Etude du rôle des activateurs de transcription paralogues Aft1p et Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer chez la levure Saccharomyces cerevisiae

Maïté Courel

▶ **To cite this version:**

Maïté Courel. Etude du rôle des activateurs de transcription paralogues Aft1p et Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer chez la levure Saccharomyces cerevisiae. Biologie moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00843280

HAL Id: tel-00843280

https://theses.hal.science/tel-00843280

Submitted on 11 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS VI – PIERRE ET MARIE CURIE
INSTITUT JACQUES MONOD

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialité : **Génétique**

Présentée par

Maïté COUREL

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Etude du rôle des activateurs de transcription paralogues Aft1p et Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Soutenue le 6 septembre 2005 devant le jury composé de :

Mr Jean-Claude Liébart	**Président**
Mme Agnès Rötig	**Rapporteur**
Mr Bertrand Daignan-Fornier	**Rapporteur**
Mr Jean-Marc Moulis	**Examinateur**
Mr Pierre-Louis Blaiseau	**Directeur de thèse**

« Le commencement de toutes les sciences,

c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »

(Aristote)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser un grand merci aux membres de mon jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur d'accepter, avec enthousiasme, d'examiner ce travail.

Lorsque je regarde ces quatre années de thèse passées à l'institut Jacques Monod, je constate qu'elles ont été riches de rencontres, tant scientifiques qu'humaines, qui ont contribué de près ou de loin à la multitude de souvenirs que je garderai de cette première véritable expérience au sein du monde de la recherche. Vais-je parvenir à remercier toutes ces personnes en quelques lignes ? Je n'en suis pas sûre, et je présente mes excuses par avance à tous les oubliés, qui sont malgré tout présents dans ma petite tête.

Je voudrais commencer par remercier les personnes du laboratoire, qui m'ont appris, chacune à leur manière, à faire de la recherche.
Merci à Jean-Michel, Camadro, the big boss, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, et pour avoir été toujours là lorsque j'en avais besoin. Nos discussions, de fin de journée bien souvent, ont été pour moi des sources indispensables de réflexion et surtout de positivisme.
Milles merci à Pierre-Louis Blaiseau, qui a du me supporter au quotidien durant toutes ces années, et qu'il a fallu que je supporte également...Ça n'a pas toujours été facile, mais avec le recul, ça en valait vraiment la peine. J'ai appris énormément à ses côtés, et j'espère que, comme moi, il gardera un excellent souvenir de cette expérience unique.
Merci à Emmanuel Lesuisse, pour ses yeux bleus et son sourire, mais surtout pour ses conseils et sa vision particulière des problèmes scientifiques abordés au laboratoire.
Merci à Jean-Jacques Montagne, que nous n'avons hélas pas vu souvent au 5e, mais qui a toujours pris le temps de me demander comment j'allais et de s'intéresser à ma réponse.
Le laboratoire ne serait pas ce qu'il est sans l'ensemble de la gente féminine, avec qui j'ai tissé des liens qui dépassent le cadre du simple « collèguisme ».
Mes remerciements les plus chaleureux à Renata Santos, Wonderwoman réincarnée. Toujours présente, oreille attentive, conseillère hors pair, assez dure parfois, mais toujours juste et tellement dans le vrai…Renata, merci pour tout.
Un grand merci à Emmanuelle et à Soo Jin (ma Dark Vador préférée), petites thésardes discrètes qui gagnent à être connues, et qui ont rendu le labo plus agréable. Je n'oublie pas non plus cette sacrée Monique, et sa bonne humeur légendaire.
Merci à Sylvie et Emmanuelle, post-doc de choc, duo loufoque, véritables électrochocs, pour leur joie de vivre et leurs conseils avisés. Chapeau bas à Sylvie notamment, pour s'être autant impliquée dans mon travail et dans ma vie de fin de thèse avec une générosité sans pareil.
Une pensée particulière pleine d'une véritable amitié pour ma petite Alex, le démon au cœur d'ange, pour avoir partagé tout, absolument tout, durant ces quatre années, des déceptions aux réussites scientifiques, en passant par les aléas de la vie personnelle et familiale. J'espère que nous continuerons longtemps à croiser nos vies.

Je souhaite remercier également l'ensemble de la population du couloir 43-44, pour leur sympathie, et leurs discussions toujours très enrichissantes. Un gros clin d'œil à tous les

« Tsapis », le labo d'en face, pour m'avoir soutenue, et pour avoir été plus qu'attentifs à mon évolution. J'ai une pensée particulière pour Nicole, ancienne « Camadro », qui a été pour ainsi dire une seconde mère, et qui a toujours su trouver les mots justes pour me réconforter. Je remercie également tous les « Petit-Glatron », le labo du fond. Merci surtout à celles et ceux qui ont quitté le navire, Anne et Fabiola, Tom et Pierre, pour les bonnes parties de rigolades, et milles merci à Brigitte et Sandrine, pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je tiens aussi à remercier les travailleurs de l'ombre, sans qui les labos ne pourraient pas fonctionner, et qui sont toujours là pour nous tous, Katti, Josiane (tu nous manques), Chantal, Stéphane, Agnès, Antonia et Martine, ma copine de l'administration.

Les membres de la recherche ont été autant de personnalités qui m'ont aidées à me construire durant ces quatre ans, mais les membres de ma famille ont également considérablement contribué à mon épanouissement, et ce depuis toujours.
Je tiens à dire merci à mon Steph à moi, mon mamour, pour tout ce qu'il m'a apporté et qu'il m'apporte encore.
Un infini merci à la plus géniale des femmes, ma mère, pour tout l'amour qu'elle me donne à chaque instant et pour son soutien inconditionnel et infaillible.
Un grand merci à mon papoun, pour être un père, certes pas toujours très habile, mais tellement fier des ses enfants et toujours à l'écoute.
Je remercie de tout coeur Ririck, mon frangin, mon complice, pour tout ce qu'il est, et Clo, sa chérie, ma copine aussi maintenant, pour sa gaieté et son enthousiasme.
Mes respects à Will, qui me porte beaucoup d'intérêt, de manière tellement naturelle, alors que rien ne l'y oblige.
Une pensée chaleureuse pour toute ma belle famille, qui a toujours su m'accompagner.
Milles merci aussi à mon tonton-parrain, sur qui je pourrai toujours compter.

Enfin, je termine par un gigantissime merci à Mamy, mon mécène, qui m'a soutenue moralement depuis le début, et financièrement durant ces derniers (longs) mois.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 14

CHAPITRE I : NECESSITE D'UNE REGULATION DU METABOLISME DU FER 15

A. Le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes vivants 15
B. Le fer est un élément peu disponible dans l'environnement 18
C. Quelques principes sur le transport et le stockage du fer 19
C-1. Les systèmes de transport du fer 19
C-2. Des protéines pour le stockage du fer intracellulaire 22
D. Le fer est un élément potentiellement toxique pour les cellules 23

CHAPITRE II : DIFFERENTS MECANISMES DE REGULATION DU METABOLISME DU FER 26

A. Chez les procaryotes 26
A-1. Mode d'action du répresseur transcriptionnel Fur 26
A-2. Les gènes régulés par Fur 27
B. Chez les champignons 29
B-1. Introduction au phylum des champignons 29
B-2. Les répresseurs transcriptionnels GATA régulent le métabolisme du fer chez la plupart des champignons 30
B-3. Les activateurs de transcription Aft1p et Aft2p 32
C. Chez les mammifères et les plantes 35
C-1. Mode d'action des régulateurs post-transcriptionnels IRP1 et IRP2 chez les mammifères 35
C-2. Les gènes régulés par IRP1 et IRP2 36
C-3. Des activateurs transcriptionnels chez les plantes ? 38

CHAPITRE III : REGULATION DE L'HOMEOSTASIE DU FER CHEZ *S. CEREVISIAE* 39

A. Le métabolisme du fer chez *S. cerevisiae* 39
A-1. Les systèmes d'acquisition du fer chez S. cerevisiae 39
A-2. Stockage et trafic intracellulaire du fer chez la levure *S. cerevisiae* 47
A-3. La mitochondrie : un lieu d'utilisation du fer intracellulaire 52
B. Aft1p et Aft2p, les régulateurs de l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae* 56
B-1. Aft1p, un régulateur majeur de l'homéostasie du fer chez S. cerevisiae 56
B-2. Aft1p et Aft2p : des facteurs de transcription paralogues 66
B-3. Le rôle cellulaire d'Aft2p au sein de la cellule n'est pas encore bien caractérisé 72
B-4. Problématiques abordées au cours de la thèse 78

RESULTATS 79

CHAPITRE I : ETUDE DES ROLES RESPECTIFS D'AFT1P ET D'AFT2P DANS LE METABOLISME DU FER 80

A. Article 1 : Aft2p régule l'homéostasie intracellulaire du fer en absence d'Aft1p 80
A-1. Préambule à l'article 1 80
A-2. Résumé de l'article 1 81
A-3. Article 1 86
A-4. Résultat complémentaire à l'analyse des séquences consensus des promoteurs 99
B. Analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur les promoteurs d'autres gènes du « régulon fer » : *FIT2*, *FIT3*, *CTH2* et *COT1* 102

B-1. Régulation transcriptionnelle de *FIT2* et *FIT3* 102
B-2. Régulation transcriptionnelle de *CTH2* : gestion de l'utilisation du fer 107
B-3. Régulation transcriptionnelle de *COT1* : un gène cible d'Aft2p ? 110
C. Régulation d'Aft1p et d'Aft2p par le fer 112
C-1. La quantité d'Aft1p est régulée au niveau transcriptionnel 112
C-2. La quantité d'Aft2p n'est pas régulée au niveau transcriptionnel 116
C-3. La quantité d'Aft1p ou d'Aft2p est un paramètre important pour la croissance des cellules 117

CHAPITRE II : IMPLICATION D'AFT1P ET D'AFT2P DANS LE METABOLISME DU ZINC 120

A. Pourquoi s'intéresser à la connexion fer-zinc ? 120
A-1. Introduction au métabolisme du zinc et à sa régulation 120
A-2. Aft1p et Aft2p sont impliqués dans la réponse à l'excès de plusieurs métaux 121
A-3. Le mutant *Δyfh1* est dérégulé pour l'homéostasie du zinc 123
B. Etude des effets du zinc en absence d'*AFT1* et/ou d'*AFT2* : confirmation de la connexion entre les deux métabolismes 124
B-1. Aft1p et Aft2p sont nécessaires pour la tolérance au zinc 124
B-2. Effet des délétions sur la quantité intracellulaire des métaux fer et zinc 127
C. Aft1p et Aft2p participent directement à la régulation transcriptionnelle de *ZRT1* et *ZRT3* 130
C-1. Aft1p et Aft2p sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *ZRT1* 130
C-2. Aft1p et Aft2p sont recrutés sur le promoteur de *ZRT1* 134
C-3. Le gène *ZRT3* pourrait être lui aussi directement régulé par Aft1p et Aft2p 137
D. Aft1p et Aft2p, des régulateurs pluripotentiels ? 139
D.1- Les phénotypes des doubles mutants *Δaft1Δzap1* et *Δaft2Δzap1* confirment l'étroite connexion entre les deux métabolismes 139
D-2. La fonction de transactivation d'Aft2p est régulée par le zinc 142
D-3. Comparaison des analyses globales de transcriptomes : d'autres gènes sous la dépendance d'Aft1p, d'Aft2p, et de Zap1p ? 143

CHAPITRE III : ANALYSE DU TRANSCRIPTOME DES MUTANTS 147

A. Etude des groupes de gènes affectés par l'absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p 147
A-1.Un quart du génome est affecté par la délétion d'*AFT1* et/ou *AFT2* 147
A-2. La transcription de 523 gènes est diminuée en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p 149
A-3. La transcription de 882 gènes est augmentée en absence d'Aft1p et d'Aft2p 155
A-4. Métabolisme du soufre 158
A-5. Métabolisme respiratoire et croissance sur milieu respirable 162
B. Vers de nouvelles cibles directes pour Aft1p et Aft2p ? 166
B-1.La présence d'une séquence consensus de fixation pour Aft1p et/ou Aft2p restreint le nombre de gènes cibles potentiels 166
B-2. Aft1p est impliqué dans la régulation directe des gènes du transport du fer extracellulaire 169
B-3. Aft1p et Aft2p sont impliqués ensemble dans la régulation directe de l'homéostasie du zinc 170
B-4. Aft2p pourrait être impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides 171

CHAPITRE IV: PURIFICATION DES PROTEINES AFT1P ET AFT2P 175

A. Stratégie de purification des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p 175
A-1. Pourquoi vouloir purifier les facteurs de transcription Aft1p et Aft2p ? 175
A-2. Système de purification utilisé 177

B. Matériel et Méthodes **178**
B-1. Tests d'induction et paramètres de production 178
B-2. Purification de la protéine GST-Aft2p 180
C. Résultats et discussion **182**
C-1. Production des protéines de fusion 182
C-2. Tentatives de purification d'Aft2p 186
C-3. Conclusions et perspectives 190

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES **192**

A. Le choix d'une démarche expérimentale **193**
A-1. Souches et milieux utilisés 193
A-2. Méthodologie 194
A-3. Stratégie de l'étude 194
B. Les gènes cibles d'Aft2p **195**
B-1. Aft1p et Aft2p ne sont pas recrutés sur les mêmes promoteurs 195
B-2. Des rôles distincts pour Aft1p et Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer 197
B-3. Un rôle pléiotrope pour Aft2p dans la cellule ? 198
C. Modes d'actions des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p **199**
C-1. Effet du fer sur l'activité d'Aft1p et d'Aft2p 200
C-2. Une cinétique différente d'activation d'Aft1p et d'Aft2p en condition de carence en fer 200
C-3. Régulation par le fer de la quantité des protéines Aft1p et Aft2p 201
D. Aft1p et Aft2p, des paralogues originaux **203**
E. Aft1p et Aft2p chez une souche de *S. cerevisiae* sauvage **205**

MATERIEL & METHODES **206**

Souches et plasmides **207**
Souches de levures 207
Souches bactériennes 208
A-3. Plasmides 208
Milieux et conditions de culture **210**
Composition des milieux levure 210
Composition des milieux bactériens 211
Conditions de culture des levures dans le milieu +/-fer 211
Test de croissance en milieu liquide 212
Test de croissance sur boîte 212
Mesures de métaux 212
Manipulations génétiques **213**
Transformation des bactéries et levures 213
Construction des souches de levure par insertion au locus 213
Construction des souches par croisement 214
Manipulation des acides nucléiques **215**
Oligonucléotides 215
Extraction d'acides nucléiques 217
Northern blot 217
RT-PCR quantitative 218
Analyses globales de transcriptome **219**
Présentation des filtres utilisés 219

Obtention des ADNc radiomarqués 220
Hybridation et détection 220
Analyse des données 221
Immunoprécipitation de la chromatine 225
Préparation de la chromatine et immunoprécipitation 225
Analyse par PCR quantitative 227
Manipulations des protéines chez *S. cerevisiae* 227
Extractions protéiques 227
Gels SDS-PAGE 228
Immunoempreinte 228

BIBLIOGRAPHIE 229

Résumé 248
Summary 249

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Configuration des couches électroniques de l'atome de fer. 15
Figure 2 : Mécanismes de transport du fer chez les mammifères. 22
Figure 3 : Mécanismes de toxicité du fer en condition aérobie. 24
Figure 4 : Régulation de l'homéostasie du fer par Fur chez *E. coli.* 28
Figure 5 : Classification des champignons au sein des eucaryotes. 29
Figure 6 : Représentation schématique des facteurs de transcription GATA fer-dépendants des champignons. 31
Figure 7 : Répartition d'Aft1p et d'Aft2p au sein des hémiascomycètes. 33
Figure 8 : Régulation post-transcriptionnelle des gènes du métabolisme du fer par IRP1/IRP2. 37
Figure 9: Schéma récapitulatif des systèmes de transport du fer extracellulaire chez *S. cerevisiae.* 39
Figure 10 : Schéma récapitulatif du transit du fer intracellulaire chez *S. cerevisiae.* 51
Figure 11 : Les gènes du « régulon fer ». 57
Figure 12 : Région promotrice de *FET3* où se fixe Aft1p. 60
Figure 13 : Localisation d'*AFT1* et d'*AFT2* dans des régions chromosomiques dupliquées. 67
Figure 14 : Alignement des séquences protéiques d'Aft1p et d'Aft2p. 69
Figure 15 : Gènes cibles potentiels d'Aft1p et d'Aft2p identifiés lors d'analyses globales du transcriptome avec les mutants constitutifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up*. 76
Figure 16 : Schéma de régulation du métabolisme du fer par Aft1p et Aft2p. 77
Figure 17 : Profils d'expression des gènes activés par *AFT1-1up* et/ou *AFT2-1up* dans l'ensemble des comparaisons effectuées en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p. 100
Figure 18 : Représentation des gènes *FIT1*, *FIT2* et *FIT3*. 103
Figure 19 : Régulation transcriptionnelle de *FIT2* par Aft1p et Aft2p. 104
Figure 20 : Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation transcriptionnelle de *FIT3* en condition accrue de carence en fer. 105
Figure 21 : Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation transcriptionnelle de *CTH2*. 109
Figure 22 : Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation transcriptionnelle de *COT1*. 111
Figure 23 : Analyse par RT-PCR des transcrits *AFT1*. 113
Figure 24 : Analyse du recrutement d'Aft2p et d'Aft1p sur le promoteur d'*AFT1*. 115
Figure 25 : Analyse de la régulation transcriptionnelle d'*AFT2*. 117
Figure 26 : Conséquences de la surexpression d'*AFT1* ou d'*AFT2* sur la croissance des cellules. 118
Figure 27 : Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la réponse à l'excès de zinc dans le milieu. 122
Figure 28 : Aft1p et Aft2p sont nécessaires pour mobiliser le fer utile à la tolérance au zinc. 125

Figure 29 : La sensibilité des souches mutantes *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* est accrue en condition de carence en fer. 126
Figure 30 : Quantités intracellulaires de fer et de zinc dans les souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2* et *Δzap1* en présence de concentrations variables de fer et de zinc. 128
Figure 31 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT1* chez les mutants *Δaft1* et/ou *Δaft2* en condition de carence en fer. 130
Figure 32 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT1* en absence de Zap1p en condition de carence en fer. 131
Figure 33 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT1* chez les mutants *aft1* et *aft1aft2* (contexte CM3260) en condition de carence en fer. 133
Figure 34 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT1* chez le mutant *Δaft1* en fonction de l'état en fer des cellules. 134
Figure 35 : Implication directe d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation transcriptionnelle de *ZRT1*. 135
Figure 36 : Localisation des séquences de fixation d'Aft1p/Aft2p et de Zap1p dans le promoteur de *ZRT1*. 136
Figure 37 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT3* par Aft1p et Aft2p. 138
Figure 38 : Localisation des séquences de fixation d'Aft1p/Aft2p et de Zap1p dans le promoteur de *ZRT3*. 139
Figure 39 : Aft1p et Aft2p sont connectés au métabolisme du zinc. 141
Figure 40 : La réponse transcriptionnelle à la carence en zinc est partiellement influencée par Aft1p et Aft2p. 145
Figure 41 : Représentation des séquences consensus de fixation de Zap1p et d'Aft1p/Aft2p dans le promoteur de *YGL258W* et *YOR387C*. 146
Figure 42 : Représentation du nombre de gènes affectés dans chaque comparaison sauvage/*aft1*, *aft2*/*aft1aft2*, sauvage/*aft1aft2*, *aft1*/*aft1aft2* et sauvage/*aft2*. 148
Figure 43 : Profil d'expression des gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p, d'Aft2p ou des deux. 151
Figure 44 : Répartition des gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p, d'Aft2p ou des deux selon leur fonction et leur localisation. 154
Figure 45 : Profil d'expression et répartition fonctionnelle des gènes dont l'expression est augmentée en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p. 156
Figure 46 : Comparaison des gènes dont l'expression est augmentée en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p avec les gènes régulés par Cth2p. 158
Figure 47: Le métabolisme du soufre chez la souche *aft1aft2*. 159
Figure 48: Aft1p et Aft2p sont nécessaires pour la résistance au cadmium. 160

Figure 49 : Les gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant *via* les thiols. 161
Figure 50 : Les gènes impliqués dans la glycolyse et le cycle de Krebs, affectés par la délétion d'Aft1p et/ou Aft2p. 162
Figure 51 : Les fonctions mitochondriales induites en absence d'Aft1p et/ou Aft2p. 163
Figure 52 : Croissance des mutants en présence de concentrations croissantes de glucose. 165
Figure 53 : Analyse des promoteurs pour la présence d'une séquence consensus de fixation d'Aft1p et/ou d'Aft2p. 167
Figure 54 : Gènes cibles potentiels d'Aft1p. 169
Figure 55 : Gènes cibles potentiels d'Aft1p et d'Aft2p. 170
Figure 56 : Gènes cibles potentiels d'Aft2p. 171
Figure 57 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol. 173
Figure 58 : Tests représentatifs de la production de la protéine de fusion GST-Aft1p. 183
Figure 59 : Premiers tests de production de la protéine de fusion GST-Aft2p. 184
Figure 60 : Production de la protéine GST-Aft2p soluble. 186
Figure 61 : Purification de la protéine de fusion GST-Aft2p. 187
Figure 62 : Clivage de la protéine GST-Aft2p. 188
Figure 63 : Purification de la protéine Aft2p à grande échelle. 190
Figure 64 : Construction des plasmides pGEX-4T-1-*AFT1* et pGEX-4T-1-*AFT2*. 209
Figure 65 : Premier lot de filtres Research Genetics. 220
Figure 66 : Représentation schématique de la méthode de validation des données par le calcul de la séparation standard. 222
Figure 67 : Nuage de points des valeurs d'intensités pour les deux hybridations des conditions sauvage ou *aft1*. 223

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Potentiels rédox des composants à co-facteur fer de la chaîne respiratoire. 16
Tableau 2 : Liste des gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse et la maturation des centres [Fe-S] chez *S. cerevisiae*. 53
Tableau 3 : Constantes d'affinité des chélateurs pour les métaux fer et zinc. 140
Tableau 4 : Mesure de la fonction transactivatrice d'Aft1p et d'Aft2p en fonction de la quantité de zinc dans le milieu. 143
Tableau 5 : Gènes dont l'expression est diminuée dans la souche *aft2* par rapport à la souche sauvage. 155
Tableau 6 : Composition en acides aminés des protéines Aft1p et Aft2p et biais de codons. 178
Tableau 7 : Tests de production de la protéine de fusion GST-Aft1p. 182
Tableau 8, 8bis, 8ter : Tests de production de la protéine de fusion GST-Aft2p sous forme soluble. 185
Tableau 9 : Souches de *S. cerevisiae.* 207
Tableau 10 : Plasmides utilisés au cours de ce travail. 208
Tableau 11 : Oligonucléotides utilisés pour la construction des souches de levure. 215
Tableau 12 : Oligonucléotides utilisés pour la construction des vecteurs d'expression hétérologue. 216
Tableau 13 : Oligonucléotides utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. 216
Tableau 14 : Oligonucléotides utilisés pour analyser la quantité des transcrits. 216
Tableau 15 : Valeurs numériques des bruits de fond de chaque expérience et calcul des valeurs seuil. 225

INTRODUCTION

Chapitre I :
Nécessité d'une régulation du métabolisme du fer

A. Le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes vivants

Le fer est le composant chimique majeur de la Terre (34,6% du poids total de la Terre). Il est, après l'aluminium, le métal le plus abondant de la croûte terrestre (Aluminium : 8,07% ; Fer : 5,05% du poids de la croûte terrestre). C'est le 26^{e} élément de la classification périodique de Mendéléïev. Le fer appartient à la famille des métaux de transition, ce qui implique qu'il a la possibilité d'exister sous divers états d'oxydation. La configuration des couches électroniques du fer est $1s^2\ 2s^2\ 2p^6\ 3s^2\ 3p^6\ 3d^6\ 4s^2$ (figure 1). Les états d'oxydation du fer peuvent varier de Fe(–II) à Fe(IV), mais ce sont les deux états d'oxydation Fe(II) (ion ferreux) et Fe(III) (ion ferrique) qui sont les plus couramment rencontrés. En effet, les deux électrons de la couche externe 4s peuvent être facilement perdus par l'atome de fer (conduisant à Fe(II)), et la perte supplémentaire d'un électron de la couche 3d (conduisant à Fe(III)) permet de stabiliser la configuration électronique de cette couche (figure 1).

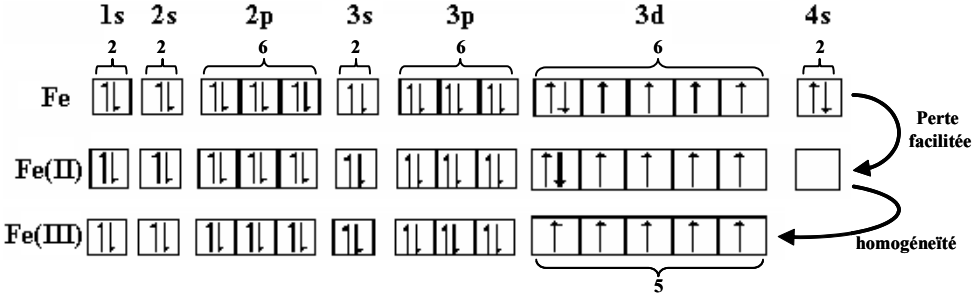

Figure 1 : Configuration des couches électroniques de l'atome de fer. Les flèches représentent les électrons, répartis sur les différentes couches électroniques nommées s, p et d.

Une autre caractéristique des métaux de transition est la facilité de former des complexes avec divers ligands par des liaisons de coordination. Le degré de coordination de 6 du fer est le degré le plus fréquemment rencontré (complexes octaédriques, $Fe(H_20)_6^{2+}$, $FeCl_6^{3-}$), mais il existe également des complexes tétraédriques de coordination 4 ($FeCl_4^-$, FeO_4^{2-}), ou des complexes bipyramidaux de coordination 5 ($Fe(CO)_5$, $Fe(N_3)_5^{2-}$).

Une propriété remarquable du fer en tant que couple rédox vient de l'extrême versatilité de son potentiel rédox. Le potentiel rédox standard du couple Fe^{3+}/Fe^{2+} est de 0,77V. Toutefois, en fonction du ligand auquel le fer est attaché, le potentiel rédox du couple Fe^{3+}/Fe^{2+} peut couvrir quasiment l'ensemble des potentiels rédox biologiques, allant d'environ -0,7V à 0,8V. Le tableau 1 représente l'ensemble des potentiels rédox du fer dans les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Tableau 1 : Potentiels rédox des composants à co-facteur fer de la chaîne respiratoire. D'après Wilson *et al.*, 1974

Composant	Potentiel rédox (V)
Complexe I	
(Fe-S)N-1a	-0,380
(Fe-S)N-1b	-0,250
(Fe-S)N-2	-0,030
(Fe-S)N-3,4	-0,240
(Fe-S)N-5,6	-0,270
Complexe II	
(Fe-S)S-1	-0,030
(Fe-S)S-2	-0,240
(Fe-S)S-3	0,060
Cytochrome b560	-0,080
Complexe III	
Cytochrome b562	0,030
Cytochrome b566	-0,030
(Fe-S)	0,280
Cytochrome c1	0,210
Cytochrome c	0,235
Complexe IV	
Cytochrome a	0,210
Cytochromea3	0,385

Grâce à ses propriétés physico-chimiques, le fer est ainsi retrouvé comme co-facteur de nombreuses enzymes intervenant dans des processus cellulaires très divers. Les protéines à co-facteur fer peuvent être classées en plusieurs catégories, selon le type de liaison du fer dans ces protéines :

1°- Les hémoprotéines sont des protéines dans lesquelles un atome de fer est retrouvé sous forme d'hème. Ce sont par exemple l'hémoglobine et la myoglobine (transport d'oxygène), les cytochromes (chaîne respiratoire, photosynthèse…), les peroxydases et les catalases (protection contre le stress oxydant, métabolisme de l'oxygène).

2°- Le fer peut également être retrouvé sous une forme dite non-héminique mononucléaire : un seul atome de fer est associé à la protéine, mais pas sous forme d'hème. C'est le cas des lipoxygénases (métabolisme des acides gras) ou des hydroxylases (synthèse d'acides aminés).

3°- Deux atomes de fer peuvent être associés à certaines protéines sous forme de centre di-fer, telles que les ribonucléotide réductases (synthèse et réparation de l'ADN).

4°- Plusieurs atomes de fer (de 2 à 8) peuvent être associés à certaines protéines sous forme de centre fer-soufre ([Fe-S]). C'est le cas par exemple de l'aconitase (cycle de Krebs), des nitrogénases (assimilation d'azote atmosphérique), des ferrédoxines (photosynthèse, synthèse des centres [Fe-S]) et d'autres protéines impliquées dans des processus divers tels que la biosynthèse d'acides aminés ou la biogenèse des ribosomes.

Le fer est donc un élément indispensable à la vie de la plupart des organismes. Il est par exemple le métal de transition le plus répandu chez les Mammifères (96mg Fe/g de tissu cardiaque, Perry *et al.*, 1962). Les bactéries de type *Lactobacillus*, couramment utilisées dans les processus de fermentation lactique industriels, semblent faire exception à cette règle (Archibald, 1983). Ces bactéries utilisent préférentiellement le manganèse en tant que co-facteur, et possèdent une ribonucléotide réductase à co-facteur cobalt, une ARN polymérase à co-facteur manganèse et une mangano-catalase (Weinberg, 1997). La possibilité d'une survie de ces bactéries en absence de fer est cependant remise en doute. Il a en effet été montré que ces bactéries ne peuvent pas pousser sur un milieu synthétique en absence de fer, à moins que celui-ci ne soit supplémenté en bases puriques et pyrimidiques. Ceci suggère que les voies de biosynthèse des bases pourraient être dépendantes du métal fer (Elli *et al.*, 2000).

B. Le fer est un élément peu disponible dans l'environnement

L'origine de la vie requiert la formation de liaisons carbone-carbone dans des conditions primitives prébiotiques dans lesquelles les activités volcaniques et hydrothermales prédominent. Il existe une théorie qui considère l'origine de la vie dans un monde fer-soufre (Huber et Wachtershauser, 1997). Il a été montré que la formation réductive d'une molécule primitive d'acétyl-CoA ($CH_3CO\text{-}SCH_3$) à partir de monoxyde de carbone et de méthane-thiol (CH_3SH), ainsi que la formation de peptides à partir d'acides aminés, est rendue possible grâce au potentiel réducteur généré par la présence de précipités de sulfure de fer et de nickel (Huber et Wachtershauser, 1997, Huber et Wachtershauser, 1998). Il y a environ 1 milliard d'années, le métabolisme des cyanobactéries a permis une évolution de la quantité d'oxygène dans l'atmosphère. Une période de 200-300 millions d'années est estimée entre les premières productions d'oxygène et l'apparition d'une quantité importante d'oxygène dans l'atmosphère, l'oxygène produit ayant tout d'abord été consommé par l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) dans les océans. Dans les conditions d'atmosphère actuelles, aux pH biologiques, le fer se trouve donc majoritairement sous la forme oxydée stable Fe(III). En solution aqueuse, la quantité de Fe(III) soluble est très faible (10^{-17}M, Spiro et Saltman, 1969). Le Fe(II) est plus soluble (10^{-1}M) mais il est rapidement oxydé par l'oxygène (demi-vie inférieure à 15 secondes, Slivka *et al.*, 1986). Le Fe(III) ainsi formé, en absence de ligand, devient un complexe aqueux qui polymérise pour former des précipités d'hydroxydes ferriques qui ne sont pas directement assimilables par les organismes vivants. (Graf et Eaton, 1984). Le monde vivant est donc confronté à un problème de disponibilité du fer dans l'environnement malgré son abondance : « *famine in a land of plenty* » (Dancis *et al.*, 1990).

C. Quelques principes sur le transport et le stockage du fer

Face au problème d'indisponibilité du fer dans l'environnement, les organismes vivants ont développé différentes stratégies qui leur permettent de solubiliser, transporter et stocker le fer environnemental indispensable à leur survie. Les différents systèmes mis en place par les divers règnes du vivant possèdent des caractéristiques communes et des principes de fonctionnement similaires, qui sont exposés dans cette partie. Les systèmes de transport et de stockage du fer chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mon modèle d'étude, seront abordés de manière détaillée dans le chapitre III de cette introduction.

C-1. Les systèmes de transport du fer

Il existe deux stratégies majeures de transport du fer extracellulaire : un système basé sur la réduction préalable du Fe(III) en Fe(II) avant son entrée dans la cellule, et un système basé sur le transport du Fe(III) complexé à des ligands spécifiques.

C-1-a. Le système de transport réductif

Un mécanisme mis en place pour importer le fer extracellulaire consiste à le solubiliser dans un premier temps en le réduisant en fer ferreux par l'intermédiaire d'une ferriréductase, avant de le transporter à travers la membrane plasmique. Ce mécanisme est présent chez la plupart des organismes vivants. Il permet aux cellules de prélever dans leur environnement le Fe(III) présent sous différentes formes de sels inorganiques ou complexé à des molécules organiques. Le Fe(II) ainsi généré par les ferriréductases peut ensuite être importé dans les cellules par des transporteurs membranaires à haute ou basse affinité.

C'est chez la levure *S. cerevisiae* qu'a été identifié le premier gène codant une ferriréductase membranaire (Dancis *et al.*, 1990). Le transport du fer ferreux est ensuite assuré par un complexe membranaire bipartite à haute affinité composé d'une ferroxydase et d'une perméase à fer qui fonctionne en condition aérobie (Stearman *et al.*, 1996) ou par un transporteur à basse affinité dont le rôle est important surtout en condition anaérobie (Jensen et Culotta, 2002).

Chez les mammifères, le système de transport réductif est utilisé pour absorber le fer provenant de l'alimentation. La réduction du fer ferrique est assurée par la ferriréductase Cybrd1 (McKie *et al.*, 2001) et son transport subséquent par le transporteur DMT1 de la famille des transporteurs de cations divalents Nramp, selon un système couplé au transport de protons (Gunshin *et al.*, 1997 et figure 2).

Chez les plantes, des systèmes de transport du fer à travers les racines ont été identifiés récemment. Chez *Arabidopsis thaliana*, le transport réductif est assuré par la ferriréductase FRO2 (Robinson *et al.*, 1999), et le transporteur non spécifique IRT1 (Vert *et al.*, 2002).

Une activité ferriréductase a été mise en évidence chez de nombreuses bactéries, mais le(s) gène(s) codant pour une telle protéine n'a (n'ont) pas encore été clairement identifié(s) (Lovley *et al.*, 1989). Le premier transporteur bactérien de Fe(II), FeoB, a été identifié chez *Escherichia coli* (Kammler *et al.*, 1993). Il joue un rôle important en condition anaérobie (pour revue, Braun et Killmann, 1999). En condition aérobie, c'est le système de transport du fer non réductif qui est privilégié chez cette bactérie. Si le transport de Fe(II) est négligeable chez *E. coli* en condition aérobie, il n'en est pas de même chez toutes les bactéries. Il a par exemple été montré que la bactérie invasive de l'estomac *Helicobacter pylori* utilise majoritairement le système FeoB couplé à une réductase du fer (Velayudhan *et al.*, 2000).

C-1-b. Les systèmes de transport non réductifs

Le Fe(III) peut être acquis par les cellules sous forme de complexe Fe(III)-ligand. Ce système est basé sur la reconnaissance du complexe par des transporteurs membranaires spécifiques.

Le fer lié aux sidérophores

Le transport du fer lié aux sidérophores est la stratégie d'acquisition principale utilisée par la bactérie *E. coli*. Plusieurs champignons et certaines plantes possèdent également un tel système.

Les sidérophores sont des molécules organiques de masse moléculaire inférieure à 1kDa qui sont synthétisées et généralement sécrétées par de nombreuses bactéries, certains champignons et quelques plantes (pour revue, Crosa et Walsh, 2002). Ces molécules organiques possèdent une forte affinité et spécificité pour le Fe(III) (K_{aff} supérieur à $10^{30}.M^{-1}$)

et forment avec ce métal des complexes hexacoordonnés. Cette affinité particulière pour le Fe(III) confère à ces molécules la capacité d'extraire le Fe(III) de la plupart des complexes organiques et inorganiques par un simple déplacement d'équilibre. Il existe environ 500 sidérophores identifiés jusqu'à présent, qui peuvent être classés en trois catégories selon la nature du groupe fonctionnel qui permet de chélater le Fe(III) : les hydroxamates (comme le ferrichrome ou la ferrioxamine B), les catécholates (comme l'entérobactine), les hydroxyacides (comme la pyochéline).

Les organismes producteurs de sidérophores synthétisent et sécrètent au moins un type de sidérophore, mais peuvent exprimer des transporteurs spécifiques de sidérophores synthétisés par d'autres espèces. La bactérie *E. coli* par exemple, qui ne synthétise que le sidérophore entérobactine, possède 6 systèmes de transport différents localisés à la membrane externe lui permettant de capturer, en plus de l'entérobactine, l'aérobactine, le ferrichrome, la ferrioxamine B, le coprogène ou l'acide rhodotulique (Hantke, 2001). Chez les bactéries, le transport des ferrisidérophores à travers le périplasme et la membrane interne requiert un complexe triprotéique périplasmique appelé TonB et des transporteurs de type ABC nécessitant de l'ATP (pour revue, Wandersman et Delepelaire, 2004 et figure 4).

Chez le maïs, la carence en fer induit la production de phytosidérophores, des équivalents des sidérophores bactériens (Von Wiren *et al.*, 1999). L'un de ces phytosidérophores, l'acide déoxymuginéïque, est transporté sous forme complexée au Fe(III) par le transporteur YS1 (Curie *et al.*, 2001).

Le cycle de la transferrine

Chez les mammifères, le transport du fer dans l'ensemble de l'organisme est assuré par la transferrine, protéine dimérique capable de fixer deux atomes de Fe(III) (figure 2). Le fer circulant dans l'organisme provient du recyclage des globules rouges sénescents par les macrophages et de l'absorption par les cellules entérocytaires (figure 2). Dans les deux cas, la diffusion du Fe(II) est facilitée par la ferroportine (McKie *et al.*, 2000). Le Fe(II) est alors réoxydé en Fe(III) pour être pris en charge par la transferrine. Le Fe(II) en provenance des cellules entérocytaires est réoxydé par l'héphaestine, une ferroxydase membranaire (Vulpe *et al.*, 1999), le Fe(II) en provenance des macrophages est réoxydé par la céruloplasmine, une protéine circulante homologue de l'héphaestine (Harris *et al.*, 1999).

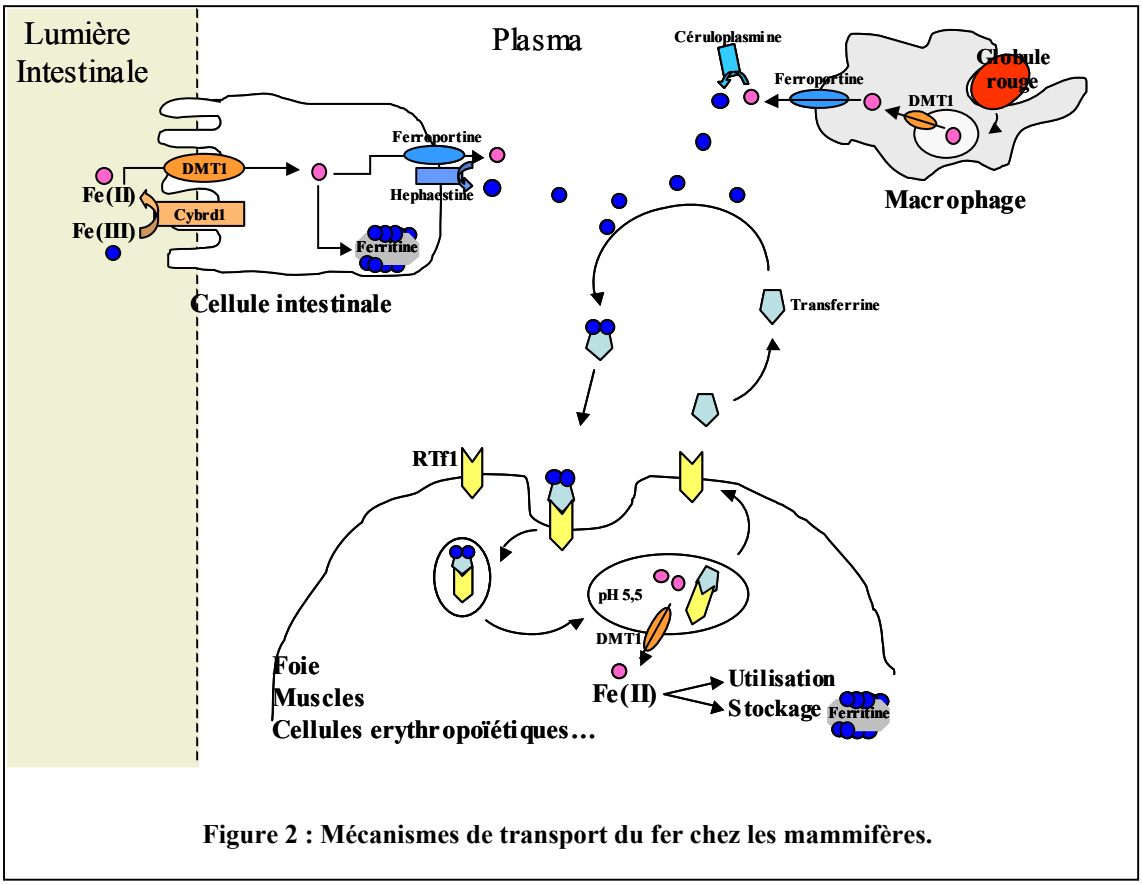

Figure 2 : Mécanismes de transport du fer chez les mammifères.

Le récepteur 1 ubiquitaire de la transferrine (RTf1), localisé à la membrane plasmique des cellules de l'organisme, est capable de lier la transferrine diferrique circulante, le complexe formé est endocyté et fusionné aux endosomes où le pH acide va permettre la dissociation du fer de la transferrine liée au récepteur. Le fer libéré pourra être exporté de l'endosome *via* le transporteur DMT1 selon un mécanisme qui n'est pas encore complètement caractérisé (Gruenheid *et al.*, 1999), tandis que le complexe récepteur-apotransferrine sera recyclé à la membrane plasmique, où l'apotransferrine sera relarguée dans le plasma pour un nouveau cycle de transport de Fe(III) au sein de l'organisme (figure 2).

C-2. Des protéines pour le stockage du fer intracellulaire

L'accumulation du fer dans les cellules peut avoir lieu grâce à des systèmes protéiques qui permettent de stocker de nombreux atomes de fer sous une forme disponible mais non toxique pour la cellule.

La ferritine est une protéine de stockage du fer très conservée, retrouvée depuis les bactéries jusqu'à l'homme. C'est une protéine majoritairement cytosolique composée de 24 sous-unités identiques qui s'associent pour former un complexe globulaire présentant une cavité centrale (pour revue, Theil, 2004). Le Fe(II) est dans un premier temps oxydé en Fe(III) par l'activité oxydase que possèdent les ferritines, puis dirigé au sein de la cavité. Une molécule de ferritine peut contenir jusqu'à 5000 atomes de Fe(III). Chez les bactéries, il existe, en plus de la ferritine, une deuxième protéine de stockage, la bactérioferritine (Bfr). Elle possède les mêmes caractéristiques que la ferritine, mais s'en distingue de part la présence de groupements hème qui pourraient être impliqués dans le relargage du fer hors de la molécule (Andrews *et al.*, 1995).

D. Le fer est un élément potentiellement toxique pour les cellules

La production de formes réactives de l'oxygène dans la cellule est une conséquence inéluctable de la respiration cellulaire. Lors de la dernière étape de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire est réduit simultanément par 4 électrons pour donner une molécule d'eau. Cependant, une faible proportion de cet oxygène subit 4 réductions monoélectroniques successives, les 3 premières résultant en la formation de formes réactives de l'oxygène, l'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, et le radical hydroxyle OH° (figure 3). La toxicité du fer vient de sa participation à la réaction de Fenton (figure 3, et Halliwell et Gutteridge, 1984). En présence de H_2O_2, le Fe(II) catalyse la production du radical hydroxyle OH°. Ce dernier est la forme la plus dangereuse des formes réactives de l'oxygène, il a des effets délétères sur toutes les macromolécules cellulaires : lipides, protéines, ADN.

Réductions monoélectroniques de l'oxygène

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^{\circ -} \xrightarrow{2H^+, e^-} H_2O_2 \xrightarrow{H^+, e^-} OH^\circ \xrightarrow{H^+, e^-} H_2O$$

Réaction de Fenton

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\circ$$

Effet du radical superoxyde sur les protéines à centres fer-soufre

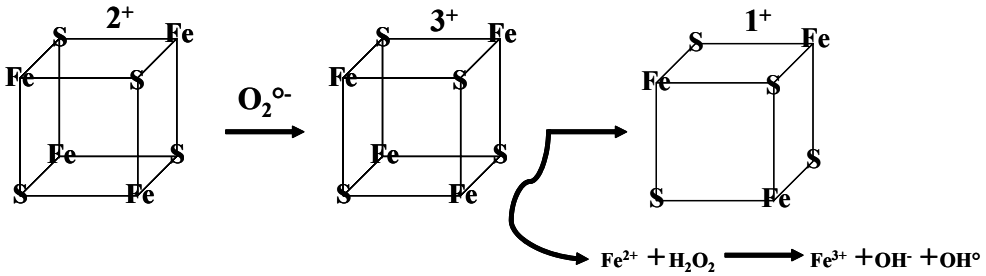

Figure 3 : Mécanismes de toxicité du fer en condition aérobie.

L'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$ est capable d'inactiver des enzymes à centre [Fe-S], telles que l'aconitase ou les fumarases. L'action de l'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$ sur les centres [Fe-S] entraîne la perte d'un atome de fer (Keyer et Imlay, 1996 et figure 3). Ceci a deux conséquences : la perte d'activité des enzymes cibles, et le relargage dans le cytoplasme de Fe(II) « libre » qui va pouvoir entrer dans la réaction de Fenton (figure 3). Des mutants de levure ne possédant plus la superoxyde dismutase cytosolique Sod1p (catalysant la réaction : $2\ O_2^{\circ -} + 2\ H^+ = O_2 + H_2O_2$) présentent par conséquent une altération de leurs enzymes à centres [Fe-S], une forte proportion de fer libre toxique et une dérégulation du métabolisme du fer (De Freitas *et al.*, 2000, Srinivasan *et al.*, 2000, Wallace *et al.*, 2004).

L'existence de la réaction de Fenton *in vivo* telle que présentée ci-dessus reste un sujet délicat (Winterbourn, 1995). Elle ne tient pas compte notamment de la forme complexée du fer au sein de la cellule. Il semblerait en fait que l'action du fer avec H_2O_2 conduise dans un premier temps à la formation d'espèces intermédiaires de type ferryl, dans lesquelles le fer est à un degré d'oxydation (IV). Ces espèces pourraient soit conduire à la génération du radical superoxyde, soit agir elles-mêmes en tant que molécules oxydantes, selon les espèces

présentes au voisinage de la réaction (Winterbourn, 1995). Quoiqu'il en soit, la mise en présence de Fe(II) et de peroxyde d'hydrogène peut s'avérer délétère pour les cellules, et l'on comprend ainsi pourquoi une stricte régulation du métabolisme de ce métal est nécessaire pour satisfaire les besoins essentiels des cellules tout en évitant ses effets toxiques.

Chapitre II :
Différents mécanismes de régulation du métabolisme du fer

Pour acquérir le fer essentiel à leur métabolisme mais peu disponible, les organismes vivants ont mis en place des systèmes de transport et de stockage du fer dont les principes fondamentaux de fonctionnement ont été conservés. Le fer pouvant être également toxique pour les cellules, des systèmes de régulation du métabolisme du fer ont également été développés par les organismes vivants. De manière générale, l'adaptation des cellules à des conditions de carence en fer se traduit par une augmentation du transport du fer extracellulaire et une diminution concomitante de son stockage. Les mécanismes à l'origine de cette adaptation sont variés : ils peuvent reposer sur une régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme du fer, de type activation ou répression, ou bien impliquer une régulation post-transcriptionnelle de ces gènes, *via* le contrôle de la stabilité des ARNm.

A. Chez les procaryotes

A-1. Mode d'action du répresseur transcriptionnel Fur

La régulation du métabolisme du fer chez *E. coli* a lieu au niveau transcriptionnel. Elle est assurée par le répresseur transcriptionnel Fur. Fur est une protéine de 16,8kD composée de deux domaines (Stojiljkovic et Hantke, 1995) :

- Un domaine N-terminal, contenant un motif hélice-tour-hélice responsable de la liaison à l'ADN de la protéine.

- Un domaine C-terminal, contenant deux sites de liaison aux métaux et responsable de la dimérisation de la protéine.

L'activité de répression de Fur dépend de sa liaison au Fe(II). Lorsque le fer est en quantité suffisante, il se lie à la protéine Fur, la rendant apte à se dimériser. C'est sous cette forme dimérique associée au fer que Fur acquiert sa capacité à se lier à l'ADN (Bagg et Neilands, 1987). Pour être capable de se lier à l'ADN, Fur requiert, en plus du fer, la liaison de deux atomes de zinc au niveau de deux résidus cystéine du domaine C-terminal (Althaus *et al.*, 1999).

Fur reconnaît une séquence consensus de 19 pb, appelée « boîte Fur », qui est une séquence palindromique riche en AT (De Lorenzo *et al.*, 1987). Les boîtes Fur sont localisées aux abords des régions -10 et -35, régions importantes pour l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase. En se fixant sur ces régions, Fur va interférer avec l'initiation de la transcription en bloquant l'accès à l'ARN polymérase (Escolar *et al.*, 1997).

A-2. Les gènes régulés par Fur

Fur est un répresseur transcriptionnel des gènes impliqués dans le transport du fer extracellulaire. Lorsque du fer est présent dans le milieu, Fur inhibe la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse et le transport des sidérophores (Cir, FecA, FepA, FhuA, FhuE, Fiu, le complexe TonB et les transporteurs ABC), ainsi que la transcription du gène FeoB, transporteur de Fe(II).

Fur réprime également la transcription de RhyB, un petit ARN de 90pb. Cet ARN est capable de diminuer la quantité de transcrits de gènes dont les produits sont impliqués dans le stockage du fer intracellulaire (ferritine et bactérioferritine), ou possèdent un co-facteur fer (superoxyde dismutase, aconitase et fumarase, Massé et Gottesmann, 2002). La répression par Fur de RhyB a donc pour conséquence d'activer la transcription de ces gènes. Des analyses globales de transcriptome ont permis de mettre en évidence que cette régulation transcriptionnelle indirecte par Fur peut se généraliser à l'ensemble des gènes ayant un rapport plus ou moins direct avec le métabolisme du fer, tels que les gènes codant pour des nitrates réductases (protéines à centre [Fe-S]) ou les oxydases (protéines héminiques) (McHugh *et al.*, 2003).

Lorsque le fer devient limitant dans la cellule, Fur est inactivé par la perte du co-facteur fer, et les gènes du transport du fer et RhyB sont alors transcrits. Chez un mutant *fur*, l'importation du fer dans la cellule est constitutivement activée, entraînant une sensibilité

accrue du mutant au stress oxydant (Touati *et al.*, 1995). Le schéma présenté figure 4 récapitule les mécanismes moléculaires à l'origine de l'organisation de la réponse cellulaire à la quantité de fer dans le milieu chez la bactérie *E. coli*.

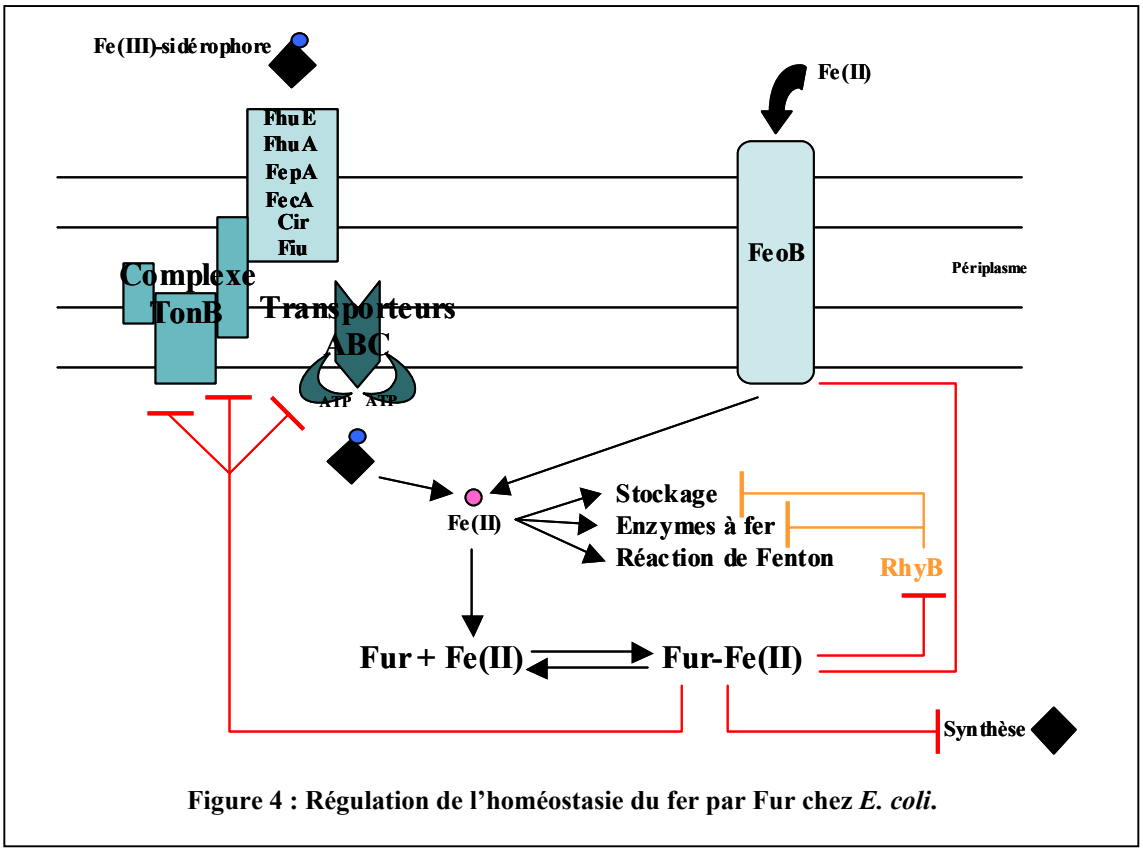

Figure 4 : Régulation de l'homéostasie du fer par Fur chez *E. coli*.

Fur est très répandu dans le monde bactérien, et plusieurs répresseurs fer-dépendants homologues de Fur ont été décrits aussi bien chez des bactéries à $Gram^+$ que chez les bactéries à $Gram^-$ (Andrews *et al.*, 2003). Il existe également des homologues de Fur qui sont fer-indépendants. C'est par exemple le cas de Zur, répresseur zinc-dépendant qui réprime la transcription du système d'importation du zinc (Patzer et Hantke, 2000), et de PerR, répresseur manganèse-dépendant qui réprime la transcription des systèmes de défense contre le stress oxydant (Bsat *et al.*, 1998).

B. Chez les champignons

B-1. Introduction au phylum des champignons

On distingue 4 phyla au sein des champignons : les basidiomycètes, les ascomycètes, les zygomycètes et les chytridiomycètes (figure 5). Il n'existe que peu de données concernant le métabolisme du fer chez les zygomycètes et les chytridiomycètes, c'est pourquoi je ne développerai pas l'étude de ces deux phyla.

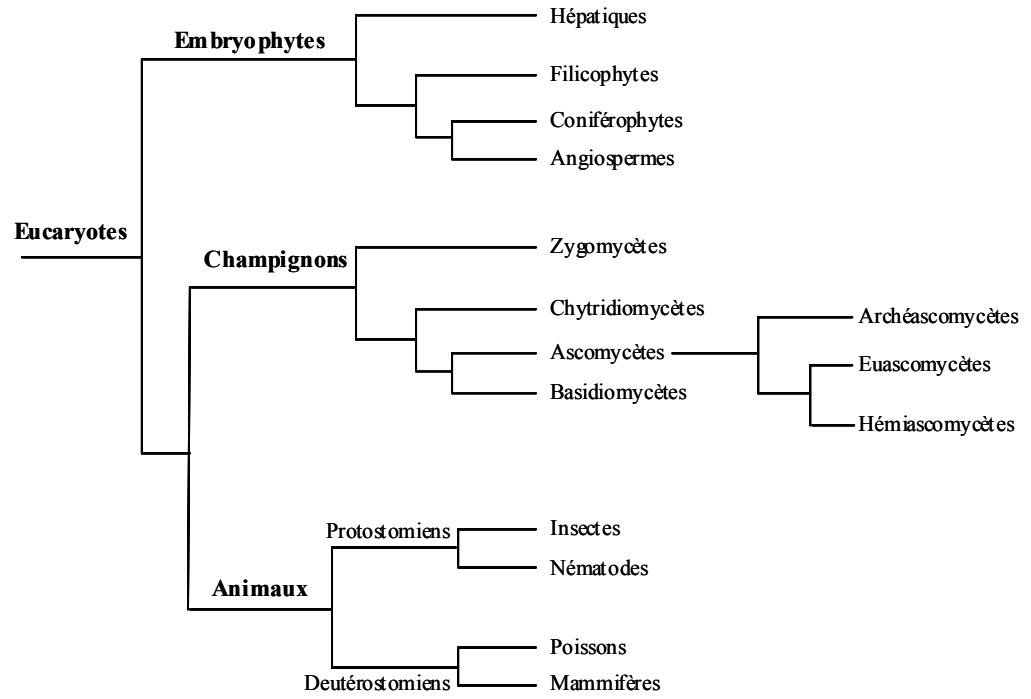

Figure 5 : Classification des champignons au sein des eucaryotes. Seuls les phyla représentatifs sont indiqués.

Le phylum des basidiomycètes regroupe entres autres de nombreux pathogènes des plantes à fleurs, dont l'étude revêt une importance économique. Des données existent concernant le métabolisme du fer et sa régulation chez *Ustilago maydis*, champignon basidiomycète pathogène du maïs. Le phylum des ascomycètes regroupe 50% des espèces connues de champignons, parmi lesquelles les levures. Les ascomycètes sont divisés en 3 branches : les archéascomycètes (*Schizosaccharomyces pombe*), les euascomycètes

(*Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*) et les hémiascomycètes (*S. cerevisiae*, *Candida albicans*) (figure 5). Les données actuelles de nos connaissances sur la régulation du métabolisme du fer chez les champignons basidiomycètes et ascomycètes indiquent qu'il existe deux stratégies majeures de régulation : la première repose sur un mécanisme de répression transcriptionnelle, retrouvé chez les basidiomycètes et de nombreux ascomycètes. La deuxième repose sur un mécanisme d'activation transcriptionnelle, présent chez la plupart des hémiascomycètes.

B-2. Les répresseurs transcriptionnels GATA régulent le métabolisme du fer chez la plupart des champignons

La régulation par le fer chez les champignons non hémiascomycètes est médiée par les facteurs de transcription Urbs1 (*U. maydis*, Voisard *et al.*, 1993), Fep1 (*S. pombe*, Pelletier *et al.*, 2002), SRE (*N. crassa*, Zhou *et al.*, 1998) et SREA (*A. nidulans*, Haas *et al.*, 1999), appartenant à la famille des facteurs de transcription GATA. Les facteurs de transcription GATA sont caractérisés par des motifs de liaison à l'ADN à doigt de zinc dans le domaine N-terminal, et leur capacité à se lier sur une séquence consensus contenant un noyau 5'-GATA-3'.

Les facteurs GATA fer-dépendants des champignons possèdent une très forte homologie au niveau de la région N-terminale contenant deux domaines à doigt de zinc ($CX_2CX_{17}CX_2C$), de part et d'autre d'un domaine contenant 4 résidus cystéine conservés ($CX_5CX_8CX_2C$) chez l'ensemble des facteur GATA fer-dépendants (figure 6). Lorsque le fer est présent dans le milieu, il confère aux facteurs GATA fer-dépendants la capacité de se lier à l'ADN. Les deux domaines à doigt de zinc sont nécessaires pour la fonction de liaison à l'ADN *in vitro* de la protéine (Zhou et Marzluf, 1999). D'après les études réalisées chez *U. maydis*, il semblerait que le domaine en doigt de zinc C-terminal ait un rôle plus important que celui en N-terminal (An *et al.*, 1997b). La liaison directe du fer aux facteurs de transcription GATA pourrait être un mécanisme permettant la régulation de leur liaison à l'ADN, et les résidus cystéines conservés pourraient être impliqués dans cette liaison. La protéine purifiée SRE possède une couleur rouge-brun et un spectre caractéristiques des protéines à co-facteur fer (Harrison et Marzluf, 2002). Ce spectre n'est plus observé lorsque les résidus cystéine sont remplacés par des résidus sérine. *In vivo*, ces substitutions conduisent

à une répression constitutive des gènes cibles du facteur GATA étudié (Harrison et Marzluf, 2002).

Les séquences promotrices 5'-GATA-3' se situent en moyenne entre –300pb (*S. pombe*) et -2000pb (*U. maydis*) du codon d'initiation de la traduction (Pelletier *et al.*, 2002, An *et al.*, 1997a). Le nombre de séquences 5'-GATA-3' au sein des promoteurs des gènes régulés par les facteurs GATA fer-dépendants peut varier. Fep1 peut réguler l'expression de gènes contenant 1 ou 2 consensus 5'-(T/A)GATAA-3' (Pelletier *et al.*, 2002, Pelletier *et al.*, 2003). La régulation par Urbs1 nécessite la présence des deux séquences 5'-(G/T)GATAA-3', mais ces deux séquences ne sont cependant pas suffisantes pour médier une régulation Urbs1-dépendante (An *et al.*, 1997a). La distance qui sépare deux séquences 5'-GATA-3' semble également être un facteur déterminant pour la liaison à l'ADN de SRE. Elle doit être comprise entre 10 et 25 pb (Harrison et Marzluf, 2002).

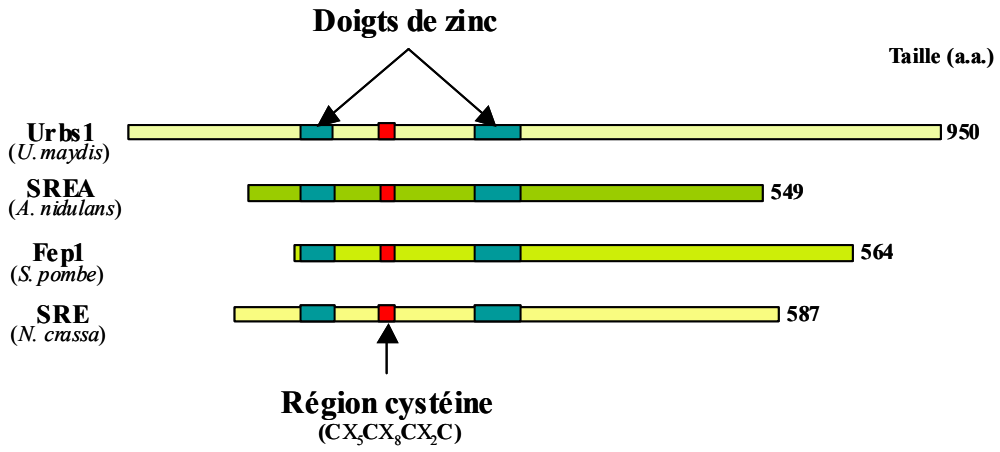

Figure 6 : Représentation schématique des facteurs de transcription GATA fer-dépendants des champignons. D'après Rutherford et Bird, 2004.

Lorsque du fer est présent dans le milieu, les facteurs de transcription GATA répriment la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse et le transport des sidérophores, ainsi que dans le transport réductif du fer. Urbs1 réprime la transcription des gènes *sid1* et *sid2* (synthèse du ferrichrome, Mei *et al.*, 1993, Yuan *et al.*, 2001). Fep1 réprime la transcription des gènes du transport réductif du fer (*fip1*$^+$/*fio*$^+$) et du transport de sidérophores (*str1*$^+$/*str2*$^+$/*str3*$^+$) (Pelletier *et al.*, 2002, Pelletier *et al.*, 2003). SREA réprime la transcription des gènes de biosynthèse et de transport des sidérophores (*sidA*/*sidB*/*sidC* et *mirA*/*mirB*/*mirC*, Oberegger *et al.*, 2001). Enfin SRE est impliqué dans la répression des gènes de synthèse des sidérophores (Zhou *et al.*, 1998).

Les souches dans lesquelles le facteur de transcription GATA d'intérêt est absent présentent donc une expression constitutive des gènes impliqués dans le transport du fer extracellulaire. Ainsi par exemple, en absence du gène *URBS1*, *U. maydis* synthétise les sidérophores de manière constitutive (Voisard *et al.*, 1993), et l'absence du gène Fep1 provoque chez *S. pombe* une activité ferriréductase membranaire constitutive (Pelletier *et al.*, 2002).

B-3. Les activateurs de transcription Aft1p et Aft2p

La levure hémiascomycète *S. cerevisiae* a été le premier eucaryote dont le génome a été entièrement séquencé (Goffeau *et al.*, 1996). Depuis, plusieurs projets de séquençage (notamment le projet national Génolevures) ont été développés pour permettre une exploration systématique des génomes à l'intérieur du groupe des hémiascomycètes. Les espèces ont été sélectionnées sur la base de la phylogénie déduite de l'ADNr 18S , de manière à couvrir le plus largement possible les divers groupes des hémiascomycètes (figure 7, Souciet *et al.*, 2000, Naumov *et al.*, 2000, Kellis *et al.*, 2003).

Le cladogramme actuel des hémiascomycètes met en évidence une évolution de ces levures vers une croissance de moins en moins dépendante de l'oxygène. Il existe une démarcation entre les hémiascomycètes à respiration obligatoire et les hémiascomycètes qui sont aérobie facultatifs (figure 7). Les hémiascomycètes aérobie obligatoire sont incapables de tirer leur énergie de la seule fermentation, mais ils peuvent oxyder par respiration une multitude de substrats carbonés (sucres, lipides, acétate, alcanes ou méthanol), alors que les hémiascomycètes aérobies facultatifs peuvent se passer de la respiration. Parmi les hémiascomycètes aérobies facultatifs, il existe deux groupes de levures distincts : les levures « petites-positives », qui sont capables de tolérer la perte de leur ADN mitochondrial (ADNmt), et les levures « petites-négatives », chez qui la perte d'ADNmt est létale. Les levures « petites-négatives » sont des organismes aérobies facultatifs qui restent sujets à un effet Pasteur plus ou moins prononcé : elles favorisent la respiration, et utilisent la fermentation comme appoint dans des conditions de faible oxygénation. Les levures « petites-positives » ont quand à elles un effet Crabtree, privilégiant la fermentation même en présence d'oxygène.

Les levures « petites-positives » ont subi un évènement de duplication entière de leur génome il y a environ 100 millions d'années (Kellis *et al.*, 2004). Au sein de ce groupe, on distingue les *Saccharomyces sensu stricto* et *sensu lato* (figure 7). Les *Saccharomyces sensu stricto* représentent un ensemble de levures très proches de *S. cerevisiae*, aux premiers stades de la spéciation (Kurtzmann et Robnett, 2003) : elles sont encore capables de former des diploïdes, même si ceux-ci restent des hybrides stériles.

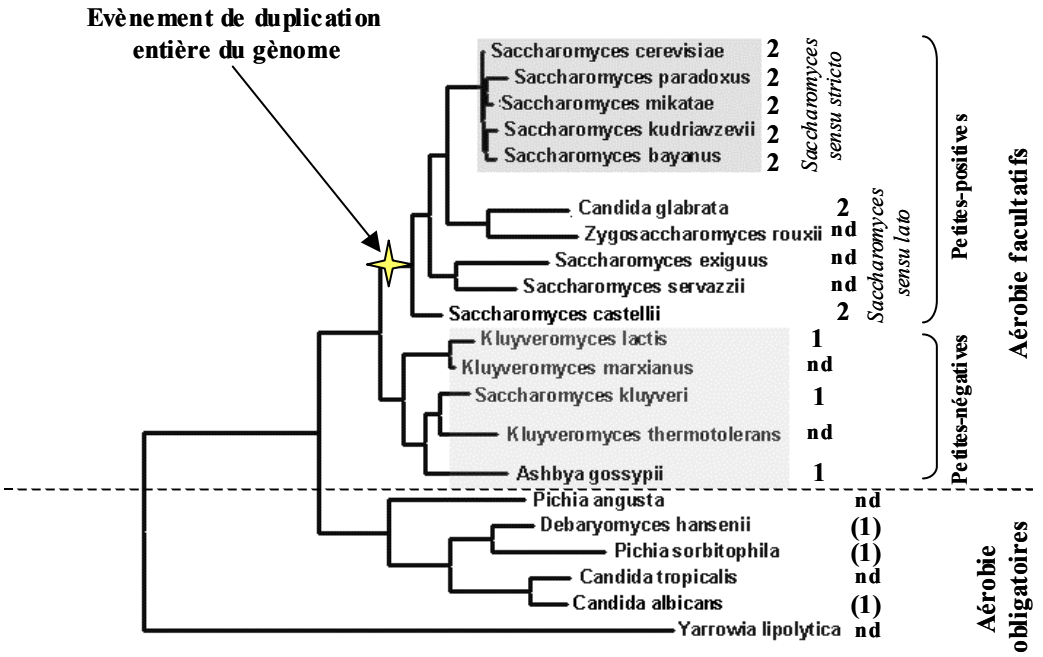

Figure 7 : Répartition d'Aft1p et d'Aft2p au sein des hémiascomycètes. Le cladogramme représenté a été généré d'après la comparaison de séquence de l'ADNr 18S. Le nombre de facteurs de transcription homologues d'Aft1p ou d'Aft2p de *S. cerevisiae* retrouvés chez les autres levures est indiqué.Un nombre entre parenthèses indique une faible conservation du domaine N-terminal. nd, non déterminé.

Chez l'organisme de référence *S. cerevisiae*, il existe deux activateurs transcriptionnels qui régulent l'homéostasie du fer, Aft1p et Aft2p. Les protéines Aft1p et Aft2p sont des paralogues issus de l'évènement de l'entière duplication du génome. Ces deux protéines possèdent un domaine N-terminal de liaison à l'ADN très conservé, avec notamment la présence de 4 résidus cystéines pouvant jouer un rôle dans la régulation par le fer de leur activité.

Aft1p ou Aft2p ne possèdent pas d'homologues parmi les eucaryotes supérieurs (*A. thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorabditis elegans* ou *Homo sapiens*). Il n'existe pas non plus d'homologues de ces facteurs de transcription parmi les autres champignons ni même parmi les hémiascomycètes aérobies obligatoire (figure 7). En effet, l'Aftp identifié

chez *D. hansenii*, *P. sorbitophila* et *C. albicans* ne présente que peu d'homologie avec les Aftp de *S. cerevisiae*, et les résidus cystéines du domaine de liaison à l'ADN ne sont pas conservés. L'absence de l'Aftp de *C. albicans* n'a d'ailleurs pas de conséquences sur la régulation de l'homéostasie du fer chez cette levure (D. Davis, communication personnelle), qui possède par ailleurs un régulateur de type GATA impliqué dans cette régulation (Lan *et al.*, 2004). La présence d'Aft1p ou d'Aft2p est donc spécifique des hémiascomycètes aérobies facultatifs.

Au sein de ces levures aérobies facultatives, les homologues Aft présents possèdent tous un domaine N-terminal très conservé par rapport aux domaines N-terminaux d'Aft1p et d'Aft2p de *S. cerevisiae*, avec notamment la présence des 4 résidus cystéines. Parmi les levures « petites-négatives », qui n'ont pas subi d'évènement de duplication, il existe un Aftp conservé. L'Aftp de *K. lactis* est capable de complémenter le défaut de régulation de l'homéostasie du fer du mutant *Δaft1Δaft2* de *S. cerevisiae* (P.-L. Blaiseau, communication personnelle). La présence de deux facteurs de transcription Aft1p et Aft2p est retrouvée chez la majorité des levures « petites-positives », ayant subi la duplication de leur génome (figure 7). Au sein des levures *Saccharomyces sensu stricto*, chaque Aftp présente même une forte homologie de séquence sur l'ensemble de la protéine avec Aft1p ou Aft2p de *S. cerevisiae*.

Après l'événement de l'entière duplication du génome ayant conduit aux levures « petites-positives », seuls 12% des gènes dupliqués ont été conservés (Seoighe et Wolfe, 1999). La duplication du génome aurait permis de générer des gènes avec de nouvelles fonctions, possiblement à l'origine de l'effet Crabtree et de la capacité à perdre l'ADNmt (Piskur et Langkjaer, 2004). Les deux facteurs de transcription paralogues Aft1p et Aft2p faisant partie de ces gènes, leur conservation au cours de l'évolution pourrait possiblement être en relation avec les caractéristiques métaboliques des levures « petites-positives ».

C. Chez les mammifères et les plantes

C-1. Mode d'action des régulateurs post-transcriptionnels IRP1 et IRP2 chez les mammifères

Le système de régulation de l'homéostasie intracellulaire du fer est le mieux connu des systèmes de régulation post-transcriptionnelle chez les eucaryotes. Il s'agit du système IRE/IRP (Iron Responsive Element/Iron Regulatory Protein). Le système IRE/IRP, très bien caractérisé chez les mammifères, a également été retrouvé chez les invertébrés *D. melanogaster* et *C. elegans* (Muckenthaler *et al.*, 1998b, Gourley *et al.*, 2003).

IRP1 et IRP2 sont des protéines cytoplasmiques de la famille des isomérases à centre [Fe-S] présentant 57% d'identité de séquence. Cependant, seule IRP1 possède un centre [Fe-S] qui lui confère une activité aconitase, particularité qui détermine et régule son action en tant que régulateur de l'homéostasie du fer intracellulaire (Beinert et Kiley, 1996). L'assemblage du centre [Fe-S] ne peut avoir lieu qu'en condition de fer suffisante pour la cellule. Dans ces conditions, IRP1 est active en tant qu'aconitase cytosolique. L'absence de fer provoque un désassemblage du centre [Fe-S] par un mécanisme encore mal caractérisé, et IRP1 acquiert ainsi sa capacité de liaison à l'ARN (Beinert et Kiley, 1996).

La protéine IRP2 ne contient pas de centre [Fe-S], et possède donc une capacité constante de liaison à l'ARN. En revanche, elle s'accumule en condition de carence en fer, et est sujette à la dégradation par le protéasome lorsque les quantités de fer dans la cellule sont suffisantes (Guo *et al.*, 1995). Ce type de régulation pourrait être médié par un domaine N-terminal de 73 acides aminés absent chez IRP1. Ce domaine serait capable de fixer l'hème, et une oxydation de 3 résidus cystéine dans ce domaine serait le signal pour son ubiquitination et sa dégradation subséquente par le protéasome (Kang *et al.*, 2003, Yamanaka *et al.*, 2003). Ces données sont cependant remises en cause par des études plus récentes dans lesquelles il a été montré que le domaine de 73 acides aminés n'était pas nécessaire pour observer une dégradation fer-dépendante de la protéine (Wang *et al.*, 2004).

Les motifs IRE sont les sites de liaisons contenus dans les régions non traduites des ARNm des gènes cibles des deux protéines IRP1 et IRP2. Ces protéines sont capables d'interagir fortement ($K_d=10^{-12}M$) avec ces motifs en condition de carence en fer (Rouault *et*

al., 1988, Samaniego *et al.*, 1994). Les IRE sont des motifs structuraux conservés d'environ 30 nucléotides, qui forment une structure de type tige-boucle, la boucle étant formée par les nucléotides 5'-CAGUGN-3', et la tige étant interrompue par un résidu C non apparié (Hentze *et al.*, 1987, Casey *et al.*, 1988). Les conséquences de la liaison IRP/IRE sont différentes selon la localisation de la séquence IRE (5' ou 3'). La liaison de l'IRP à l'IRE en 5' non traduit empêche la traduction de l'ARNm considéré en inhibant la fixation des ribosomes (Muckenthaler *et al.*, 1998a et figure 8). A l'inverse, la fixation de l'IRP à l'IRE en 3' non traduit empêche la dégradation de l'ARNm, entraînant par conséquent une durée de vie plus longue et donc une synthèse protéique plus importante (Hentze et Kuhn, 1996 et figure 8).

C-2. Les gènes régulés par IRP1 et IRP2

La régulation post-transcriptionnelle assurée par les IRPs s'exerce principalement sur la synthèse de la ferritine et de RTf1. Les ARNm des deux chaînes lourdes et légères de la ferritine contiennent une IRE en 5' de leur région non traduite, l'ARNm de RTf1 contient 5 motifs IRE en 3' de sa région non traduite. Lorsque les cellules ont besoin de fer, les IRPs se lient aux IRE des ARNm de RTf1 et de la ferritine, entraînant ainsi de manière coordonnée une augmentation de la quantité de RTf1 permettant d'importer davantage de fer circulant, et une diminution de la quantité de ferritine limitant le stockage du fer (Pantopoulos, 2004, figure 8).

Le système de régulation IRE/IRP ne se réduit pas à la régulation de la quantité de RTf1 et de la ferritine (figure 8). D'autres ARNm contenant des IRE ont été identifiés, la plupart d'entre eux ayant un rôle dans le métabolisme du fer. Ainsi, les ARNm de la 5-aminolevulinate synthase érythropoïétique (ALAS, synthèse d'hème) et de la ferroportine possèdent une IRE en 5' non traduit et sont réprimés par les IRPs en condition de carence en fer (Melefors *et al.*, 1993, Abboud et Haile, 2000, figure 8). Inversement, l'ARNm de DMT1, qui possède une IRE en 3' non traduit, est stabilisé en condition de carence en fer par les IRPs (Hubert et Hentze, 2002). Il semblerait par ailleurs que les IRPs puissent diminuer la synthèse d'enzymes du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui suggère un lien entre la régulation du métabolisme du fer et le métabolisme énergétique (Eisenstein et Ross, 2003). Ces protéines étant pour beaucoup des protéines à co-facteur fer, il est possible

d'imaginer un mécanisme de régulation dans lequel la synthèse des protéines à co-facteur fer est couplée à la disponibilité en fer des cellules.

