of vacuolar membranes. Nomarski optics were used to examine cells under fixed (left) and non-fixed (right) conditions. White arrows indicate examples of vacuolar membranes.

Figure 6. Subcellular localization of *Ctr6*-HA₄ during meiosis and sporulation. *h*⁺/*h*⁺ *ctr6* Δ /*ctr6* Δ mutant cells expressing *Ctr6*-HA₄ were synchronously induced to undergo azygotic meiosis and then were left untreated or were treated with TTM (50 μ M) or CuSO_4 (Cu) (50 μ M) for the indicated time points.

Hoechst 33342 staining was used to visualize DNA (center left). The merged images of the Ctr6-HA₄ and the Hoechst dye are shown (centre right). Fixed cells observed by indirect immunofluorescence (Ctr6-HA₄; far left) were also examined by Nomarski optics (far right). After 9 h of meiotic induction, the GFP-Psy1 fluorescent protein was examined and used as a forespore membrane resident marker. At the 12-h time point, the Ctr6-HA₄ fluorescent signal was observed on the membrane of spores that were newly released from asci.

Figure 7. Effect of *ctr4Δ/ctr4Δ* and *ctr6Δ/ctr6Δ* disruptions on SOD1 and CAO activities during meiosis. *A*, Wild-type diploid ($h^+/h^+ ctr4^+/ctr4^+ ctr6^+/ctr6^+$), $h^+/h^+ ctr6Δ/ctr6Δ$, and $h^+/h^+ ctr4Δ/ctr4Δ$ mutant strains were synchronously induced to undergo meiosis under basal (untreated), copper-depleted (25 μM TTM), and copper-replete (25 μM CuSO₄) conditions. At the indicated time points, total extracts from aliquots of cultures were analyzed for SOD1 activity using an in-gel activity assay. Protein extracts were analyzed for steady-state protein levels of SOD1 and α-tubulin by immunoblotting using anti-SOD1 and anti-α-tubulin antibodies, respectively. *B*, Spectrophotometric determination of SOD activity was also performed from these strains using a cytochrome *c*/xanthine oxidase method. Data are the averages of triplicate determinations +/- standard deviation. *C*, The above-mentioned strains plus a $h^+/h^+ cao1Δ/cao1Δ$ mutant were analyzed for CAO activity by spectrophotometric assays using 4-aminoantipyrine and vanillic acid. Error bars indicate standard deviation of activities from samples analyzed in triplicate.

Figure 8. SOD1 and Cao1 enzymes require different combinations of copper transporters for their activation during meiosis. Cultures of $h^+/h^+ ctr4^+/ctr4^+ ctr6^+/ctr6^+$ (WT) and $h^+/h^+ ctr4Δ/ctr4Δ ctr6Δ/ctr6Δ$ diploid cells were synchronously induced into meiosis under basal (untreated), copper-starved (25 μM TTM) or copper-replete (25 μM CuSO₄) conditions. Total extracts were prepared from culture aliquots taken at the indicated time points. SOD1 activity was determined using an in-gel assay. Aliquots of total-extract preparations were also examined by immunoblotting using either anti-SOD1 or anti-α-tubulin antibody. *B*, Cell extracts were prepared from strains used in *A*, and analyzed by a cytochrome *c*/xanthine oxidase method. Results are the averages of triplicate determinations +/- standard deviation. *C*, FY435/FY436 (h^+/h^-) (WT), $h^+/h^- ctr4Δ/ctr4Δ ctr6Δ/ctr6Δ$, $h^+/h^- ctr4Δ/ctr4Δ ctr6Δ/ctr6Δ mfc1Δ/mfc1Δ$, and $h^+/h^- cao1Δ/cao1Δ$ strains were synchronously induced into azygotic meiosis under copper-starved or copper-replete conditions. CAO activity was quantitated in cell lysates at the indicated time after meiotic induction. Data are the averages of triplicate determinations +/- standard deviation.

Table 1. *S. pombe* strain genotypes.

Strain	Genotype	Source or Reference
FY435	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210</i>	19
FY436	<i>h⁻ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M216</i>	19
DBY6	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 ctr6Δ::hisG</i>	13
SPY1	<i>h⁻ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M216 ctr6Δ::LoxP</i>	This study
DBY11	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 ctr6Δ::hisG ctr4Δ::URA4</i>	13
SPY2	<i>h⁻ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M216 ctr6Δ::LoxP ctr4Δ::LoxPKANr</i>	this study
SPY3	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 ctr4Δ::LoxP ctr5Δ::KANr</i>	this study
SPY4	<i>h⁻ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M216 ctr4Δ::LoxP ctr5Δ::KANr</i>	this study
JSY104	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 ctr4Δ::KAN^r</i>	19
JSY204	<i>h⁻ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M216 ctr4Δ::KAN^r</i>	19
SPY5	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 mfc1Δ::LoxP ctr4Δ::LoxP ctr6Δ::KANr</i>	this study
SPY6	<i>h⁻ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 mfc1Δ::LoxP ctr4Δ::LoxP ctr6Δ::KANr</i>	this study
FY435/FY436	<i>h⁺/h⁻ his7-366/his7-366 leu1-32/leu1-32 ura4Δ18/ura4Δ18 ade6-M210/ade6-M216</i>	this study
ctr6Δ/Δ	<i>h⁺/h⁻ his7-366/his7-366 leu1-32/leu1-32 ura4Δ18/ura4Δ18 ade6-M210/ade6-M216 ctr6Δ::HisG/ctr6Δ::LoxP</i>	this study
ctr4Δ/Δ	<i>h⁺/h⁻ his7-366/his7-366 leu1-32/leu1-32 ura4Δ18/ura4Δ18 ade6-M210/ade6-M216 ctr4Δ::KAN/ctr4Δ::KAN</i>	this study
ctr4Δ/Δ / ctr6Δ/Δ	<i>h⁺/h⁻ his7-366/his7-366 leu1-32/leu1-32 ura4Δ18/ura4Δ18 ade6-M210/ade6-M216 ctr6Δ::HisG/ctr6Δ::LoxP ctr4Δ::KAN/ctr4Δ::KAN</i>	this study
mfc1Δ/Δ / ctr6Δ/Δ / ctr4Δ/Δ	<i>h⁺/h⁻ his7-366/his7-366 leu1-32/leu1-32 ura4Δ18/ura4Δ18 ade6-M210/ade6-M216 mfc1Δ::LoxP/mfc1Δ::LoxP ctr4Δ::LoxP/ctr4Δ::LoxP ctr6Δ::KAN/ctr6Δ::KAN</i>	this study
JSY5	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 ctr4Δ::KAN^r</i>	19
JSY6	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M216 ctr4Δ::KAN^r</i>	19
JB484	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210</i>	22
JB485	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M216</i>	22
RAY14	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 mei4Δ::KAN^r</i>	26
RAY15	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M216 mei4Δ::KAN^r</i>	26
JSY3	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf1Δ::KAN^r</i>	19
JSY4	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M216 cuf1Δ::KAN^r</i>	19
SPY7	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 mei4Δ::loxP cuf1Δ::KAN^r</i>	this study
SPY8	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M216 mei4Δ::loxP cuf1Δ::KAN^r</i>	this study

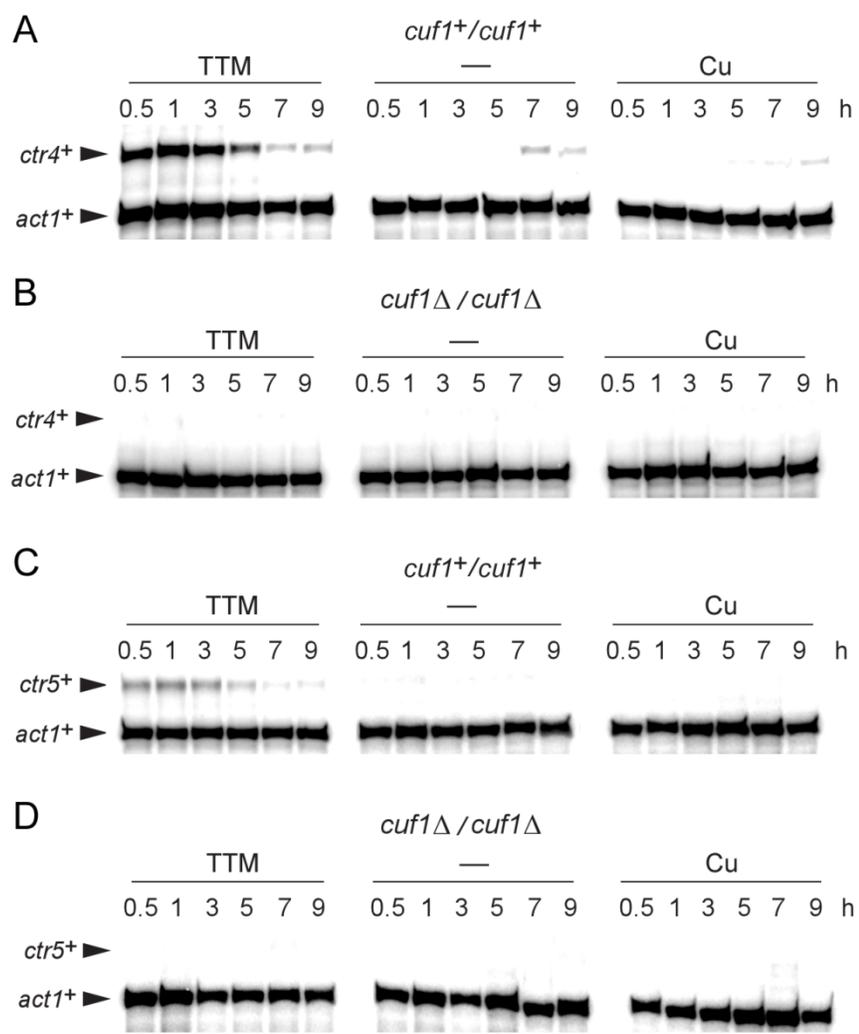


Figure 1 - Plante *et al.*

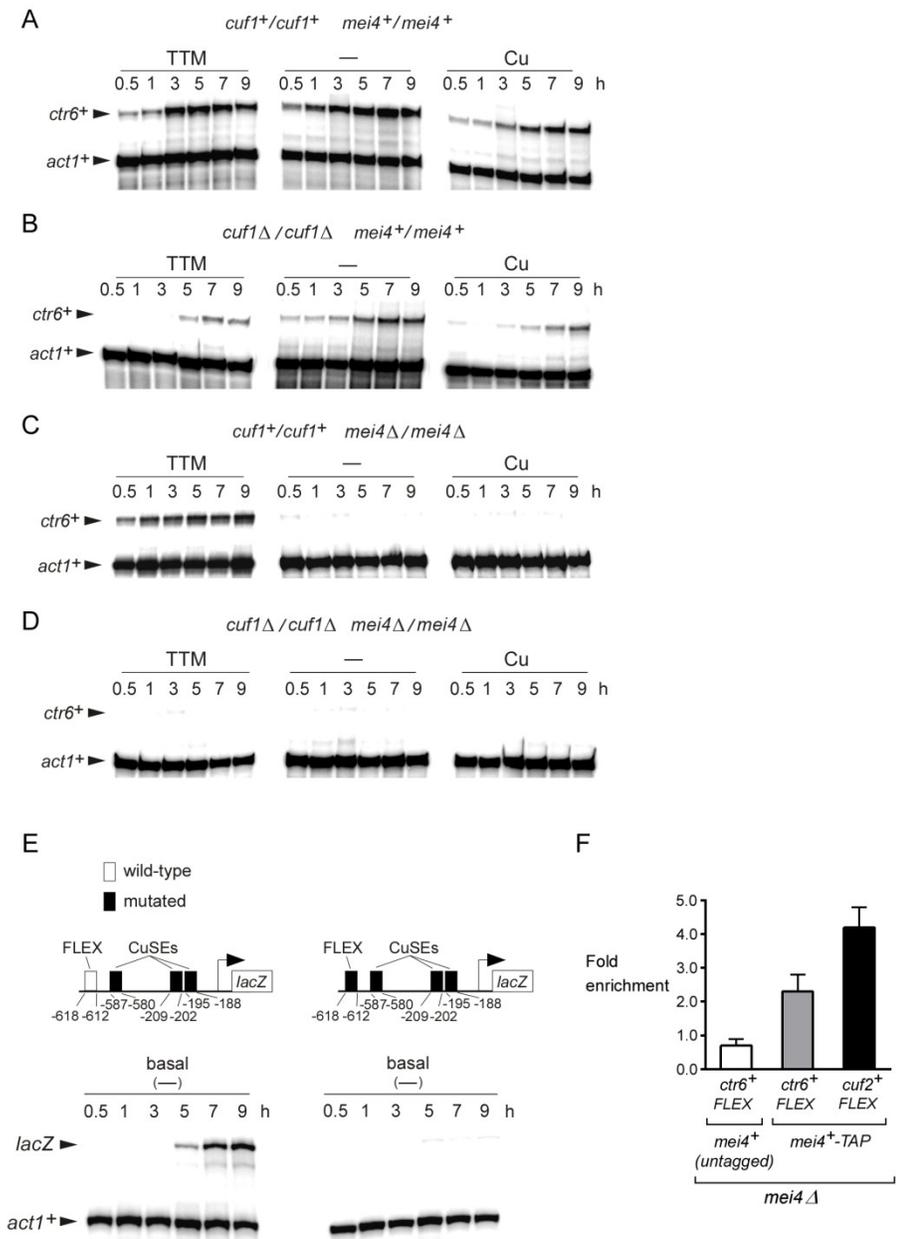


Figure 2 - Plante *et al.*

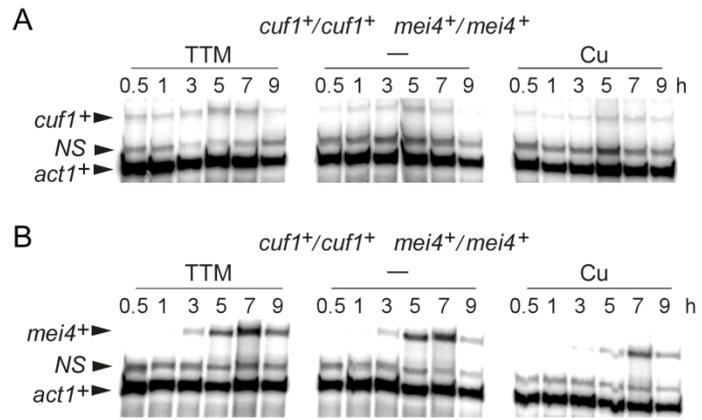


Figure 3 - Plante *et al.*

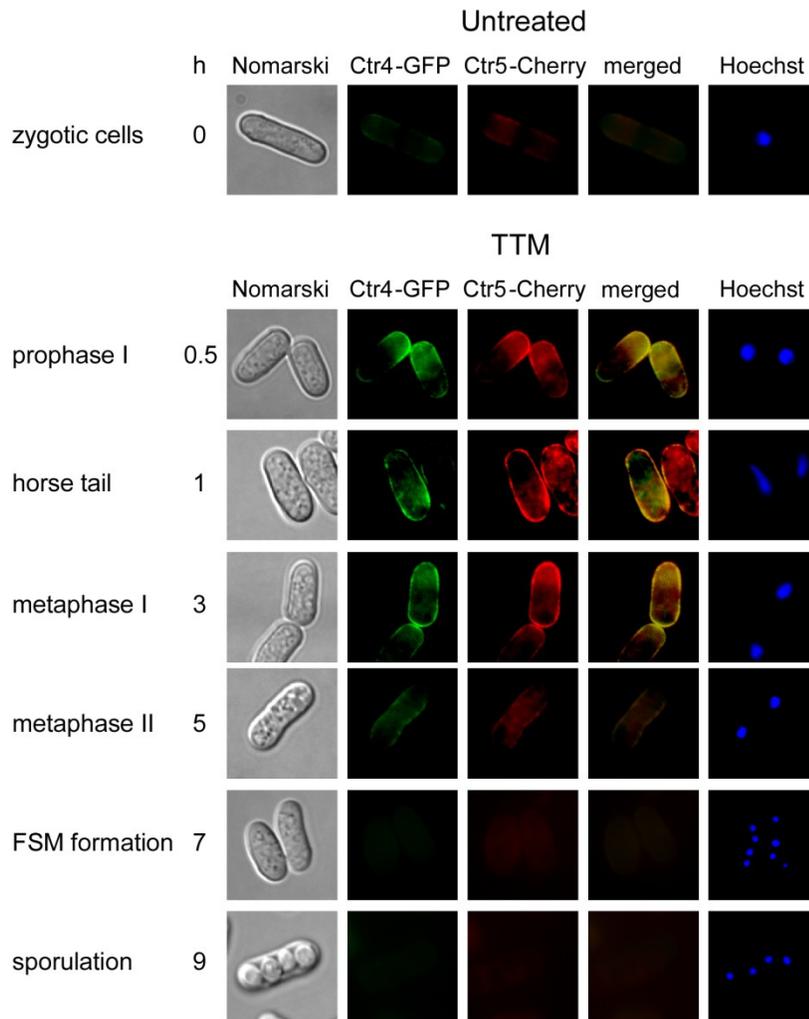


Figure 4 - Plante *et al.*

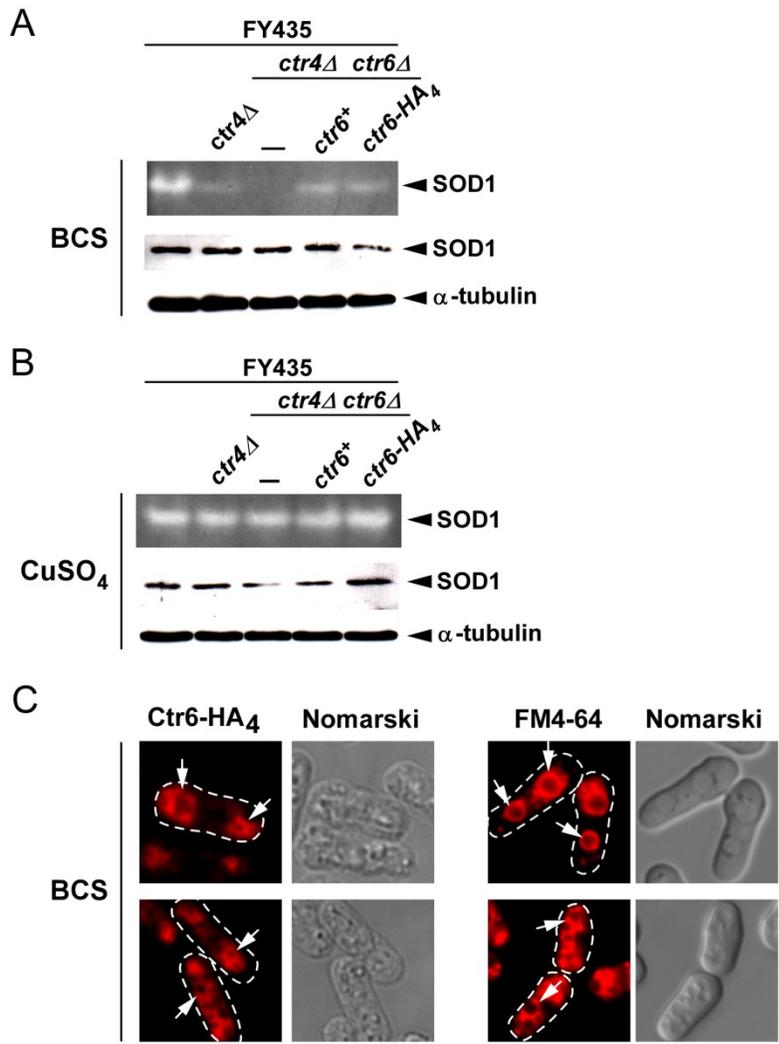


Figure 5 - Plante *et al.*

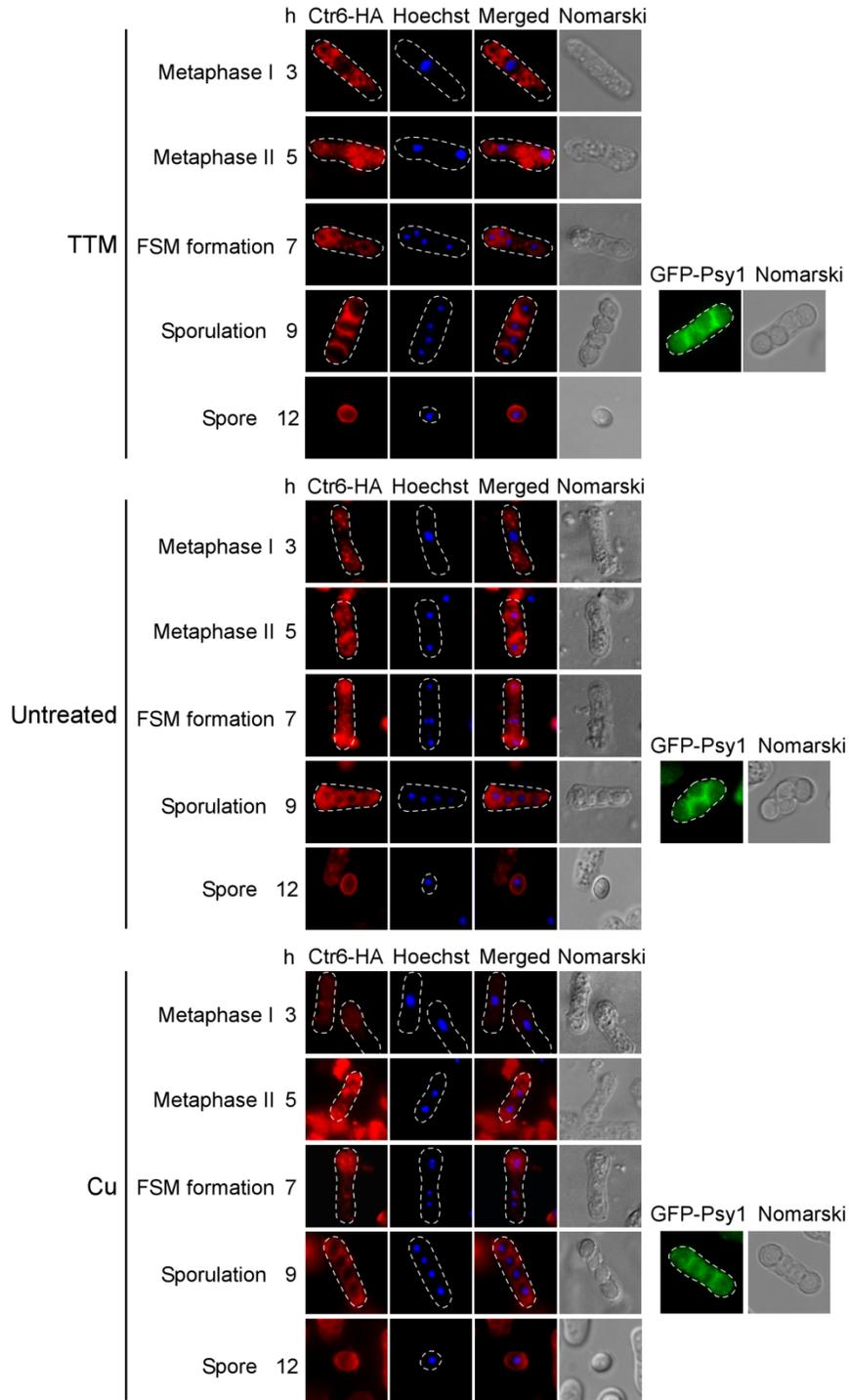


Figure 6 - Plante *et al.*

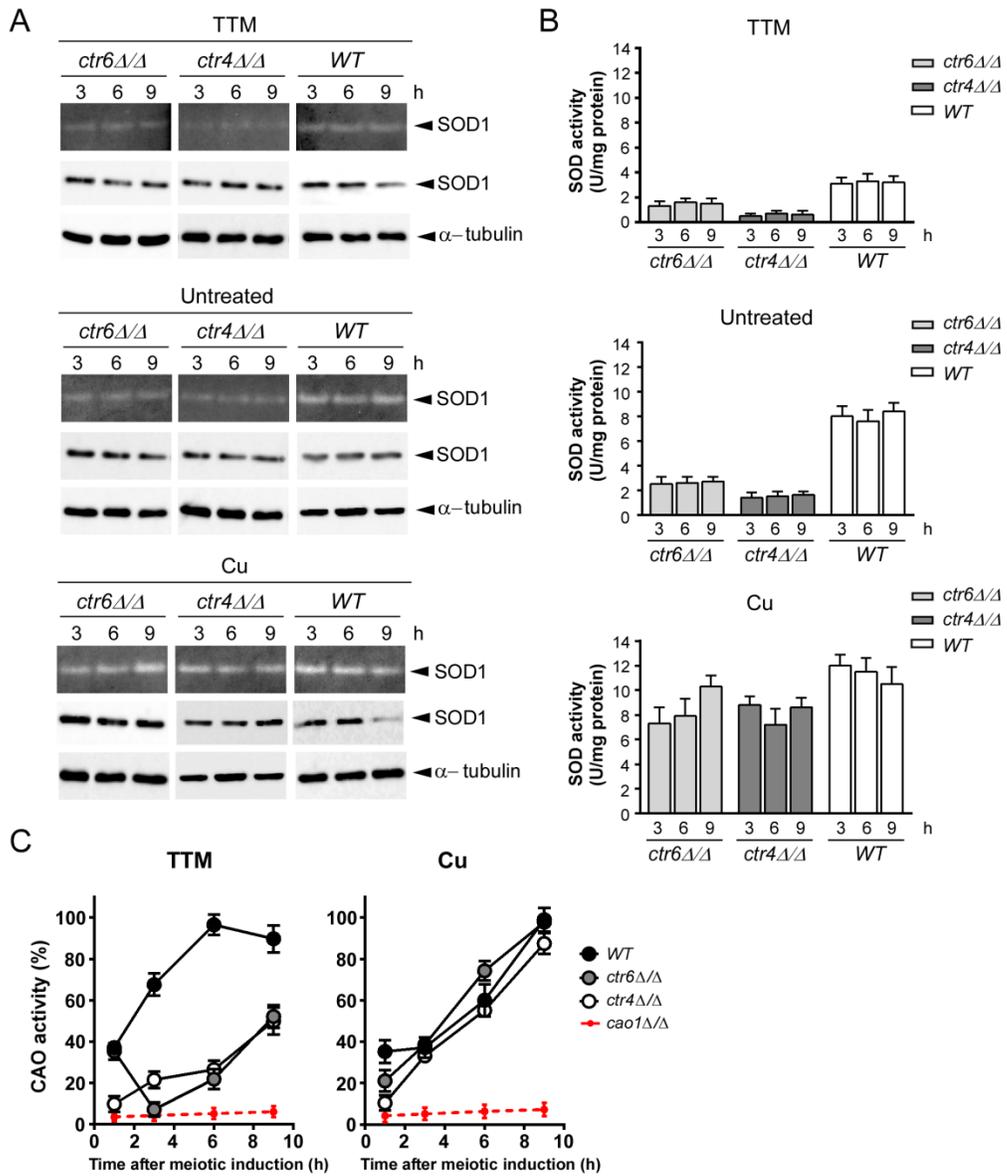


Figure 7 - Plante *et al.*

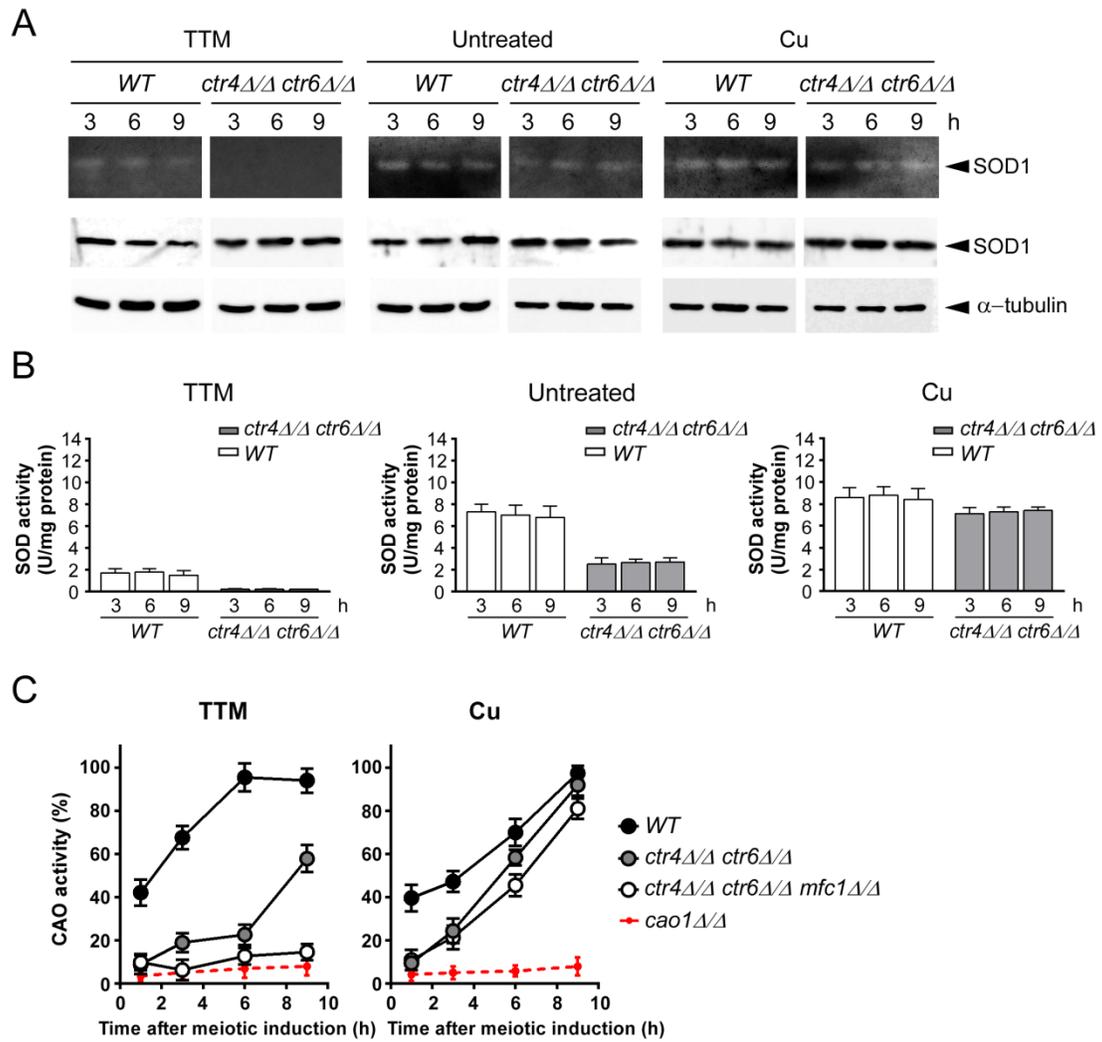


Figure 8 - Plante *et al.*

DISCUSSION

L'ensemble de mes travaux a permis de décrire le rôle des transporteurs de Cu durant la méiose. À la lumière de mes résultats, nous avons pu élaborer un modèle, présenté à la figure 7, qui décrit comment se comportent les transporteurs, Ctr4, Ctr5 et Ctr6 au cours de la sporulation, depuis l'initiation du processus jusqu'à la formation des spores matures.

Les deux premières étapes (initiation et métaphase I) ont été choisies pour illustrer ce qui est connu des transporteurs lors de l'induction de la méiose. L'initiation de la méiose correspond à la réponse des cellules diploïdes à une carence d'azote, la phase pré-méiotique S et la prophase méiotique. Durant ces étapes, l'hétérocomplexe Ctr4 et Ctr5 est visible à la surface des cellules, où il permet l'import du Cu dans les cellules diploïdes. C'est seulement au début de la première division méiotique (métaphase I) que Ctr6 est détectable à la membrane vacuolaire. À ce moment, autant l'activité de Ctr6 que l'activité des transporteurs de surface Ctr4 et Ctr5 contribuent à la translocation d'ion de Cu au cytoplasme.