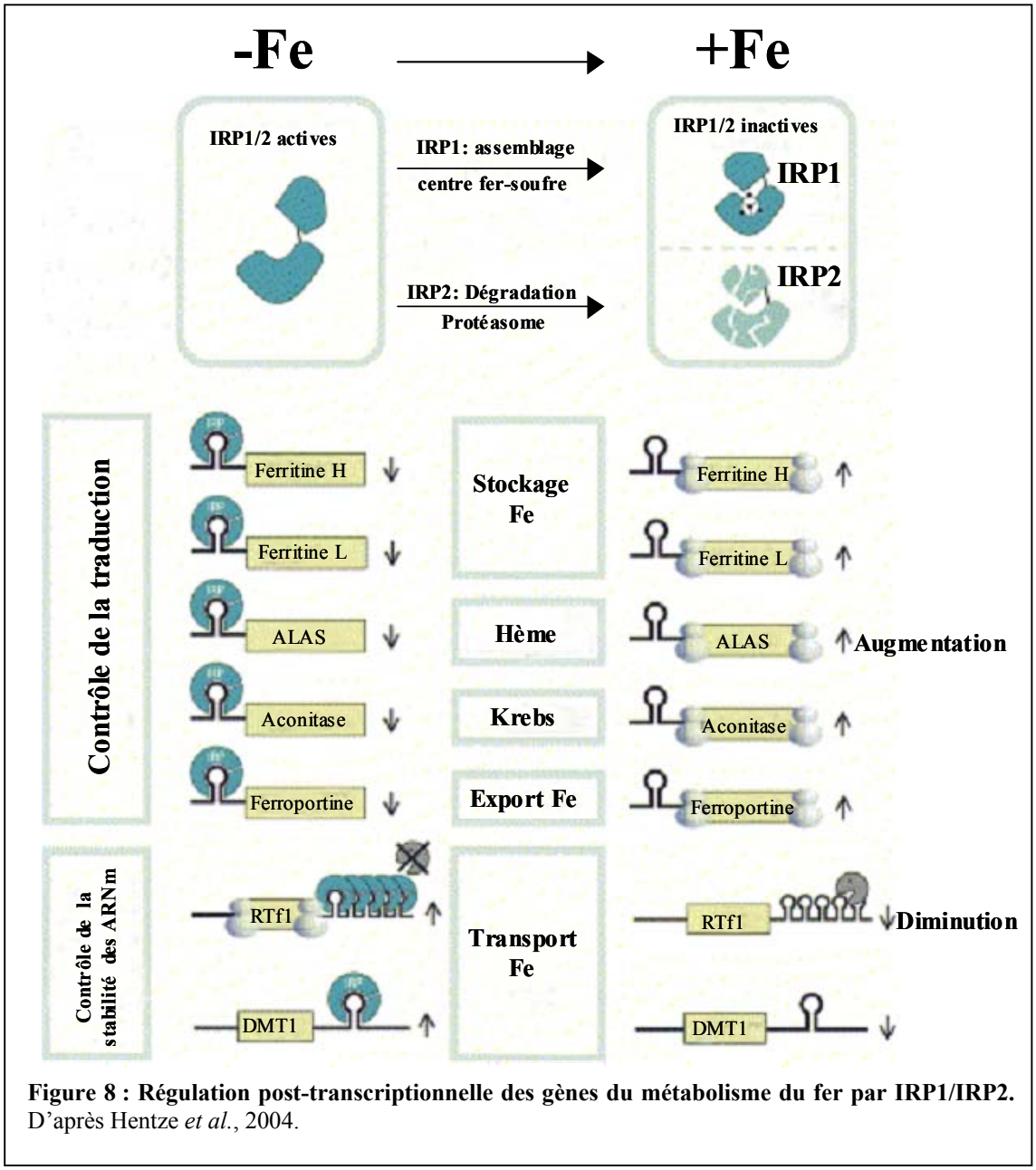

Figure 8 : Régulation post-transcriptionnelle des gènes du métabolisme du fer par IRP1/IRP2. D'après Hentze *et al.*, 2004.

L'activité de liaison aux IRE des IRP peut également être induite par d'autres stimuli tels que le H_2O_2, qui induirait le désassemblage du centre [Fe-S] d'IRP1 (Pantopoulos et Hentze, 1998), ou bien l'hypoxie et l'acide nitrique, qui affectent l'activité des deux IRP par des mécanismes qui ne sont pas encore complètement caractérisés (Hentze et Kuhn, 1996, Hanson *et al.* 1999). Les régulations d'IRP1 et d'IRP2 en réponse à différents stimuli

s'avèrent donc être complexes et mettent en évidence que ces deux protéines sont capables d'intégrer plusieurs signaux.

La construction de souris mutantes pour IRP1 ou IRP2 a permis d'apporter de nouvelles informations quant à la fonction des deux protéines *in vivo* (Meyron-holtz *et al.*, 2004). De manière intéressante, cette étude a montré qu'IRP1 *in vivo* reste majoritairement sous sa forme aconitase en condition de carence en fer. Cette même condition de carence en fer est en revanche suffisante pour induire l'activité de liaison d'IRP2 aux IRE. Par ailleurs, chez des souris IRP1-/IRP1-, il semble exister un mécanisme compensatoire qui permet une augmentation d'un facteur 2 de la quantité de protéine IRP2, phénomène non observé concernant IRP1 dans un contexte IRP2-/IRP2-. IRP2 apparaît donc être le régulateur majeur de l'homéostasie du fer *in vivo*.

C-3. Des activateurs transcriptionnels chez les plantes ?

L'identification des gènes impliqués dans le métabolisme du fer chez les plantes est assez récente. Il semblerait que la régulation du transport racinaire du fer chez les plantes soit assurée par des activateurs transcriptionnels actifs en condition de carence en fer (Connolly *et al.*, 2002, Vert *et al.*, 2002). Un candidat potentiel pour médier cette régulation est le produit du gène FER, identifié chez la tomate (Ling *et al.*, 1996). Le produit de ce gène code pour un facteur de transcription putatif à domaine basique de type hélice-boucle-hélice (Ling *et al.*, 2002), qui, lorsqu'il est absent dans la plante, conduit à une incapacité à induire la transcription des gènes impliqués dans le transport racinaire du fer (Ling *et al.*, 1996). Les mécanismes de régulation de ces gènes par FER n'ont pas encore été élucidés. Un homologue de FER a été identifié chez *A. thaliana* (Colangelo et Guerinot, 2004). L'absence de ce facteur de transcription, nommé FIT1, empêche l'induction transcriptionnelle des gènes de transport de fer racinaire. Ce facteur de transcription, FIT1, contrairement à FER, voit sa transcription augmentée en condition de carence en fer, ce qui suggère des mécanismes différents de régulation de ces deux facteurs de transcription homologues (Colangelo et Guerinot, 2004).

Chapitre III :
Régulation de l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae*

A. Le métabolisme du fer chez *S. cerevisiae*

A-1. Les systèmes d'acquisition du fer chez S. cerevisiae

L'ensemble des protéines dont il sera question dans ce sous-chapitre est schématisé figure 9.

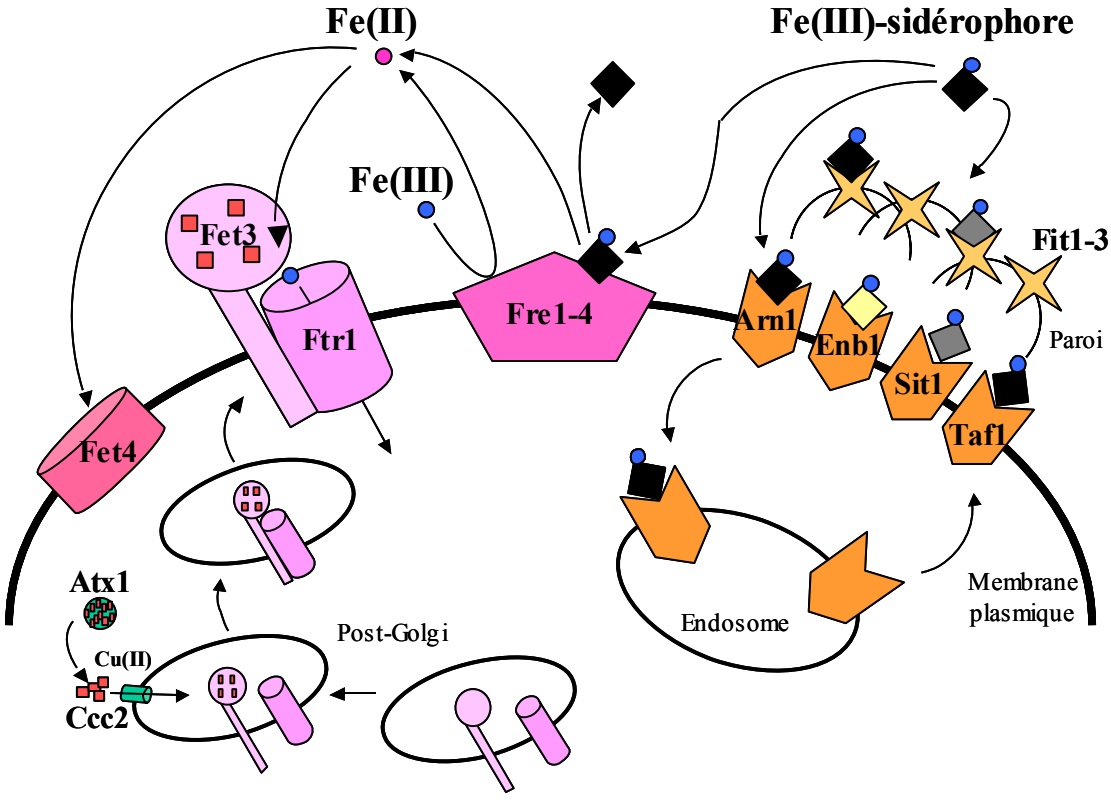

Figure 9: Schéma récapitulatif des systèmes de transport du fer extracellulaire chez *S. cerevisiae*.

A-1-a. Le transport réductif à haute affinité du fer

Les réductases membranaires Fre1p et Fre2p

Chez *S. cerevisiae,* il existe une famille de 7 réductases, la famille *FRE*, dont font partie les deux ferriréductases membranaires Fre1p et Fre2p (Dancis *et al.*, 1990, Georgatsou et Alexandraki, 1994). Ces réductases Fre1p et Fre2p ne sont cependant pas spécifiques de l'ion ferrique puisqu'elles sont entre autres capables de réduire aussi le cuivre cuprique (Cu(II)) en cuivre cuivreux (Cu(I)) (Hassett et Kosman, 1995, Georgatsou *et al.*, 1997). Cette étape de réduction du cuivre est également nécessaire pour le transport de ce métal dans la cellule (Hassett et Kosman, 1995). Une souche *Δfre1Δfre2* ne possède plus aucune activité ferriréductase membranaire et est incapable de croître sur un milieu carencé en fer (Georgatsou et Alexandraki, 1994). La simple disruption de *FRE1* ou *FRE2* n'entraîne en revanche pas de défaut de croissance sur un milieu carencé en fer, et l'activité réductase des mutants *Δfre1* ou *Δfre2* n'est que partiellement réduite par rapport à la souche sauvage (Georgatsou et Alexandraki, 1994).

Fre1p et Fre2p présentent 24,5% d'identité au niveau de leur séquence protéique. Par ailleurs, ces deux protéines possèdent une similarité importante avec la sous-unité $gp91^{phox}$ de la NADPH oxydase des phagocytes humains. Cette protéine est un flavocytochrome membranaire faisant partie d'un complexe protéique qui réalise un transfert d'électrons du NADPH cytosolique à l'oxygène moléculaire pour former l'ion superoxyde à l'intérieur du phagosome, en réponse à une infection microbienne (Wientjes et Segal, 1995). Des études ont montré que Fre1p est également un flavocytochrome (Shatwell *et al.*, 1996, Finegold *et al.*, 1996). De fait, un mutant déficient pour la synthèse de l'hème ne possède pas d'activité ferriréductase (Lesuisse et Labbe, 1989, Amillet *et al.*, 1996). Fre1p ne semble pas posséder lui même d'activité NADPH oxydase, ce qui suggère, comme pour le complexe NADPH oxydase des phagocytes, l'existence d'une chaîne multiprotéique de transfert d'électrons du NADPH cytosolique au Fe(III) extracellulaire (Anderson *et al*., 1992, Lesuisse *et al.*, 1996, Lesuisse *et al.*, 1997).

La transcription de *FRE1* et *FRE2* est induite en condition de carence en fer (Dancis *et al.*, 1990, Georgatsou *et al.*, 1997). La transcription de *FRE1*, mais pas celle de *FRE2*, est également induite en condition de carence en cuivre (Hassett et Kosman, 1995). Le gène *FRE1* n'est par ailleurs pas transcrit en condition anaérobie (Hassett *et al.*, 1998a).

Les 5 autres gènes appartenant à la famille *FRE*, nommés *FRE3* à *FRE7*, codent pour des protéines présentant une homologie avec Fre2p, et donc susceptibles de présenter une activité réductase (Martins *et al.*, 1998, Georgatsou et Alexandraki, 1999). Il a été montré que Fre3p, localisée à la membrane plasmique, et Fre4p sont nécessaires pour la réduction du Fe(III) de certains sidérophores de type hydroxamate, notamment lorsque Fre1p et Fre2p sont absents (Yun *et al.*, 2001). La fonction des autres homologues Fre5p et Fre6p n'est pas encore connue à ce jour, mais leur expression est régulée par la quantité de fer dans le milieu (Martins *et al.*, 1998, Georgatsou et Alexandraki, 1999). L'homologue Fre7p est quand à lui soumis à une régulation exclusive par le cuivre (Martins *et al.*, 1998, Georgatsou et Alexandraki, 1999).

Le complexe ferroxydase/perméase Fet3p/Ftr1p

Le Fe(II) généré par les ferriréductases Fre1p et Fre2p peut ensuite être transporté dans les cellules par le complexe à haute affinité bipartite Fet3p/Ftr1p (Km=0,15µM).

Fet3p est une ferroxydase appartenant à la famille des oxydases à cuivre, dans laquelle on retrouve la céruloplasmine et l'héphaestine des mammifères (Askwith *et al.*, 1994, De Silva *et al.*, 1995a). Fet3p possède un seul domaine transmembranaire C-terminal d'ancrage à la membrane, et son domaine catalytique multicuivre est orienté vers l'extérieur de la cellule (De Silva *et al.*, 1995b). Les oxydases à cuivre utilisent les 4 atomes de cuivre du site catalytique pour coupler l'oxydation monoélectronique de leur substrat à la réduction d'une molécule d'O_2 en H_2O (Solomon *et al.*, 1996). La ferroxydase Fet3p utilise le Fe(II) produit par les ferriréductases pour catalyser la réaction :

$$4Fe^{2+} + O_2 + 4H^+ \rightarrow 4Fe^{3+} + 2H_2O \qquad \text{(Hassett } et\ al.\text{, 1998b)}$$

Le Fe(III) issu de cette réaction est le substrat pour Ftr1p, la perméase à fer. Cette protéine possède 7 domaines transmembranaires, qui s'assemblent probablement sous forme de « tonneau » pour créer un canal à travers la membrane plasmique (Severance *et al.*, 2004). Deux motifs REGLE situés dans ces domaines transmembranaires, possiblement impliqués dans l'interaction avec le fer transporté, sont essentiels pour l'activité de transport du complexe Fet3p/Ftr1p (Stearman *et al.*, 1996, Severance *et al.*, 2004).

La nécessité d'un cycle rédox du Fe(III) réduit en Fe(II) (*via* les ferriréductases) puis réoxydé en Fe(III) (*via* Fet3p) avant d'être transporté par Ftr1p a paru surprenant dans un premier temps (Askwith *et al.*, 1994, Stearman *et al.*, 1996). Il semblerait cependant que le Fe(III) substrat de Ftr1p ne puisse provenir que de la réaction d'oxydation médiée par Fet3p. Couplée aux études topologiques des deux protéines (Di Patti *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2003, Severance *et al.*, 2004), cette donnée suggère l'existence d'un système de canalisation de substrat, qui pourrait expliquer la forte affinité de ce complexe pour le Fe(II) (Km=0,15µM). De plus, le Fe(II) étant potentiellement dommageable pour les cellules, une réoxydation précédant son entrée dans la cellule pourrait paraître tout à fait justifiée.

L'adressage à la membrane plasmique de chacune des deux protéines nécessite la présence de l'autre. En absence de son partenaire, la protéine restante est bloquée au niveau du réticulum endoplasmique (Stearman *et al.*, 1996, Sato *et al.*, 2004). La présence de Ftr1p est également requise pour l'incorporation des atomes de cuivre au sein du site catalytique de Fet3p (Stearman *et al.*, 1996). L'activité ferroxydase de Fet3p ou perméase de Ftr1p ne sont en revanche pas nécessaires pour l'adressage à la membrane du complexe (Askwith et Kaplan, 1998, Severance *et al.*, 2004). Des études plus récentes ont par ailleurs montré qu'en présence de quantités importantes de fer dans le milieu de culture (1mM), le complexe Fet3p/Ftr1p est endocyté et dégradé dans la vacuole suite à l'ubiquitination de Ftr1p (Felice *et al.*, 2005). Les mutants déficients pour Ftr1p ou Fet3p présentent des phénotypes similaires : absence d'activité de transport du Fe(II), et incapacité à croître sur un milieu fortement carencé en fer ou contenant une source de carbone respirable comme le glycérol.

L'activité de transport du fer ferreux nécessitant la présence d'oxygène (pour l'activité ferroxydase), elle n'est pas observée en condition anaérobie, ce qui est corrélé à une absence de transcrits *FET3* et *FTR1* dans cette condition (Hassett *et al.*, 1998a).

La connexion fer-cuivre

La protéine Fet3p requiert la présence de cuivre pour son activité catalytique. Dans un milieu dépourvu de cuivre, une souche sauvage transporte environ deux fois moins de Fe(II) (Lin *et al.*, 1997). Plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du cuivre sont en fait nécessaires pour assurer la biosynthèse d'une protéine Fet3p fonctionnelle : le métabolisme du fer est donc étroitement lié au métabolisme du cuivre.

Sur la base d'un crible génétique visant à sélectionner des mutants déficients pour le transport du Fe(II), Dancis et collaborateurs ont ainsi isolé le gène *CTR1*, codant pour le transporteur membranaire à haute affinité du cuivre (Dancis *et al.*, 1994). Un mutant déficient pour ce gène présente des phénotypes similaires aux mutants déficients pour *FET3* ou *FTR1*. Il possède un défaut de transport de fer à haute affinité et est incapable de croître sur un milieu respirable. Cependant, ce défaut de transport de fer peut être corrigé par l'ajout de cuivre dans le milieu et apparaît donc comme un effet secondaire de l'incapacité de ce mutant à assimiler le cuivre (Dancis *et al.*, 1994).

Pour être délivré correctement à la ferroxydase Fet3p, le cuivre transporté par Ctr1p est ensuite pris en charge par les chaperons intracellulaires Atx1p et Ccc2p. La protéine Atx1p est un chaperon cytosolique. Un mutant *Δatx1* est incapable de croître sur un milieu dépourvu de fer, et possède une activité réduite de transport de Fe(II) restaurée par l'ajout de cuivre dans le milieu (Lin *et al.*, 1997). Le cuivre pris en charge par Atx1p dans le cytosol peut ensuite être délivré à Fet3p par l'intermédiaire de Ccc2p, une ATPase de type P (Fu *et al.*, 1995, Yuan *et al.*, 1995). Cette protéine est localisée dans un compartiment post-Golgien où elle va y importer le cuivre du cytosol pour charger Fet3p (Yuan *et al.*, 1997). Un mutant *Δccc2* est incapable de croître sur un milieu respirable et possède une activité de transport de Fe(II) nulle. Ces phénotypes peuvent être restaurés par l'ajout de cuivre dans le milieu (Yuan *et al.*, 1995). Contrairement aux mutants déficients pour Ctr1p, les mutants *Δatx1* et *Δccc2* ne sont pas affectés pour l'homéostasie du cuivre (Yuan *et al.*, 1995).

Alors que l'étude et la caractérisation de la connexion fer-cuivre chez *S. cerevisiae* a été amorcée il y a une dizaine d'années, l'hypothèse d'une telle connexion chez les mammifères avait déjà été formulée il y a 40 ans : des porcs ayant suivi un « régime sans cuivre » présentaient les symptômes d'une anémie, due à l'impossibilité d'exporter le fer dans le plasma (Lee *et al.*, 1968). C'est l'étude postérieure des symptômes similaires de l'acéruloplasminémie qui a permis de faire le lien entre le métabolisme du fer et du cuivre chez les mammifères (pour revue, Xu *et al.*, 2004). L'apport du cuivre à la céruloplasmine, protéine homologue de Fet3p, est assuré par deux ATPases homologues, ATP7a et ATP7b. La protéine Ccc2p est l'homologue levure d'ATP7a et ATP7b. Un défaut dans l'une ou l'autre de ces protéines humaines conduit aux maladies de Menkes et Wilson, caractérisées par des défauts d'homéostasie du cuivre. Les deux systèmes sont donc très conservés entre la levure et les mammifères.

A-1-b. Transport du fer à basse affinité

La levure *S. cerevisiae* dispose également du transporteur à basse affinité Fet4p (Km=35µM, Dix *et al.*, 1994) pour importer le Fe(II) généré par les ferriréductases Fre1p et Fre2p ou présent en condition anaérobie.

Le gène *FET4* a été identifié comme un suppresseur multicopie du défaut de croissance du mutant *Δfet3* sur un milieu carencé en fer (Dix *et al.*, 1994). Le produit de ce gène code pour un transporteur localisé à la membrane plasmique (Dix *et al.*, 1994, Dix *et al.*, 1997). Le rôle de Fet4p dans le transport à basse affinité du fer peut être clairement mis en évidence en absence du système de transport à haute affinité. Alors que la croissance d'un mutant *Δfet3* n'est inhibée qu'à partir d'une concentration de 200µM de BPS (BathoPhénanthroline diSulfonate, chélateur) dans le milieu, la croissance du double mutant *Δfet3Δfet4* est inhibée dès la présence de 50µM de BPS (Dix *et al.*, 1994).

Le rôle de Fet4p ne se limite cependant pas à l'importation du fer dans la cellule. Des études ont montré que Fet4p assure également le transport à basse affinité du cuivre sous forme réduite Cu(I) (Km=35µM, Hasset *et al.*, 2000). A nouveau, l'importance de ce transporteur est révélée en absence de Ctr1p, le transporteur de cuivre à haute affinité : l'incapacité de croissance du mutant *Δctr1* sur un milieu respirable peut être restaurée par l'ajout de 20µM de cuivre dans le milieu, alors qu'il faut 100µM de cuivre pour restaurer la croissance du double mutant *Δctr1Δfet4* (Hassett *et al.*, 2000). De la même manière, il a été montré que Fet4p intervient dans le transport à basse affinité du zinc (Waters et Eide, 2002). De façon générale, Fet4p semble être capable de transporter une grande variété de métaux, puisque le cobalt, le cadmium ou encore le nickel sont des inhibiteurs du transport de fer par Fet4p (Dix *et al.*, 1994).

Comme mentionné précédemment, la transcription de *FET3* et *FTR1* est diminuée en condition anaérobie. A l'inverse, la transcription de *FET4* est induite en absence d'oxygène (Hassett *et al.*, 1998a, Ter Linde *et al.*, 1999). Fet4p étant un transporteur de métal peu spécifique, une souche sauvage est par exemple plus sensible à la toxicité du cadmium en condition anaérobie qu'en condition aérobie (Jensen et Culotta, 2002). L'expression de *FET4* est contrôlée par plusieurs conditions environnementales et *via* différents facteurs de transcription, ce qui permet à la cellule de réguler finement l'activité de ce transporteur qui, de par sa faible sélectivité, peut s'avérer dangereux pour les cellules.

Une souche déficiente pour les transports de fer à haute et à basse affinité Fet3p/Ftr1p et Fet4p est encore capable de croître en condition de carence en fer modérée (jusqu'à 50µM de BPS, Dix *et al.*, 1994). Ce résultat suggère qu'il existe encore d'autres systèmes de transport qui sont capables de transporter le fer extracellulaire. La protéine Smf1p, de la famille de transporteurs de cations divalents Nramp, possède par exemple, une activité de transport de fer ferreux couplée au transport de protons (Chen *et al.*, 1999). Cette protéine est localisée à la membrane plasmique chez *S. cerevisiae* (Supek *et al.*, 1996, Portnoy *et al.*, 2000), et est impliquée essentiellement dans le transport du manganèse (Supek *et al.*, 1996), bien qu'elle puisse aussi transporter d'autres métaux comme le zinc, le fer, le cadmium ou le cobalt (Chen *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 1997). Le rôle exact de cette protéine dans le métabolisme du fer chez *S. cerevisiae* n'a pas encore été déterminé, mais le fer, comme le manganèse, pourrait avoir un rôle dans la dégradation vacuolaire de cette protéine (Liu et Culotta, 1999, Portnoy *et al.*, 2000). Il existe par ailleurs deux homologues de Smf1p, les protéines Smf2p et Smf3p, localisées respectivement dans des vésicules intracellulaires et à la vacuole (Portnoy *et al.*, 2000). Smf2p possède le même profil de régulation par les métaux que Smf1p (Portnoy et al, 2000), mais rien n'est connu quant à son rôle dans le métabolisme du fer. Le rôle de Smf3p dans le métabolisme du fer a été plus clairement établi (Portnoy *et al.*, 2002) et sera détaillé plus loin dans ce chapitre.

A-1-c. Un système de transport opportuniste : la capture des sidérophores

La levure *S. cerevisiae* ne synthétise pas de sidérophores, mais elle est capable d'acquérir le fer complexé à ces molécules, soit *via* le système de transport réductif, soit *via* des transporteurs spécifiques de certains sidérophores. Ce dernier système est non seulement une stratégie d'acquisition du fer supplémentaire pour la cellule, mais également un moyen pour entrer en compétition avec les organismes qui eux, synthétisent les sidérophores. La caractérisation des gènes impliqués dans ce système de transport spécifique chez *S. cerevisiae* a débuté il y a peu (Lesuisse *et al.*, 1998), et les mécanismes impliqués dans ce transport ne sont pas aussi bien documentés que le système bactérien (pour revue, Wandersman et Delepelaire, 2004). *S. cerevisiae* possède 4 gènes codant pour des transporteurs de sidérophores : *ARN1* , *TAF1* (ou *ARN2*), *SIT1* (ou *ARN3*) et *ENB1* (ou *ARN4*) (Heymann *et al.*, 2000b, Heymann *et al.*, 1999, Lesuisse *et al.*, 1998, Heymann *et al.*, 2000a). Ces 4 transporteurs représentent une sous-famille de la superfamille des facilitateurs de transport

(Goffeau *et al.*, 1997, Yun *et al.*, 2000a). Ce type de transporteur nécessite l'établissement d'un gradient de protons fournissant l'énergie nécessaire au transport du composé. L'efficacité du transport de ferrichrome étant optimale pour un pH 6-7, il serait possible qu'un mécanisme d'antiport ferrisidérophore/protons soit impliqué (Lesuisse *et al.*, 2001).

Enb1p transporte exclusivement l'entérobactine, un catécholate produit par les bactéries (Heymann *et al.*, 2000a, Lesuisse *et al.*, 2001). Arn1p, Taf1p et Sit1p transportent quant à eux des sidérophores de type hydroxamate ; Taf1p transporte majoritairement la triacétylfusarine, Sit1p la ferrioxamineB (Heymann *et al.*, 1999, Lesuisse *et al.*, 1998, Yun *et al.*, 2000a, Yun *et al.*, 2000b). Ces deux transporteurs jouent cependant aussi un rôle dans le transport des ferrichromes (Lesuisse *et al.*, 2001, Yun *et al.*, 2000b). Arn1p semble quant à lui transporter une classe particulière de ferrichromes, possédant des résidus couplés à la N-ornithine (Heymann *et al.*, 2000b), mais peut aussi intervenir dans le transport de la triacétylfusarine (Lesuisse *et al.*, 2001). Les transporteurs Arn1p, Taf1p et Sit1p ne possèdent donc pas de spécificité exclusive pour un sidérophore donné.

En absence de leur substrat dans le milieu, les transporteurs de sidérophores sont localisés dans des vésicules de type endosome (Yun *et al.*, 2000b, Kim *et al.*, 2002). Des études détaillées concernant Arn1p ont montré que ce transporteur possède deux sites d'affinité différente pour le ferrichrome (K_d=8,1nM et 1,2µM, Moore *et al.*, 2003), dont les valeurs coïncident avec les concentrations de ferrichrome nécessaires pour observer une localisation à la membrane plasmique (10nM de ferrichrome) ou un cyclage entre l'endosome et la membrane plasmique (1µM de ferrichrome) (Kim *et al.*, 2002). Des expériences de mutagenèse dirigée récentes permettent de proposer un modèle dans lequel le ferrichrome viendrait, par endocytose non spécifique, se fixer sur le site à haute affinité d'Arn1p, induisant sa localisation à la membrane plasmique par un changement de conformation. Le site de basse affinité exposé à l'extérieur de la cellule pourrait alors fixer une autre molécule de ferrichrome et induire l'endocytose du transporteur, un nouveau changement de conformation, et le relargage du ferrichrome à l'intérieur de la cellule (Kim *et al.*, 2005). Les autres transporteurs ayant une localisation identique, le même type de mécanisme faisant intervenir une régulation post-traductionnelle des transporteurs de sidérophores médiée par la quantité de substrat présente dans l'environnement cellulaire leur est probablement applicable.

L'identification des gènes du transport des sidérophores a parallèlement permis d'identifier 3 autres gènes, *FIT1*, *FIT2* et *FIT3* (Protchenko *et al.*, 2001). Les produits de ces gènes, Fit1p, Fit2p et Fit3p sont attachés au squelette β-glucan de la paroi cellulaire *via* des « ancres » glycosylphosphatidylinositol. En absence d'une ou de plusieurs de ces protéines, le transport des sidérophores ferrichrome ou ferrioxamine est diminué, de même que la quantité de fer associé à la paroi cellulaire (Protchenko *et al.*, 2001). Les Fitp pourraient donc jouer un rôle dans la rétention du fer à proximité des cellules afin d'en faciliter le transport.

A-2. Stockage et trafic intracellulaire du fer chez la levure *S. cerevisiae*

De plus en plus d'informations sont disponibles concernant le stockage et l'utilisation du fer au sein de la cellule. Un schéma représentant la plupart des protéines décrites est présenté figure 10.

A-2-a. Prise en charge du fer dans le cytoplasme

Malgré les progrès réalisés dans la compréhension du devenir du fer au sein de la cellule, la prise en charge du fer dans le cytoplasme est un point qui reste aujourd'hui encore obscur. En effet, alors que plusieurs chaperons protéiques ont été identifiés pour l'acheminement du cuivre à travers la cellule (tels que Atx1p, Lys7p ou Cox17p (Lin *et al.*, 1997, Yuan *et al.*, 1995, Culotta *et al.*, 1997, Beers *et al.*, 1997)), il ne semble pas exister ce genre de protéines pour prendre en charge le fer dans le cytoplasme. Des ligands organiques, tels que le citrate ou le malate, sont cependant capables de fixer le fer et pourraient remplir ce rôle dans le cytoplasme.

A-2-b. La vacuole : un lieu de stockage du fer intracellulaire

Contrairement à la plupart des organismes, la levure *S. cerevisiae* ne possède pas de ferritine. Une protéine en possédant des caractéristiques (composée de 24 sous-unités similaires) a été isolée, mais son contenu en fer est assez faible (50 à 100 atomes par molécules) et n'est pas fonction de la quantité de fer dans le milieu, ce qui n'est pas en accord avec un rôle putatif de stockage du fer (Raguzzi *et al.*, 1988). Cette même étude a montré en

revanche que la vacuole est le seul compartiment cellulaire qui voit sa quantité de fer augmenter en fonction de la quantité de fer dans le milieu, faisant ainsi de la vacuole le lieu privilégié de stockage du fer chez *S. cerevisiae* (Raguzzi *et al.*, 1988, Bode *et al.*, 1995). Aucune donnée n'existe concernant la forme de stockage du fer dans cette organelle, mais le parallèle avec le stockage du fer dans les ferritines indique que le fer pourrait être également sous forme de Fe(III) dans les vacuoles. Des mesures de transport intracellulaire du fer suggèrent que la vacuole serait un lieu de passage obligé pour le fer avant sa redistribution dans la cellule, redistribution qui peut notamment être observée en faveur de la mitochondrie lors du passage d'un milieu fermentescible à un milieu respirable (Raguzzi *et al.*, 1988).

Le rôle exact de la vacuole dans le métabolisme du fer n'est pas encore bien caractérisé. La vacuole est un compartiment rendu acide par le fonctionnement d'une pompe à protons ATPase dépendante, la V-ATPase (pour revue, Graham *et al.*, 2003). Le gradient de protons généré par cette ATPase va être utilisé par d'autres transporteurs pour permettre l'accumulation et le stockage de leur substrat à l'intérieur de la vacuole. C'est le cas par exemple de plusieurs cations divalents, calcium, manganèse, magnésium et zinc (Okorokov *et al.*, 1985). L'acidification des vacuoles semble être également un élément important pour le métabolisme du fer, puisque des mutants déficients pour l'acidification des vacuoles (*Δvma3*, *Δcwh36*) présentent un retard de croissance sur un milieu dépourvu de fer et une incapacité à croître sur milieu respirable (Eide *et al.*, 1993, Szczypka *et al.*, 1997, Davis-Kaplan *et al.*, 2004). Des mutations qui engendrent une malformation des vacuoles (*Δvps16*, *Δpep3*, *Δpep5*), de même que des défauts dans le système de trafic des protéines dans le système sécrétoire (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, endosomes, vacuole), entraînent également des défauts dans le métabolisme du fer (Szczypka *et al.*, 1997, Bode *et al.*, 1995, Radisky *et al.*, 1997, Greene *et al.*, 1993, Lesuisse *et al.*, 2005). Les effets de ces mutations sont pléiotropes, et ne se limitent pas à un défaut du métabolisme du fer. Une explication concernant le défaut de métabolisme du fer de la plupart de ces mutants pourrait être la mauvaise maturation du transporteur à haute affinité Fet3p (Radisky *et al.*, 1997, Szczypka *et al.*, 1997, Davis-Kaplan *et al.*, 1998). L'étude de ces mutants pour le rôle de stockage du fer dans la vacuole n'a jamais été réellement entreprise, et les données moléculaires concernant les mécanismes de transport du fer dans cet organelle ne sont que partielles.

A-2-c. Un transporteur pour le stockage du fer dans la vacuole ?

En tant que lieu de stockage du fer au sein de la cellule, la vacuole possède un certain nombre de transporteurs vacuolaires qui permettent le transit du fer dans cet organelle. Le rôle exact de ces transporteurs ainsi que leur organisation au niveau de cet organelle ne sont pas encore complètement caractérisés.

L'importation du fer du cytoplasme vers la vacuole est très peu documentée. Elle pourrait être médiée à la fois par un mécanisme classique d'endocytose (Raguzzi *et al.*, 1988, Bode *et al.*, 1995, Li *et al*., 2001b) et par un transporteur nommé Ccc1p (Li *et al.*, 2001b). Ccc1p a été dans un premier temps identifié comme suppresseur multicopie d'un mutant sensible au calcium (Fu *et al.*, 1994), puis comme suppresseur multicopie de la sensibilité au manganèse du mutant *pmr1*, déficient pour le transport intracellulaire de ce métal (Lapinskas *et al.*, 1996), et enfin comme suppresseur multicopie du défaut de croissance sur milieu respirable d'un mutant *Δyfh1*, dérégulé pour le métabolisme du fer (Chen et Kaplan, 2000 ; voir plus loin). Ccc1p est un transporteur localisé à la membrane vacuolaire (Fu *et al.*, 1994, Li *et al.*, 2001b). La surexpression du gène *CCC1* entraîne une augmentation de la quantité de fer présent dans les vacuoles aux dépends de la quantité de fer cytoplasmique (Li *et al.*, 2001b), effet qui a pour conséquence d'induire la transcription des gènes du transport de fer extracellulaire (Chen et Kaplan, 2000). A l'inverse, une souche *Δccc1* n'accumule que peu de fer dans les vacuoles (Li *et al.*, 2001b). Ces résultats sont similaires concernant le manganèse (Li *et al.*, 2001b), ce qui laisse penser que Ccc1p pourrait à la fois un transporteur vacuolaire du fer et du manganèse ; il n'existe cependant pas encore de données concernant la régulation de ce transporteur, aussi bien par le fer que par le manganèse. Ccc1p est le seul transporteur de fer dans la vacuole qui ait été identifié jusqu'à présent, et il n'est pas spécifique de ce métal (Li *et al.*, 2001b). Par analogie avec les transporteurs de la membrane plasmique, il est possible qu'il existe d'autres transporteurs du fer dans la vacuole, qui n'ont pas encore été caractérisés jusqu'à présent du fait de la redondance des systèmes.

A-2-d. Les systèmes de mobilisation du fer hors de la vacuole

Export vacuolaire *via* le complexe Fet5p/Fth1p

Un système impliqué dans l'export du fer hors de la vacuole est le complexe bipartite Fet5p/Fth1p, homologue du complexe membranaire Fet3p/Ftr1p. La protéine Fet5p est une oxydase à cuivre qui a été identifiée comme suppresseur multicopie du défaut de croissance sur un milieu dépourvu de fer de la souche *Δfet3Δfet4* (Spizzo *et al.*, 1997). Fet5p et Fth1p forment un complexe localisé à la membrane vacuolaire (Urbanowski et Piper, 1999). De manière similaire au complexe Fet3p/Ftr1p, l'adressage à la membrane vacuolaire de chacune des deux protéines nécessite la présence de l'autre : En absence de Fet5p, Fth1p reste bloquée au niveau du réticulum endoplasmique (Urbanowski et Piper, 1999). L'orientation du complexe est en accord avec un rôle de celui-ci dans la mobilisation du fer vacuolaire. L'absence de Fet5p entraîne une induction de la transcription de Fet3p, et un double mutant *Δfet5Δfth1* est incapable de passer d'un milieu fermentescible à un milieu respiratoire lorsque les cellules ont été privées de fer avant la transition (Urbanowski et Piper, 1999).

Le fer stocké dans les vacuoles est probablement sous forme oxydée Fe(III), et n'est donc pas un substrat pour le complexe ferroxydase/perméase vacuolaire Fet5p/Fth1p. Les ferriréductases homologues Fre5p et Fre6p n'ont actuellement pas de rôle défini dans la cellule, mais une analyse globale de la localisation subcellulaire de chacune des protéines de la levure *S. cerevisiae* a mis en évidence une localisation vacuolaire de Fre6p (Huh *et al.*, 2003). Cette ferriréductase pourrait donc être impliquée dans la réduction du Fe(III) vacuolaire en Fe(II) avant son export par le complexe Fet5p/Fth1p.

Export vacuolaire *via* Smf3p, un transporteur de type Nramp

La levure *S. cerevisiae* possède trois homologues appartenant à la famille des transporteurs Nramp : Smf1p, Smf2p, et Smf3p (Portnoy *et al.*, 2000). Smf3p est vacuolaire et sa topologie indique qu'il pourrait jouer un rôle dans le transport du fer hors de la vacuole (Portnoy *et al.*, 2000). De fait, son absence résulte en une induction de la transcription de Fet3p (Portnoy *et al.*, 2000). Il a été montré que *SMF3* est régulé par le répresseur transcriptionnel oxygène dépendant Rox1p (Jensen et Culotta, 2002). La transcription de *SMF3* est donc fortement augmentée en condition anaérobie (Jensen et Culotta, 2002). Par

analogie avec la régulation oxygène dépendante de Fet3p/Ftr1p (expression abolie en condition anaérobie) et Fet4p (expression augmentée en condition anaérobie), il est possible d'imaginer que l'augmentation des transcrits *SMF3* en anaérobie pourrait permettre de compenser l'absence d'activité du transporteur Fet5p/Fth1p (qui requiert de l'oxygène pour oxyder le Fe(III)) dans ces conditions.

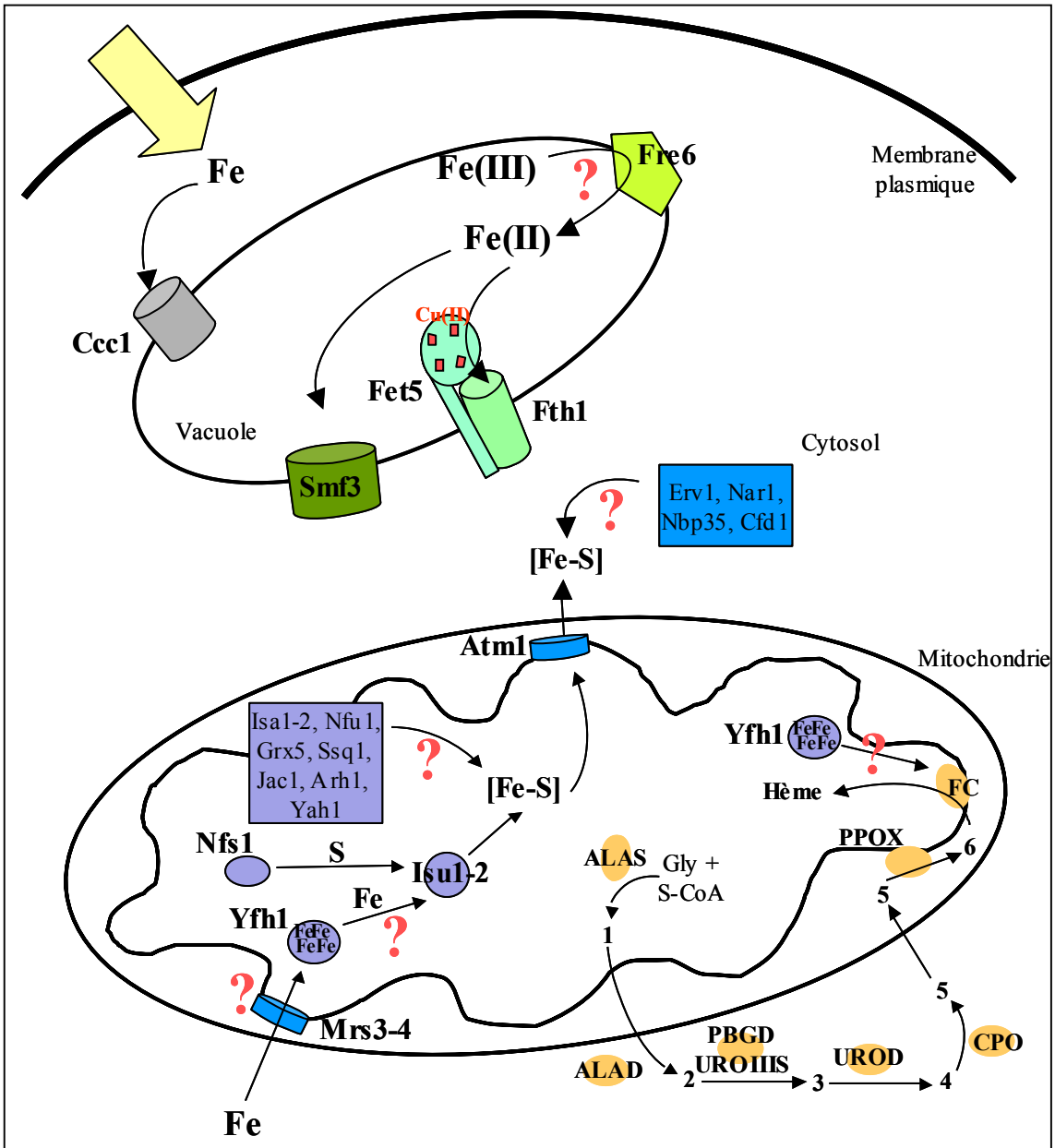

Figure 10 : Schéma récapitulatif du transit du fer intracellulaire chez *S. cerevisiae*. ALAS : δ-aminolévulinate synthase ; ALAD : δ-aminolévulinate déshydratase ; PBGD : porphobilinogène déaminase ; UROIIIS : uroporphyrinogène III synthase ; UROD : uroporphyrinogène décarboxylase ; CPO : coproporphyrinogène oxydase ; PPOX : protoporphyrinogène oxydase ; FC : ferrochélatase. Les produits des réactions sont les suivants : 1 : acide δ-aminolévulinique ; 2 : Pophobilinogène ; 3 : Uroporphyrinogène III ; 4 : Coproporphyrinogène III ; 5 : Protoporphyrinogène IX ; 6 : Protoporphyrine IX.

A-3. La mitochondrie : un lieu d'utilisation du fer intracellulaire

La mitochondrie est un organelle essentiel pour les cellules eucaryotes. En plus de sa fonction dans la génération d'énergie via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire, elle est le siège de plusieurs voies métaboliques telles que la synthèse de certains acides aminés (valine, isoleucine), le cycle de l'urée, la biogenèse des centres [Fe-S] ou la synthèse de l'hème. Ces deux dernières voies métaboliques impliquent l'incorporation d'atomes de fer dans les groupements synthétisés, ce qui fait de la mitochondrie un lieu prépondérant d'utilisation du fer intracellulaire.

A-3-a. La mitochondrie et la synthèse des centres fer-soufre

Un rôle essentiel de la mitochondrie est la biosynthèse des centres [Fe-S]. La machinerie de synthèse de ces centres [Fe-S] est très conservée depuis les procaryotes jusqu'aux eucaryotes supérieurs, suggérant ainsi l'universalité de ce processus dans le monde vivant (Muhlenhoff et Lill, 2000). La synthèse mitochondriale des centres [Fe-S] consiste à assembler les atomes de fer et de soufre sur des protéines « matrices », les structures formées étant ensuite maturées et transférées sur les protéines acceptrices mitochondriales, ou exportées dans le cytoplasme pour être transférées sur les protéines acceptrices cytosoliques. Les premiers éléments qui existent concernant la maturation des protéines cytosoliques à centre [Fe-S] suggèrent qu'il s'agit d'un mécanisme biochimique complexe, qui ne possède pas d'équivalent chez les bactéries.

La reconstitution des centres [Fe-S] peut s'effectuer *in vitro*, en absence de protéines d'assemblage (Beinert *et al.*, 1997), ce qui indique que les protéines impliquées dans la biosynthèse des centres [Fe-S] doivent être considérées comme des chaperons plutôt que comme des catalyseurs.

Chez la levure *S. cerevisiae*, les premières études concernant la caractérisation de machinerie de synthèse des centres [Fe-S] ont débuté assez récemment (Strain *et al.*, 1998), mais l'ensemble des études réalisées depuis a permis d'identifier un grand nombre de gènes impliqués dans ce processus chez *S. cerevisiae* (pour revue, Muhlenhoff et Lill, 2000, Rouault et Tong, 2005), qui sont énumérés dans le tableau 2 et représentés sur la figure 10.

La fonction des gènes *ISU1*, *ISU2* et *NFS1* est essentielle pour la cellule. La délétion combinée des deux gènes *ISU1* et *ISU2* ou la délétion de *NFS1* est létale (Garland *et al.*, 1999,

Schilke *et al.*, 1999, Kispal *et al.*, 1999). Un phénotype retrouvé chez la plupart des mutants délétés des gènes impliqués dans la synthèse des centres [Fe-S] est l'accumulation de fer dans la mitochondrie. Comparés à une souche sauvage, les mutants *Δisu1*, *Δisu2*, *Δisa1Δisa2* ou *Δjac1* accumulent 2 à 3 fois plus de fer mitochondrial (Garland *et al.*, 1999, Jensen et Culotta, 2000, Voisine *et al.*, 2001), les mutants *Δssq1*, *Δyfh1* ou un mutant dans lequel l'expression de *NFS1* est diminuée en accumulent 10 fois plus (Schilke *et al.*, 1999, Babcock *et al.*, 1997, Li *et al.*, 1999) et un mutant *Δatm1* 20 fois plus (Kispal *et al.*, 1999). Les mutants *nfs1*, *Δyfh1*, *Δssq1* ou *Δatm1* expriment également de manière constitutive les gènes impliqués dans le transport du fer extracellulaire (Li *et al.*, 1999, Babcock *et al.*, 1997, Knight *et al.*, 1998, Chloupkova *et al.*, 2003).

Tableau 2 : Liste des gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse et la maturation des centres [Fe-S] chez *S. cerevisiae*.

	Gène	Rôle ou fonction	Références
Synthèse et maturation mitochondriale	*ISU1 ISU2*	« Matrice », formation du [Fe-S]	Garland *et al*., 1999 Muhlenhoff *et al.*, 2003a
	NFS1	Donneur de soufre	Muhlenhoff *et al.*, 2004
	YFH1	Donneur de fer ?	Muhlenhoff *et al.*, 2002, Gerber *et al*., 2003
	ISA1 ISA2	?	Kaut *et al.*, 2000, Pelzer *et al.*, 2000
	NFU1	?	Schilke *et al*., 1999, Muhlenhoff *et al.*, 2002
	GRX5	Glutarédoxine réductase	Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2002
	SSQ1	Chaperon Hsp70	Strain *et al.*, 1998, Voisine *et al.*, 2001, Dutkiewicz *et al.*, 2003
	JAC1	Chaperon Hsp70	Strain *et al.*, 1998, Voisine *et al.*, 2001, Dutkiewicz *et al.*, 2003
	YAH1	Ferrédoxine	Lange *et al.*, 2000, Alves *et al*., 2004
	ARH1	Ferrédoxine réductase	Li *et al.*, 2001a, Alves *et al*., 2004
	MRS3 MRS4	Import mitochondrial du fer ?	Muhlenhoff *et al.*, 2003b, Foury et Roganti, 2002
Maturation cytosolique	*ATM1*	Export des centres [Fe-S] ?	Kispal *et al.*, 1997, Kispal *et al.*, 1999
	ERV1	Sulfhydril oxydase	Lange *et al.*, 2001
	NAR1	Hydrogénase	Balk *et al.*, 2004, Balk *et al.*, 2005
	NBP35	ATPase	Hausmann *et al.*, 2005
	CFD1	ATPase	Roy *et al.*, 2003

Yfh1p est une protéine homologue de la frataxine humaine qui pourrait être le donneur de fer pour la synthèse des centres [Fe-S]. Des études *in vitro* ont montré que la frataxine humaine est une protéine capable de fixer le fer (Cavadini *et al.*, 2002), et que l'ajout d'holo-frataxine et de soufre est suffisant pour former un centre [Fe-S] sur une protéine ISU (Yoon et

Cowan, 2003). Les études menées *in vivo* chez l'homme ont confirmé que la frataxine est un composant de la machinerie d'assemblage des centres [Fe-S] (Rötig *et al.*, 1997, Stehling *et al.*, 2004). Des observations similaires ont été faites chez la levure : Yfh1p est une protéine qui lie le fer (Adamec *et al.*, 2000), et qui interagit physiquement *in vivo* avec Isu1p et Nfs1p (Gerber *et al.*, 2003, Gerber *et al.*, 2004), ce qui indique qu'elle est impliquée dans la synthèse des centres [Fe-S] (Muhlenhoff *et al.*, 2002).

Mrs3p et Mrs4p pourraient être les transporteurs mitochondriaux délivrant le fer nécessaire à Yfh1p pour la synthèse des centres [Fe-S]. La délétion de *MRS3* et *MRS4* dans un contexte *Δyfh1* permet de réduire à un niveau sauvage le contenu en fer des mitochondries (Foury et Roganti, 2002). L'absence de ces protéines dans un contexte sauvage est par ailleurs corrélée à une diminution de la synthèse des centres [Fe-S] (Muhlenhoff *et al.*, 2003).

La localisation mitochondriale des protéines impliquées dans la synthèse des centres [Fe-S] est indispensable (Gerber *et al.*, 2004). Les centres [Fe-S] retrouvés dans les protéines cytosoliques doivent être exportés de la mitochondrie. Cet export fait intervenir un transporteur de type ABC localisé dans la membrane interne des mitochondries, Atm1p (Kispal *et al.*, 1999). En absence de ce transporteur, les cellules présentent un défaut spécifique des protéines cytosoliques à centre [Fe-S] (Kispal *et al.*, 1999). L'absence de Erv1p, Nar1p, Nbp35p et Cfd1p (tableau 2) entraîne également un défaut spécifique des protéines cytosoliques à centre [Fe-S], mais leur rôle exact dans ce processus n'est pas encore défini.

A-3-b. La synthèse de l'hème a lieu en partie dans la mitochondrie

La mitochondrie est également un organelle important pour la synthèse de l'hème. L'hème est un groupe prosthétique de nombreuses protéines et consiste en un atome de fer coordonné par 4 atomes d'azote au sein d'un cycle tétrapyrolique. La formation du cycle tétrapyrolique débute dans la mitochondrie par la formation du précurseur acide δ-aminolévulinique (ALA) à partir de succinyl-CoA et de glycine. Cette étape est catalysée par Hem1p, ou ALA synthase (Urban-Grimal *et al.*, 1986). Le cycle tétrapyrolique est ensuite assemblé dans le cytosol à partir de 8 molécules d'ALA, et par l'intermédiaire d'une série de réactions schématisée figure 10 (Urban-Grimal et Labbe-Bois, 1981). Le protoporphyrinogène ainsi formé est redirigé dans la mitochondrie où l'atome de fer est incorporé par la férrochélatase, ou Hem15p (Labbe-Bois, 1990). Des données récentes

suggèrent qu'Yfh1p pourrait être également le donneur de fer pour la ferrochélatase (Lessuise *et al.*, 2003, Yoon et Cowan, 2004). Les transporteurs mitochondriaux Mrs3p et Mrs4p sont également impliqués dans le processus (Muhlenhoff *et al.*, 2003b, Zhang *et al.*, 2005). Les mécanismes de translocation de l'hème de la mitochondrie vers le reste de la cellule, ainsi que la nature de la molécule transportée (libre ou associée) restent encore un mystère chez *S. cerevisiae*. Contrairement à un défaut de synthèse des centres [Fe-S], une déficience pour la synthèse de l'hème n'entraîne pas d'accumulation de fer mitochondrial (Crisp *et al.*, 2003).

La biosynthèse de l'hème est intimement liée à la présence d'oxygène dans le milieu. La production d'hème requiert de l'oxygène à deux étapes de sa synthèse, ce qui établit une corrélation directe entre l'absence d'oxygène et l'absence d'hème. L'hème est donc considérée comme une molécule centrale, indicateur de l'état aérobie ou anaérobie des cellules, et effecteur de la réponse transcriptionnelle oxygène-dépendante. L'hème est le co-facteur du facteur de transcription Hap1p (pour revue, Kwast *et al.*, 1998). En se fixant sur Hap1p, l'hème va permettre son activation et par conséquent l'expression des gènes impliqués notamment dans la respiration cellulaire et la défense contre le stress oxydant.

La dégradation de l'hème a longtemps été considérée comme inexistante chez *S. cerevisiae* (Auclair *et al.*, 2003). Des études récentes ont cependant mis en évidence une activité hème oxygénase dans les membranes de *S. cerevisiae*, activité perdue lorsque Hmx1p, homologue de l'hème oxygénase humaine, est absente (Protchenko et Philpott, 2003). Dans une souche *Δhmx1* la quantité d'hème est plus importante (Protchenko et Philpott, 2003). L'hème étant elle-même une molécule régulatrice, l'activité de Hmx1p influe sur le système de régulation hème-dépendant : Les gènes cibles du facteur de transcription Hap1p sont plus fortement transcrits en absence de Hmx1p.

B. Aft1p et Aft2p, les régulateurs de l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae*

B-1. Aft1p, un régulateur majeur de l'homéostasie du fer chez S. cerevisiae

B-1-a. Le « régulon fer »

L'identification et la caractérisation des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez la levure *S. cerevisiae* a permis de définir un ensemble de 27 gènes appelé le « régulon fer » (figure 11). Les gènes appartenant au « régulon fer » ont une transcription induite en condition de carence en fer. Les gènes du « régulon fer » codent pour l'ensemble des protéines impliquées dans le transport extracellulaire du fer : la famille des ferriréductases Fre1p à Fre6p (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Casas *et al.*, 1997, Dancis *et al.*, 1990, Georgatsou *et al.*, 1997, Georgatsou et Alexandraki, 1999), le système bipartite de transport à haute affinité du fer Fet3p/Ftr1p (Askwith *et al.*, 1994, Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996), le transporteur basse affinité Fet4p (Waters et Eide, 2002, Jensen et Culotta, 2002), les transporteurs de sidérophores Arn1p, Enb1p, Sit1p et Taf1p (Yun *et al.*, 2000a), et les protéines de la paroi Fit1p, Fit2p et Fit3p (Protchenko *et al.*, 2000). On retrouve également parmi les gènes du « régulon fer » les protéines Ccc2p et Atx1p chargées de délivrer le cuivre à la ferroxydase Fet3p (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996, Lin *et al.*, 1997, Blaiseau *et al.*, 2001), ainsi que des gènes codant pour des protéines de trafic et d'utilisation du fer intracellulaire : le transporteur bipartite vacuolaire Fet5p/Fth1p (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996, Rutherford *et al.*, 2001), le transporteur de la famille Nramp, Smf3p (Portnoy *et al.*, 2000, Portnoy *et al.*, 2002), un transporteur impliqué dans le stockage du zinc dans la vacuole, Cot1p (MacDiarmid *et al.*, 2003, Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004), le transporteur mitochondrial Mrs4p (Foury et Roganti, 2002), les protéines d'assemblage des centres [Fe-S] Isu1p et Isu2p (Garland *et al.*, 1999), l'hème oxygénase Hmx1p (Protchenko et Philpott, 2003) et la protéine Cth2p (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004, Puig *et al.*, 2005).

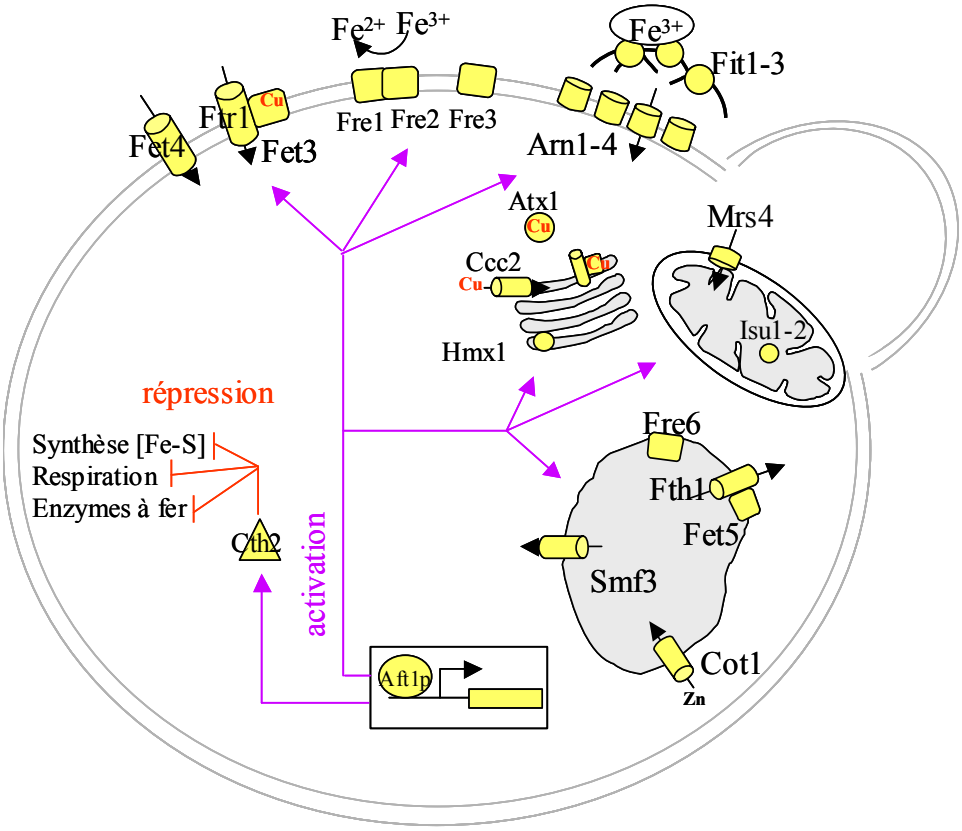

Figure 11 : Les gènes du « régulon fer ». Les gènes dont la transcription est activée par la carence en fer, et majoritairement par le facteur de transcription Aft1p sont représentés.

Les études de Puig et collaborateurs ont caractérisé récemment le rôle du produit du gène *CTH2*, ou *TIS11,* dans le métabolisme du fer (Puig *et al.*, 2005). Cth2p est une protéine impliquée dans la dégradation des ARNm en réponse à la carence en fer. Cette protéine interagit avec une séquence riche en A-U contenue dans la partie 3' non traduite des ARNm, ce qui favorise leur dégradation. Nombre des ARNm régulés de cette manière par Cth2p sont impliqués dans des processus qui utilisent le fer comme co-facteur (respiration, cycle de Krebs, synthèse des centres [Fe-S]...).

En réponse à la carence en fer, il existe un véritable remaniement coordonné de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du fer médié principalement par Aft1p (Puig *et al.*, 2005, et figure 11). En condition de carence en fer, l'activation d'Aft1p permet d'une part de recruter le fer nécessaire à la cellule en induisant la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans le transport extracellulaire et le trafic du fer intracellulaire, et d'autre part d'économiser ce fer disponible, en diminuant l'expression des gènes qui l'utilisent, et ce *via* l'activation du répresseur post-transcriptionnel Cth2p. De manière

intéressante, Cth2p possède un paralogue, Cth1p, qui semble être lui aussi nécessaire, dans une moindre mesure, pour la régulation de la transcription des gènes utilisant le fer comme co-facteur. Ce gène ne semble cependant pas être régulé par le fer et les facteurs de transcription Aft1p ou Aft2p (Puig *et al.*, 2005).

B-1-b. Aft1p est un facteur de transcription actif en réponse à la carence en fer

Le gène codant pour le facteur de transcription Aft1p a été isolé sur la base d'un crible génétique visant à identifier des mutants dérégulés pour l'homéostasie du fer (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995). Les auteurs ont utilisé les propriétés régulatrices du promoteur du gène *FRE1* (codant pour une ferriréductase membranaire), induisant l'expression du gène placé sous son contrôle en condition de carence en fer (Dancis *et al.*, 1992). Un plasmide portant le promoteur du gène *FRE1* fusionné au gène *HIS3* confère aux cellules *Δhis3* une prototrophie pour l'histidine fer-dépendante, de telle manière que les cellules ne sont capables de croître sur un milieu dépourvu d'histidine seulement lorsqu'il est carencé en fer (Dancis *et al.*, 1994). Des mutants spontanés capables de croître sur un milieu dépourvu d'histidine et contenant du fer sont des mutants dérégulés pour l'homéostasie du fer. C'est avec ce crible que le gène *CTR1*, codant pour le transporteur membranaire à haute affinité du cuivre, avait été précédemment identifié (Dancis *et al.*, 1994). Avec ce crible, une forme mutée d'Aft1p, appelée *AFT1-1up*, a pu être isolée, et le gène *AFT1* identifié (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995). Il code pour une protéine de 690 acides aminés dont les caractéristiques seront discutées plus loin dans ce chapitre.

L'expression d'une protéine hybride, composée du domaine de liaison à l'ADN LexA, ou du domaine de liaison à l'ADN Gal4 fusionnés à la protéine Aft1p permet d'activer la transcription d'un gène rapporteur LacZ contenant les séquences promotrices LexAop ou GAL1, reconnues respectivement par les domaines de liaison LexA ou Gal4 (Casas *et al.*, 1997, Blaiseau *et al.*, 2001). Cette activation transcriptionnelle a lieu quelle que soit la quantité de fer dans le milieu (Casas *et al.*, 1997, Blaiseau *et al.*, 2001), ce qui montre qu'Aft1p est un facteur de transcription dont la fonction transactivatrice n'est pas régulée par la quantité de fer dans le milieu. Une recherche du domaine activateur d'Aft1p, en utilisant des formes tronquées de la protéine fusionnée au domaine de liaison Gal4, a permis de le localiser entre les acides aminés 413 et 572 de la protéine (Ueta *et al.*, 2003, et figure 14).

En absence d'Aft1p, les cellules ne possèdent pas d'activité ferriréductase ni de transport de Fe(II). Elles présentent un fort retard de croissance sur un milieu carencé en fer ainsi qu'une incapacité à croître sur un milieu respirable tel que le glycérol (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Casas *et al.*, 1997, Blaiseau *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2001, Stadler et Schweyen, 2002). Comme mentionné précédemment, la transcription des gènes impliqués dans les systèmes de transport du fer n'est plus induite en absence d'Aft1p en condition de carence en fer (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996, Georgatsou et Alexandraki, 1999, Blaiseau *et al.*, 2001). A l'inverse, l'expression de la forme mutée d'Aft1p, *AFT1-1up*, confère une expression constitutive de ces gènes, insensible au fer présent dans le milieu (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996, Martins *et al.*, 1998). L'ensemble de ces données révèle que le facteur de transcription Aft1p est actif en condition de carence en fer et induit la transcription de gènes dont les produits sont impliqués dans le transport du fer extracellulaire.

L'absence d'Aft1p confère par ailleurs une légère sensibilité à un agent oxydant, le peroxyde d'hydrogène, ainsi qu'une sensibilité à l'excès de différents métaux divalents tels que le cobalt, le zinc, le manganèse ou le nickel (Blaiseau *et al.*, 2001, Stadler et Schweyen, 2002). Une réponse de la cellule à l'excès de ces métaux semble être en effet l'augmentation du transport du fer extracellulaire, mais les raisons de cette induction ne sont pas encore comprises (Stadler et Schweyen, 2002).

B-1-c. Aft1p se fixe de manière fer-dépendante sur une séquence promotrice consensus définie

Afin de comprendre le mécanisme d'action du facteur de transcription Aft1p pour la régulation fer-dépendante de la transcription de ces gènes, Yamaguchi-Iwai et collaborateurs ont entrepris la caractérisation de la fixation d'Aft1p sur les régions promotrices de ses gènes cibles (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996).

Le promoteur du gène *FET3* a été utilisé pour caractériser la région conférant une régulation Aft1p-dépendante. L'étude par délétions successives de ce promoteur a permis de montrer que la région promotrice -263/-234 pb de *FET3* est nécessaire et suffisante pour permettre l'expression Aft1p-dépendante et fer-dépendante d'un gène rapporteur LacZ (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Des expériences de retard sur gel et d'empreinte à la DNase ont montré qu'Aft1p est capable d'interagir directement avec la région -263/-234, et des

expériences de compétition avec différents oligonucléotides mutés ont mis en évidence que c'est la séquence 5'-TGCACCC-3' contenue dans cette région qui est indispensable pour observer une fixation d'Aft1p sur l'ADN (figure 12). Des expériences d'interférence par méthylation de l'ADN ont également permis de définir les nucléotides probablement en contact direct avec Aft1p (figure 12).

Figure 12 : Région promotrice de *FET3* où se fixe Aft1p. La région présentée ci-dessus est protégée du clivage par la DNase. Les résidus entourés sont protégés de la méthylation de l'ADN, et donc probablement en contact direct avec Aft1p. Les expériences de compétition avec des oligonucléotides mutés ont défini la région grisée comme étant nécessaire pour la fixation d'Aft1p. D'après Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996.

L'alignement par informatique des régions promotrices de plusieurs gènes régulés par Aft1p (*FRE1*, *FRE2*, *FET3*, *FTR1*, *CCC2* et *FTH1*) a permis d'identifier la séquence consensus de 8 pb suivante : 5'-(T/C)(G/A)CACCC(A/G)-3' comme séquence reconnue par Aft1p. Aft1p est capable de se fixer directement *in vitro* sur la région promotrice de chacun de ces gènes contenant la séquence consensus (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Cependant, les expériences de retard sur gel avec les régions promotrices de chacun des 6 gènes cités ci-dessus ont mis en évidence une fixation moins forte d'Aft1p sur le promoteur du gène *FRE1,* qui est le seul à posséder une séquence de type 5'-TACACCC-3', ce qui suggère une meilleure affinité d'Aft1p pour la séquence 5'-TGCACCC-3'. En revanche, la mutation du A en C modifiant la séquence 5'-TGCACCCA-3' en 5'-TGCACCCC-3' n'affecte que modérément la fixation d'Aft1p, suggérant que le résidu en 3' de 5'-TGCACCC-3' n'est pas strictement nécessaire à la fixation d'Aft1p sur un promoteur donné. De plus, l'analyse des régions promotrices de l'ensemble des gènes activés par *AFT1-1up*, identifiés par des expériences d'analyse globale du transcriptome, identifient aussi la séquence consensus 5'-TGCACCC-3' comme étant le site de liaison d'Aft1p (Rutherford *et al.*, 2003).

Des expériences de méthylation de l'ADN ont permis de montrer qu'Aft1p est capable de se fixer directement *in vivo* sur le promoteur de *FET3* (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). La liaison à l'ADN d'Aft1p est régulée par la quantité de fer dans le milieu, puisqu'Aft1p ne se lie au promoteur de *FET3* qu'en condition de carence en fer. Le mutant constitutif *AFT1-1up*

est quant à lui présent sur le promoteur de *FET3* quelle que soit la quantité de fer dans le milieu (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996).

Le recrutement *in vivo* d'Aft1p sur les promoteurs de ses gènes cibles, et donc l'induction de la transcription de ces gènes en condition de carence en fer, semble par ailleurs modulé par des protéines ayant un rôle plus général dans l'établissement de la structure chromatinienne. Il a ainsi été montré que Nhp6ap/Nhp6bp et Ssn6p étaient nécessaires à l'activation fer-dépendante des gènes *FRE2* et *TAF1*. L'activation Aft1p-dépendante de *FRE2* et *TAF1* ne peut cependant pas s'appliquer à l'ensemble des gènes régulés par Aft1p. La présence de Nhp6ap/Nhp6bp et Ssn6p n'est pas nécessaire pour l'activation transcriptionnelle des gènes *FET3*, *FIT2* ou *FRE3* et leur rôle dans l'expression du gène *FRE1* semble être différent de celui proposé pour l'expression du gène *FRE2* (Fragiadakis *et al.*, 2004).

Nhp6ap et Nhp6bp sont des protéines non histone de faible poids moléculaire (11 kDa), de la famille des protéines à boîte HMG (pour High Mobility Group), qui sont capables d'interagir avec l'ADN. Elles sont homologues et ont un rôle redondant dans la modulation de l'état de la chromatine (et donc appelées toutes deux Nhp6p), et pourraient ainsi faciliter et stabiliser le recrutement de facteurs de transcription sur leurs séquences consensus, comme cela a été suggéré concernant le facteur de transcription Gal4p sur le promoteur de *GAL1* (Paull *et al.*, 1996, Laser *et al.*, 2000). Nhp6p interagit directement avec le domaine N-terminal de liaison à l'ADN d'Aft1p, et la présence de Nhp6p sur le promoteur de *FRE2* est nécessaire pour que le recrutement d'Aft1p ait lieu en condition de carence en fer (Fragiadakis *et al.*, 2004).

Ssn6p quant à lui est un co-régulateur transcriptionnel majeur chez la levure. Il fonctionne, en association avec Tup1p, à la fois comme un répresseur ou un activateur transcriptionnel, en interagissant avec des facteurs de transcription spécifiques (Smith et Johnson, 2000, Proft et Struhl, 2002). Ssn6p n'est pas nécessaire pour le recrutement d'Aft1p sur le promoteur de *FRE2*. Il est cependant présent, de manière Aft1p-dépendante, sur le promoteur de *FRE2* en condition de carence en fer, et permet l'activation transcriptionnelle de *FRE2* dans cette condition (Fragiadakis *et al.*, 2004). Il interagit directement avec le domaine N-terminal de liaison à l'ADN d'Aft1p, et pourrait faciliter le recrutement de la machinerie générale de transcription sur le promoteur de *FRE2* (Fragiadakis *et al.*, 2004). Un rôle pour Ssn6p dans la régulation du transport du fer avait déjà été suggéré précédemment (Lesuisse *et al.*, 2001). Dans cette étude, il a été montré que l'absence des protéines Ssn6p/Tup1 entraîne une activation constitutive du transport des sidérophores ferrichrome ou ferrioxamine B

(médié majoritairement par Sit1p et Arn1p), ainsi qu'un défaut d'activation du transport de triacétylfusarine (médié par Taf1p) en condition de carence en fer (Lesuisse *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces données indique donc que la régulation transcriptionnelle Aft1-dépendante des gènes du métabolisme du fer pourrait être fonction du contexte chromatinien du promoteur considéré.

B-1-d. La localisation subcellulaire d'Aft1p est régulée par le fer

Des études ont été menées afin d'identifier à quel niveau s'effectue la régulation par le fer de la liaison d'Aft1p à l'ADN. En effet, le recrutement sur l'ADN d'un facteur de transcription peut être la conséquence de plusieurs mécanismes de régulation. La présence/absence d'un facteur de transcription sur les promoteurs de ses gènes cibles peut ainsi se traduire simplement par la présence/absence du facteur de transcription lui-même. C'est par exemple le cas de facteurs de transcription, tels que Ime1p, impliqués dans la régulation de la méiose (pour revue, Kassir *et al.*, 2003). La régulation du recrutement d'un facteur de transcription peut également s'effectuer au niveau de sa localisation subcellulaire. Le facteur de transcription Pho4p est ainsi localisé dans le cytoplasme en présence de phosphate dans le milieu, et concentré dans le noyau en absence de phosphate, où il active notamment la transcription de *PHO5*, une acide phosphatase (O'Neill *et al.*, 1996). Le facteur de transcription Yap1p est également re-localisé du cytoplasme vers le noyau en condition de stress oxydant et joue ainsi son rôle d'activateur transcriptionnel (Kuge *et al.*, 1997). Enfin, le recrutement sur l'ADN d'un facteur de transcription peut être médié par des changements conformationnels de la protéine. Il a par exemple été montré que le recrutement du facteur de transcription Mac1p, régulateur de l'homéostasie du cuivre chez *S. cerevisiae*, est inhibé par la fixation d'atomes de cuivre qui induisent une interaction intramoléculaire masquant le domaine de liaison à l'ADN de Mac1p (Jensen et Winge, 1998). De la même manière, l'activité du facteur de transcription Zap1p, régulateur de l'homéostasie du zinc chez *S. cerevisiae*, pourrait être inhibée par la fixation d'atomes de zinc au niveau de son domaine de liaison à l'ADN qui empêcheraient ainsi son interaction avec l'ADN (Bird *et al.*, 2000).

Il a été montré que la quantité de la protéine Aft1p ne varie pas en fonction de la quantité de fer dans le milieu (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). En revanche, la localisation subcellulaire d'Aft1p est modulée par la présence/absence de fer (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002, Ueta *et al.*, 2003). En condition de carence en fer, générée par

l'utilisation d'un milieu dépourvu de fer, Aft1p est localisé dans le noyau, alors qu'il est localisé majoritairement dans le cytoplasme en présence de fer (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002).

Import d'Aft1p dans le noyau

Pse1p, un transporteur de la famille des kariophérines β, est un récepteur d'import nucléaire nécessaire à la localisation nucléaire d'Aft1p en condition de carence en fer (Ueta *et al.*, 2003). Aft1p reste localisé dans le cytoplasme en condition de carence en fer dans un mutant conditionnel *pse1-1* thermosensible, et l'activation de la transcription du gène cible d'Aft1p, *FTR1*, ne peut avoir lieu dans ces conditions (Ueta *et al.*, 2003).

L'import des protéines dans le noyau par Pse1p requiert la présence d'un NLS (pour Nuclear Localisation Signal) riche en résidus basiques. Deux domaines présentant des similitudes avec un NLS ont été identifiés dans la partie N-terminale d'Aft1p (202-KPKKKR-207, 332-SKRP//RKPK-355, figure 14), les deux étant nécessaires à la localisation nucléaire d'Aft1p (Ueta *et al.*, 2003). Il semblerait cependant que l'import d'Aft1p dans le noyau *via* la reconnaissance de ces NLS par Pse1p ne soit pas dépendant de la quantité de fer présente dans le milieu : lorsque les NLS seuls sont fusionnés à la GFP, celle-ci se localise dans le noyau aussi bien en absence qu'en présence de fer, et la protéine chimère Aft1p mutée pour les 2 NLS et fusionnée à la séquence NLS de SV40 présente toujours une localisation subcellulaire dépendante du fer (Ueta *et al.*, 2003). De tels résultats révèlent que bien que l'import d'Aft1p soit médié par Pse1p, la régulation de la localisation subcellulaire d'Aft1p par le fer ne passe pas par le contrôle de son import dans le noyau.

Export d'Aft1p hors du noyau

Une autre séquence riche en résidus leucine, caractéristique des séquences NES (pour Nuclear Export Signal) a été identifiée dans la partie N-terminale d'Aft1p (97-NNLIHLDPVPN-107, figure 14). La mutation des résidus leucine 99 et 102 présents dans cette séquence en résidus alanine entraîne une localisation d'Aft1p dans le noyau aussi bien en absence qu'en présence de fer ; localisation qui s'accompagne d'une expression constitutive de *FTR1* (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). De tels résultats suggèrent que la régulation de la localisation subcellulaire d'Aft1p en réponse à la quantité de fer présente dans le milieu s'effectue par l'intermédiaire de ce motif NES. Des expériences supplémentaires

sont cependant nécessaires pour déterminer le rôle exact de ce motif dans la localisation fer-dépendante d'Aft1p. Par ailleurs, la forme mutée constitutivement active d'Aft1p, *AFT1-1up*, se localise aussi dans le noyau, même en présence de fer (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). La mutation responsable de cet allèle mutant *AFT1-1up* correspond au remplacement du résidu cystéine par un résidu phénylalanine en position 291, résidu qui n'intervient ni dans la composition des NLS, ni dans la composition du NES. Ce résultat révèle que la régulation de la localisation subcellulaire d'Aft1p est plus complexe et qu'elle implique d'autres régions en plus du motif NES.

Le signal menant à l'activation d'Aft1p est encore inconnu

La transduction du signal « carence en fer » sur l'activité d'Aft1p n'a pas encore été identifiée. Il semblerait que l'activation Aft1p-dépendante des gènes du métabolisme du fer dépende d'un composé lié à la synthèse mitochondriale des centres [Fe-S], possiblement transporté par Atm1p (Chen *et al.*, 2004, Rutherford *et al.*, 2005). Il semblerait cependant qu'Aft1p ne soit pas elle-même une protéine capable de lier directement le fer, notamment sous la forme de centre [Fe-S] (Rutherford *et al.*, 2005), ce qui laisse encore de nombreuses pistes ouvertes.