Une fois la première division méiotique terminée (télophase I), la présence de l'hétérocomplexe s'amenuise à la surface cellulaire et il restera virtuellement absent pour le restant de la méiose. La contribution de Ctr6 est alors plus importante pour l'approvisionnement du cytoplasme en Cu. À la télophase II, lorsque les divisions du matériel génétique sont complétées, Ctr6 subit un changement de localisation. Un flux de membrane vacuolaire est dirigé vers la FSM afin de contribuer à sa croissance. La protéine Ctr6 est alors dirigée vers la FSM. Ctr6 est détectable à la membrane des spores jusqu'à la fin de leur maturation et à leur libération de l'ascus. La contribution de Ctr6 à l'homéostasie du Cu dans les spores n'a cependant pas encore été élucidée. Il n'est pas clair dans quelle direction le Cu est transporté

par Ctr6. Il est possible que le transporteur contribue à faire entrer des ions Cu dans les spores avec l'aide de Mfc1. Aussi, il est possible que Ctr6 permette la sortie de Cu des spores.

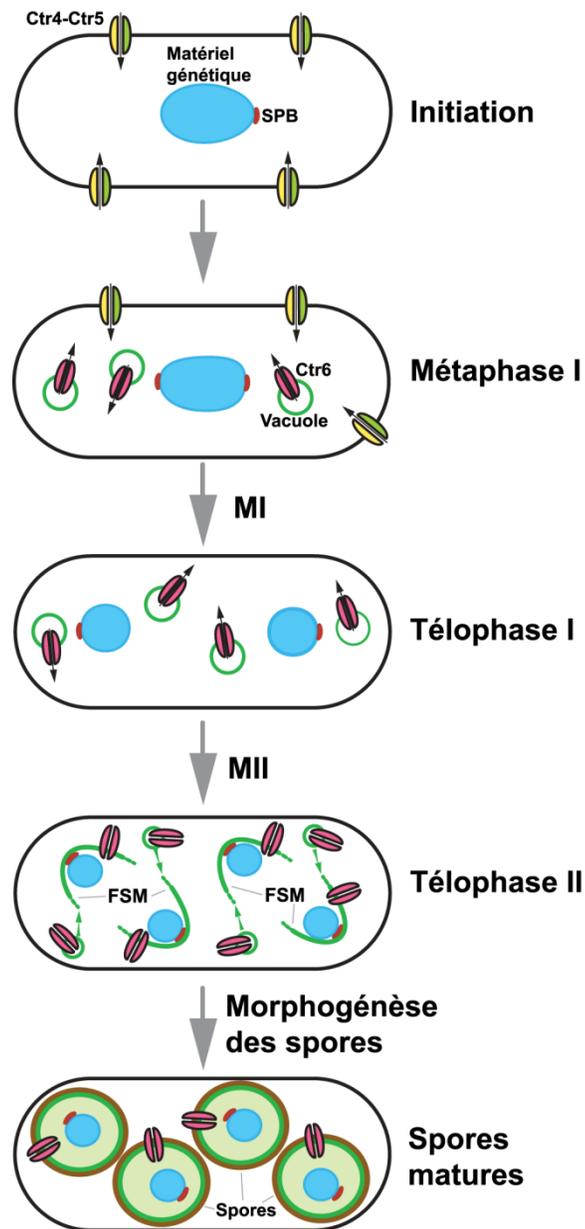


Figure 7. Modèle de l'acquisition du Cu par les Ctrs durant la méiose chez *Schizosaccharomyces pombe*. Les transporteurs Ctr4, Ctr5 et Ctr6 y sont illustrés à différentes étapes de la méiose. Durant les étapes d'initiation de la méiose, l'hétérocomplexe Ctr4 et Ctr5 se localise à la membrane plasmique. En métaphase I, Ctr6 est aussi visible à la membrane vacuolaire. À la fin de la première division méiotique (télaphase I), Ctr4 et Ctr5 disparaissent ne laissant que Ctr6. À la deuxième division méiotique (télaphase II), Ctr6 subit une relocalisation qui l'amène à la FSM. Ctr6 y sera détectable même sur les spores matures. Bleu, matériel génétique; Rouge, SPB; rond vert vide, vacuole; rond vert plein,

FSM; brun, parois des spores. MI, première division méiotique; MII, deuxième division méiotique; SBP, corps polaire du faisceau; FSM, membrane des spores.

Les résultats majeurs issus de mon travail de recherche ont été discutés dans le manuscrit qui fait l'objet de ce mémoire. Voilà pourquoi la suite de la discussion sera consacrée aux résultats qui offrent une continuité du projet, et des travaux qui seraient intéressants de poursuivre.

1. Activation de la transcription par Cuf1 en méiose.

En mitose, la cellule s'adapte à la carence en Cu grâce à l'activité de Cuf1 qui active simultanément l'expression des transporteurs de Cu. En méiose, cependant, les Ctrs ont des profils d'expression distincts dans le temps. Cuf1 est essentiel à la transcription de *ctr4+* et *ctr5+* durant la phase précoce de la méiose, et il participe à l'induction de l'expression de *ctr6+* durant les phases médiane et tardive. En mitose, le gène *cuf1+* est exprimé de manière ubiquitaire. La modulation de l'activité du facteur Cuf1 s'accompagne d'une modification de sa localisation cellulaire. L'expression des gènes cibles est activée lorsque Cuf1 se localise au noyau alors que leur expression est réprimée lorsque Cuf1 est inactivé par les ions Cu, ce qui déclenche son confinement au cytoplasme des cellules. Le transcrit du gène *cuf1+* est détectable à des niveaux relativement constants durant tout le processus méiotique, sauf pour ce qui est d'une légère augmentation en phase médiane du programme (Plante et al, 2014). De manière consistante, la protéine Cuf1 étiquetée avec la molécule fluorescente GFP est visible tout le long de la méiose. En conditions limitées pour le Cu, Cuf1 se trouve au noyau des cellules, alors qu'en conditions de surplus de Cu, Cuf1 est observé à la fois associé au matériel génétique et au cytoplasme des cellules (résultats non publiés).

Des changements dans la localisation cellulaire de Cuf1 ne semblent pas être la cause primaire de la modulation de l'expression de ses gènes cibles durant la méiose. Nous suspectons que des modifications post-traductionnelles et des partenaires d'interaction spécifiques sont à l'origine des changements d'activité de Cuf1 durant la méiose. Une première question à laquelle je voudrais répondre est de savoir si la liaison de Cuf1 aux éléments CuSEs des promoteurs de ses gènes cibles est constante durant la méiose. Par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et qPCR, nous serons en mesure de quantifier l'enrichissement de la protéine Cuf1 fusionnée à l'étiquette TAP (Cuf1-TAP) aux promoteurs des gènes *ctr4+*, *ctr5+*, et *ctr6+*. Des essais de ChIP à différents moments après l'induction de la méiose nous informeront si Cuf1 se détache ou se lie en fonction du temps aux promoteurs des gènes cibles. Cette expérience identifiera les bases moléculaires des changements qui s'opèrent sur Cuf1 durant la méiose. Puisque Cuf1 demeure à proximité du matériel génétique tout au long de la méiose, il ne serait pas étonnant qu'elle soit retrouvée à chaque moment liée au promoteur des gènes de transport du Cu. Il est possible que la liaison de Cuf1 à la chromatine soit modulée de manière cohérente avec les profils d'expression génique. Durant les trois premières heures après induction de la méiose, Cuf1 serait particulièrement liée aux promoteurs de *ctr4+* et *ctr5+* puisque leur expression est induite à ce moment, mais moins au promoteur de *ctr6+*. Pour être consistant avec les profils d'expression, à la phase d'expression médiane de la méiose, Cuf1 quitterait les promoteurs de *ctr4+* et *ctr5+*, et serait enrichie au promoteur de *ctr6+*.

Peu importe l'issue de l'expérience de ChIP, il sera pertinent d'investiguer les interactions auxquelles participent Cuf1 afin de comprendre les variations de sa capacité à activer la transcription ou de liaison à l'ADN. À des instants clés après l'induction de la méiose, il sera intéressant de fixer les cellules exprimant la protéine de fusion Cuf1-TAP et isoler un extrait soluble de protéines. Puis, purifier par affinité en tandem la protéine Cuf1-TAP. La résolution

de la fraction purifiée sur SDS-PAGE révélera si d'autres protéines ont été co-purifiées. Elles seront considérées comme de potentiels partenaires de Cuf1. Les protéines co-purifiées pourront être caractérisées par spectrométrie de masse. La nature directe de l'interaction pourra être évaluée par essai double hybride ou par BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*), dans la mesure où les protéines d'intérêt supportent la fusion des étiquettes nécessaire aux essais (Robida & Kerppola, 2009). La comparaison des partenaires de Cuf1 durant la phase précoce, médiane, ou tardive de la méiose précisera si des changements d'interaction surviennent au cours du processus méiotique. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse de la protéine Cuf1 pourrait révéler l'existence de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, ou l'ubiquitination à des phases méiotiques précises. En effet, l'ajout d'une modification post-traductionnelle modifierait la masse et la charge des peptides détectés. Lorsque nous comparerons les peptides issus de Cuf1 aux bases de données du protéome de *S. pombe*, nous pourrons aussi mettre en évidence la présence potentielle d'ubiquitine sur le facteur de transcription.

Dans l'ensemble, les expériences que je propose traceraient un portrait de la dynamique des interactions de Cuf1 à la chromatine et à d'autres protéines, ainsi que de modifications post-traductionnelles potentielles. Le but étant de comprendre les changements moléculaires qui affectent l'activité de Cuf1 et qui permettent la progression du programme méiotique.

2. Activité de la cytochrome c oxydase durant la méiose

Afin de caractériser la contribution des Ctrs à l'homéostasie du Cu en méiose, je me suis concentré sur l'activité de deux cuproenzymes, soit la Cao1, et la SOD1. Les résultats présentés dans ce mémoire corroborent l'idée que la Cao1 et la SOD1 sont actives durant le processus méiotique, et que la présence des transporteurs est cruciale à leur activité.

Je propose de caractériser une autre cuproenzyme, soit, la cytochrome c oxydase (CcO). Comme il a été mentionné en introduction, la délétion des transporteurs de Cu de haute affinité affecte l'activité de cette enzyme essentielle à la phosphorylation oxydative. De fait, les cellules *ctr4Δ ctr5Δ* sont incapables d'utiliser une source de carbone non-fermentable pour leur croissance (Zhou & Thiele, 2001). L'intérêt d'analyser l'activité de la CcO durant la méiose provient de l'aspect essentiel de la respiration pour le processus méiotique. En effet, l'inhibition de la fonction mitochondriale, autant chez *S. cerevisiae* que *S. pombe*, bloque la méiose. Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que les cellules diploïdes ne complètent pas la première division méiotique dans ces conditions (Jambhekar & Amon, 2008). L'ajout de composés comme l'azoture de sodium (NaN_3), le cyanure et le dinitrophénol, ou encore, la délétion de l'ADN mitochondrial par une longue exposition au bromure d'éthidium inhibe la phosphorylation oxydative et la croissance sur milieu non-fermentable. Spécifiquement, l'azoture de sodium et le cyanure sont connus pour inhiber la CcO (Stannard & Horecker, 1948). La respiration est un des signaux qui régulent l'entrée en méiose. Aussi, elle est la source d'énergie nécessaire à la réplication de l'ADN et aux divisions méiotiques subséquentes. La quantification de l'activité CcO, impliquant la quantification de la réduction du cytochrome *c in vitro* par spectrophotométrie, devrait présenter une augmentation dès l'induction de la méiose, et celle-ci restera élevée jusqu'à la fin des divisions méiotiques. Comme c'est le cas en mitose, le transport de haute affinité de Cu doit être capital pour l'activation de la CcO en méiose.

La diminution de la quantité d'ion Cu dans le milieu des zygotes conduit à un arrêt hâtif de la méiose à l'aube de la première division. Plusieurs moyens peuvent être utilisés pour diminuer la concentration de Cu, par exemple, l'utilisation de milieu de culture défini préparé en ajoutant la quantité voulu de l'ion métallique ou l'utilisation de chélateurs qui lient spécifiquement

les ions Cu du milieu. Le moyen privilégié est la chélation puisque la carence qui en résulte est soudaine et les membranes peuvent être perméables au chélateur utilisé comme c'est le cas pour le TTM. L'interruption de la méiose est visible par l'accumulation de cellules montrant un blocage de leur cycle cellulaire en métaphase I (Beaudoin et al, 2011a). Nous avons émis l'hypothèse que des composantes dépendantes du Cu et essentielles à la méiose sont affectées par cette carence. En ce moment, il n'est pas clair comment la diminution des ions Cu du milieu de culture affecte la méiose et quelles sont les activités cuivre-dépendantes défectueuses qui sont la cause de ce phénotype. Les conditions de forte carence en Cu qui provoquent ce phénotype chez une souche de type sauvage n'affectent pas l'activité de la SOD1. De plus, la délétion du gène *cao1+* ce qui inhibition de l'activité amine oxydase n'affecte pas le déroulement de la méiose. L'investigation de la CcO en méiose s'inscrit dans notre recherche à mieux comprendre les effets à l'échelle moléculaire de la carence en Cu sur le déroulement de la méiose.

Je serais intéressé de confirmer le blocage de la méiose provoqué par l'inhibition de la respiration. J'exposerai, à l'azoture de sodium, des cellules diploïdes induites en méiose. Je pourrai mettre en évidence l'étape à laquelle la méiose est interrompue. Si l'effet de l'azoture de sodium chez *S. pombe* a un effet similaire à celui observé chez la levure à bourgeon, cela provoquera un arrêt méiotique de manière similaire à celui qui est engendré par la chélation de Cu. C'est-à-dire qu'en présence d'un inhibiteur de la phosphorylation oxydative comme l'azoture de sodium, les zygotes en méiose ne pourront pas atteindre l'étape qui suit la métaphase I. Nous pourrions émettre l'hypothèse que la séquestration du Cu intracellulaire par le chélateur TTM inhibe la respiration, interrompant, de fait, la méiose. En mesurant l'activité de la CcO, je m'attends à ce que plus de TTM soit ajouté au milieu de sporulation, plus l'activité CcO des cellules en méiose soit diminuée. À une concentration en TTM qui induit un blocage méiotique, l'activité CcO devrait être équivalente à celle mesurée dans les cellules arrêtées

en métaphase I par la présence d'azoture, un inhibiteur de la phosphorylation oxydative. Un tel résultat appuierait l'idée que l'arrêt méiotique causé par la chélation en Cu soit attribuable à une déficience de la respiration

3. Contribution de SOD1 à la méiose

Un fait intéressant que nous avons observé est que la complétion de la méiose demande la présence de SOD1. Aucune sporulation n'a été détectée après le croisement de cellules *sod1Δ* sur un milieu de sporulation (extrait de malt), comparativement à environ 30 % de sporulation pour les croisements de type sauvage ou hétérozygotes (figure 8a et b). La réintégration de la protéine de fusion fonctionnelle SOD1-GFP dans une souche *sod1Δ* renverse le phénotype (figure 8a). Chez *S. cerevisiae*, les enzymes SOD1 et SOD2 ont un rôle déterminant dans la méiose (Liu et al, 1992). La délétion d'un ou l'autre altère de manière importante la sporulation. Aussi, chez la souris et la mouche *D. melanogaster*, les individus homozygotes SOD1^{-/-} sont viables, mais infertiles (Ho et al, 1998, Phillips et al, 1989). Ces données illustrent un rôle conservé des protéines SOD dans la méiose et la reproduction sexuée.