B-1-e. La protéine Aft1p est phosphorylée lors de la transition diauxique

La transition diauxique correspond au passage d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire, lorsque l'ensemble des sources de carbone fermentescibles est épuisé dans le milieu. Dans ces conditions, la levure *S. cerevisiae* adapte son métabolisme énergétique dans le but d'utiliser l'éthanol produit par la fermentation comme source de carbone. Cette adaptation fait intervenir la voie de signalisation SNF1, dont l'élément central est le complexe protéine kinase Snf1p, qui est impliqué dans l'activation de plusieurs facteurs de transcription (pour revue, Schuller, 2003) ainsi que dans l'inhibition de la voie AMPc-PKA (pour Protéine Kinase dépendante de l'AMPc ; pour revue, Thevelein et De Winde, 1999). Lors de la transition diauxique, la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans la néoglucogenèse, le cycle de Krebs, la respiration et la biogenèse des mitochondries est induite, alors que la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans la glycolyse et la synthèse protéique est diminuée (DeRisi *et al.*, 1997). La transcription

de certains gènes du métabolisme du fer, *FET3*, *FTR1*, *FIT2*, *SIT1* et *CTH2*, est également induite lors de la transition diauxique (Haurie *et al.*, 2003). Le signal responsable de cette induction semble être l'épuisement du glucose dans le milieu et non la carence en fer, puisque l'induction a toujours lieu lors de la transition diauxique même en présence de 350µM de fer (Haurie *et al.,* 2003). L'induction de la transcription des gènes du métabolisme du fer lors de la transition diauxique est néanmoins médiée par le facteur de transcription Aft1p, et nécessite également la présence de la protéine kinase Snf1p, ce qui suggère que l'activation de la voie SNF1 en réponse à l'épuisement en sources de carbone fermentescibles telles que le glucose pourrait réguler positivement Aft1p (Haurie *et al.*, 2003). Par ailleurs, en absence de la protéine Tpk2p, une sous-unité catalytique de la PKA, la transcription des gènes du métabolisme du fer est également induite (Robertson *et al.*, 2000) ; il se pourrait donc que Tpk2p inhibe l'activité d'Aft1p en présence de glucose. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un lien privilégié entre l'activité d'Aft1p et le métabolisme énergétique des cellules.

La protéine Aft1p subit par ailleurs des modifications post-traductionnelles qui sont fonction du métabolisme énergétique cellulaire. Lors du passage des cellules d'un milieu contenant du glucose à un milieu contenant du glycérol ou lors de la transition diauxique, la protéine Aft1p est phosphorylée et cette phosphorylation est corrélée à l'activation de la transcription des gènes du métabolisme du fer (Casas *et al.*, 1997, Haurie *et al.*, 2003). Cependant, cette phosphorylation d'Aft1p a toujours lieu en absence de la protéine kinase Snf1p (Casas *et al.*, 1997, Haurie *et al.*, 2003), et ne peut être abolie par le maintien d'un niveau d'AMPc intracellulaire élevé lors de la transition diauxique (Casas *et al.*, 1997), ce qui indique que ni la protéine kinase Snf1p, ni la PKA, ne sont impliquées dans cet évènement de phosphorylation.

Le rôle de cette phosphorylation, ainsi que la protéine kinase responsable ne sont pas encore connus, et la relation qui existe entre la phosphorylation d'Aft1p et la transition diauxique n'est donc pas encore clairement établie. Il a été montré que l'état de phosphorylation peut intervenir dans la régulation de la localisation subcellulaire de nombreux facteurs de transcription, comme par exemple l'activateur transcriptionnel Pho4p. Lorsque Pho4p est phosphorylé, il ne peut pas interagir avec le récepteur d'import Pse1p et se localise alors dans le cytoplasme (Kaffman *et al.*, 1998). L'import d'Aft1p dans le noyau est également médié par Pse1p, et comme je l'ai mentionné précédemment, cette étape n'est pas régulée par le fer (Ueta *et al.*, 2003). Une hypothèse séduisante serait donc que l'accumulation

d'Aft1p dans le noyau lors de la transition diauxique pourrait être régulée *via* son état de phosphorylation. Dans ces conditions, la phosphorylation d'Aft1p, contrairement à celle de Pho4p, favoriserait son interaction avec Pse1p et par conséquent sa localisation nucléaire, même en présence de fer dans le milieu.

B-2. Aft1p et Aft2p : des facteurs de transcription paralogues

B-2-a. Aft1p et Aft2p sont localisés dans des régions chromosomiques dupliquées

L'analyse du génome de *S. cerevisiae* a permis de proposer un évènement de duplication entière du génome à l'origine des grandes régions dupliquées retrouvées chez *S. cerevisiae* (Wolfe et Shields, 1997, Kellis *et al.*, 2004). Cet évènement aurait eu lieu il y a 100 millions d'années, lors de la divergence entre les levures « petites-positives » et « petites-négatives » (Wolfe et Shields, 1997 et figure 7). La plupart des gènes dupliqués auraient ensuite été perdus, et les régions conservées réarrangées par des mécanismes de translocations réciproques au sein des chromosomes. Les protéines ayant encore un homologue issu de cette duplication ancestrale (protéines paralogues) représentent environ 12% de l'ensemble des protéines du génome de *S. cerevisiae* (Seoighe et Wolfe, 1999, Kellis *et al.*, 2004). *S. cerevisiae* compte ainsi 52 blocs dupliqués non chevauchants, qui recouvrent environ 45,5% des gènes du génome et qui se caractérisent par des paires de gènes dupliqués arrangés dans un même ordre et séparés par plusieurs gènes uniques (Goffeau *et al.*, 1996, Seoighe et Wolfe, 1999).

Le gène *AFT2* est le gène paralogue d'*AFT1*. *AFT1* et *AFT2* font partie de la région dupliquée 33 présente sur les chromosomes VII et XVI (figure 13). Les deux régions dupliquées ont probablement subi un réarrangement chromosomique post-duplication, puisqu'elles sont en ordre inverse par rapport aux centromères. Ces régions sont délimitées par les paires de paralogues *PUS1*/*PUS2* et *MF(alpha)1*/*MF(alpha)2* et contiennent 4 autres paires supplémentaires de protéines paralogues, dont Aft1p et Aft2p (figure 13). Lors de l'édification de la première carte chromosomique des régions dupliquées chez *S. cerevisiae*, Aft1p et Aft2p n'avaient pas été répertoriés comme paralogues (Wolfe et Shields, 1997). Les critères utilisés pour réaliser cette première carte sont beaucoup plus stringents que ceux utilisés ensuite par Seoighe et Wolfe (Seoighe et Wolfe, 1999). La première carte ne tient

compte en effet que des paralogues pour lesquels l'identité de séquence est très forte (alignement avec blastp présentant un score > 200). Aft1p et Aft2p présentant une similitude de séquence modérée (score = 168), ils n'avaient pas été retenus lors de l'édification de la première carte chromosomique de régions dupliquées de *S. cerevisiae*.

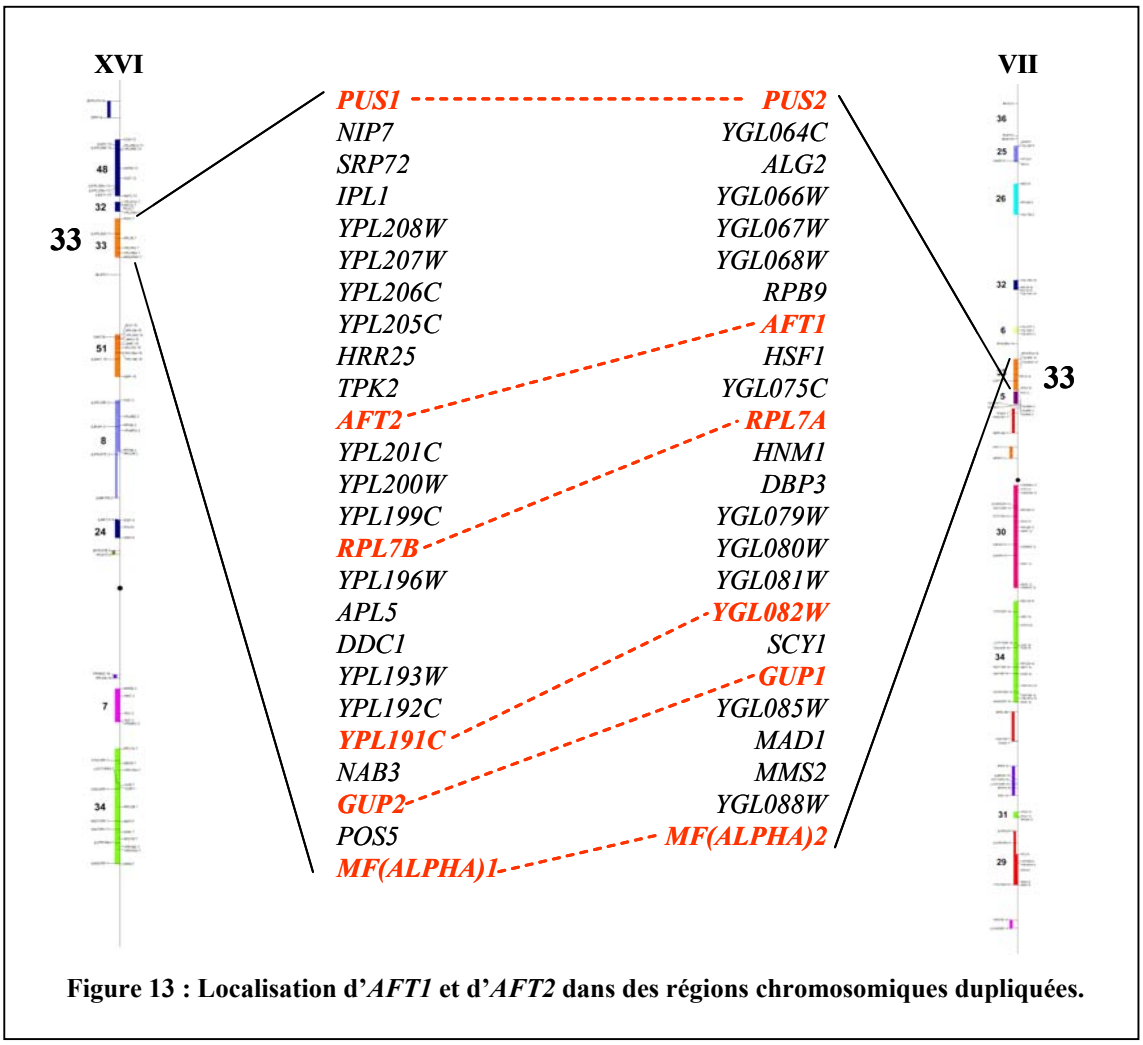

Figure 13 : Localisation d'*AFT1* et d'*AFT2* dans des régions chromosomiques dupliquées.

B-2-b. Organisation fonctionnelle d'Aft1p et d'Aft2p

Aft1p et Aft2p sont des protéines paralogues de respectivement 690 et 416 acides aminés qui présentent une identité de séquence globale de 34% (figure 14-A). C'est le domaine N-terminal qui est le plus conservé entre les deux protéines, avec 47% d'identité entre les acides aminés 1 et 214 d'Aft2p, contre 20% d'identité seulement pour le domaine C-terminal (entre les acides aminés 215 et 416 d'Aft2p) (figure 14-A).

Aft1p et Aft2p présentent des similarités au niveau de leur domaine N-terminal

Le domaine N-terminal d'Aft1p (1 à 313) et d'Aft2p (1 à 214) correspond au domaine de liaison à l'ADN des protéines (Rutherford *et al.*, 2001). Aucun motif connu de liaison à l'ADN n'a pu être identifié dans ces régions, mais elles sont riches en acides aminés basiques, caractéristiques de ce type de domaine. Alors que le point isoélectrique de la protéine Aft1p est de 6,9, celui de la région N-terminale est de 8,9, et il atteint 10,6 entre les acides aminés 140 et 280 (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995). De la même manière, le point isoélectrique d'Aft2p est de 8,9, celui du domaine de liaison à l'ADN est de 9,7 et peut atteindre 10 lorsque l'on considère les acides aminés correspondant à la portion 140-280 d'Aft1p (soit les acides aminés 84 à 175). Les régions N-terminales homologues des deux facteurs de transcription sont par ailleurs séparées par une région qui n'est présente que chez Aft1p, qui contient elle même de nombreux acides aminés basiques. La région N-terminale contient par ailleurs 4 résidus cystéines qui sont conservés entre les deux protéines, résidus qui pourraient être des ligands potentiels du fer (figure 14). L'un de ces résidus, 291 chez Aft1p et 187 chez Aft2p, est d'ailleurs à l'origine, lorsqu'il est muté, des allèles constitutivement actifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up* (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Rutherford *et al.*, 2001). Un autre résidu cystéine conservé, 293 chez Aft1p et 189 chez Aft2p, donne également lieu à des allèles constitutifs lorsqu'il est muté, mais ces données n'ont pas été publiées.

Les séquences NLS retrouvées dans la partie N-terminale d'Aft2p ne sont pas très conservées (figure 14). En revanche, la séquence NES est présente chez les deux protéines, suggérant que l'export d'Aft1p et d'Aft2p pourrait être soumis à une régulation similaire.

Le fort degré d'identité entre les domaines N-terminaux de liaison à l'ADN des deux protéines Aft1p et Aft2p est une caractéristique générale retrouvée chez la plupart des facteurs de transcription paralogues caractérisés de *S. cerevisiae* (Bossier *et al.*, 1993, Butler et Thiele, 1991, Delaveau *et al.*, 1994, Lucau-Danila *et al.*, 2003). Une telle similitude suggère que ces deux facteurs de transcription pourraient jouer un rôle, du moins partiellement, redondant dans la régulation de l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae*.

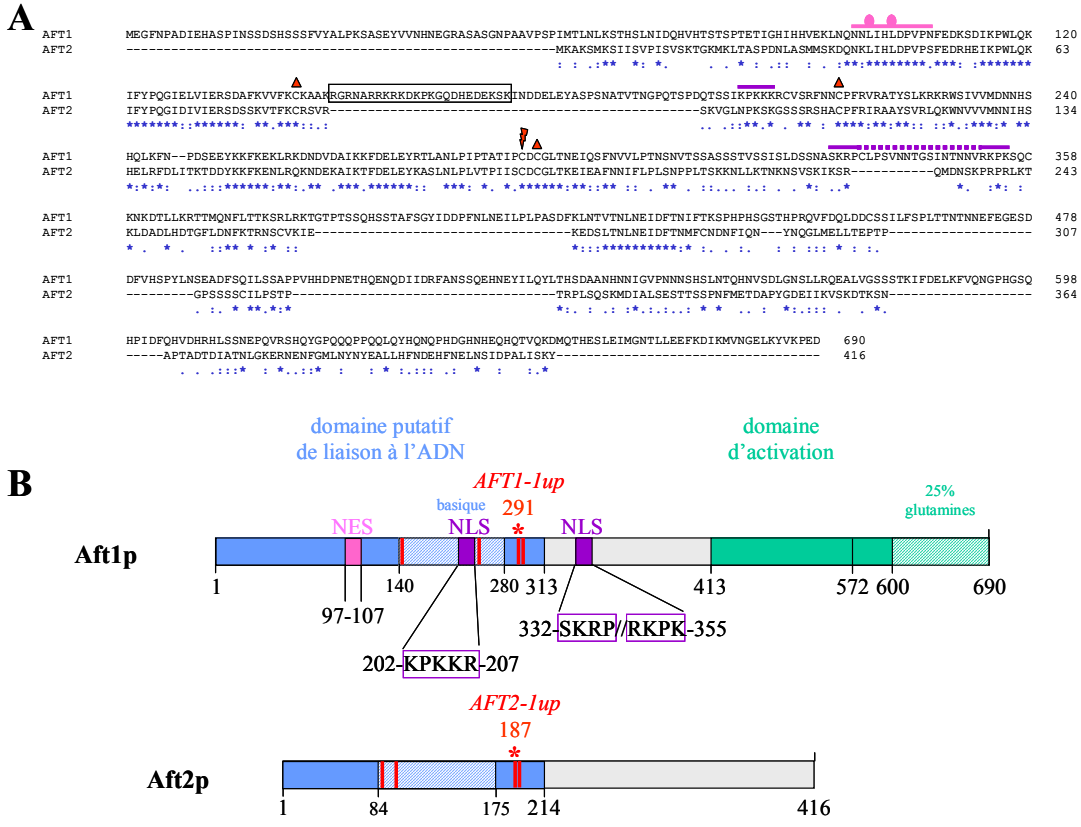

Figure 14 : Alignements des séquences protéiques d'Aft1p et d'Aft2p. A, alignement protéique généré par ClustalW. Les acides aminés identiques (*) ou similaires (: et .) entre les deux protéines sont indiqués. Les quatre résidus cystéine conservés sont indiqués en rouge, le résidu cystéine impliqué dans la génération d'allèles constitutifs représenté par un éclair. La région N-terminale basique d'Aft1p absente chez Aft2p est encadrée. Les NLS et le NES d'Aft1p sont indiqués par les traits dont le code couleur est identique à celui de la représentation schématique d'Aft1p et d'Aft2p présentée en B. Les deux résidus leucine du NES sont indiqués par une boule.

Le domaine C-terminal est beaucoup moins bien conservé entre les deux protéines

Le domaine C-terminal d'Aft1p est riche en acides aminés glutamines (25% entre les acides aminés 600 et 660, figure 14), qui sont retrouvés dans les domaines transactivateurs de nombreux activateurs transcriptionnels (Mitchell et Tjian, 1989). Bien que le principal domaine de transactivation d'Aft1p ait été localisé entre les résidus 413 et 572 (Ueta *et al.*, 2003), région qui ne contient que 5% de résidus glutamine, la fonction transactivatrice d'Aft1p est beaucoup plus élevée lorsque la totalité du domaine C-terminal est utilisée (Ueta *et al.*, 2003). Aft2p quant à lui ne possède pas ces domaines riches en résidus glutamine. Il possède néanmoins, comme Aft1p, une activité de transactivation (Blaiseau *et al.*, 2001), mais le domaine de transactivation n'a pas encore été caractérisé. L'activité de transactivation

d'Aft2p est deux fois plus faible que l'activité transactivatrice d'Aft1p, et est de plus diminuée d'un facteur 2 par l'ajout de 100µM de fer dans le milieu (Blaiseau *et al.*, 2001).

Deux domaines riches en résidus histidine, potentiellement impliqué dans la liaison de métaux, ont également été identifiés chez Aft1p, à la fois dans les régions N- et C-terminales (résidus 1 à 100 et 500 à 690 respectivement ; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995). Ces résidus histidine sont absents dans la protéine Aft2p.

B-2-c. Aft1p et Aft2p se fixent sur la même séquence in vitro

Des études de retard sur gel menées avec les régions 1 à 313 d'Aft1p et 1 à 214 d'Aft2p contenues dans un extrait protéique de *E. coli* et incubées avec une séquence de 30 pb du gène *FET3* possédant le consensus 5'-TGCACCC-3', ont montré que ces formes tronquées d'Aft1p ou d'Aft2p forment un complexe spécifique avec cette séquence d'ADN, démontrant ainsi qu'Aft2p est capable de reconnaître *in vitro* une séquence identique à celle reconnue par Aft1p (Rutherford *et al.*, 2001). Les études *in vitro* de la fixation d'Aft2p n'ont pas été poursuivies, et aucune autre donnée n'est disponible concernant la spécificité de liaison d'Aft2p ou l'affinité d'Aft2p pour la séquence 5'-TGCACCC-3' du promoteur de *FET3*. De la même manière, aucune donnée d'interaction directe *in vivo* de la protéine Aft2p avec des régions promotrices des gènes du métabolisme du fer n'était disponible avant ce jour.

B-2-d. Les mutants AFT1-1up et AFT2-1up

Comme je l'ai mentionné précédemment, Aft1p et Aft2p possèdent au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN 4 résidus cystéine conservés, et le changement de l'un d'eux (291 pour Aft1p et 187 pour Aft2p) en résidu phénylalanine entraîne une activité constitutive, indépendante du fer, de ces deux facteurs de transcription.

La mutation *AFT1-1up*

La mutation *AFT1-1up* provoque une localisation permanente d'Aft1p dans le noyau (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002), une fixation constitutive de la protéine sur les promoteurs des gènes du métabolisme du fer (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995), et par conséquent une activation constitutive de la transcription de ces gènes (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Yamaguchi-Iwai *et*

al., 1996). Par ailleurs, en condition de carence en fer, la mutation *AFT1-1up* confère un niveau d'expression des gènes *FET3*, *FTR1*, *FRE1*, *FRE2* et *FTH1* supérieur au niveau d'expression observé dans une souche sauvage dans la même condition (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Le mutant *AFT1-1up*, dont le métabolisme du fer n'est donc plus contrôlé, se révèle être ainsi un bon modèle génétique pour étudier les mécanismes de réponse à la toxicité du fer exogène (Philpott *et al.*, 1998). Il est en général délicat d'évaluer les effets toxiques du fer exogène dans une levure sauvage, celui-ci étant majoritairement sous une forme oxydée Fe(III) non réactive. Une souche de levure présente ainsi une sensibilité au fer fourni sous forme de fer ammonium sulfate Fe(II) lorsque sa concentration extracellulaire atteint 20mM (Wisnicka *et al.*, 1997). Il est possible de réduire la quantité de fer ajoutée pour voir un effet toxique en utilisant un mélange de ferrozine (chélateur de fer) et de fer ammonium sulfate, qui permet de « garder » le fer en solution sous forme Fe(II). Dans la condition de milieu 1,25mM de ferrozine + 500µM de fer ammonium sulfate, une souche sauvage présente un léger retard de croissance par rapport à un milieu classique alors que le mutant *AFT1-1up* est incapable de croître dans cette condition (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995). Il a été montré qu'en réponse à une concentration toxique de fer (1mM de ferrozine + 500µM de fer ammonium sulfate), les cellules *AFT1-1up* stoppent leur cycle cellulaire à la fin de la phase G1, au niveau du point « Start », point de contrôle de l'entrée des cellules en phase S de réplication (Philpott *et al.*, 1998). Cet arrêt est imputable à l'absence de traduction des ARNm des cyclines Cln1p et Cln2p. La réponse cellulaire à la toxicité du fer pourrait donc se traduire par un arrêt des cellules avant le point « Start » du à l'absence des cyclines Cln1p et Cln2p (Philpott *et al.*, 1998). De la même manière, la surexpression de la protéine Aft1p sauvage provoque un arrêt des cellules en phase G1, et ce, quelle que soit la quantité de fer dans le milieu (Casas *et al.*, 1997). Le mécanisme par lequel le fer ralentit la traduction des transcrits *CLN1* et *CLN2* n'est pas encore connu à ce jour, mais il est intéressant de noter que le gène *AFT1* a été isolé pour la première fois comme un gène dont le produit semblait impliqué dans la régulation de la taille des cellules avant le passage du point « Start », et il avait alors été nommé *RCS1* (pour Regulation of Cell Size) (Gil *et al.*, 1991). Le mutant *rcs1* s'est avéré correspondre à une forme tronquée de la protéine Aft1p, ne comprenant que les 440 premiers acides aminés (Casas *et al.*, 1997), et de manière intéressante, cette forme tronquée conduit effectivement à un défaut de la taille des cellules, alors que la délétion complète de ce gène ne la modifie pas (Casas *et al.*, 1997). L'ensemble

de ces données indiquent qu'il existe une corrélation complexe entre le rôle d'Aft1p dans la régulation du métabolisme du fer et la progression du cycle cellulaire.

La mutation *AFT1-1up* est par ailleurs semi-dominante (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995). Ainsi, lorsque la croissance des souches contenant le système rapporteur *FRE1-HIS3* est observée sur un milieu dépourvu d'histidine et en présence de fer dans le milieu, un diploïde hétérozygote *AFT1-1up*/*AFT1* présente un retard de croissance par rapport à un haploïde *AFT1-1up* (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995).

La mutation *AFT2-1up*

Contrairement au mutant *AFT1-1up*, peu de données existent concernant le mutant *AFT2-1up*. Ce mutant n'a pas été isolé lors de cribles génétiques, mais construit pour reproduire la mutation analogue à la mutation entraînant une activation constitutive du facteur de transcription Aft1p (Rutherford *et al.*, 2001). Rien n'est connu quant aux phénotypes de ce mutant, et aucune donnée n'existe quant à la toxicité de cet allèle en condition d'excès de fer dans le milieu. L'expression de l'allèle *AFT2-1up* (sur un plasmide monocopie et sous le contrôle de son propre promoteur) dans une souche *Δaft1* permet de restaurer de moitié l'activité de transport de Fe(II) de cette souche, et restaure aussi partiellement son incapacité à croître sur un milieu respirable (Rutherford *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été montré que la mutation *AFT2-1up* active de manière constitutive la transcription du gène *FIT3* (Rutherford *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2003).

B-3. Le rôle cellulaire d'Aft2p au sein de la cellule n'est pas encore bien caractérisé

B-3-a. Etude des phénotypes des mutants Δaft2

Afin de caractériser le rôle du facteur de transcription Aft2p au sein de la cellule, des études phénotypiques des souches délétées du gène *AFT2* ont été réalisées. La simple délétion du gène *AFT2* ne présente pas de phénotypes particuliers : le mutant *Δaft2* se comporte comme une souche sauvage sur un milieu dépourvu de fer, il est également parfaitement capable de croître sur un milieu respirable contenant comme source de carbone du glycérol ou

du raffinose, et ne présente pas de sensibilité au peroxyde d'hydrogène (Rutherford *et al.*, 2001, Blaiseau *et al.*, 2001). En revanche, la délétion du gène *AFT2* associée à la délétion du gène *AFT1* exacerbe les phénotypes connus de la souche *Δaft1*. Une souche double mutante *Δaft1Δaft2* est ainsi incapable de croître sur un milieu dépourvu de fer alors que le mutant *Δaft1* présente seulement un retard de croissance sur ce milieu (Blaiseau *et al.,* 2001, Rutherford *et al.*, 2001). Elle présente même un retard de croissance prononcé sur un milieu complet classique, retard qui peut être partiellement supprimé soit par une préculture de la souche double mutante en présence de fer ou par l'ajout de fer directement dans le milieu complet. Une restauration complète de la croissance de la souche double mutante sur un milieu complet peut être obtenue en combinant les deux conditions, préculture avec du fer et croissance en présence de fer dans le milieu, ou bien en plaçant les cellules en condition anaérobie (Rutherford *et al.*, 2001). Une souche double mutante est également hypersensible au peroxyde d'hydrogène (Blaiseau *et al.*, 2001). L'ensemble des phénotypes observés à la fois chez les mutants *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* (sur milieu carencé en fer, sur une source de carbone respirable, en présence de peroxyde d'hydrogène) peuvent être supprimés par la surexpression d'*AFT2* (Blaiseau *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2001).

La souche *Δaft1Δaft2* possède par ailleurs plusieurs phénotypes associés au stress oxydant qui ne sont pas observés chez la souche *Δaft1*, et qui rappellent certains phénotypes observés chez une souche *Δsod1* (Culotta *et al.*, 1995, Slekar *et al.*, 1996). La souche *Δaft1Δaft2* est hypersensible au cuivre et auxotrophe pour la lysine et la méthionine (Blaiseau *et al.*, 2001). Ces phénotypes peuvent être partiellement restaurés par l'ajout de 100µM de fer dans le milieu, ou bien totalement abolis en condition anaérobie (Blaiseau *et al.*, 2001). L'origine de ces phénotypes chez la souche *Δaft1Δaft2* n'est pas encore connue, mais suggère un rôle d'Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer qui pourrait être en relation avec la défense de la cellule contre les effets délétères de ce métal.

B-3-b. Aft2p est un facteur de transcription qui régule des gènes cibles d'Aft1p dans des conditions particulières

L'absence d'Aft2p n'a pas de conséquences sur la transcription fer-dépendante des gènes du « régulon fer » (Blaiseau *et al.*, 2001, Puig *et al.*, 2005). En revanche, la délétion d'*AFT2* dans une souche *Δaft1* permet d'abolir totalement la transcription des gènes *FET3* et *CTH2* en condition de carence en fer (Blaiseau *et al.*, 2001, Puig *et al.*, 2005). Par ailleurs, la

surexpression d'*AFT2* dans un contexte *Δaft1Δaft2* permet d'activer modérément, mais de manière fer-dépendante, la transcription du gène *FET3* (Blaiseau *et al.*, 2001). La région promotrice de 30pb de *FET3* contenant la séquence consensus reconnue par Aft1p (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996) est suffisante pour médier cette activation (Blaiseau *et al.*, 2001).

Le rôle d'Aft2p dans la régulation des gènes du « régulon fer » reste cependant assez flou. Comme mentionné ci-dessus, l'activité d'Aft2p ne peut être détectée qu'en absence d'Aft1p, et seulement sur certains gènes tels que *FET3* et *CTH2*. Cette activité reste modérée pour la transcription de *FET3* en condition de carence en fer générée par l'utilisation d'un milieu dépourvu de fer (Blaiseau *et al.*, 2001). Elle apparaît jouer un rôle plus important dans la transcription du gène *CTH2* en condition de carence en fer générée par l'ajout du chélateur ferrozine (Puig *et al.*, 2005). Une forte transcription de *FIT3* dépendante d'Aft2p, en contexte *Δaft1*, a également été observée en condition de carence en fer générée par l'ajout du chélateur BPS (Rutherford *et al.*, 2001). Il semblerait par ailleurs que l'activité d'Aft2p soit, comme celle d'Aft1p, stimulée par un signal provenant de la biosynthèse des centres [Fe-S] mitochondriaux, mais avec une cinétique plus lente (Rutherford *et al.*, 2005).

B-3-c. L'analyse des mutants constitutifs AFT1-1up et AFT2-1up a permis de définir des gènes cibles pour Aft1p et Aft2p

L'ensemble des données moléculaires et phénotypiques obtenues concernant les facteurs de transcription paralogues Aft1p et Aft2p suggèrent qu'ils ont un rôle partiellement redondant dans la régulation du métabolisme du fer, rôle qui n'est pas encore complètement caractérisé. Dans le but de définir l'ensemble des gènes cibles d'Aft1p et d'Aft2p et de mieux comprendre le rôle de chacun des deux facteurs de transcription, des analyses globales de transcriptome ont été effectuées. Ces analyses globales de transcriptome ont été réalisées avec les mutants *AFT1-1up* et *AFT2-1up* dans un milieu minimum classique, contenant du fer, en partant du principe que les gènes cibles de chacun de ces facteurs de transcription seraient activés dans les mutants constitutifs dans ces conditions. Au total, 4 types d'analyses ont ainsi été effectués. La première consiste en l'identification des gènes cibles d'Aft1p en comparant l'expression des gènes d'une souche *AFT1-1up* avec une souche sauvage ou *Δaft1* ; conditions dans lesquelles le gène *AFT2* est présent (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004). Parallèlement, ces mêmes auteurs ont analysé et comparé la transcription des gènes en fonction de la quantité de

fer extracellulaire, en utilisant le chélateur de fer ferrozine à 1mM additionné de différentes quantités de fer ammonium sulfate (20, 100 et 500µM). Une seconde analyse globale menée par Rutherford et collaborateurs avait pour objectif d'identifier les gènes cibles d'Aft2p (Rutherford *et al.*, 2001). Dans cette analyse, les auteurs ont comparé la transcription des gènes dans une souche *AFT2-1up* par rapport à une souche *Δaft2* ; conditions dans lesquelles le gène *AFT1* est présent. Enfin, les deux dernières analyses globales qui ont été réalisées avaient pour but de comparer les gènes cibles d'Aft1p et d'Aft2p, en analysant les transcrits des gènes dans les souches *AFT1-1up* ou *AFT2-1up* par rapport à une souche double mutante *Δaft1Δaft2* (Rutherford *et al.*, 2003). Dans ces conditions, l'activité d'*AFT1-1up* ou d'*AFT2-1up* est révélée en absence du facteur de transcription paralogue.

La figure 15 représente de manière qualitative l'ensemble des données obtenues avec ces analyses. Il existe ainsi 52 gènes dont la transcription est augmentée par l'expression des formes constitutives *AFT1-1up* ou *AFT2-1up*. Parmi ces gènes, seule la moitié d'entre eux (24) est connue pour faire partie du « régulon fer ». De manière surprenante, *FRE4* codant une ferriréductase membranaire, n'a pas été identifié lors des expériences d'analyses globales, bien qu'il soit par ailleurs connu comme étant régulé, *via* Aft1p, par la quantité de fer dans le milieu (Georgatsou et Alexandraki, 1999).

Sur les 52 gènes identifiés, 17 voient leur transcription augmentée seulement par *AFT1-1up*, et 12 d'entre eux sont également régulés par le fer, ce qui est en accord avec un rôle d'Aft1p dans la régulation des gènes du « régulon fer » (figure 15). Seuls 11 gènes sont activés par *AFT1-1up* en présence d'Aft2p, ce qui souligne une influence partielle d'Aft2p sur l'action d'*AFT1-1up*. Cette influence semble être négative, puisque *AFT1-1up* active la transcription d'un plus grand nombre de gènes (14) en absence d'Aft2p (figure 15).

Sur les 52 gènes identifiés, 22 voient leur transcription augmentée seulement par *AFT2-1up*, mais seuls *FET5* et *ISU1* font partie du « régulon fer » (figure 15). Ce résultat suggère un rôle pour ce facteur de transcription possiblement plus large que celui de réguler la transcription des gènes du « régulon fer ». Par ailleurs, seule la transcription de 4 de ces gènes est indépendante de la présence/absence d'Aft1p, ce qui souligne l'importance du contexte génétique d'*AFT1* pour étudier le rôle d'Aft2p au sein de la cellule. L'influence d'Aft1p sur l'action d'*AFT2-1up* est cependant difficile à définir, puisqu'un nombre de gènes similaire est activé par *AFT2-1up* en présence (10) ou en absence (8) d'Aft1p.

Enfin, 12 gènes sont à la fois activés par *AFT1-1up* et *AFT2-1up*, et 9 d'entre eux font partie du « régulon fer » (figure 15). Ce résultat indique un rôle partiellement redondant pour Aft1p et Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer.

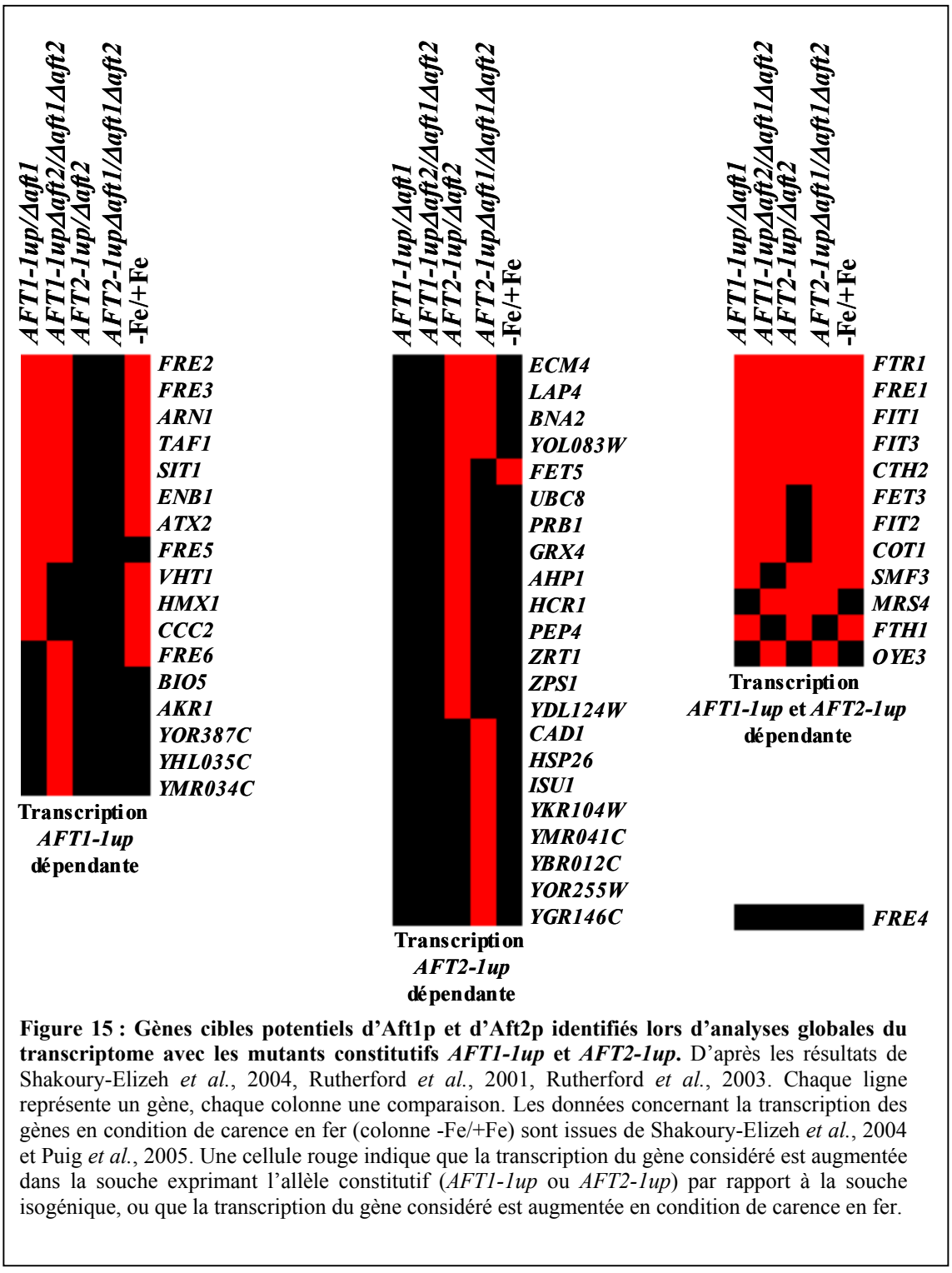

Figure 15 : Gènes cibles potentiels d'Aft1p et d'Aft2p identifiés lors d'analyses globales du transcriptome avec les mutants constitutifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up*. D'après les résultats de Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004, Rutherford *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2003. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. Les données concernant la transcription des gènes en condition de carence en fer (colonne -Fe/+Fe) sont issues de Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004 et Puig *et al.*, 2005. Une cellule rouge indique que la transcription du gène considéré est augmentée dans la souche exprimant l'allèle constitutif (*AFT1-1up* ou *AFT2-1up*) par rapport à la souche isogénique, ou que la transcription du gène considéré est augmentée en condition de carence en fer.

Ces analyses de transcriptome représentent une base de données précieuse pour comprendre et analyser le rôle d'Aft1p et d'Aft2p dans la cellule car elles ont permis d'identifier de nombreux gènes cibles potentiels d'Aft2p (Rutherford *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2003, Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004, et figure 16). Ces analyses ont cependant été réalisées avec les mutants constitutifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up*, et le rôle de chacun de ces facteurs de transcription en réponse à la carence en fer dans le milieu ne peut être étudié avec ces mutants dont l'activité est indépendante de la quantité de fer dans le milieu. Très peu d'études ont d'ailleurs été réalisées en utilisant les allèles sauvages *AFT1* et *AFT2* en condition de carence en fer. Les données de transcriptome obtenues sont en accord avec un rôle partiellement redondant de ces deux facteurs de transcription, mais elles ne permettent pas de savoir si le fonctionnement d'Aft1p et d'Aft2p peut être coordonné au sein de la cellule. L'ensemble des données sur la régulation des gènes cibles d'Aft1p et d'Aft2p, bien qu'ouvrant des pistes pour comprendre la réponse cellulaire à la carence en fer, ne permettent donc pas encore à ce jour d'établir clairement les rôles respectifs d'Aft1p et d'Aft2p dans cette réponse.

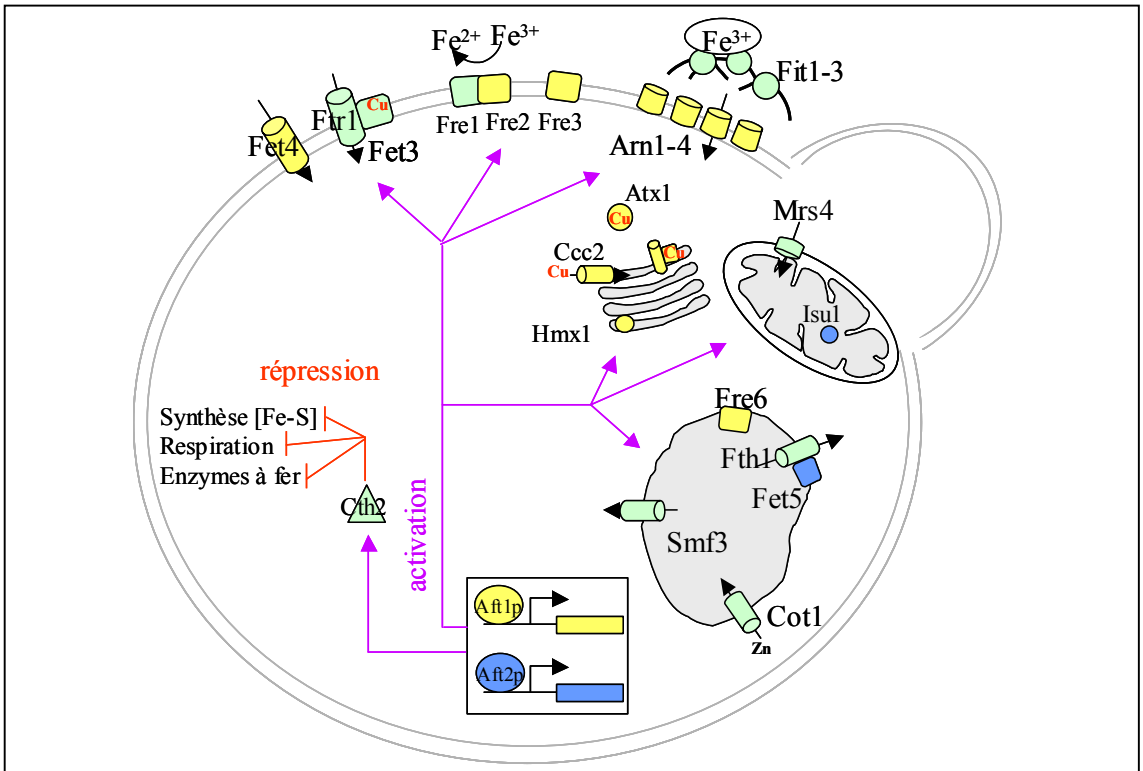

Figure 16 : Schéma de régulation du métabolisme du fer par Aft1p et Aft2p. Les gènes dont la transcription est activée par *AFT1-1up* sont en jaune, ceux dont la transcription est activée par *AFT2-1up* sont en bleu, ceux dont la transcription est activée par *AFT1-1up* et *AFT2-1up* sont en vert.

B-4. Problématiques abordées au cours de la thèse

Lorsque j'ai initié mon travail de thèse, le gène *AFT2* venait d'être identifié comme un facteur de transcription impliqué, avec Aft1p, dans la régulation du métabolisme du fer chez *S. cerevisiae* (Blaiseau *et al.*, 2001). Les gènes régulés par ce facteur de transcription n'étaient pas encore identifiés, et seule la transcription fer-dépendante de *FET3* médiée par la surexpression d'Aft2p dans un contexte *aft1aft2* avait été caractérisée (Blaiseau *et al.*, 2001).

Comprendre et définir le rôle d'Aft2p au sein de la cellule a donc été l'objectif principal de ce travail de thèse. Afin de caractériser le rôle d'Aft2p au sein de la cellule, nous avons entrepris la recherche des gènes cibles de ce facteur de transcription en réalisant des analyses globales de transcriptome. Nous avons pour cela choisi de comparer les profils d'expression de souches sauvage et déficientes pour Aft1p et/ou Aft2p cultivées dans un milieu dépourvu de fer. Nous avons ainsi pu étudier les conséquences de l'absence de l'un ou l'autre des facteurs de transcription, dans un contexte aussi bien sauvage que mutant pour le paralogue restant. Nous avons également pu étudier les conséquences de l'absence combinée d'Aft1p et d'Aft2p.

La comparaison des effets de la délétion d'un de ces facteurs de transcription sur le paralogue restant nous a par ailleurs permis de mettre en évidence l'existence d'une régulation fer-dépendante de la quantité des protéines Aft1p et Aft2p, qui semble s'exercer à un niveau différent selon le paralogue étudié.

Afin de distinguer les effets directs médiés par Aft1p et Aft2p sur la transcription des gènes des effets indirects liés à la réponse cellulaire générale, nous avons choisi d'utiliser la technique d'immunoprécipitation de la chromatine. Cette technique permet de mesurer la quantité de protéine d'intérêt fixée sur une région d'ADN donnée. Nous avons ainsi pu déterminer dans quelles conditions et sur quels promoteurs les protéines Aft1p et Aft2p sont recrutées *in vivo*. Combinée aux analyses globales de transcriptome et à des analyses de Northern blot, cette technique nous a permis de préciser davantage les rôles respectifs d'Aft1p et d'Aft2p dans la réponse à la carence en fer, et de proposer de nouveaux gènes cibles pour ces régulateurs.

RESULTATS

Chapitre I :
Etude des rôles respectifs d'Aft1p et d'Aft2p dans le métabolisme du fer

A. Article 1 : Aft2p régule l'homéostasie intracellulaire du fer en absence d'Aft1p

A-1. Préambule à l'article 1

Des études phénotypiques et moléculaires ont mis en évidence un rôle partiellement redondant des deux facteurs de transcription Aft1p et Aft2p dans la régulation de l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae*.

Les analyses phénotypiques réalisées avec les mutants « perte de fonction » mettent en évidence un rôle joué par Aft2p dans la réponse à la carence en fer. Sur un milieu carencé en fer, la délétion seule d'*AFT2* n'engendre pas de retard de croissance du mutant. En revanche, elle exacerbe le retard de croissance qui est observé pour une souche délétée du gène *AFT1* (Blaiseau *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2001). Ces observations suggèrent que le rôle d'Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer est important lorsqu'Aft1p est absent, et qu'il existe donc des relations fonctionnelles étroites entre les deux facteurs de transcription.

Des expériences de retard sur gel avec des extraits protéiques bruts d'*E. coli* contenant les domaines de liaisons à l'ADN d'Aft1p et d'Aft2p ont montré qu'Aft2p était capable de se fixer *in vitro* sur la séquence consensus reconnue par Aft1p, 5'-TGCACCC-3' (Rutherford *et al.*, 2003). Les facteurs de transcription paralogues étudiés chez la levure présentent tous la caractéristique de reconnaître une même séquence *in vitro* : c'est le cas par exemple de Yap1p/Cad1p (Fernandes *et al.*, 1997), Ace2p/Swi5p (Dohrmann *et al.*, 1996), Msn2p/Msn4p (Martinez-Pastor *et al.*, 1996) ou Upc2p/Ecm22p (Vik et Rine, 2001). Pourtant, les analyses *in vivo* de ces paires de facteurs de transcription tendent à montrer qu'ils n'activent pas tout à

fait la transcription des mêmes groupes de gènes (Cohen *et al.*, 2002, Doolin *et al.*, 2001, Schmitt et McEntee, 1996).

Les allèles constitutifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up* qui sont actifs quelle que soit la quantité de fer dans le milieu, ont été utilisés pour réaliser des analyses globales de transcriptome. Ceci a permis d'identifier les gènes respectivement activés par *AFT1-1up* et par *AFT2-1up* (Rutherford *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2003, Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004). Ces deux ensembles de gènes ne sont qu'en partie chevauchants. L'utilisation de mutants « gain de fonction » ne permet pas d'étudier le rôle de chacun de ces facteurs de transcription en fonction des conditions de carence en fer des cellules. Ce paramètre pourrait être en effet important pour l'organisation et la hiérarchisation de la réponse à la carence en fer d'Aft1p et d'Aft2p. Les résultats sont en accord avec un rôle partiellement redondant de ces deux facteurs de transcription, mais ils ne permettent pas de définir si le fonctionnement d'Aft1p et d'Aft2p peut être coordonné au sein de la cellule.

Nous avons donc cherché à définir plus précisément les rôles respectifs d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer au sein de la cellule. Pour cela, nous avons analysé en détail l'implication directe d'Aft1p et d'Aft2p dans la transcription des gènes du « régulon fer » *in vivo*. Nous avons ainsi pu évaluer leur action en fonction de la présence ou de l'absence du paralogue, et dans des conditions de carence ou de présence de fer dans le milieu. Cette analyse détaillée des mécanismes d'activation directe par Aft1p et/ou Aft2p des gènes impliqués dans le métabolisme du fer a fait l'objet d'une publication, acceptée dans Molecular and Cellular Biology.

A-2. Résumé de l'article 1

A-2-a. Aft1p inhibe l'expression des gènes du régulon Aft2p (figure 1)

Les 50 gènes décrits comme étant activés par *AFT1-1up* et/ou *AFT2-1up* (Rutherford *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2003, Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004) ont été regroupés en fonction de leur profil transcriptionnel en condition de carence en fer chez les mutants délétés des gènes *AFT1* et/ou *AFT2*. Nous avons utilisé les trois comparaisons sauvage/*aft1*, sauvage/*aft1aft2* et *aft1/aft1aft2*, qui mettent respectivement en évidence l'effet de la délétion d'*AFT1*, l'effet de la délétion combinée d'*AFT1* et d'*AFT2*, et l'effet de la délétion d'*AFT2*.

Nous avons ainsi identifié 5 groupes de gènes qui reflètent des actions respectives d'Aft1p et d'Aft2p au sein de la cellule. Le groupe A contient des gènes cibles potentiels d'Aft1p. Le groupe B contient des gènes pour lesquels Aft1p et Aft2p semblent jouer un rôle redondant. Les groupes C et D contiennent les gènes cibles potentiels d'Aft2p. Le groupe E contient des gènes dont la transcription semble indépendante d'Aft1p ou d'Aft2p. La transcription des gènes des groupes C et D est augmentée en absence d'Aft1p, augmentation qui dépend de la présence d'Aft2p. L'activation transcriptionnelle par Aft2p est donc dépendante de la présence/absence d'Aft1p.

A-2-b. Aft2p n'active pas la transcription de FET3 (figure 3)

Le gène *FET3* fait partie des gènes cibles d'Aft1p. La transcription de ce gène en condition de carence en fer est totalement abolie dans les souches délétées d'*AFT1*, mais elle peut être partiellement restaurée par la surexpression d'*AFT2*. Nous avons montré que seul Aft1p est fortement recruté (facteur 20,4) sur le promoteur de *FET3* en condition de carence en fer. Nos résultats indiquent également que la fixation d'Aft1p sur ce promoteur est diminuée en présence de 100µM de fer dans le milieu, ce qui est en accord avec la diminution de transcription de *FET3* dans cette condition. Aft2p ne se fixe que légèrement sur le promoteur de *FET3* (facteur 2,8), et la transcription de ce gène n'est pas diminuée en absence d'Aft2p. Au contraire, la transcription de *FET3* est 1,5 fois augmentée dans un contexte *Δaft2* par rapport à un contexte sauvage. Ce résultat est concordant avec un recrutement d'Aft1p sur le promoteur 1,3 fois plus important dans le contexte *Δaft2* par rapport au contexte sauvage. Le gène *FET3* est donc une cible directe d'Aft1p, mais pas d'Aft2p.

A-2-c. Aft2p active directement la transcription de FTR1, en absence d'Aft1p (figure 4)

Le gène *FTR1* était connu pour être une cible d'Aft1p (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Nous avons montré que la transcription de *FTR1* n'est abolie qu'en absence des deux facteurs de transcription. Aft1p et Aft2p participent directement à la régulation transcriptionnelle de ce gène, ils sont fortement recrutés sur son promoteur. Aft1p est recruté sur le promoteur de *FTR1* en contexte sauvage, recrutement multiplié par 2 en contexte *Δaft2*. Aft2p est recruté

sur le promoteur de *FTR1* seulement en contexte *Δaft1*. La fixation d'Aft1p est diminuée en présence de 100µM fer, alors que celle d'Aft2p est abolie dans la même condition. L'ensemble de ces résultats est corrélé aux effets transcriptionnels observés. Le gène *FTR1* est donc une cible directe d'Aft1p mais aussi d'Aft2p, Aft2p étant capable de compenser l'absence d'Aft1p. L'activation de *FTR1* par Aft2p semble être plus sensible à la présence de fer dans le milieu que celle d'Aft1p.

A-2-d. Aft1p et Aft2p ont des rôles opposés dans la transcription de SMF3 et MRS4 (figures 5 et 6)

Il a été montré qu'*AFT1-1up* et *AFT2-1up* étaient capables d'activer la transcription de *SMF3* et *MRS4* (Rutherford *et al.*, 2003, Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004).

Nous avons montré que la surexpression d'*AFT1* ou d'*AFT2* dans une souche double mutante permet d'induire fortement la transcription de *SMF3*. Par ailleurs, la transcription de *SMF3* est augmentée en absence d'*AFT1*, et cette augmentation est supprimée par la délétion d'*AFT2*. Elle est également supprimée par la présence de 100µM de fer dans le milieu. Nous avons montré que seul Aft2p est fortement recruté sur le promoteur de *SMF3*, en contexte délété d'*AFT1*, et que cette fixation est abolie en présence de fer, ce qui corrobore les données de transcription de ce gène.

Nous avons montré que la transcription de *MRS4* est fortement augmentée en absence d'*AFT1*, augmentation supprimée à nouveau par la délétion d'*AFT2* ou par la présence de fer. En accord avec ces résultats, nous avons montré que seul Aft2p est recruté sur le promoteur de *MRS4* dans un contexte délété d'*AFT1*. Cette fixation est complètement abolie par la présence de fer 100µM.

Les gènes *SMF3* et *MRS4* sont donc des cibles directes d'Aft2p, activées en absence d'Aft1p, et ne sont pas régulés directement par Aft1p.

A-2-e. Le consensus de fixation pour Aft2p n'est pas 5'-TGCACCC-3' (figures 2 et 7)

Les promoteurs de chaque groupe de gènes ont été analysés pour y trouver des motifs consensus. Alors que la séquence 5'-TGCACCC-3' est identifiée par le logiciel MEME pour les groupes A et B, c'est un consensus plus flou et plus court, 5'-(G/A)CACCC-3', qui est contenu dans les promoteurs des gènes des groupes C et D. La séquence 5'-TGCACCC-3' semble donc être nécessaire pour une activation transcriptionnelle médiée par Aft1p, mais pas par Aft2p (figure 2).

Pour mesurer l'importance de la différence entre les deux séquences consensus 5'-TGCACCC-3' et 5'-(G/A)CACCC-3', la séquence active 5'-G**T**G**CACCC**AT-3' du promoteur de *FET3* a été mutée pour ressembler à la séquence active du promoteur de *SMF3* 5'-CC**GCACCC**TG-3' (figure 7). Dans un contexte sauvage ou *Δaft2* en condition de carence en fer, l'activité β-galactosidase médiée par les formes mutées en 5'ou 3' est diminuée de manière similaire, diminution qui est exacerbée en utilisant la forme mutée 5'/3'. La surexpression d'*AFT1* dans un contexte *Δaft1Δaft2* ne restaure que partiellement l'activité β-galactosidase de chacun des promoteurs mutés, qui reste en moyenne deux fois plus faible que l'activité β-galactosidase du promoteur *FET3* sauvage . Le rôle activateur d'Aft1p est donc fortement réduit par les mutations générées en 5' ou en 3' de la séquence active de *FET3*. L'activité β-galactosidase résiduelle mesurée dans un contexte *Δaft1* et attribuée à Aft2p est quant à elle augmentée d'un facteur 2,3 par la mutation du promoteur en 5', diminuée d'un facteur 1,8 par la mutation du promoteur en 3', et inchangée par la double mutation 5'/3'. La surexpression d'*AFT2* dans un contexte *Δaft1Δaft2* conduit aussi à une activité β-galactosidase 2,5 fois plus forte pour les promoteurs mutés en 5' et en 5'/3', par rapport au promoteur sauvage. Elle est en revanche 1,9 fois diminuée concernant le promoteur muté en 3'. Le rôle activateur dAft2p est donc favorisé essentiellement par la mutation générée en 5' de la séquence active de *FET3*.

A-2-f. Les quantités d'Aft1p et d'Aft2p sont augmentées en absence du paralogue et ce de manière fer-dépendante (figure 8)

Le niveau de fixation d'Aft1p et d'Aft2p sur les promoteurs est dépendant de la présence/absence du paralogue et de la présence/absence de fer. L'analyse de la quantité d'Aft1p en condition de carence en fer révèle qu'elle est 1,5 fois plus importante dans un contexte *Δaft2* par rapport à un contexte sauvage. Dans ce contexte mutant, la quantité d'Aft1p peut être diminuée de moitié en ajoutant du fer dans le milieu. En condition de carence en fer, la quantité d'Aft2p est 3,3 fois plus importante dans un contexte *Δaft1* que dans un contexte sauvage. Dans ce contexte mutant, la quantité d'Aft2p peut également être 1,7 fois diminuée en ajoutant du fer dans le milieu. Le niveau de fixation d'Aft1p et d'Aft2p sur les promoteurs peut donc être en partie corrélé à la quantité de protéines présentes dans les cellules.

A-2-g. Conclusions (figure 9)

Les analyses globales de transcriptome des souches délétées pour *AFT1* et/ou *AFT2* nous ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes de gènes dont l'expression est régulée différemment par Aft1p et Aft2p. L'analyse des séquences consensus des promoteurs de chaque groupe et les expériences de mutagenèse dirigée des séquences en 5' et 3' du consensus de *FET3* ont permis de suggérer qu'Aft1p et Aft2p activent la transcription de leurs gènes cibles *via* des consensus légèrement différents. L'analyse détaillée de l'implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la transcription de gènes appartenant à chacun des groupes nous a permis de montrer que *in vivo*, Aft1p et Aft2p sélectionnent les promoteurs sur lesquels ils se fixent pour activer la transcription de gènes distincts. Nous avons également montré que c'est en absence d'Aft1p qu'Aft2p active spécifiquement la transcription de ses gènes cibles. Cela suggère que l'activation d'Aft2p nécessite des conditions plus drastiques de carence en fer que ne le nécessite Aft1p. Par ailleurs, la fixation sélective d'Aft1p et d'Aft2p sur les promoteurs s'accompagne d'une spécificité fonctionnelle. Aft2p est impliqué dans la régulation des gènes de l'utilisation intracellulaire du fer, localisés dans la mitochondrie ou la vacuole, alors qu'Aft1p est responsable de la régulation des gènes du transport extracellulaire du fer. En réponse à une carence en fer générée par l'absence cumulée de fer et d'Aft1p,

l'activation des gènes de l'utilisation intracellulaire du fer par Aft2p pourrait permettre une réorganisation de la distribution du fer dans la cellule.

La surexpression d'*AFT1* ou d'*AFT2* ainsi que l'expression des allèles constitutifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up* abolit la sélectivité pour les promoteurs des deux facteurs de transcription, ce qui souligne l'importance des quantités respectives de ces facteurs pour la régulation de l'homéostasie du fer au sein de la cellule. Nous avons montré que les quantités d'Aft1p et d'Aft2p sont augmentées en absence du paralogue et régulées par la quantité de fer dans ces contextes mutants. Identifier à quel niveau s'effectue cette régulation pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'homéostasie du fer.

A-3. Article 1

Accepté à Molecular and Cellular Biology.

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Aug. 2005, p. 6760–6771 Vol. 25, No. 15
0270-7306/05/$08.00+0 doi:10.1128/MCB.25.15.6760–6771.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Direct Activation of Genes Involved in Intracellular Iron Use by the Yeast Iron-Responsive Transcription Factor Aft2 without Its Paralog Aft1

Maïté Courel, Sylvie Lallet, Jean-Michel Camadro, and Pierre-Louis Blaiseau*

Laboratoire d'Ingénierie des Protéines et Contrôle Métabolique, Département de Biologie des Génomes, Institut Jacques-Monod, UMR 7592 CNRS-Universités Paris 6 and 7, 2 Place Jussieu, F-75251 Paris cedex 05, France

Received 1 December 2004/Returned for modification 18 January 2005/Accepted 25 April 2005

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains a pair of paralogous iron-responsive transcription activators, Aft1 and Aft2. Aft1 activates the cell surface iron uptake systems in iron depletion, while the role of Aft2 remains poorly understood. This study compares the functions of Aft1 and Aft2 in regulating the transcription of genes involved in iron homeostasis, with reference to the presence/absence of the paralog. Cluster analysis of DNA microarray data identified the classes of genes regulated by Aft1 or Aft2, or both. Aft2 activates the transcription of genes involved in intracellular iron use in the absence of Aft1. Northern blot analyses, combined with chromatin immunoprecipitation experiments on selected genes from each class, demonstrated that Aft2 directly activates the genes *SMF3* and *MRS4* involved in mitochondrial and vacuolar iron homeostasis, while Aft1 does not. Computer analysis found different *cis*-regulatory elements for Aft1 and Aft2, and transcription analysis using variants of the *FET3* promoter indicated that Aft1 is more specific for the canonical iron-responsive element TGCACCC than is Aft2. Finally, the absence of either Aft1 or Aft2 showed an iron-dependent increase in the amount of the remaining paralog. This may provide additional control of cellular iron homeostasis.

Iron is an essential nutrient, but its accumulation can be highly cytotoxic owing to its chemical reactivity, which depends on its redox state (II or III). Prokaryotic and eukaryotic cells have therefore evolved various regulatory mechanisms to control iron homeostasis and to maintain a balance between nutritional deprivation and an excess of iron (12, 13). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two paralogous iron-responsive transcription activators, Aft1 and Aft2, that play key roles in the response to a lack of iron in the environment by increasing the expression of genes involved in iron transport and its subcellular distribution and use (28). The N-terminal regions of Aft1 and Aft2, which contain the DNA binding domain (29, 38), are well conserved (3). These N-terminal regions interact with the same DNA promoter in vitro (29, 38). The replacement of a conserved cysteine residue in the N-terminal region by phenylalanine makes the gain of function mutant alleles *AFT1-1^{up}* (37) and *AFT2-1^{up}* (29) iron independent.

Aft1 is located in the cytosol of cells grown under iron-replete conditions, but in cells grown under iron-depleted conditions, it is in the nucleus, where it binds to DNA and activates transcription (39). Cells lacking *AFT1* grow poorly under iron-depleted conditions (3, 29, 37). Consistent with this phenotype, Aft1 activates the transcription of genes involved in iron uptake at the plasma membrane. These include genes that encode the high-affinity ferrous transport complex composed of the multicopper oxidase (*FET3*) and iron permease (*FTR1*) (1, 34), the copper transporter responsible for delivering copper to Fet3 (*CCC2*) (40), plasma membrane metalloreductases (*FRE1* to *FRE4*) (5, 10, 41), iron-siderophore transporters (*ARN1* to *ARN4*) (17, 18, 42, 43), and cell wall mannoproteins, which facilitate the uptake of siderophore-bound iron (*FIT1* to *FIT3*) (25). Aft1 is also involved in the activation of other genes, such as *FTH1*, which encodes a vacuolar iron transporter (35), and genes with functions not yet elucidated in iron metabolism, such as *HMX1*, the homolog of the gene encoding heme oxygenases (26, 33), two members of the *FRE* family (*FRE5* and *FRE6*) (21), and *CTH2*, a gene recently shown to be involved in mRNA degradation under iron deficiency (27). Others genes were recently shown by DNA microarray analyses to be regulated by the constitutive *AFT1-1^{up}* mutant allele, but the role of Aft1 in their regulation remains to be elucidated (30, 33).

The role of Aft2 is still unclear, unlike that of Aft1. No phenotype is associated with the lack of *AFT2* alone. Consistent with this lack of phenotype, the genes involved in the iron uptake systems are expressed similarly in the wild type and in the *aft2*Δ mutant (3; unpublished results). However, plasmids expressing *AFT2* in the *aft1 aft2* mutant activate the transcription of Aft1 target genes in an iron-regulated manner (3, 29). The deletion of *AFT2* exacerbates the phenotype of the *aft1* mutant, rendering the *aft1 aft2* double mutant unable to grow under iron-depleted conditions, and it abolishes the residual transcription of genes such as *FET3* and *CTH2* that still occurs in the single *aft1* mutant (3, 27). The *aft1 aft2* mutant also has many oxidative stress-related phenotypes that are not present in the *aft1* mutant (3). These results suggested that the roles of Aft2 and Aft1 overlap to some extent.

DNA microarray data have defined a set of genes that is

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'Ingénierie des Protéines et Contrôle Métabolique, Département de Biologie des Génomes, Institut Jacques-Monod, UMR 7592 CNRS-Universités Paris 6 and 7, 2 Place Jussieu, F-75251 Paris cedex 05, France. Phone: 33 1 44 27 47 41. Fax: 33 1 44 27 57 16. E-mail: blaiseau@ijm.jussieu.fr.

TABLE 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains used

Strain	Genotype	Reference or source
CM3260	*MATα trp1-63 leu2-3,112 gcn4-101 his3-309*	37
Y18	*MATα trp1-63 leu2-3,112 gcn4-101 his3-309 aft1*::*TRP1*	37
Y18 *aft2*Δ	*MATα trp1-63 leu2-3,112 gcn4-101 his 3-309 aft1*::*TRP1 aft2*::*kanMX4*	3
BY4741	*MAT***a** *his3*Δ*1 leu2*Δ*0 met15*Δ*0 ura3*Δ*0*	Euroscarf
BY4742	*MATα his3*Δ*1 leu2*Δ*0 lys2*Δ*0 ura3*Δ*0*	Euroscarf
Y01090	*MAT***a** *his3*Δ*1 leu2*Δ*0 met15*Δ*0 ura3*Δ*0 aft2*::*kanMX4*	Euroscarf
Y14438	*MATα his3*Δ*1 leu2*Δ*0 lys2*Δ*0 ura3*Δ*0 aft1*::*kanMX4*	Euroscarf
Y11090	*MATα his3*Δ*1 leu2*Δ*0 lys2*Δ*0 ura3*Δ*0 aft2*::*kanMX4*	Euroscarf
SCMC01	*MATα his3*Δ*1 leu2*Δ*0 lys2*Δ*0 ura3*Δ*0 aft1*::*kanMX4 aft2*::*kanMX4*	This study
SCMC05	*MATα his3*Δ*1 leu2*Δ*0 lys2*Δ*0 ura3*Δ*0 AFT1-3HA*::*HIS3MX6*	This study
SCMC11	*MAT***a** *his3*Δ*1 leu2*Δ*0 met15*Δ*0 ura3*Δ*0 AFT2-3HA*::*HIS3MX6*	This study
SCMC18	*MATα his3*Δ*1 leu2*Δ*0 ura3*Δ*0 AFT2-3HA*::*HIS3MX6*	This study
SCMC13	*MATα his3*Δ*1 leu2*Δ*0 ura3*Δ*0 aft1*::*kanMX4 AFT2-3HA*::*HIS3MX6*	This study
SCMC10	*MATα his3*Δ*1 leu2*Δ*0 ura3*Δ*0 aft2*::*kanMX4 AFT1-3HA*::*HIS3MX6*	This study

activated by the constitutive *AFT2-1*^{up} (29, 30). A few of these genes encode proteins that are involved in iron homeostasis, such as the vacuolar iron transporter *SMF3* (23, 24), the mitochondrial iron transporter *MRS4* (7), and a protein involved in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly, *ISU1* (9, 32). This work was designed to define the involvement of Aft1 and Aft2 in the transcriptional regulation of iron homeostasis in regard to the presence/absence of the paralog. DNA microarray clustering allowed us to identify several classes of genes that are regulated by Aft1 and/or Aft2, and computer analyses highlighted different consensus sequences for each class. A combination of Northern blotting and chromatin immunoprecipitation experiments with the iron-regulated genes *FET3*, *FTR1*, *SMF3*, and *MRS4* demonstrated that the direct transcription activation mediated by either Aft1 or Aft2 is gene specific and iron dependent. Aft2 directly activates the transcription of the iron intracellular use genes *SMF3* and *MRS4*, while Aft1 does not. We show that Aft2 functions in the absence of Aft1. We have also obtained evidence that the amounts of Aft1 and Aft2 are increased in the absence of the paralog and that iron represses the amounts of Aft1 and Aft2 in these genetic contexts.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, plasmids, and growth conditions. All strains used are listed in Table 1. Transcriptome analysis experiments were performed with strains CM3260, Y18, and Y18*aft2*Δ. The strains used for other experiments were derivatives from strains obtained from Research Genetics (Huntsville, AL). The haploid strain SCMC01 (*aft1*Δ *aft2*Δ) was constructed as follows. Y01090 and Y14438 were mated, and the diploid strain was selected on medium lacking lysine and methionine and was made to sporulate. Tetrads were dissected, and spores showing resistance to Geneticin and hypersensitivity to copper were characterized. *AFT1* and *AFT2* deletions were verified by PCR, and the known phenotypes of the Y18*aft2*Δ double mutant strain (3) were confirmed. Strains SCMC05 (*AFT2*, *AFT1-HA*), SCMC11, SCMC18 (*AFT1*, *AFT2-HA*), SCMC10 (*aft2*Δ, *AFT1-HA*), and SCMC13 (*aft1*Δ, *AFT2-HA*) carry three tandem copies of the influenza virus hemagglutinin (HA) epitope at the very carboxy terminus of *AFT1* or *AFT2*. The HA epitope tags for *AFT1* and *AFT2* were amplified from the template pFA6a-3HA-HIS3MX6 as described previously (20), using the following primer sets: *AFT1-3HA*, 5′-AATGGTGAACGGCGAGTTGAAGTA TGTGAAGCCAGAAGATCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3′ and 5′-ATGG ACGAGAGATACGTCTAAGTTTGATTTCATCTATATGGAATTCGAGC TCGTTTAAAC-3′; *AFT2-3HA*, 5′-TGAATTAAATTCTATTGACCCAGCCT TAATATCAAAATATCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3′ and 5′-TTAAAC GTGATACCGTTTTAATGAGTTGAAAACTAAATAAGAATTCGAGCTC GTTTAAAC-3′. The *AFT1-3HA* PCR products were transformed into BY4742 and those of *AFT2-3HA* were transformed into BY4741 to generate strains SCMC05 and SCMC11. Strains SCMC18, SCMC10, and SCMC13 were isolated after mating strains SCMC11 and BY4742, SCMC05 and Y01090, and SCMC11 and Y14438, respectively. Epitope-tagged strains were verified by PCR, sequencing, and protein synthesis. The plasmids pEG202-*AFT1* and pEG202-*AFT2* have been described previously (3). Plasmid pFC-W was kindly provided by Y. Yamaguchi-Iwai; it contains the −263/−234 upstream activation sequence of the *FET3* gene that has been inserted into the *CYC1* promoter and fused to the *lacZ* gene (38). Plasmids pFC-M1, pFC-M2, and pFC-M3, containing site-directed nucleotide substitutions introduced into the *FET3* core sequence (−252/−243) to resemble to the *SMF3* sequence (−362/−353), were constructed as follows. The entire SalI-BamHI fragment from the pFC-W was first subcloned into the pUC-18 vector (Stratagene), and the resulting plasmid was used as a PCR template for the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The primers used were 5′-GGCTCGACCTTCAA AACCGCACCCATTTGCAGGTGC-3′ and its complement for M1 substitutions, 5′-CCTTCAAAAGTGCACCCTGTTGCAGGTGCTCGTCG-3′ and its complement for M2 substitutions, and 5′-GGCTCGACCTTCAAAACCGCAC CCTGTTGC-AGGTGCTCGTCG-3′ and its complement for M3 substitutions. Then the entire SalI-BamHI fragment from the pUC-18 vector was reinserted into the SalI-BamHI sites of the pFC-W vector to obtain the pFC-M1, pFC-M2, and pFC-M3 plasmids. All PCR-generated sequences were confirmed by DNA sequencing.

All yeast transformations were performed by the lithium acetate method. The iron-depleted or iron-replete conditions were created by first growing cells at 30°C in a defined medium consisting of an iron-limiting and copper-limiting yeast nitrogen base (catalog no. 4027-122; Bio101) plus 1 μM ferric ammonium sulfate. These cells (optical density at 600 nm [OD_{600}] = 0.3) were placed in the defined medium with or without 100 μM ferric ammonium sulfate, and the cultures were grown for 5 h to an OD_{600} of 1.0. They were then used for DNA microarray assays, Northern blotting, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments, or β-galactosidase assays.

RNA isolation, Northern analysis, and β-galactosidase assay. Total RNA extraction, Northern blotting (15 μg total RNA), and hybridization were performed in duplicate, as described previously (14, 31). The ^{32}P-labeled DNA fragments used as probes corresponded to the open reading frame of each gene. A 1.2-kb BamHI-HindIII fragment was used for the *ACT1* gene. The 623-bp fragment of *FET3*, the 759-bp fragment of *FTR1*, the 744-bp fragment of *MRS4*, and the 924-bp fragment of *SMF3* were obtained by PCR using the primer sets listed in Table 2. The membranes were exposed for 2 days. Data were quantified using ImageQuant software and normalized using the *ACT1* mRNA signal. β-Galactosidase was assayed using *o*-nitrophenyl-D-galactopyranoside (11).

Microarray hybridization and analysis. RNA extracted from strains grown exponentially in iron-depleted medium was used to hybridize a yeast GeneFilter microarray (Research Genetics, Invitrogen Corporation) according to the manufacturer's instructions, except that 5 μg of total RNA was reverse transcribed. Hybridizations were done in duplicate using two separate sets of filters. Images were acquired after 3 days of exposure using a Storm 860 phosphorimager (Molecular Dynamics) and analyzed with PATHWAYS 3 software (Research Genetics). Those genes previously found to be activated by *AFT1-1*^{up} and/or *AFT2-1*^{up} were selected and subjected to a *k* mean clustering (*k* = 5) (6) (http://rana.stanford.edu/clustering). The JavaTreeView program (http://genome-www.stanford.edu/~alok/TreeView) was used to visualize the clustered data.

TABLE 2. Primer sets for PCR amplifications used in ChIP assays and Northern blots

Assay and gene	Upper primer	Lower primer
ChIP		
Negative controls		
POL1	GCCGCTCGAAATGGTACATC	GCAATTCCTGGCGCTTTCT
RPO21	GTTCGTTGATCGTACCTTACCTCAT	GATAAGACCTTCACGACCACCC
Promoter genes		
FET3	AGTACGCTGAGTCGCCGATAA	CGAGAATAAGAGCACCTGCAAA
FTR1	GTGCGCGAATACTGCTGGT	TTACTGCTGCGACGGTGCT
MRS4	TAACCCACAGGAATCGCTACTTT	GGTGTTCTTGCCTTTCAGTCTTC
SMF3	ACATTGAAGCCACGACAAATGA	ACAGGGTGCGGTTACCATGA
Northern blot (Coding sequences)		
FET3	TTCTTGGACGATTTCTACTT	GCAACTCTGGCAAACTTCTA
FTR1	TCCGTGCTGCTATCGTTTTT	ATCCCACCCATTGTCCAGTT
MRS4	ATGGAGCATTCTTTGATGTT	ATTAGCCACTATCCTTGGTT
SMF3	CTGAAAACTGTCGTCATAAT	AGGACAAGACCACTTGAGA

Multiple expectation maximization for motif elicitation (MEME) (2) was used to identify shared motifs in the 700 bp of the promoters of similarly regulated genes. Additional information and a version of MEME running on a parallel supercomputer are available at http://meme.sdsc.edu/meme/website/intro.html.

Chromatin immunoprecipitation. Cells were grown exponentially in 100 ml iron-depleted or iron-replete medium to an OD_{600} of 1. The chromatin was then prepared (15), and the resulting supernatant volume was adjusted to 4 ml before storage at −80°C. Immunoprecipitations were performed in duplicate. Five hundred microliters of the cross-linked chromatin solution was added to 8 μg of anti-HA monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology) prebound to 10 mg protein A–Sepharose CL-4B (Sigma) and incubated for 1.5 h at room temperature. Protein A–Sepharose CL-4B without antibody was used for background control. Beads were washed twice with 1.6 ml FA lysis buffer (15) with 500 mM NaCl; once with 1.6 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.25 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, and 0.5% sodium deoxycholate; and once with 1.6 ml Tris-EDTA, for 15 min each. Chromatin complexes were released from the beads by incubation in 500 μl of 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, and 0.5% sodium dodecyl sulfate for 15 min at 65°C. Cross-links from eluates and crude chromatin solution (50 μl) were reversed by incubation with 600 μg proteinase K (Sigma) for 1 h at 37°C and overnight at 65°C. The resulting DNA was purified on PCR purification kit columns (QIAGEN).

Real-time quantitative PCR analysis. The QIAGEN Quantitect SYBR Green PCR kit was used for quantitative real-time PCR in a LightCycler (Roche Diagnostics). Primer pairs (Table 2) were designed with Oligo 4.0-s software to generate products of 90 to 130 bp. For the *FET3*, *SMF3*, and *MRS4* promoters, PCR fragments were amplified with primers flanking the iron regulatory sites defined by promoter deletion analyses (23, 30, 38). For the *FTR1* promoter, we designed primers to amplify the region (190 bp) between the two TGCACCC sequences. For *POL1* and *RPO21*, used as negatives controls, we designed primers within their coding sequences.

PCRs were carried out in 15-μl reaction mixtures with 2 μM concentrations of each primer and 1× Quantitect SYBR Green PCR kit. The DNA templates added to the reaction mixture were 1/150 of the immunoprecipitated or background DNA and 1/50,000 of the input DNA. The LightCycler protocol was denaturation at 95°C for 15 min, 45 cycles of amplification and quantification (95°C for 20 s, 55°C for 20 s, 72°C for 25 s, with a single measurement), and a melting curve of 60 to 95°C, with a heating rate of 0.1°C per second and continuous fluorescence measurement.

Data were analyzed using the Roche LightCycler 3.5 software and the fit point method. The crossing point (CP) was defined as the point at which the fluorescence was 10 times the background fluorescence. The efficiency (E) of each primer pair was calculated from the slope of the linear standard curve ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) generated with a fivefold dilution of a DNA input mix. The protein occupancy of each DNA fragment was then calculated as previously described (4): protein occupancy = $E^{(\text{CP input} - \text{CP immunoprecipitation})}/E^{(\text{CP input} - \text{CP background})}$. The data were averaged over two independent experiments, with real-time PCR performed at least in duplicate. The relative enrichment of a selected DNA fragment was obtained by dividing the protein occupancy at this DNA fragment by the average protein occupancy at the negative controls (coding sequences of *POL1* and *RPO21*).

Protein extraction and Western blotting. Total protein extracts from 3 ml of cells grown exponentially in iron-depleted or iron-replete media were prepared by the NaOH-trichloroacetic acid lysis technique (36). Aliquots (5 μl) were separated on an 8% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis gel and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 3% bovine serum albumin (Sigma), 0.1% Tween 20 (Sigma) in Tris-buffered saline and probed at room temperature in the same blocking buffer. Anti-HA monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were diluted at 1:1,000, and anti-Pgk1 monoclonal antibodies (Roche Diagnostics) were diluted at 1:5,000. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin G (diluted 1:1,000) was used as the secondary antibody (Sigma) and was detected by enhanced chemiluminescence (ECL kit; Amersham).

RESULTS

Inhibition of the Aft2 regulon by Aft1. We investigated the effects of Aft1 and Aft2 on gene expression under iron-depleted conditions. Previous studies show that the transcription mediated by wild-type Aft2 can be detected in the absence of Aft1 (3, 29). We therefore examined the effect of Aft2 on gene expression in an *aft1* mutant genetic context. DNA microarray hybridizations were performed with labeled transcripts extracted from the wild-type strain and single *aft1* and double *aft1 aft2* mutant cells grown in iron-depleted conditions. Comparisons of the gene expression in these genetic contexts allowed us to identify 332 genes whose expression decreased more than twofold in at least one of the 3 comparisons, wt/*aft1*, wt/*aft1 aft2*, or *aft1*/*aft1 aft2* (experimental data sets are available at the Gene Expression Omnibus, accession number GSE1763 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/]). To take advantage of both our "loss of function" approach and previous "gain of function" analyses, we combined the experimental data and focused on those 50 genes that were postulated as potential targets of *AFT1-1*^{up} and/or *AFT2-1*^{up} (29, 30, 33). Genes with similar transcription profiles were grouped by cluster analysis into 5 classes (classes A to E) (Fig. 1).

Class A contained those genes whose mRNAs were at least twofold more abundant in the wild type than in either the *aft1* or *aft1 aft2* mutant. Most of these genes had been shown to be Aft1 target genes, encoding proteins involved in the plasma

1: wt/*aft1*
2: wt/*aft1aft2*
3: *aft1*/*aft1aft2*

	1 2 3	Gene name	up regulation	Function	Number of MEME consensus
A		*ARN1*	1up	Iron-siderochrome transporter	1 (-260)
		AHP1	2up	Thioredoxine peroxidase, cell redox homeostasis	0
		FRE1	1up/2up	Metalloreductase, iron/copper transport	0
		ARN4	1up	Iron-siderochrome transporter	2 (-137/-193)
		ZPS1	2up	Putative GPI-anchored protein	0
		FET3	1up/2up	Multicopper oxidase, ferrous iron transport	1 (-251)
		FIT2	1up/2up	Cell wall protein, iron transport	4 (-131/-249/-266/-331)
		YOR387C	1up		0
		FIT3	1up/2up	Cell wall protein, iron transport	1 (-184)
		ARN2	1up	Iron-siderochrome transporter	1 (-447)
		BIO5	1up	Biotin transport	0
		PRB1	2up	Vacuolar proteinase B	2 (-378/-504)
		ARN3	1up	Iron-siderochrome transporter	1 (-188)
B		*FRE2*	1up	Metalloreductase, iron transport	1 (-430)
		CCC2	1up	Copper-transporting P-type ATPase, iron transport	2 (-242/-290)
		CTH2	1up/2up	Zinc finger containing homolog of mammalian *TIS11*	2 (-173/-249)
		ZRT1	2up	High-affinity zinc transporter	0
		FTR1	1up/2up	High affinity iron permease, ferrous iron transport	2 (-175/-365)
		HMX1	1up	Heme oxygenase, iron homeostasis	1 (-451)
C		*ECM4*	2up		1 (-147)
		COT1	1up/2up	Vacuolar cobalt/zinc transporter	1 (-285)
		HSP26	2up	Unfolded protein binding, response to stress	1 (-302)
		LAP4	2up	Vacuolar aminopeptidase I	1 (-137)
		AKR1	1up	Palmitoyltransferase, endocytosis	1 (-163)
		YDL124W	2up		0
		FRE6	1up	Metalloreductase	2 (-141/-168)
		FTH1	1up/2up	Similar to *FTR1*, vacuolar iron transport	1 (-177)
		SMF3	1up/2up	Vacuolar iron transporter	2 (-360/-429)
		PEP4	2up	Vacuolar proteinase A	1 (-368)
D		*CAD1*	2up	Transcriptional activator, response to cadmium	1 (-52)
		MRS4	2up	Mitochondrial carrier protein, iron transport	3 (-192/-237/-270)
		FET5	2up	Similar to *FET3*, vacuolar iron transport	2 (-127/-620)
		BNA2	2up	Tryptophan 2,3-dioxygenase, NAD biosynthesis	1 (-342)
		YOL083W	2up		1 (-190)
		FIT1	1up/2up	Cell wall protein, iron transport	3 (-181/-271/-283)
		VHT1	1up	Vitamin H transporter, biotin transport	1 (-69)
		HCR1	2up	Processing of 20S-rRNA and protein biosynthesis	0
		NFT1	2up	ATPase, transport	2 (-188/-324)
		YMR041C	2up		1 (-217)
		ISU1	2up	Iron-sulfur cluster protein, iron homeostasis	1 (-251)
		YGR146C	2up		2 (-354/-677)
E		*ATX1*	1up	Copper chaperone, iron transport	0
		FRE3	1up	Metalloreductase, iron transport	1 (-618)
		FRE5	1up	Metalloreductase	2 (-229/-330)
		GRX4	2up	Glutaredoxine, response to oxidative stress	0
		YHL035C	1up/2up	Member of the ATP-binding cassette family	0
		FRE4	1up	Metalloreductase, iron transport	1 (-436)
		UBC8	1up	Ubiquitin-conjugating enzyme	0
		OYE3	1up/2up	NADPH oxidoreductase	0
		YMR034C	1up	Sterol transporter	1 (-86)

FIG. 1. Cluster analysis of DNA microarray hybridization with the wild-type, *aft1*, and *aft1 aft2* strains grown under iron-depleted conditions. Each column displays the results from two experiments, and cells represent the averaged ratio of mRNAs (strain 1/strain 2). Transcripts more abundant in strain 1 are in red; transcripts more abundant in strain 2 are in green. The scale indicates the magnitude of the expression ratio. The *AFT1-1*^{up} (1up) or *AFT2-1*^{up} (2up) activation from previous studies (29, 30, 33) is indicated. Gene functions are described according to the *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database. Genes selected for Northern blotting and ChIP analyses are indicated in boldface type. The number of MEME consensus sites within the 700 bp of the promoter of each gene are indicated.

membrane iron transport (e.g., *FET3*, *FRE1*, *FIT2* to *FIT3*, and *ARN1* to *ARN4*). Class B contained genes whose mRNA amounts in the single *aft1* mutant were similar to those of the wild-type strain, but whose mRNA amounts were lower in the *aft1 aft2* double mutant. This transcription profile suggests that the roles of Aft1 and Aft2 overlap in the control of these genes. Class B, like class A, contained genes involved in iron metabolism, except for *ZRT1*, which encodes the high-affinity zinc transporter (44). Surprisingly, the mRNAs of class C and D genes were more abundant in the *aft1* mutant than in the wild type, indicating that Aft1 has a negative influence on the transcription of these genes. The class C and D genes showed more mRNA in the *aft1* mutant than in the double mutant (positive *aft1*/*aft1 aft2* ratio), as did those of class B, suggesting that Aft2 activates their transcription in the absence of Aft1. As shown in Fig. 1, most of the class C and D genes are activated by *AFT2-1*^{up} (29, 30). These genes had almost the same transcription profiles, except that the class C genes had a higher wild type/*aft1 aft2* ratio than did those of class D. Unlike classes A and B, classes C and D contained few genes encoding proteins involved in iron homeostasis. These genes take no part in iron transport across the plasma membrane but are involved in vacuolar iron transport (*SMF3*, *FTH1*, and *FET5*) or mitochondrial iron transport and use (*MRS4* and *ISU1*). Lastly, class E contained genes with neither positive wild type/*aft1* nor positive *aft1*/*aft1 aft2* ratios, unlike those of classes A to D. This suggests that Aft1 and Aft2 are not important for their transcription under our experimental conditions, and the effects of Aft1 and Aft2 on their transcription were not investigated further.

The MEME program (2) was used to identify potential regulatory elements in the promoters of the genes regulated by Aft1 and Aft2. The promoter region between the predicted ATG start codon and 700 bp upstream was chosen to identify the most probable motif within each class, A to E, of input promoters (Fig. 1 and 2). MEME successfully identified the canonical iron-responsive element (38) TGCACCC in the promoters of the A and B class genes (Fig. 2). Thus, 13 of the 19 genes (68%) analyzed contained at least one copy of this sequence in either orientation. Analysis of the whole genome identified 3% of all open reading frames having this sequence within their promoter. There was also generally an A 2 bases upstream of the TGCACCC sequence. In contrast, the sequence TGCACCC was present in only 6 of the 22 class C and D gene promoters (27%). The most probable motif identified within the promoters of class C and D genes was restricted to G/ACACCC, with 20 of the 22 genes (91%) containing at least one copy of this motif. This sequence was present in 24% of the promoters of the whole genome. About 80% of the class C genes contained the G/ACACCC sequence followed by an AT-rich region starting 3 bases downstream the motif. MEME identified the GCACCCT sequence as the most probable motif of the class E genes; it was present in 44% of the genes analyzed (4 of 9 genes) and in 3.2% of the promoters of the whole genome. This sequence was often preceded by a T, reminiscent of the known TGCACCC sequence.

We attempted to distinguish between the direct and indirect effects of Aft1 and Aft2 on the regulation of class A, B, C, and D genes by examining one iron-regulated gene from each class using ChIP experiments and Northern blotting analyses. The *FET3*, *FTR1*, *SMF3*, and *MRS4* genes were chosen arbitrarily because of their known function in iron homeostasis. The ChIP experiments were performed in two genetic contexts (presence and absence of the paralogous protein) because Aft1 and Aft2 could interfere with each other.

Direct activation of *FET3* transcription by Aft1 but not by Aft2. In vivo DNA footprint analyses have shown that Aft1 binds to the *FET3* FeRE sequence and activates its transcription in an iron-dependent manner (37, 38). In contrast, the role of Aft2 in the transcriptional activation of *FET3* is not clear. Aft2 binds to the same *FET3* FeRE sequence as Aft1 in vitro (29), but Aft2-dependent regulation of *FET3* in vivo has only been reported for specific conditions, such as overexpression of *AFT2* in the absence of Aft1 (3) or expression of the constitutive allele *AFT2-1*^{up} (29, 30). Northern blot analyses (Fig. 3A) confirmed that the transcription of *FET3* required *AFT1* but not *AFT2* (3). Overexpression of *AFT2* in *aft1*Δ *aft2*Δ increased the amount of *FET3* mRNA, although this was still lower than that resulting from overexpression of *AFT1*. The amount of *FET3* mRNA increased 1.5-fold in the absence of Aft2. ChIP analyses showed that Aft1 was strongly bound to the *FET3* promoter in wild-type cells, whereas Aft2 was not (Fig. 3B). The occupancy of the *FET3* promoter by Aft1 also increased 1.3-fold in the absence of Aft2. Conversely, low but reproducible amounts of Aft2 were bound to the *FET3* promoter in the absence of Aft1, although this appeared to be insufficient to sustain observable *FET3* mRNAs production (Fig. 3A and B). We further investigated the effect of iron on *FET3* transcription and on the binding of Aft1/Aft2 to the *FET3* promoter. Transcription of *FET3* was repressed by adding iron (Fig. 3C), as previously reported (37). However, residual *FET3* mRNAs were still detected in the wild-type and *aft2*Δ strains. ChIP assays indicated that iron decreased Aft1 binding to the *FET3* promoter fivefold, but it was still four- to fivefold higher than the binding to nonrelevant DNA controls (Fig. 3D). The weak binding of Aft2 to the *FET3* promoter in the absence of Aft1 was repressed by iron. Thus, Aft2 does not activate the transcription of *FET3*, although it can poorly bind to the *FET3* promoter in the absence of Aft1, and *FET3* is specifically activated by Aft1 under iron depletion.

Direct activation of *FTR1* transcription by Aft2 in the absence of Aft1. *FTR1* is an Aft1 target gene (38), and its transcription is reportedly activated by the *AFT2-1*^{up} mutant allele (29), albeit to a lower degree than by *AFT1-1*^{up} (30). Our DNA microarray results suggested that Aft1 and Aft2 were redundant in the activation of *FTR1* transcription (Fig. 1). Northern blot analyses confirmed the DNA microarray data. The amounts of *FTR1* mRNAs in the wild-type, *aft1*Δ, and *aft2*Δ strains were similar, while no transcript was detected in the *aft1*Δ *aft2*Δ double mutant (Fig. 4A). Overexpression of *AFT2* induced the expression of *FTR1* but to a lesser extent than overexpression of *AFT1*, in agreement with previous DNA microarray data obtained with the constitutive *AFT1-1*^{up}/*AFT2-1*^{up} alleles (29, 30, 33). ChIP experiments showed that Aft1 was bound to the *FTR1* promoter in the wild-type and *aft2*Δ strains under iron-depleted conditions (Fig. 4B). The Aft1 occupancy of the *FTR1* promoter was increased twofold in the absence of Aft2. Aft2 was also bound to the *FTR1* promoter but only in the absence of Aft1. Aft1 and Aft2 occupied the *FTR1* promoter similarly in the absence of their

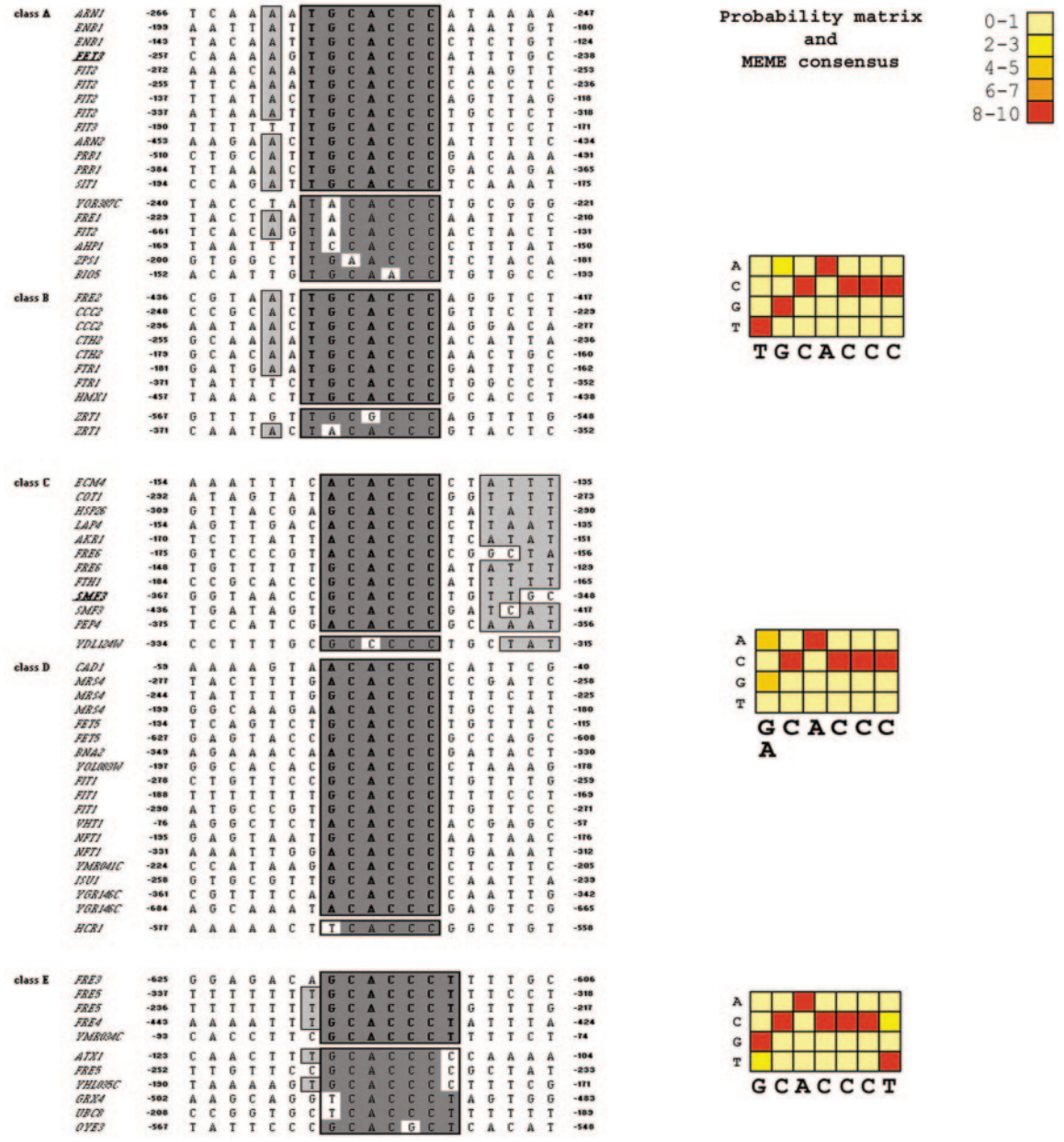

FIG. 2. Probability-based motif derived from MEME analysis of genes in classes A to E. The letter probability matrix of the motif is based on the elements within the 700-bp promoters of genes from each class. The scale indicates the probability of each possible base occurring at each position in the motif multiplied by 10 and rounded to the nearest integer. The most probable form of the motif (the MEME consensus) derived from the probability matrix is shown. The putative consensus binding sites for Aft1 and Aft2 in the DNA sequences upstream of the 50 genes up-regulated by *AFT1-1*^{up} and/or *AFT2-1*^{up} are shown. Boxed dark gray nucleotides are identical to the consensus sequence identified by MEME, and boxed light gray nucleotides are found in more than 50% of the analyzed sequences. Numbering corresponds to +1 at the putative translation start site.

paralog, consistent with the similar amounts of *FTR1* mRNAs found in the *aft1*Δ and *aft2*Δ mutants (Fig. 3A and B). These analyses indicate that Aft2 can compensate for the absence of Aft1 in the direct control of *FTR1* transcription. We also investigated the effect of iron on the Aft1- and Aft2-dependent regulation of *FTR1*. The transcription of *FTR1* decreased in iron-replete conditions, as previously reported (38). However, there was still residual transcription of *FTR1* in the wild-type and *aft2*Δ strains, but not in the *aft1*Δ mutant (Fig. 4C). The degree of *FTR1* promoter occupancy by Aft1 was two- to four-fold lower than under iron-depleted conditions, but it was still twofold higher than for DNA controls, whereas occupancy of the *FTR1* promoter by Aft2 in the *aft1*Δ mutant was sevenfold lower, reaching the level of the DNA controls (Fig. 4D). Therefore, the binding of Aft2 to the *FTR1* promoter is more sensitive to iron than is the binding of Aft1.

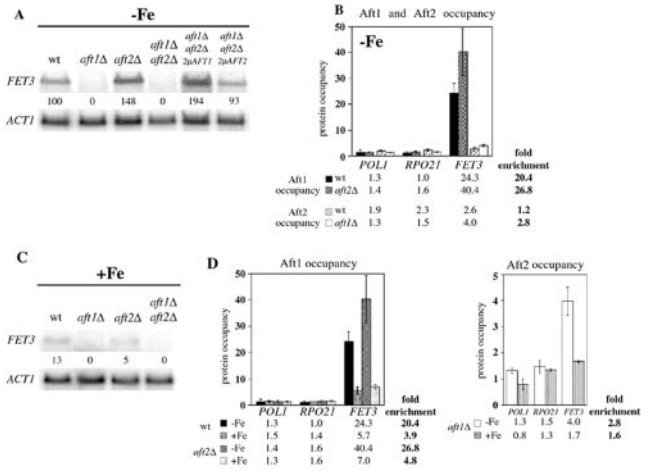

FIG. 3. Effects of Aft1 and Aft2 on *FET3* regulation. (A and C) Northern blot analysis of *FET3* transcription. Cells were grown exponentially under iron-depleted conditions (−Fe) (A) or under iron-replete conditions (+Fe) (C). Identical amounts of total RNA extracted from the indicated strains were blotted onto a nylon membrane and hybridized with the indicated probes. The plasmids designated 2μ*AFT1* and 2μ*AFT2* are derivatives of plasmid pEG202 (see Materials and Methods). Experiments were repeated twice with similar results. Data from a single experiment are presented. Numbers represent the *FET3* signal after normalization with the *ACT1* signal. One hundred percent refers to the transcription of *FET3* in the wild-type (wt) strain under iron-depleted conditions. (B and D) In vivo DNA binding of Aft1-HA and Aft2-HA to the *FET3* promoter. (B) Strains containing Aft1-HA in a wild-type (*AFT2*, *AFT1-HA*) or *aft2*Δ (*aft2*Δ, *AFT1-HA*) context and strains containing Aft2-HA in a wild-type (*AFT1*, *AFT2-HA*) or *aft1*Δ (*aft1*Δ, *AFT2-HA*) context were grown exponentially under iron-depleted conditions. (D) Strains showing significant specific binding of Aft1-HA or Aft2-HA to the *FET3* promoter were also grown under iron-replete conditions. ChIP experiments were performed as described in Materials and Methods. Samples (immunoprecipitated DNA, beads-alone control DNA, and total DNA) were amplified with the specified primer pairs. The heights of the bars represent the specific protein occupancy calculated as described in Materials and Methods. Error bars represent the standard deviations resulting from two independent experiments. The relative enrichment is defined as the protein occupancy of the *FET3* promoter normalized to the average protein occupancy of the negative controls *POL1* and *RPO21*.

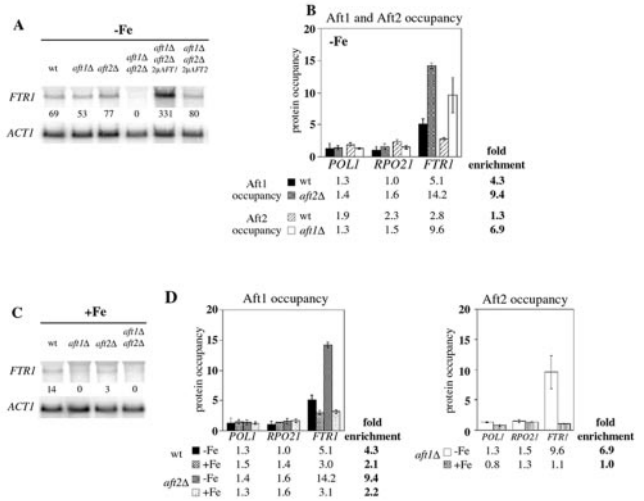

FIG. 4. Effects of Aft1 and Aft2 on *FTR1* regulation. (A and C) Northern blot analysis of *FTR1* transcription. Cells grown exponentially under iron-depleted (A) or iron-replete (C) conditions were analyzed as described in the legend to Fig. 3. One hundred percent is the transcription of *FET3* in the wild-type (wt) strain under iron-depleted conditions. (B and D) In vivo DNA binding of Aft1-HA and Aft2-HA to the *FTR1* promoter. (B) Strains containing Aft1-HA in a wild-type (*AFT2*, *AFT1-HA*) or *aft2*Δ (*aft2*Δ, *AFT1-HA*) context and strains containing Aft2-HA in a wild type (*AFT1*, *AFT2-HA*) or *aft1*Δ (*aft1*Δ, *AFT2-HA*) context were grown exponentially under iron-depleted conditions. (D) Strains showing significant specific binding of Aft1-HA or Aft2-HA to the *FTR1* promoter were also grown under iron-replete conditions. ChIP experiments and analyses were performed as described in Materials and Methods and the legend to Fig. 3.

Opposing roles for Aft1 and Aft2 in the control of *SMF3* and *MRS4*. The transcription of *SMF3* is activated by iron starvation in an Aft1/Aft2-dependent manner (23). Previous DNA microarray analyses indicated that this transcription is activated by *AFT2-1*^{up} and, to a lesser extent, by *AFT1-1*^{up} (29, 30, 33). However, *SMF3* may be controlled by other transcription factors, unlike *FET3* and *FTR1*, because its transcription is not abolished in the *aft1*Δ *aft2*Δ mutant (23). Our DNA microarray analysis indicated that the amount of *SMF3* mRNAs in *aft1*Δ was greater than in the wild type, although it was lower than in the wild type in *aft1*Δ *aft2*Δ (Fig. 1). Northern blot analyses and ChIP experiments were performed to elucidate the antagonistic effect of the *AFT1* deletion in wild-type versus *aft2*Δ genetic contexts. The amount of *SMF3* mRNAs in the *aft1*Δ mutant was higher than in the wild type, consistent with the DNA microarray data, while it was slightly lower than in the wild type in the *aft2*Δ mutant (Fig. 5A). The effect of the *AFT2* deletion was epistatic on that of the *AFT1* deletion, since the amount of *SMF3* mRNAs in the double *aft1*Δ *aft2*Δ mutant was lower than in the wild-type strain. The signal still detected in *aft1*Δ *aft2*Δ confirmed that other factors are involved in the activation of *SMF3* transcription. Finally, overexpression of either *AFT1* or *AFT2* in the *aft1*Δ *aft2*Δ mutant clearly induced *SMF3* expression. The occupancy of the *SMF3* promoter by Aft1 was only 1.8-fold greater than in the DNA controls in *aft2*Δ and 2.7-fold greater than in the DNA controls in the wild-type strain (Fig. 5B). In contrast, a great deal of Aft2 (12 times more than in the DNA controls) was bound to the *SMF3* promoter in the absence of Aft1. No Aft2 was bound to the *SMF3* promoter in wild-type cells, as for *FET3* and *FTR1*. This suggests that the increased *SMF3* mRNA in *aft1*Δ was due to the direct binding of Aft2 and its activation of transcription. We checked this by investigating the Aft1-dependent and Aft2-dependent transcription of *SMF3* in the presence of iron. The experiments performed in iron-replete conditions showed correlated decreases in both the amount of *SMF3* mRNA (threefold) and the occupancy of the *SMF3* promoter by Aft2 in the *aft1*Δ mutant (fivefold) (Fig. 5C and D). It also showed that the low occupancy of the *SMF3* promoter by Aft1 was affected by iron. We conclude that Aft2 directly activates the transcription of *SMF3* when Aft1 is absent.

DNA microarray analyses have shown that the transcription of *MRS4* is activated by *AFT2-1*^{up} (29) and *AFT1-1*^{up} but to a lower degree (30). However, in contrast to the positive action of Aft1 in the control of *MRS4*, others have reported that *MRS4* transcription is greater in the *aft1*Δ mutant than in the

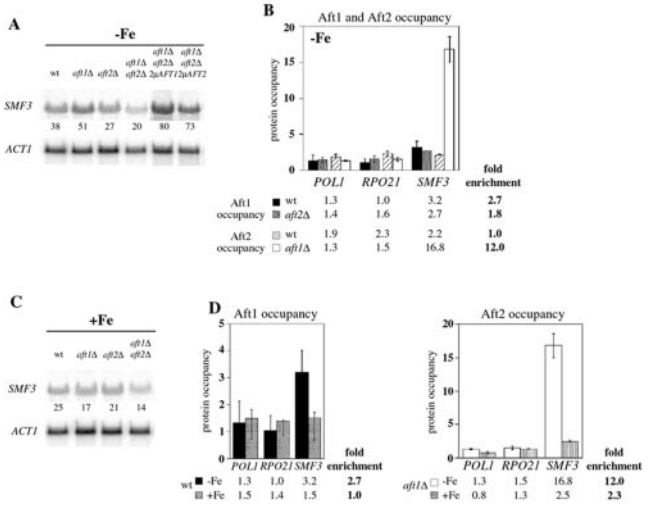

FIG. 5. Effects of Aft1 and Aft2 on *SMF3* regulation. (A and C) Northern blot analysis of *SMF3* transcription. Strains were grown in iron-depleted (A) or iron-replete (C) medium and analyzed as described in the legend to Fig. 3. One hundred percent is the transcription of *FET3* in the wild-type (wt) strain under iron-depleted conditions. (B and D) In vivo DNA binding of Aft1 and Aft2 to the *SMF3* promoter. (B) Strains containing Aft1-HA in a wild-type (*AFT2*, *AFT1-HA*) or *aft2*Δ (*aft2*Δ, *AFT1-HA*) context and strains containing Aft2-HA in a wild-type (*AFT1*, *AFT2-HA*) or *aft1*Δ (*aft1*Δ, *AFT2-HA*) context were grown exponentially under iron-depleted conditions. (D) Strains showing significant specific binding of Aft1-HA or Aft2-HA to the *SMF3* promoter were also grown under iron-replete conditions. ChIP experiments and analyses were performed as described in Materials and Methods and the legend to Fig. 3.

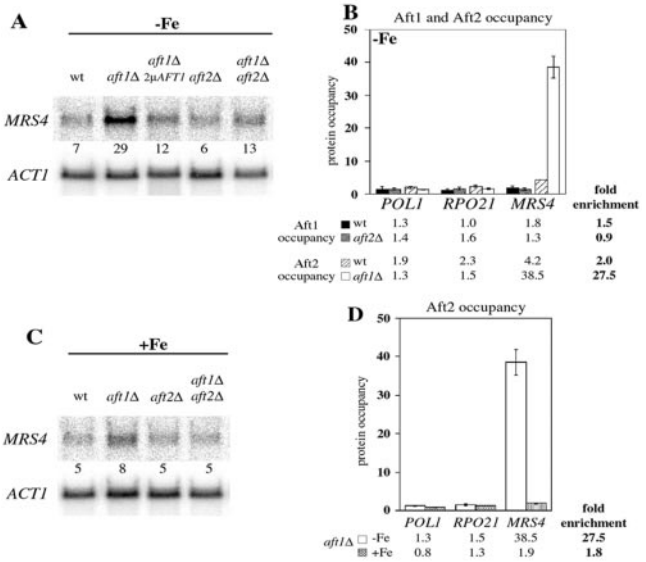

FIG. 6. Effects of Aft1 and Aft2 on *MRS4* regulation. (A and C) Northern blot analysis of *MRS4* transcription. Cells were grown exponentially under iron-depleted (A) or iron-replete (C) conditions and analyzed as described in the legend to Fig. 3. One hundred percent is the transcription of *FET3* in the wild-type (wt) strain under iron-depleted conditions. (B and D) In vivo DNA binding of Aft1 and Aft2 to the *MRS4* promoter. (B) Strains containing Aft1-HA in a wild-type (*AFT2*, *AFT1-HA*) or *aft2*Δ (*aft2*Δ, *AFT1-HA*) context and strains containing Aft2-HA in a wild-type (*AFT1*, *AFT2-HA*) or *aft1*Δ (*aft1*Δ, *AFT2-HA*) context were grown exponentially under iron-depleted conditions. (D) Only the strain containing Aft2-HA in an *aft1*Δ context (*aft1*Δ, *AFT2-HA*) was grown under iron-replete conditions. ChIP experiments and analyses were performed as described in Materials and Methods and the legend to Fig. 3.

wild-type strain (7). Our DNA microarray data (Fig. 1) and Northern blot analyses (Fig. 6A) confirmed the latter result. Moreover, the introduction of a plasmid carrying *AFT1* into the *aft1*Δ mutant led to a decrease in the *MRS4* mRNAs (Fig. 6A). The amount of *MRS4* mRNA was not affected by sole deletion of *AFT2*, but the increased amount of *MRS4* mRNA in the *aft1*Δ mutant was suppressed by deleting *AFT2* as well. The remaining signal in the *aft1*Δ *aft2*Δ mutant indicated that other factors are involved in activating *MRS4* transcription. These results suggest that the increased transcription of *MRS4* in the *aft1*Δ mutant is due to Aft2, as for *SMF3*. Considerable amounts of Aft2 were consistently bound to the *MRS4* promoter in the absence of Aft1 (27.5-fold more than to the DNA controls) (Fig. 6B). Little Aft2 was bound to the *MRS4* promoter in wild-type cells (two times more than bound to the DNA controls). No Aft1 was bound to the *MRS4* promoter in the wild-type or *aft2*Δ strains, unlike Aft2. The amounts of *MRS4* mRNAs were greatly reduced in the absence of Aft1 under iron-replete conditions (Fig. 6C). In agreement with this decreased *MRS4* mRNA amount, the binding of Aft2 to the *MRS4* promoter was 15 times less than under iron limitation (Fig. 6D). Thus, Aft2 directly activates the transcription of *MRS4* in iron-depleted conditions when Aft1 is absent. Control experiments indicated that there was no binding of Aft2 in a wild-type strain grown with iron, regardless of the promoter studied (*FET3*, *FTR1*, *SMF3*, or *MRS4*) (data not shown).

Mutational analysis of the *FET3* regulatory sequence. The above results indicate that Aft1 and Aft2 activate different target genes. The transcription of *FET3* was specifically activated by Aft1, while those of *SFM3* and *MRS4* were specifically activated by Aft2. Furthermore, computer analyses (Fig. 2) identified a slight difference between the consensus binding sites of genes activated by either Aft1 (TGCACCC) or Aft2 (G/ACACCC). We modified the iron regulatory sequence in the *FET3* promoter to resemble that of the *SFM3* promoter by site-directed mutagenesis so as to investigate the functional importance of the difference in these consensus binding sites. Dinucleotides 5′ and/or 3′ of the core sequence GCACCC of the pFC-W *FET3* promoter LacZ fusion were changed as shown in Fig. 7A. The pFC-W plasmid and the plasmids pFC-M1, pFC-M2, and pFC-M3 with mutated promoters were used to transform the wild-type, *aft1*Δ, *aft2*Δ, and *aft1*Δ *aft2*Δ strains. These plasmids were also used to transform the *aft1*Δ *aft2*Δ strain harboring a high-copy-number plasmid which overexpressed either *AFT1* or *AFT2*. We evaluated the Aft1 and Aft2 transcriptional activity from the mutated promoters by comparing the β-galactosidase activities in these strains. The β-galactosidase activities obtained with the pFC-W plasmid in the different genetic contexts (Fig. 7B) confirmed previous data showing that the transcription of *FET3* is predominantly Aft1 dependent (3). The slightly higher β-galactosidase activity in *aft2*Δ than in the wild-type strain is in agreement with the increased *FET3* mRNA (Fig. 3A). The β-galactosidase activity obtained with pFC-M1 was 3.5-fold lower than

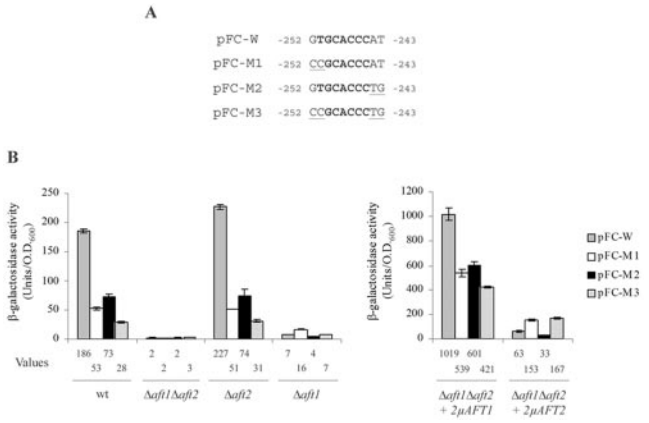

FIG. 7. Mutational analysis of the *FET3* regulatory sequence. (A) Plasmid pFC-W contains the −263/−234 of the upstream region of the *FET3* gene that has been inserted into the *CYC1* promoter and fused to the *lacZ* gene (38). Plasmid pFC-M1 is identical to pFC-W, except that the dinucleotide GT flanking the 5′ *FET3* core sequence GCACCC was replaced by the dinucleotide CC that flanks the 5′ *SMF3* GCACCC sequence (Fig. 2). Plasmid pFC-M2 is identical to pFC-W, except that the dinucleotide AT flanking the 3′ *FET3* GC ACCC sequence was replaced with the dinucleotide TG flanking the 3′ *SMF3* GCACCC sequence. Plasmid pFC-M3 contains both substitutions (GT to CC and AT to TG) of the pFC-M1 and pFC-M2 plasmids. The 5′ *FET3* core sequence GCACCC is shown in boldface type. Nucleotides that deviate from the *FET3* sequence are underlined. (B) The strains BY4742 (wild type [wt]), Y14438 (*aft1*Δ), Y11090 (*aft2*Δ), and SCMC01 (*aft1*Δ *aft2*Δ), harboring the plasmids pFC-W, pFC-M1, pFC-M2, and pFC-M3, with or without overexpression of *AFT1* or *AFT2* (plasmids pEG202-*AFT1* and pEG202-*AFT2*, see Materials and Methods) were grown for 18 h in iron-limiting medium containing 1 μM iron and then diluted to an OD_{600} of 0.3 in the same medium without iron and grown to an OD_{600} of 1.0. Error bars represent the standard deviations (less than 10%) for assays performed on three independent transformants. Numerical values of β-galactosidase activities are shown in the lower panel.

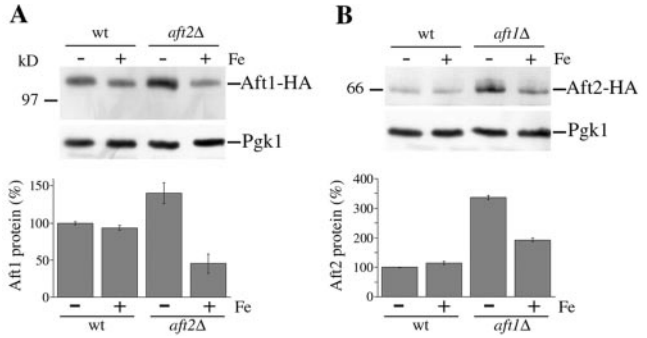

FIG. 8. Analysis of the relative abundances of Aft1 and Aft2. Equal amounts of total protein extract from cells grown exponentially in iron-depleted (−Fe) or iron-replete (+Fe) medium were analyzed by Western blotting with an anti-HA antibody to detect HA-tagged Aft1 in the wild-type (wt) and *aft2*Δ strains (A) and HA-tagged Aft2 in the wild-type and *aft1*Δ strains (B). Aft1 and Aft2 were assayed after the same exposure times. Results from two independent protein extracts are shown in bar graphs after normalization to the Pgk1 signal. The amounts of Aft1 and Aft2 in the wild-type context under iron-depleted conditions were arbitrarily defined as 100%.

that obtained with the pFC-W plasmid in the wild-type strain, 2.5-fold lower than that obtained with pFC-M2, and 6.6-fold lower than that obtained with pFC-M3. Similar results were obtained in the *aft2*Δ strain. These results indicate that Aft1 is a poor activator for the mutated promoters and that Aft2 is not involved in the residual activation when Aft1 is present. No significant β-galactosidase activity was detected in the *aft1*Δ *aft2*Δ mutant transformed with the pFC-W, pFC-M1, pFC-M2, or pFC-M3 plasmid, indicating that the β-galactosidase activity mediated by these plasmids was strictly Aft1/2 dependent. The β-galactosidase activity measured in the *aft1*Δ mutant, attributed to Aft2, was 3.5-fold higher than that of the *aft1*Δ *aft2*Δ mutant with pFC-W. The Aft2-dependent activation was more efficient in the pFC-M1 context (2.3-fold greater than pFC-W); in contrast, this Aft2-dependent activation was lower (1.7-fold decrease) with pFC-M2 than with pFC-W and remained unchanged with pFC-M3. The β-galactosidase activities measured with pFC-W, pFC-M1, pFC-M2, and pFC-M3 were decreased three- to fourfold by adding 100 μM iron in the wild type, *aft2*Δ, and *aft1*Δ strains (data not shown). The differences in Aft1- and Aft2-dependent activation were further confirmed with *aft1*Δ *aft2*Δ strains overexpressing either the *AFT1* or *AFT2* gene (Fig. 7B). Overexpression of *AFT2* increased the transcription from the pFC-M1 promoter 2.4-fold and from the pFC-M3 promoter 2.6-fold, while it decreased the transcription from pFC-M2 1.9-fold compared to pFC-W. The transcription from pFC-M1, pFC-M2, and pFC-M3 was lower than with pFC-W when *AFT1* was overexpressed.

Iron-dependent increases in Aft1 and Aft2 in the absence of paralog. The above results show that the occupancy of promoters by Aft1 and Aft2 depends on the presence or the absence of the paralog and on the iron concentration in the culture medium. We measured the total Aft1-HA and Aft2-HA levels in wild-type cells and in either *aft2*Δ or *aft1*Δ cells grown in iron-depleted and in iron-replete conditions by Western blotting with anti-HA antibody to determine whether these effects resulted from changes in the amounts of Aft1 and Aft2 proteins. The concentration of Aft1 was higher in the absence of Aft2 than in the wild type under iron depletion (Fig. 8A); this is in agreement with the increased Aft1-mediated activation of *FET3* and *FTR1* transcription in the *aft2*Δ strain (Fig. 3 and 4). The amount of Aft1 in wild-type cells was not greatly affected by adding iron, consistent with previous analyses (39). Nevertheless, it was decreased at least twofold by iron in the absence of Aft2. Analysis of the amounts of Aft2 showed a weak band corresponding to Aft2, fainter than that of Aft1 in wild-type cells (Fig. 8B). The amount of Aft2 was 3.3-fold higher in the absence of Aft1 under iron-depleted conditions, in agreement with the stimulation of the Aft2-activated transcription alone under these conditions (Fig. 3 to 6). The amount of Aft2 in wild-type cells was not affected by adding iron, while it was decreased by iron in the absence of the paralog, as was that of Aft1. The Western blot analyses therefore show that the amounts of Aft1 and Aft2 are increased in the absence of the paralog under iron depletion and that iron represses the amounts Aft1 and Aft2 in these genetic contexts.

DISCUSSION

The yeast paralogs Aft1 and Aft2 are iron-responsive transcription activators that have overlapping, but not redundant, functions in iron homeostasis. Aft1 is the major regulator of the iron uptake systems, while the role of Aft2 is not yet clear.

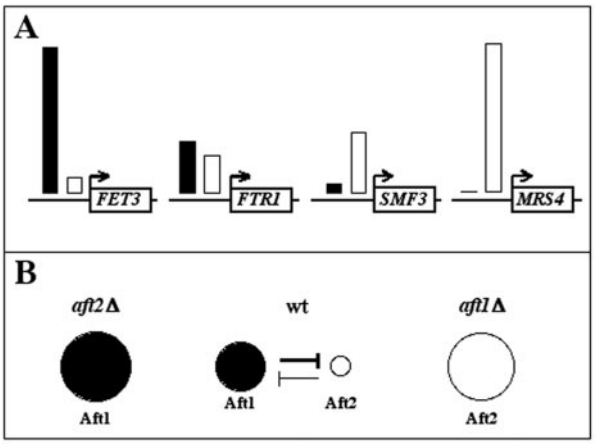

FIG. 9. Diagram of Aft1 and Aft2 DNA binding activities and protein amounts under iron-depleted conditions. (A) The bars represent the promoter occupancy by Aft1 in the *aft2*Δ strain (black bars) and promoter occupancy by Aft2 in the *aft1*Δ strain (white bars). The heights of the bars are proportional to each calculated relative enrichment from Fig. 3 (*FET3*), 4 (*FTR1*), 5 (*SMF3*), and 6 (*MRS4*). (B) The amounts of Aft1 and Aft2 proteins are represented by spheres with areas proportional to the protein measured as described in the legend to Fig. 7. Aft1 is in black, and Aft2 is in white. wt, wild type.

We assessed the role of Aft2 by analyzing the profiles of gene expression in the wild-type yeast strain and in mutant strains deficient for Aft1 or for both Aft1 and Aft2. The cells were grown in iron-depleted medium, which promotes Aft1- and Aft2-dependent activation of the genes involved in iron metabolism. We used our DNA microarray data to perform a cluster analysis on the 50 genes that were previously identified as target genes of the *AFT1-1^{up}* and/or *AFT2-1^{up}* allele (29, 30, 33). This allowed us to uncover several classes of genes that are differentially regulated by Aft1 and Aft2. The class A to D genes exhibited transcription profiles that were consistent with a role of either Aft1 (class A), Aft2 (classes C and D), or both (class B) in their activation. Only the small class E genes exhibited no transcription decrease in each of the 3 comparisons: wt/*aft1*, wt/*aft1 aft2*, and *aft1*/*af1 aft2*. This discrepancy between our "loss of function" analyses and the previous "gain of function" results could be caused by the different genetic contexts or different experimental conditions.

The detailed study by Northern blotting and ChIP experiments of the prototype genes *FET3*, *FTR1*, *SMF3*, and *MRS4*, representing the four A, B, C, and D class genes, respectively, has provided new insights into the direct and indirect actions of Aft1 and Aft2 in the regulation of genes involved in iron homeostasis. The degrees of promoter occupancy by Aft1 and Aft2 were correlated with the subsequent transcription of the corresponding genes. A striking feature here is that Aft1 and Aft2 mostly activate distinct iron-regulated genes in vivo by selective binding to the promoter, while they are able to bind to the same sequence in vitro (29). Aft1 binds well to *FET3* and *FTR1* promoters and poorly to the *SMF3* promoter, but Aft1 is not bound to the *MRS4* promoter; conversely, Aft2 binds poorly to the *FET3* promoter and well to the *FTR1*, *SMF3*, and *MRS4* promoters (summarized in Fig. 9A). This raises the question of how Aft1 and Aft2 identify the appropriate promoters. A search for specific *cis*-acting sequences in the promoter regions of class A and B genes activated by Aft1 identified the canonical TGCACCC sequence of the defined FeRE element (38), indicating the importance of this sequence in the Aft1-mediated activation. In contrast, we observed that the consensus sequence in the promoter regions of genes specifically activated by Aft2 (classes C and D) was not the TGC ACCC sequence, but the shorter G/ACACCC sequence (Fig. 2). Hence, the TGCACCC sequence appears to be important for Aft1-mediated activation, but not for Aft2-mediated activation. This was confirmed by transcriptional analysis of a LacZ reporter gene cloned under the control of variants of the *FET3* GTGCACCCAT iron-responsive element. Changing the 5′ GT to CC dramatically decreased Aft1-dependent activation. Changing the 3′ AT to TG also affected the Aft1-mediated activation by decreasing the transcription of LacZ, but to a lesser extent than the previous mutation. Introducing both changes in the 5′ and 3′ of the *FET3* iron-responsive element led to a cumulated loss of Aft1-mediated transcription. By contrast with Aft1 reactivity, the 5′ variant *FET3* CCGCAC CCAT element supported increased Aft2-mediated activation. Although the activation measured with the natural amount of Aft2 was low, it was significant, and overexpression of *AFT2* confirmed that this 2-bp change is critical for increased activation. Changing only the 3′ end of the site (AT to TG) decreased the Aft2-mediated activation. The two mutations led to an overall increased activation when *AFT2* was overexpressed. Our results on Aft1-mediated activation agree well with previous DNA binding competition experiments demonstrating that the in vitro-translated Aft1 protein interacted better with the TGCACCCA sequence than with the sequences GGCACCCA or TGCACCCC (38). The new data we provided on Aft2-mediated activation are also in accordance with in vivo analyses of *lacZ* reporter fusion constructs showing (i) that iron regulation of the Aft2-activated gene *SMF3* depends on the $^{-361}$CGCACCC sequence and not on the $^{-430}$T GCACCC sequence (22) and (ii) that the *AFT2-1^{up}* allele activates the transcription of *MRS4* through the $^{-238}$GGC ACCC sequence (30). Taken together, our computer analysis of the iron-responsive elements of the Aft1- and Aft2-regulated genes and transcriptional analysis of the *FET3* promoter LacZ fusion provide strong support for differently defined Aft1 and Aft2 DNA binding sites; Aft1 appears to be more selective in recognizing the 5′ context of the GCACCC sequence than is Aft2. However, the presence of the TGCACCC sequence in the promoter region of a gene is not sufficient for its activation by Aft1 because some class C, D, and E genes contain the TGCACCC sequence in their promoter regions and are not activated by Aft1 (Fig. 1 to 2). Thus, Aft1 (and Aft2) may recognize the promoter through combination with other *trans*-acting factors in addition to the specific regulatory *cis*-acting sequence. Recent studies have shown that the HMG box chromatin-associated architectural factor Nhp6 associates with Aft1 in vivo to facilitate its recruitment to the promoter region of certain of the Aft1-activated genes (8).

Our results show that Aft1 specifically activates *FET3* transcription and that Aft2 specifically activates *SMF3*/*MRS4* transcription (Fig. 3 to 6). In contrast, the constitutive allele *AFT1-1^{up}* activates the transcription of *MRS4* (30) and *AFT2-1^{up}* activates that of *FET3* (29, 30). The discrepancy between these results suggests that strains carrying the *AFT1*/*AFT2* wild-type

alleles are required to unravel the specificity of gene targeting by Aft1 and Aft2 and that the expression of one hyperactive *AFT1-1^{up}/AFT2-1^{up}* allele may lead to aberrant activation of genes specifically controlled by the paralog. More importantly, the specificity of gene activation by Aft1 and Aft2 described in this work correlates with a specificity of gene function. Aft1 specifically activates the transcription of genes involved in cell surface iron uptake systems (*FET3*, *FRE1*, *ARN1* to *ARN4*, and *FIT2* to *FIT3*) (Fig. 1, class A), while Aft2 specifically activates the transcription of genes involved in vacuolar and mitochondrial iron subcompartmentation and use (*SMF3*, *FRE6*, *FTH1*, *MRS4*, *FET5*, and *ISU1*) (Fig. 1, classes C and D). Thus, with two paralogous transcription factors displaying a functional specialization in the control of iron homeostasis, the cell may adapt to environmental iron changes with greater flexibility.

Phenotype analyses have shown that the sole *AFT2* deletion confers no iron-specific phenotype, whereas it reveals misregulation of intracellular iron use and oxidative stress-related phenotypes in the absence of Aft1 (3). Consistently, we have now shown that the Aft2-mediated activation of transcription is revealed under iron-depleted conditions and in the absence of Aft1. This suggests that the Aft2 activity is triggered by exacerbated iron-limiting conditions caused by the cumulative effects of environmental iron depletion and a lack of Aft1-dependent iron uptake systems. Thus, in response to severe iron limitation, the activation by Aft2 of the transcription of genes involved in vacuolar and mitochondrial iron transport may lead to a reorganization of the intracellular iron distribution. This is further supported by recent data indicating that the Aft2 target gene *MRS4* is involved in a mitochondrial-vacuolar iron-signaling pathway (19). A hierarchical model implicating Aft1 and Aft2 in a graded response to iron limitation fits well with the greater sensitivity of Aft2 to iron: a given iron concentration in the culture medium may completely abolish the binding of Aft2 to DNA but only decrease that of Aft1. Further investigation is now required to clarify the fine-tuning of Aft2 triggering in response to iron limitation.

The absence of one of the Aft1/Aft2 paralogs under iron deprivation conditions leads to an increase in the binding of the resident paralog to its specific promoters and subsequent gene activation (Fig. 3 to 6). These effects are correlated with a change in the abundance of paralog protein in whole cells (Fig. 8 and 9B). The extent to which the absence of either Aft1 or Aft2 increases the amount of the remaining paralog protein varies: the Aft2 concentration increases more in the absence of Aft1 than does that of Aft1 in the absence of Aft2. The reciprocal negative influence of Aft1 and Aft2 may reflect a compensatory mechanism to counterbalance a failure in processes regulated by one factor by stimulating those of the paralog. This would allow the cell to tightly coordinate the Aft1-mediated regulation of extracellular iron transport and the Aft2-mediated regulation of iron intracellular use.

The modulation of protein amounts may involve transcriptional and/or posttranscriptional regulation. Aft1 binds to its own promoter (16). We found $^{-614}$TGCACCC and $^{-658}$GGC ACCC sequences in the *AFT1* promoter. This suggests that Aft1 and Aft2 are directly involved in the regulation of *AFT1* transcription. In contrast, no CACCC core element of the FeRE sequence was found in the *AFT2* promoter. Any change in its transcription in response to *AFT1* deletion would thus occur through other *cis*- and *trans*-regulatory elements. Posttranslational effects may also be involved. Our data agree with recent work on mammals showing that the amount of the iron-regulatory protein IRP2 is increased when the paralog gene encoding IRP1 is deleted. Since iron regulates IRP2 by mediating its proteasomal degradation, these experiments suggest that IRP1 is involved in this step of regulation (22). We show that the negative effect of Aft1 and Aft2 on the amount of the paralog is iron dependent. How iron is involved in controlling the balance between the Aft1 and Aft2 proteins is still unknown, and answering this question is critical for a better understanding of the functions of these iron-responsive paralogous transcription factors in the yeast cell. Iron regulates the function of Aft1 by modulating its subcellular distribution (39) but is likely to be involved at other steps of Aft1 control. Nothing is yet known about the regulation of Aft2 function by iron. As a first step toward clarifying this critical point, experiments are in progress to determine the level at which iron regulates Aft2 abundance in the absence of Aft1.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joel Pothier, Laurent Kuras, Arnaud Teichert, and Renata Santos for helpful discussions and all the members of Rosine Haguenauer-Tsapis's laboratory for advice and technical support. Frederic Devaux critically read the manuscript. The English text was edited by Owen Parkes.

This work was supported by grants from the Ministère de la Recherche (Programme de Recherches Fondamentales en Microbiologie, Maladies Infectieuses et Parasitaires), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC no. 5439), and the Centre National pour la Recherche Scientifique (grant from the Programme de Toxicologie Nucléaire).

REFERENCES

1. **Askwith, C., D. Eide, A. Van Ho, P. S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe, and J. Kaplan.** 1994. The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. Cell **76:**403–410.
2. **Bailey, T. L., and C. Elkan.** 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. **2:**28–36.
3. **Blaiseau, P. L., E. Lesuisse, and J. M. Camadro.** 2001. Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. J. Biol. Chem. **276:** 34221–34226.
4. **Cobb, J. A., L. Bjergbaek, K. Shimada, C. Frei, and S. M. Gasser.** 2003. DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. EMBO J. **22:**4325–4336.
5. **Dancis, A., R. D. Klausner, A. G. Hinnebusch, and J. G. Barriocanal.** 1990. Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **10:**2294–2301.
6. **Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown, and D. Botstein.** 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95:**14863–14868.
7. **Foury, F., and T. Roganti.** 2002. Deletion of the mitochondrial carrier genes *MRS3* and *MRS4* suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. J. Biol. Chem. **277:**24475–24483.
8. **Fragiadakis, G. S., D. Tzamarias, and D. Alexandraki.** 2004. Nhp6 facilitates Aft1 binding and Ssn6 recruitment, both essential for FRE2 transcriptional activation. EMBO J. **23:**333–342.
9. **Garland, S. A., K. Hoff, L. E. Vickery, and V. C. Culotta.** 1999. Saccharomyces cerevisiae ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. J. Mol. Biol. **294:**897–907.
10. **Georgatsou, E., and D. Alexandraki.** 1999. Regulated expression of the Saccharomyces cerevisiae Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes. Yeast **15:**573–584.
11. **Guarente, L.** 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. Methods Enzymol. **101:**181–191.
12. **Hantke, K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. **4:**172–177.
13. **Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, and N. C. Andrews.** 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. Cell **117:**285–297.
14. **Kohrer, K., and H. Domdey.** 1991. Preparation of high molecular weight RNA. Methods Enzymol. **194:**398–405.

15. **Kuras, L., and K. Struhl.** 1999. Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. Nature **399:**609–613.
16. **Lee, T. I., N. J. Rinaldi, F. Robert, D. T. Odom, Z. Bar-Joseph, G. K. Gerber, N. M. Hannett, C. T. Harbison, C. M. Thompson, I. Simon, J. Zeitlinger, E. G. Jennings, H. L. Murray, D. B. Gordon, B. Ren, J. J. Wyrick, J. B. Tagne, T. L. Volkert, E. Fraenkel, D. K. Gifford, and R. A. Young.** 2002. Transcriptional regulatory networks in Saccharomyces cerevisiae. Science **298:**799–804.
17. **Lesuisse, E., P. L. Blaiseau, A. Dancis, and J. M. Camadro.** 2001. Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology **147:**289–298.
18. **Lesuisse, E., M. Simon-Casteras, and P. Labbe.** 1998. Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the *SIT1* gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. Microbiology **144:**3455–3462.
19. **Li, L., and J. Kaplan.** 2004. A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. J. Biol. Chem. **279:**33653–33661.
20. **Longtine, M. S., A. McKenzie III, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J. R. Pringle.** 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. Yeast **14:**953–961.
21. **Martins, L. J., L. T. Jensen, J. R. Simon, G. L. Keller, D. R. Winge, and J. R. Simons.** 1998. Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. **273:**23716–23721.
22. **Meyron-Holtz, E. G., M. C. Ghosh, K. Iwai, T. LaVaute, X. Brazzolotto, U. V. Berger, W. Land, H. Ollivierre-Wilson, A. Grinberg, P. Love, and T. A. Rouault.** 2004. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. EMBO J. **23:**386–395.
23. **Portnoy, M. E., L. T. Jensen, and V. C. Culotta.** 2002. The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. Biochem. J. **362:**119–124.
24. **Portnoy, M. E., X. F. Liu, and V. C. Culotta.** 2000. Saccharomyces cerevisiae expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. Mol. Cell. Biol. **20:**7893–7902.
25. **Protchenko, O., T. Ferea, J. Rashford, J. Tiedeman, P. O. Brown, D. Botstein, and C. C. Philpott.** 2001. Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **276:**49244–49250.
26. **Protchenko, O., and C. C. Philpott.** 2003. Regulation of intracellular heme levels by HMX1, a homologue of heme oxygenase, in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. **278:**36582–36587.
27. **Puig, S., E. Askeland, and D. J. Thiele.** 2005. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. Cell **120:**99–110.
28. **Rutherford, J. C., and A. J. Bird.** 2004. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. Eukaryot. Cell **3:**1–13.
29. **Rutherford, J. C., S. Jaron, E. Ray, P. O. Brown, and D. R. Winge.** 2001. A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98:**14322–14327.
30. **Rutherford, J. C., S. Jaron, and D. R. Winge.** 2003. Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. J. Biol. Chem. **278:**27636–27643.
31. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
32. **Schilke, B., C. Voisine, H. Beinert, and E. Craig.** 1999. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96:**10206–10211.
33. **Shakoury-Elizeh, M., J. Tiedeman, J. Rashford, T. Ferea, J. Demeter, E. Garcia, R. Rolfes, P. O. Brown, D. Botstein, and C. C. Philpott.** 2004. Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biol. Cell **15:**1233–1243.
34. **Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner, and A. Dancis.** 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. Science **271:**1552–1557.
35. **Urbanowski, J. L., and R. C. Piper.** 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.
36. **Volland, C., D. Urban-Grimal, G. Geraud, and R. Haguenauer-Tsapis.** 1994. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. J. Biol. Chem. **269:**9833–9841.
37. **Yamaguchi-Iwai, Y., A. Dancis, and R. D. Klausner.** 1995. *AFT1*: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. **14:**1231–1239.
38. **Yamaguchi-Iwai, Y., R. Stearman, A. Dancis, and R. D. Klausner.** 1996. Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. EMBO J. **15:**3377–3384.
39. **Yamaguchi-Iwai, Y., R. Ueta, A. Fukunaka, and R. Sasaki.** 2002. Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. **277:**18914–18918.
40. **Yuan, D. S., R. Stearman, A. Dancis, T. Dunn, T. Beeler, and R. D. Klausner.** 1995. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92:**2632–2636.
41. **Yun, C. W., M. Bauler, R. E. Moore, P. E. Klebba, and C. C. Philpott.** 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.
42. **Yun, C. W., T. Ferea, J. Rashford, O. Ardon, P. O. Brown, D. Botstein, J. Kaplan, and C. C. Philpott.** 2000. Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. J. Biol. Chem. **275:**10709–10715.
43. **Yun, C. W., J. S. Tiedeman, R. E. Moore, and C. C. Philpott.** 2000. Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. J. Biol. Chem. **275:**16354–16359.
44. **Zhao, H., and D. Eide.** 1996. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93:**2454–2458.

A-4. Résultat complémentaire à l'analyse des séquences consensus des promoteurs

La recherche de séquences consensus dans les ensembles de gènes identifiés et les expériences de mutagenèse dirigée (article 1) nous a permis de mettre en évidence que le consensus de fixation d'Aft1p, 5'-TGCACCC-3', est nécessaire pour une activation transcriptionnelle médiée par Aft1p, mais pas par Aft2p. Cette séquence est présente dans 68% des gènes régulés par Aft1p (groupes A et B), contre seulement 3% des gènes du génome. Ce consensus n'est cependant pas suffisant pour expliquer l'activation transcriptionnelle spécifique médiée par Aft1p, puisqu'il est tout de même présent dans 27% des gènes activés par Aft2p. Le consensus de fixation identifié pour Aft2p, 5'-(G/A)CACCC-3', est quant à lui plus flou et plus court. Il est par conséquent présent dans 24% des promoteurs des gènes de l'ensemble du génome. Cette large distribution au sein du génome suggère que le recrutement d'Aft2p sur les promoteurs ne nécessite pas de véritable séquence consensus, ou bien que le consensus identifié n'est pas encore complètement défini à ce jour.

Les résultats de l'analyse globale présentés dans l'article 1 ne prennent en compte que les trois comparaisons les plus pertinentes pour mettre en évidence l'effet des délétions *AFT1* et/ou *AFT2*, à savoir sauvage/*aft1*, sauvage/*aft1aft2* et *aft1/aft1aft2*. De plus, ces résultats ne tiennent pas compte des résultats de l'analyse statistique que nous avons réalisée pour épurer nos données de transcriptome (*cf.* Matériel et Méthodes). Nous avons donc repris le classement des 50 gènes avec l'ensemble de nos données (figure 17), dans le but d'obtenir un meilleur classement de chaque gène au sein de groupes distincts, et donc possiblement de préciser la séquence consensus reconnue par Aft2p.

Avec ces données différentes, le logiciel Cluster 3.0 a ainsi identifié 4 groupes de gènes différant de par leur profil transcriptionnel (figure 17).

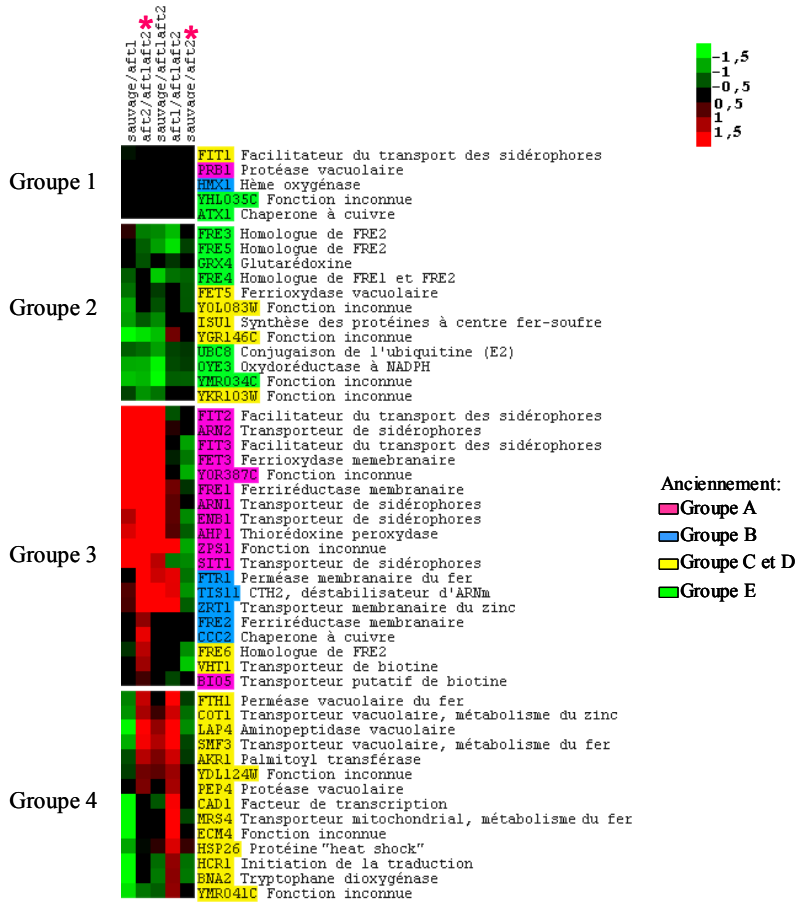

Figure 17 : Profils d'expression des gènes activés par *AFT1-1up* et/ou *AFT2-1up* dans l'ensemble des comparaisons effectuées en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p. Représentation du classement par groupe de corrélation transcriptionnelle. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. L'échelle indiquant les niveaux de rapports d'expression va du vert (diminution) au rouge (augmentation). Le classement précédemment obtenu en ne tenant compte que de trois comparaisons (article 1) est indiqué par la coloration du nom des gènes. Les deux comparaisons supplémentaires sont indiquées par un astérisque rouge.

Le groupe 1 contient 5 gènes pour lesquels les valeurs de rapports d'expression obtenues sur les deux séries d'expériences d'analyse globale se sont avérées non reproductibles pour les cinq comparaisons (figure 17). Ces gènes avaient été classés précédemment dans chacun des groupes A, B, C, D et E, et le rattachement de chacun à un groupe particulier nécessitera la vérification de sa transcription dans les différentes souches délétées d'*AFT1* et/ou d'*AFT2*.

Le groupe 2 contient des gènes pour lesquels la transcription ne semble pas être dépendante d'Aft1p ou d'Aft2p, ce qui correspond au groupe E précédemment identifié. Quasiment la moitié de ces gènes faisait partie des gènes cibles potentiels d'Aft2p (figure 17). La diminution de transcription de la plupart de ces gènes dans la souche *aft1aft2* par rapport à

la souche *aft1* n'a pas été reproduite sur les deux séries d'expériences d'analyse globale du transcriptome , ce qui mériterait d'être vérifié par Northern blot.

Le groupe 3 contient les gènes classés précédemment dans les groupes A et B (gènes cibles d'Aft1p, et gènes cibles d'Aft1p et d'Aft2p). Nos données supplémentaires indiquent que la transcription de la plupart de ces gènes a tendance à être augmentée chez le simple mutant *aft2* par rapport à une souche sauvage (figure 17), et que l'effet d'Aft1p sur la transcription de ces gènes est révélé aussi en absence d'Aft2p (comparaison *aft2*/*aft1aft2*).

Le groupe 4 contient les gènes classés précédemment dans les groupes C et D, c'est-à-dire les gènes régulés par Aft2p, en absence d'Aft1p. La comparaison *aft2*/*aft1aft2* permet de comprendre pourquoi ces gènes ont été préalablement classés dans deux groupes distincts (figure 17). Aft1p semble en effet jouer un rôle en absence d'Aft2p dans la régulation de la transcription des gènes du groupe C (figure 17), ce qui n'est pas le cas pour la transcription des gènes du groupe D (figure 17). Ces données sont d'ailleurs en accord avec les résultats que nous avons obtenus concernant la régulation transcriptionnelle de *SMF3* et *MRS4* : la délétion d'*AFT1* en contexte *Δaft2* entraîne une diminution de la transcription de *SMF3*, mais pas de *MRS4* (article 1).

La prise en compte de l'ensemble des données obtenues par l'analyse du transcriptome des souches délétées d'*AFT1* et/ou *d'AFT2* permet d'obtenir un regroupement légèrement différent des gènes décrits comme étant activés par *AFT1-1up* et/ou *AFT2-1up* (Rutherford *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2003, Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004), mais qui reste complètement en accord avec le classement présenté dans l'article 1.

Ce nouveau classement que nous avons établi avec l'ensemble des données du transcriptome permet de réduire le nombre de gènes cibles directs d'Aft2p (figure17, groupe 4). Nous avons à nouveau analysé les promoteurs de ce groupe restreint de gènes, à la recherche d'une séquence consensus mieux définie pour Aft2p. Mais malheureusement, ces analyses ne nous ont pas permis de mettre en évidence un consensus plus précis.

En revanche, nous avons identifié la séquence d'Aft1p, 5'-TGCACCC-3', dans seulement 7% des promoteurs des gènes cibles potentiels d'Aft2p du groupe 4 (contre 27% des promoteurs des gènes cibles potentiels d'Aft2p des groupes C et D). Ce résultat suggère encore plus fortement que la séquence 5'-TGCACCC-3' n'est pas spécifique des gènes qui sont régulés par Aft2p.

B. Analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur les promoteurs d'autres gènes du « régulon fer » : *FIT2*, *FIT3*, *CTH2* et *COT1*

B-1. Régulation transcriptionnelle de *FIT2* et *FIT3*

Les gènes *FIT1*, *FIT2* et *FIT3* codent pour des protéines de la paroi cellulaire qui pourraient faciliter le transport du fer extracellulaire en le retenant à la surface de la cellule (Protchenko *et al.*, 2001). La transcription de ces gènes est fortement augmentée en réponse à la carence en fer et ils possèdent de nombreux sites consensus de fixation d'Aft1p et d'Aft2p dans leur promoteur (Protchenko *et al.*, 2001 et figure 18-A). L'expression d'*AFT1-1up* et d'*AFT2-1up* permet également d'augmenter la transcription de ces trois gènes, ce qui suggère qu'Aft1p et Aft2p participent à leur régulation transcriptionnelle (Protchenko *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2003).

Les gènes *FIT1*, *FIT2* et *FIT3* sont localisés dans des régions subtélomériques, comme c'est le cas pour les gènes *ARN1* à *ARN4* codant les transporteurs de sidérophores, le gène *FET4* codant le transporteur de fer à basse affinité et certains gènes de la famille des ferriréductases, *FRE2* à *FRE7*. Le gène *FIT1* est localisé sur le bras droit du chromosome IV (figure 18-B). Les gènes *FIT2* et *FIT3* sont localisés quant à eux sur le chromosome XV, et forment, avec *FRE3* et *FRE5* un ensemble particulier de gènes adjacents qui sont connus pour être régulés par Aft1p (figure 18-B). Cette organisation chromosomique pourrait avoir des conséquences sur la manière dont les gènes de ce groupe sont régulés. Notre intérêt s'est donc porté sur la régulation transcriptionnelle de *FIT2* et *FIT3* par Aft1p et Aft2p en réponse à la carence en fer.

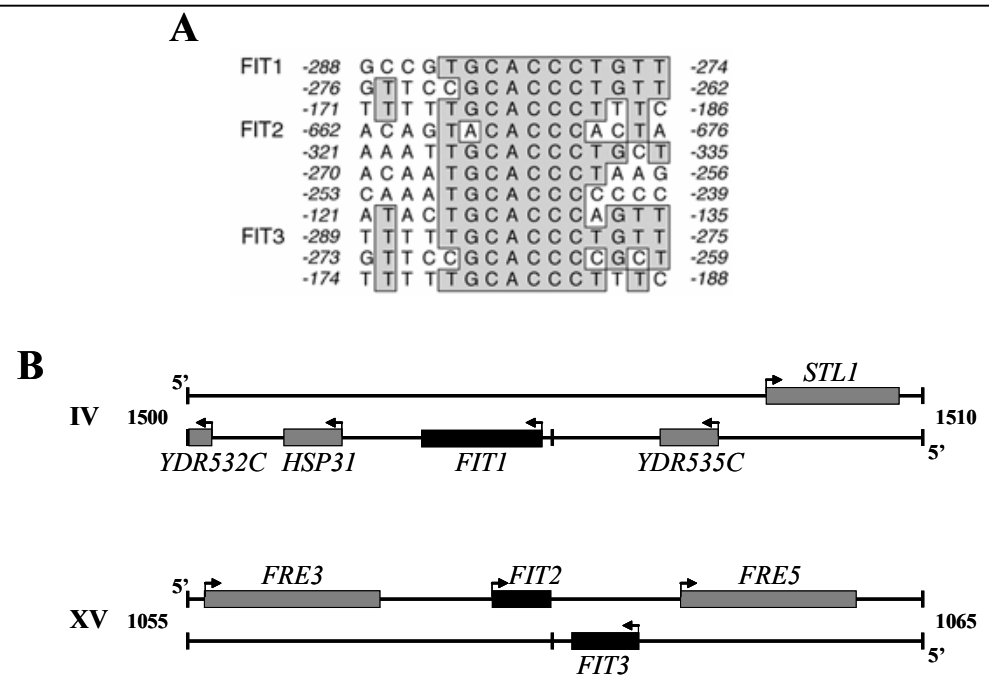

Figure 18 : Représentation des gènes *FIT1*, *FIT2* et *FIT3*. A, localisation des séquences consensus de fixation d'Aft1p et d'Aft2p dans les régions promotrices. B, représentation de la localisation chromosomique des gènes *FIT1*, *FIT2* et *FIT3*. Les coordonnées de la région sur le chromosome sont indiquées de part et d'autre en kilobases. Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes. D'après Protchenko *et al*, 2001.

L'analyse des transcrits du gène *FIT2* dans des cellules cultivées en condition de carence en fer a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel (figure 19-A). La transcription de *FIT2* est induite en condition de carence en fer, induction uniquement dépendante du facteur de transcription Aft1p (figure 19-A). Ce résultat ne reflète pas les données obtenues avec les allèles *AFT1-1up* et *AFT2-1up* qui suggéraient une régulation de *FIT2* à la fois par Aft1p et Aft2p (Rutherford *et al.*, 2003, Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004).

L'analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *FIT2* est en accord avec nos résultats d'expression de *FIT2* : seul Aft1p a la capacité de se fixer sur le promoteur de *FIT2*, et cette fixation est dépendante de la quantité de fer dans le milieu (figure 19-B/C). Le recrutement d'Aft1p sur le promoteur de *FIT2* est cependant faible, et ne reflète pas les effets transcriptionnels observés (figure 19).

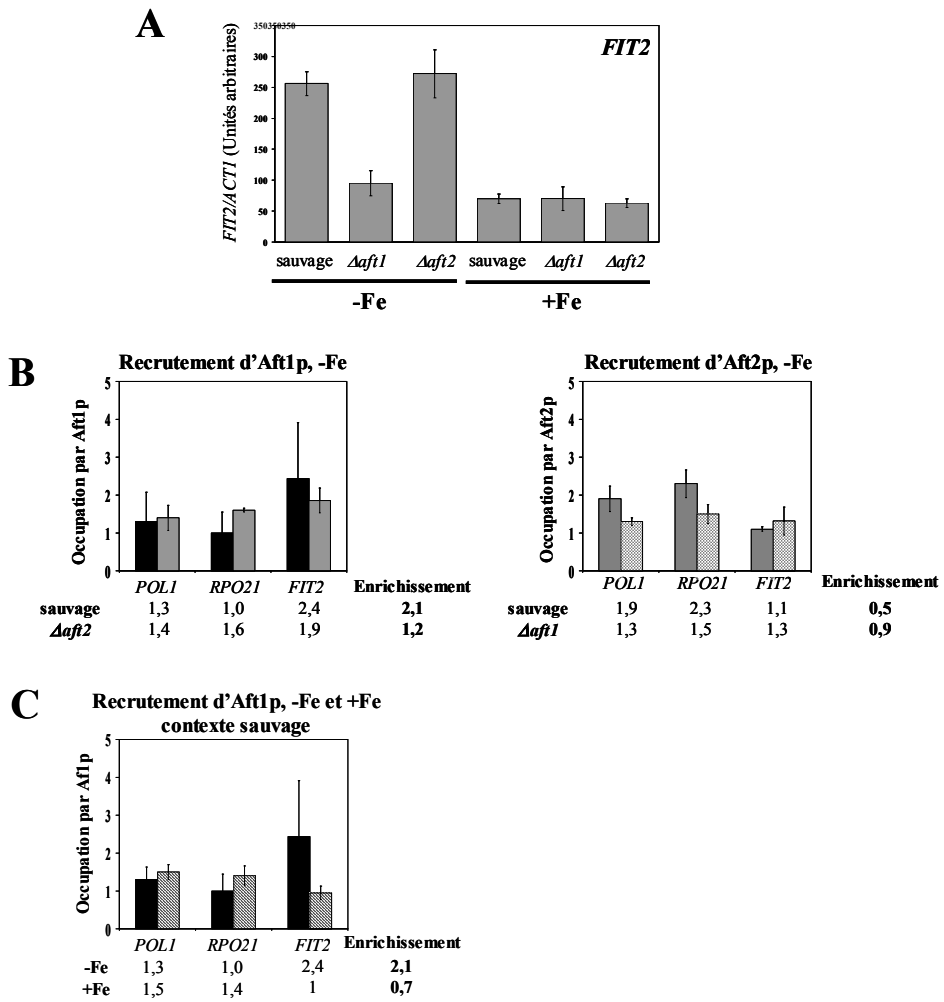

Figure 19 : Régulation transcriptionnelle de *FIT2* par Aft1p et Aft2p. A, analyse par RT-PCR des transcrits *FIT2*. Deux lots d'ARNm extraits des souches indiquées, cultivées en condition de carence (-Fe) ou de présence de fer 100µM (+Fe), ont été rétro-transcrits. Les ADNc des gènes *FIT2* et *ACT1* ont été analysés par PCR quantitative en temps réel, en utilisant des oligonucléotides spécifiques (*cf.* Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus pour *FIT2* ont été normalisés par le signal *ACT1* pour chaque lot, puis la moyenne a été calculée. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. B et C, analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *FIT2*. Les souches portant Aft1p ou Aft2p étiquetés avec 3 copies de l'épitope HA dans un contexte sauvage ou délété du paralogue ont été cultivées en absence (A) ou en présence de 100 µM de fer dans le milieu (B). Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées en duplicata comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne calculé sur les deux expériences. *POL1* et *RPO21* sont utilisés comme témoins négatifs des expériences, et la valeur moyenne d'occupation obtenue pour ces témoins permet de calculer l'enrichissement d'Aft1p ou d'Aft2p sur le promoteur de *FIT2*.

Les transcrits du gène *FIT3* dans des souches cultivées en condition de carence en fer n'ont pas pu être détectés par Northern blot. Pourtant, la transcription de ce gène est très bien observée dans un milieu contenant un mélange de 1mM de ferrozine (chélateur de fer) et de 20µM de fer (Protchenko *et al.*, 2001), suggérant la nécessité de conditions de carence en fer

plus drastiques pour étudier la régulation transcriptionnelle de ce gène. Nous avons donc cultivé les cellules dans le milieu dépourvu de fer sur une période plus longue, d'environ 18 heures, contre une période de seulement 5 heures utilisée habituellement (figure 20). Dans cette condition de carence en fer plus drastique, les transcrits *FIT3* sont nettement révélés dans une souche sauvage. De plus, alors que l'ajout de fer 100µM ne fait que diminuer la transcription du gène *FET3*, il abolit complètement la transcription de *FIT3* (figure 20-A). Ces données montrent que la régulation de l'expression de *FIT3* est beaucoup plus sensible à la présence de fer dans le milieu que ne l'est celle de *FET3*.

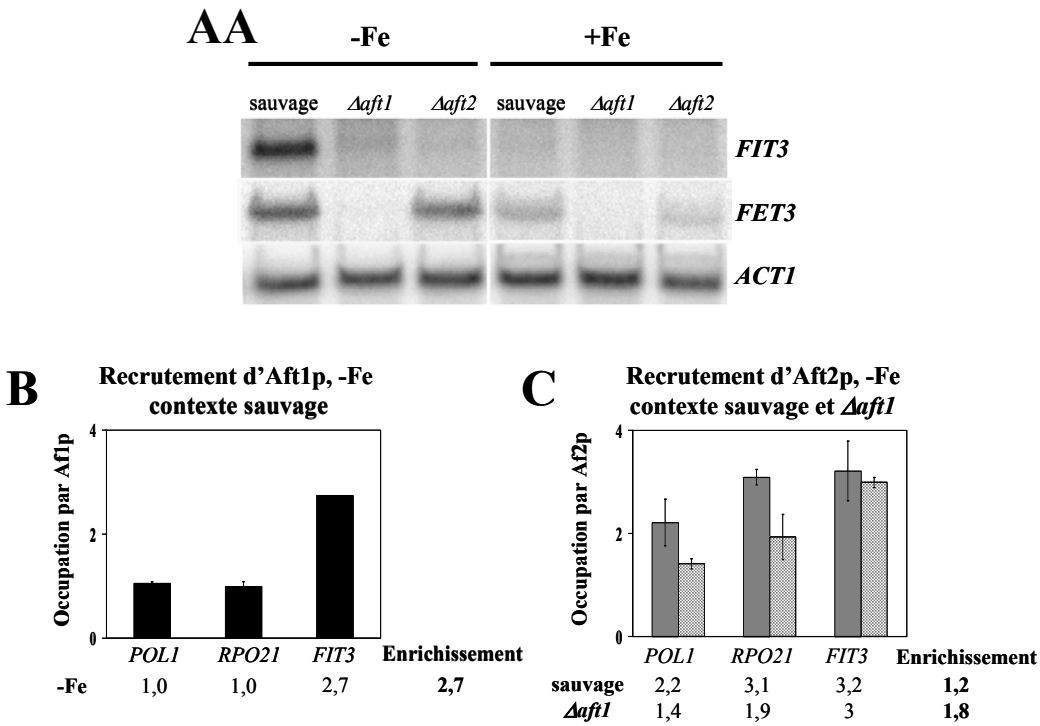

Figure 20 : Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation transcriptionnelle de *FIT3* en condition accrue de carence en fer. A, analyse en Northern blot des transcrits *FIT3* dans les souches indiquées, cultivées en absence (-Fe) ou en présence de fer 100µM dans le milieu sur une période d'environ 18h. B et C, analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *FIT3* dans les mêmes conditions (carence en fer pendant 18h). Les souches portant Aft1p ou Aft2p étiquetés avec 3 copies de l'épitope HA dans un contexte sauvage ou délété du paralogue ont été cultivées en absence de fer dans le milieu. Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées en duplicata (sauf pour B), et les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne calculé sur les deux expériences. *POL1* et *RPO21* sont utilisés comme témoins négatifs des expériences, et la valeur moyenne d'occupation obtenue pour ces témoins permet de calculer l'enrichissement d'Aft1p ou d'Aft2p sur le promoteur de *FIT3*.