L'analyse du phénotype chez *S. pombe* a révélé un point très fascinant. Lorsque des cellules *sod1Δ* de types sexuels opposés sont inoculées sur un milieu de sporulation, il n'y a pas formation de zygotes diploïdes. Alors qu'après 20 h d'incubation, des zygotes homozygotes de type sauvage, ou hétérozygotes sont clairement visibles. Les cellules *sod1Δ* sont pourtant différenciées puisque des projections cellulaires associées à la communication par phéromones sont visibles (figure 8c). La différenciation sexuelle et la méiose sont des processus dépendant de la phosphorylation oxydative qui génère beaucoup d'anions superoxydes. Nous pouvons supposer qu'une contribution de la SOD1 durant la différenciation méiotique est de disproportionner les ROS générées lors de la respiration. Cet arrêt de la méiose peut être une

conséquence biologique des défauts métaboliques causés par un stress oxydatif incontrôlé et toxique dû à l'absence de SOD1.

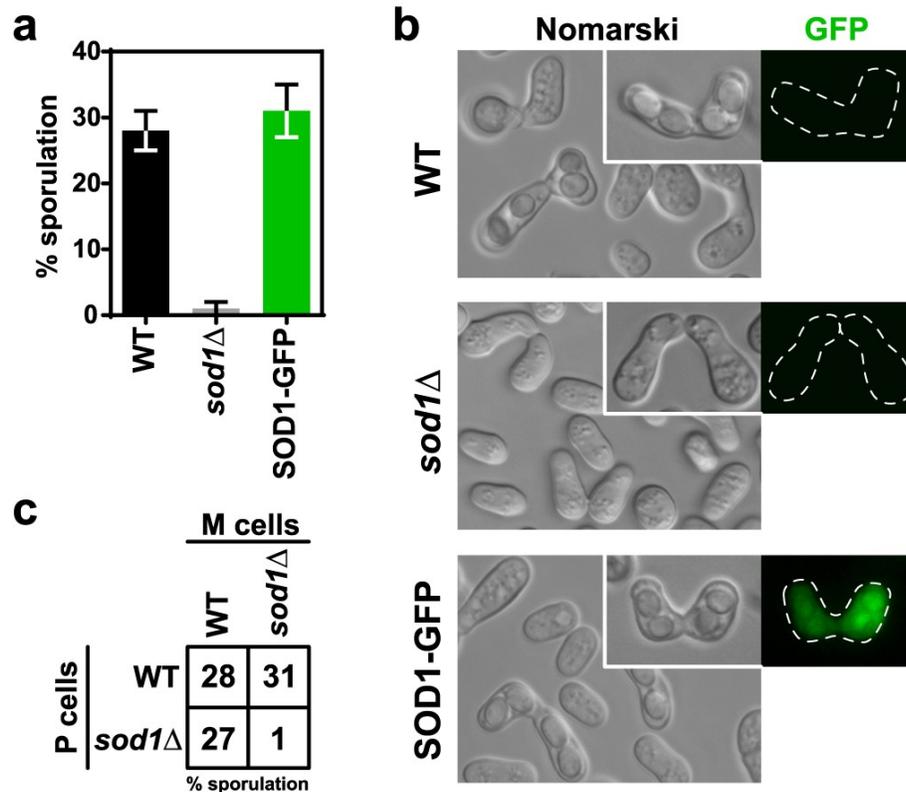


Figure 8. Inhibition de la méiose causée par une déficience en SOD1. Des cellules de types sexuels opposés de type sauvage (WT), déficientes en SOD1 (*sod1Δ*) ou ces mêmes souches mutantes exprimant une protéine SOD1 fusionnée à la GFP (SOD1-GFP) ont été incubées sur plaque d'extrait de malt durant 3 jours à 30 °C. Ces cellules sont alors observées au microscope (a) le pourcentage de tétrades observées a été considéré comme l'efficacité des cellules à initier la méiose zygotique. (b) Un plan typique de cellules observées par microscopie Nomarski, avec un agrandissement sur une cellule à l'étape du processus de sporulation la plus abondante. Ces cellules ont aussi été analysées pour la fluorescence GFP. (c) Comme indiqué, des cellules de type sauvage (WT) ou *sod1Δ* de types sexuels opposés ont été incubées ensemble sur plaque d'extrait de malt durant 3 jours à 30 °C. L'efficacité de la méiose zygotique est représentée par le pourcentage de cellules ayant sporulé pour chaque croisement.

Une première expérience que je voudrais réaliser est l'expression d'allèles *sod1+* mutés dans une souche *sod1Δ*. La mutation des résidus qui coordonnent le Cu (H47, H49, H64 et H121), et le Zn (H64, H72, H81, et D84) est susceptible d'altérer l'activité de SOD1. Par contre, la

mutation du résidu arginine R144 en acide glutamique (R144E) est la plus intéressante puisque la protéine mutante peut lier le Cu et le Zn. Elle est cependant inactive puisque le résidu basique R144 est essentiel à la stabilisation du substrat (O_2^-) au site catalytique (Banci et al, 2002). L'intégration au génome de cet allèle muté en amont du promoteur de *sod1+* permettra la production d'une quantité physiologique d'enzyme SOD1 inactive. Le but étant de vérifier si l'expression de cette enzyme inactive, dans au moins un des types sexuels, renverse le phénotype en permettant la formation de zygotes et la sporulation. Ce résultat permettra de mettre en lumière un nouveau rôle pour SOD1 indépendant de son activité catalytique. Le résultat opposé, si l'enzyme mutante ne renverse pas le phénotype, indiquera que la réaction de disproportion des anions superoxydes est essentielle pour le dénouement de la différenciation sexuelle et la méiose.

En second lieu, je veux investiguer la participation de SOD1 durant les événements suivant la formation du zygote. Je compte utiliser les cellules mutantes pour la chaperonne de SOD1, *pccsΔ* pour examiner la contribution de SOD1. Sans Pccs, l'approvisionnement en Cu à la SOD1 n'est plus possible, ce qui la laisse inactive. L'ajout au milieu de culture de Cu exogène permet l'activation de SOD1 (Laliberté et al, 2004). Le croisement de deux cellules *pccsΔ* devrait donner un zygote viable dans un milieu supplémenté en Cu. L'intérêt sera ensuite de carencer ou non les cellules diploïdes en Cu au moment d'induire la méiose. En condition carencée en Cu, on s'attend à ce que SOD1 soit inactif. Des essais de l'activité SOD1 devront être réalisés pour confirmer la perte d'activité. Si la disproportion des anions superoxydes est essentielle à une étape du programme méiotique, cette étape devrait faire défaut dans les conditions de carence en Cu qui inactive SOD1. Par la supplémentation en Cu au milieu de sporulation, l'activation Pccs-indépendante de SOD1 devrait éviter l'interruption de la méiose. Cet essai pourrait confirmer que la supplémentation en Cu exogène, et de fait, l'activation de SOD1, n'est pas suffisante pour renverser le phénotype. Un tel résultat laissera croire que

l'interruption observée est reliée à la délétion de Pccs. Il a été démontré chez *S. pombe* que la protéine Pccs, en plus de son activité de chaperonne, participe à la détoxification du Cu. Le domaine IV de cette chaperonne agit comme une MT en séquestrant les ions de Cu (Laliberte et al, 2004). Il ne peut pas être exclu que cette fonction soit cruciale durant la méiose, surtout lors de la supplémentation en Cu.

4. Rôle des métalloréductases dans l'homéostasie du cuivre.

Chez *S. pombe*, l'activité des transporteurs Ctr4, Ctr5, et Ctr6 est spécifique au Cu(I).

L'environnement de la levure à fission et la lumière des vacuoles sont des milieux qui favorisent la présence du Cu sous sa forme Cu(II). C'est pourquoi une métalloréductase est requise pour la réduction du Cu(II) en Cu(I) pour permettre sa translocation vers le cytoplasme.

Deux métalloréductases ont été identifiées chez la levure à fission, soient Frp1 et Frp2. Frp1 est impliquée dans l'acquisition du Fe par la catalyse de la réduction du Fe(III) en Fe(II) (Roman et al, 1993), alors que l'activité de Frp2 n'a pas été caractérisée. Jusqu'à présent, aucune métalloréductase n'a été confirmée pour participer à la réduction du Cu dans l'environnement ou la lumière vacuolaire chez la levure à fission.

Je propose d'abord de vérifier si Frp1 et Frp2 sont impliqués dans le transport du Cu depuis l'environnement. L'activité des transporteurs de surface peut être mesurée par la quantification de l'accumulation d'un isotope radioactif de Cu (^{64}Cu) dans les cellules. Cet essai devra être légèrement adapté pour l'étude des métalloréductases. Dans sa version originale, l'essai se fait en présence d'antioxydant tel le citrate de sodium (Hassett & Kosman, 1995). Le but étant de générer un large réservoir d'ion Cu(I) accessible pour le transport par les Ctrs. Pour les besoins de l'expérience, il faudra s'assurer que les ions Cu présents dans le milieu extracellulaire soient sous forme oxydée Cu(II). Dans ces conditions, la réduction des ions Cu sera

déterminante pour leur acquisition par les transporteurs de haute affinité. Une population de type sauvage croissant exponentiellement en carence en Cu sera exposée à des radio-isotopes ^{64}Cu sans la présence de citrate. La quantification du ^{64}Cu emmagasiné dans ces cellules sera la référence pour l'activité métalloréductase de type sauvage. Si une ou l'autre des métalloréductases Frp1 et Frp2 participe à la réduction du Cu, la délétion des gènes *frp1+* et *frp2+*, devrait avoir une incidence sur la quantité de ^{64}Cu accumulée dans les cellules. Je m'attends à ce qu'une majorité de l'activité de réduction des ions de Cu soit attribuable à Frp1 puisque cette protéine se localisant à la membrane plasmique est connue pour être responsable de la majorité de la réduction dans le milieu de culture. Une contribution de Frp2 ne peut cependant pas être écartée. De façon plus qualitative, je peux m'attendre à ce que la délétion de *frp1+*, dans la mesure où Frp1 est le principal acteur de la réduction du Cu, induise des phénotypes associés à la carence de l'ion métallique. Par exemple, une souche *frp1Δ* devrait présenter une croissance ralentie sur un milieu de culture contenant de l'éthanol et du glycérol comme seule source de carbone.

Ensuite, je souhaite m'intéresser à la réduction du Cu à la vacuole. Chez *S. cerevisiae*, le Cu accumulé dans les vacuoles peut être redirigé vers le cytoplasme via l'activité du transporteur Ctr2. Le transport par Ctr2 est cependant dépendant de la réduction des ions Cu dans la lumière de la vacuole par la métalloréductase Fre6. Chez *S. pombe*, c'est la protéine Ctr6 qui est responsable de la mobilisation des ions de Cu emmagasiné dans la vacuole (Bellemare et al, 2002). Comme c'est le cas chez la levure à bourgeon, l'activité de Ctr6 doit être dépendante d'une métalloréductase vu l'acidité des vacuoles qui force l'équilibre redox vers la forme oxydée Cu(II). La surexpression de *ctr6+* augmente la sensibilité des levures au Cu. Il a été proposé qu'avec la forte activité des protéines Ctr6, un flux important de Cu en provenance de la vacuole s'accumule de manière toxique au cytoplasme. Cette accumulation de Cu a pour effet d'inactiver le facteur de transcription Cuf1, ce qui mène à la répression de *ctr4+*, et

l'augmentation de l'activité SOD1. Si l'activité réductase à la vacuole est abolie, par la délétion de *frp1+* ou *frp2+*, l'activité de transport de Ctr6 devrait être affectée. Ainsi, la délétion de la métalloréductase vacuolaire devrait atténuer la toxicité au Cu en condition de surexpression de *ctr6+*. Il serait étonnant que Frp1 participe de manière importante à la réduction du Cu à la vacuole puisqu'elle a une activité à la surface cellulaire. Il est cependant possible que Frp2. localise à la membrane vacuolaire et contribue à la réduction du Cu dans la vacuole.