Dans cette condition de carence en fer plus drastique, on observe une disparition des transcrits *FIT3* aussi bien dans une souche *Δaft1* que dans une souche *Δaft2* (figure 20-A). Ce résultat est en accord avec une régulation de *FIT3* dépendante à la fois d'Aft1p et d'Aft2p, et

montre en plus que la présence des deux facteurs de transcription est requise pour l'expression de *FIT3*. C'est à ce titre la première fois qu'un effet aussi radical de la simple délétion du gène *AFT2* est observé sur la transcription d'un gène du métabolisme du fer. Par ailleurs, ces résultats montrent que la régulation transcriptionnelle du gène *FIT3* par Aft1p et Aft2p est différente de la régulation transcriptionnelle du gène *FIT2*. Ce résultat pourrait être imputé aux types de séquences consensus retrouvées dans les promoteurs de ces deux gènes : alors que le promoteur du gène *FIT2* possède 5 séquences consensus 5'-T(G/A)CACCC-3' préférentiellement reconnues par Aft1p, le promoteur du gène *FIT3* possède deux séquences 5'-TGCACCC-3' mais également une séquence 5'-CCGCACCC-3', préférentiellement reconnue par Aft2p (figure 18-A).

Nous avons regardé si les effets transcriptionnels observés sur *FIT3* dans cette condition de carence en fer plus drastique peuvent être corrélés à une action directe d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *FIT3* (figure 20-B/C). L'analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *FIT3* dans cette condition n'a révélé qu'une fixation légère d'Aft1p en contexte sauvage mais pas de fixation d'Aft2p (figure 20-C). La transcription de *FIT3* est pourtant complètement dépendante d'Aft1p et d'Aft2p (figure 20-A), et ce gène contient 3 séquences de fixation d'Aft1p et/ou d'Aft2p (figure 18-A). Les résultats de recrutement d'Aft1p et d'Aft2p ne reflètent donc pas la régulation transcriptionnelle de *FIT3*.

La régulation transcriptionnelle des quatre gènes *FET3*, *FTR1*, *SMF3* et *MRS4* par Aft1p et Aft2p a pu être parfaitement corrélée avec le recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur les régions promotrices de ces gènes (article 1). Nous n'avons pas obtenu cette corrélation concernant la régulation transcriptionnelle des gènes *FIT2* et *FIT3*. Comme je l'ai mentionné précédemment, *FIT2* et *FIT3* sont localisés dans des régions qui sont proches des télomères, ce qui n'est pas le cas des quatre gènes *FET3*, *FTR1*, *SMF3* et *MRS4*. Les régions télomériques et subtélomériques possèdent une structure chromatinienne particulière très compactée, et la transcription des gènes contenus dans ces régions est de manière générale fortement réprimée (pour revue, Moazed, 2001). Les mécanismes qui permettent l'expression de ces gènes font intervenir un certain nombre de protéines qui modifient les histones de la chromatine afin de la rendre plus ou moins compacte, telles que les protéines Sir3p ou Hda1p (Carmen *et al.*, 2002, Bernstein *et al.*, 2002). La localisation chromosomique particulière des gènes *FIT2* et *FIT3* est donc possiblement à l'origine des difficultés à corréler leur transcription au recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur leur régions promotrices.

B-2. Régulation transcriptionnelle de *CTH2* : gestion de l'utilisation du fer

Le gène *CTH2* a été identifié comme un gène régulé par Aft1p et Aft2p (Puig *et al.*, 2005). Cth2p est impliqué dans la dégradation des ARNm codant des protéines qui utilisent le fer en tant que co-facteur. Il existe ainsi un véritable remaniement transcriptionnel coordonné en réponse à la carence en fer dans le milieu (Puig *et al.*, 2005) : en condition de carence en fer, l'activation d'Aft1p et d'Aft2p permet d'une part de recruter le fer nécessaire à la cellule en induisant la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans le transport extracellulaire et le trafic du fer intracellulaire, et d'autre part d'économiser ce fer disponible, en diminuant, *via* l'activation de Cth2p, l'expression des gènes dont les produits nécessitent du fer pour fonctionner.

L'analyse des transcrits *CTH2* dans les mutants déficients pour *AFT1* et/ou *AFT2* après ajout de 100µM du chélateur BPS ou de 100µM fer a révélé que la transcription de *CTH2* est fer-dépendante, et que les deux facteurs de transcription Aft1p et Aft2p sont impliqués dans cette régulation, Aft1p semblant y jouer un rôle prépondérant (Puig *et al.*, 2005 et figure 21-A). La transcription de *CTH2* est par ailleurs induite de manière équivalente par *AFT1-1up* et *AFT2-1up* (Rutherford *et al.*, 2003), et nos analyses globales de transcriptome ont placé ce gène dans le groupe contenant *FTR1* (donc comme une cible potentielle d'Aft1p et d'Aft2p). Afin de déterminer plus précisément le rôle respectif d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation de ce gène, nous avons commencé par analyser l'expression de *CTH2* dans les souches sauvage et délétées d'*AFT1* et/ou d'*AFT2* cultivées dans le milieu dépourvu de fer (figure 21-B).

Le gène *CTH2* est faiblement exprimé dans cette condition de carence en fer. Chez la souche sauvage, il est 14 fois moins transcrit que le gène *FET3* (figure 21-B), alors que la quantité de transcrits de ces deux gènes est équivalente après ajout de BPS (Puig *et al.*, 2005 et figure 21-A). Ce résultat suggère que la régulation transcriptionnelle du gène *CTH2* est plus sensible aux conditions de carence en fer que la transcription du gène *FET3*. La faible expression de *CTH2* est diminuée par l'ajout de 100µM fer dans le milieu (figure 21-B), ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment (Puig *et al.*, 2005, figure 21-A). En absence de fer dans le milieu, l'expression de *CTH2* n'est pas affectée par la délétion d'*AFT2*, alors qu'elle est très fortement diminuée par la délétion d'*AFT1* et complètement absente dans la souche double mutante *Δaft1Δaft2* (figure 21-B). Dans ce contexte *Δaft1Δaft2*, la surexpression d'*AFT2* permet d'induire l'expression de *CTH2* à un niveau 1,7 supérieur au

niveau sauvage, alors que la surexpression d'*AFT1* permet de la multiplier par 60 par rapport à une souche sauvage. Cela est en accord avec un rôle prépondérant d'Aft1p dans la régulation transcriptionnelle de ce gène. La comparaison avec l'effet de la surexpression d'*AFT1* dans le contexte *Δaft1Δaft2* sur la transcription de *FET3* (qui ne permet d'augmenter la transcription de ce gène que d'un facteur 2 par rapport à la souche sauvage), suggère par ailleurs que la transcription de *CTH2* pourrait être soumise à de plus fortes amplitudes de variation d'expression que le gène *FET3*. L'effet de la surexpression d'*AFT1* dans le contexte *Δaft1Δaft2* est exacerbé d'un facteur 15 par rapport à l'effet dans le contexte *Δaft1* (figure 21-B). La présence d'Aft2p limite donc l'effet de la surexpression d'*AFT1* sur la transcription de *CTH2*, phénomène qui est également observé concernant la transcription de *FET3* (figure 21-B). L'effet de la surexpression d'*AFT2* sur la transcription de *CTH2* est quant à lui indépendant de la présence/absence d'Aft1p : dans le contexte *Δaft2* ou *Δaft1Δaft2*, la surexpression d'*AFT2* permet d'induire la transcription de *CTH2* à un niveau environ 2 fois supérieur au niveau sauvage (figure 21-B).

En accord avec nos résultats de Northern blot, nos résultats préliminaires de recrutement d'Aft1p et d'Aft2p indiquent qu'en condition de carence en fer, seul Aft1p est capable d'être recruté sur le promoteur de *CTH2* (figure 21-C). Ce recrutement est très faible et les mesures demandent à être reproduites, mais il est régulé par le fer (figure 21-C), ce qui est en faveur d'un rôle direct de ce facteur de transcription dans la régulation de *CTH2*. Dans des cellules cultivées dans cette condition de carence en fer, il semble donc que seul Aft1p soit impliqué de manière directe dans la régulation transcriptionnelle de *CTH2*. Par contre, l'utilisation de conditions de carence en fer plus drastiques (ajout de BPS) permet de mettre en évidence le rôle d'Aft2p sur la transcription de *CTH2* lorsqu'Aft1p est absent (Puig *et al.*, 2005 et figure 21-A), et il probable que dans ces conditions plus drastiques de carence, le recrutement d'Aft2p sur le promoteur de *CTH2* puisse être observé.

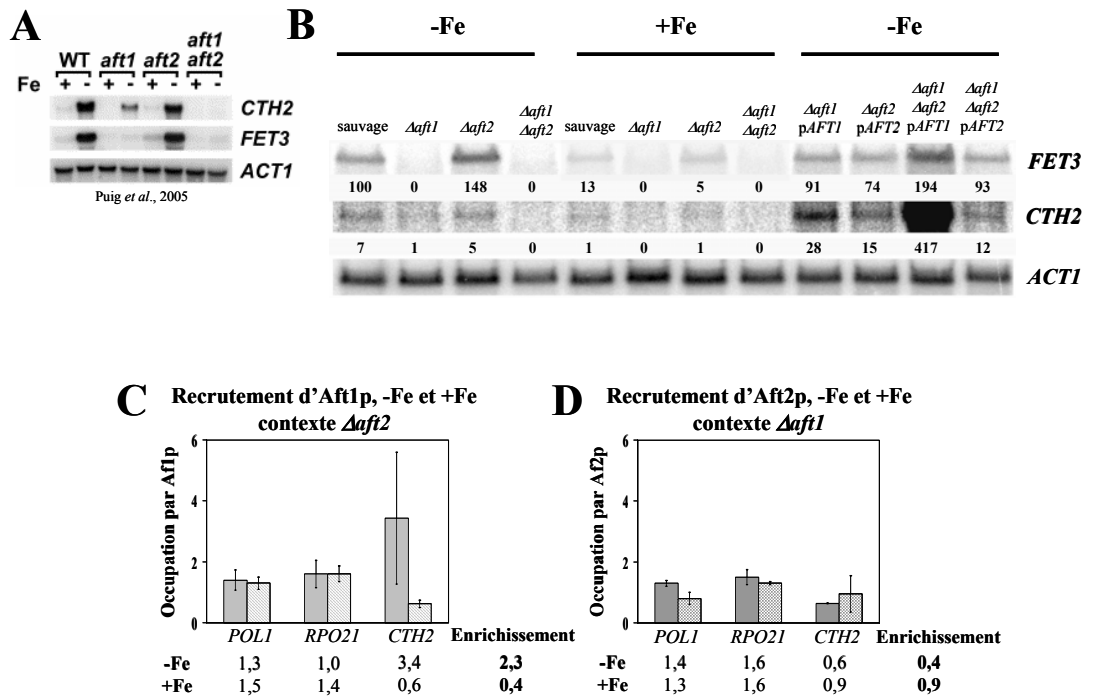

Figure 21 : Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation transcriptionnelle de *CTH2*. A, résultats obtenus par Puig et collaborateurs. B, Analyse par Northern blot des transcrits *CTH2* dans les souches indiquées, cultivées en absence (-Fe) ou en présence de fer 100µM dans le milieu. p*AFT1* et p*AFT2* désignent les plasmides issus du pEG202 surexprimant *AFT*1 ou *AFT2* (*cf.* Matériel et Méthodes). Les valeurs obtenues lors de la quantification ont été normalisées en prenant *FET3* sauvage -Fe = 100. C et D, analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *CTH2*. Les souches portant Aft1p ou Aft2p étiquetées avec 3 copies de l'épitope HA dans un contexte délété du paralogue ont été cultivées en absence ou en présence de fer 100µM dans le milieu. Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées en duplicata, et les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne calculé sur les deux expériences. *POL1* et *RPO21* sont utilisés comme témoins négatifs des expériences, et la valeur moyenne d'occupation obtenue pour ces témoins permet de calculer l'enrichissement d'Aft1p ou d'Aft2p sur le promoteur de *CTH2*.

Il est à noter que l'effet de la surexpression d'*AFT2* sur la transcription de *FET3* dans les contextes *Δaft2* et *Δaft1Δaft2* est différent : la surexpression d'*AFT2* dans le contexte *Δaft1Δaft2* permet de restaurer la transcription de ce gène à un niveau sauvage, alors que la surexpression d'*AFT2* dans le contexte *Δaft2* entraîne une diminution d'un facteur 2 de la transcription de ce gène par rapport au niveau de la souche *Δaft2*. Ces résultats suggèrent un rôle négatif d'Aft2p sur la transcription de *FET3* lorsqu'Aft1p est présent, et sont donc en accord avec le fait que seul Aft1p est l'activateur de la transcription de *FET3*.

B-3. Régulation transcriptionnelle de *COT1* : un gène cible d'Aft2p ?

Le gène *COT1* code pour une protéine vacuolaire impliquée dans la résistance cellulaire au cobalt et au zinc (Conklin *et al.*, 1992, MacDiarmid *et al.*, 2003). Des analyses des transcrits *COT1* ont montré que la transcription de ce gène est activée en réponse à la carence en fer et à l'excès de cobalt (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004, Conklin *et al.*, 1992). La transcription du gène *COT1* est par ailleurs induite à un même niveau par *AFT1-1up* et *AFT2-1up* (Rutherford *et al.*, 2003). Nos analyses globales de transcriptome utilisant les mutants déficients pour *AFT1* et/ou *AFT2* suggèrent que la transcription de ce gène serait dépendante d'Aft2p : la transcription de *COT1* est augmentée dans la souche *aft1* par rapport à la souche sauvage, et elle est diminuée dans la souche *aft1aft2* par rapport à la souche *aft1*. Le gène *COT1* possède d'ailleurs dans son promoteur une séquence de type 5'-TACACCC-3', sur laquelle Aft1p ne se fixe que faiblement *in vitro* (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996).

L'analyse par Northern blot des transcrits *COT1* nous a permis de mettre en évidence que la transcription de ce gène est induite en condition de carence en fer (figure 22-A). Dans cette condition, les délétions d'*AFT1* et/ou d'*AFT2* n'ont cependant pas d'effet significatif sur la transcription de *COT1* (figure 22-A). La transcription de ce gène étant induite par *AFT1-1up* et *AFT2-1up*, nous avons regardé si Aft1p et Aft2p étaient capables de se fixer sur le promoteur de *COT1*. En condition de carence en fer, Aft1p n'est pas recruté sur le promoteur de *COT1* (figure 22-B). Il semblerait qu'Aft2p puisse se fixer faiblement (facteur 1,9) sur le promoteur de *COT1* en contexte sauvage (figure 22-B). De plus, cette fixation potentielle d'Aft2p est régulée par la quantité de fer dans le milieu (figure 22-C), ce qui est en accord avec la diminution de transcrits *COT1* observés en présence de fer dans le milieu (figure 22-A).

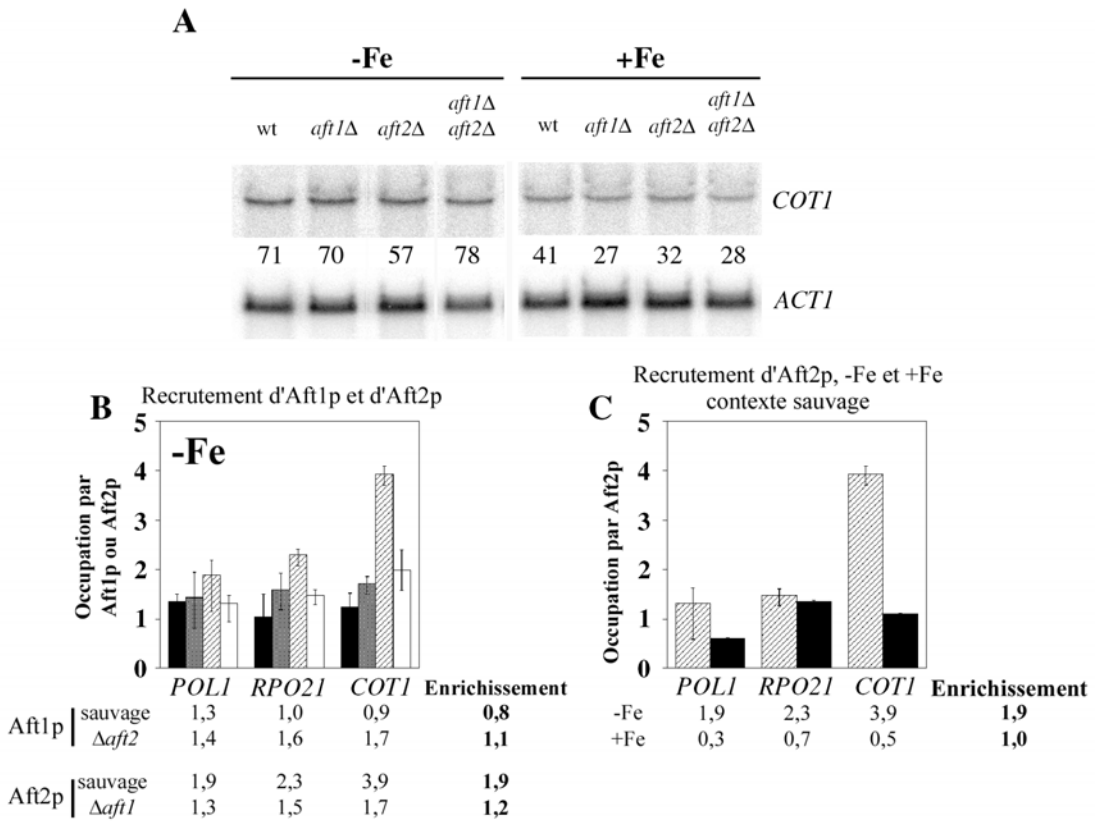

Figure 22 : Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation transcriptionnelle de *COT1*. A, Analyse en Northern blot des transcrits *COT1* dans les souches indiquées, cultivées en absence (-Fe) ou en présence de fer 100µM dans le milieu pendant 5 heures. B et C, analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *COT1*. Les souches portant Aft1p ou Aft2p étiquetés avec 3 copies de l'épitope HA dans un contexte sauvage ou délété du paralogue ont été cultivées en absence de fer dans le milieu. Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées en duplicata, et les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne calculé sur les deux expériences. *POL1* et *RPO21* sont utilisés comme témoins négatifs des expériences, et la valeur moyenne d'occupation obtenue pour ces témoins permet de calculer l'enrichissement d'Aft1p ou d'Aft2p sur le promoteur de *COT1*.

Nos résultats suggèrent qu'Aft2p, mais pas Aft1p, pourrait être impliqué dans la régulation directe de *COT1*. Or le gène *COT1* est considéré dans la littérature comme un gène cible d'Aft1p, bien que les données n'aient été obtenues qu'avec la forme constitutive *AFT1-1up* (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004, Rutherford et Bird, 2004). Il serait donc intéressant de poursuivre l'analyse de la régulation transcriptionnelle de ce gène par Aft1p et Aft2p, en utilisant par exemple des conditions plus drastiques de carence en fer pour révéler davantage les effets des délétions d'*AFT1* et/ou d'*AFT2* et l'implication directe de ces facteurs dans la régulation transcriptionnelle de *COT1*.

C. Régulation d'Aft1p et d'Aft2p par le fer

Yamaguchi-Iwai et collaborateurs ont montré que l'activité d'Aft1p est régulée par le fer *via* sa distribution subcellulaire, puisqu'il se localise dans le cytoplasme lorsque les cellules sont cultivées en présence de fer dans le milieu et qu'il s'accumule dans le noyau en réponse à la carence en fer (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002, Ueta *et al.*, 2003). Le rôle d'Aft2p au sein de la cellule n'a été que très peu étudié pour l'instant, et les mécanismes qui régulent son activité restent encore à définir.

Nous avons montré que la quantité des protéines Aft1p et Aft2p peut varier en fonction de la présence/absence du paralogue et de la quantité de fer dans le milieu (article 1). L'absence d'un paralogue conduit à une augmentation de la quantité du paralogue restant. Nous avons par ailleurs montré que l'activité d'Aft1p et d'Aft2p peut être associée à leur quantité dans la cellule. L'augmentation de la transcription du gène *FET3* en absence d'Aft2p est concomitante d'une augmentation de la quantité d'Aft1p, et l'augmentation de la transcription des gènes *MRS4* et *SMF3* en absence d'Aft1p est concomitante d'une augmentation de la quantité d'Aft2p. De plus, dans les contextes délétés d'*AFT1* ou d'*AFT2*, on observe une diminution importante de la quantité du paralogue restant en présence de fer (article 1).

Afin d'apporter des éléments de réponse quant à la nature des mécanismes qui contrôlent les quantités de protéines Aft1p et Aft2p, nous avons débuté une étude visant à identifier à quel(s) niveau(x) les quantités d'Aft1p et d'Aft2p sont régulées.

C-1. La quantité d'Aft1p est régulée au niveau transcriptionnel

Le gène *AFT1* possède deux séquences consensus de fixation pour Aft1p et Aft2p dans son promoteur : $^{-615}$5'-TGCACCC-3'$^{-609}$ et $^{-659}$5'-GGCACCC-3'$^{-653}$. Des analyses à grande échelle visant à identifier l'ensemble des régions promotrices de *S. cerevisiae* occupées *in vivo* par un facteur de transcription donné (expériences de « ChIP-chip »), ont montré qu'Aft1p est capable de se fixer sur son propre promoteur, suggérant ainsi une possible auto-régulation transcriptionnelle (Lee *et al.*, 2002). Une hypothèse simple serait donc que les variations de quantité de protéine Aft1p soient liées à son auto-régulation transcriptionnelle.

Nos conditions d'analyse n'ont pas permis de révéler les transcrits *AFT1* par la méthode de Northern blot. Nous avons donc opté pour une analyse des transcrits *AFT1* par RT-PCR quantitative en temps réel, une technique plus sensible qui permet de mettre en évidence des niveaux de transcrits plus faibles et des variations plus subtiles de quantité (Wang et Brown, 1999). Nous avons observé en parallèle comme contrôle l'expression du gène *FIT2*, appartenant au « régulon fer » et gène cible d'Aft1p (sous-chapitre B). La transcription de ce gène dans notre condition de carence en fer générée par la croissance des cellules sur 5 heures dans le milieu dépourvu de fer est représentée pour mémoire dans l'encadré de la figure 23.

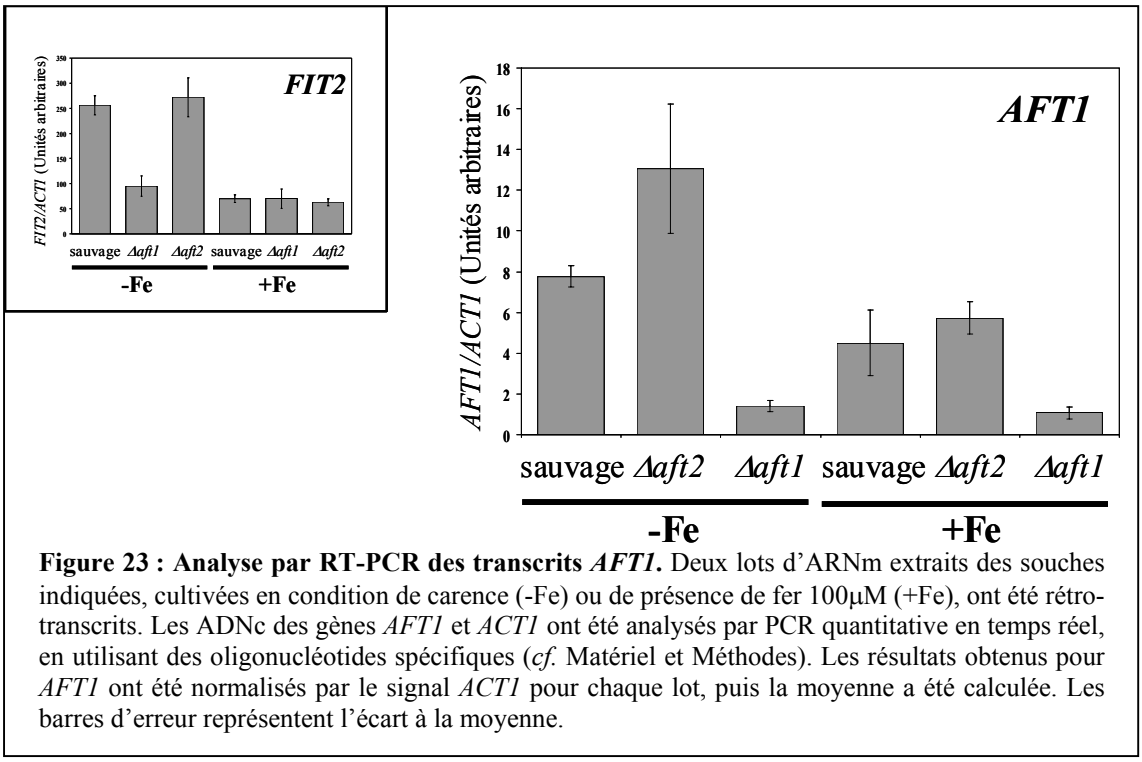

Figure 23 : Analyse par RT-PCR des transcrits *AFT1*. Deux lots d'ARNm extraits des souches indiquées, cultivées en condition de carence (-Fe) ou de présence de fer 100µM (+Fe), ont été rétro-transcrits. Les ADNc des gènes *AFT1* et *ACT1* ont été analysés par PCR quantitative en temps réel, en utilisant des oligonucléotides spécifiques (*cf.* Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus pour *AFT1* ont été normalisés par le signal *ACT1* pour chaque lot, puis la moyenne a été calculée. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne.

Les transcrits *AFT1* sont indétectables dans la souche *Δaft1*, ce qui montre que l'amplification obtenue par PCR est spécifique de ce transcrit (figure 23). En condition de carence en fer, la quantité de transcrits *AFT1* est 1,6 fois plus élevée dans un contexte où Aft2p est absent. La présence de fer dans le milieu entraîne une diminution de la quantité de transcrits *AFT1*, aussi bien dans un contexte sauvage (1,7 fois moins) que dans le contexte mutant *Δaft2* (2,1 fois moins) (figure 23).

L'ensemble de ces résultats est en accord avec les variations de quantité de la protéine Aft1p observées par immunoempreinte et la régulation par le fer (article 1, figure 8). La

transcription d'*AFT1* varie de manière concomitante à la quantité de protéine Aft1p, et les amplitudes des variations observées au niveau transcriptionnel et protéique sont similaires.

Afin de savoir si les effets transcriptionnels observées sur *AFT1* impliquent directement Aft1p et Aft2p, nous avons étudié le recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur d'*AFT1*, en fonction de la présence/absence du paralogue et de la quantité de fer dans le milieu, par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (figure 24).

Aft1p est recruté sur son propre promoteur dans un contexte sauvage, recrutement qui nécessite une condition de carence en fer puisqu'il est 2,6 fois diminué lorsque 100µM de fer sont ajoutés dans le milieu (figure 24-A). Ces résultats sont en accord avec les données de RT-PCR décrites précédemment (figure 23), et suggèrent que la variation de quantité de transcrits *AFT1* dans un contexte sauvage serait directement liée au recrutement d'Aft1p sur son propre promoteur.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence un léger recrutement d'Aft2p sur le promoteur d'*AFT1*, en absence d'Aft1p (figure 24-B), recrutement qui est aboli par l'ajout de fer dans le milieu (figure 24-B). La capacité d'Aft2p à se fixer sur le promoteur d'*AFT1* suggère qu'il pourrait être impliqué directement dans la régulation transcriptionnelle de son paralogue.

Dans un contexte où Aft2p est absent, Aft1p est toujours recruté sur son propre promoteur en condition de carence en fer, mais dans des proportions équivalentes à celles observées dans un contexte sauvage (figure 24-A). L'augmentation de la quantité de transcrit *AFT1* en absence d'Aft2p (figure 23) ne s'explique donc pas par un recrutement plus important d'Aft1p sur son propre promoteur dans ce contexte. Par ailleurs, le recrutement d'Aft1p est toujours observé en présence de fer dans le milieu (figure 24-A), ce qui ne rend pas non plus compte de la diminution de la quantité de transcrits *AFT1* dans cette condition (figure 23). Ces résultats révèlent donc que dans un contexte où Aft2p est absent, l'augmentation de la quantité d'Aft1p ne peut pas être expliquée par un simple mécanisme d'auto-régulation transcriptionnelle d'Aft1p. Une autre protéine est peut-être par conséquent impliquée dans la régulation de la quantité de transcrits *AFT1* dans un contexte *Δaft2*.

Pourquoi l'effet du fer sur le recrutement d'Aft1p en contexte *Δaft2* est-il aboli sur le promoteur d'*AFT1* ? Des études ont montré que l'association d'Aft1p avec les facteurs à HMG-box Nhp6ap et Nhp6bp facilite son recrutement sur certains promoteurs (Fragiadakis *et al.*, 2004, *cf.* introduction). Nhp6ap et Nhp6bp sont de petites protéines non histone de 11 kDa associées à la chromatine qui permettraient de faciliter l'ouverture de la double hélice d'ADN

(Ruone *et al.*, 2003). Les résultats que nous avons obtenus concernant le recrutement d'Aft1p sur son propre promoteur sont donc possiblement à mettre en relation avec son association avec ce type de protéines.

Une absence de corrélation entre le recrutement d'Aft1p et la transcription du gène ciblé a déjà été rapportée concernant le gène *FET3* (Crisp *et al.*, 2003). Dans un contexte *Δhem1*, en condition de carence en fer, Aft1p est recruté sur le promoteur de *FET3*, et pourtant la transcription de ce gène n'est pas induite.

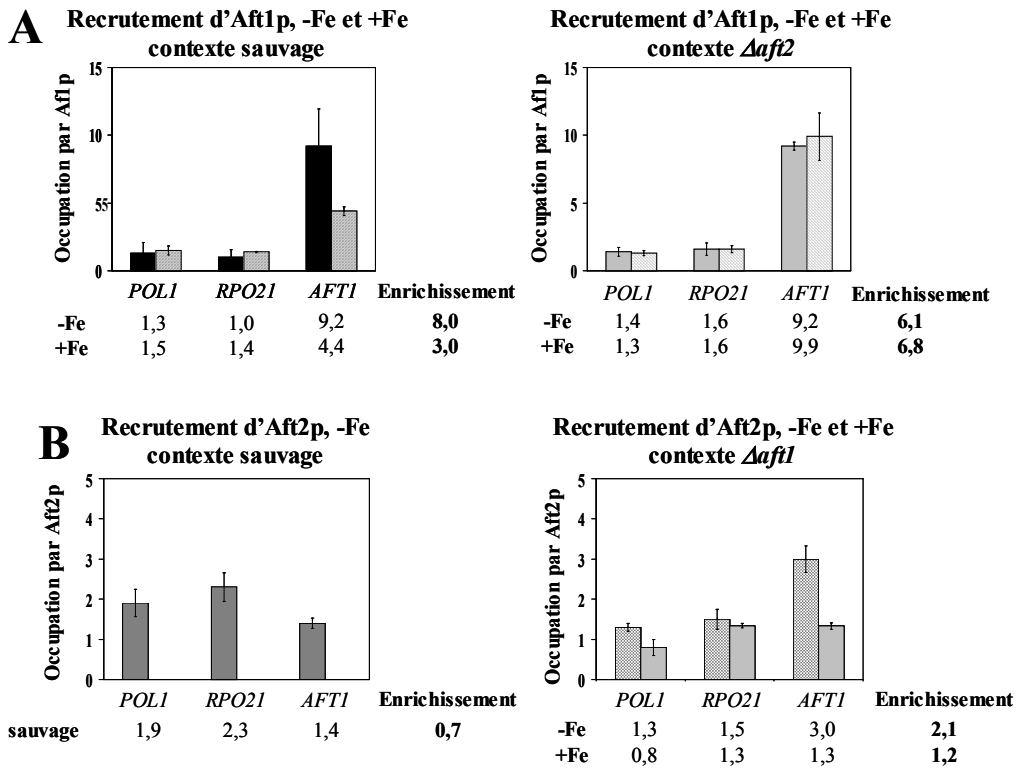

Figure 24 : Analyse du recrutement d'Aft2p et d'Aft1p sur le promoteur d'*AFT1*. Les souches utilisées portent Aft1p ou Aft2p étiquetées avec 3 copies de l'épitope HA, dans un contexte sauvage ou délété du paralogue. Ces souches ont été cultivées pendant 5 heures en condition de carence (-Fe) ou de présence de fer 100µM (+Fe). Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées en duplicata, comme décrit dans le Matériel et Méthodes. La hauteur des histogrammes représente l'occupation de la protéine étudiée sur les promoteurs indiqués, et les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne calculé sur les deux expériences. *POL1* et *RPO21* sont utilisés comme témoins négatifs des expériences, et la valeur moyenne d'occupation obtenue pour ces témoins permet de calculer l'enrichissement d'Aft1p ou d'Aft2p sur le promoteur d'*AFT1*. A, recrutement d'Aft1p, B, recrutement d'Aft2p.

En utilisant la technique de RT-PCR, nous avons montré qu'il existe une régulation de la quantité de transcrits *AFT1*, qui est dépendante de la présence/absence d'Aft2p, et de la présence de fer dans le milieu. Cette régulation n'avait pas encore été mise en évidence à ce

jour. Lors de la caractérisation d'Aft1p comme facteur de transcription impliqué dans la régulation du métabolisme du fer chez *S. cerevisiae*, Yamaguchi-Iwai et collaborateurs ont montré par Northern blot que la quantité de transcrits *AFT1* dans un contexte sauvage est indépendante de la quantité de fer dans le milieu (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995). Les résultats les plus démonstratifs que nous avons obtenus concernent la variation de transcription d'*AFT1* en contexte *Δaft2*, étude qui n'avait jamais été réalisée jusqu'à présent.

C-2. La quantité d'Aft2p n'est pas régulée au niveau transcriptionnel

Les résultats que nous avons obtenus sont les premiers concernant l'étude de la protéine Aft2p. Nous nous sommes posé la question de savoir à quel(s) niveau(x) la quantité d'Aft2p pourrait être régulée.

Nous avons dans un premier temps cherché à savoir si ces variations de quantité de protéine pouvaient être imputées, comme pour Aft1p, à une variation de la quantité de transcrits *AFT2*. Nous n'avons pas identifié de séquences consensus de fixation d'Aft1p ou d'Aft2p dans le promoteur d'*AFT2*, ce qui suggère que la régulation transcriptionnelle d'*AFT2* ne ferait intervenir ni Aft1p ni Aft2p. Nous avons mesuré les transcrits *AFT2* par RT-PCR quantitative en temps réel, en fonction de la présence/absence de fer dans le milieu et de la présence/absence d'Aft1p (figure 25). Cette analyse a été réalisée sur les mêmes extraits d'ARNm que ceux utilisés pour mesurer la quantité de transcrits *AFT1*. De manière générale, nos résultats de RT-PCR indiquent que le gène *AFT2* est 10 fois moins transcrit que le gène *AFT1* (comparaison des figures 23 et 25-A). L'abondance relative des transcrits *AFT1* et *AFT2* est corrélée aux quantités relatives des protéines Aft1p et Aft2p observées par immunoempreinte dans la souche sauvage cultivée en condition de carence en fer (article 1). En revanche, quels que soient le contexte étudié (sauvage et *Δaft1*) et le milieu utilisé (présence ou absence de fer dans le milieu) il n'apparaît pas de variation importante de quantités de transcrits *AFT2* qui peuvent expliquer les variations de quantités de protéine Aft2p observées par immunoempreinte (article 1). Ces résultats indiquent que la quantité d'Aft2p dans ces conditions n'est pas régulée au niveau transcriptionnel.

Bien que n'ayant pas mis en évidence de régulation transcriptionnelle d'*AFT2* dans nos conditions et qu'il n'existe pas de séquence consensus de fixation d'Aft1p et d'Aft2p dans

son promoteur, nous nous sommes assuré qu'Aft1p et Aft2p n'étaient pas recrutés sur le promoteur d'*AFT2* dans nos conditions (figure 25-B).

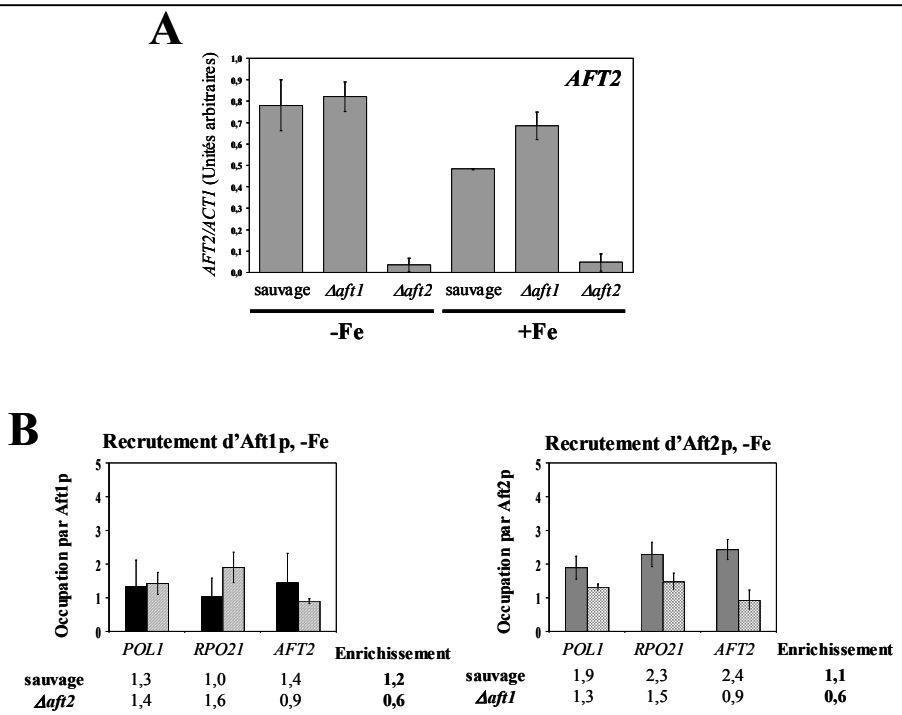

Figure 25 : Analyse de la régulation transcriptionnelle d'*AFT2*. A, analyse des transcrits *AFT2* par RT-PCR. Le protocole expérimental est identique à celui présenté figure 24. Les deux lots d'ARNm proviennent des souches indiquées, cultivées en condition de carence (-Fe) ou de présence de fer 100µM (+Fe). Les résultats obtenus pour *AFT2* ont été normalisés par le signal *ACT1* pour chaque lot, puis la moyenne a été calculée. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. B, analyse du recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur d'*AFT2*. Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées en duplicata, comme décrit dans le Matériel et Méthodes. La hauteur des histogrammes représente l'occupation de la protéine étudiée sur les promoteurs indiqués, et les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne calculé sur les deux expériences. *POL1* et *RPO21* sont utilisés comme témoins négatifs des expériences, et la valeur moyenne d'occupation obtenue pour ces témoins permet de calculer l'enrichissement d'Aft1p ou d'Aft2p sur le promoteur d'*AFT2*.

C-3. La quantité d'Aft1p ou d'Aft2p est un paramètre important pour la croissance des cellules

Nous avons mis en évidence qu'il existe une corrélation entre la quantité des protéines Aft1p ou Aft2p et leur activité transcriptionnelle, et que la surexpression d'*AFT1* ou d'*AFT2* permet d'abolir la sélectivité pour les promoteurs de ces deux facteurs de transcription (article 1). L'ensemble de ces résultats suggère que la régulation de la quantité des protéines Aft1p et Aft2p est un facteur déterminant pour contrôler leur activité, et montrent l'importance des

niveaux d'expression de ces protéines. Nous nous sommes donc naturellement interrogés sur les conséquences physiologiques entraînées par une surexpression des protéines Aft1p et Aft2p (sauvages ou mutantes). Pour répondre à cette question, les gènes *AFT1* et *AFT2* ainsi que leurs équivalents constitutifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up* ont été insérés dans des plasmides centromériques sous le contrôle de promoteurs répressibles par la tétracycline (Gari *et al.*, 1997). Dans ces plasmides, la variation du nombre de motifs TetO dans le promoteur permet d'induire plus ou moins fortement l'expression du gène situé en aval du promoteur en absence de tétracycline dans le milieu. Afin de faire varier le niveau d'expression de base des deux facteurs de transcription, nous avons donc cloné les gènes *AFT1* et *AFT2* ainsi que leurs équivalents constitutifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up* dans deux types de plasmides, contenant 2 ou 7 motifs TetO (pCM188 et pCM189) dans leur promoteur. Les souches transformées avec ces plasmides ont été déposées en gouttes sur des boîtes de milieu de sélection minimum classique (figure 26).

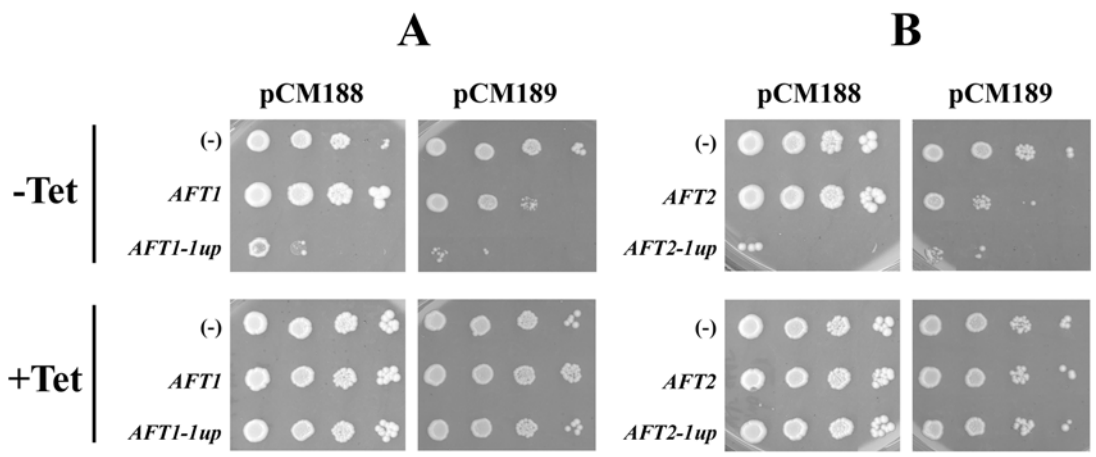

Figure 26 : Conséquences de la surexpression d'*AFT1* ou d'*AFT2* sur la croissance des cellules. Les souches *Δaft1* (A) ou *Δaft2* (B) ont été transformées avec les plasmides pCM188 ou pCM189 vides (-) ou contenant les gènes *AFT1* ou *AFT2* sauvages (*AFT1*, *AFT2*) ou mutants conférant une activité constitutive (*AFT1-1up*, *AFT2-1up*). Une série de dilutions d'un facteur 10 (DO_{600} initiale des cellules = 1) sont déposées en gouttes de 3µL sur des boîtes de milieu minimum dépourvu d'uracile (DOB-U) et avec (+Tet) ou sans (-Tet) ajout de tétracycline (0,1µg.mL^{-1}). Les boîtes ont été placées à 30°C pendant 4 à 6 jours.

Alors que la surexpression modérée d'*AFT1* ou d'*AFT2* (*via* le pCM188, contenant 2 motifs TetO) n'a pas d'effet sur la croissance des cellules, il est possible d'observer un retard de croissance des souches qui surexpriment plus fortement *AFT1* ou *AFT2* (*via* le pCM189, contenant 7 motifs TetO) (figure 26). Le retard de croissance observé est plus important dans

le cas de la surexpression d'*AFT2*. Les effets sont exacerbés lorsque ce sont les allèles mutés constitutifs *AFT1-1up* ou *AFT2-1up* qui sont surexprimés (figure 26). L'ensemble des phénotypes n'est plus observé lorsque la surexpression des allèles sauvages ou mutés est abolie par l'ajout de tétracycline dans le milieu (figure 26).

L'ensemble de ces résultats montre que la surexpression des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p, mais surtout celle des formes mutées *AFT1-1up* et *AFT2-1up,* est néfaste pour les cellules. Cela suggère que la régulation de la quantité de ces facteurs de transcription est un paramètre important pour leur activité au sein de la cellule. La surexpression d'*AFT2* ou d'*AFT2-1up* est plus délétère pour la cellule que la surexpression d'*AFT1* ou d'*AFT1-1up* (figure 26), ce qui indique que la quantité d'Aft2p au sein de la cellule soit davantage régulée que la quantité d'Aft1p. Ce résultat pourrait être en accord avec le fait que les variations de quantité de protéine les plus fortes sont observées pour Aft2p (article 1).

Chapitre II :
Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans le métabolisme du zinc

A. Pourquoi s'intéresser à la connexion fer-zinc ?

A-1. Introduction au métabolisme du zinc et à sa régulation

Le zinc est, comme le fer, un élément essentiel pour les organismes vivants. La levure dispose de systèmes impliqués dans deux aspects majeurs de l'homéostasie du zinc : son transport dans la cellule et son stockage dans la vacuole. Les gènes *ZRT1* et *ZRT2* codent, respectivement, pour les transporteurs membranaires à haute et basse affinité du zinc (Zhao et Eide, 1996 a et b). Le gène *FET4*, transporteur basse affinité de différents métaux (cuivre, fer, cadmium) est également capable d'importer du zinc dans la cellule (Waters et Eide, 2002).

Les gènes *ZRC1* et *COT1* codent des transporteurs responsables de l'import du zinc dans la vacuole (MacDiarmid *et al.*, 2000, Colin *et al.*, 2000). Le gène *ZRT3* code également pour un transporteur de zinc, qui est responsable de l'export du zinc hors de la vacuole (MacDiarmid *et al.*, 2000).

Les gènes *IZH1* et *IZH2*, codant pour des protéines appartenant à une famille de récepteurs membranaires stéroïdiens, semblent être eux aussi impliqués dans le métabolisme du zinc. Leur absence entraîne une sensibilité accrue au zinc des mutants, mais leur rôle exact dans l'homéostasie du zinc n'est pas encore élucidé (Lyons *et al.*, 2004).

La régulation de l'expression de la plupart de ces gènes a lieu au niveau transcriptionnel, et est médiée par le facteur de transcription Zap1p (Zhao et Eide, 1997, Lyons *et al.*, 2000). En condition de carence en zinc, le facteur de transcription Zap1p active l'expression des gènes *ZRT1*, *ZRT2*, *FET4*, *ZRT3*, *ZRC1*, *IZH1* et *IZH2* en se fixant sur la séquence consensus promotrice 5'-ACCTTNAAGGT-3' appelée ZRE (pour Zinc Responsive Element) (Zhao *et al.*, 1998, Lyons *et al.*, 2000). Le gène *ZRT1* est plus fortement régulé par

Zap1p que ne l'est *ZRT2*. Le gène *COT1*, induit par la carence en fer (Shakoury–Elizeh *et al.*, 2004), n'est pas régulé par Zap1p. En condition de carence en zinc, Zap1p active également la transcription des gènes *ZRC1*, *ZRT3*, *IZH1* et *IZH2*. L'augmentation de la transcription de *ZRC1* par Zap1p en condition de carence en zinc peut paraître paradoxale ; elle permettrait de prévenir les effets toxiques du zinc en le stockant dans la vacuole lorsque celui-ci est ajouté brutalement en excès dans le milieu (MacDiarmid *et al.*, 2003).

A-2. Aft1p et Aft2p sont impliqués dans la réponse à l'excès de plusieurs métaux

Stadler et Schweyen, en étudiant les mécanismes de détoxification du cobalt, ont montré qu'Aft1p était impliqué dans ce mécanisme, puisque la réponse première de la cellule en présence de cobalt est une augmentation Aft1p-dépendante de la transcription des gènes du transport du fer extracellulaire (Stadler et Schweyen, 2002). Cette induction conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de fer dans des cellules sauvages, qui semble être nécessaire pour tolérer la présence de cobalt dans le milieu. Une souche mutante *Δaft1* étant incapable d'induire ce système, elle est sensible à la présence de cobalt, à moins de lui fournir suffisamment de fer extracellulaire pour restaurer sa croissance (Stadler et Schweyen, 2002). Aucune donnée publiée n'existe concernant le rôle d'Aft2p dans la réponse au cobalt.

Dans cette même étude, Stadler et Schweyen ont montré que l'absence d'Aft1p provoquait également une sensibilité au zinc, au nickel, au manganèse et au calcium. La restauration de ces phénotypes par l'addition de fer n'a pas été testée, mais il a été montré que les transcrits du gène *FET3* sont plus abondants lorsque du zinc est présent en excès dans le milieu, ce qui suggère qu'Aft1p pourrait également être directement impliqué dans cette réponse.

En accord avec ce dernier résultat, Lyons et collaborateurs ont révélé par des analyses globales de transcriptome que les transcrits de l'ensemble des gènes du « régulon fer » sont plus abondants en présence d'un excès de zinc (3mM) dans le milieu (Lyons *et al*., 2004). Par comparaison de ces données avec nos analyses globales de transcriptome, nous avons pu constater que ceci est particulièrement vrai concernant les gènes du transport extracellulaire du fer qui sont régulés par Aft1p, *FIT2*, *FIT3*, *FRE1*, *FET3*, *ARN1*, *ENB1*, *SIT1* et *TAF1* (figure 27-A). Nous avons confirmé ces données en utilisant le plasmide rapporteur pFC-W

(Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Dans cette construction, le gène rapporteur LacZ est placé en aval de la séquence consensus de *FET3* reconnue par Afl1p, ce qui rend sa transcription strictement dépendante d'Aft1p (Blaiseau *et al.*, 2001). Dans une souche sauvage, la concentration croissante de zinc entraîne une augmentation croissante de l'activité β-galactosidase mesurée (figure 27-B). Ce résultat confirme les données globales du transcriptome en réponse à l'excès de zinc, et montre que la séquence consensus de *FET3* reconnue par Aft1p est suffisante pour médier cette réponse. En accord avec ce résultat, l'activité β-galactosidase est complètement abolie dans un contexte *Δaft1*, quelle que soit la quantité de zinc dans le milieu (figure 27-B). Aft1p pourrait donc être impliqué dans la réponse transcriptionnelle à l'excès de zinc dans le milieu.

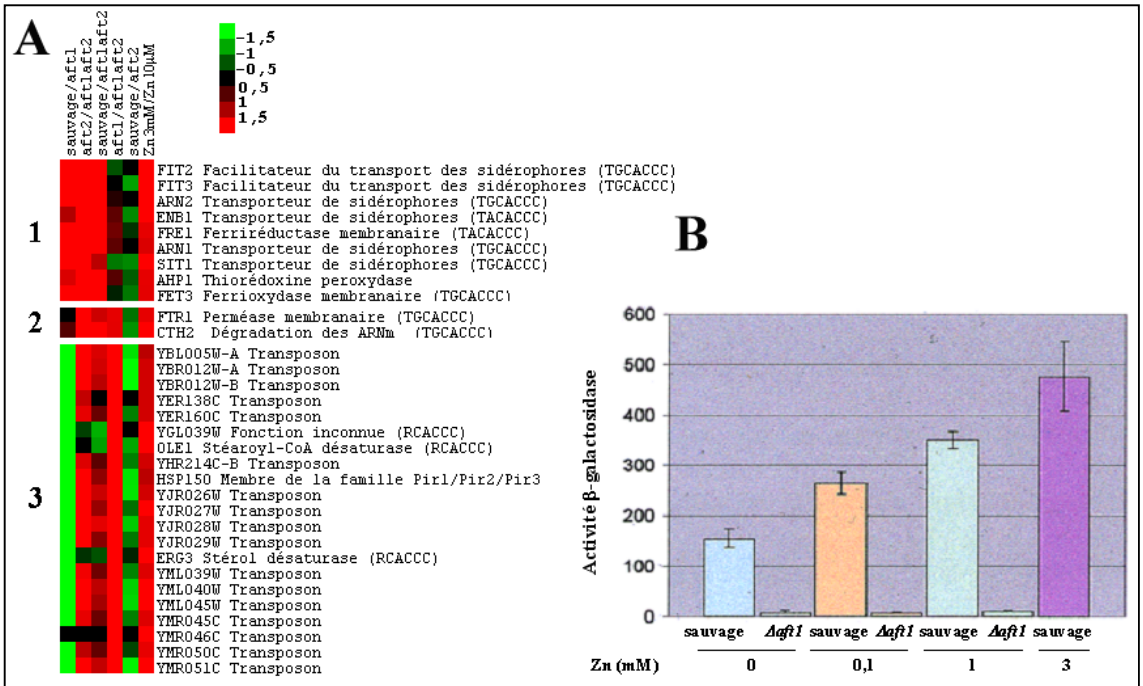

Figure 27 : Implication d'Aft1p et d'Aft2p dans la réponse à l'excès de zinc dans le milieu. A, Représentation des gènes dont la transcription est à la fois augmentée en excès de zinc dans le milieu, et diminuée chez les mutants *aft1* et/ou *aft2*. Les gènes sont classés en fonction de leur profil transcriptionnel : sous la dépendance d'Aft1p (1), d'Aft1p et d'Aft2p (2) ou d'Aft2p (3). La colonne « Zn 3mM/Zn 10µM » correspond à la comparaison sauvage 3mM/sauvage 10µM de zinc (Lyons *et al.*, 2000). L'échelle verticale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la condition 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la condition 2 sont en vert. B, Analyse de l'activité β-galactosidase du plasmide rapporteur pFC-W, dans des souches sauvage ou *Δaft1* cultivées avec des concentrations croissantes de zinc dans un milieu dépourvu de fer.

Les analyses globales de Lyons et collaborateurs ont également identifié des transposons Ty, ainsi que des gènes induits par l'hypoxie (dont *OLE1* et *ERG3*) dont les transcrits sont plus abondants en présence d'un excès de zinc dans le milieu (Lyons *et al.*,

2004). Nos analyses globales de transcriptome ont identifié ce deuxième groupe de gènes comme étant diminués en absence d'Aft2p (figure 27-A). Les analyses globales de la réponse à l'excès de zinc ne révèlent l'augmentation transcriptionnelle d'aucun des gènes d'utilisation du fer intracellulaire tels que *SMF3*, *MRS4*, *FET5* ou *FTH1*. Cependant, nous avons pu montrer qu'Aft2p active la transcription de ces gènes spécifiquement dans des conditions où Aft1p est absent (article 1). Il n'est donc pas exclu qu'Aft2p puisse lui aussi intervenir pour mobiliser le fer nécessaire pour la réponse à l'excès de zinc, notamment en absence d'Aft1p.

A-3. Le mutant *Δyfh1* est dérégulé pour l'homéostasie du zinc

Des études biochimiques ont montré que le fer et le zinc sont des substrats compétitifs pour la ferrochélatase, dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème (Camadro et Labbe, 1982). Dans un mutant Δ*yfh1*, dérégulé pour l'homéostasie du fer, le fer mitochondrial n'est pas disponible pour la ferrochélatase, et c'est une production de zinc-protoporphyrine qui est observée chez ce mutant (Lesuisse *et al.*, 2003). Ce dernier résultat établit un lien physiologique entre les deux métabolismes fer et zinc, et une analyse détaillée de l'homéostasie du zinc dans une souche mutante Δ*yfh1* a été réalisée dans le laboratoire (Santos *et al.*, 2003). La quantité de zinc intracellulaire dans un mutant Δ*yfh1* est diminuée par rapport à une souche sauvage, ainsi que les transcrits des gènes du « régulon zinc » (cibles de Zap1p), notamment *ZRT1* et *ZRT3*. Par ailleurs, il a été montré que l'ajout de zinc dans le milieu de culture permet de restaurer certains phénotypes du mutant *Δyfh1* (Santos *et al.*, 2003) : l'addition de zinc réduit la quantité de fer accumulée par le mutant à un niveau sauvage, et prévient, entre autres, les effets délétères du peroxyde d'hydrogène.

L'ensemble de ces résultats montre qu'un mutant dérégulé pour l'homéostasie du fer est également dérégulé pour l'homéostasie du zinc. Le comportement du mutant *Δyfh1* est paradoxal, aussi bien en ce qui concerne le métabolisme du fer que celui du zinc, et les défauts observés pour les deux métabolismes sont opposés. Le mutant *Δyfh1* possède une surcharge en fer mitochondrial, et pourtant la transcription des gènes régulés par Aft1p et Aft2p est augmentée comme si ce mutant était carencé en fer (Foury et Talibi, 2001). A l'inverse, le mutant Δ*yfh1* est carencé en zinc, et pourtant la transcription des gènes du « régulon zinc » est diminuée par rapport à une souche sauvage (Santos *et al.*, 2003). Il existe donc une interconnexion entre les homéostasies du fer du zinc. Nous nous sommes demandé

s'il existait des mécanismes de régulations communs pour contrôler l'homéostasie de ces deux métaux. Cette question a été abordée par l'étude d'un possible rôle d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation du métabolisme du zinc.

B. Etude des effets du zinc en absence d'*AFT1* et/ou d'*AFT2* : confirmation de la connexion entre les deux métabolismes

B-1. Aft1p et Aft2p sont nécessaires pour la tolérance au zinc

Nous avons étudié l'effet du zinc sur des souches mutantes en comparant leur capacité à croître en présence de quantités croissantes de zinc dans un milieu minimum (contenant en moyenne 1,25µM de fer et 2,5µM de zinc) (figure 28).

Les souches sauvage et *Δaft2* ne commencent à être sensibles au zinc que lorsque celui-ci est présent à 15mM dans le milieu (figure 28). Une souche *Δaft1* est sensible à partir d'une concentration de zinc supérieure à 5mM dans le milieu. Cette sensibilité est d'autant plus grande que la quantité de zinc dans le milieu est importante, et la souche *Δaft1* est incapable de croître en présence de 15mM de zinc dans le milieu (figure 28). La souche double mutante *Δaft1Δaft2* est hypersensible au zinc, et la présence de 0,1mM de ce métal dans le milieu suffit à affecter la croissance de cette souche (figure 28). La sensibilité au zinc de la souche *Δaft1Δaft2* est elle aussi fonction de la quantité de zinc dans le milieu, et une concentration de 5mM de zinc empêche totalement cette souche de croître. L'ensemble de ces résultats est en accord avec un rôle d'Aft1p dans la réponse à l'excès de zinc dans le milieu, et montre qu'Aft2p pourrait être lui aussi sollicité dans cette réponse lorsqu'Aft1p est absent.

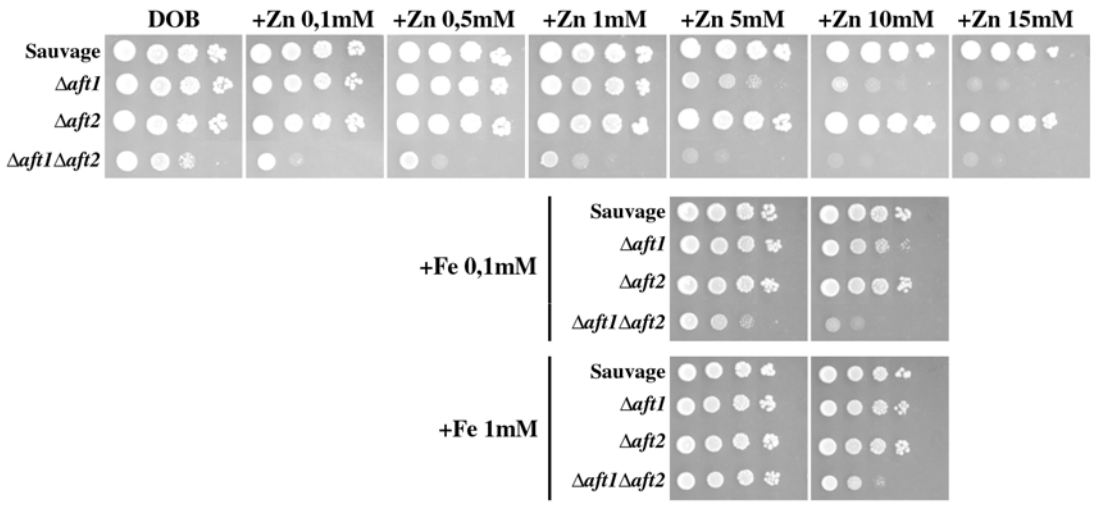

Figure 28 : Aft1p et Aft2p sont nécessaires pour mobiliser le fer utile à la tolérance au zinc. Les souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2* et *Δaft1Δaft2* (contexte BY4742) sont diluées à DO_{600} = 1 et une série de dilutions d'un facteur 10 est déposée en gouttes de 3µL sur des boîtes de milieu minimum complet (DOB) avec ou sans ajout de fer 0,1 ou 1mM, et en présence de quantités croissantes de zinc ($ZnSO_4$). Les boîtes ont été placées à 30°C pendant 4 jours.

Pour voir si la sensibilité au zinc des mutants *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* est due à leur incapacité à accroître la quantité de fer au sein de la cellule, nous avons regardé si l'ajout de fer dans le milieu pouvait restaurer le défaut de croissance de ces souches en présence de fortes concentrations de zinc dans le milieu (figure 28). A 5mM de zinc dans le milieu, l'ajout de 0,1mM de fer suffit à restaurer pleinement la croissance de la souche *Δaft1*. La restauration complète de la croissance de la souche *Δaft1Δaft2* nécessite une quantité plus importante de fer ajouté (1mM). A 10mM de zinc dans le milieu, 0,1mM de fer ne suffit plus à restaurer pleinement la croissance de la souche *Δaft1*, et l'ajout de 1mM de fer ne suffit plus à restaurer la croissance de la souche *Δaft1Δaft2*. L'ajout de fer dans le milieu permet donc de compenser (plus efficacement pour *Δaft1* que pour *Δaft1Δaft2*) le défaut de croissance des souches *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* en présence de zinc dans le milieu.

Des tests de croissance des souches ont également été effectués dans un milieu liquide dépourvu de fer, de zinc et de cuivre (contenant en moyenne moins de 0,1µM de ces métaux). Ces conditions expérimentales permettent de faire varier à volonté la quantité respective de

chaque métal dans le milieu, autorisant ainsi une meilleure évaluation de la relation entre l'homéostasie du fer et la tolérance au zinc.

Différentes souches sauvages et mutantes ont été cultivées dans ce milieu liquide dans lequel ont été ajoutées des quantités croissantes de zinc (figure 29-A). L'absence de zinc dans le milieu utilisé a été vérifiée en utilisant le mutant *Δzap1* : celui-ci présente un retard de croissance dans le milieu dépourvu de zinc, restauré par l'ajout de 2,5µM de zinc (figure 29-A).

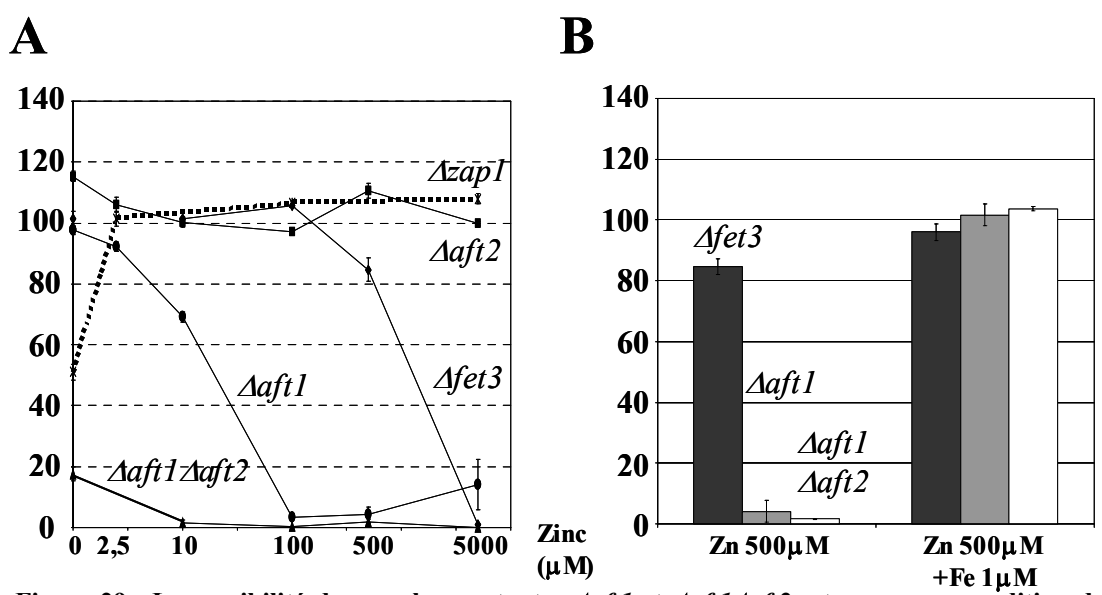

Figure 29 : La sensibilité des souches mutantes *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* est accrue en condition de carence en fer. Les souches sauvage (contexte BY4742 et BY4741), *Δaft1*, *Δaft2*,*Δaft1Δaft2*, *Δzap1* (contexte BY4742) et *Δfet3* (contexte BY4741) ont été précultivées dans le milieu dépourvu de fer, de zinc et de cuivre pendant 24 heures (0,5µM de fer ont été rajoutés pour la souche *Δaft1Δaft2*). Les cellules ont alors été diluées à DO_{600} de 0,005 dans le même milieu contenant des quantités croissantes de zinc sans (A) ou avec ajout de fer 1µM (B), et laissées pendant 48 heures à 30°C. Le contexte génétique du mutant *Δfet3* étant différent du contexte génétique des mutants *Δaft1*, *Δaft1Δaft2* et *Δzap1*, les valeurs de DO_{600} des mutants sont exprimées en pourcentage de la valeur de DO_{600} des souches sauvage isogéniques. Les valeurs obtenues pour les souches sauvages (4,62±0,41 pour BY4742, 5,72±0,32 pour BY4741) ne varient pas en fonction de la quantité de zinc ajouté. Les barres d'erreurs représentent la variation standard obtenue pour 3 cultures indépendantes.

De manière spectaculaire, la souche *Δaft1Δaft2* est capable de croître jusqu'à une DO_{600} de 0,86 (18% de la DO_{600} sauvage) en condition de carence en fer, à condition que le zinc soit également absent du milieu (figure 29-A). L'incapacité de cette souche à croître en condition de carence en fer est donc en partie due à son hypersensibilité au zinc dans cette condition. La souche *Δaft1* présente un défaut de croissance avec 10µM de zinc dans le milieu, et devient incapable de croître avec 100µM de zinc ajouté (figure 29-A). La souche

Δfet3 quant à elle ne commence à souffrir de la présence de zinc que lorsque ce métal est à une concentration de 500µM dans le milieu, et est incapable de croître en présence de 5mM de ce métal (figure 29-A). Le défaut de croissance des souches *Δaft1*, *Δaft1Δaft2* à 500µM de zinc est par ailleurs parfaitement restauré par l'addition de 1µM de fer dans le milieu (figure 29-B).

L'absence du facteur de transcription Aft1p entraîne une hypersensibilité au zinc en condition de carence en fer, qui est exacerbée par l'absence d'Aft2p. La sensibilité au zinc des mutants délétés d'*AFT1* est donc accrue par la carence en fer : alors qu'une concentration de zinc de 5mM est nécessaire pour voir une sensibilité au zinc du mutant *Δaft1* sur un milieu minimum classique (contenant 1,25µM de fer, figure 28), une concentration de 10µM de zinc dans le milieu dépourvu de fer est suffisante. Ce phénotype ne peut pas s'expliquer seulement par un défaut de transport du fer, puisque le mutant *Δfet3* n'est affecté qu'en présence de quantités beaucoup plus importantes de zinc dans le milieu (500µM contre 10µM pour *Δaft1*). Pour apporter des éléments de réponse concernant ces données, nous avons cherché à savoir si les quantités respectives des métaux fer et zinc dans les cellules pouvaient rendre compte des phénotypes observés chez les mutants.

B-2. Effet des délétions sur la quantité intracellulaire des métaux fer et zinc

B-2-a. L'ajout de zinc ne provoque pas de diminution de la quantité de fer intracellulaire chez les mutants

Les souches mutantes *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* cultivées dans un milieu contenant 10µM de fer accumulent une quantité de fer intracellulaire diminuée par rapport à une souche sauvage (figure 30). La présence de zinc dans le milieu peut-elle entraîner une diminution accrue de la quantité de fer intracellulaire chez les mutants ? Pour répondre à cette question, les cellules ont été cultivées en présence de fer 10µM et de quantités de zinc variables (figure 30-A). La quantité de fer intracellulaire est diminuée chez les mutants *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* indépendamment de la quantité de zinc dans le milieu, elle n'est donc pas fonction de la quantité de zinc dans la gamme de concentrations testée.

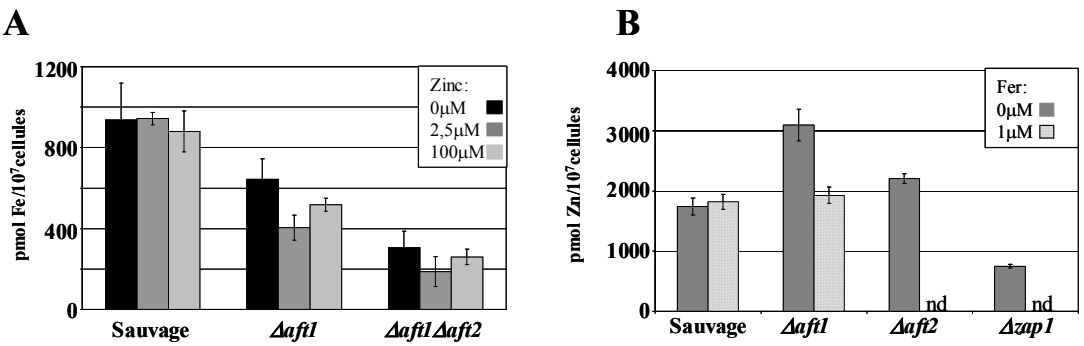

Figure 30 : Quantités intracellulaires de fer et de zinc dans les souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2* et *Δzap1* en présence de concentrations variables de fer et de zinc. Les cellules ont été ensemencées à DO_{600} 0,08 dans le milieu dépourvu de fer, de zinc et de cuivre additionné des quantités de métaux indiquées. Au bout de 20 heures croissance en moyenne (DO_{600} comprise entre 3 et 5), les cellules ont été centrifugées et la quantité de métal mesurée par spectroscopie atomique d'absorption. A, Quantité de fer intracellulaire (pour 10µM dans le milieu) en fonction de la quantité de zinc dans le milieu. B, quantité de zinc intracellulaire pour 10µM de zinc dans le milieu, en fonction de la quantité de fer. Les barres d'erreurs représentent la variation standard des valeurs obtenues sur 3 clones indépendants. nd, non déterminé.

B-2-b. La carence en fer entraîne une dérégulation de l'homéostasie du zinc du mutant Δaft1

Une condition de carence en fer rend les mutants sensibles à de faibles quantités de zinc dans le milieu. Cette sensibilité peut-elle être liée à un défaut de l'homéostasie du zinc dans ces conditions ? Pour répondre à cette question, la quantité de zinc intracellulaire a été mesurée dans les souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2* et *Δzap1* cultivées en absence de fer et avec 2,5 ou 10µM de zinc dans le milieu. La souche *Δaft1Δaft2* n'a pu être utilisée en raison de son incapacité à croître dans ces conditions (figure 29).

Pour une quantité de 10 µM de zinc dans le milieu (quantité sublétale pour la souche *Δaft1*, figure 29), la quantité de zinc intracellulaire de la souche *Δaft1* est 1,8 fois plus élevée que dans la souche sauvage (figure 30-B). L'ajout de fer 1µM dans le milieu permet de rétablir le niveau de zinc intracellulaire du mutant *Δaft1* à un niveau sauvage. Ces résultats sont en accord avec la restauration de croissance de la souche *Δaft1* en présence de fer dans le milieu (figure 29).

Pour une quantité de 2,5µM de zinc dans le milieu, nous n'avons pas observé de différences de quantité de zinc intracellulaire entre les souches sauvage, *Δaft1* et *Δaft2*

(résultats non montrés). Cela est en accord avec l'absence de phénotypes de croissance observés pour cette quantité de zinc dans le milieu (figure 29).

Ces résultats suggèrent que l'hypersensibilité au zinc du mutant *Δaft1* pourrait être due à une accumulation anormale de zinc dans les cellules. La croissance de la souche *Δaft1* étant progressivement affectée par l'ajout de zinc dans le milieu, il est possible que l'accumulation de zinc dans les cellules soit fonction de la quantité de zinc ajoutée dans le milieu. Il faudrait pour vérifier cela réaliser de nouvelles mesures avec des quantités plus importantes de zinc dans le milieu, mais toujours sublétales (50µM par exemple).

L'absence d'Aft1p provoque une hypersensibilité au zinc dans un milieu carencé en fer, exacerbée par l'absence d'Aft2p. Cette hypersensibilité pourrait être expliquée par une accumulation anormale de zinc dans les cellules. A l'inverse, le zinc est bénéfique pour la souche *Δyfh1*, et la déficience en zinc de ce mutant a pu être corrélée à une sous-expression du transporteur à haute affinité Zrt1p (Santos *et al.*, 2003). L'accumulation de zinc chez le mutant *Δaft1* pourrait donc être, à l'inverse, la conséquence d'une augmentation de la quantité des transporteurs du zinc.

Nos analyses globales de transcriptome (effectuées dans le contexte génétique CM3260) révèlent que la transcription des gènes *ZRT1* et *ZRT3* est diminuée en absence à la fois d'Aft1p et d'Aft2p. Par ailleurs, *ZRT1* a également été montré comme étant activé par *AFT2-1up* (Rutherford *et al.*, 2001). Les gènes *ZRT1* et *ZRT3* possèdent une séquence 5'-TACACCC-3' dans leur promoteur ($^{-358}$5'-TACACCC-3'$^{-352}$ pour *ZRT1*, $^{-226}$5'-TACACCC-3'$^{-220}$ pour *ZRT3*), ce qui suggère un rôle direct d'Aft1p et d'Aft2p dans la transcription de ces gènes. Pour préciser davantage le rôle d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation du métabolisme du zinc, nous avons donc commencé une étude du profil transcriptionnel de *ZRT1* et *ZRT3* chez les mutants déficients pour les régulateurs de l'homéostasie du fer. Cette étude a été effectuée dans le contexte génétique BY4742, utilisé pour les expériences de croissance et de mesures de métaux présentées précédemment.

C. Aft1p et Aft2p participent directement à la régulation transcriptionnelle de *ZRT1* et *ZRT3*

C-1. Aft1p et Aft2p sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *ZRT1*

C-1-a. Les effets d'Aft1p et d'Aft2p sur la transcription de ZRT1 nécessitent la présence de Zap1p

En condition de carence en fer, l'absence d'*AFT2* seul n'a pas d'effet sur la quantité de transcrits *ZRT1* (figure 31). Par contre, la transcription de *ZRT1* peut être 2,8 fois augmentée en absence d'*AFT1*, ce qui pourrait être corrélé à l'augmentation de la quantité de zinc intracellulaire qui est observée chez ce mutant. La surexpression d'*AFT1* dans ce contexte permet de ramener les transcrits *ZRT1* à un niveau sauvage, ce qui montre que l'effet observé en *Δaft1* est bien lié à l'absence d'Aft1p. L'augmentation transcriptionnelle de *ZRT1* dans le contexte *Δaft1* est dépendante d'Aft2p puisqu'elle est totalement abolie lorsqu'*AFT2* est délété dans le contexte *Δaft1*. L'ensemble de ces variations rappelle les résultats obtenus concernant la régulation du gène *MRS4* (article 1), ce qui suggère que *ZRT1* pourrait être une cible directe d'Aft2p, activée en absence d'Aft1p.

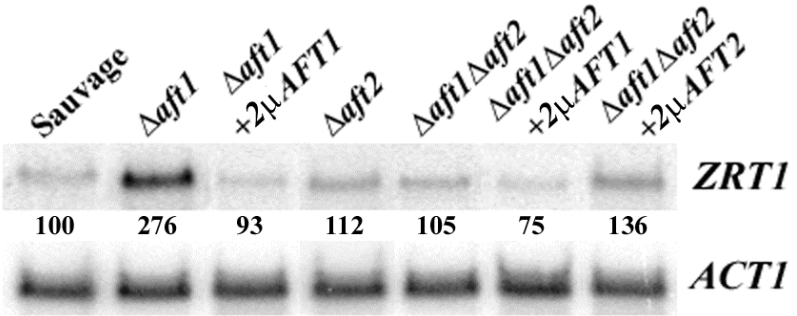

Figure 31 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT1* chez les mutants *Δaft1* et/ou *Δaft2* en condition de carence en fer. Les souches ont été précultivées avec 1μM de fer dans le milieu (contenant par ailleurs 2,5μM de zinc), puis diluées dans le milieu sans fer, pendant 5 heures. 2μ*AFT1* et 2μ*AFT2* désignent les plasmides pEG202-*AFT1* et pEG202-*AFT2*. Le gène *ACT1* est utilisé pour la normalisation de la quantité de transcrits dans chaque échantillon. La valeur obtenue pour le transcrit *ZRT1* chez le sauvage a été ajustée à 100.

Nous avons également analysé l'effet de la surexpression d'*AFT1* et d'*AFT2* sur la transcription de *ZRT1* dans un contexte *Δaft1Δaft2* (figure 31). La surexpression d'*AFT1* en contexte *Δaft1Δaft2* entraîne la diminution de la transcription de *ZRT1* d'un facteur 1,3 par rapport à la souche sauvage. Ce résultat montre que la surexpression d'*AFT1* a un effet négatif sur la transcription de *ZRT1*, à la fois dans un contexte *Δaft1* et dans un contexte *Δaft1Δaft2*. La surexpression d'*AFT2* dans un contexte double mutant quant à elle permet d'augmenter légèrement (facteur 1,3) la transcription de *ZRT1* (figure 31). Ceci est en accord avec un rôle activateur d'Aft2p sur la transcription de *ZRT1*.

Le gène *ZRT1* étant régulé majoritairement par Zap1p, nos résultats indiquent la possibilité d'un mécanisme de régulation de ce gène à la fois par Aft1p, Aft2p et Zap1p. Afin d'apporter des éléments de réponse concernant les mécanismes de régulation de *ZRT1* par Aft1p, Aft2p et Zap1p, nous avons regardé comment le rôle d'Aft1p et d'Aft2p pouvait s'articuler par rapport à Zap1p. Pour cela, nous avons construit les mutants *Δzap1*, *Δaft1Δzap1* et *Δaft2Δzap1* et analysé les transcrits *ZRT1* dans ces souches où Zap1p est absent (figure 32). La simple délétion de *ZAP1* suffit à abolir totalement la transcription de *ZRT1*. L'augmentation des transcrits observée en absence d'Aft1p est également abolie lorsque Zap1p est absent. Ce résultat suggère qu'Aft2p seul ne peut activer la transcription de *ZRT1*, et que l'effet médié par Aft2p en absence d'Aft1p nécessite la présence de Zap1p dans la cellule.

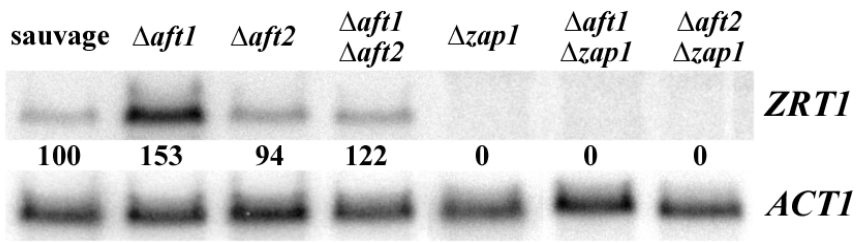

Figure 32 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT1* en absence de Zap1p en condition de carence en fer. Les souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2*, *Δaft1Δaft2*, *Δzap1*, *Δaft1Δzap1* et *Δaft2Δzap1* ont été précultivées dans un milieu dépourvu de fer et de cuivre en présence de 1µM de fer, puis diluées à DO_{600}=0,3 dans le même milieu en absence de fer pendant 5 heures. Le gène *ACT1* est utilisé pour la normalisation de la quantité de transcrits dans chaque échantillon. La valeur obtenue pour le transcrit *ZRT1* chez le sauvage a été ajustée à 100.

C-1-b. La régulation de ZRT1 par Aft1p et Aft2p est fonction du contexte génétique utilisé

Comme je l'ai mentionné précédemment, les analyses globales de transcriptome ont été réalisées avec des souches du contexte CM3260, alors que les analyses phénotypiques, les Northern blots et les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été réalisées avec des souches du contexte BY4742. La régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme du fer entre ces deux contextes est globalement similaire, et les résultats de l'analyse globale en contexte CM3260 ont pu être corrélés aux résultats de Northern blot en contexte BY4242. En revanche, les résultats de Northern blot en contexte BY4742 concernant la transcription de *ZRT1* ne reflètent pas les résultats de nos analyses globales de transcriptome en contexte CM3260 : la transcription de *ZRT1* est augmentée en absence d'Aft1p dans le contexte BY4742 mais ne varie pas dans le contexte CM3260. Elle est diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p dans le contexte CM3260 et reste inchangée dans le contexte BY4742. Afin de confirmer ces résultats de transcriptome, nous avons également regardé la régulation par Aft1p et Aft2p des transcrits *ZRT1* en condition de carence en fer dans le contexte génétique CM3260 utilisé pour réaliser les analyses globales (figure 33). Dans ces conditions, la transcription de *ZRT1* est diminuée d'un facteur 1,4 dans le contexte double mutant *aft1aft2* par rapport au sauvage, et la surexpression d'*AFT2* dans la souche *aft1aft2* permet d'augmenter la transcription de *ZRT1* d'un facteur 1,3 par rapport à la souche sauvage (figure 33). Les résultats obtenus dans le contexte CM3260 sont donc différents de ceux obtenus dans le contexte BY4742, mais ils restent en accord avec un rôle positif d'Aft2p dans la régulation de la transcription de *ZRT1*, et montrent l'influence du contexte génétique sur l'état de carence en fer des cellules.

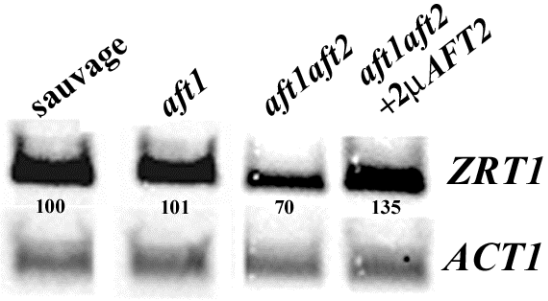

Figure 33 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT1* chez les mutants *aft1* et *aft1aft2* (contexte CM3260) en condition de carence en fer. Les souches sauvage, *aft1* et *aft1aft2* (contexte CM3260) ont été précultivées dans un milieu dépourvu de fer et de cuivre en présence de 1μM de fer, puis diluées à DO_{600}=0,3 dans le même milieu en absence de fer pendant 5 heures. 2μ*AFT2* désigne le plasmide pEG202-*AFT2*. Le gène *ACT1* est utilisé pour la normalisation de la quantité de transcrits dans chaque échantillon. La valeur obtenue pour le transcrit *ZRT1* chez le sauvage a été ajustée à 100.

C-1-c. La régulation de ZRT1 par Aft1p et Aft2p est fonction du contenu en fer du milieu

Nous avons voulu vérifier que l'augmentation transcriptionnelle de *ZRT1* dans une souche *Δaft1* était fer-dépendante. Dans des conditions de culture identiques aux conditions utilisées pour révéler le rôle du fer sur la transcription de *FET3*, *FTR1*, *SMF3* ou *MRS4* (culture pendant 5 heures dans le milieu dépourvu de fer, article 1), nous avons observé un effet partiel du fer sur la transcription de *ZRT1* (figure 34-A). Lorsque les cellules sont cultivées en présence de fer sur une plus longue période (figure 34-B et C), l'augmentation de la transcription de *ZRT1* dans la souche *Δaft1* est complètement abolie. Dans ces conditions, il est également possible de révéler un effet du fer sur la transcription de *ZRT1* en contexte sauvage.

Ces résultats indiquent que la régulation par le fer de la transcription de *ZRT1* possède une cinétique particulière, plus lente que celle des gènes directement impliqués dans le métabolisme du fer. Cela suggère à nouveau que la régulation du gène *ZRT1* par les facteurs de transcription Aft1p et Aft2p soit le résultat de mécanismes complexes qui restent encore à élucider.

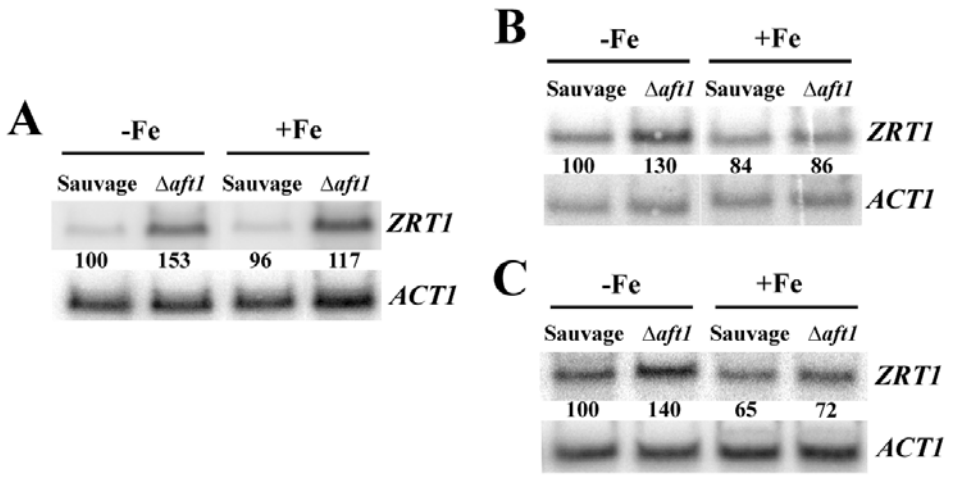

Figure 34 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT1* chez le mutant *Δaft1* en fonction de l'état en fer des cellules. Les souches sauvage et *Δaft1* ont été cultivées dans un milieu dépourvu de fer et de cuivre en présence (+Fe) ou en absence (-Fe) de 100µM de fer dans le milieu. Différentes conditions de préculture et de culture ont été testées. (A) Les cellules ont été précultivées avec 1µM de fer puis diluées dans un milieu avec ou sans fer pendant 5 heures. (B) Les cellules ont été précultivées avec 1 ou 100µM de fer dans le milieu, puis diluées dans le même milieu, avec ou sans fer, pendant 5 heures. (C) Les cellules ont été précultivées comme en A, puis diluées dans un milieu avec ou sans fer pendant 15 heures. Le gène *ACT1* est utilisé pour la normalisation de la quantité de transcrits dans chaque échantillon. La valeur obtenue pour le transcrit *ZRT1* chez le sauvage en carence en fer a été ajustée à 100.

C-2. Aft1p et Aft2p sont recrutés sur le promoteur de *ZRT1*

La présence d'une séquence $^{-358}$5'-TACACCC-3'$^{-352}$ dans le promoteur de *ZRT1* suggère qu'Aft1p et Aft2p peuvent être directement impliqués dans sa régulation transcriptionnelle. Nous avons donc réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pour observer le recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *ZRT1*, dans des conditions identiques à celles utilisées pour les expériences de Northern blot (culture des cellules dans le milieu dépourvu de fer pendant 5 heures, figure 31). C'est dans ces conditions que nous avons mis en évidence, entre autres, le recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur les promoteurs des gènes *FET3*, *FTR1*, *SMF3* et *MRS4* (article 1 et chapitre I).

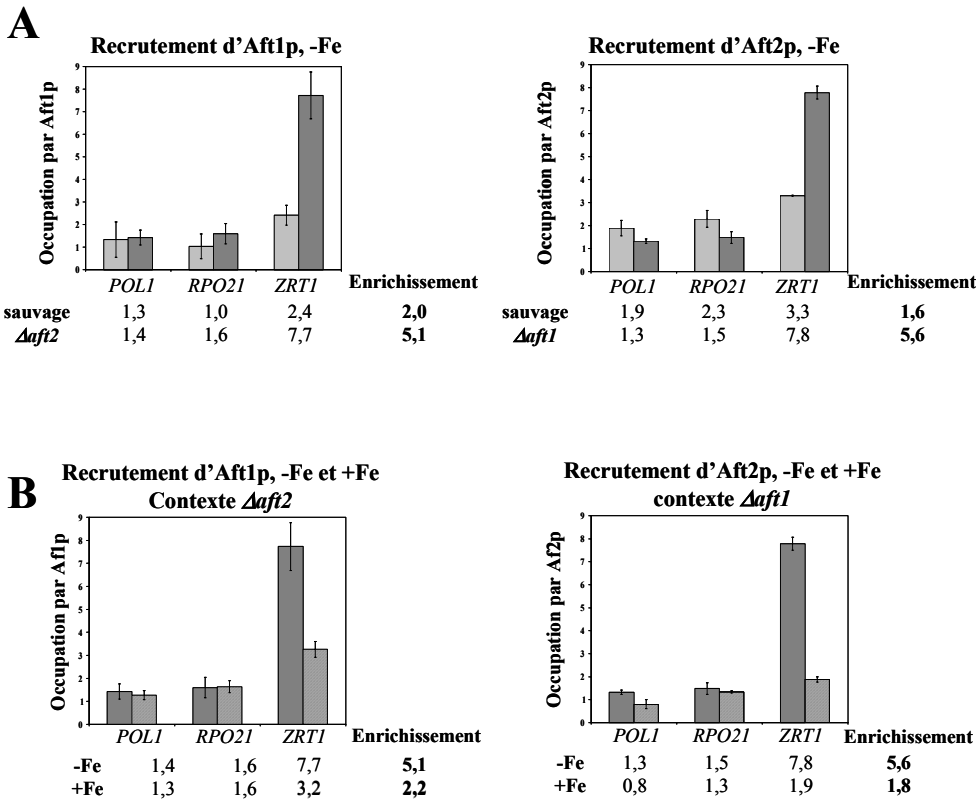

Figure 35 : Implication directe d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation transcriptionnelle de *ZRT1*. Les souches portant Aft1p ou Aft2p étiquetés avec 3 copies de l'épitope HA dans un contexte sauvage ou délété du paralogue ont été cultivées en absence (A) ou en présence de fer 100µM dans le milieu (B). Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées en duplicata, et les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne calculé sur les deux expériences. *POL1* et *RPO21* sont utilisés comme témoins négatifs des expériences, et la valeur moyenne d'occupation obtenue pour ces témoins permet de calculer l'enrichissement d'Aft1p ou d'Aft2p sur le promoteur de *ZRT1*.

Ce n'est qu'en absence du paralogue que l'on peut révéler clairement le recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *ZRT1* (figure 35-A). La fixation de l'activateur Aft2p sur le promoteur de *ZRT1* dans un contexte où Aft1p est absent est en accord avec l'augmentation transcriptionnelle de *ZRT1* dans le contexte *Δaft1*. Par contre, la fixation d'Aft1p sur ce même promoteur ne semble pas être corrélée à un effet sur la transcription de *ZRT1* en *Δaft2* (figure 31). Elle montre néanmoins la possibilité d'un rôle direct d'Aft1p sur la transcription de *ZRT1*. Le recrutement d'Aft1p et d'Aft2p est diminué par l'ajout de 100µM de fer dans le milieu (figure 35-B). Comme nous l'avons montré concernant le recrutement sur les promoteurs des gènes du « régulon fer » (article 1), l'ajout de 100µM de fer n'a qu'un effet partiel sur le recrutement d'Aft1p (figure 35-B). L'effet du fer sur le recrutement d'Aft2p est en accord avec les résultats de Northern blot effectués dans les mêmes conditions,

pour lesquels l'augmentation de la transcription de *ZRT1* en *Δaft1* est diminuée par l'ajout de 100µM de fer dans le milieu (figure 34-A).

Ces résultats indiquent donc qu'Aft1p et Aft2p sont impliqués directement dans la régulation de *ZRT1*, et permet de disposer pour la première fois d'une base moléculaire pour comprendre et analyser la connexion qui existe entre la régulation de l'homéostasie du zinc et celle du fer. Aft1p et Aft2p pourraient interagir avec Zap1p sur le promoteur de *ZRT1*. Le gène *ZRT1* est localisé dans une région subtélomérique du chromosome VII. Il possède 4 séquences consensus de fixation par Zap1p (Lyons *et al.*, 2000, figure 36). Il a été montré qu'au moins 3 de ces séquences (1, 2 et 3, figure 36) sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle de *ZRT1* par Zap1p (Zhao *et al.*, 1998). La distance qui sépare la séquence consensus de fixation d'Aft1p et d'Aft2p de la séquence 1 de fixation de Zap1p est de 40pb, et elle est de 15pb pour la séquence 4 de fixation de Zap1p, ce qui suggère une interaction physique possible entre les facteurs de transcription Aft1p, Aft2p et Zap1p sur le promoteur de *ZRT1*. Ces interactions potentielles pourraient expliquer pourquoi les modalités de liaison d'Aft1p et d'Aft2p sur le promoteur de *ZRT1*, ainsi que la régulation par le fer de la transcription de ce gène diffèrent des résultats obtenus concernant les gènes du métabolisme du fer (article 1).

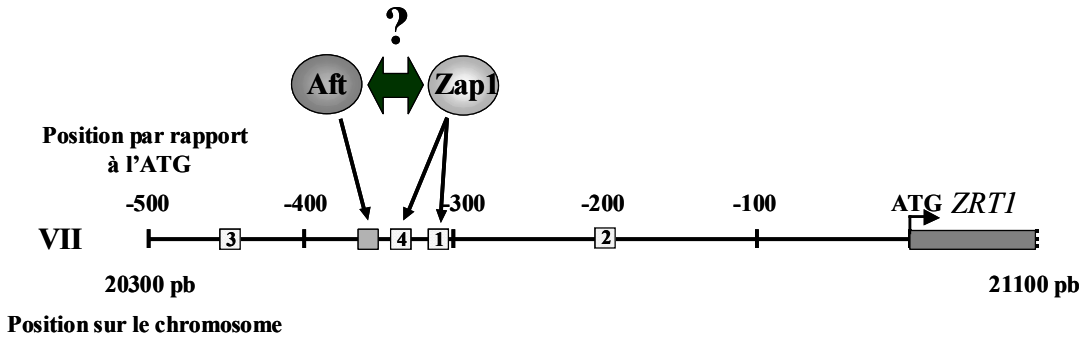

Figure 36 : Localisation des séquences de fixation d'Aft1p/Aft2p et de Zap1p dans le promoteur de *ZRT1*. Les boîtes numérotées représentent les séquences potentielles de fixation de Zap1p. 1 : $^{-318}$5'-ACCCTCAAGGT-3'$^{-308}$, 2 : $^{-203}$5'-ACCTTGAAGGT-3'$^{-193}$, 3 : $^{-445}$5'-ACCTTTGGGGT-3'$^{-435}$, 4 : $^{-337}$5'-ACCTCGAAGGA-3'$^{-327}$. La boîte grise représente la séquence $^{-358}$5'-TACACCC-3'$^{-352}$ de fixation d'Aft1p et d'Aft2p.

C-3. Le gène *ZRT3* pourrait être lui aussi directement régulé par Aft1p et Aft2p

C-3-a. Aft1p et Aft2p participent à la régulation de ZRT3 dans certaines conditions

Dans des conditions de culture identiques à celle utilisées pour révéler un effet d'Aft1p et d'Aft2p sur le gène *ZRT1* (culture des cellules dans le milieu dépourvu de fer pendant 5 heures), nous n'avons pas observé de changement dans la quantité de transcrit du gène *ZRT3*. Puisque nous avons pu mettre en évidence une régulation différentielle de certains gènes du « régulon fer » en fonction de la condition de carence en fer des cellules, et que la transcription de *ZRT1* dépend elle aussi des conditions de culture, nous avons cherché à voir s'il pouvait en être de même concernant *ZRT3*. Les cellules ont donc été cultivées pendant une période prolongée (15 heures) en conditions de carence ou de présence de fer (figure 37-A). Dans cette condition de carence en fer prolongée, la souche *Δaft1Δaft2* est incapable de croître, et n'a donc pu être utilisée.

En condition de carence en fer prolongée, la transcription de *ZRT3* est augmentée aussi bien en absence d'Aft1p (1,3 fois) qu'en absence d'Aft2p (1,8 fois) (figure 37-A). La transcription de *ZRT3* n'est que légèrement diminuée par la délétion de *ZAP1* (1,2 fois) ce qui suggère que Zap1p n'est pas le régulateur majeur de ce gène. Ce résultat est assez déroutant par rapport à ce qui est admis dans la littérature : le gène rapporteur LacZ, placé sous le contrôle du promoteur *ZRT3*, est exprimé en condition de carence en zinc, expression qui est totalement abolie dans un mutant *Δzap1* (MacDiarmid *et al.*, 2000). L'expression du gène LacZ est également constitutivement induite dans un mutant *ZAP1-1up* (MacDiarmid *et al.*, 2000). Ces données ont été reproduites dans les analyses globales de transcriptome visant à identifier les gènes cibles potentiels de Zap1p (Lyons *et al.*, 2000), et l'ensemble de ces résultats démontre clairement que *ZRT3* est un gène cible de Zap1p. Nous avons donc vérifié que la transcription de ce gène était bien régulée par le zinc afin de nous assurer de la spécificité du signal détecté par Northern blot (figure 37-B).

Dans ces conditions de culture (sur 15 heures) le fer régule la transcription de *ZRT3*, de manière similaire à ce qui avait été observé pour *ZRT1*. Lorsque le fer 100µM est ajouté dans le milieu, plus aucun effet n'est observé sur la transcription de *ZRT3* chez les mutants

Δaft1 ou *Δaft2* et *Δzap1*. L'abolition par le fer des effets observés chez chacun des mutants suggère qu'Aft1p et Aft2p pourraient être impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *ZRT3*. Afin de savoir si les effets médiés par Aft1p et Aft2p pouvaient être directs, nous avons regardé si Aft1p et Aft2p pouvaient être recrutés sur le promoteur de *ZRT3* dans ces conditions.

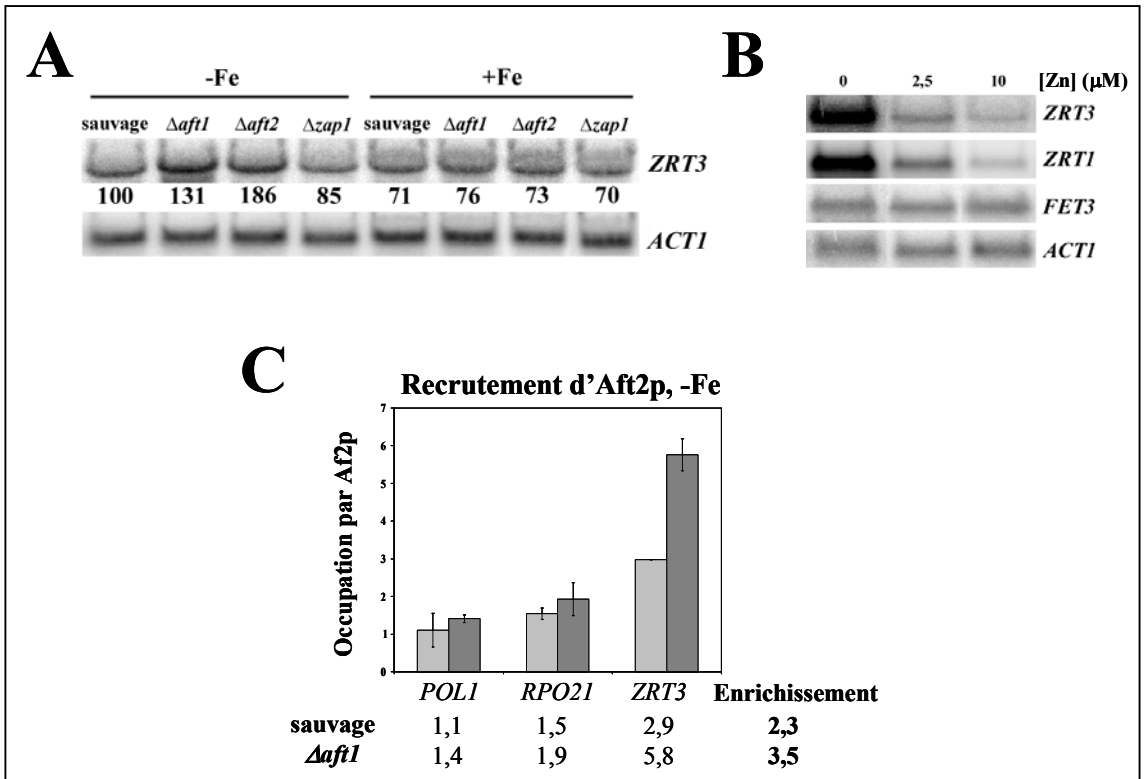

Figure 37 : Régulation transcriptionnelle du gène *ZRT3* par Aft1p et Aft2p. A, Northern blot des transcrits *ZRT3* et *ACT1*. Les souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2*, *Δaft1Δaft2* et *Δzap1* ont été cultivées dans un milieu dépourvu de fer et de cuivre en présence (+Fe) ou en absence (-Fe) de 100μM de fer dans le milieu, pendant 15 heures. Le gène *ACT1* est utilisé pour la normalisation de la quantité de transcrits dans chaque échantillon. La valeur obtenue pour le transcrit *ZRT3* chez le sauvage a été ajustée à 100. B, Northern blot des transcrits *ZRT3*, *ZRT1*, *FET3* et *ACT1* dans une souche sauvage. La souche sauvage a été cultivée pendant 5 heures dans le milieu dépourvu de fer et de zinc dans lequel des concentrations croissantes de zinc ont été ajoutées. C, recrutement d'Aft2p sur le promoteur de *ZRT3* en condition de carence en fer pendant 15 heures.

C-3-b. Aft1p et Aft2p sont recrutés sur le promoteur de ZRT3

Aft1p et Aft2p ne sont pas recrutés sur le promoteur de *ZRT3* lorsque les cellules sont cultivées pendant 5 heures dans le milieu dépourvu de fer, ce qui est en accord avec l'absence de régulation transcriptionnelle de *ZRT3* par ces facteurs dans ces conditions (résultats non

montrés). En condition de carence en fer prolongée, le recrutement d'Aft1p n'a été testé qu'en contexte sauvage, et il est absent sur le promoteur de *ZRT3* (résultats non montrés). En revanche, dans cette condition, nous avons pu mettre en évidence une fixation d'Aft2p sur le promoteur de *ZRT3* (figure 37-C). Cette fixation est légèrement supérieure en contexte *Δaft1* (figure 37-C), ce qui est en accord avec les résultats de Northern blot obtenus dans les mêmes conditions (figure 37-A). L'effet du fer n'a quant à lui pas été étudié.

Le promoteur de *ZRT3* possède une séquence de fixation de Zap1p $^{-154}$5'-ACCTTAAGGGT-3'$^{-144}$ (Lyons *et al.*, 2000) et une séquence de fixation d'Aft1p et d'Aft2p $^{-226}$5'-TACACCC-3'$^{-220}$. La distance de 66 pb qui sépare ces deux séquences laisse à nouveau envisager la possibilité d'une interaction physique entre Aft1p, Aft2p et Zap1p sur le promoteur de *ZRT3* (figure 38).

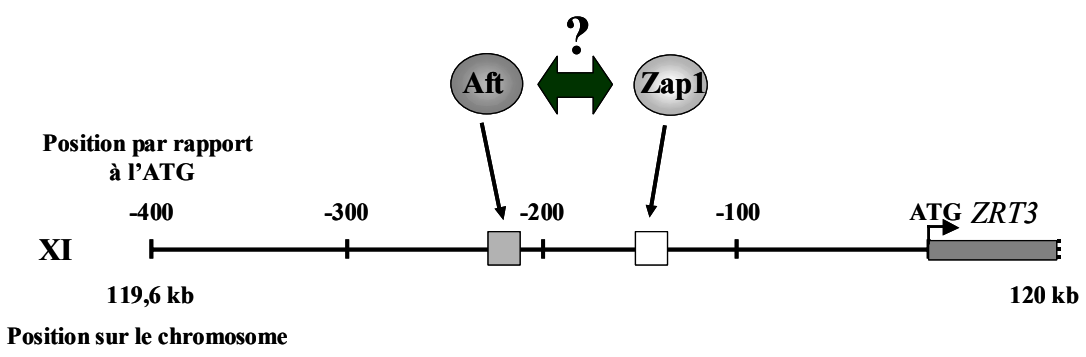

Figure 38 : Localisation des séquences de fixation d'Aft1p/Aft2p et de Zap1p dans le promoteur de *ZRT3*. La boîte blanche représente la séquence potentielle $^{-154}$5'-ACCTTAAGGGT-3'$^{-144}$ de fixation de Zap1p. La boîte grise représente la séquence $^{-226}$5'-TACACCC-3'$^{-220}$ de fixation d'Aft1p et d'Aft2p.

D. Aft1p et Aft2p, des régulateurs pluripotentiels ?

D.1- Les phénotypes des doubles mutants *Δaft1Δzap1* et *Δaft2Δzap1* confirment l'étroite connexion entre les deux métabolismes

L'ensemble des résultats moléculaires que nous avons pu obtenir concernant la régulation de *ZRT1* et *ZRT3* par Aft1p, Aft2p et Zap1p suggèrent l'importance des

mécanismes de régulation coordonnés par ces trois facteurs de transcription. Afin d'apporter des informations supplémentaires quant aux relations qui existent entre ces différents facteurs de transcription, nous avons débuté une analyse phénotypique de l'ensemble des mutants délétés d'*AFT1* et/ou d'*AFT2* et/ou de *ZAP1*. Nous avons testé la croissance des différentes souches mutantes sur des milieux contenant des chélateurs de fer ou de zinc (figure 39). La ferrozine est un chélateur très spécifique, couramment utilisé pour dépléter un milieu en fer (Stookey, 1970) ; l'EDTA est couramment utilisé pour créer une condition de carence en zinc dans le milieu, bien qu'il ne soit pas spécifique de ce métal (tableau 3).

Tableau 3 : Constantes d'affinité (M^{-1}) des chélateurs pour les métaux fer et zinc. nd, non déterminé.

	Zn(II)	Fe(II)	Fe(III)
Ferrozine	nd	$3{,}6.10^{15}$	nd
EDTA	3.10^{16}	2.10^{14}	$1{,}2.10^{25}$

L'ensemble des souches délétées du gène *AFT1*, mais pas la souche *Δzap1*, présentent des défauts de croissance sur le milieu contenant de la ferrozine (figure 39-A et Blaiseau *et al.*, 2001). L'ajout de fer dans le milieu, mais pas celui de zinc, permet de restaurer pleinement la croissance de l'ensemble des souches, ce qui montre que les défauts observés sont avant tout liés à la carence en fer du milieu. La souche *Δaft1Δzap1* semble être légèrement moins affectée par la carence en fer que la souche *Δaft1* (figure 39-A). La délétion supplémentaire de *ZAP1* abolirait donc en partie le défaut de croissance de la souche *Δaft1* en condition de carence en fer. En condition de carence en fer, nous avons montré que la souche *Δaft1* présente une sensibilité accrue au zinc (figure 29), corrélée à une augmentation de la quantité de zinc intracellulaire (figure 30). L'absence supplémentaire de Zap1p pourrait permettre de diminuer cette sensibilité, possiblement en rétablissant chez le double mutant *Δaft1Δzap1* une concentration intracellulaire de zinc de type sauvage. La différence de croissance des souches *Δaft1* et *Δaft1Δzap1* n'étant cependant pas exacerbée par l'ajout de zinc dans le milieu carencé en fer (figure 39-A), cette hypothèse ne suffit pas à expliquer la différence de phénotype observée entre *Δaft1* et *Δaft1Δzap1* sur le milieu additionné de 100µM de ferrozine.

L'ajout d'EDTA dans le milieu minimum abolit la croissance de l'ensemble des souches affectées pour l'homéostasie en fer et/ou en zinc (délétées d'*AFT1* et/ou de *ZAP1*)

(figure 39-B). Le léger retard de la souche *Δaft2* par rapport à la souche sauvage n'a pas été reproduit.

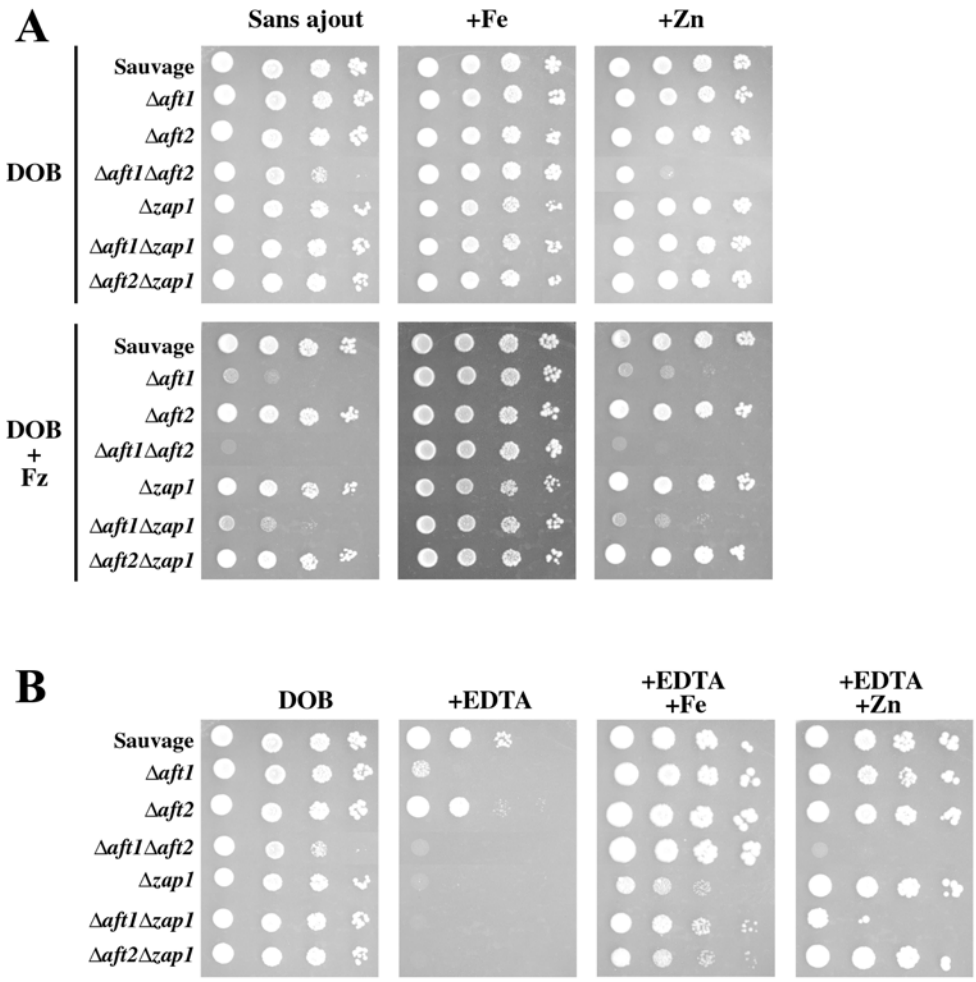

Figure 39 : Aft1p et Aft2p sont connectés au métabolisme du zinc. Les souches citées (contexte BY4742) sont diluées à DO_{600} = 1 et une série de dilutions d'un facteur 10 est déposée en gouttes de 3µL sur des boîtes de milieu minimum complet (DOB) avec ou sans ajout de chélateur et de métal. A, Effet de la carence en fer sur la croissance des mutants. Le chélateur ferrozine (Fz) ou les métaux fer (+Fe) et zinc (+Zn) sont à une concentration de 100µM. B, Effet de la carence en zinc. Le chélateur EDTA ou les métaux fer et zinc sont à une concentration de 1,5mM. Les boîtes ont été placées à 30°C pendant 4 jours.

Lorsque du fer est ajouté au milieu contenant l'EDTA, il permet de restaurer pleinement la croissance des souches *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* (figure 39-B). Il confère même à la souche *Δaft1Δaft2* une croissance légèrement supérieure à la souche sauvage (figure 39-B). Ce résultat montre que la chélation du zinc par l'EDTA est favorable à la croissance de la souche double mutante *Δaft1Δaft2* comme nous avions pu le constater lors des études croissance en milieu liquide (figure 29). L'ajout de fer restaure partiellement la croissance des

souches qui portent la délétion de *ZAP1*. Cet effet est possiblement dû à un déplacement d'équilibre des complexes métal-EDTA, libérant une infime quantité de zinc autorisant la faible croissance des souches délétées de *ZAP1*. La croissance des souches doubles mutantes *Δaft1Δzap1* et *Δaft2Δzap1* est mieux restaurée par le fer que la croissance de la souche *Δzap1*, mais moins bien restaurée que la croissance des souches *Δaft1* et *Δaft1Δaft2*.

L'ajout de zinc permet de restaurer pleinement la croissance des souches *Δaft1* et *Δzap1*. La libération d'une quantité infime de fer par déplacement d'équilibre des complexes métal-EDTA, pourrait expliquer la restauration de croissance de la souche *Δaft1*. Par contre, la croissance de la souche double mutante *Δaft1Δzap1* n'est pas pleinement restaurée. La combinaison des délétions de *ZAP1* et *AFT1* est donc néfaste pour la cellule dans ces conditions.

Cette analyse phénotypique de mutants dérégulés à la fois pour l'homéostasie du fer et l'homéostasie du zinc confirme le lien étroit qui existe entre ces deux métabolismes. L'utilisation de chélateurs n'est cependant pas suffisamment précise pour déterminer la ou les cause(s) exacte(s) des phénotypes observés chez ces mutants. L'analyse de la croissance de ces mutants en milieu liquide dépourvu de fer et de zinc, dans lequel les quantités de métaux ajoutés peuvent être soigneusement contrôlées, devrait permettre de caractériser davantage les défauts de ces souches, et ainsi apporter des informations supplémentaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation coordonnée de l'homéostasie du fer et de l'homéostasie du zinc chez *S. cerevisiae*.

D-2. La fonction de transactivation d'Aft2p est régulée par le zinc

Les protéines Aft1p et Aft2p pouvant être impliquées directement dans la régulation de *ZRT1* et *ZRT3* nous nous sommes demandés si le zinc pouvait avoir une influence sur les fonctions transactivatrices d'Aft1p et d'Aft2p. Les protéines de fusion LexA-Aft1p et LexA-Aft2p (codées par les plasmides pEG202-*AFT1* et pEG202-*AFT2*) ont donc été utilisées pour mesurer l'activité transactivatrice d'Aft1p et d'Aft2p en fonction de la quantité de zinc dans le milieu (tableau 4, résultats P.L. Blaiseau). Cette technique a déjà permis de mettre en évidence que la fonction de transactivation d'Aft2p est 2 fois inférieure à la fonction de

transactivation d'Aft1p en condition de carence en fer, et de plus réprimée d'un facteur 2 par l'ajout de fer 100µM (Blaiseau *et al.*, 2001).

Tableau 4 : Mesure de la fonction transactivatrice d'Aft1p et d'Aft2p en fonction de la quantité de zinc dans le milieu. La souche sauvage BY4742 a été transformée avec le plasmide rapporteur pSH18-34 et les plasmides pEG202, pEG202-AFT1 ou pEG202-AFT2. Les transformants ont été cultivés dans le milieu minimum dépourvu de fer, de cuivre et de zinc dans lequel ont été rajoutés (+Zn) ou non (-Zn) 10µM de $ZnSO_4$.

Construction présente	Activité β-galactosidase (LexAop-GAL1-LacZ) Unités/DO_{600}		**Augmentation de la fonction transactivatrice (-Zn/+Zn)**
	- Zn	+ Zn	
LexA	<10	<10	**-**
LexA-Aft1p	1078 ± 98	1451 ± 368	**1,4**
LexA-Aft2p	193 ± 19	1481 ± 110	**7,7**

En condition de carence en fer, la quantité de zinc dans le milieu n'a pas d'effet important sur l'activité transactivatrice d'Aft1p (tableau 4). En revanche, l'activité transactivatrice d'Aft2p est 7,7 fois plus élevée dans un milieu qui contient 10µM de zinc que dans un milieu qui n'en contient pas. Ainsi, en présence de 10µM de zinc dans le milieu, l'activité transactivatrice d'Aft2p est identique à l'activité transactivatrice d'Aft1p. Ces résultats montrent l'importance du zinc pour la fonction d'Aft2p et constituent une nouvelle base moléculaire pour tenter de comprendre davantage les connexions qui existent entre la régulation de l'homéostasie du fer et celle du zinc. Il serait également intéressant de regarder si la capacité de liaison à l'ADN d'Aft1p et d'Aft2p peut être elle aussi modulée par la quantité de zinc dans le milieu. Par ailleurs, le fait que la fonction de transactivation d'Aft2p soit régulée par la quantité de zinc dans le milieu laisse envisager que la transcription de ses gènes cibles, définis au chapitre I, puisse être régulée par la quantité de zinc dans le milieu.

D-3. Comparaison des analyses globales de transcriptomes : d'autres gènes sous la dépendance d'Aft1p, d'Aft2p, et de Zap1p ?

Nos résultats concernant la transcription de *ZRT1* et *ZRT3* ont montré qu'Aft1p, et surtout Aft2p, pouvaient être directement impliqués dans leur régulation, possiblement en interaction avec Zap1p. Afin d'estimer le nombre de gènes potentiellement régulés à la fois par Aft1p, Aft2p, et Zap1p, et ainsi évaluer l'étendue du lien fonctionnel entre ces trois facteurs de transcription, nous avons entrepris la comparaison de nos résultats de

transcriptome avec les résultats de transcriptome obtenus lors de la caractérisation de l'ensemble des gènes régulés par Zap1p en condition de carence en zinc (Lyons *et al.*, 2000).

La transcription de 458 gènes est augmentée en réponse à la carence en zinc (Lyons *et al.*, 2000). La transcription de 52 de ces gènes est également diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p (figure 40-A). Parmi ces 52 gènes dont la transcription est à la fois augmentée en condition de carence en zinc et diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p, 38% (20 gènes) possèdent dans leur région promotrice la séquence 5'-(G/A)CACCC-3', potentiellement reconnue par Aft2p (figure 40-A et B). Cette séquence est retrouvée dans 24% des promoteurs des gènes du génome. Elle est donc 1,6 fois plus présente parmi les 52 gènes dont la transcription est à la fois augmentée en condition de carence en zinc et diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p. Sur les 20 séquences 5'-(G/A)CACCC-3', 7 s'avèrent être des séquences plus spécialement reconnues par Aft1p, de type 5'-T(G/A)CACCC-3' (figure 40). Cette séquence est 1,8 fois plus présente parmi les gènes dont la transcription est à la fois augmentée en condition de carence en zinc et diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p que sur l'ensemble du génome (13% des 52 gènes contre 7% sur le génome). L'ensemble de ces données suggère qu'Aft1p et Aft2p pourraient jouer un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du zinc.

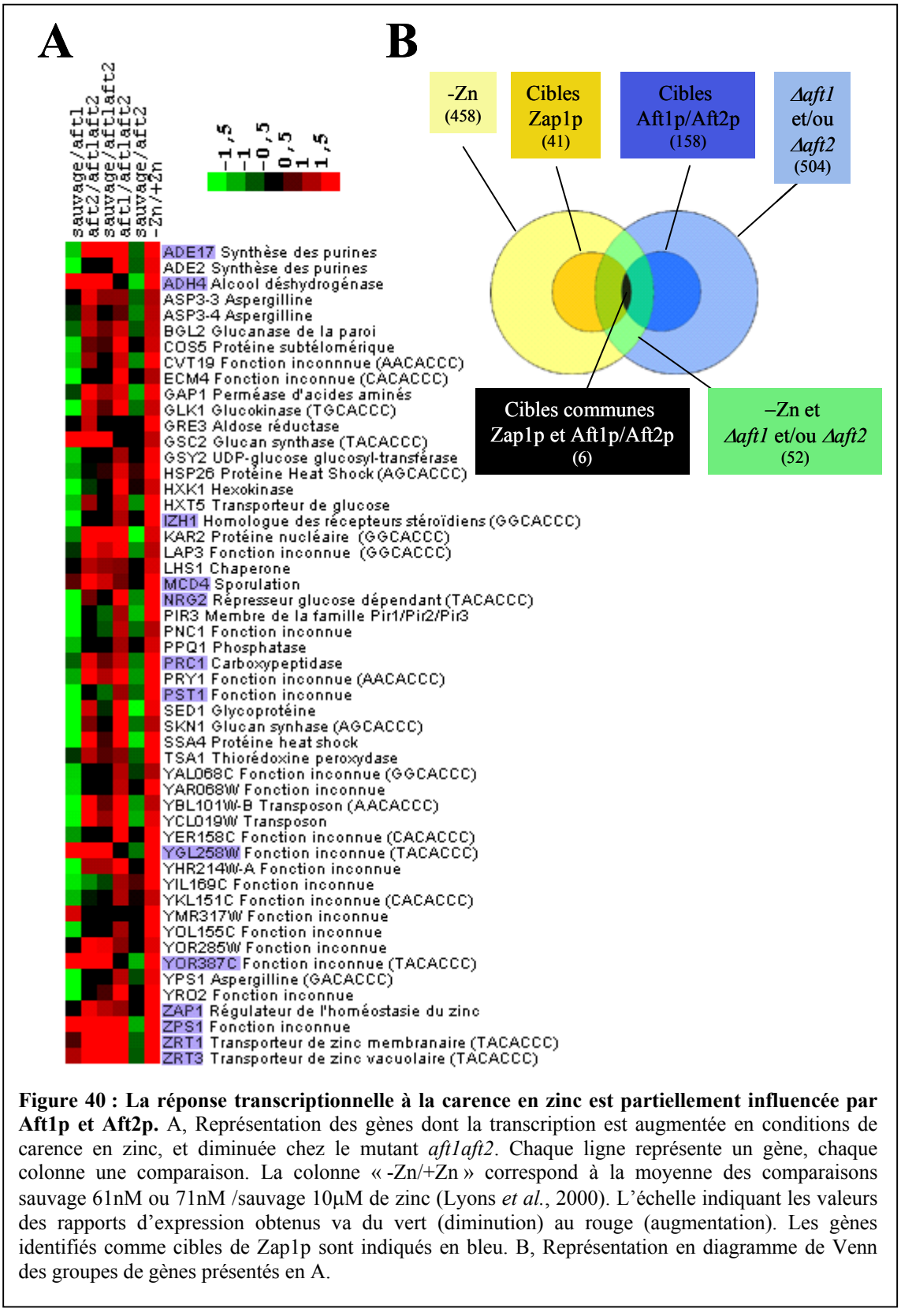

Figure 40 : La réponse transcriptionnelle à la carence en zinc est partiellement influencée par Aft1p et Aft2p. A, Représentation des gènes dont la transcription est augmentée en conditions de carence en zinc, et diminuée chez le mutant *aft1aft2*. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. La colonne « -Zn/+Zn » correspond à la moyenne des comparaisons sauvage 61nM ou 71nM /sauvage 10µM de zinc (Lyons *et al.*, 2000). L'échelle indiquant les valeurs des rapports d'expression obtenus va du vert (diminution) au rouge (augmentation). Les gènes identifiés comme cibles de Zap1p sont indiqués en bleu. B, Représentation en diagramme de Venn des groupes de gènes présentés en A.

Parmi les 52 gènes dont la transcription est à la fois augmentée en condition de carence en zinc et diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p, 13 font partie des 41 gènes cibles potentiels de Zap1p (Lyons *et al.*, 2000 et figure 40-A). Sur ces 13 gènes cibles potentiels de Zap1p, 6 sont également des cibles potentielles d'Aft1p et/ou d'Aft2p, ce qui suggère que ces 6 gènes pourraient être régulés à la fois par Zap1p et Aft1p et/ou Aft2p (figure 40-B). Parmi ces 6 gènes se trouvent *ZRT1* et *ZRT3*, pour lesquels nous avons mis en évidence un rôle direct d'Aft1p et d'Aft2p dans leur régulation transcriptionnelle, et les 4 autres gènes *NRG2* (répresseur glucose-dépendant), *IZH1* (homologue des récepteurs stéroïdiens), *YOR387C* et *YGL258W* (figure 40-A). De manière intéressante, les séquences consensus reconnues par Aft1p/Aft2p et Zap1p dans le promoteur des gènes paralogues *YOR387C* et *YGL258W* sont chevauchantes (figure 41).

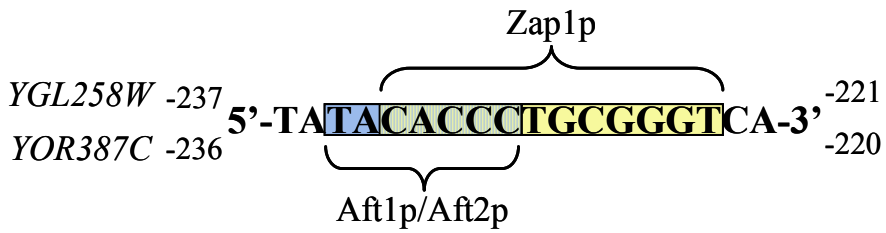

Figure 41 : Représentation des séquences consensus de fixation de Zap1p et d'Aft1p/Aft2p dans le promoteur de *YGL258W* et *YOR387C*.

Chapitre III :
Analyse du transcriptome des mutants

A. Etude des groupes de gènes affectés par l'absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p

L'analyse du classement des 50 gènes décrits comme étant activés par *AFT1-1up* et/ou *AFT2-1up* (Rutherford *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2003, Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004) en fonction de leur profil transcriptionnel dans les mutants délétés des gènes *AFT1* et/ou *AFT2* nous a permis de mettre en évidence 4 groupes distincts de gènes, dont l'expression est régulée différemment par Aft1p et Aft2p. Nous avons notamment mis en évidence que l'absence d'Aft1p était requise pour révéler le rôle d'Aft2p. Par ailleurs, ce classement nous a permis d'identifier une séquence consensus de fixation légèrement différente pour chacun des deux facteurs de transcription : 5'-TGCACCC-3' pour Aft1p, 5'-(G/A)CACCC-3' pour Aft2p. Nous avons mis à profit ces résultats pour étudier l'ensemble du transcriptome des souches déficientes pour Aft1p et Aft2p.

A-1.Un quart du génome est affecté par la délétion d'*AFT1* et/ou *AFT2*

L'analyse des données du transcriptome nous a permis d'identifier 1405 gènes dont l'expression est affectée de manière reproductible d'au moins un facteur 2 par l'absence des facteurs de transcription Aft1p et/ou Aft2p (*cf.* Matériel et Méthodes). Ce chiffre représente presque un quart du génome de *S. cerevisiae* (23%). Par comparaison, la délétion de la sous-unité TAF_{145} du facteur général de transcription TFIID n'affecte que 16% du génome (Holstege *et al.*, 1998), et l'analyse de la réponse transcriptionnelle générale aux stress environnementaux (changement de température, choc osmotique, carence azotée, stress oxydants, phase stationnaire...) a identifié environ 15% de gènes dont la transcription est modifiée (Gasch *et al.*, 2000). Les variations que nous avons observées représentent donc

vraisemblablement des effets à la fois directs et indirects de l'absence des protéines Aft1p et Aft2p, mais leur grand nombre suggère que la perturbation de l'homéostasie du fer au sein de la cellule entraîne un remaniement important du transcriptome.

L'ensemble des variations observées rend compte de la totalité des effets des délétions des deux facteurs de transcription : augmentation et diminution des transcrits, effet de chaque délétion en présence du paralogue, effet de chaque délétion en absence du paralogue, et effet de la double délétion. Nous avons dans un premier temps regardé séparément la proportion de gènes induits ou réprimés dans chacune des 5 comparaisons (figure 42).

Les conséquences de l'absence des facteurs de transcription Aft1p et/ou Aft2p sont très variables selon la comparaison étudiée (figure 42). C'est la double délétion d'*AFT1* et d'*AFT2* qui affecte la transcription du plus grand nombre de gènes, et la simple délétion d'*AFT2* en contexte sauvage qui a le moins de conséquences sur la transcription des gènes. Ce dernier résultat confirme que le rôle d'Aft2p peut être difficilement mis en évidence dans un contexte où Aft1p est présent.

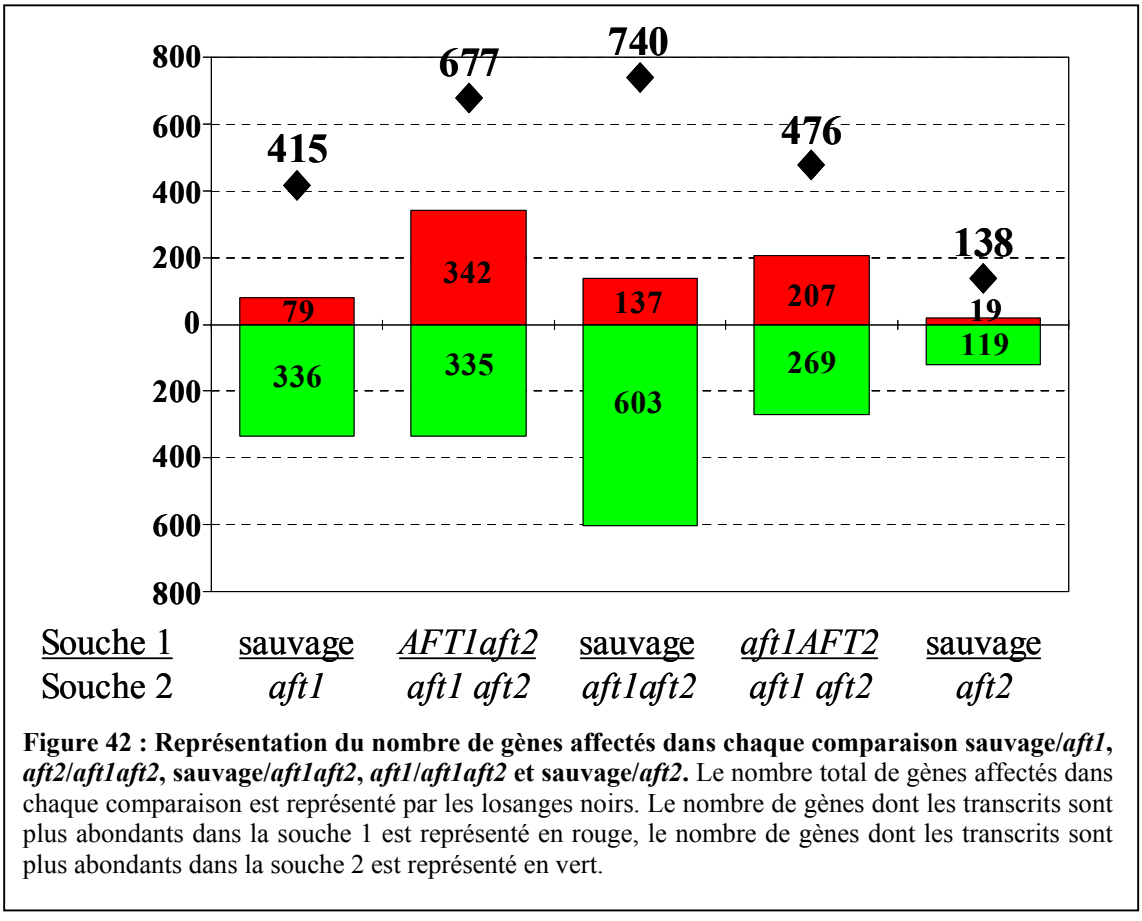

Figure 42 : Représentation du nombre de gènes affectés dans chaque comparaison sauvage/*aft1*, *aft2*/*aft1aft2*, sauvage/*aft1aft2*, *aft1*/*aft1aft2* et sauvage/*aft2*. Le nombre total de gènes affectés dans chaque comparaison est représenté par les losanges noirs. Le nombre de gènes dont les transcrits sont plus abondants dans la souche 1 est représenté en rouge, le nombre de gènes dont les transcrits sont plus abondants dans la souche 2 est représenté en vert.

L'absence des facteurs de transcription Aft1p et/ou Aft2p entraîne majoritairement une augmentation de la transcription des gènes étudiés quelle que soit la comparaison étudiée (figure 42). Ce résultat peut paraître paradoxal, Aft1p et Aft2p étant avant tout des activateurs de transcription.

Ce sont les comparaisons simple mutant/double mutant qui entraînent une diminution de la transcription du plus grand nombre de gènes. Premièrement, ce résultat est en accord avec un rôle d'Aft2p lorsqu'Aft1p est absent. Deuxièmement, il révèle que la présence/absence d'Aft2p est également influente sur le rôle d'Aft1p. L'étude de la régulation transcriptionnelle de *FET3*, *FTR1* et *SMF3*, ainsi que la régulation de la quantité de protéine Aft1p (chapitre I) nous avait déjà permis de souligner l'importance de la présence/absence d'Aft2p. Seuls 49 gènes sont réprimés en absence d'Aft1p à la fois en présence et en absence d'Aft2p (donnée non figurée), ce qui suggère que l'influence d'Aft2p sur l'action d'Aft1p est généralisable à la plupart des gènes dont la transcription est réprimée en absence d'Aft1p.

Le nombre de gènes dont la transcription est diminuée dans la souche *aft1aft2* par rapport à la souche sauvage est modéré (137). De plus, la transcription de 95% d'entre eux est aussi diminuée dans la souche *aft1aft2* par rapport à la souche *aft2* (donnée non figurée). Les effets observés chez le double mutant semblent donc être majoritairement la conséquence de l'absence d'Aft1p.

Nous avons dans un deuxième temps classé l'ensemble de ces 1405 gènes en nous basant sur les résultats que nous avons obtenus lors de l'analyse des 50 gènes décrits comme étant activés par *AFT1-1up* et/ou *AFT2-1up* (article 1).

A-2. La transcription de 523 gènes est diminuée en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p

Parmi les 1405 gènes dont l'expression est affectée par l'absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p, nous en avons isolé 523 dont l'expression est diminuée dans au moins une des cinq comparaisons sauvage/*aft1*, sauvage/*aft2*, sauvage/*aft1aft2*, *aft2*/*aft1aft2* et *aft1*/*aft1aft2*.

L'analyse du sous ensemble de gènes décrits comme étant activés par *AFT1-1up* et/ou *AFT2-1up* (article 1) nous a permis de définir les gènes cibles d'Aft1p comme étant des gènes dont la transcription est diminuée dans au moins une des trois comparaisons sauvage/*aft1*,

aft2/*aft1aft2* ou sauvage/*aft1aft2*. Sur les 523 gènes sélectionnés, 147 répondent à ces critères (figure 43).

Comme nous l'avons mis en évidence dans l'article 1, le rôle d'Aft2p en tant qu'activateur transcriptionnel est révélé en absence d'Aft1p, ce qui se traduit par une transcription plus importante des gènes dans une souche *aft1* par rapport à une souche sauvage, et une transcription diminuée de ces gènes dans une souche *aft1aft2* par rapport à une souche *aft1*. Parmi les 523 gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p, 190 répondent à ces critères (figure 43). Il existe par ailleurs un petit groupe de gènes (19) dont l'expression est diminuée en absence d'Aft2p en contexte sauvage (figure 43).

Après avoir défini l'ensemble des gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p d'une part, et ceux dont la transcription est diminuée en absence d'Aft2p d'autre part, il reste un ensemble de 167 gènes dont le profil transcriptionnel montre que leur transcription est diminuée essentiellement dans les comparaisons impliquant la souche double mutante. Ce résultat est en accord avec un rôle redondant des deux facteurs de transcription Aft1p et Aft2p dans la régulation de l'expression de ces gènes (figure 43).

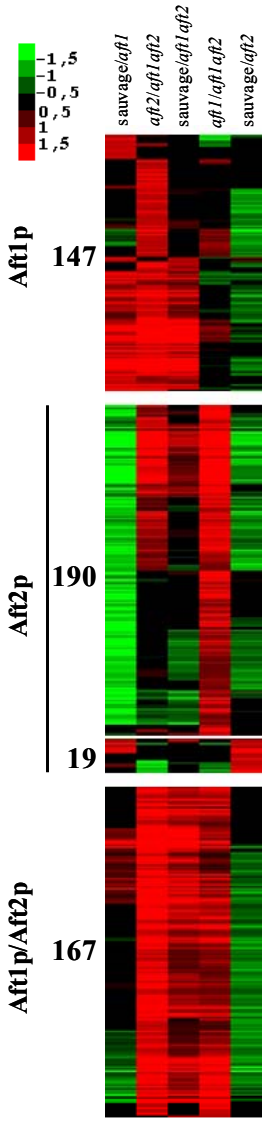

Figure 43 : Profil d'expression des gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p, d'Aft2p ou des deux. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. L'échelle verticale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert.

Nous avons cherché à savoir si l'absence d'Aft1p, l'absence d'Aft2p, ou l'absence combinée d'Aft1p et d'Aft2p entraînaient la diminution de l'expression de groupes de gènes impliqués dans une fonction cellulaire particulière ou localisés dans un compartiment subcellulaire spécifique (figure 44). Pour cela, nous avons utilisé le serveur MIPS (http://mips.gsf.de/proj/funcatDB). A partir d'une liste de gènes donnée, ce serveur établit un classement des gènes en fonction de leur implication dans les différents processus cellulaires et en fonction de leur localisation subcellulaire, et indique, par comparaison avec l'ensemble des gènes du génome, si une catégorie donnée est représentée de manière significative par les gènes de la liste à analyser. En accord avec le rôle connu d'Aft1p dans la régulation des gènes du transport du fer extracellulaire, le serveur a identifié les gènes dont les produits sont

impliqués dans le transport de métaux comme particulièrement présents parmi les gènes dont l'expression est diminuée en absence d'Aft1p (figure 44).

L'absence d'Aft1p entraîne la diminution de la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse protéique. On en retrouve ainsi 23,7% parmi les gènes dont l'expression est diminuée en absence d'Aft1p et 17,7% parmi les gènes dont l'expression est diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p, la majorité d'entre eux codant pour des protéines ribosomales (figure 44). La diminution de la transcription de cette catégorie de gènes est également observée lorsque les cellules sont soumises à divers stress environnementaux (Gasch *et al.*, 2000). L'absence d'Aft1p entraîne également la diminution de l'expression des gènes dont les produits sont impliqués dans la défense de la cellule contre les stress environnementaux. Ces gènes représentent 18,3% des gènes dont l'expression est diminuée en absence d'Aft1p, et 12,7% des gènes dont l'expression est diminuée par l'absence d'Aft1p et d'Aft2p (figure 44).

L'absence d'Aft2p entraîne la diminution d'un grand nombre de gènes dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol, et plus généralement dans le métabolisme des lipides et des acides gras. Ces gènes représentent 16,1% des gènes dont l'expression est diminuée par Aft2p, et 6,6% des gènes dont l'expression est diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p. L'absence d'Aft2p entraîne également la diminution de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des purines et le transport des composés carbonés, ainsi que les éléments transposables Ty.

De manière assez générale, l'absence d'Aft1p, d'Aft2p ou d'Aft1p et d'Aft2p entraîne la diminution d'un nombre important de gènes impliqués dans le métabolisme du carbone. Ces gènes représentent respectivement 18,3% et 19,3% des gènes dont l'expression est diminuée par l'absence d'Aft1p et l'absence d'Aft1p et d'Aft2p, et 8,3% des gènes dont l'expression est diminuée par l'absence d'Aft2p. On retrouve notamment parmi ces gènes ceux dont les produits sont impliqués dans la glycolyse et la fermentation ainsi que l'utilisation des réserves telles que le tréhalose ou le glycogène (figure 44).

L'absence des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p entraîne également une diminution de l'expression d'un grand nombre de gènes dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse des acides aminés (10,2%). La biosynthèse de la lysine semble être préférentiellement affectée par l'absence d'Aft1p, alors que la biosynthèse des acides aminés soufrés cystéine et méthionine ainsi que la biosynthèse de la sérine permettant la production de ces acides aminés soufrés semblent être plus affectés par l'absence d'Aft2p (figure 44).

L'identification de ces derniers groupes de gènes parmi les gènes dont l'expression est diminuée en absence des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p pourrait être une explication de l'auxotrophie pour la lysine et la méthionine observée chez le double mutant *aft1aft2* (Blaiseau *et al.*, 2001), phénotypes qui seront abordés plus en détail plus loin dans ce chapitre.

La majorité des gènes dont l'expression est diminuée en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p se trouve dans le cytoplasme (figure 44). L'absence d'Aft1p entraîne également la diminution de l'expression de gènes dont les produits sont localisés dans la paroi. L'absence d'Aft2p quant à elle entraîne la diminution de l'expression de gènes dont les produits se trouvent à la membrane plasmique, mais surtout dans la vacuole ou le réticulum endoplasmique. Ces deux dernières localisations subcellulaires sont également fortement retrouvées au sein des gènes dont l'expression est diminuée par l'absence d'Aft1p et d'Aft2p.

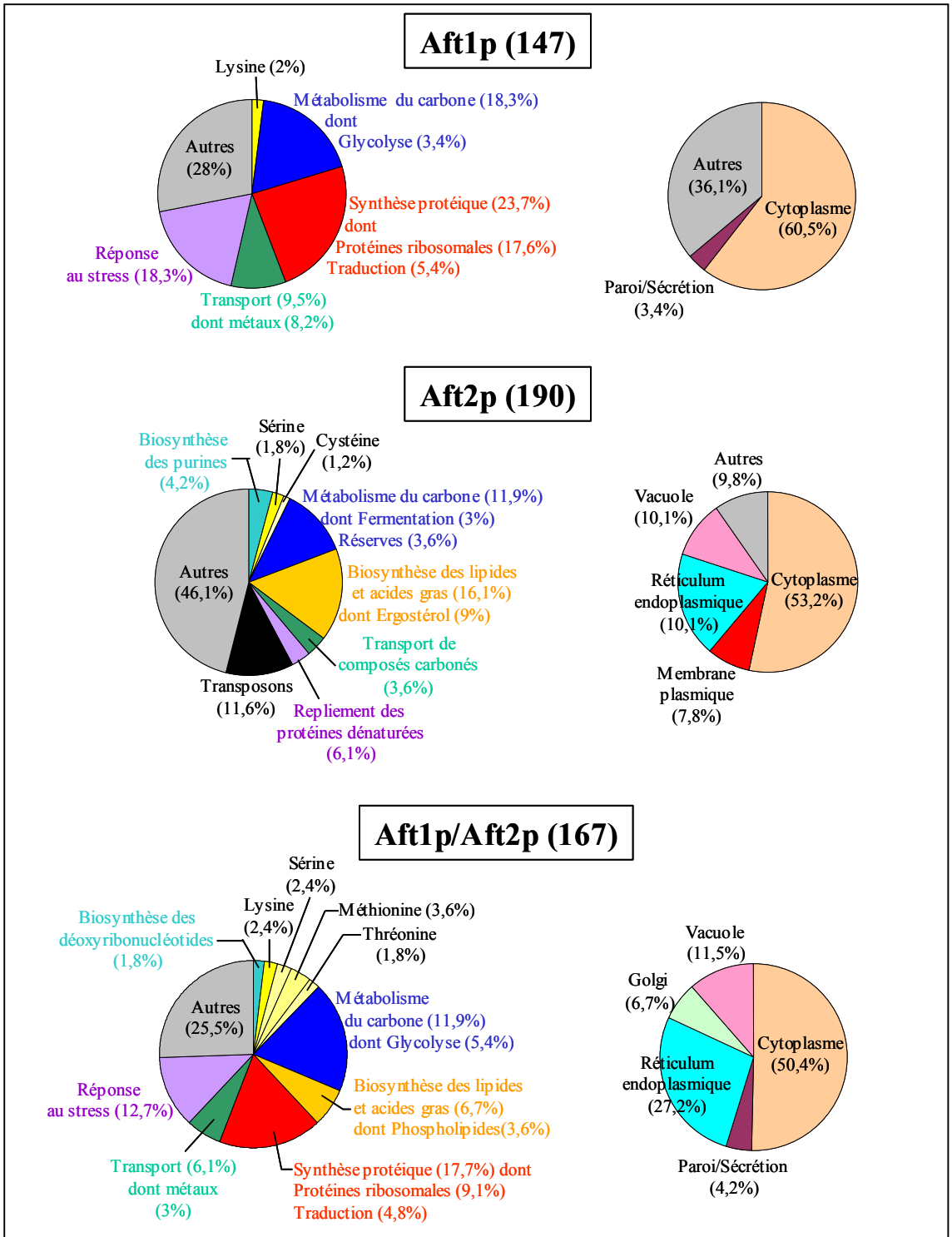

Figure 44 : Répartition des gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p, d'Aft2p ou des deux selon leur fonction et leur localisation. Les gènes appartenant à chacun des trois groupes définis d'après leur profil transcriptionnel ont été analysés à l'aide du serveur MIPS (http://mips.gsf.de/proj/funcatDB). Les catégories présentes de manière significative par rapport à la répartition de l'ensemble des gènes du génome sont indiquées, et le nombre de gènes appartenant à ces différentes catégories est indiqué en pourcentage des gènes du groupe analysé.

Nous avons traité à part le groupe réduit de 19 gènes dont l'expression est diminuée en absence d'Aft2p en contexte sauvage. Ils sont présentés dans le tableau 5. La fonction de plusieurs d'entre eux est encore inconnue, et nous n'avons pas pu établir de corrélation fonctionnelle dans cet ensemble. Par ailleurs, la séquence consensus 5'-(G/A)CACCC-3' reconnue par Aft2p n'est présente que dans 16% des promoteurs de ces gènes (tableau 5), contre 24% sur l'ensemble du génome. Ce résultat suggère qu'Aft2p ne joue pas de rôle direct dans la régulation de leur transcription.

Tableau 5 : Gènes dont l'expression est diminuée dans la souche *aft2* par rapport à la souche sauvage. Les gènes ont été annotés en utilisant la base de données SGD. La recherche de la séquence consensus a été effectuée sur 700 pb en amont du site d'initiation de la traduction.

GENE	*NOM*	**Description**	**Séquence 5'-(G/A)CACCC-3'**
YAR020C	*PAU7*	Séripaupérine	aucune
YBR184W	*YBR184W*	Protéine hypothétique	1
YER015W	*FAA2*	Synthèse des acides gras	aucune
YER047C	*SAP1*	ATPase potentielle	aucune
YGR269W	*YGR269W*	Protéine hypothétique	aucune
YHR092C	*HXT4*	Transporteur de glucose basse affinité	aucune
YJR091C	*JSN1*	Régulateur de la stabilité des ARNm de protéines membranaires	aucune
YLR051C	*YLR051C*	Protéine hypothétique	1
YLR235C	*YLR235C*	Protéine hypothétique	aucune
YLR428C	*YLR428C*	Protéine hypothétique	aucune
YMR289W	*ABZ2*	Protéine hypothétique	1
YNL101W	*AVT4*	Impliqué dans l'export vacuolaire des acides aminés	aucune
YNL224C	*YNL224C*	Protéine hypothétique	aucune
YNL335C	*YNL335W*	Protéine hypothétique	aucune
YNR004W	*YNR004W*	Protéine hypothétique	aucune
YNR024W	*YNR024W*	Protéine hypothétique	aucune
YOR229W	*WTM2*	Répresseur transcriptionnel, rôle putatif dans la méiose	aucune
YOR379C	*YOR379C*	Protéine hypothétique	aucune
YPL280W	*HSP32*	Chaperone potentielle	aucune

A-3. La transcription de 882 gènes est augmentée en absence d'Aft1p et d'Aft2p

Les trois ensembles des gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p, d'Aft2p ou des deux totalisent 523 gènes. Le profil transcriptionnel des 882 gènes restants (1405-523) est représenté figure 45. Ce sont des gènes dont la transcription est augmentée en absence des facteurs de transcription Aft1p et/ou Aft2p. Les gènes dont la transcription est augmentée en absence d'Aft1p représentent 1/3 de ce groupe de gènes, et les gènes dont la transcription est augmentée uniquement en absence des deux facteurs de transcription Aft1p

et Aft2p représentent 2/3 de ce groupe de gènes (figure 45-A). Il ne ressort pas de cette analyse de groupes de gènes dont la transcription pourrait être augmentée uniquement par l'absence d'Aft2p.

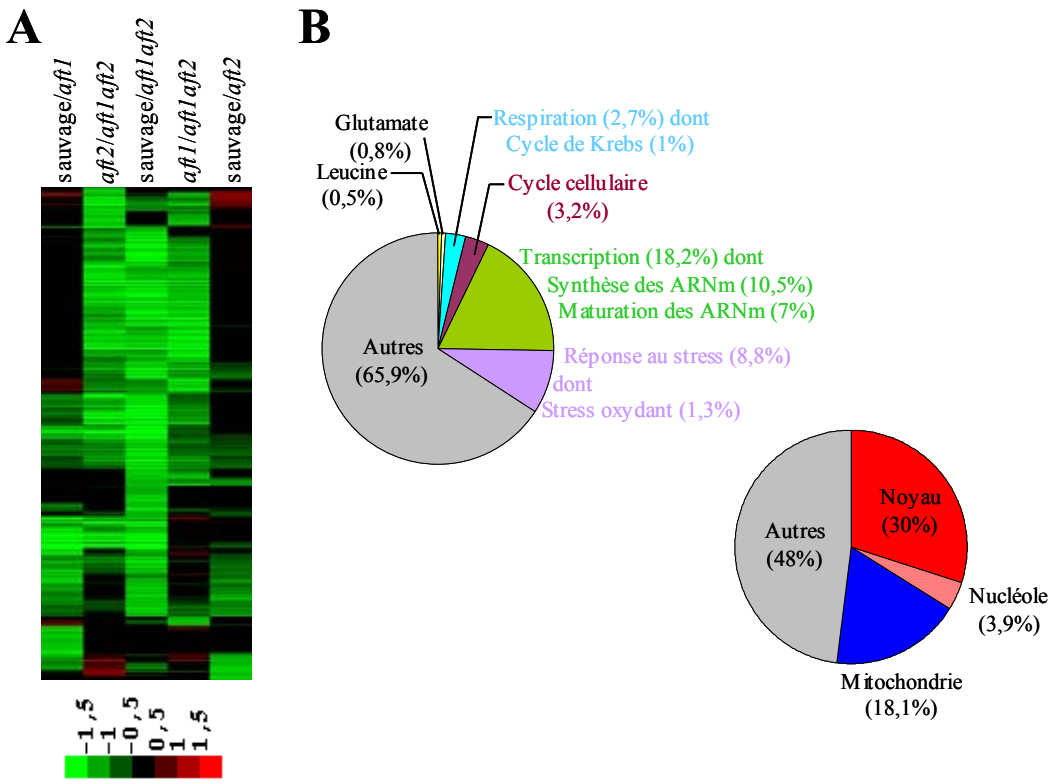

Figure 45 : Profil d'expression et répartition fonctionnelle des gènes dont l'expression est augmentée en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p. A, représentation des profils d'expression. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. L'échelle horizontale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert. B, Répartition des gènes selon leur fonction et leur localisation. Les gènes ont été analysés à l'aide du serveur MIPS (http://mips.gsf.de/proj/funcatDB). Les catégories présentes de manière significative par rapport à la répartition de l'ensemble des gènes du génome sont indiquées et le nombre de gènes appartenant à ces différentes catégories est représenté sous forme de pourcentage.

A l'aide du serveur MIPS, nous avons identifié les fonctions cellulaires et la localisation subcellulaire de ces gènes dont la transcription est augmentée en absence d'Aft1p ou d'Aft1p et d'Aft2p (figure 45-B). L'absence des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p entraîne une augmentation de la transcription d'une proportion importante de gènes (18,2%) dont les produits sont impliqués dans la transcription et notamment la synthèse et la maturation des ARNm, ainsi que des gènes dont les produits sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire (figure 45-B). L'augmentation de la transcription de ces catégories de gènes est également observée lorsque les cellules sont soumises à des stress

environnementaux (Gasch *et al.*, 2000). Nous avons également identifié 8,8% de gènes dont les produits sont impliqués dans la réponse au stress, et notamment dans la réponse au stress oxydant (figure 45-A). L'augmentation de la transcription de ce type de gène pourrait être en accord avec le phénotype de sensibilité au H_2O_2 observé chez les mutants *aft1* et *aft1aft2* (Blaiseau *et al.*, 2001). La transcription de gènes dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse des acides aminés leucine et glutamate est également augmentée en absence d'Aft1p et d'Aft2p.

L'absence des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p entraîne également une augmentation de la transcription de 2,7% de gènes dont les produits sont impliqués dans la respiration cellulaire, et notamment le cycle de Krebs (1%). Aft1p et Aft2p activent la transcription de *CTH2*, lui même responsable de la dégradation de plusieurs ARNm dont les produits sont impliqués dans des fonctions mitochondriales telles que la respiration, la synthèse des centres [Fe-S] ou encore le cycle de Krebs (Puig *et al.*, 2005 et chapitre I-B). L'augmentation de la transcription de 2,7% de gènes dont les produits sont impliqués dans la respiration cellulaire en absence d'Aft1p et d'Aft2p pourrait donc être la résultante de l'absence d'induction de *CTH2*. Une analyse globale a été réalisée pour identifier l'ensemble des ARNm régulés par Cth2p (Puig *et al.*, 2005). Nous avons utilisé ces données afin de regarder si d'autres gènes induits par l'absence d'Aft1p et d'Aft2p pouvaient être sous la dépendance de Cth2p (figure 46). Seuls 28 gènes régulés par Cth2p sont également induits en absence d'Aft1p et d'Aft2p, et ce sont pour la plupart des gènes impliqués dans des fonctions mitochondriales (figure 46). Leur petit nombre ne suffit donc pas à expliquer pourquoi autant de gènes sont induits en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p.

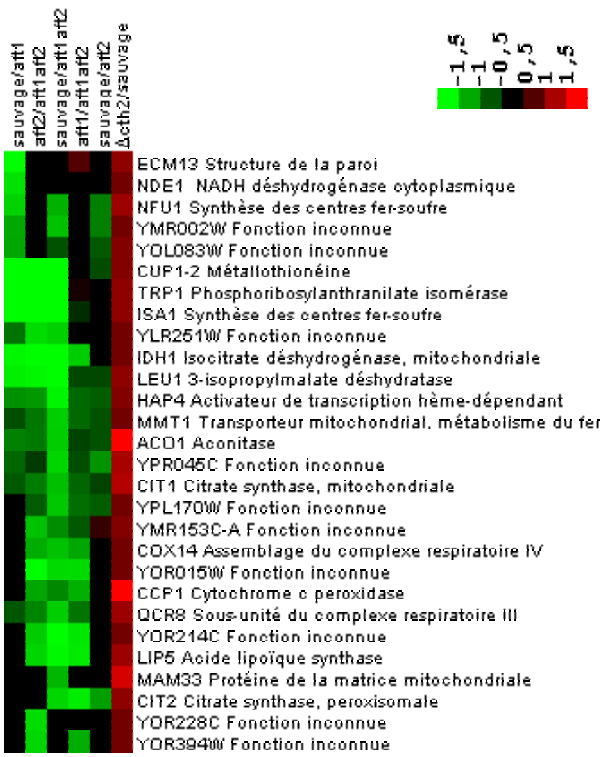

Figure 46 : Comparaison des gènes dont l'expression est augmentée en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p avec les gènes régulés par Cth2p. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. La comparaison *Δcth2*/sauvage est issue des données de Puig *et al.*, 2005. L'échelle horizontale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert.

A-4. Métabolisme du soufre

A-4-a. Biosynthèse des acides aminés méthionine et cystéine

Une souche double mutante est auxotrophe pour la méthionine et la lysine. Ces phénotypes peuvent être partiellement restaurés par l'ajout de 100µM de fer dans le milieu, ou bien totalement abolis en condition anaérobie (Blaiseau *et al.*, 2001). L'origine de ces phénotypes chez la souche *Δaft1Δaft2* n'est pas encore connue, mais ils sont également observés chez une souche *Δsod1*, qui souffre de stress oxydant (Culotta *et al.*, 1995, Slekar *et al.*, 1996).

Parmi les gènes dont la transcription est diminuée chez le mutant *aft1aft2*, nous avons retrouvé des gènes dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse des acides aminés

soufrés, particulièrement la méthionine (figure 47). Par ailleurs, la voie d'assimilation des sulfates semble être au contraire induite par l'absence des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p (figure 47). Ces résultats mettent en évidence une dérégulation de la synthèse des composés soufrés dans une souche *aft1aft2*, et pourraient être en accord avec l'auxotrophie pour la méthionine de cette souche.