5. Homéostasie du cuivre au cours de la germination

La différenciation méiotique est une adaptation drastique de la levure à fission pour s'accommoder à des stress environnementaux, plus particulièrement une carence nutritionnelle. La survie des cellules dans des conditions environnementales hostiles est assurée par ce processus qui, à terme, forme des cellules en dormance hautement résistantes (spores) avec une grande diversité génétique. Le Cu est un oligoélément essentiel au bon déroulement de la méiose. Peu après le début de la sporulation, les cellules utilisent leur réserve intracellulaire de Cu pour la distribution aux cuproenzymes. Lorsque le Cu intracellulaire est perturbé par l'ajout de chélateur, la méiose est interrompue de manière précoce. Un parallèle peut être noté avec la levure à bourgeon. Chez *S. cerevisiae*, l'initiation de la sporulation est dépendante d'une source de carbone non-fermentable, comme l'acétate. Mais peu après l'induction, les sources intracellulaires de carbone sont suffisantes pour alimenter la respiration mitochondriale (Jambhekar & Amon, 2008). Si les réserves intracellulaires de nutriments sont primordiales à la méiose, c'est qu'en plus d'être résistants aux stress environnementaux, les spores doivent contenir les éléments essentiels pour leur activation lorsque l'environnement sera propice à la croissance cellulaire. La germination est le processus par lequel les cellules en latence sous forme de spores retrouvent un état végétatif dans lequel elles pourront proliférer. La germination est un événement important lors d'infection par des

levures pathogènes comme *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (Kronstad et al, 2013, Whiteway & Oberholzer, 2004).

Chez l'organisme modèle *S. pombe*, peu est connu sur la germination. La présence de glucose dans l'environnement des spores est le premier signal qui déclenche la germination. La cascade AMPc/PKA transmet le signal en réponse à la présence de glucose et initie la germination (Hatanaka & Shimoda, 2001). L'activation des spores implique des changements morphologiques importants. La modification de la paroi cellulaire est le premier changement visible en microscopie. La couche externe d'Ips3 et le chitosane sont retirés. Cela rend les spores moins réfringentes, et leur donne un aspect plus sombre au microscope optique. Cette étape peut être suivie en spectroscopie par absorbance puisque les spores en germination absorbent plus de lumière à 650 nm. Il y a d'abord croissance non-polarisée de la cellule. Puis, la croissance se polarise, et une projection cellulaire apparaît, et croît pour former une cellule végétative qui se séparera par fission.

Rien n'est connu sur l'hémostasie du Cu durant ce processus. L'impact d'une carence en Cu sur la progression de la germination reste à être déterminé. L'inoculation de spore de type sauvage dans un milieu de culture riche carencé ou non en Cu nous permettra de suivre le processus et constater les effets de la carence en Cu sur la germination. Si les réserves d'ions de Cu emmagasinées durant la sporulation sont cruciales pour la germination, il est logique de penser qu'une carence en Cu durant la sporulation aura un effet sur la germination. Je propose que des spores de type sauvage issues de sporulation en condition de carence en Cu, par exemple par l'ajout d'un chélateur, soient inoculées dans un milieu liquide riche (e.g. YES) sans ou avec l'ajout d'un chélateur de Cu ou de Cu exogène. Pour les besoins de comparaison, des spores issues d'une sporulation en condition non traitée ou en abondance de Cu serviront de contrôle. En suivant la germination par spectrophotométrie et par micros-

copie, cette expérience de base, nous donnera un aperçu de l'impact des conditions de sporulation sur l'habileté des spores à germer.

Au terme de la germination, les spores en latence deviennent des cellules en prolifération, et métaboliquement actives qui peuvent s'adapter, entre autre, à la carence en Cu. Les transporteurs de Cu Ctr4 et Ctr5 co-localisent à la surface des cellules végétatives, alors que Ctr6 se retrouve à la membrane des vacuoles en réponse à la déficience en Cu. Mais nous ne savons pas à quel moment les spores en processus de germination commencent à subir l'effet la carence en Cu, et donc à quel moment la transcription des gènes *ctr4+*, *ctr5+* et *ctr6+* est initiée. L'analyse d'extraits totaux d'ARN issus de spores à différent moment après l'induction de la germination, spécifiquement pour les gènes de transport de Cu, fournira des informations importantes pour notre compréhension de la réponse transcriptionnelle à la carence en Cu. Il serait aussi instructif de visualiser par microscopie le moment et l'endroit où apparaissent les transporteurs dans les spores en germination.

Des résultats préliminaires montrent un retard de la germination causé par la délétion du gène *ctr6+*. Des spores issues de cellules diploïdes de type sauvage (*ctr6+/+*) ou *ctr6Δ/Δ* qui ont été induites en méiose en présence de TTM ont été inoculées dans un milieu riche (YES). La croissance polarisée et l'apparition d'une projection cellulaire sont retardées chez les spores haploïdes *ctr6Δ* comparativement aux spores de type sauvage (*ctr6+*) (figure 9). De manière opposée, l'activation proprement dite des spores, caractérisée par une diminution de l'absorbance à 650 nm et la perméabilité des spores au colorant Hoechst, s'est produite au même rythme pour les deux souches (figure 9). Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant d'évaluer l'importance des transporteurs de surface pour la germination. Si les spores ont recours aux transporteurs Ctr4 et Ctr5, pour leur approvisionnement en Cu, la délétion de ces transporteurs devrait générer une insuffisance en Cu qui pourrait révéler des défauts de

germination reliée à la carence en Cu.

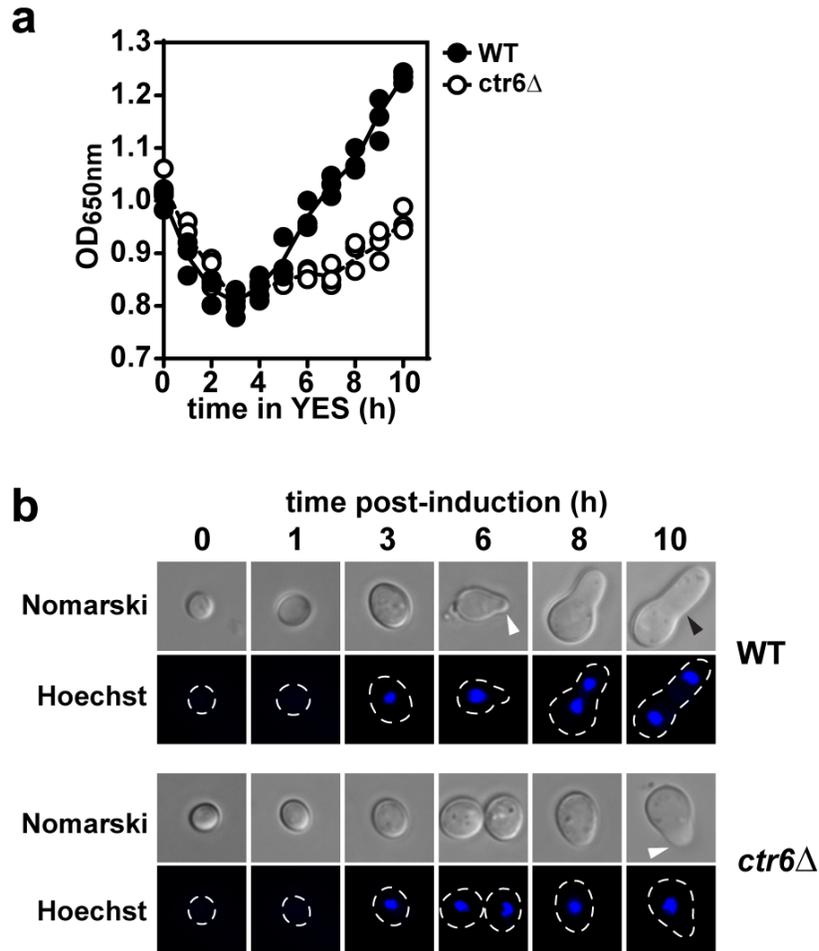


Figure 9. Ralentissement de la germination provoqué par la délétion de *ctr6*⁺. Les spores de type sauvage (WT) ou *ctr6*Δ libres ont été inoculées dans du milieu YES liquide à raison de 1×10^7 spores ml^{-1} . a) Aux temps indiqués après l'inoculation, l'absorbance de la culture a été mesurée à 650 nm. L'expérience a été réalisée à trois reprises et les valeurs des trois essais ont été reportées en graphique. b) Aux temps indiqués, les spores en germination ont été analysées par microscopie. La morphologie des spores a été examinée à la lumière visible (Nomarski). Des images représentatives de la majorité de la population sont rapportées. La perméabilité des spores a aussi été évaluée par la révélation de l'ADN au moyen du colorant Hoechst ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$). Les pointes blanches indiquent la position des projections émergentes et la pointe noire indique la position du septum.

L'abondance des ions Cu se reflète sur l'activité des enzymes Cu-dépendantes. La contribution des transporteurs Ctr4, Ctr5, et Ctr6 pourra être révélée si leur délétion affecte l'activité de SOD1, Cao1, ou CcO par exemple. Au moment de la maturation des spores, ces enzy-

mes et d'autres composantes cellulaires y sont incluses pour assurer la survie des spores lors de la latence et leur activation. Cependant, il est clair que les spores au moment de germer doivent ajuster leur contenu cellulaire pour soutenir la prolifération. L'importante synthèse *de novo* de protéines qui s'en accompagne doit générer une grande demande de Cu pour satisfaire la distribution de cet ion aux cuproenzymes nouvellement produites. Les systèmes d'acquisition du Cu prendraient alors toute leur importance afin d'assurer une transition viable entre les spores et la forme végétative de *S. pombe*.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le professeur Simon Labbé pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je suis reconnaissant pour le dévouement et la confiance qu'il porte à tous ses étudiants. L'intérêt et la passion qui l'anime dans ses recherches à été des plus inspirants.

Un remerciement tout particulier va à Jude. Je suis reconnaissant pour la patience dont il a fait preuve à mon égard durant mes stages au laboratoire. Je tiens aussi à souligner son implication dans ma formation. Il a consacré beaucoup de son temps à mon encadrement, et à me transmettre ses connaissances et son savoir-faire.

Finalement, mes années à la maîtrise n'auraient pas été les mêmes sans les merveilleux collègues que je côtoie chaque jour. Par leurs conseils, leur support et leur patience, ils ont contribué aux succès de mes études. Anne, Ariane, Marie-Chantal, Apu, Jean-François, Jude, Thierry, Raphaël, Vincent et tous les étudiants que j'ai pu croiser au laboratoire ont su égayer mes journées même lors des longues expériences en méiose.

RÉFÉRENCES

- Aller SG, Eng ET, De Feo CJ, & Unger VM** (2004) Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *J Biol Chem* **279**: 53435-53441
- Arai K, Sato M, Tanaka K, & Yamamoto M** (2010) Nuclear compartmentalization is abolished during fission yeast meiosis. *Curr Biol* **20**: 1913-1918
- Arellano M, Cartagena-Lirola H, Nasser Hajibagheri MA, Duran A, & Henar Valdivieso M** (2000) Proper ascospore maturation requires the *chs1+* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **35**: 79-89
- Arnesano F, Balatri E, Banci L, Bertini I, & Winge DR** (2005) Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure* **13**: 713-722
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL, & O'Halloran TV** (2001) Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. *J Biol Chem* **276**: 41365-41376
- Asakawa H, Kojidani T, Mori C, Osakada H, Sato M, Ding D, Hiraoka Y, & Haraguchi T** (2010) Virtual breakdown of the nuclear envelope in fission yeast meiosis. *Curr Biol* **20**: 1919-1925
- Avery SV, Howlett NG, & Radice S** (1996) Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3960-3966
- Bahler J, Schuchert P, Grimm C, & Kohli J** (1991) Synchronized meiosis and recombination in fission yeast: observations with *pat1-114* diploid cells. *Curr Genet* **19**: 445-451
- Banci L, Bertini I, Cantini F, Felli IC, Gonnelli L, Hadjiliadis N, Pierattelli R, Rosato A, & Voulgaris P** (2006) The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nat Chem Biol* **2**: 367-368
- Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL, & O'Halloran TV** (2001) Solution structure of the yeast copper transporter domain Ccc2a in the apo and Cu(I)-loaded states. *J Biol Chem* **276**: 8415-8426
- Banci L, Bertini I, Cramaro F, Del Conte R, & Viezzoli MS** (2002) The solution structure of reduced dimeric copper zinc superoxide dismutase. *Eur J Biochem* **269**: 1905-1915
- Banting GS & Glerum DM** (2006) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase assembly protein Cox11p. *Eukaryot Cell* **5**: 568-578
- Beaudoin J, Ekici S, Daldal F, Ait-Mohand S, Guerin B, & Labbé S** (2013) Copper transport and regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* **41**: 1679-1686

Beudoin J, Ioannoni R, Lopez-Maury L, Bahler J, Ait-Mohand S, Guerin B, Dodani SC, Chang CJ, & Labbé S (2011a) Mfc1 is a novel forespore membrane copper transporter in meiotic and sporulating cells. *J Biol Chem* **286**: 34356-34372

Beudoin J & Labbé S (2006) Copper induces cytoplasmic retention of fission yeast transcription factor cuf1. *Eukaryot Cell* **5**: 277-292

Beudoin J & Labbé S (2001) The fission yeast copper-sensing transcription factor Cuf1 regulates the copper transporter gene expression through an Ace1/Amt1-like recognition sequence. *J Biol Chem* **276**: 15472-15480

Beudoin J, Thiele DJ, Labbé S, & Puig S (2011b) Dissection of the relative contribution of the *Schizosaccharomyces pombe* Ctr4 and Ctr5 proteins to the copper transport and cell surface delivery functions. *Microbiology* **157**: 1021-1031

Beers J, Glerum DM, & Tzagoloff A (2002) Purification and characterization of yeast Sco1p, a mitochondrial copper protein. *J Biol Chem* **277**: 22185-22190

Beers J, Glerum DM, & Tzagoloff A (1997) Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J Biol Chem* **272**: 33191-33196

Bellemare DR, Shaner L, Morano KA, Beudoin J, Langlois R, & Labbé S (2002) Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **277**: 46676-46686

Bendezu FO & Martin SG (2013) Cdc42 explores the cell periphery for mate selection in fission yeast. *Curr Biol* **23**: 42-47

Bernhardt ML, Kong BY, Kim AM, O'Halloran TV, & Woodruff TK (2012) A zinc-dependent mechanism regulates meiotic progression in mammalian oocytes. *Biol Reprod* **86**: 114, 1-10

Brazeau BJ, Johnson BJ, & Wilmot CM (2004) Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Arch Biochem Biophys* **428**: 22-31

Cai D & Klinman JP (1994) Evidence of a self-catalytic mechanism of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in yeast copper amine oxidase. *J Biol Chem* **269**: 32039-32042

Carr HS & Winge DR (2003) Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res* **36**: 309-316

Chang EC, Crawford BF, Hong Z, Bilinski T, & Kosman DJ (1991) Genetic and biochemical characterization of Cu,Zn superoxide dismutase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**: 4417-4424

Chen XZ, Peng JB, Cohen A, Nelson H, Nelson N, & Hediger MA (1999) Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J Biol Chem* **274**: 35089-35094

Chen Z, Schwartz B, Williams NK, Li R, Klinman JP, & Mathews FS (2000) Crystal structure at 2.5 Å resolution of zinc-substituted copper amine oxidase of *Hansenula polymorpha* expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **39**: 9709-9717

Choi YH, Matsuzaki R, Suzuki S, & Tanizawa K (1996) Role of conserved Asn-Tyr-Asp-Tyr sequence in bacterial copper/2,4, 5-trihydroxyphenylalanyl quinone-containing histamine oxidase. *J Biol Chem* **271**: 22598-22603

Cobine PA, Ojeda LD, Rigby KM, & Winge DR (2004) Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* **279**: 14447-14455

Cobine PA, Pierrel F, Bestwick ML, & Winge DR (2006a) Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *J Biol Chem* **281**: 36552-36559

Cobine PA, Pierrel F, & Winge DR (2006b) Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 759-772

Cohen A, Nelson H, & Nelson N (2000) The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J Biol Chem* **275**: 33388-33394

Cooper RA, Knowles PF, Brown DE, McGuirl MA, & Dooley DM (1992) Evidence for copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochem J* **288**: 337-340

Corpillo D, Valetti F, Giuffrida MG, Conti A, Rossi A, Finazzi-Agro A, & Giunta C (2003) Induction and characterization of a novel amine oxidase from the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* **20**: 369-379

Coudreuse D, van Bakel H, Dewez M, Soutourina J, Parnell T, Vandehaute J, Cairns B, Werner M, & Hermand D (2010) A gene-specific requirement of RNA polymerase II CTD phosphorylation for sexual differentiation in *S. pombe*. *Curr Biol* **20**: 1053-1064

Culotta VC, Howard WR, & Liu XF (1994) CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 25295-25302

Culotta VC, Joh HD, Lin SJ, Slekar KH, & Strain J (1995) A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J Biol Chem* **270**: 29991-29997

Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, & Gitlin JD (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272**: 23469-23472

Dameron CT, George GN, Arnold P, Santhanagopalan V, & Winge DR (1993) Distinct metal binding configurations in ACE1. *Biochemistry* **32**: 7294-7301

Dancis A, Haile D, Yuan DS, & Klausner RD (1994a) The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J Biol Chem* **269**: 25660-25667

Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J, & Klausner RD (1994b) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**: 393-402

De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ, & Unger VM (2009) Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4237-4242

Ecker DJ, Butt TR, Sternberg EJ, Neeper MP, Debouck C, Gorman JA, & Crooke ST (1986) Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J Biol Chem* **261**: 16895-16900

Enrique-Tarancon G, Marti L, Morin N, Lizcano J, Unzeta M, Sevilla L, Camps M, Palacin M, Testar X, Carpene C, & Zorzano A (1998) Role of Semicarbazide-sensitive Amine Oxidase on Glucose Transport and GLUT4 Recruitment to the Cell Surface in Adipose Cells. *J Biol Chem* **273**: 8025-8032

Festa RA & Thiele DJ (2011) Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol* **21**: R877-83

Field LS, Luk E, & Culotta VC (2002) Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J Bioenerg Biomembr* **34**: 373-379

Fukunishi K, Miyakubi K, Hatanaka M, Otsuru N, Hirata A, Shimoda C, & Nakamura T (2014) The fission yeast spore is coated by a proteinaceous surface layer comprising mainly Isp3. *Mol Biol Cell* **25**: 1549-1559

Funaya C, Samarasinghe S, Pruggnaller S, Ohta M, Connolly Y, Müller J, Murakami H, Grallert A, Yamamoto M, Smith D, Antony C, & Tanaka K (2012) Transient structure associated with the spindle pole body directs meiotic microtubule reorganization in *S. pombe*. *Curr Biol* **22**: 562-574

Furukawa Y & O'Halloran TV (2005) Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation. *J Biol Chem* **280**: 17266-17274

Furukawa Y, Torres AS, & O'Halloran TV (2004) Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J* **23**: 2872-2881

Garcia I, Tajadura V, Martin V, Toda T, & Sanchez Y (2006) Synthesis of α -glucans in fission yeast spores is carried out by three α -glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol* **59**: 836-853

Georgatsou E & Alexandraki D (1999) Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes. *Yeast* **15**: 573-584

Glerum DM, Shtanko A, & Tzagoloff A (1996) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **271**: 14504-14509

- Gonzalez Y, Meerbrey K, Chong J, Torii Y, Padte NN, & Sazer S** (2009) Nuclear shape, growth and integrity in the closed mitosis of fission yeast depend on the Ran-GTPase system, the spindle pole body and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **122**: 2464-2472
- Graden JA & Winge DR** (1997) Copper-mediated repression of the activation domain in the yeast Mac1p transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5550-5555
- Halliwell B & Gutteridge JM** (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* **307**: 108-112
- Harigaya Y & Yamamoto M** (2007) Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res* **15**: 523-537
- Hart PJ, Balbirnie MM, Ogihara NL, Nersissian AM, Weiss MS, Valentine JS, & Eisenberg D** (1999) A structure-based mechanism for copper/zinc superoxide dismutase, *Biochemistry* **38**: 2167-2178
- Hassett R, Dix DR, Eide DJ, & Kosman DJ** (2000) The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **351 Pt 2**: 477-484
- Hassett R & Kosman DJ** (1995) Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**: 128-134
- Hatanaka M & Shimoda C** (2001) The cyclic AMP/PKA signal pathway is required for initiation of spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**: 207-217
- Henle ES & Linn S** (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **272**: 19095-19098
- Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L, & Amasino RM** (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**: 1227-1234
- Ho Y, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, & Hutz RJ** (1998) Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **273**: 7765-7769
- Hong YC, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS, & Winge DR** (2004) Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem* **279**: 35334-35340
- Huffman DL & O'Halloran TV** (2001) Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* **70**: 677-701
- Ioannoni R, Beaudoin J, Lopez-Maury L, Codlin S, Bahler J, & Labbé S** (2012) Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation. *PLoS One* **7**: e36338
- Ioannoni R, Beaudoin J, Mercier A, & Labbé S** (2010) Copper-dependent trafficking of the Ctr4-Ctr5 copper transporting complex. *PLoS One* **5**: e11964

- Jambhekar A & Amon A** (2008) control of meiosis by respiration. *Curr Biol* **18**: 969-975
- Janes SM, Palcic MM, Scaman CH, Smith AJ, Brown DE, Dooley DM, Mure M, & Klinman JP** (1992) Identification of topaquinone and its consensus sequence in copper amine oxidases. *Biochemistry* **31**: 12147-12154
- Jensen LT & Culotta VC** (2005) Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. *J Biol Chem* **280**: 41373-41379
- Jensen LT, Posewitz MC, Srinivasan C, & Winge DR** (1998) Mapping of the DNA binding domain of the copper-responsive transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 23805-23811
- Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, Kosman D, & Jentsch S** (1993) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J* **12**: 5051-5056
- Kampfenkel K, Kushnir S, Babiychuk E, Inze D, & Van Montagu M** (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J Biol Chem* **270**: 28479-28486
- Kashiwazaki J, Yamasaki Y, Itadani A, Teraguchi E, Maeda Y, Shimoda C, & Nakamura T** (2011) Endocytosis is essential for dynamic translocation of a syntaxin 1 orthologue during fission yeast meiosis. *Mol Biol Cell* **22**: 3658-3670
- Khalimonchuk O, Ostermann K, & Rodel G** (2005) Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox11p, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome c oxidase. *Curr Genet* **47**: 223-233
- Kim AM, Vogt S, O'Halloran TV, & Woodruff TK** (2010) Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat Chem Biol* **6**: 674-681
- Kim BE, Nevitt T, & Thiele DJ** (2008) Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* **4**: 176-185
- Klionsky DJ, Herman PK, & Emr SD** (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **54**: 266-292
- Klomp LWJ, Lin S, S.Yuan D, Klausner RD, Culotta VC, & Gitlin JD** (1997) Identification and Functional Expression of HAH1, a Novel Human Gene Involved in Copper Homeostasis. *J Biol Chem* **272**: 9221-9226
- Knight SA, Labbe S, Kwon LF, Kosman DJ, & Thiele DJ** (1996) A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* **10**: 1917-1929
- Krapp A, Collin P, Cokoja A, Dischinger S, Cano E, & Simanis V** (2006) The *Schizosaccharomyces pombe* septation initiation network (SIN) is required for spore formation in meiosis. *J Cell Sci* **119**: 2882-2891

Kronstad JW, Hu G, & Jung WH (2013) An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* **21**: 457-465

Kuo YM, Zhou B, Cosco D, & Gitschier J (2001) The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6836-6841

La Fontaine S & Mercer JF (2007) Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys* **463**: 149-167

Labbé S, Pena MM, Fernandes AR, & Thiele DJ (1999) A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **274**: 36252-36260