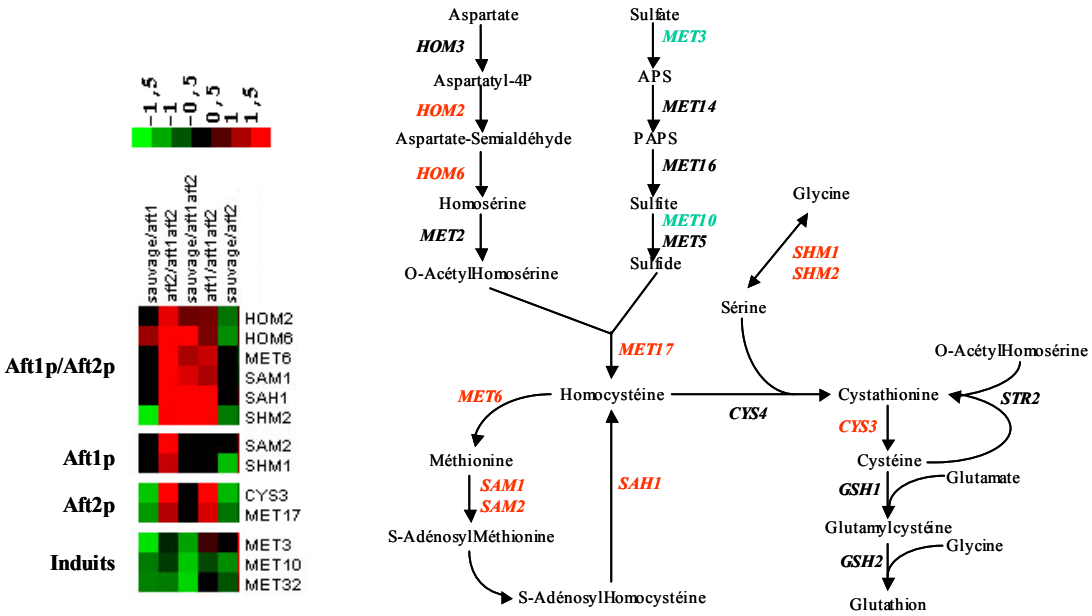

Figure 47: Le métabolisme du soufre chez la souche *aft1aft2*. A gauche, représentation des profils transcriptionnels des gènes impliqués dans le métabolisme du soufre dont l'expression est affectée par l'absence d'Aft1p et d'Aft2p. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. L'échelle horizontale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert. A droite, représentation du métabolisme du soufre chez *S. cerevisiae*. (D'après SGD et Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Les gènes dont les produits catalysent les réactions sont en italique. Les gènes dont la transcription est diminuée dans une souche double mutante sont indiqués en rouge. Les gènes dont la transcription est augmentée dans une souche double mutante sont indiqués en vert. APS : 5'-Adénylylsulfate ; PAPS: 3'-phospho-5'- Adénylylsulfate.

A-4-b. Tolérance au cadmium

En réponse à un traitement par le cadmium, la cellule met en place un programme d'économie du soufre (Fauchon *et al.*, 2002) qui va permettre de mobiliser le soufre de la cellule pour synthétiser de grandes quantités de glutathion. Le glutathion ainsi produit va permettre à la cellule de chélater le cadmium et de le détoxifier dans la vacuole (Perego et Howell, 1997, Li *et al.*, 1997). L'analyse des gènes dont la transcription est affectée chez un double mutant suggérant une dérégulation du métabolisme du soufre, nous avons cherché à

savoir quelles pouvaient être les conséquences de l'absence d'Aft1p et d'Aft2p sur les mécanismes de réponse au cadmium des cellules.

La comparaison des données de transcriptome obtenues en réponse à un traitement au cadmium (Fauchon *et al.*, 2002) avec nos résultats d'analyse globale a révélé que 24% des gènes réprimés en absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p sont induits en réponse au cadmium (données non montrées), ce qui suggère fortement que ces facteurs pourraient être nécessaires pour la tolérance au cadmium des cellules. Nous avons testé cette hypothèse en analysant la croissance des souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2* et *Δaft1Δaft2* sur des boîtes contenant du cadmium (figure 48).

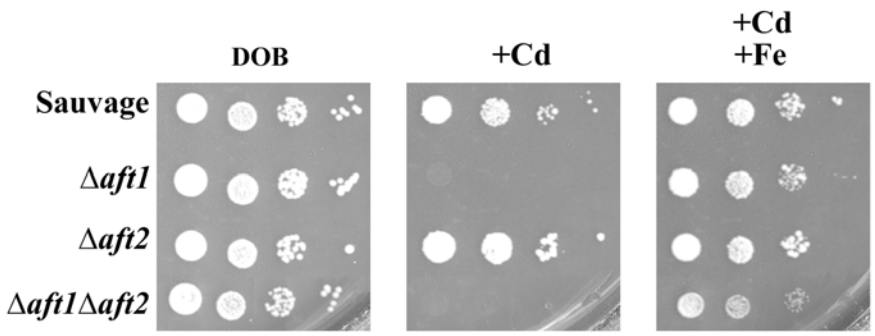

Figure 48 : Aft1p et Aft2p sont nécessaires pour la résistance au cadmium. Les souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2* et *Δaft1Δaft2* sont diluées à DO_{600} = 1 et une série de dilutions d'un facteur 10 est déposée en gouttes de 3µL sur des boîtes de milieu minimum (DOB) avec du cadmium 10µM (+Cd) et avec (+Fe) ou sans ajout de fer 100µM. Les boîtes ont été placées à 30°C pendant 4 jours.

Contrairement à la souche *Δaft2*, les souches *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* présentent une sensibilité au cadmium (figure 48). Par ailleurs, la sensibilité au cadmium de la souche double mutante est plus importante que la sensibilité de la souche simple mutante *Δaft1* (données non montrées). Ces résultats suggèrent qu'Aft1p et Aft2p sont nécessaires pour la tolérance au cadmium. L'ajout de fer dans le milieu minimum permet de restaurer complètement la croissance de la souche *Δaft1*, et partiellement la croissance de la souche *Δaft1Δaft2* (figure 48). L'homéostasie du fer de la souche *Δaft1Δaft2* étant plus affectée que celle de la souche *Δaft1*, il faudrait vérifier si des quantités plus importantes de fer permettent de restaurer complètement la croissance de la souche *Δaft1Δaft2*. Ces résultats suggèrent néanmoins que la dérégulation de l'homéostasie du fer des souches mutantes pourrait être à l'origine de leur sensibilité au cadmium.

A-4-c. Oxydoréduction des ponts disulfures

Nous avons isolé six gènes impliqués dans le système d'oxydoréduction des ponts disulfures *via* le glutathion ou les thiorédoxines dont la transcription est diminuée chez une souche double mutante, et deux gènes impliqués dans ce même système dont l'expression est en revanche induite en absence d'Aft1p et d'Aft2p (figure 49).

La glutathion réductase et les thiorédoxines réductases permettent de régénérer les thiols oxydés produits par les glutarédoxines, les glutathion peroxydases ou les thiorédoxines peroxydases. Le profil transcriptionnel de l'ensemble de ces gènes (figure 49) suggère donc un défaut de régénération des thiols oxydés dans une souche double mutante. Par ailleurs, l'augmentation de la transcription de *GPX2* et *PRX1*, ainsi que celle de *CTT1* (catalase T cytosolique), *CCP1* (cytochrome c peroxydase) et *CUP1* (métallothionéine) pourrait être en accord avec l'existence d'un stress oxydant chez une souche double mutante (figure 49 et Blaiseau *et al.*, 2001).

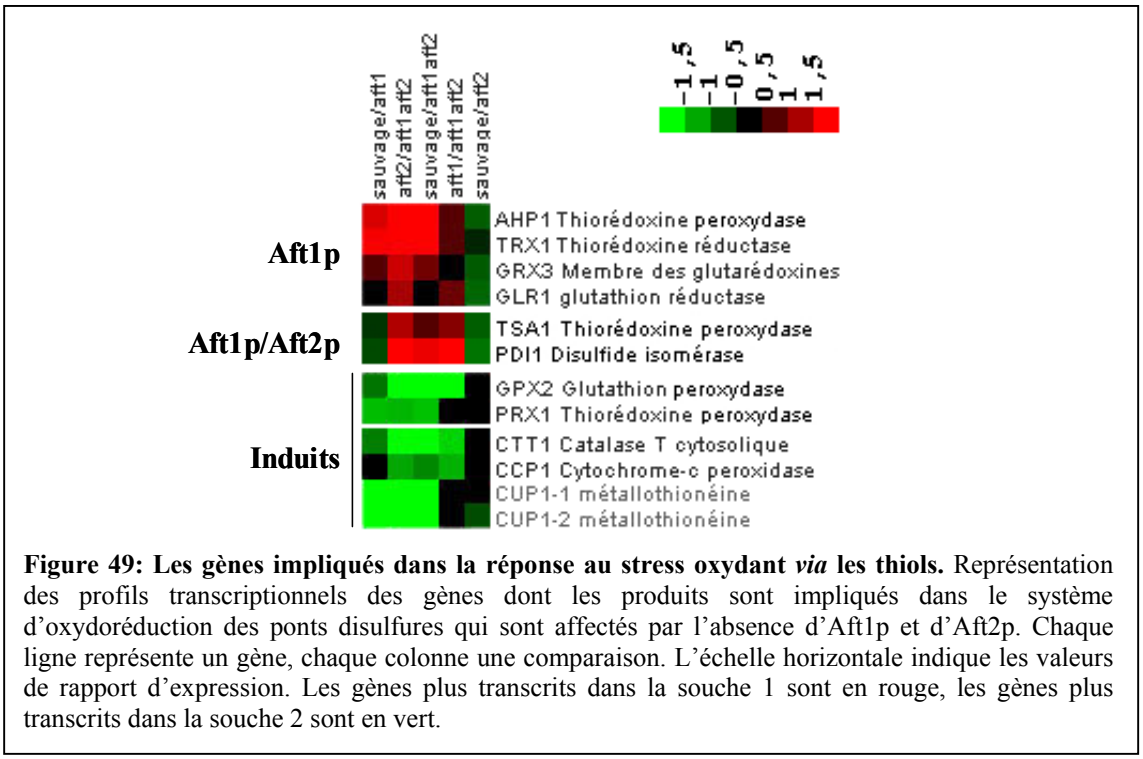

Figure 49: Les gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant *via* les thiols. Représentation des profils transcriptionnels des gènes dont les produits sont impliqués dans le système d'oxydoréduction des ponts disulfures qui sont affectés par l'absence d'Aft1p et d'Aft2p. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. L'échelle horizontale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert.

A-5. Métabolisme respiratoire et croissance sur milieu respirable

L'analyse des gènes sous l'influence d'Aft1p et/ou d'Aft2p a permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone, et notamment la glycolyse. La transcription de ces gènes est majoritairement diminuée en absence d'Aft1p et d'Aft2p (figure 50). Par ailleurs, la transcription des gènes impliqués dans le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) est augmentée en absence des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p (figure 50), effet qui pourrait en partie être du à l'absence de transcription de *CTH2* dans ces conditions (Puig *et al.*, 2005).

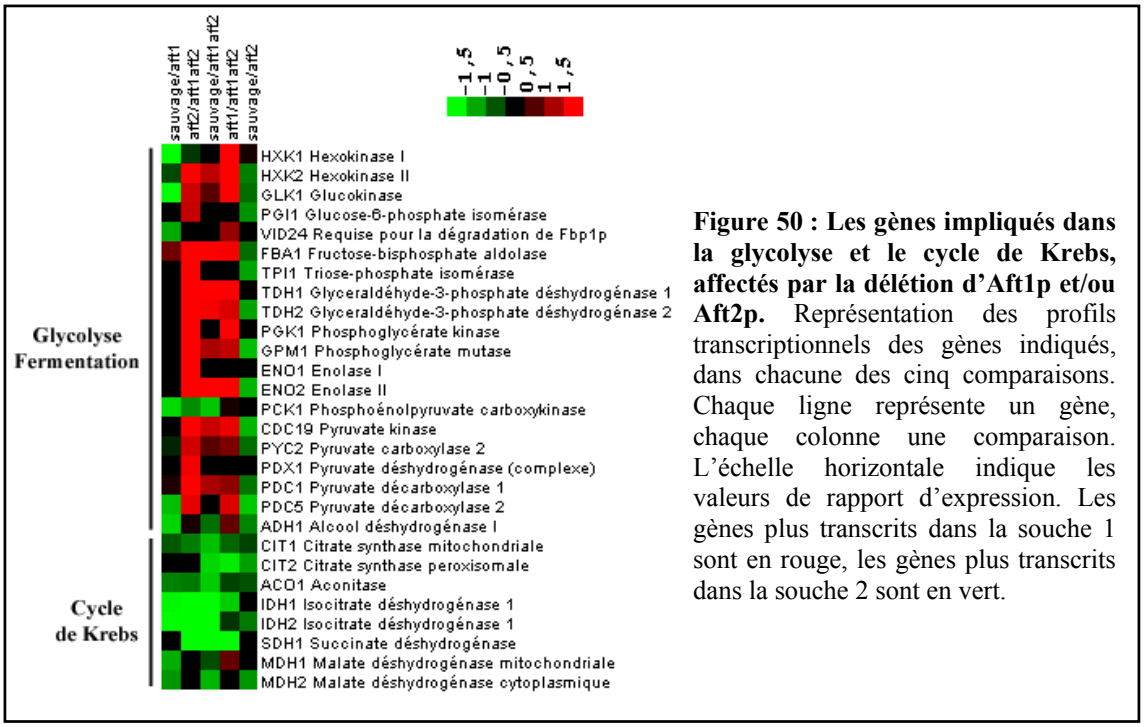

Figure 50 : Les gènes impliqués dans la glycolyse et le cycle de Krebs, affectés par la délétion d'Aft1p et/ou Aft2p. Représentation des profils transcriptionnels des gènes indiqués, dans chacune des cinq comparaisons. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. L'échelle horizontale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert.

Un tel effet transcriptionnel n'est pas sans rappeler le phénomène qui est observé lorsque les cellules passent d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire en réponse à un épuisement du glucose dans le milieu, appelé transition diauxique (DeRisi *et al.*, 1997).

La transition diauxique apparaît environ après une dizaine d'heures de croissance exponentielle dans un milieu complet contenant 2% de glucose (DeRisi *et al.*, 1997). Les ARN totaux utilisés pour notre analyse ont été extraits après seulement cinq heures de

croissance des cellules en 2% glucose. Nos conditions de culture ne peuvent donc pas expliquer le phénomène que nous observons. L'absence des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p pourrait donc entraîner un changement métabolique de type transition diauxique au sein de la cellule.

Figure 51 : Les fonctions mitochondriales induites en absence d'Aft1p et/ou Aft2p. Représentation des profils transcriptionnels des gènes indiqués, dans chacune des cinq comparaisons. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. L'échelle verticale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert.

Les analyses globales du transcriptome des souches ayant effectué la transition diauxique ont révélé l'augmentation de la transcription des gènes impliqués dans les activités mitochondriales (DeRisi *et al.*, 1997). Nous avons également retrouvé ce résultat en absence d'Aft1p et d'Aft2p (figure 51).

Plusieurs des gènes induits en absence d'Aft1p et d'Aft2p codent pour des protéines ribosomiques mitochondriales, suggérant une traduction accrue des gènes codés par le génome mitochondrial. Le génome mitochondrial code, entre autres, pour plusieurs sous-unités des complexes respiratoires. D'autres composants de ces complexes, codés par le génome nucléaire, ainsi que des facteurs de leur assemblage, sont également induits en absence d'Aft1p et d'Aft2p (figure 51), de même que plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la biogenèse des centres [Fe-S], nécessaires à l'activité des complexes respiratoires. Plusieurs gènes codent également pour des protéines impliquées dans les processus de réplication et de biogenèse des mitochondries, ainsi que pour de nombreux transporteurs (figure 51). L'ensemble de ces résultats suggère donc que les fonctions mitochondriales sont induites en absence d'Aft1p et d'Aft2p.

Ces données de transcriptome sont en accord avec le fait que les souches mutantes *aft1* et *aft1aft2* consomment 2 fois plus d'oxygène qu'une souche sauvage (Blaiseau *et al.*, 2001). Ce qui peut alors sembler paradoxal, c'est que la souche *Δaft1* soit incapable de croître sur un milieu contenant une source de carbone strictement respirable, telle que le glycérol, l'éthanol ou le pyruvate (Casas *et al.*, 1997), ou une source de carbone préférentiellement respirable comme le raffinose (Blaiseau *et al.*, 2001). De la même manière, la souche *Δaft1Δaft2* ne peut croître en présence de glycérol ou de raffinose dans le milieu (Blaiseau *et al.*, 2001). Le défaut de croissance sur raffinose de la souche *Δaft1* peut être restauré par l'ajout de 100µM de fer ou de cuivre dans le milieu, mais pas celui de la souche *Δaft1Δaft2* (Blaiseau *et al.*, 2001). Afin de comprendre davantage ce paradoxe, nous avons réalisé des tests de croissance sur des milieux contenant différentes quantités de glucose (figure 52). Il a été montré que plus le glucose est présent en faibles quantités dans le milieu, et plus il induit le métabolisme respiratoire des cellules (Lin *et al.*, 2002). A l'inverse, plus le glucose est présent en grandes quantités dans le milieu, et plus il favorise le métabolisme fermentaire. Dans des conditions où le glucose est graduellement diminué ou augmenté dans le milieu par rapport aux quantités standard utilisées (2%), il sera donc possible de suivre l'adaptation progressive des cellules à un métabolisme respiratoire ou fermentaire (figure 52).

Sur un milieu complet, les souches sauvage et *Δaft2* sont capables de croître quelle que soit la quantité de glucose dans le milieu (figure 52-A). En revanche, la croissance des souches *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* diminue parallèlement à la diminution de quantité de glucose dans le milieu par rapport à la quantité standard. A l'inverse, la croissance du mutant

Δaft1Δaft2 est favorisée par l'ajout de plus fortes quantités de glucose par rapport aux quantités standard (figure 52-A). Lorsque qu'une même quantité de fer est ajoutée dans le milieu (figure 52-A), elle permet une restauration graduelle de la croissance des mutants *Δaft1* et *Δaft1Δaft2*. Plus le métabolisme respiratoire est favorisé (par de faibles quantités de glucose) et moins l'ajout de fer est efficace pour restaurer la croissance des mutants.

Des expériences similaires réalisées sur milieu minimum (figure 52-B) permettent d'observer le même phénomène de manière beaucoup plus démonstrative concernant la souche *Δaft1Δaft2*.

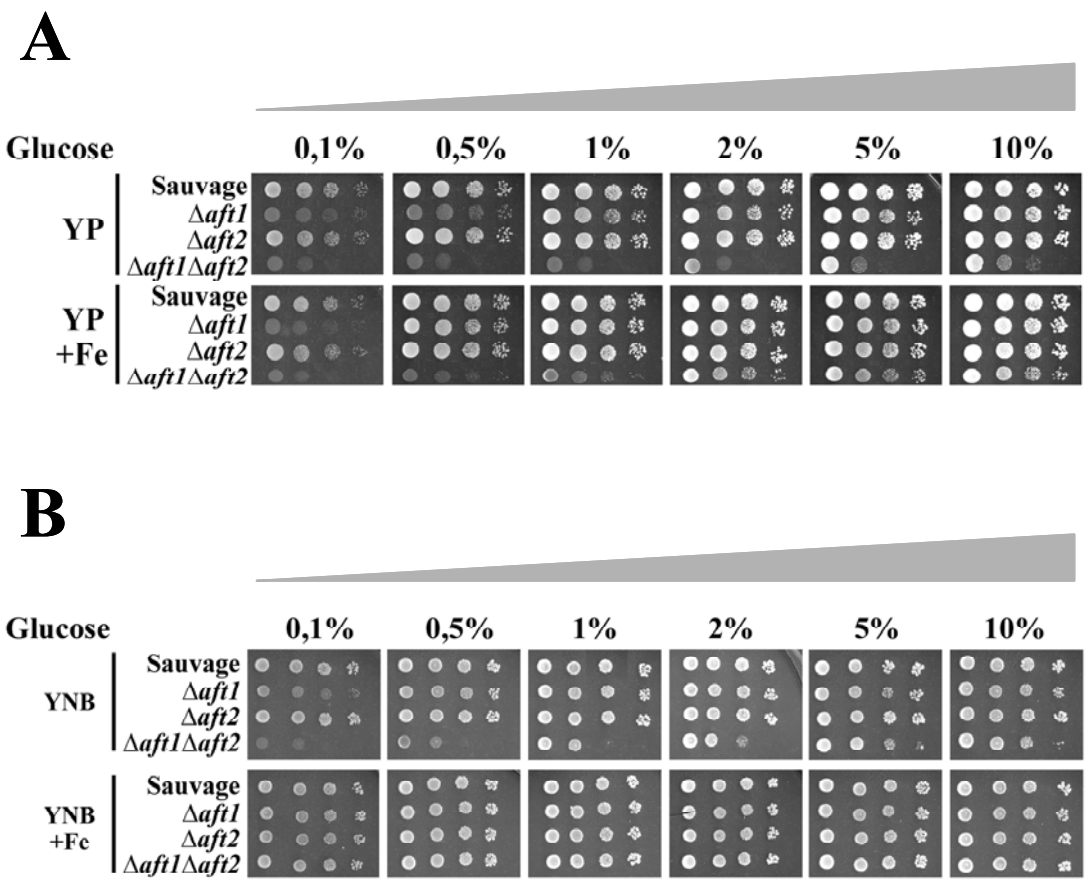

Figure 52 : Croissance des mutants en présence de concentrations croissantes de glucose. Les souches sauvage, *Δaft1*, *Δaft2* et *Δaft1Δaft2* sont diluées à DO_{600} = 1 et une série de dilutions d'un facteur 10 est déposée en gouttes de 3µL sur des boîtes de milieu complet (YP, A) ou minimum complet (YNB, B) contenant différentes concentrations de glucose et avec (+Fe) ou sans ajout de fer 100µM. Les boîtes ont été placées à 30°C pendant 4 jours.

L'ensemble de ces résultats montre que bien que les souches *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* présentent un métabolisme respiratoire augmenté dans des conditions de fermentation (2%

glucose), elles sont incapables de croître dans des conditions de respiration (source de carbone respirable ou diminution de la quantité de glucose dans le milieu). La corrélation entre le métabolisme respiratoire accru des souches *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* en condition de fermentation (2% glucose) et leur croissance affectée en condition de respiration (source de carbone respirable ou diminution de la quantité de glucose dans le milieu) suggère que l'augmentation du fonctionnement de la chaîne respiratoire chez les mutants *Δaft1* et *Δaft1Δaft2* est néfaste pour les cellules, possiblement parce qu'elle entraîne une production de dérivés oxygénés accrue à laquelle les cellules ne peuvent faire face. En accord avec cette hypothèse, plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans la réponse au stress oxydant voient leur transcription augmentée par l'absence d'Aft1p et d'Aft2p (ce Chapitre, partie A-4-c.), et les phénotypes liés au stress oxydant des souches délétées d'*AFT1* sont abolis en absence d'oxygène (Blaiseau *et al.*, 2001, Rutherford *et al.*, 2001). Le défaut de croissance des mutants sur un milieu respirable peut également être pallié par l'ajout de fer, ce qui montre que le défaut d'homéostasie du fer des cellules est à l'origine de ce phénotype.

B. Vers de nouvelles cibles directes pour Aft1p et Aft2p ?

B-1.La présence d'une séquence consensus de fixation pour Aft1p et/ou Aft2p restreint le nombre de gènes cibles potentiels

Le nombre important de gènes dont la transcription est affectée par la délétion d'Aft1p et/ou d'Aft2p (1405) représente à la fois les effets directement imputables à l'absence de régulation transcriptionnelle par les protéines Aft1p et Aft2p ainsi que les effets métaboliques indirects, réponse générale de la cellule à la perturbation de l'homéostasie du fer. L'analyse des profils transcriptionnels de ces 1405 gènes a permis de définir 3 groupes de gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p (147 gènes), en absence d'Aft2p (190 gènes en contexte mutant pour Aft1p) ou en absence d'Aft1p et d'Aft2p (167 gènes). Afin de distinguer les effets directs de l'absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p des effets métaboliques indirects, une recherche de séquences consensus de fixation d'Aft1p et d'Aft2p dans les promoteurs des gènes de ces trois groupes a été entreprise.

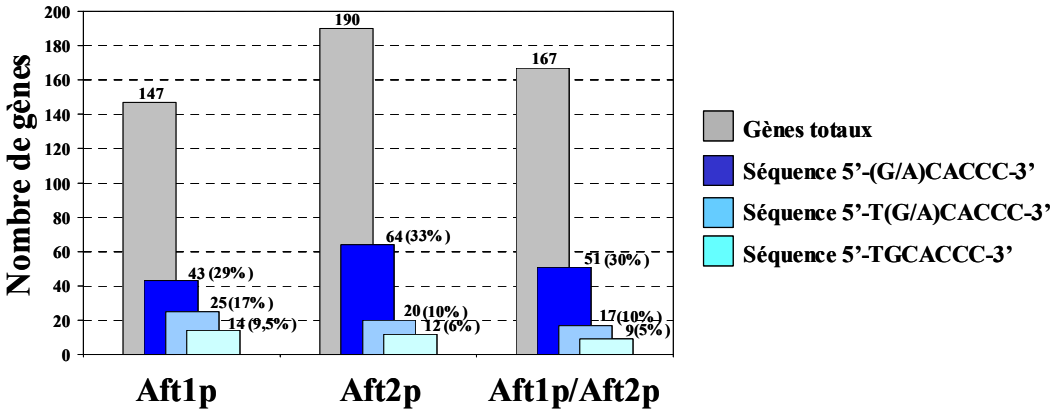

Figure 53 : Analyse des promoteurs pour la présence d'une séquence consensus de fixation d'Aft1p et/ou d'Aft2p. Les 700 pb en amont du site d'initiation de la traduction de chaque gène ont été analysées à l'aide du serveur RSA-tools (http://rsat.ulb.ac.be/rast).

Nous avons identifié une séquence consensus de fixation légèrement divergente pour chacun des deux facteurs de transcription : la séquence 5'-TGCACCC-3' semble être la séquence reconnue par Aft1p, alors que la séquence 5'-(G/A)CACCC-3' semble être reconnue par Aft2p (article 1). Quelques gènes cibles d'Aft1p, tels que *FRE1* ou *FIT2*, contiennent cependant la séquence 5'-TACACCC-3', sur laquelle Aft1p est capable de se fixer *in vitro* (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Nous nous sommes donc intéressés à la présence des séquences 5'-T(G/A)GCACCC-3' et 5'-(G/A)CACCC-3' dans les régions promotrices des gènes dont la transcription est diminuée en absence d'Aft1p, en absence d'Aft2p ou en absence des deux (figure 53). Ces séquences ne sont que légèrement différentes les unes des autres. Les gènes contenant la séquence 5'-TGCACCC-3' représentent un sous ensemble des gènes contenant la séquence 5'-T(G/A)CACCC-3', eux-mêmes sous-ensemble des gènes contenant une séquence 5'-(G/A)CACCC-3'.

La séquence 5'-(G/A)CACCC-3' est présente dans 24% des promoteurs des gènes du génome de *S. cerevisiae*. Ce sont les gènes sous l'influence d'Aft2p qui possèdent dans leur promoteur la plus grande proportion de cette séquence (33%), celle-ci n'étant retrouvée que dans 29% des promoteurs des gènes sous l'influence d'Aft1p et 30% des promoteurs des gènes sous l'influence d'Aft1p et d'Aft2p (figure 53). Ce résultat est en accord avec l'identification de cette séquence comme consensus de fixation pour Aft2p. Cependant, cette séquence n'est que 1,4 fois plus présente parmi les gènes sous l'influence d'Aft2p que sur

l'ensemble du génome, ce qui ne représente pas un enrichissement significatif. Sur les 190 gènes sous l'influence d'Aft2p, seuls 64 contiennent cette séquence, ce qui restreint malgré tout le nombre de gènes cibles potentiels directs d'Aft2p (figure 53).

La séquence 5'-T(G/A)CACCC-3' est présente dans 7% des promoteurs des gènes du génome de *S. cerevisiae*. Elle est 2,4 fois plus présente parmi les gènes sous l'influence d'Aft1p (17%), contre seulement 1,7 fois plus parmi des gènes sous l'influence d'Aft2p ou sous l'influence d'Aft1p et d'Aft2p (10%). Ce résultat est en accord avec une spécificité d'Aft1p pour des séquences de type 5'-T(G/A)CACCC-3', et révèle que sur les 147 gènes dont la transcription est diminuée par l'absence d'Aft1p, seuls 25 peuvent être considérés comme des cibles directes potentielles de ce facteur (figure 53).

La séquence la mieux définie, 5'-TGCACCC-3', présente dans 3% des gènes du génome, est 3 fois plus représentée parmi les gènes sous l'influence d'Aft1p (9,5%), ce qui est accord avec l'identification de cette séquence comme consensus de fixation pour Aft1p. La séquence 5'-TGCACCC-3' est par ailleurs 2 fois plus présente parmi les gènes sous l'influence d'Aft2p (6%), ce qui indique que la présence de cette séquence n'est pas suffisante pour expliquer une activation médiée uniquement par Aft1p. La séquence 5'-TGCACCC-3' est seulement 1,6 fois plus présente parmi les gènes sous l'influence d'Aft1p et d'Aft2p (5%), ce qui suggère que cette séquence n'est pas nécessaire pour une activation commune par Aft1p et Aft2p. Pourtant, les gènes pour lesquels nous avons démontré un rôle des deux facteurs Aft1p et Aft2p, à savoir *FTR1*, *FIT3* et *CTH2* possèdent tous dans leur promoteur au moins une séquence 5'-TGCACCC-3'. Le nombre de gènes dont la transcription est diminuée par l'absence des deux facteurs de transcription est possiblement très pauvre en gènes cibles directes d'Aft1p et d'Aft2p, ce qui pourrait biaiser la répartition des séquences au sein de ce groupe de gènes.

L'analyse des promoteurs des gènes sous l'influence d'Aft1p, d'Aft2p ou d'Aft1p et d'Aft2p permet donc de réduire le nombre de gènes cibles potentiels de ces deux facteurs, mais la confirmation de leur implication directe dans la transcription de ces gènes reste un élément incontournable pour valider les résultats obtenus.

B-2. Aft1p est impliqué dans la régulation directe des gènes du transport du fer extracellulaire

La séquence 5'-T(G/A)CACCC-3' étant enrichie parmi les gènes sous l'influence d'Aft1p, la fonction des 25 gènes possédant ce type de séquence a été détaillée (figure 54). Parmi eux, 10 sont des gènes connus comme étant régulés par Aft1p, impliqués dans le transport extracellulaire du fer et possédant une séquence 5'-TGCACCC-3', excepté *FRE1* qui possède une séquence 5'-TACACCC-3' (figure 54).

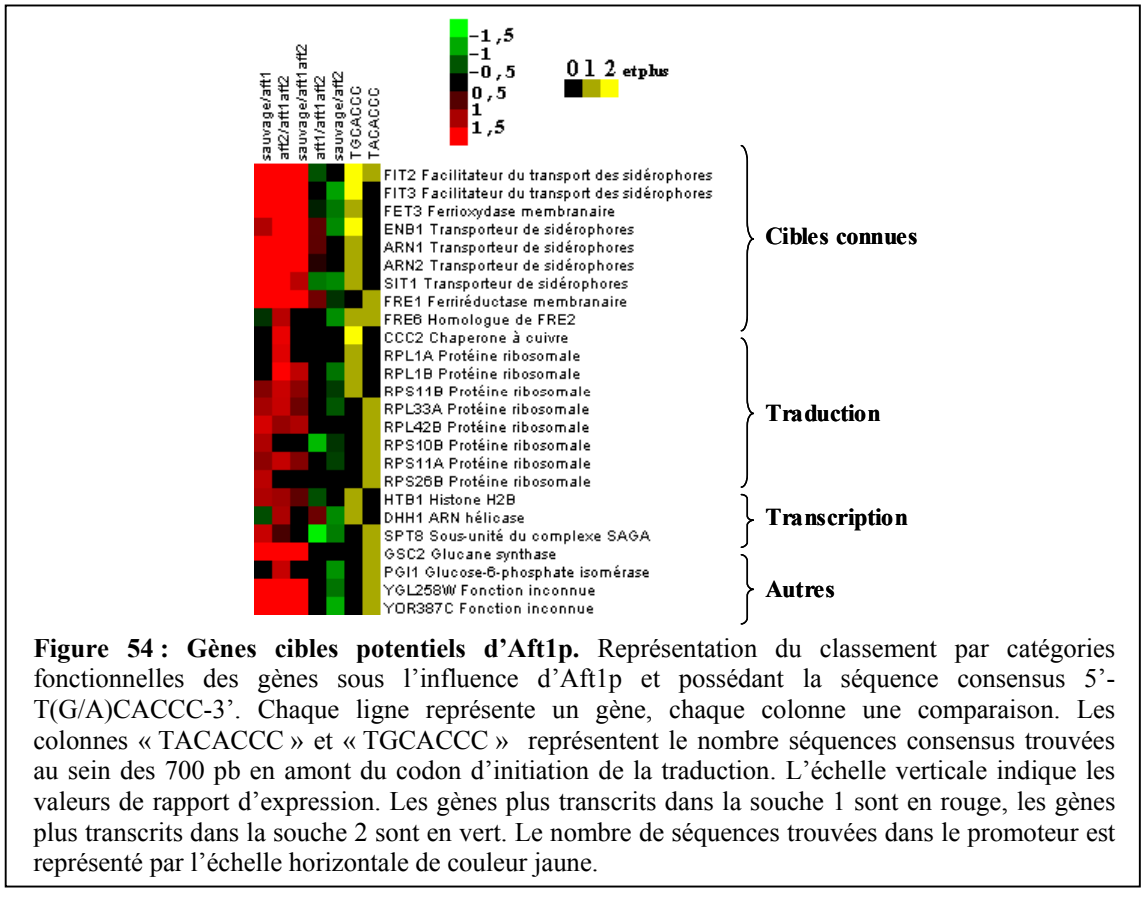

Figure 54 : Gènes cibles potentiels d'Aft1p. Représentation du classement par catégories fonctionnelles des gènes sous l'influence d'Aft1p et possédant la séquence consensus 5'-T(G/A)CACCC-3'. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. Les colonnes « TACACCC » et « TGCACCC » représentent le nombre séquences consensus trouvées au sein des 700 pb en amont du codon d'initiation de la traduction. L'échelle verticale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert. Le nombre de séquences trouvées dans le promoteur est représenté par l'échelle horizontale de couleur jaune.

Les 8 gènes codant pour des protéines ribosomales ne sont vraisemblablement pas des cibles directes d'Aft1p. Comme nous l'avons mentionné précédemment, 35 gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse protéique ont une transcription diminuée en absence d'Aft1p, ce qui suggère plutôt un effet indirect de la délétion d'Aft1p. Par ailleurs, le régulateur majeur de la transcription des protéines ribosomales Rap1p reconnaît une séquence

consensus 5'-(A/T)ACA(C/T)CC(A/G)TACAT(C/T)-3' (Lascaris *et al.*, 1999). Le chevauchement partiel de cette séquence avec la séquence 5'-T(G/A)CACCC-3', peut expliquer pourquoi certains gènes ribosomaux sont identifiés comme cibles potentielles d'Aft1p.

B-3. Aft1p et Aft2p sont impliqués ensemble dans la régulation directe de l'homéostasie du zinc

Aucune séquence consensus, 5'-T(G/A)CACCC-3' ou 5'-(G/A)CACCC-3', n'est particulièrement enrichie parmi les gènes sous l'influence d'Aft1p et d'Aft2p. Cependant, étant donné que les gènes connus comme étant régulés par ces deux facteurs (*FIT3*, *CHT2*, *FTR1*) possèdent une séquence de type 5'-T(G/A)CACCC-3', nous avons regardé quels sont les autres gènes qui possèdent ce type de séquence dans leur région promotrice (figure 55). Nous avons retrouvé les gènes du métabolisme du zinc *ZRT1* et *ZRT3* pour lesquels nous avons mis en évidence un rôle direct d'Aft1p et d'Aft2p dans leur régulation (chapitre II), ainsi que le gène *PDI1*, cible potentielle intéressante puisque le produit de ce gène est impliqué dans la formation des ponts disulfures dans le cadre de la maturation des protéines néosynthétisées.

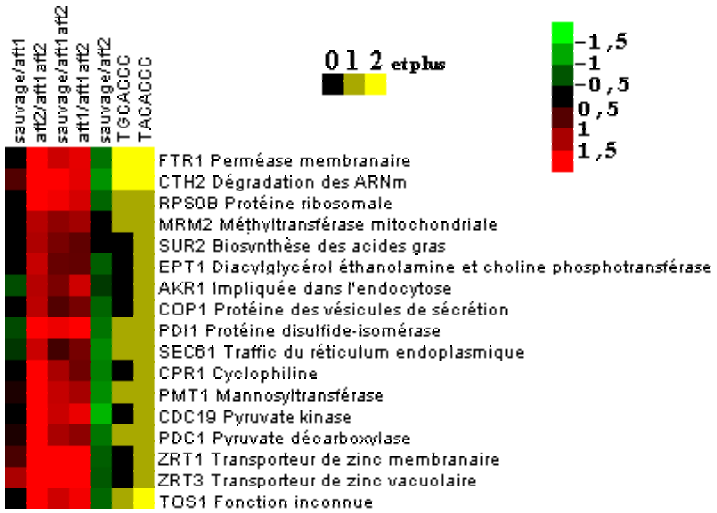

Figure 55 : Gènes cibles potentiels d'Aft1p et d'Aft2p. Représentation des gènes sous l'influence d'Aft1p et d'Aft2p et possédant les séquences consensus 5'-T(G/A)CACCC-3'. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. Les colonnes « TACACCC » et « TGCACCC » représentent le nombre séquences consensus trouvées au sein des 700 pb en amont du codon d'initiation de la traduction. L'échelle verticale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert. Le nombre de séquences trouvées dans le promoteur est représenté par l'échelle horizontale de couleur jaune.

B-4. Aft2p pourrait être impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides

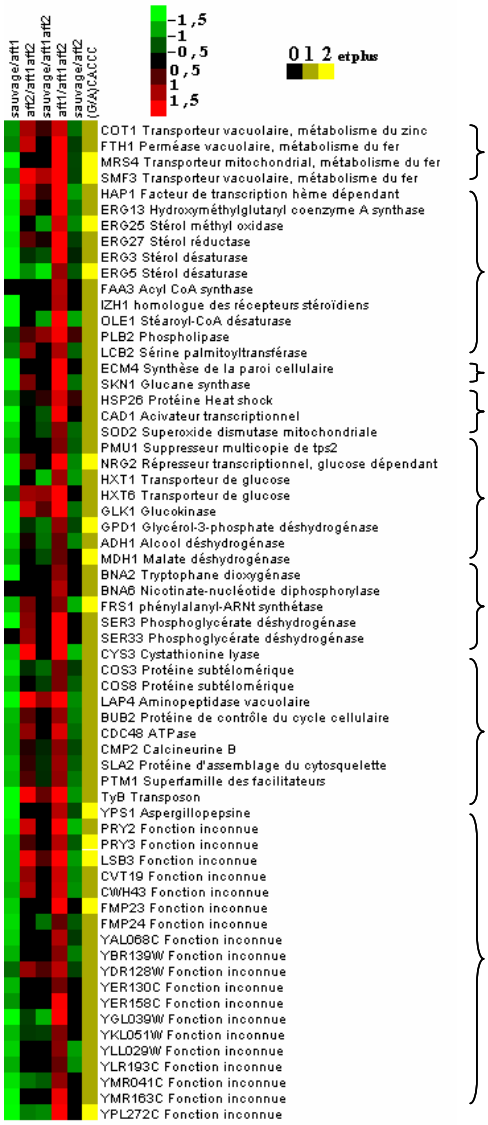

Figure 56 : Gènes cibles potentiels d'Aft2p. Représentation du classement par catégories fonctionnelles des gènes sous l'influence d'Aft2p et possédant la séquence consensus 5'-(G/A)CACCC-3'. Chaque ligne représente un gène, chaque colonne une comparaison. La colonne « (G/A)CACCC » représente le nombre séquences consensus trouvées au sein des 700 pb en amont du codon d'initiation de la traduction. L'échelle verticale indique les valeurs de rapport d'expression. Les gènes plus transcrits dans la souche 1 sont en rouge, les gènes plus transcrits dans la souche 2 sont en vert. Le nombre de séquences trouvées dans le promoteur est représenté par l'échelle horizontale de couleur jaune.

La séquence identifiée pour Aft2p, 5'-(G/A)CACCC-3' n'est pas particulièrement enrichie dans le groupe de gènes sous l'influence d'Aft2p, mais c'est ce groupe qui possède la

plus grande proportion de cette séquence, ce qui représente 64 gènes cibles potentiels d'Aft2p (figure 56).

De manière intéressante, sur les 21 gènes impliqués dans la biosynthèse des lipides et des acides gras, 11 possèdent une séquence 5'-(G/A)CACCC-3'. De manière plus spécifique, 5 gènes intervenant dans la biosynthèse de l'ergostérol sont retrouvés dans cette catégorie. Les stérols sont des composés lipidiques des membranes eucaryotes, essentiels au maintien de la viabilité cellulaire. L'ergostérol est le composant spécifique des membranes des champignons. La biosynthèse de l'ergostérol (figure 57) est un procédé métabolique mettant en jeu pas moins de 20 réactions distinctes, localisées majoritairement dans le réticulum endoplasmique. Au total, 11 gènes participant à cette voie de biosynthèse sont sous l'influence d'Aft2p, dont 5 possèdent une séquence 5'-(G/A)CACCC-3'. Cela suggère une implication importante de ce facteur dans la régulation transcriptionnelle de cette voie métabolique.

La régulation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol a lieu au niveau transcriptionnel. Les facteur de transcription Upc2p et Ecm22p activent la transcription de ces gènes en réponse à la carence en ergostérol (Vik et Rine, 2001). Plusieurs gènes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (par exemple *ERG11* et *HMG1*) sont également régulés de manière combinatoire par les facteurs de transcription Rox1p et Hap1p, respectivement répresseur et activateur hème-dépendants (Kwast *et al.*, 1998). En effet, la biosynthèse de l'ergostérol consomme de l'oxygène moléculaire au niveau de 6 réactions enzymatiques, catalysées par des enzymes à co-facteur fer (figure 57). Elle ne peut donc avoir lieu qu'en condition aérobie. Nous avons également identifié *HAP1* comme une cible potentielle directe d'Aft2p (figure 56).

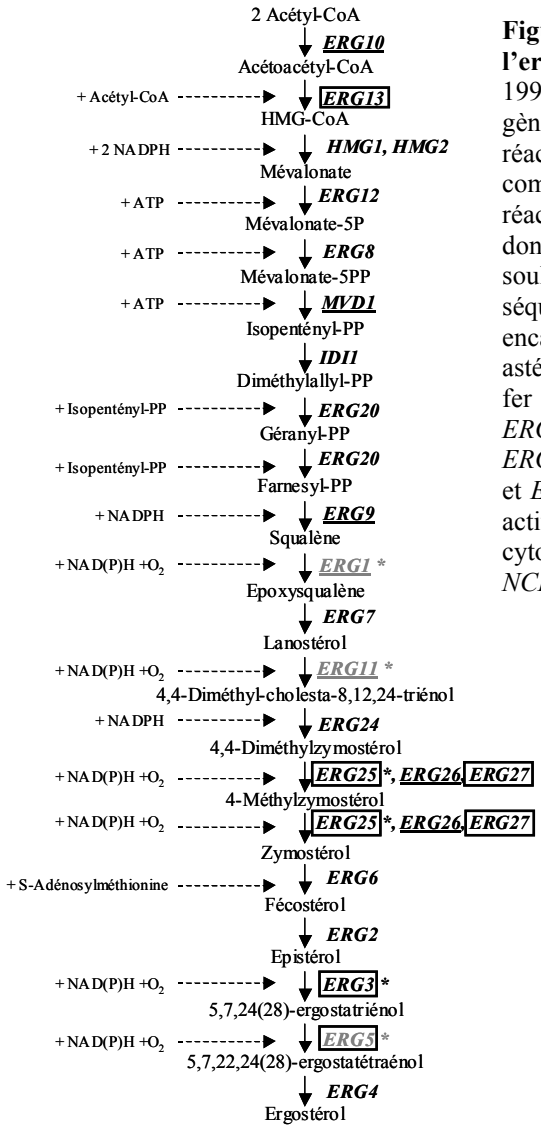

Figure 57 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol. (D'après SGD, Daum *et al.*, 1998, Rosenfeld et Beauvoit, 2003). Les gènes impliqués dans chacune des réactions sont indiqués à droite, les composés consommés pour chaque réaction sont indiqués à gauche. Les gènes dont la transcription dépend d'Aft2p sont soulignés, et ceux qui possèdent une séquence consensus de fixation sont encadrés. Les gènes marqués d'un astérisque codent des protéines à co-facteur fer (type cytochrome P450 : *ERG11* et *ERG5* ; type cytochrome non P450 : *ERG1* ; type di-ferrique non hème : *ERG25* et *ERG3*). Les gènes notés en gris ont une activité dépendante de la NADPH-cytochrome P450 réductase codée par *NCP1*.

L'hypothèse d'une régulation directe par Aft2p des gènes de la biosynthèse de l'ergostérol est renforcée par le fait que ces gènes sont activés en réponse à la carence en fer (Puig *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'ajout de tween-ergostérol dans un milieu YPG contenant 100µM de fer permet d'améliorer la croissance de la souche double mutante *Δaft1Δaft2* (résultats P.L. Blaiseau). La croissance de la souche double mutante peut également être restaurée par l'ajout d'acide oléique dans un milieu YPG, source d'acide gras pour la cellule (résultats P.L. Blaiseau). Le gène *OLE1*, impliqué dans la biosynthèse des acides gras, est également une cible potentielle directe d'Aft2p (figure 56). Il semble donc exister une relation étroite entre Aft2p et le métabolisme des lipides et des acides gras.

L'analyse des séquences consensus dans les promoteurs des gènes sous l'influence d'Aft1p et/ou d'Aft2p a permis l'identification de nouveaux gènes cibles potentiels pour chacun de ces facteurs. Il reste à vérifier dans un premier temps par Northern blot que la régulation transcriptionnelle de ces gènes est bien Aft1p- et Aft2p-dépendante, et si c'est le cas, définir par des expériences d' immunoprécipitation de la chromatine l'implication directe ou indirecte de ces facteurs dans la régulation observée. Ce travail a été amorcé concernant les gènes impliqués dans le métabolisme du zinc (chapitre II). Par ailleurs, il semblerait important de poursuivre une telle étude concernant les gènes du métabolisme des lipides et des acides gras, qui se révèlent être assez nombreux comme cibles potentielles directes d'Aft2p.

Chapitre IV:
Purification des protéines Aft1p et Aft2p

A. Stratégie de purification des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p

A-1. Pourquoi vouloir purifier les facteurs de transcription Aft1p et Aft2p ?

L'utilisation de la protéine Aft1p synthétisée *in vitro* pour des expériences de retard sur gel avec différents oligonucléotides radiomarqués a mis en évidence l'affinité de cette protéine pour la séquence 5'-TGCACCC-3' et dans une moindre mesure pour la séquence 5'-TACACCC-3' (Yamaguchi *et al.*, 1996). Il a été montré également que le domaine potentiel de liaison à l'ADN d'Aft2p (acides aminés 1 à 214) était capable de reconnaître *in vitro* la séquence 5'-TGCACCC-3' (Rutherford *et al.*, 2001). Par ailleurs, nous avons montré qu'Aft1p et Aft2p étaient capables de reconnaître *in vivo* des séquences consensus d'ADN légèrement divergentes, 5'-T(G/A)CACCC-3' pour Aft1p, et 5'-(G/A)CACCC-3' pour Aft2p (article 1). Ce résultat pourrait résulter d'une affinité intrinsèque de liaison à l'ADN d'Aft1p et d'Aft2p différente en fonction de la séquence considérée. Déterminer et comparer les constantes d'affinité d'Aft1p et d'Aft2p pour différentes séquences d'ADN permettrait de vérifier cette hypothèse. Les facteurs de transcription sont en général composés de deux domaines distincts : le domaine de liaison à l'ADN, et le domaine de transactivation. Le domaine de liaison à l'ADN d'Aft1p et d'Aft2p ayant été identifié, il serait envisageable de réaliser ces mesures d'affinités uniquement à partir des domaines de liaison purifiés, par des expériences de retard sur gel avec compétition entre différents oligonucléotides mutés. Des études ont cependant montré que la régulation de la liaison à l'ADN de certains facteurs de transcription passe par un mécanisme d'interaction intramoléculaire entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation. C'est le cas du facteur de transcription

Mac1p, régulateur de l'homéostasie du cuivre (Jensen et Winge, 1998), ou du facteur de transcription Leu3p, régulateur de la biosynthèse de la leucine (Wang *et al.*, 1997). L'utilisation des protéines entières purifiées Aft1p et Aft2p semble donc être un outil plus complet pour apporter un maximum d'informations quant aux propriétés de liaison à l'ADN de chacun de ces deux facteurs de transcription et à l'influence du fer sur cette capacité de liaison à l'ADN.

Le remplacement d'un résidu cystéine conservé entre Aft1p et Aft2p (position 291 pour Aft1p, 187 pour Aft2p) confère aux protéines mutées une activité transcriptionnelle constitutive, non régulée par la quantité de fer dans le milieu. Les résidus cystéine étant des ligands potentiels du fer, un mécanisme de régulation de l'activité d'Aft1p par la formation/déformation d'un centre [Fe-S] avait été suggéré (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995). Par extension, un mécanisme similaire pourrait être à l'origine de la régulation de l'activité transcriptionnelle d'Aft2p.

En accord avec ces observations, il a été montré que l'activité transcriptionnelle d'Aft1p et d'Aft2p n'est pas dépendante de la quantité de fer dans le cytosol, mais qu'elle est influencée par la biosynthèse des centres [Fe-S] (Chen *et al.*, 2004), et plus particulièrement par la voie de biosynthèse mitochondriale de ces centres [Fe-S] (Rutherford *et al.*, 2005). Il semblerait cependant qu'Aft1p et Aft2p ne soient pas les senseurs directs de cette activité, puisqu'aucune structure de type centre [Fe-S] n'a été détectée par spectroscopie dans les domaines purifiés de liaison à l'ADN de ces deux protéines, ni aucune présence de fer dans le domaine de liaison à l'ADN d'Aft1p (Rutherford *et al.*, 2005). Ces études n'ont pas été réalisées sur les protéines entières. Comme mentionné précédemment, la régulation par le fer de l'activité d'Aft1p et d'Aft2p pourrait passer par une interaction entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation, entraînant un changement de conformation de la protéine. La caractérisation de la structure des protéines entières purifiées pourrait donc apporter des informations supplémentaires concernant le mécanisme de régulation par le fer des protéines Aft1p et Aft2p.

A-2. Système de purification utilisé

La surproduction des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p ne peut être conduite chez la levure *S. cerevisia*e, du fait de leur toxicité (chapitre I). Nous avons donc opté pour un système d'expression hétérologue chez *E. coli*, du fait de son important rendement de production et de la flexibilité du système qui permet de choisir différentes combinaisons d'expression souches/plasmides.

Nous avons choisi d'utiliser le vecteur d'expression pGEX-4T-1, qui permet d'exprimer la protéine à purifier fusionnée en C-terminal de la GST de *Schistosoma japonicum* (Glutathion S-Transférase). Le système de purification de protéines fusionnées à la GST est couramment utilisé pour obtenir des protéines natives. Les protéines de fusion produites sont en effet séparées de l'extrait protéique brut en utilisant les propriétés de la GST native.

La souche bactérienne BL21 est un hôte adapté à la surexpression des protéines de fusion portées par le plasmide pGEX-4T-1. Cette souche bactérienne ne possède pas les gènes *ompT* et *lon* qui codent pour des protéases qui pourraient dégrader la protéine de fusion surexprimée. La production efficace de protéines hétérologues chez *E. coli* est souvent limitée par la rareté de certains ARN de transfert qui sont abondants dans les organismes dont sont issues les protéines hétérologues : c'est le cas des ARNt *argU*, *ileY* et *leuW*, qui reconnaissent les codons arginine AGA et AGG, le codon isoleucine AUA et le codon leucine CUA. Comme indiqué dans le tableau 6, 3,7% des acides aminés d'Aft1p et 6,2% des acides aminés d'Aft2p nécessitent ces ARNt rares chez *E. coli*. Nous avons donc rajouté un deuxième plasmide dans les bactéries, le pRIL, qui porte les gènes *argU*, *ileY* et *leuW*.

Tableau 6 : Composition en acides aminés des protéines Aft1p et Aft2p et biais de codons. Les acides aminés pour lesquels il existe un biais de codon sont indiqués en vert. L'ensemble des codons correspondant à ces acides aminés est énuméré en rouge, les codons limitants chez *E. coli* sont colorés en jaune.

Aft1p				Aft2p			
Acide aminé	Nombre	Acide aminé	Nombre	Acide aminé	Nombre	Acide aminé	Nombre
A (ala)	28	L (leu) :	48	A (ala)	17	L (leu) :	38
C (cys)	8	TTA	10	C (cys)	7	TTA	13
D (asp)	44	TTG	16	D (asp)	28	TTG	9
E (glu)	39	CTT	4	E (glu)	23	CTT	5
F (phe)	28	CTC	6	F (phe)	18	CTC	3
G (gly)	23	CTA	6	G (gly)	11	CTA	5
H (his)	38	CTG	6	H (his)	8	CTG	3
I (ile) :	34	R (arg) :	25	I (ile) :	28	R (arg) :	16
ATT	17	CGT	3	ATT	12	CGT	1
ATC	7	CGC	-	ATC	4	CGC	-
ATA	10	CGA	2	ATA	12	CGA	1
K (lys)	47	CGG	-	K (lys)	43	CGG	2
M (met)	7	AGA	11	M (met)	12	AGA	7
N (asn)	63	AGG	9	N (asn)	35	AGG	5
P (pro)	46	V (val)	35	P (pro)	25	V (val)	15
Q (gln)	38	W (trp)	2	Q (gln)	9	W (trp)	2
S (ser)	79	Y (tyr)	14	S (ser)	46	Y (tyr)	9
T (thr)	44	* (stop)	1	T (thr)	26	* (stop)	1

B. Matériel et Méthodes

B-1. Tests d'induction et paramètres de production

B-1-a. Mise au point des conditions d'expression

Les plasmides pGEX-4T-1-AFT1 et pGEX-4T-1-AFT2 ont été transformés dans les bactéries BL21 préalablement transformées avec le plasmide pRIL. Les cellules sont précultivées durant 18 heures dans le milieu LB contenant les antibiotiques nécessaires au maintien des deux plasmides (ampicilline à 100µg/mL pour le pGEX-4T-1, chloramphénicol à 50µg/mL pour le pRIL). Elles sont ensuite diluées à DO_{600} = 0,1 dans 10mL de 3 milieux de culture différents : TB (milieu très riche), LB (milieu classique) ou M63 (milieu minimum). L'induction de l'expression des protéines de fusion s'effectue lorsque les cellules ont atteint

une DO_{600} = 0,6 ou 1,2. Les cellules sont d'abord placées 20 minutes dans la glace pour permettre l'expression des protéines chaperons de choc thermique pouvant faciliter le repliement de la protéine de fusion, puis l'IPTG est ajouté à 1mM dans le milieu pour induire l'expression de la protéine de fusion. La production de la protéine de fusion est alors réalisée à différentes températures : 15°C, 25°C ou 30°C, et durant différentes périodes : 1, 3, 4 ou 18 heures. Dans certains cas, 5mM de bétaïne, chaperon chimique favorisant le repliement des protéines recombinantes, ont été ajoutés simultanément à l'IPTG.

La détermination des paramètres de production de la protéine de fusion GST-Aft2p a conduit à tester l'ajout des composés métalliques fer, cuivre et zinc à des concentrations variables dans le milieu, et sous forme de sulfates ($FeSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$).

Après induction de la production de la protéine de fusion, les cellules sont centrifugées, reprises dans 500µL d'une solution de KH_2PO_4 0,1M pH7,2 contenant des inhibiteurs de protéases, et traitées par sonication (3x10secondes à 20kHz) pour lyser les cellules et fragmenter l'ADN qui peut rendre les extraits cellulaires visqueux. La concentration des extraits obtenus est estimée par la technique de Bradford (Bradford, 1976). 15µg de protéines totales sont séparées sur gel de polyacrylamide SDS 8% et révélées par coloration au Bleu de Coomassie, ou transférées sur membrane de nitrocellulose pour une immunoempreinte. Les membranes sont saturées avec une solution de TBS/Régilait (Tris-HCl 20mM pH7,5, NaCl 150mM Régilait 5%(w/v)). Les anticorps primaire (Anticorps monoclonal anti-GST, dilution 1/50000e, Pharmacia) et secondaire (IgG anti-chèvre, dilution 1/4000^{e}, Sigma) sont incubés chacun durant 1 heure à température ambiante dans la solution bloquante et la membrane est lavée 3 fois dans du TBS après chaque incubation. L'anticorps secondaire étant couplé à la phosphatase alcaline, les protéines sont révélées en présence de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) et de bleu de tétrazolium nitreux (NBT).

B-1-b. Conditions de cultures pour l'expression de la GST-Aft2p en vue de sa purification

A petite échelle : L'induction de la production de la protéine de fusion GST-Aft2p est effectuée sur 2 litres de culture, dans les conditions suivantes : les cellules sont cultivées dans un milieu LB, jusqu'à DO_{600} = 1,2 et incubées 20 minutes dans la glace. La production de la protéine de fusion est induite par l'ajout de 1mM d'IPTG, 5mM de bétaïne et 100µM de

sulfate de fer ($FeSO_4$), pendant 1 heure à 30°C. Les cellules sont reprises dans 8mL de PBS (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 1,8mM pH7,3 ; tampon d'équilibrage des billes de sépharose couplées au glutathion) contenant des inhibiteurs de protéases, lysées à la presse de French avec une pression de 1,2 kbar (One Shot cell disrupter) et le surnageant issu de l'étape de centrifugation à 3000g pendant 5 minutes à 4°C est isolé.

A grande échelle : La protéine de fusion GST-Aft2p est produite à partir de 33 litres de culture. A cause de contraintes techniques dues à la manipulation de grands volumes de culture, le protocole utilisé pour l'induction diffère du protocole d'induction à petite échelle : après croissance des cellules dans un milieu LB, une incubation de 20 minutes au réfrigérateur a été effectuée, préalablement à l'induction à DO_{600} = 0,7 avec 1mM d'IPTG, 5mM de bétaïne et 100µM de fer-citrate pendant 2 heures à 30°C. Les cellules sont reprises dans 200mL de PBS contenant des inhibiteurs de protéases, lysées par sonication (5x50secondes à 200Watts) et le surnageant de l'étape de centrifugation à 4000g pendant 2 heures à 4°C est isolé.

B-2. Purification de la protéine GST-Aft2p

B-2-a. A petite échelle

Purification : La purification de la protéine de fusion GST-Aft2p est effectuée en chambre froide à 4°C par la technique en « batch » (incubation sur roue et changement de tampon par centrifugation des billes à 5000g 2 minutes). 500µL de billes de sépharose couplées au glutathion sont dans un premier temps équilibrés avec 5mL d'un tampon PBS, Triton 0,1%. Le triton est un détergent non-ionique qui permet de réduire les interactions hydrophobes non spécifiques. Les billes sont ensuite incubées pendant 1h30 avec 500µL de l'extrait protéique puis lavées 5 fois avec 1mL de PBS, Triton 0,1%. L'élution de la protéine de fusion est réalisée par incubations successives de 20 minutes avec 1mL de solutions de glutathion réduit à concentration croissante : 2mM, 5mM, 10mM et 50mM de glutathion dans un tampon Tris-HCl 50mM pH8, Triton 0,1% et NaCl 0,2M (pour augmenter la force ionique du tampon d'élution). A chaque étape, 10µL du surnageant sont prélevés et déposés sur gel SDS 8% pour

analyse. Les 4 éluats sont ensuite concentrés sur centricons PM30 (passage de 4mL à 200µL de solution).

Clivage par la thrombine : 100µL des éluats concentrés sont dans un premier temps incubés 15 minutes à 37°C dans une solution de 900µL de Tris-HCl 50mM pH7,4, $MgSO_4$ 10mM et ATP 2mM afin de dissocier la protéine chaperon DnaK de la protéine de fusion GST-Aft2p. Le mélange est ensuite incubé 1h45 avec 500µL de billes de sépharose couplées au glutathion, lavé, et incubé la nuit à 4°C en présence de 10 unités de thrombine (dans 1mL de PBS). Le surnageant issu de cette digestion contient en théorie la protéine Aft2p clivée. Afin de récolter un maximum de protéine Aft2p libre, les billes sont lavées 2 fois avec du PBS. A chaque étape de l'expérience, des aliquotes de 10µL sont prélevés pour analyse.

B-2-b. A grande échelle

La purification de la protéine de fusion GST-Aft2p a été réalisée à 4°C sur une colonne contenant 8mL de billes couplées au glutathion, équilibrées avec du PBS. Le surnageant bactérien est passé 3 fois sur la colonne pour autoriser un maximum de fixation de la protéine de fusion sur les billes. La colonne est ensuite lavée avec 50mL de PBS, Triton 0,1%, puis avec 10mL de Tris-HCl 50mM pH7,4, ATP 2mM, $MgCl_2$ 10mM, NaCl 0,2M (pour décrocher le chaperon DnaK). L'élution de la protéine de fusion est réalisée en ajoutant les solutions de glutathion réduit suivantes : 10mM dans un tampon Tris-HCl 50mM pH7,5, NaCl 0,2M à pH 3,3 (5mL) ; 10mM dans un tampon Tris-HCl 50mM pH7,5, NaCl 0,2M à pH 7,5 (11,5mL) ; 100mM dans un tampon Tris-HCl 50mM pH7,5, NaCl 0,2M à pH 7,5 (10mL). Une fraction des solutions obtenues à chaque étape de la purification est conservée pour analyse. Les éluats 2 et 3 sont concentrés séparément sur une cellule de concentration Diaflo à température ambiante pendant toute une journée (passage de 11,5mL à 350µL pour l'éluat 2 et de 10mL à 650µL pour l'éluat 3).

C. Résultats et discussion

C-1. Production des protéines de fusion

C-1-a. Aft1p

Les différentes conditions d'induction testées pour la production de la protéine de fusion GST-Aft1p sont indiquées dans le tableau 7, et des gels caractéristiques des résultats obtenus sont présentés figure 58.

Tableau 7 : Tests de production de la protéine de fusion GST-Aft1p. L'obtention de la protéine de fusion est indiquée de manière qualitative par les signes + et +/-. nd, non déterminé. Les cases rouge et jaunes correspondent à des résultats caractéristiques présentés sur la figure 58.

		3 heures		18 heures	
		Bétaïne		Bétaïne	
Milieu	T°C	avec	sans	avec	sans
TB	15	+/- (C)	nd	nd	nd
	25	dégradation	dégradation	nd	dégradation
	30	dégradation	dégradation	nd	dégradation
LB	15	+ (C)	nd	nd	nd
	25	dégradation	dégradation	nd	dégradation
	30	dégradation (A)	dégradation (A)	nd	dégradation (B)
M63	15	+/-	nd	nd	nd
	25	dégradation	dégradation	nd	dégradation
	30	dégradation	dégradation	nd	dégradation

La révélation des protéines totales sur le gel SDS-PAGE par coloration au bleu de Coomassie n'a pas permis de révéler de bande fortement majoritaire de masse moléculaire attendue pour la protéine de fusion GST-Aft1p (104 kDa, figure 58). Ce résultat suggère que l'ensemble des conditions d'induction testées ne permet pas de production massive de la protéine de fusion GST-Aft1p.

La détection de la protéine de fusion GST-Aft1p à l'aide des anticorps anti-GST permet de révéler dans la plupart des conditions testées la présence d'une protéine de masse moléculaire d'environ 55 kDa (figure 58), suggérant que la protéine de fusion produite est probablement rapidement dégradée. Cette forme est d'ailleurs présente en quantités beaucoup plus importantes lorsque l'expression de la protéine de fusion est réalisée sur une période de

18heures (figure 58-B), ce qui indique que l'obtention d'une protéine de fusion GST-Aft1p intacte nécessite des temps d'induction courts. La présence de bétaïne, chaperon chimique, permet de diminuer la quantité de protéine dégradée ; la protéine de fusion entière est cependant produite en très faibles quantités (figure 58-A). Une diminution de la température d'induction permet d'augmenter la quantité de protéine de fusion entière, bien que la forme dégradée reste majoritaire (figure 58-C).

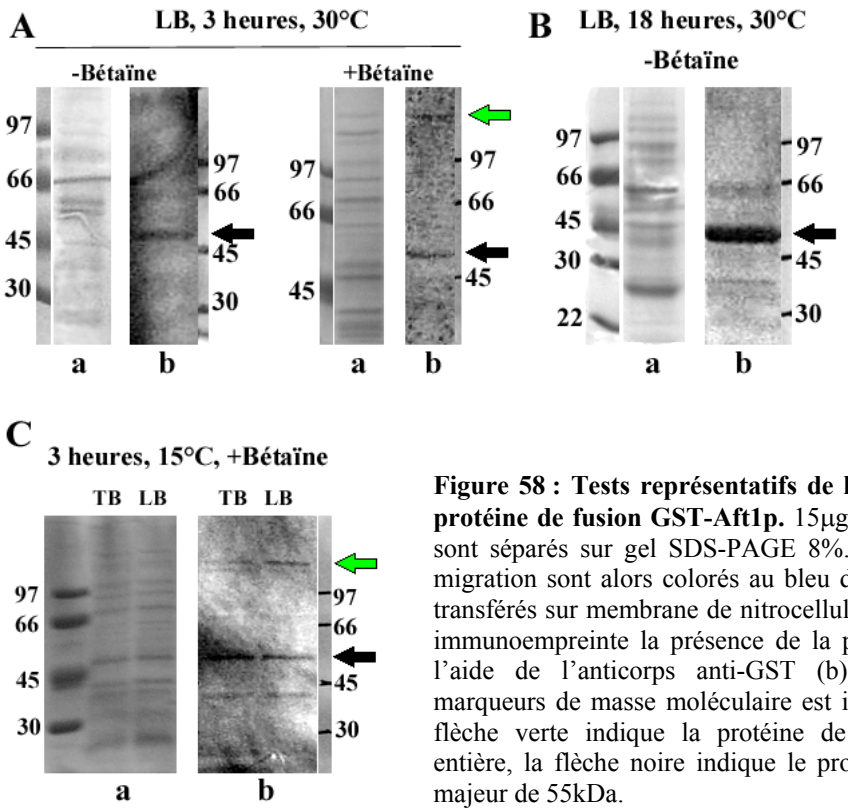

Figure 58 : Tests représentatifs de la production de la protéine de fusion GST-Aft1p. 15µg de protéines totales sont séparés sur gel SDS-PAGE 8%. Les produits de la migration sont alors colorés au bleu de Coomassie (a) ou transférés sur membrane de nitrocellulose pour révéler par immunoempreinte la présence de la protéine de fusion à l'aide de l'anticorps anti-GST (b). La position des marqueurs de masse moléculaire est indiquée en kDa. La flèche verte indique la protéine de fusion GST-Aft1p entière, la flèche noire indique le produit de dégradation majeur de 55kDa.

C-1-b. Aft2p

Au vu des résultats obtenus concernant la production de la protéine de fusion GST-Aft1p, les premiers tests de production de la protéine de fusion GST-Aft2p ont été réalisés sur une période de 3 heures uniquement, et les résultats obtenus sont présentés sur la figure 59.

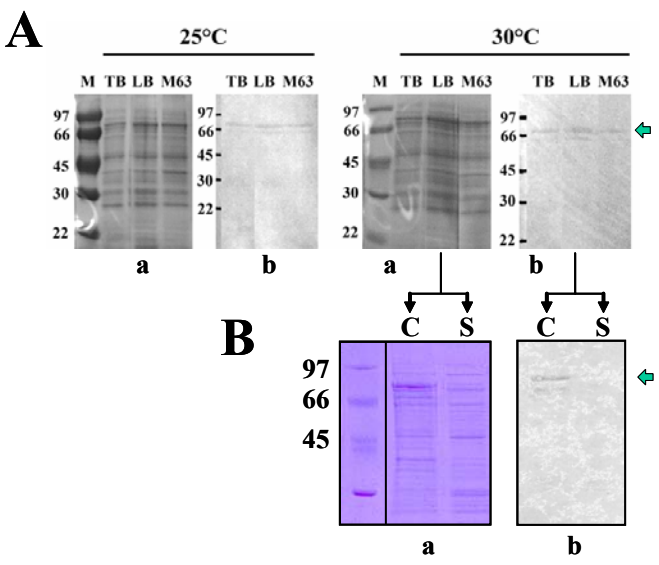

Figure 59 : Premiers tests de production de la protéine de fusion GST-Aft2p. A, 15µg de protéines totales sont séparés sur gel SDS-PAGE 8%. Les produits de la migration sont alors colorés au bleu de Coomassie (a) ou transférés sur membrane de nitrocellulose pour révéler par immunoempreinte la présence de la protéine de fusion à l'aide de l'anticorps anti-GST (b). B, la séparation culot (C) / surnageant (S) des extraits par centrifugation révèle la présence de corps d'inclusion. La position des marqueurs de masse moléculaire est indiquée à gauche en kDa. La flèche verte indique la protéine de fusion GST-Aft2p

La révélation des protéines totales sur le gel SDS-PAGE par coloration au bleu de Coomassie ne permet pas de révéler de bande fortement majoritaire de masse moléculaire attendue pour la protéine de fusion GST-Aft2p (73 kDa, figure 59-A). Ce résultat suggère à nouveau que les conditions d'induction testées ne permettent pas de production massive de la protéine de fusion GST-Aft2p. La détection spécifique de la protéine de fusion GST-Aft2p par immunoempreinte montre néanmoins la présence d'une protéine unique possédant la masse moléculaire attendue (figure 59-A), qui semble plus efficacement produite à 30°C qu'à 25°C (figure 59-A). La totalité de la protéine de fusion GST-Aft2p produite est cependant entraînée avec le culot de cellules non lysées, ce qui signifie qu'elle est produite sous forme de corps d'inclusions (figure 59-B).

L'obtention de corps d'inclusion lors de la purification d'une protéine est un phénomène largement répandu. De manière intéressante, il a déjà été rapporté que les facteurs de transcription Mac1p et Zap1p de *S. cerevisiae* sont produits sous forme de corps d'inclusions dans des conditions classiques d'induction (Jensen et Winge, 1998, Bird *et al.*, 2000). La régulation par le zinc ou le cuivre de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs passe par une liaison directe du métal sur la protéine. La production de formes tronquées de Zap1p et Mac1p sous forme soluble a pu être améliorée en ajoutant le métal qui les régule (zinc ou cuivre respectivement, Jensen et Winge, 1998, Bird *et al.*, 2000) dans le milieu de

culture des bactéries. Les études réalisées sur le domaine de liaison à l'ADN d'Aft2p ont suggéré que le fer ne s'y associait pas de manière suffisamment stable pour être détecté (Rutherford *et al.*, 2005). Cependant, par analogie avec les résultats obtenus concernant les facteurs de transcription Zap1p et Mac1p, nous avons choisi les conditions : LB, 30°C, et fait varier un certain nombre de paramètres (notamment la quantité de métaux) pour trouver des conditions d'induction pour lesquelles la protéine de fusion GST-Aft2p est retrouvée sous forme soluble. Les résultats obtenus sont résumés de manière qualitative dans les tableaux 8, 8bis et 8ter.

Tableau 8 : Tests de production de la protéine de fusion GST-Aft2p sous forme soluble. L'obtention de la protéine de fusion sous forme soluble (S) est indiquée de manière qualitative par les signes - et +/-. Les quantités de métaux ajoutés sont les suivantes : Fer (Fe) : 0,5mM ; Zinc (Zn) : 0,5mM ; Cuivre (Cu) : 1,4mM. Le terme « Préculture » correspond à la période pendant laquelle les cellules sont amenées de DO_{600} = 0,1 à la DO_{600} requise pour l'induction.

		Induction pendant 3 heures	
		Préculture LB +Fe	**Préculture LB**
DO_{600}	**Métal**		
0,7	+Fe	S +/-	S +/-
	+Fe +Zn	S +/-	S +/-
	+Fe +Zn +Cu	S -	S +/-
1,2	+Fe	S +/-	S +/-
	+Fe +Zn	S +/-	S +/-
	+Fe +Zn +Cu	S -	S -

Tableau 8bis: Tests de production de la protéine de fusion GST-Aft2p sous forme soluble. L'obtention de la protéine de fusion sous forme soluble (S) est indiquée de manière qualitative par les signes -, +/- et +. Le fer et la bétaïne sont ajoutés au moment de l'induction.

	Induction à DO_{600} = 0,4			
	+Bétaïne		**-Bétaïne**	
	4 heures	18 heures	4 heures	18 heures
+Fe 0,5mM	S +	S -	S +	S -
+Fe 1mM	S +	S +/-	S +/-	S -
+Fe 1,5mM	S +/-	S -	S -	S -

Tableau 8ter: Tests de production de la protéine de fusion GST-Aft2p sous forme soluble. L'obtention de la protéine de fusion sous forme soluble (S) est indiquée de manière qualitative par les signes -, +/-, + et +++. Le fer et la bétaïne sont ajoutés au moment de l'induction. L'analyse de la condition ayant donné les meilleurs résultats, indiquée en jaune et rouge dans le tableau, est présentée figure 60.

Induction à DO_{600} = 1,2				
	+Bétaïne		-Bétaïne	
	1 heure	2 heures	1 heure	2 heures
+Fe 0,25mM	S +	S +/-	S +/-	S -
+Fe 0,1mM	S +++	S +	S ++	S +/-

Après plusieurs essais visant à optimiser la quantité de protéine produite sous forme soluble (tableaux 8, 8bis, 8ter), nous avons défini les conditions d'induction suivantes comme étant suffisantes pour pouvoir tenter de purifier la protéine de fusion GST-Aft2p : Induction à DO_{600} 1,2 avec 1mM d'IPTG et en présence de 5mM de bétaïne pendant 1 heure à 30°C, dans un milieu LB contenant 0,1mM de sulfate de fer (figure 60).

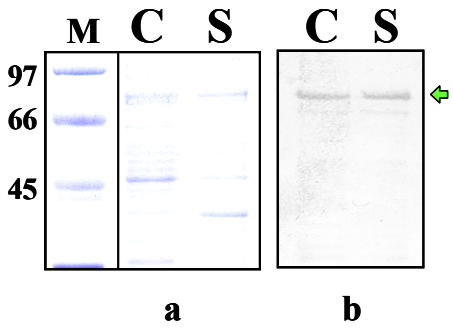

Figure 60 : Production de la protéine GST-Aft2p soluble. L'induction de la production est effectuée dans le milieu LB, à 30°C pendant 1 heure, par ajout de 5mM de Bétaïne, 0,1mM de $FeSO_4$, et 1mM d'IPTG. 15µg de protéines issues de la séparation culot (C) / surnageant (S) sont séparés sur gel SDS-PAGE 8%. Les produits de la migration sont alors colorés au bleu de Coomassie (a) ou transférés sur membrane de nitrocellulose pour révéler par immunoempreinte la présence de la protéine de fusion à l'aide de l'anticorps anti-GST (b). La position des marqueurs de masse moléculaire est indiquée à gauche en kDa. La flèche verte indique la protéine de fusion GST-Aft2p.

C-2. Tentatives de purification d'Aft2p

C-2-a. A petite échelle

Les étapes de la mise au point de la purification de la protéine de fusion GST-Aft2p ont été analysées (figure 61). Les résultats obtenus par immunoempreinte montrent qu'une fraction de la protéine de fusion GST-Aft2p n'a pas été retenue sur les billes de sépharose couplées au glutathion (figure 61). Les billes utilisées sont en théorie capables de retenir 10mg de protéine de fusion par mL de résine. Une sous-estimation de la quantité de GST-

Aft2p produite, ou une capacité de fixation moindre de la résine, pourraient être à l'origine de la perte importante de la protéine GST-Aft2p lors de la fixation sur les billes. Il serait donc nécessaire de réaliser les expériences futures de purification avec des quantités plus importantes de billes afin de minimiser la perte de la protéine de fusion.

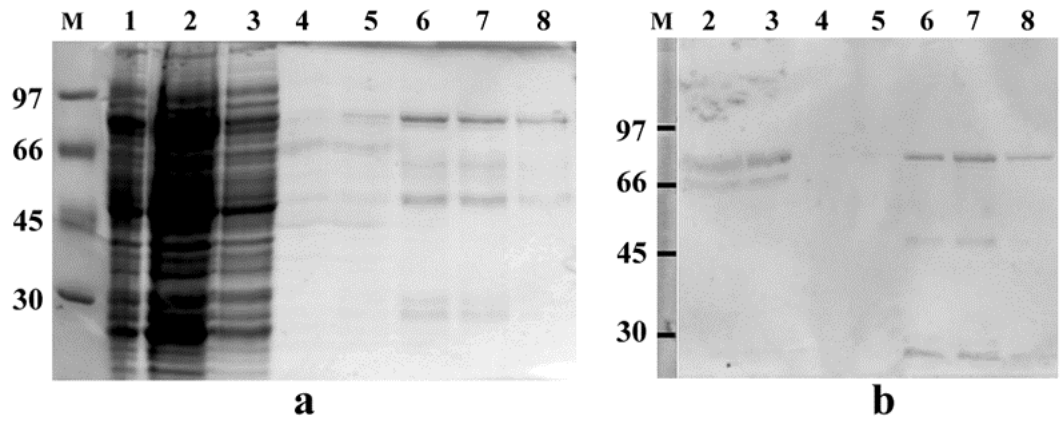

Figure 61 : Purification de la protéine de fusion GST-Aft2p. 10µ

Il faut ajouter 5mM ou 10mM de glutathion réduit pour permettre une élution efficace de la protéine GST-Aft2p, et seule une faible quantité de protéine est éluée par l'ajout de 50mM de glutathion (figure 61). La cinétique d'interaction entre la GST et le glutathion étant assez lente, augmenter davantage le temps d'incubation des billes en présence de 5 ou 10mM de glutathion devrait permettre d'éluer la totalité de la protéine de fusion avec ces quantités de glutathion.