Laliberté J, Whitson LJ, Beaudoin J, Holloway SP, Hart PJ, & Labbé S (2004) The *Schizosaccharomyces pombe* Pccs protein functions in both copper trafficking and metal detoxification pathways. *J Biol Chem* **279**: 28744-28755

Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, & Rosenzweig AC (2001) Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat Struct Biol* **8**: 751-755

Lamb AL, Wernimont AK, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV, & Rosenzweig AC (1999) Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol* **6**: 724-729

Lee J, Pena MM, Nose Y, & Thiele DJ (2002) Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem* **277**: 4380-4387

Lee J, Prohaska JR, Dagenais SL, Glover TW, & Thiele DJ (2000) Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene* **254**: 87-96

Lee J, Prohaska JR, & Thiele DJ (2001) Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6842-6847

Lin SJ & Culotta VC (1995) The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3784-3788

Lin SJ, Pufahl RA, Dancis A, O'Halloran TV, & Culotta VC (1997) A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* **272**: 9215-9220

Liu J, Sitaram A, & Burd CG (2007) Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic* **8**: 1375-1384

Liu XF, Elashvili I, Gralla EB, Valentine JS, Lapinskas P, & Culotta VC (1992) Yeast lacking superoxide dismutase: Isolation of genetic suppressors. *J Biol Chem* **267**: 18298-18302

- Lode A, Kuschel M, Paret C, & Rodel G** (2000) Mitochondrial copper metabolism in yeast: interaction between Sco1p and Cox2p. *FEBS Lett* **485**: 19-24
- Madsen E & Gitlin JD** (2007) Copper deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 187-192
- Mata J, Lyne R, Burns G, & Bahler J** (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* **32**: 143-147
- Mata J, Wilbrey A, & Bahler J** (2007) Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol* **8**: R217
- Maxfield AB, Heaton DN, & Winge DR** (2004) Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* **279**: 5072-5080
- McCord JM & Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* **244**: 6049-6055
- McLeod M & Beach D** (1988) A specific inhibitor of the ran1+ protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **332**: 509-514
- Merlini L, Dudin O, & Martin SG** (2013) Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biology* **3**: 130008
- Migliorini C, Sinicropi A, Kozlowski H, Luczkowski M, & Valensin D** (2014) Copper-induced structural propensities of the amyloidogenic region of human prion protein. *J Biol Inorg Chem* **19**: 635-645
- Montes S, Rivera-Mancia S, Diaz-Ruiz A, Tristan-Lopez L, & Rios C** (2014) Copper and copper proteins in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* **2014**: 147251
- Mure M** (2004) Tyrosine-derived quinone cofactors. *Acc Chem Res* **37**: 131-139
- Nakamura T, Abe H, Hirata A, & Shimoda C** (2004) ADAM family protein Mde10 is essential for development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **3**: 27-39
- Nakase Y, Nakamura-Kubo M, Ye Y, Hirata A, Shimoda C, & Nakamura T** (2008) Meiotic spindle pole bodies acquire the ability to assemble the spore plasma membrane by sequential recruitment of sporulation-specific components in fission yeast. *Mol Biol Cell* **19**: 2476-2487
- Nevitt T, Ohrvik H, & Thiele DJ** (2012) Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1580-1593
- Nielsen O** (2004) Mating-type control and differentiation, *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe* **2004**: 281-296

- Ohrvik H, Nose Y, Wood LK, Kim BE, Gleber SC, Ralle M, & Thiele DJ** (2013) Ctr2 regulates biogenesis of a cleaved form of mammalian Ctr1 metal transporter lacking the copper- and cisplatin-binding ecto-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 4279-4288
- Ohta M, Sato M, & Yamamoto M** (2012) Spindle pole body components are reorganized during fission yeast meiosis. *Mol Biol Cell* **23**: 1799-1811
- Okuzaki D, Satake W, Hirata A, & Nojima H** (2003) Fission yeast *meu14+* is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II. *J Cell Sci* **116**: 2721-2735
- Ooi CE, Rabinovich E, Dancis A, Bonifacino JS, & Klausner RD** (1996) Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J* **15**: 3515-3523
- O'Sullivan J, Unzeta M, Healy J, O'Sullivan MI, Davey G, & Tipton KF** (2004) Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. *Neurotoxicology* **25**: 303-315
- Otsubo Y & Yamamoto M** (2012) Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. *J Cell Sci* **125**: 2789-2793
- Pena MM, Puig S, & Thiele DJ** (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* **275**: 33244-33251
- Peter C, Laliberte J, Beaudoin J, & Labbe S** (2008) Copper distributed by Atx1 is available to copper amine oxidase 1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **7**: 1781-1794
- Petris MJ** (2004) The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Pflugers Arch* **447**: 752-755
- Pfeiffer RF** (2011) Wilson's disease. *Handb Clin Neurol* **100**: 681-709
- Phillips JP, Campbell SD, Michaud D, Charbonneau M, & Hilliker AJ** (1989) Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2761-2765
- Plante S, Ioannoni R, Beaudoin J, & Labbé S** (2014) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Copper Transporter Proteins in Meiotic and Sporulating Cells. *J Biol Chem* **289**:10168-10181
- Portnoy ME, Jensen LT, & Culotta VC** (2002) The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochem J* **362**: 119-124
- Portnoy ME, Rosenzweig AC, Rae T, Huffman DL, O'Halloran TV, & Culotta VC** (1999) Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J Biol Chem* **274**: 15041-15045
- Predki PF & Sarkar B** (1992) Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J Biol Chem* **267**: 5842-5846

Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta VC, Penner-Hahn JE, & O'Halloran TV (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**: 853-856

Puig S, Lee J, Lau M, & Thiele DJ (2002) Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem* **277**: 26021-26030

Puig S & Thiele DJ (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 171-180

Qin J, Kang W, Leung B, & McLeod M (2003) Ste11p, a high-mobility-group box DNA-binding protein, undergoes pheromone- and nutrient-regulated nuclear-cytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol* **23**: 3253-3264

Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, & O'Halloran TV (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**: 805-808

Rae TD, Torres AS, Pufahl RA, & O'Halloran TV (2001) Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. *J Biol Chem* **276**: 5166-5176

Rea G, Laurenzi M, Tranquilli E, D'Ovidio R, Federico R, & Angelini R (1998) Developmentally and wound-regulated expression of the gene encoding a cell wall copper amine oxidase in chickpea seedlings. *FEBS Lett* **437**: 177-182

Reddi A & Culotta V (2013) SOD1 Integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* **152**: 224-235

Rees EM, Lee J, & Thiele DJ (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *J Biol Chem* **279**: 54221-54229

Rees EM & Thiele DJ (2007) Identification of a vacuole-associated metalloredutase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. *J Biol Chem* **282**: 21629-21638

Robida AM & Kerppola TK (2009) Bimolecular fluorescence complementation analysis of inducible protein interactions: effects of factors affecting protein folding on fluorescent protein fragment association. *J Mol Biol* **394**: 391-409

Robinson NJ & Winge DR (2010) Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* **79**: 537-562

Roman DG, Dancis A, Anderson GJ, & Klausner RD (1993) The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol Cell Biol* **13**: 4342-4350

Rosenzweig AC, Huffman DL, Hou MY, Wernimont AK, Pufahl RA, & O'Halloran TV (1999) Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure* **7**: 605-617

Salmi M & Jalkanen S (1992) A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science* **257**: 1407-1409

Sazer S (2010) Nuclear membrane: nuclear envelope Porosity in fission yeast meiosis. *Curr Biol* **20**: R923-R925

Schaefer M & Gitlin JD (1999) Genetic disorders of membrane transport. IV. Wilson's disease and Menkes disease. *Am J Physiol* **276**: G311-314

Schmidt PJ, Kunst C, & Culotta VC (2000) Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo. Role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1. *J Biol Chem* **275**: 33771-33776

Schmidt PJ, Rae TD, Pufahl RA, Hamma T, Strain J, O'Halloran TV, & Culotta VC (1999) Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **274**: 23719-23725

Shimoda C (2004) Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *J Cell Sci* **117**: 389-396

Singh A, Kaur N, & Kosman DJ (2007) The metalloreductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J Biol Chem* **282**: 28619-28626

Singh A, Severance S, Kaur N, Wiltsie W, & Kosman DJ (2006) Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p.Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 13355-13364

Stannard JN & Horecker BL (1948) The in vitro inhibition of cytochrome oxidase by azide and cyanide. *J Biol Chem* **172**: 599-608

Strain J & Culotta VC (1996) Copper ions and the regulation of *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein genes under aerobic and anaerobic conditions. *Mol Gen Genet* **251**: 139-145

Sukegawa Y, Yamashita A, & Yamamoto M (2011) The fission yeast stress-responsive MAPK pathway promotes meiosis via the phosphorylation of Pol II CTD in response to environmental and feedback cues. *PLoS Genet* **7**: e1002387

Telianidis J, Hung YH, Materia S, & Fontaine SL (2013) Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Front Aging Neurosci* **5**: 44

Thorvaldsen JL, Sewell AK, McCowen CL, & Winge DR (1993) Regulation of metallothionein genes by the ACE1 and AMT1 transcription factors. *J Biol Chem* **268**: 12512-12518

Tougan T, Chiba Y, Kakiyama Y, Hirata A, & Nojima H (2002) Meu10 is required for spore wall maturation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gen Cells* **7**: 217-231

Tumer Z, Moller LB, & Horn N (1999) Mutation spectrum of ATP7A, the gene defective in Menkes disease. *Adv Exp Med Biol* **448**: 83-95

Urbanowski JL & Piper RC (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

Valko M, Morris H, & Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**: 1161-1208

Vest KE, Leary SC, Winge DR, & Cobine PA (2013) Copper import into the mitochondrial matrix in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Pic2, a mitochondrial carrier family protein. *J Biol Chem* **288**: 23884-23892

Wakabayashi T, Nakamura N, Sambongi Y, Wada Y, Oka T, & Futai M (1998) Identification of the copper chaperone, CUC-1, in *Caenorhabditis elegans*: tissue specific co-expression with the copper transporting ATPase, CUA-1. *FEBS Lett* **440**: 141-146

Wallace MA, Liou L, Martins J, Clement MHS, Bailey S, Longo VD, Valentine JS, & Gralla EB (2004) Superoxide Inhibits 4Fe-4S Cluster Enzymes Involved in Amino Acid Biosynthesis: cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. *J Biol Chem* **279**: 32055-32062

Waters BM & Eide DJ (2002) Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* **277**: 33749-33757

Whiteway M & Oberholzer U (2004) *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **7**: 350-357

Wilmot CM (2003) Oxygen activation in a copper-containing amine oxidase. *Biochem Soc Trans* **31**: 493-496

Wong PC, Waggoner D, Subramaniam JR, Tessarollo L, Bartnikas TB, Culotta VC, Price DL, Rothstein J, & Gitlin JD (2000) Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2886-2891

Wu X, Sinani D, Kim H, & Lee J (2009) Copper transport activity of yeast Ctr1 is down-regulated via its C terminus in response to excess copper. *J Biol Chem* **284**: 4112-4122

Yamamoto M (2004) Initiation of meiosis. *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, **2004**, Springer Berlin Heidelberg, New-York (NY), USA, pp 297-309.

Yoo BY, Calleja GB, & Johnson BF (1973) Ultrastructural changes of the fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) during ascospore formation. *Arch Mikrobiol* **91**: 1-10

Yuan DS, Stearman R, Dancis A, Dunn T, Beeler T, & Klausner RD (1995) The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2632-2636

Yun CW, Bauler M, Moore RE, Klebba PE, & Philpott CC (2001) The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 10218-10223

Zhou B & Gitschier J (1997) hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7481-7486

Zhou H, Cadigan KM, & Thiele DJ (2003) A copper-regulated transporter required for copper acquisition, pigmentation, and specific stages of development in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* **278**: 48210-48218

Zhou H & Thiele DJ (2001) Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **276**: 20529-20535

Zhu Z, Labbe S, Pena MM, & Thiele DJ (1998) Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J Biol Chem* **273**: 1277-1280