Une protéine de masse moléculaire moindre (environ 50kDa), révélée par immunoempreinte, est également présente dans les éluats, suggérant que la protéine Aft2p puisse être dégradée au cours de sa purification. Il est également possible d'imaginer que les formes dégradées étaient déjà présentes lors de l'expression de la protéine de fusion, mais en trop faible quantité pour être détectées par immunoempreinte. La purification de la protéine GST-Aft2p permettrait alors non seulement un enrichissement de la protéine entière mais aussi un enrichissement de ces formes dégradées. Une autre bande, très fine, d'environ 70kDa, semble également être purifiée avec la protéine GST-Aft2p (figure 61). Cette protéine n'est cependant pas reconnue par les anticorps anti-GST. Ce contaminant n'est donc pas un

produit de dégradation de la protéine GST-Aft2p. Pour identifier cette protéine, nous l'avons analysée au spectromètre de masse MALDI-TOF : il s'agit de la protéine chaperon bactérienne DnaK. En parallèle, nous nous sommes assurés que la bande de 73kDa correspond à une fusion GST-Aft2p.

L'expression de la protéine de fusion GST-Aft2p chez la bactérie et la purification de cette dernière nous a permis d'obtenir une solution protéique relativement purifiée, de concentration 1mg.mL^{-1} contenant la protéine d'intérêt, des formes dégradées de celle-ci, et le chaperon DnaK. 1,6mg de ce mélange de protéines peuvent être obtenus par litre de culture ; ce rendement est assez faible, mais il devrait pouvoir être amélioré en modifiant certains paramètres des différentes étapes de purification évoqués précédemment.

L'équivalent de 100µg de solution protéique purifiée a été utilisé pour tenter d'obtenir la protéine Aft2p non fusionnée à la GST par action de la thrombine sur la protéine de fusion GST-Aft2p. Du fait de cette faible quantité de protéines de départ le gel a été coloré à l'argent, qui permet une révélation des protéines jusqu'à 100 fois supérieure à la coloration au bleu de Coomassie (figure 62).

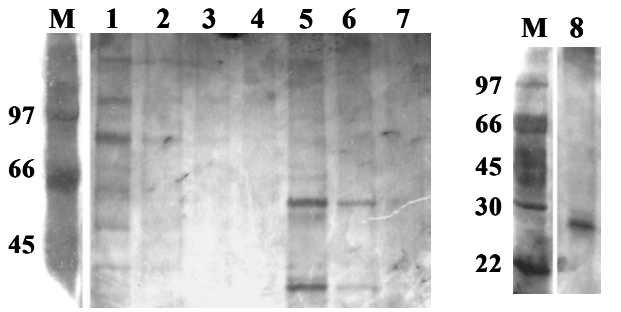

Figure 62 : Clivage de la protéine GST-Aft2p. 10µL d'extrait de chaque étape de la purification ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 8%, coloré au nitrate d'argent. Piste 1 : passage sur les billes. Pistes 2, 3, 4 : lavages. Piste 5 : clivage thrombine. Pistes 6 et 7 : lavages. Piste 8 : protéines retenues sur les billes. La position des marqueurs de masse moléculaire (M) est indiquée à gauche.

Le traitement de l'extrait avec le mélange ATP/$MgSO_4$ permet de dissocier efficacement la protéine de fusion GST-Aft2p de la protéine chaperon bactérienne DnaK, cette dernière n'étant plus retenue sur les billes (figure 62, piste 1). Après action de la thrombine, il est possible de détecter deux protéines majoritaires qui ne sont pas associées au billes (figure 62, piste 5). La masse moléculaire de la première, environ 37 kDa, correspond à la masse moléculaire de la thrombine elle même. La deuxième quant à elle semble correspondre à Aft2p. La masse moléculaire observée, environ 55 kDa, est légèrement supérieure à la masse moléculaire théorique d'Aft2p (47 kDa). Des résultats identiques ont été

obtenus concernant la protéine Aft2p-HA (article 1, figure 8 : la masse moléculaire théorique est de 55kDa, la protéine apparaît à 66kDa). Le dépôt sur gel des protéines restées accrochées aux billes (figure 62, piste 8), met en évidence la présence d'une protéine dont la masse moléculaire (environ 27 kDa) correspond à la masse moléculaire de la GST. Le clivage par la thrombine de la protéine de fusion GST-Aft2p est donc très efficace et permet d'obtenir la protéine Aft2p dans un état de « quasi-homogénéité ».

C-2-b. A grande échelle

Aux vues des résultats encourageants obtenus sur les premiers essais de purification de la protéine Aft2p, une purification à partir de 33L de culture a été entreprise dans le laboratoire de biophysique moléculaire et cellulaire au C.E.A. de Grenoble, sous la direction et avec les conseils de J.M. Moulis (figure 63).

Le signal spécifique de la protéine GST-Aft2p n'est que peu visible dans l'extrait bactérien. Les variations expérimentales introduites lors de l'induction à grande échelle semblent donc diminuer l'efficacité de production de la protéine de fusion GST-Aft2p. Cette protéine est tout de même retenue efficacement sur la colonne, et elle est éluée par l'ajout de glutathion réduit dans un tampon à pH neutre (figure 63, pistes 6 et7). Il semblerait à nouveau que de fortes quantités de glutathion (100mM) soient nécessaire à l'élution complète de la protéine GST-Aft2p (figure 63, piste 7). L'étape d'élution avec 10mM de glutathion n'est donc pas optimale.

Des formes plus courtes, d'environ 30kDa sont éluées avec la protéine de fusion GST-Aft2p. La masse moléculaire de ces bandes pourrait correspondre à la GST seule. La protéine de fusion semble être fortement dégradée dans les conditions de production et de purification utilisées dans cette expérience. De plus, lorsqu'une quantité de protéines équivalente est à nouveau analysée sur gel SDS-PAGE après 48 heures à -80°C, seule la forme de 30kDa est détectée, la bande de 73kDa correspondant à la protéine de fusion GST-Aft2p ayant complètement disparu. La protéine de fusion GST-Aft2p isolée dans ces conditions est donc très instable et sensible à la protéolyse.

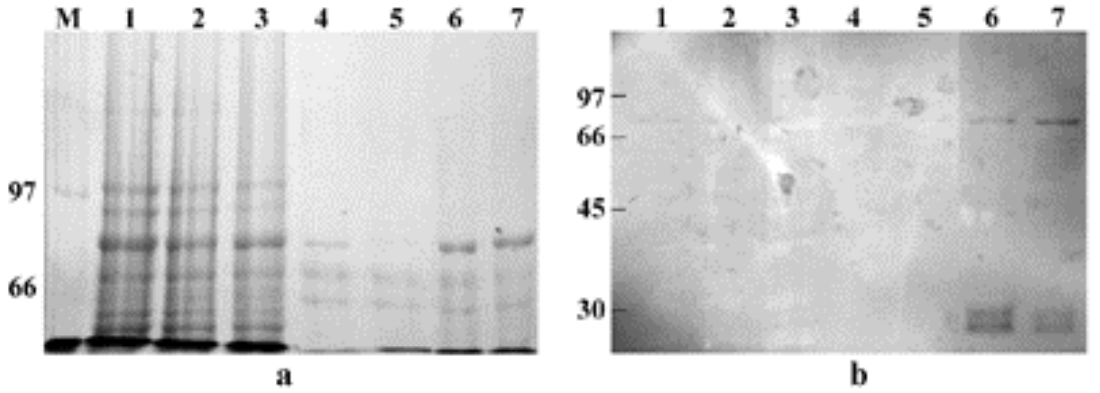

Figure 63 : Purification de la protéine Aft2p à grande échelle. Des fractions de chaque étape de la purification ont été déposées sur gel SDS-PAGE 8%, coloré au bleu de Coomassie(a) ou transféré sur membrane pour immunoempreinte (b). Piste 1 : extrait brut (0,2µL). Piste 2 : passage sur les billes(0,2µL). Pistes 3 et 4 : lavages (70 et 100µL). Piste 5 : élution 10mM glutathion pH3,3 (100µL). Piste 6 : élution 10mM glutathion pH7,5 (50µL). Piste 7 : élution 100mM glutathion pH7,5 (50µL). La position des marqueurs de masse moléculaire (M) est indiquée à gauche, en kDa.

C-3. Conclusions et perspectives

Le système de surexpression hétérologue de protéines fusionnées à la GST est couramment utilisé du fait de son rendement important et de la simplicité du protocole de purification. L'utilisation de ce système pour la purification des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p s'est pourtant avérée complexe.

La protéine de fusion GST-Aft1p n'a pu être produite correctement chez *E. coli*, mais l'ensemble des tests que nous avons réalisés nous a permis d'établir des pistes à suivre pour optimiser la surproduction de la protéine GST-Aft1p. Nos résultats indiquent que la protéine Aft1p est très sensible à la protéolyse, et qu'une induction à faible température est nécessaire pour éviter sa dégradation. Des tests supplémentaires sont à poursuivre dans cette voie, en testant par exemple des périodes d'induction plus restreintes de 30 minutes à 1 heure.

Nous avons mis en évidence que la protéine de fusion GST-Aft2p est produite majoritairement sous forme de corps d'inclusions. Par analogie avec les facteurs de transcription Mac1p et Zap1p, nous avons pu résoudre ce problème en ajoutant du fer ($FeSO_4$ 100µM) dans le milieu de culture, et nous avons pu poursuivre les essais de purification de la protéine GST-Aft2p et obtenir à terme, en quantité restreinte, la protéine Aft2p purifiée. Des

améliorations, tant au niveau de l'étape de production de protéine de fusion que des étapes de purification peuvent être apportées pour obtenir un rendement de purification optimal.

Il semblerait que seul le fer permette la production d'une protéine GST-Aft2p soluble. Ce résultat pourrait être en faveur d'une modulation directe par le fer de l'activité d'Aft2p. Les résultats de Rutherford et collaborateurs suggèrent un mécanisme différent (Rutherford *et al.*, 2005), mais ils se sont focalisés sur le domaine de liaison à l'ADN des protéines Aft1p et Aft2p. Nos résultats concernant la protéine Aft2p entière laissent donc une porte ouverte quant à la possibilité d'un mécanisme de régulation directe par le fer de l'activité transcriptionnelle d'Aft2p. Par comparaison avec les résultats obtenus concernant Aft2p, il serait nécessaire de tester l'influence du fer sur la production de la protéine de fusion GST-Aft1p.

CONCLUSIONS

&

PERSPECTIVES

A. Le choix d'une démarche expérimentale

Aft1p et Aft2p sont des activateurs de transcription paralogues ayant des rôles partiellement redondants dans la régulation de l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae*. Le rôle d'Aft1p est assez clairement établi : en conditions de carence en fer, il est importé dans le noyau où il reconnaît la séquence consensus 5'-TGCACCC-3' contenue dans les régions promotrices des gènes dont les produits sont impliqués dans le transport du fer extracellulaire. Le rôle d'Aft2p au sein de la cellule est quant à lui plus obscur : il reconnaît *in vitro* la même séquence consensus qu'Aft1p, et active la transcription des gènes régulés par Aft1p dans des conditions particulières de surexpression de l'allèle sauvage ou d'expression de l'allèle constitutif *AFT2-1up*. Des analyses globales de transcriptome utilisant les mutants constitutivement actifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up* ont permis de déterminer un ensemble de gènes potentiellement régulés par Aft1p et/ou Aft2p. Ces analyses ne tiennent cependant pas compte de la régulation transcriptionnelle de ces gènes en fonction de la quantité de fer dans le milieu, et donc ne permettent pas de définir le rôle d'Aft2p au sein de la cellule en condition de carence en fer.

A-1. Souches et milieux utilisés

Afin de mieux comprendre le rôle d'Aft2p en condition de carence en fer, nous n'avons pas utilisé les mutants constitutifs *AFT1-1up* ou *AFT2-1up*, mais des souches de levures portant les allèles sauvages *AFT1* et *AFT2* ou des mutants « perte de fonction » d'*AFT1* et/ou d'*AFT2*. Nous avons également étiqueté ces allèles sauvages *AFT1* et *AFT2* avec un épitope HA, ce qui nous a permis d'étudier le recrutement de chacun de ces deux facteurs de transcription sur des promoteurs cibles, en fonction de la présence ou de l'absence du paralogue.

La notion de carence en fer est une notion très subjective. Nous avons choisi d'utiliser un milieu de culture dépourvu de fer, sans ajout de chélateur pour la condition « -Fe », dans lequel ont été ajoutés 100µM de fer pour créer la condition « +Fe ». Ces conditions nous ont permis de mettre à jour de nouveaux éléments concernant la régulation du métabolisme du fer en réponse à la carence en fer du milieu.

A-2. Méthodologie

Au cours de mon travail de thèse, j'ai été amenée à utiliser un certain nombre de techniques relativement récentes, faisant appel à des technologies avancées. Les analyses globales de transcriptome ont été utilisées pour la première fois chez *S. cerevisiae* en 1997 pour décrire le remaniement transcriptionnel ayant lieu lors de la transition diauxique (DeRisi *et al.*, 1997) ; elles sont aujourd'hui couramment employées dans les approches expérimentales menées chez les organismes pour lesquels on dispose des génomes séquencés (Lyons, 2003). La technique d'immunoprécipitation de la chromatine que j'ai mise en place au laboratoire fait également partie des progrès de la biologie réalisés durant ces dix dernières années (Kuo *et al.*, 1999). Le couplage de cette technique avec le principe des analyses globales permet aujourd'hui d'identifier en une seule fois l'ensemble des régions promotrices sur lesquelles une protéine d'intérêt est recrutée (Ren *et al.*, 1999, Lieb *et al.*, 2001). J'ai par ailleurs associé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine à l'analyse par PCR quantitative en temps réel, méthode encore peu utilisée actuellement chez *S. cerevisiae* (Kuras, 2004).

A-3. Stratégie de l'étude

Afin de comprendre le rôle d'Aft2p dans la cellule, nous avons tout d'abord cherché à déterminer quels étaient les gènes régulés par ce facteur de transcription. Mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à déterminer les conséquences de l'absence d'Aft1p et/ou d'Aft2p sur l'expression du génome de *S. cerevisiae* en comparant les transcriptomes des souches sauvage et mutantes *aft1*, *aft2* et *aft1aft2* cultivées en condition de carence en fer. L'analyse des résultats obtenus a d'abord été menée de manière approfondie sur un échantillon caractéristique de gènes, dont les produits sont pour la plupart impliqués dans le métabolisme du fer et qui sont connus comme étant activés par les allèles constitutifs *AFT1-1up* et *AFT2-1up*. Nous avons pu déterminer, grâce aux souches portant les allèles sauvages *AFT1* et *AFT2* étiquetés avec l'épitope HA, l'implication directe ou indirecte des deux facteurs de transcription dans la régulation de plusieurs de ces gènes en établissant une corrélation entre leur profil transcriptionnel et le recrutement d'Aft1p et d'Aft2p sur leur promoteur. Nous avons ainsi pu identifier les gènes qui sont spécifiquement régulés par Aft1p

et/ou Aft2p, ce qui a permis de préciser le mode d'action d'Aft1p et d'établir des règles de base concernant le mode d'action d'Aft2p. Nous avons tiré parti de ces informations pour analyser l'ensemble des résultats de transcriptome et accroître ainsi le nombre de gènes cibles potentiels des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p.

B. Les gènes cibles d'Aft2p

B-1. Aft1p et Aft2p ne sont pas recrutés sur les mêmes promoteurs

Au cours de cette étude, nous avons montré que la plupart des gènes impliqués dans le métabolisme du fer sont régulés par Aft1p ou Aft2p ; Aft1p et Aft2p sont majoritairement recrutés sur les promoteurs de gènes différents. Aft2p, mais pas Aft1p, active directement la transcription des gènes *MRS4*, *SMF3*, et probablement *COT1*. Aft1p, mais pas Aft2p, active directement la transcription des gènes *FET3* et *FIT2*.

Certains autres gènes sont co-régulés par Aft1p et Aft2p. Nous avons ainsi montré qu'Aft1p et Aft2p activent directement la transcription du gène *FTR1*. Les gènes *CTH2* et *FIT3* sont également co-régulés par Aft1p et Aft2p, mais leurs profils transcriptionnels dans les souches délétées d'*AFT1* et/ou d'*AFT2* suggèrent d'ores et déjà l'existence de mécanismes de co-régulation multiples, qui restent à définir.

L'analyse *in silico* des promoteurs des gènes régulés par Aft1p et/ou Aft2p nous a permis d'identifier des consensus de fixation légèrement différents pour chacun des facteurs de transcription, 5'-TGCACCC-3' pour Aft1p et 5'-(G/A)CACCC-3' pour Aft2p. Ces résultats sont en accord avec des analyses récentes de « ChIP-chip », ayant pour but l'identification à grande échelle des motifs de liaison à l'ADN de chaque facteur de transcription de *S. cerevisiae* (Harbison *et al.*, 2004). Ces auteurs ont identifié la séquence consensus 5'-GCACCC-3' pour Aft2p et la séquence consensus étendue 5'-TGCACCC-3' pour Aft1p. Grâce à la mutagenèse dirigée de la séquence consensus du promoteur de *FET3* (cible d'Aft1p), nous avons confirmé ces données en mettant en évidence que l'activation transcriptionnelle médiée par Aft1p ou Aft2p est en partie fonction de la nature des résidus

flanquant le noyau GCACCC du consensus. La séquence GT**GCACCC**AT est nécessaire pour médier une forte activation Aft1p-dépendante, alors que la séquence CC**GCACCC**AT permet d'observer une plus forte activation Aft2p-dépendante qu'avec la séquence GT**GCACCC**AT. L'obtention d'une spécificité de régulation par des facteurs de transcription paralogues en « jouant » sur l'extension du motif consensus de base est un mécanisme déjà connu. Des analyses globales de transcriptome réalisées avec deux autres facteurs de transcription paralogues de *S. cerevisiae*, Yap1p et Cad1p, impliqués dans la réponse transcriptionnelle au stress oxydant et capables de se fixer *in vitro* sur la même séquence consensus (Fernandes *et al.*, 1997), ont également permis de définir deux séquences consensus légèrement différentes. La séquence 5'-**TTACTAA**-3' est préférentiellement présente dans les régions promotrices des gènes régulés par Cad1p, et c'est une séquence plus précise, 5'-GC**TTACTAA**T-3', qui est présente dans les promoteurs des gènes régulés par Yap1p (Cohen *et al.*, 2002).

Le consensus d'Aft2p nouvellement identifié n'est cependant pas sur-représenté parmi les promoteurs des gènes régulés par ce facteur (33%, contre 24% pour l'ensemble du génome), ce qui remet en question la pertinence de ce consensus. Y-a-t-il une possibilité de pouvoir définir une séquence consensus de fixation d'Aft2p plus précise ? L'analyse du groupe restreint de gènes activés par *AFT1-1up*/*AFT2-1up* et présentant un profil transcriptionnel compatible avec une régulation Aft2p-dépendante (résultat complémentaire à l'article 1, chapitre I) n'a pas permis de préciser davantage la séquence consensus reconnue par Aft2p. Il serait nécessaire d'analyser le recrutement d'Aft2p sur davantage de promoteurs de gènes cibles potentiels, afin de définir d'autres cibles directes de ce facteur de transcription, et ainsi affiner la recherche d'un consensus plus précis. L'obtention des protéines purifiées, afin de mettre en place des expériences de compétition par retard sur gel, serait également d'un intérêt certain pour mieux caractériser la séquence reconnue par Aft2p. Il n'est cependant pas exclu que l'originalité du facteur de transcription Aft2p réside justement dans sa capacité à reconnaître un consensus plus flou, autorisant ainsi la cellule à une certaine flexibilité concernant l'attribution des gènes cibles d'Aft2p.

Bien que le critère « présence/absence » d'une séquence consensus dans la région promotrice puisse fournir des indications quant aux gènes pouvant être directement régulés par Aft1p et Aft2p, l'interaction de ces facteurs de transcription avec d'autres protéines est probablement déterminante pour médier leur activation transcriptionnelle. Fragiadakis et collaborateurs ont déjà montré que le recrutement d'Aft1p sur le promoteur de *FRE2*, et

probablement sur le promoteur de *ARN2*, nécessite la présence des protéines à HMG-box Nhp6p, ce qui n'est par exemple pas le cas pour les gènes *FET3* ou *FRE3* (Fragiadakis *et al.*, 2003).

B-2. Des rôles distincts pour Aft1p et Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer

L'identification des gènes cibles d'Aft2p nous a permis de mettre en évidence une spécialisation fonctionnelle d'Aft2p dans la régulation de l'utilisation et du stockage du fer intracellulaire : Aft2p est seul impliqué dans la régulation directe des gènes *SMF3* et *MRS4*, dont les produits jouent un rôle respectivement dans l'homéostasie du fer vacuolaire et mitochondriale. Nos analyses globales de transcriptome permettent d'élargir ces résultats à d'autres gènes dont les produits sont impliqués dans le métabolisme du fer, et de proposer qu'Aft2p régule directement la transcription de *FET5* et *FTH1*, codant pour le transporteur bipartite de fer vacuolaire, et de *FRE6*, codant pour une ferriréductase vacuolaire. Aft1p quant à lui régule la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans le transport du fer extracellulaire. Cette spécificité d'action d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation de deux aspects différents de la réponse à la carence en fer, l'un pour le transport du fer au niveau de la membrane plasmique et l'autre pour la réorganisation de la distribution intracellulaire du fer, pourrait expliquer pourquoi ces deux facteurs de transcription font partie des 12% de gènes paralogues conservés à la suite de la duplication entière du génome de *S. cerevisiae*. Il est possible d'imaginer que l'ancêtre commun, « Aftp », était responsable de la régulation du transport du fer à la membrane plasmique et de la réorganisation de la répartition du fer à l'intérieur de la cellule. Après l'évènement de duplication entière du génome, les mutations accumulées par Aft1p et Aft2p auraient permis de dissocier la régulation de ces deux aspects du métabolisme du fer (modèle évolutif de « Duplication, Degeneration, Complementation », Force *et al.*, 1999). La complémentarité des rôles entre Aft1p et Aft2p dans la régulation du métabolisme du fer serait à l'origine de la préservation des deux copies du gène ancestral.

Nous avons mis en évidence qu'Aft1p et Aft2p régulent la transcription du gène *FTR1*, codant pour la perméase à fer du complexe bipartite Fet3p/Ftr1p impliqué dans le transport à haute affinité du fer extracellulaire. La régulation redondante de *FTR1* par Aft1p et Aft2p pourrait être le reflet de la redondance ancestrale des deux facteurs de transcription.

B-3. Un rôle pléiotrope pour Aft2p dans la cellule ?

Il semblerait que le rôle d'Aft2p au sein de la cellule ne se limite pas à la régulation d'un sous-groupe des gènes impliqués dans le métabolisme du fer. Nous avons également pu mettre en évidence qu'Aft2p est un activateur transcriptionnel direct des gènes *ZRT1* et *ZRT3*, dont les produits sont impliqués dans le métabolisme du zinc. Ceci nous a permis d'établir une base moléculaire pour comprendre les mécanismes de la connexion fer-zinc chez *S. cerevisiae*, et d'ajouter ces gènes à la liste des gènes cibles d'Aft2p.

Des analyses globales récentes de la réponse à la carence en fer (Puig *et al.*, 2005) ont également permis de mettre en évidence que les voies de biosynthèse de l'ergostérol et des acides gras peuvent être régulées en fonction de la quantité de fer présente dans le milieu. Nous avons identifié certains de ces gènes comme étant des cibles potentielles directes du facteur de transcription Aft2p.

Comme mentionné dans l'introduction de cette thèse, l'ensemble des processus intervenant dans l'acidification et la morphologie des vacuoles, ainsi que dans le système de trafic des protéines de l'appareil sécrétoire (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, endosomes, vacuole) sont des éléments nécessaires au maintien de l'homéostasie du fer des cellules. En accord avec ces données, nous avons révélé plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans ces processus comme autant de gènes cibles potentiels d'Aft2p, tels que *LAP4* ou *PEP4* codant respectivement pour une aminopeptidase et une protéinase A impliquées dans la dégradation vacuolaire des protéines, ou *AKR1*, codant pour une palmitoyltransférase ayant un rôle dans le processus d'endocytose.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il semblerait qu'Aft2p puisse avoir un rôle de régulateur pléiotrope, pour moduler, en fonction des besoins en fer de la cellule, l'expression d'un certain nombre de gènes appartenant à des voies métaboliques différentes.

Pour des raisons encore mal comprises à ce jour, l'augmentation de la transcription des gènes du métabolisme du fer est retrouvée de manière récurrente dans de nombreuses analyses de transcriptome. L'augmentation de la transcription des gènes du métabolisme du fer est par exemple retrouvée dans la réponse cellulaire à l'exposition à divers métaux tels que le cobalt, le zinc ou le cadmium (Stadler et Schweyen, 2002, Lyons *et al.*, 2004, C. Dubacq, communication personnelle et cette étude). Elle est également observée lors d'un stress oxydant, provoqué par exemple par une exposition à l'hydroxyurée ou à la choloroquine, ou par la délétion des gènes *SOD1* (superoxyde dismutase) ou *GRX5* (glutharédoxine) (C.

Dubacq, communication personnelle, Emerson *et al.*, 2002, De Freitas *et al.*, 2000, Belli *et al.*, 2004). L'augmentation de la transcription des gènes du métabolisme du fer est aussi observée lors de la transition diauxique (Haurie *et al.*, 2003). Enfin, la quantité de fer dans le milieu est un paramètre important pour l'expression des gènes du « régulon galactose » ou pour l'adaptation des cellules à un environnement alcalin (Shi *et al.*, 2003, Serrano *et al.*, 2004).

Les résultats concernant la réponse transcriptionnelle de *S. cerevisiae* à une exposition prolongée à l'hydroxyurée méritent une attention particulière. L'hydroxyurée est une drogue qui inhibe l'activité des ribonucléotide réductases, enzymes à centre di-fer impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN. En réponse à une exposition à cette drogue, la levure active la transcription des gènes connus pour être régulés par Yap1p, ainsi que la transcription des gènes du transport du fer extracellulaire (cibles d'Aft1p) et de l'utilisation et du stockage du fer intracellulaire (cibles d'Aft2p). Seuls les gènes que nous avons identifiés comme cibles d'Aft2p (*MRS4*, *SMF3*, *COT1*, *FET5*, *FTH1*, et *LAP4*) restent induits en réponse à l'hydroxyurée chez un mutant *Δaft1* (C. Dubacq, communication personnelle), ce qui confirme les rôles distincts d'Aft1p et d'Aft2p dans la régulation des gènes du métabolisme du fer.

Les études futures permettront probablement de mettre à jour d'autres situations pour lesquelles la régulation du métabolisme du fer est un paramètre important pour les cellules, et apporter ainsi des informations supplémentaires quant à l'importance d'Aft2p dans ces réponses.

C. Modes d'actions des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p

Au cours de cette étude, nous avons montré que l'activité transcriptionnelle dépendante d'Aft1p et d'Aft2p est régulée par la quantité de fer dans le milieu. Nous avons pu apporter des précisions quant à cette régulation, en mettant en évidence une régulation différentielle par le fer de l'activité d'Aft1p et d'Aft2p.

C-1. Effet du fer sur l'activité d'Aft1p et d'Aft2p

Nous avons montré que la liaison à l'ADN d'Aft2p est complètement abolie par la présence de 100µM de fer dans le milieu, alors que la liaison à l'ADN d'Aft1p n'est que diminuée dans cette même condition. Ces résultats suggèrent que l'activité transcriptionnelle d'Aft2p est plus sensible à la présence de fer que ne l'est celle d'Aft1p, hypothèse actuellement testée au laboratoire. En prenant comme modèle *FTR1*, des expériences préliminaires de Northern blot ont montré que l'activation transcriptionnelle de ce gène par Aft1p (observée dans le contexte *Δaft2*) diminue graduellement sur une gamme de concentration en fer variant de 10 à 100µM. En revanche, l'activation transcriptionnelle de *FTR1* par Aft2p (observée dans le contexte *Δaft1*) reste relativement constante sur la gamme de concentrations de fer variant de 10 à 90µM et est brutalement abolie avec 100µM de fer dans le milieu. Ces expériences vont être poursuivies pour déterminer quelle est la quantité de fer requise pour abolir complètement l'activité d'Aft1p. Parallèlement, des expériences de recrutement d'Aft1p et d'Aft2p seront réalisées afin de corréler ces résultats à la fixation différentielle de ces deux facteurs sur le promoteur de *FTR1*.

Ces résultats préliminaires sont en faveur d'un comportement différent d'Aft1p et d'Aft2p en fonction de la quantité de fer dans le milieu. Aft1p semble posséder un spectre d'action plus large en fonction de la quantité de fer dans le milieu, avec une inactivation graduelle par le fer, alors que le spectre d'action d'Aft2p semble restreint à une gamme plus courte de concentrations de fer, avec un système de réponse « tout ou rien ».

C-2. Une cinétique différente d'activation d'Aft1p et d'Aft2p en condition de carence en fer

Nous avons mis en évidence une hiérarchie d'activation parmi les gènes induits en réponse à la carence en fer chez une souche sauvage : les gènes *FIT3* et *CTH2* ne sont induits que faiblement lorsque les cellules sont cultivées pendant 5 heures dans le milieu dépourvu de fer, et il faut un temps de carence en fer plus long pour voir leur induction totale. Par ailleurs, nous avons montré que la régulation par le fer des gènes cibles d'Aft2p ne peut être observée

que dans un contexte *Δaft1*. L'ensemble de nos résultats met ainsi en évidence une certaine hiérarchie dans l'installation de la réponse à la carence en fer et suggèrent l'existence d'une cinétique d'activation par la carence en fer différente pour Aft1p et Aft2p. Une telle organisation de la réponse à la carence en fer ne peut pas être mise en évidence en utilisant les allèles constitutivement actifs *AFT1-1up* ou *AFT2-1up*, et elle n'a pas non plus été observée lors des études réalisées avec un milieu contenant le chélateur de fer ferrozine (Protchenko *et al.*, 2002, Puig *et al.*, 2005).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Rutherford et collaborateurs (Rutherford *et al.*, 2005). Ces auteurs ont montré qu'Aft1p et Aft2p sont tous deux activés par un signal émanant d'un défaut de synthèse des centres [Fe-S] mitochondriaux. Cependant, l'activation d'Aft2p (étudiée dans un contexte *Δaft1*) est observée 26 heures après le déclenchement du signal, alors que l'activation d'Aft1p est observée au bout de 11 heures. Par ailleurs, la transcription du gène *FIT3* n'est induite fortement que 26 heures après le déclenchement du défaut de synthèse des centres [Fe-S] mitochondriaux.

Une étude cinétique de l'adaptation à la quantité de fer dans le milieu serait une source supplémentaire d'informations pour disséquer davantage l'organisation de la réponse cellulaire à une variation de quantité de fer dans le milieu. Des expériences cinétiques sont à mener concernant aussi bien le passage des cellules d'un milieu contenant du fer à un milieu dépourvu de fer que le passage des cellules d'un milieu dépourvu de fer à un milieu contenant du fer. Cette source d'informations serait une base indispensable pour poursuivre l'étude complète et détaillée des rôles respectifs d'Aft1p et d'Aft2p dans la cellule.

C-3. Régulation par le fer de la quantité des protéines Aft1p et Aft2p

C-3-a. Régulation de la quantité de protéine Aft1p

Yamaguchi et collaborateurs ont montré que la quantité de fer dans le milieu n'a pas d'effet sur la quantité d'Aft1p, mais qu'elle régule la localisation subcellulaire de ce facteur de transcription : en absence de fer, Aft1p est localisé dans le noyau alors qu'en présence de fer, Aft1p est localisé dans le cytoplasme (Ueta *et al.*, 2003). Au laboratoire, S. Lallet, qui s'intéresse à cet aspect de la régulation d'Aft1p et d'Aft2p, a montré qu'il existe une régulation par le fer de la quantité de la protéine Aft1p en contexte sauvage, qui peut être

clairement révélée si les cellules sont cultivées sur une période de 18 heures dans un milieu dépourvu de fer. Ces données indiquent que le niveau de carence en fer du milieu pourrait être un élément important pour pouvoir observer des variations de quantité d'Aft1p. La régulation par le fer de la protéine Aft1p dans un contexte *Δaft2* n'avait jamais été entreprise jusqu'à présent, et nous avons mis en évidence un effet du fer dans ces conditions dès 5 heures de croissance des cellules dans un milieu dépourvu de fer. Ce résultat suggère que bien que l'absence d'Aft2p n'entraîne pas de phénotypes visibles dans les conditions de carence en fer testées jusqu'à présent, elle provoquerait néanmoins une dérégulation du métabolisme du fer suffisante pour entraîner une variation dans la régulation par le fer de la quantité de protéine Aft1p.

Nous avons montré que les variations de quantité de la protéine Aft1p sont en accord avec les variations de quantité de transcrits *AFT1*, ce qui n'exclue pas pour autant une régulation post-transcriptionnelle de la quantité d'Aft1p par le fer. En effet, une analyse de la stabilité d'Aft1p effectuée au laboratoire révèle que la protéine est stabilisée en condition de carence en fer (facteur 2). Un tel résultat montre l'existence d'une régulation post-traductionnelle d'Aft1p, et la caractérisation du mécanisme à l'origine de cette régulation est actuellement en cours au laboratoire.

C-3-b. Régulation de la quantité de protéine Aft2p

Nous avons montré que la quantité de transcrits *AFT2* reste constante quels que soient le contexte génétique utilisé (sauvage ou *Δaft1*) et la quantité de fer dans le milieu, alors que la quantité de protéine Aft2p est fortement augmentée en condition de carence en fer et en absence d'Aft1p. Ces résultats indiquent que la variation de la quantité d'Aft2p a lieu à un niveau post-transcriptionnel. La caractérisation du mécanisme impliqué est actuellement étudiée au laboratoire par S. Lallet. Des expériences préliminaires ont révélé l'existence d'au moins deux isoformes d'Aft2p se différenciant par leur mobilité électrophorétique. La bande de plus haut poids moléculaire disparaît après traitement par la phosphatase alcaline, ce qui indique une modification post-traductionnelle de type phosphorylation. La forme phosphorylée est par ailleurs majoritaire en condition de carence en fer, ce qui suggère que ce type de modification pourrait jouer un rôle dans la régulation par le fer d'Aft2p. Le rôle biologique de ces phosphorylations reste encore à déterminer. Il est intéressant de noter que la

protéine Aft1p ne présente pas ce type de modification post-traductionnelle en fonction de la quantité de fer dans le milieu (Casas *et al.*, 1997 et S. Lallet, communication personnelle).

D. Aft1p et Aft2p, des paralogues originaux

Au cours de ce travail de thèse, nous avons apporté des informations essentielles quant aux rôles respectifs d'Aft1p et d'Aft2p dans la réponse à la carence en fer, en mettant en évidence le recrutement spécifique de chacun sur les promoteurs de leur gènes cibles, et en étudiant de manière systématique les conséquences de l'absence de l'un ou l'autre de ces facteurs de transcription sur le paralogue restant. La levure *S. cerevisiae* possède d'autres paires de facteurs de transcription paralogues issus de la duplication entière du génome (Kellis *et al.*, 2004). Les stratégies utilisées pour les étudier sont variées, de même que les résultats obtenus concernant leurs rôles respectifs au sein de la cellule.

Les facteurs de transcription Msn2p/Msn4p, localisés dans la région dupliquée 43 (Seoighe et Wolfe, 1999), sont impliqués tous deux dans la réponse générale aux stress environnementaux (Martinez-Pastor *et al.*, 1996). Bien que les premières études aient suggéré des rôles partiellement distincts pour ces deux facteurs de transcription dans cette réponse (Schmitt et McEntee, 1996) ils sont aujourd'hui considérés comme des facteurs de transcription complètement redondants et seul le double mutant *Δmsn2Δmsn4* est utilisé pour étudier les mécanismes de réponse aux stress environnementaux (Boy-Marcotte *et al.*, 1998, Kandror *et al.*, 2004).

Les facteurs de transcription Pdr1p/Pdr3p sont localisés dans la région dupliquée nommée C (Seoighe et Wolfe, 1999) et impliqués dans la résistance multiple aux drogues (Delaveau *et al.*, 1994). Ils ont des rôles partiellement redondants dans la régulation des gènes impliqués dans cette réponse, mais les analyses globales réalisées pour identifier leurs gènes cibles sont conduites avec des mutants « gain de fonction » (DeRisi *et al.*, 2000, Onda *et al.*, 2004). Ces deux facteurs de transcription semblent par ailleurs être capables d'activer la transcription de leur gènes cibles en formant des homo ou des hétérodimères (Mamnun, 2002), et ils partagent la régulation de certains gènes avec deux autres facteurs de transcription paralogues, Yrr1p et Yrm1p (Lucau-Danila *et al.*, 2003).

Les facteurs de transcription Ace2p/Swi5p, localisés dans la région dupliquée 16 (Seoighe et Wolfe, 1999) sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Dohrmann *et*

al., 1992). Ils ont cependant été caractérisés rapidement comme étant des facteurs de transcription qui activent majoritairement des groupes de gènes distincts (Dohrmann *et al.*, 1992, Kovacech *et al.*, 1996, Doolin *et al.*, 2001). La surexpression de l'un ou l'autre de ces facteurs a malgré tout pour conséquence d'activer les gènes normalement régulés par le paralogue (Dohrmann *et al.*, 1992). La spécificité de chacun des paralogues dans la régulation de groupes de gènes distincts résiderait dans les domaines protéiques peu conservés, autorisant des interactions avec des partenaires différents (McBride *et al.*, 1999). Pour ces deux facteurs de transcription paralogues, la divergence évolutive aurait été telle que les mutations accumulées par la copie dupliquée lui auraient permis l'acquisition d'une nouvelle fonction (modèle évolutif de néofonctionalisation, Ohno, 1970).

Les facteurs de transcription Yap1p/Cad1p sont localisés près de la région dupliquée 19 (Seoighe et Wolfe, 1999). Afin de déterminer le rôle de chacun dans la réponse au H_2O_2, des analyses globales de transcriptome ont été effectuées avec les souches sauvage et *Δyap1* et/ou *Δcad1* cultivées en présence de H_2O_2 (Cohen *et al.*, 2002). Les résultats de cette analyse suggèrent que les deux facteurs de transcription régulent, comme Aft1p et Aft2p, la transcription de gènes dont les produits sont impliqués dans des aspects différents du même processus cellulaire, ici la réponse au stress oxydant. Alors que Yap1p pourrait activer la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, Cad1p serait spécialisé dans l'activation de la transcription des gènes dont les produits sont impliqués dans la stabilisation et le repliement des protéines nouvellement synthétisées ou dénaturées. Ces analyses n'ont cependant pas été détaillées au niveau moléculaire en termes de mécanique d'activation comme nous avons pu le faire avec Aft1p et Aft2p au cours de ce travail de thèse.

L'étude des deux facteurs de transcription paralogues Aft1p et Aft2p, dont l'un d'eux, Aft2p, n'a été mis en évidence que récemment (Blaiseau *et al.*, 2001, Rutherford *et al.,* 2001) a largement progressé depuis le début de ma thèse, grâce aux différentes stratégies qui ont pu être utilisées aussi bien dans notre laboratoire que par les autres équipes travaillant sur le sujet, pour essayer de caractériser le rôle de ces deux facteurs de transcription au sein de la cellule. Ce couple de facteurs de transcription paralogues de *S. cerevisiae* apparaît maintenant comme un couple unique de facteurs de transcription paralogues, tant au niveau de ce que nous avons apporté concernant l'organisation des rôles respectifs de chacun, qu'au niveau des données dont nous disposons maintenant concernant leur régulation par le fer.

E. Aft1p et Aft2p chez une souche de *S. cerevisiae* sauvage

Les conditions de culture utilisées en laboratoire sont très différentes de l'habitat naturel de *S. cerevisiae*. La levure doit cohabiter avec d'autres microorganismes, ce qui entraîne un véritable mécanisme de compétition pour le fer entre tous ces organismes vivants (Whipps, 2001). Le fait que *S .cerevisiae* possède des récepteurs de sidérophores alors qu'elle n'en sécrète pas est un exemple de cette nécessité de compétition pour le fer vis-à-vis des autres organismes (Loper et Henkels, 1999). Une autre forme d'avantage pour *S. cerevisiae* pour la compétition vis-à-vis des autres microorganismes vivant dans son habitat naturel pourrait être la possession de deux régulateurs du métabolisme du fer, ayant chacun leur rôle spécifique. Dans les conditions de culture de laboratoire, la délétion d'Aft2p n'entraîne pas de phénotype particulier, et ce facteur de transcription est considéré comme un régulateur secondaire par rapport à Aft1p. Dans l'habitat naturel de *S. cerevisiae*, où la disponibilité en fer pourrait être moindre, le rôle d'Aft2p pourrait être primordial pour les cellules.

MATERIEL

&

METHODES

Souches et plasmides

Souches de levures

Tableau 9 : Souches de *S. cerevisiae.* Les souches marquées d'un astérisque n'ont été utilisées que pour en construire d'autres.

Souche	Génotype	Source
CM3260	*MATα trp1-63 leu2-3 112 gcn4-101 his3-309*	Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996
Y18	*MATα trp1-63 leu2-3 112 gcn4-101 his3-309 aft1 : :TRP1*	Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996
CM3260 *Δaft2*	*MATα trp1-63 leu2-3 112 gcn4-101 his3-309 aft2 : :kanMX4*	Blaiseau *et al.*, 2001
Y18 *Δaft2*	*MATα trp1-63 leu2-3 112 gcn4-101 his3-309 aft1 : :TRP1 aft2 : :kanMX4*	Blaiseau *et al.*, 2001
BY4741*	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	Euroscarf
BY4742	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*	Euroscarf
BY4741*Δaft2* (Y01090)*	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 aft2 : :kanMX4*	Euroscarf
BY4742*Δaft1* (Y14438)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 aft1 : :kanMX4*	Euroscarf
BY4742*Δaft2* (Y11090)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 aft2 : :kanMX4*	Euroscarf
BY4742*Δzap1* (Y11367)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 zap1::kanMX4*	Euroscarf
Δaft1Δaft2 (SCMC01)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 aft1 : :kanMX4 aft2 : :kanMX4*	Ce travail
BY4741*Δzap1* (SCMC03)	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 zap1 ::HIS3MX6*	Ce travail
Δaft1Δzap1 (SCMC19)	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 aft1 : :kanMX4 zap1 ::HIS3MX6*	Ce travail
Δaft2Δzap1 (SCMC20)	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 aft2 : :kanMX4 zap1 ::HIS3MX6*	Ce travail
BY4742*AFT1-HA* (SCMC05)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 AFT1-3HA : :HIS3MX6*	Ce travail
BY4741*AFT2-HA* (SCMC11)*	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 AFT2-3HA : :HIS3MX6*	Ce travail
AFT2-HA (17B, SCMC18)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 AFT2-3HA : :HIS3MX6*	Ce travail
Δaft1,AFT2-HA (SCMC13)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 aft1 : :kanMX4 AFT2-3HA : :HIS3MX6*	Ce travail
Δaft2,AFT1-HA (SCMC10)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 aft2 : :kanMX4 AFT1-3HA : :HIS3MX6*	Ce travail

Souches bactériennes

La souche *E. coli* DH5α [F^-Φ80d*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 ($r_K^-m_K^+$) *sup*E44 λ- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1] a été utilisée pour le maintien et la production des plasmides.

Les protéines recombinantes ont été exprimées dans la souche d'*E. coli* BL21 [F^- *dcm ompT* *hsd*SB($r_B^-m_B^-$) *gal*].

A-3. Plasmides

Tableau 10 : Plasmides utilisés au cours de ce travail.

Vecteurs de levure	**Caractéristiques**	**Source**
pEG202-AFT1	2μ, pADH1 HIS3 LexA-AFT1	Blaiseau *et al.*, 2001
pEG202-AFT2	2μ, pADH1 HIS3 LexA-AFT2	Blaiseau *et al.*, 2001
pCM189-AFT1	ARS1, $pTetO_7$ URA3	P.L. Blaiseau
pCM189-AFT1-1up	ARS1, $pTetO_7$ URA3	P.L. Blaiseau
pCM189-AFT2	ARS1, $pTetO_7$ URA3	Ce travail
pCM189-AFT2-1up	ARS1, $pTetO_7$ URA3	Ce travail
pCM188-AFT1	ARS1, $pTetO_2$ URA3	P.L. Blaiseau
pCM188-AFT1-1up	ARS1, $pTetO_2$ URA3	P.L. Blaiseau
pCM188-AFT2	ARS1, $pTetO_2$ URA3	P.L. Blaiseau
pCM188-AFT2-1up	ARS1, $pTetO_2$ URA3	P.L. Blaiseau
Vecteurs bactériens		
pFA6a-His3MX6	AMP^R	Longtine *et al.*, 1998
pFA6a-3HA-His3MX6	AMP^R	Longtine *et al.*, 1998
pGEX-4T-1-AFT1	pTac AMP^R GST-AFT1	Ce travail
pGEX-4T-1-AFT2	pTac AMP^R GST-AFT2	Ce travail
pRIL	$Chloramphénicol^R$, ARNt limitants chez *E. coli*	Stratagene

Vecteurs PCM189-AFT2 et PCM189-AFT2-1up : Les phases ouvertes de lecture *AFT2* ou *AFT2-1up* ont été « ressorties » des vecteurs pEG202-AFT2 et pEG202-AFT2-1up (construits par P.L. Blaiseau) par digestion enzymatique BamHI / PstI et clonées dans le pCM189 digéré par les mêmes enzymes. Les inserts ont été vérifiés par séquençage.

Vecteurs PGEX-4T-1-AFT1 et PGEX-4T-1-AFT2 : Des amplifications par PCR des gènes *AFT1* et *AFT2* ont été réalisées sur de l'ADNg de *S. cerevisiae* avec des oligonucléotides

présentés dans le tableau 12, permettant d'obtenir des fragments contenant le gène d'intérêt flanqué de sites de digestion compatibles avec l'obtention d'une fusion traductionnelle en aval de la GST dans le pGEX-4T-1 (figure 64). L'insertion des fragments dans le pGEX-4T-1 a été vérifiée en effectuant une double digestion des plasmides obtenus par EcoRI et XhoI pour le pGEX-4T-1-AFT1 et par BamHI et XhoI pour le pGEX-4T-1-AFT2 (figure 64). La totalité des inserts a également été séquencée pour s'assurer qu'aucune mutation n'avait été introduite lors de l'amplification des fragments par PCR, et pour vérifier que les plasmides obtenus possèdent bien une fusion traductionnelle entre la GST et les gènes *AFT1* et *AFT2*.

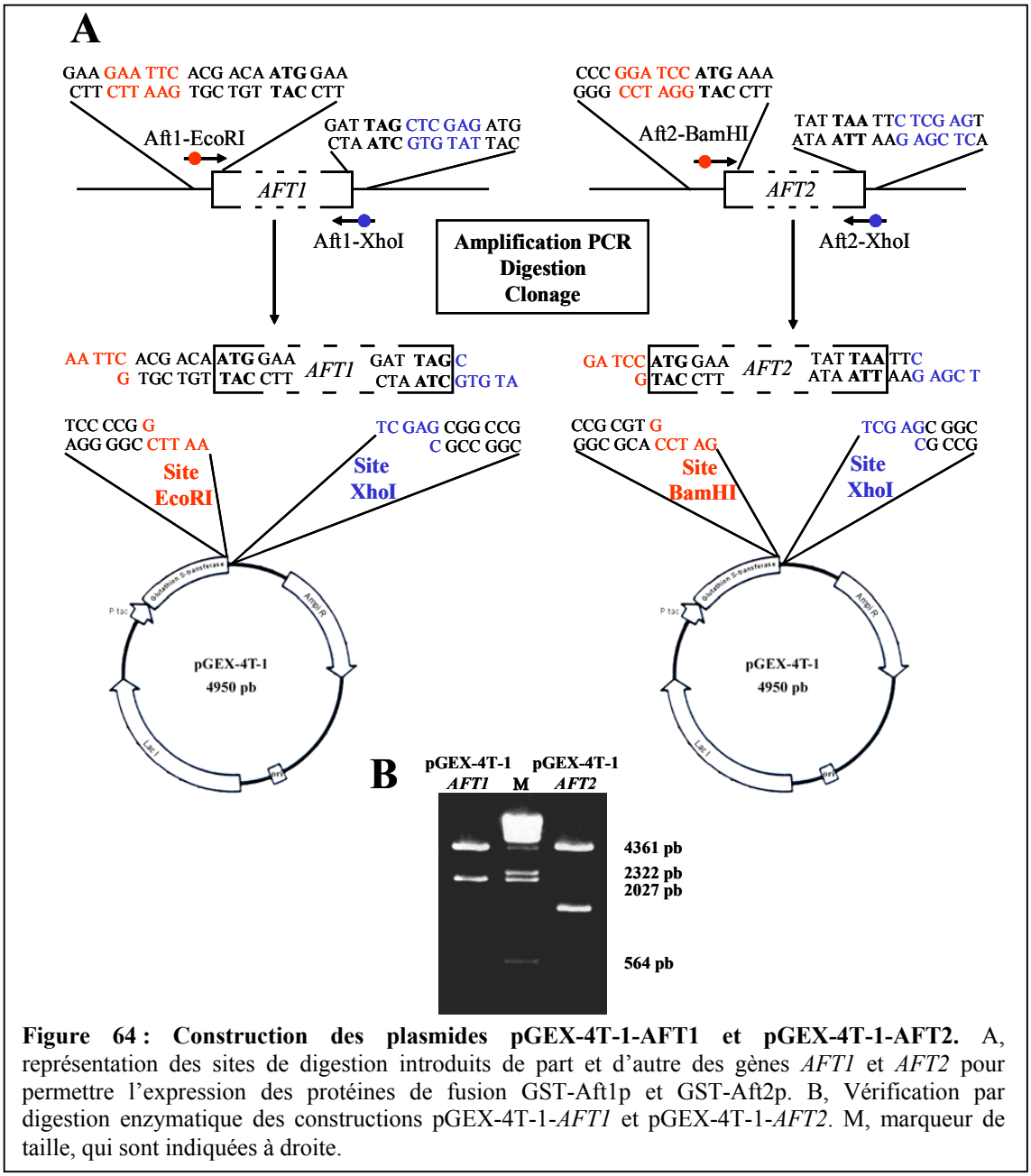

Figure 64 : Construction des plasmides pGEX-4T-1-AFT1 et pGEX-4T-1-AFT2. A, représentation des sites de digestion introduits de part et d'autre des gènes *AFT1* et *AFT2* pour permettre l'expression des protéines de fusion GST-Aft1p et GST-Aft2p. B, Vérification par digestion enzymatique des constructions pGEX-4T-1-*AFT1* et pGEX-4T-1-*AFT2*. M, marqueur de taille, qui sont indiquées à droite.

Milieux et conditions de culture

Composition des milieux levure

Milieux complets (YP) : extrait de levure 0,5%, bacto peptone 0,5%, auquel est rajouté le glucose à 2% pour les conditions de croissance standard (YPG). Lorsqu'une sélection sur le critère de résistance à la généticine est nécessaire, celle ci est ajoutée au milieu YPG à 100µg.mL^{-1}.

Milieux minimum synthétiques (DOB) : Yeast Nitrogen Base 0,17% (YNB, Difco), sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) 0,5%, glucose 2%, mélange complet d'acides aminés et bases azotées (CSM) 0,08%. Lorsqu'une sélection est nécessaire, c'est un mélange CSM omettant l'un des composants (exemple : CSM-Histidine, CSM-Uracile) qui est ajouté (DOB-His, DOB-Ura).

Milieux minimum à concentration en métaux contrôlée :

Milieu minimum sans fer ni cuivre : YNB dépourvu de fer et de cuivre 0,17% (Bio101 #4027-122), $(NH_4)_2SO_4$ 0,5%, glucose 2%, CSM 0,08%.

Milieu minimum sans fer, sans cuivre et sans zinc : YNB dépourvu de fer, de cuivre et de zinc 0,56% (Bio101 #4028-812), $(NH_4)_2SO_4$ 0,5%, KH_2PO_4 0,1%, glucose 2%, CSM 0,08%.

Milieu de sporulation : extrait de levure 0,25%, Acétate de potassium 1%, Glucose 0,1%.

Différents métaux ont pu être ajoutés aux milieux de manière adéquate : le fer sous forme de fer ammonium sulfate ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$), le cuivre sous forme de sulfate de cuivre ($CuSO_4$), le zinc sous forme de sulfate de zinc ($ZnSO_4$), le cadmium sous forme de sulfate de cadmium ($CdSO_4$). Le fer ammonium sulfate ayant tendance à former des précipités avec le temps (oxydation en présence d'oxygène), la solution mère est préparée extemporanément, à une concentration de 10mM.
Pour les boîtes, du bacto agar 2% est ajouté.

Composition des milieux bactériens

Milieu LB : extraits de levure 0,5%, bacto peptone 1%, NaCl 0,5%.

Milieu TB : extraits de levure 2,4%, bacto peptone 1,2%, glycérol 4%, KH_2PO_4 0,2%, K_2HPO_4 0,125%.

Milieu M63 : KH_2PO_4 0,3%, K_2HPO_4 0,7%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2%, $MgSO_4$ 0,01%, glucose 0,2%, Thiamine 1µg.mL^{-1}.

Les antibiotiques nécessaires à la sélection sont ajoutés dans les proportions suivantes :
Ampicilline : 50µg.mL^{-1}
Chloramphénicol : 40µg.mL^{-1}
Pour les boîtes, du bacto agar 2% est ajouté.

Conditions de culture des levures dans le milieu +/-fer

Les précultures et cultures en milieu liquide sont réalisées à 30°C sous agitation constante à 240rpm dans :
- 10mL de milieu dans des tubes en propylène (Falcon) de 50mL pour les précultures.
- 15mL de milieu dans des tubes en propylène (Falcon) de 50mL pour les extractions d'ARN totaux.
- 100mL de milieu dans des fioles Erlenmeyer de 500mL pour les préparations de chromatine.
- 5mL de milieu dans des tubes en propylène (Falcon) de 50mL pour les extractions protéiques.

Condition de culture systématique (période courte) : les levures sont dans un premier temps précultivées durant 15 heures dans le milieu liquide dépourvu de fer et de cuivre auquel est ajouté 1µM de fer ammonium sulfate. Elles sont ensuite diluées à DO_{600} = 0,3 dans le milieu frais additionné ou non de fer ammonium sulfate à 100µM et cultivées jusqu'à atteindre une DO_{600} = 0,8-1 (soit durant 5 à 6 heures).

Condition de culture sur une période longue : les levures sont dans un premier temps précultivées durant 24 heures dans le milieu liquide dépourvu de fer et de cuivre auquel est ajouté 1µM de fer ammonium sulfate. Elles sont ensuite diluées à DO_{600} = 0,03 dans le milieu frais additionné ou non de fer ammonium sulfate à 100µM et cultivées jusqu'à atteindre une DO_{600} = 0,8-1 (soit durant 15 à 18 heures).

Test de croissance en milieu liquide

Les tests de croissance en milieu liquide ont été réalisés à 30°C sous agitation constante à 240rpm dans 5mL de milieu dans des tubes à essais Pyrex de 20mL. Les levures ont été dans un premier temps précultivées durant 24 heures dans le milieu dépourvu de fer, de cuivre et de zinc (auquel ont été rajoutés 0,5µM de fer ammonium sulfate pour la souche *Δaft1Δaft2*), puis diluées à DO_{600} = 0,005 dans le milieu frais adéquat et cultivées durant 48 heures à 30°C.

Test de croissance sur boîte

Les levures sont prélevées sur une boîte de pétri DOB fraîche et sont diluées dans de l'eau à DO_{600} = 1. Une goutte de 3µL de cette solution, ainsi qu'une goutte de trois dilutions successives d'un facteur 10 sont déposées sur milieu solide et les boîtes sont placées à 30°C pendant 4 à 6 jours.

Mesures de métaux

Les levures sont prélevées sur une boîte de pétri DOB fraîche et sont diluées à DO_{600} = 0,08 dans 20mL de milieu adéquat dans des fioles Erlenmeyer de 100mL. Elles sont cultivées à 30°C sous agitation constante à 240rpm pendant environ 20 heures (DO_{600} comprises entre 3 et 5), récoltées par centrifugation, lavées avec 30mL d'EDTA 10mM puis 30mL H_2O et envoyées sous forme de culot au service central d'analyse de Vernaison (B.P.22 69390 Vernaison, bda@sca.cnrs.fr).

Manipulations génétiques

Transformation des bactéries et levures

Les bactéries thermo-compétentes DH5α (GibcoBRL) et BL21 (Stratagene) sont transformées suivant les conseils du fournisseur.

La méthode de transformation des levures est basée sur l'utilisation combinée de polyéthylène glycol (PEG) et d'acétate de lithium (Sherman *et al.*, 1986). Pour les transformations conduisant à l'insertion au locus d'un fragment d'ADN, une méthode dérivée, à haute efficacité, a été utilisée (Schiestl et Gietz, 1989).

Construction des souches de levure par insertion au locus

Mutants de délétions : Une souche simple mutante *Δzap1* a été construite par remplacement du gène *ZAP1* par le gène *HIS3* dans la souche sauvage BY4741. Les oligonucléotides chimères utilisés (tableau 11) possèdent une partie 5' homologue aux séquences situées da part et d'autre du gène à supprimer, et leur partie 3' est homologue des séquences qui encadrent le module *HIS3* présent sur le plasmide pFa6a-His3MX6 (tableau 10). Ces amorces chimères ont permis d'amplifier le module *HIS3* encadré de séquences permettant la recombinaison homologue de part et d'autre du gène ciblé (*ZAP1*) et ainsi son remplacement par le marqueur *HIS3*. Les transformants ont été sélectionnés sur DOB-His ajouté de 100µM de zinc et la délétion de *ZAP1* vérifiée par PCR à l'aide des oligonucléotides indiqués dans le tableau 11.

Mutants étiquetés 3HA : Le principe de l'étiquetage au locus des gènes *AFT1* et *AFT2* est similaire au remplacement de gène, mis à part que le fragment de PCR est inséré à la suite du gène de manière à obtenir une fusion traductionnelle entre la protéine Aft1p ou Aft2p et l'épitope 3HA. Les oligonucléotides utilisés pour générer les fragments de PCR correspondants à partir du plasmide PFA6a-3HA-His3MX6 (tableau 10) sont indiqués dans le tableau 11. L'étiquetage d'*AFT1* a été généré dans la souche sauvage BY4742, l'étiquetage d'*AFT2* a été généré dans la souche sauvage BY4741. Les transformants ont été sélectionnés

sur DOB-His, et l'insertion correcte du fragment de PCR vérifiée par PCR, séquençage et expression de la protéine étiquetée.

Construction des souches par croisement

Conjugaison et sporulation : Les souches double mutantes *Δaft1Δaft2*, *Δaft1Δzap1* et *Δaft2Δzap1*, ainsi que plusieurs souches étiquetées HA ont été construites par croisement des souches parentales suivantes (tableau 9) :

Δaft1Δaft2 : BY4741*Δaft2* (Y01090) et BY4742*Δaft1* (Y14438)

Δaft1Δzap1 : BY4742*Δaft1* (Y14438) et BY4741*Δzap1* (SCMC03)

Δaft2Δzap1 : BY4742*Δaft2* (Y11090) et BY4741*Δzap1* (SCMC03)

AFT2-HA (17B, SCMC18) : BY4741*AFT2-HA* (SCMC11) et BY4742

Δaft1,AFT2-HA (SCMC13) :BY4741*AFT2-HA* (SCMC11) et BY4742*Δaft1* (Y14438)

Δaft2,AFT1-HA (SCMC10): BY4742*AFT1-HA* (SCMC05) et BY4741*Δaft2*

La conjugaison des deux souches parentales haploïdes (de signe sexuel opposé a et α) est effectuée par leur mélange sur milieu YPG solide. Après 24 heures à 30°C, ce mélange est répliqué sur le milieu de sélection n'autorisant que la croissance des diploïdes formés : DOB-Met-Lys pour *Δaft1Δaft2* et *AFT2-HA* (17B, SCMC18), et DOB-His+généticine pour *Δaft1Δzap1*, *Δaft2Δzap1*, *Δaft1,AFT2-HA* (SCMC13) et *Δaft2,AFT1-HA* (SCMC10). Les diploïdes sélectionnés sont ensuite placés pendant 5 à 7 jours à 30°C sur le milieu de sporulation. La formation des asques est vérifiée sous un microscope optique .

Dissection des tétrades : Les asques formés par sporulation des diploïdes sont mis en suspension dans une solution d'hélicase 50µg.µL^{-1}, et placés à 30°C pendant 13 minutes afin d'hydrolyser leur paroi, puis transférés dans la glace. Les tétrades sont alors disséquées et déposées sur milieu complet YPG (additionné d'ampicilline pour éviter les contaminations bactériennes) à l'aide d'un micromanipulateur (Sanger), et laissées germer à 30°C durant 3 à 4 jours. La co-ségrégation des caractères d'intérêt (résistance à la généticine et/ou prototrophie pour l'histidine) est étudiée par réplique des spores sur les milieux de sélection appropriés, et les spores présentant les deux caractères sont sélectionnées pour être vérifiées par PCR. Le double mutant *Δaft1Δaft2* ayant été construit à partir de deux parents présentant une résistance à la généticine, ce sont les caractéristiques phénotypiques de la souche double

mutante étudiée dans un autre contexte génétique (Blaiseau *et al.*, 2001) qui ont été utilisés pour sélectionner les spores (sensibilité au cuivre et hypersensibilité au H_2O_2).

Manipulation des acides nucléiques

Oligonucléotides

Tableau 11 : Oligonucléotides utilisés pour la construction des souches de levure. En gras est indiquée la séquence homologue du plasmide portant la cassette à intégrer.

Constructions des souches	
Δzap1	
F1-ZAP1	TATGTGTTACGGTTTTTTAAATAGAAGAAGGATAGGAACTA**CGGATCCCCG GGTTAATTAA**
R1-ZAP1	CTGAAAACCGCCCTTCTTACGTTGGACCATGATGATCACAT**GAATTCGAGC TCGTTTAAAC**
Etiquetage *AFT1*	
AFT1-GFP1'	AATGGTGAACGGCGAGTTGAAGTATGTGAAGCCAGAAGAT**CGGATCCCCG GGTTAATTAA**
AFT1-GFP2	ATGGACGAGAGATACGTCTAAGTTTGATTTCATCTATATG**GAATTCGAGCT CGTTTAAAC**
Etiquetage *AFT2*	
AFT2-GFP1	TGAATTAAATTCTATTGACCCAGCCTTAATATCAAAATAT**CGGATCCCCGG GTTAATTAA**
AFT2-GFP2	TTAAACGTGATACCGTTTTAATGAGTTGAAAACTAAATAA**GAATTCGAGCT CGTTTAAAC**
Vérification des souches	
Δzap1	
ZAP1-prom	CCCTAAAGGTCATGATGAAACG
ZAP1-term	GCTTACAAAAAAGAGTTTGCG
Δaft1	
AFT1-prom	CGACGATTCATGCTTATACCG
AFT1-5	GGACTTATCTTCACGTATGTCTTG
Δaft2	
AFT2-1	CGGTATAAGGAGTGTCAAAG
AFT2-9	CCTCGATGGTGCTGATATCACC
Etiquette *AFT1*	
AFT1-8	GGTCCGCAACAGCAGCCACCGC
AFT1-5	GGACTTATCTTCACGTATGTCTTG
Etiquette *AFT2*	
AFT2-11	CGAAGCGTTGCTTCATTTCAACG
AFT2-9	CCTCGATGGTGCTGATATCACC

Tableau 12 : Oligonucléotides utilisés pour la construction des vecteurs d'expression hétérologue.

pGEX-4T1-AFT1	
AFT1-GST1'	CAGAA**GAATTC**ACGACA**ATG**GAAGGCTTC EcoRI initiation traduction
AFT1-GST2	TTCAT**CTCGAGCTA**AATCTTCTGGCTTCAC XhoI STOP
pGEX-4T1-AFT2	
AFT2-GST1	CCCC**GGATCCATG**AAAGCAAAGTCGATGAAG BamHI initiation traduction
AFT2-GST2	GAAAA**CTCGAG**AA**TTA**ATATTTTGATATTAAG XhoI STOP

Tableau 13 : Oligonucléotides utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

	Amont	Aval	Taille (pb)
Contrôles négatifs			
BUD3	GAAGACCAAGACAAACGCCTCTA	TGAAGGCTTGCTCTTGCTTTTAC	121
POL1	GCCGCTCGAAATGGTACATC	GCAATTCCTGGCGCTTTCT	115
RPO21	GTTCGTTGATCGTACCTTACCTCAT	GATAAGACCTTCACGACCACCC	142
Promoteurs			
FET3	AGTACGCTGAGTCGCCGATAA	CGAGAATAAGAGCACCTGCAAA	120
FTR1	GTGCGCGAATACTGCTGGT	TTACTGCTGCGACGGTGCT	129
MRS4	TAACCCACAGGAATCGCTACTTT	GGTGTTCTTGCCTTTCAGTCTTC	107
SMF3	ACATTGAAGCCACGACAAATGA	ACAGGGTGCGGTTACCATGA	137
FIT2	CTCAAGAGCAGGGTGCAATTTA	GGGGGTGCATTTGAACTTAGG	101
FIT3	CCAATTAAACGAGGAAGCGGTA	GGGGTGCGGAACAAACAG	111
CTH2	CGCAAAATGCACCCACATTA	CTGGCACAATGCACCCAAC	99
COT1	CAACGGCCGCTTATCACTTACT	GAAAATTCACTACTGGAAACGGG	114
AFT1	CACCCATGCACCTCACACC	TTCACTCGGCAAGCCCTTC	129
AFT2	TCTTTCAAACGGTGGCTGTTC	CAGCACTGGGCTATTTACAGAGG	114
ZRT1	GGTACCGTTACCGTCAGTTTTCTT	GTATCTTTGGTCCTTCGAGGTTTT	131
ZRT3	GCCCACAACCCAAGTTAATCA	GTCACAACCCACGGAGCAG	104

Tableau 14 : Oligonucléotides utilisés pour analyser la quantité des transcrits.

	Amont	Aval	Taille (pb)
Northern Blot			
FET3	TTCTTGGACGATTTCTACTT	GCAACTCTGGCAAACTTCTA	623
FTR1	TCCGTGCTGCTATCGTTTTT	ATCCCACCCATTGTCCAGTT	759
MRS4	ATGGAGCATTCTTTGATGTT	ATTAGCCACTATCCTTGGTT	744
SMF3	CTGAAAACTGTCGTCATAAT	AGGACAAGACCACTTGAGA	924
FIT3	CTACTTTTGTTTGGGGTGGTG	TGGTAGCGGCAGCAGAAGTGGT	121
CTH2	TTTTCCACAGATCAAGAGCA	CAGCTTTCACGTAAACAGCA	673
COT1	GGGTACTTGTCTCACTCTTT	ATAGCGGTGAAGTTTTGAT	1032
ZRT1	GGTGGAAACAATGG	GATGGAACACTAAGACAGGG	658
ZRT3	TTATCGGTTGCCTTCGATAGC	GACGAATCTGACCTGTTAGTG	1010
PCR Quantitative			
	Amont	**Aval**	
ACT1	GAGTTGCCCCAGAAGAACACC	GATGGAAACGTAGAAGGCTGGA	125
FIT2	CACCGAAGGACCAGATACCAC	CAGAAGAAGAGGCAGAAGAGGAG	119
AFT1	CCATAACCACGAACAGCACCA	TACTTCAACTCGCCGTTCACC	118
AFT2	CCAATTATTTCTTGTGACTGTGGG	CGGAGTTTTTATTTGTTTTGAGCA	124

Extraction d'acides nucléiques

L'ADN plasmidique contenu dans les souches bactériennes est préparé selon la méthode de lyse alcaline/SDS (Birnboim et Doly, 1979) à partir de 5mL d'une culture de nuit en milieu LB additionné de l'antibiotique approprié.

L'ADNg de levure est préparé selon le protocole établi par Hoffman et Winston (Hoffman et Winston, 1987) à partir de 10mL d'une culture de nuit en milieu YPG. Le culot d'ADN est repris dans 70µL d'eau.

Les ARN totaux de levure sont préparés selon la méthode dite « phénol chaud » (Schmitt *et al.*, 1990) à partir de 15 mL de culture en phase exponentielle. Le culot est repris dans 40 à 50µL d'eau, ce qui permet d'obtenir les ARN totaux à une concentration de 0,5 à 1,5µg.µL^{-1}.

Northern blot

Préparation de la membrane : La technique de Northern blot est dérivée du protocole établi par Lehrach et collaborateurs (Lehrach *et al.*, 1977). Pour chaque extrait, 15µg d'ARN totaux sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% / formaldéhyde 0,75M, transférés par capillarité sur membrane de nylon Hybond^{TM}-N^{+} (Amersham) et fixés par une exposition aux UV.

Préparation des sondes : L'ADN utilisé pour les sondes est amplifié par PCR sur de l'ADNg d'une souche sauvage à l'aide des oligonucléotides indiqués dans le tableau 14 puis purifié sur gel d'agarose. Un fragment BamHI-HindIII de 1200pb est utilisé pour *ACT1*. Les sondes sont marquées au [α-^{32}P]dCTP (3000 Ci mmol-1, Amersham) par « random priming » avec le kit de marquage de l'ADN « Megaprime labelling system » (Amersham) selon les instructions du fournisseur.

Hybridation et détection : Après une préhybridation de 15 minutes à 42°C dans 10mL de la solution d'hybridation, les membranes sont incubées à 42°C avec la sonde radiomarquée dans la même solution pendant 18 heures. Trois lavages successifs de 15 minutes à 55°C sont réalisés avec la solution de lavage. Les membranes sont ensuite exposées face à un écran

phosphore durant 48 heures et la radioactivité est révélée et quantifiée à l'aide d'un PhosphorImager et du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics). Avant de réaliser une nouvelle hybridation, les membranes sont déshybridées à l'aide de la solution de déshybridation portée à ébullition.

Solutions :

Tampon SSC 20x : NaCl 3M, citrate de sodium 0,3M.

Tampon SSPE 20x : NaCl 3,6M, Na_2HPO_4 0,2M, EDTA Na_2 20mM.

Denhart 50x : Ficoll 1%, polyvinylpyrolidone 1%, Bovine Serum Albumine (BSA) 1,2%.

Solution d'hybridation : formamide 50%, SSPE 5x, Denhart 5%, SDS 0,1%, PEG 7%, ADN de sperme de saumon dénaturé 100µg.mL^{-1}.

Solution de lavage : SSC 2x, SDS 1%.

Solution de déshybridation : SSC 0,2x, SDS 0,1%.

RT-PCR quantitative

Obtention des ADNc : 30µg d'ARN totaux obtenus par la méthode du phénol chaud (Schmitt *et al.*, 1990) sont traités par 20 unités de « DNase RNase-free » 15 minutes à température ambiante, puis purifiés avec le kit RNeasy (QIAGEN) selon les instructions du fournisseur. 5µg des ARN purifiés sont alors rétro-transcrits à l'aide du kit AMV (1 438 188, Roche) selon les instructions du fournisseur. Les ADNc obtenus sont dilués au cinquième pour analyse.

PCR Quantitative : Les PCR sont réalisées sur le LightCycler (Roche). Le volume final réactionnel (15µL) est déposé dans les capillaires adaptés (Roche). Le volume réactionnel contient 2µL de la solution d'ADNc diluée, 2µM de chaque oligonucléotide spécifique de l'ADNc à analyser et le kit d'amplification « Quantitect SybrGreen PCR master mix » 1X (solution 2X, QIAGEN). Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant :

Dénaturation initiale : 95°C, 15 minutes.

Amplification/Quantification : 95°C, 20 secondes ; 55°C, 20 secondes ; 72°C, 25 secondes (répété 45 fois, 1 seule mesure de fluorescence à la fin de chaque cycle).

Courbe de fusion : 60°C à 95°C avec une augmentation de température de 0,1°C par seconde et une mesure de fluorescence continue.

Une amplification sur une gamme de 5 concentrations connues d'ADNg est réalisée en parallèle avec chaque couple d'oligonucléotide de manière à calculer la quantité d'ADNc d'intérêt contenue dans la solution testée.
Le résultat des PCR est analysé à l'aide du logiciel LightCycler 3.5 (Roche) et la méthode du « fit point ». Le « crossing point » (CP) est défini comme étant le point auquel la fluorescence est 10 fois supérieure à la fluorescence du bruit de fond. Les CP obtenus pour chacune des 5 concentrations connues d'ADNg permettent de tracer une courbe standard CP=log (concentration), sur laquelle sont ensuite calculées les quantités d'ADNc étudiés dans les échantillons testés. Les expériences ont été réalisées en duplicata (deux lots d'ARN différents) et les PCR réalisées en duplicata ou triplicata. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport à la valeur obtenue pour le gène *ACT1*, et la moyenne calculée sur les deux lots d'ARN utilisés.

Analyses globales de transcriptome

Présentation des filtres utilisés

Des filtres ADN à haute densité produits par Research Genetics ont été utilisés comme support pour réaliser les hybridations (figure 65). L'ensemble des régions codantes du génome de *S. cerevisiae* (6144 phases ouvertes de lecture) est représenté par un lot de deux membranes de nylon, sur lesquelles vont être hybridées les populations d'ADNc radiomarquées à comparer. L'utilisation du radiomarquage ne nécessite pas de matériel spécifique, puisque la révélation des intensités d'hybridation s'effectue à l'aide d'un simple PhosphorImager. En revanche, cela implique d'hybrider successivement les différentes populations d'ADNc, puisque chacune est marquée de la même manière avec du [α-^{33}P]dCTP. Pour éviter les contaminations, il convient donc de vérifier la déshybridation totale d'une membrane avant de pouvoir la réhybrider avec une autre population d'ADNc. Pour réaliser les hybridations en duplicata, deux lots de membranes ont été utilisés.

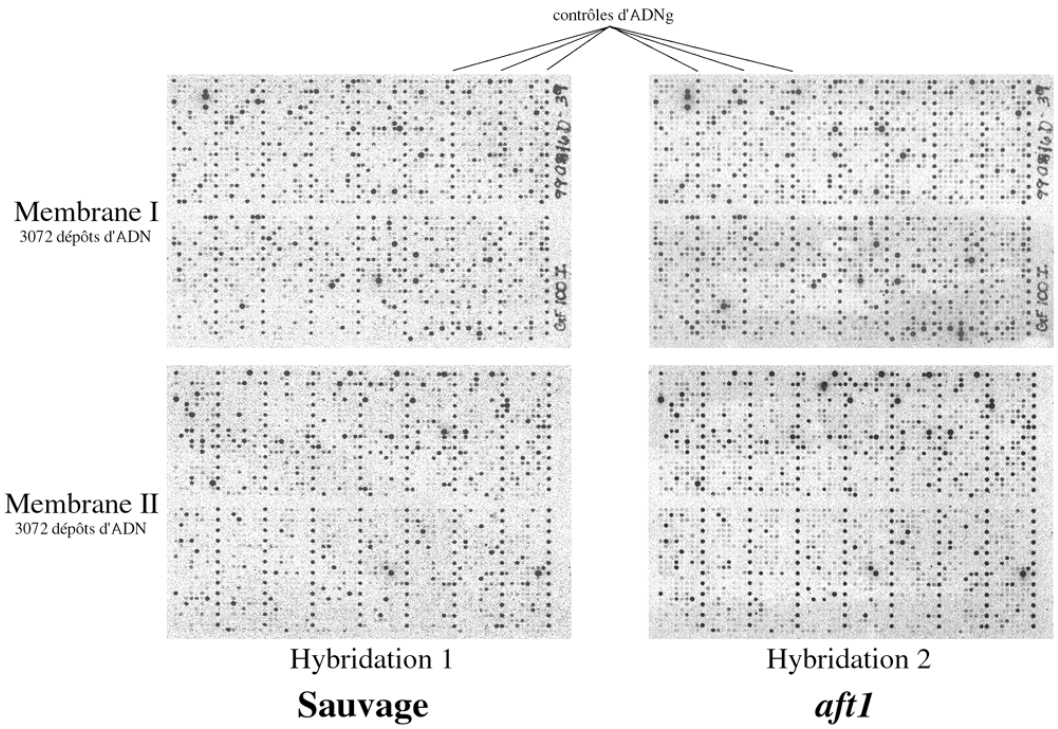

Figure 65 : Premier lot de filtres Research Genetics. Les filtres ont été hybridés avec les populations d'ADNc radiomarqués synthétisés à partir des ARNm de la souche sauvage puis de la souche *aft1*.

Obtention des ADNc radiomarqués

Une quantité de 5µg d'ARN totaux extraits des souches CM3260, Y18, CM3260*Δaft2* et Y18*Δaft2* a été rétro-transcrite. Les ARN totaux sont incubés 10 minutes à 70°C en présence de 2µg d'oligo dT, puis sont ajoutés 6µL de tampon FSB 5x, 0,1µmol de DTT, 20nmoles de dATP, dGTP, dTTP, 300 unités de reverse transcriptase (superscript II, Life Technologies) et 100µCi de [α-^{33}P]dCTP (3000 Ci mmol-1, Amersham) (volume final 30µL), avant d'incuber le mélange 2 heures à 37°C. Les ADNc ainsi marqués sont purifiés sur colonne de chromatographie (biospin P-6, Bio-Rad) selon les instructions du fournisseur.

Hybridation et détection

Les hybridations sont réalisées une à une, successivement, suivant les conseils du fournisseur (Research Genetics). Les membranes sont préhybridées durant 2 heures à 42°C

dans 5mL de solution d'hybridation (Mycrohyb) contenant 5µg de Poly-dA. Les ADNc dénaturés sont ajoutés à la solution d'hybridation et incubés à 42°C durant 20 heures. Les membranes sont ensuite lavées :

Lavage 1 et 2 : 50°C, 30mL SSC 2x, SDS 1%

Lavage 3 : 23°C, 100mL SSC 0,5x, SDS 1%

Les membranes sont ensuite exposées face à un écran phosphore durant 3 jours et la radioactivité est révélée et analysée à l'aide d'un PhosphorImager (Molecular Dynamics) et du logiciel Pathways 3 (Research Genetics). Avant de réaliser une nouvelle hybridation, les membranes sont déshybridées à l'aide de la solution de déshybridation (SDS 0,5%) portée à ébullition.

Analyse des données

Normalisation des données brutes : Les intensités d'hybridation représentent le niveau de transcrit de chacune des 6144 phases ouvertes de lecture, et comparer deux transcriptomes consiste à calculer le rapport de ces intensités pour générer des rapports d'expression. Cela nécessite une étape préliminaire de normalisation des intensités réalisée automatiquement par le logiciel d'analyse Pathways 3. Cette étape permet d'atténuer les variations expérimentales (comme par exemple la quantité réelle d'ADNc utilisée, l'efficacité du radiomarquage, le temps d'exposition...). A cet effet, des dépôts contrôle d'ADNg total de *S. cerevisiae* sont également présents sur les deux membranes (figure 65). C'est l'intensité moyenne de ces contrôles qui sert de norme : le logiciel calcule un coefficient de normalisation pour chaque hybridation en ajustant l'intensité moyenne des contrôles à une valeur identique dans chaque hybridation (2000 en l'occurrence). L'étape de normalisation des intensités est spécifique d'un lot de membranes particulier, ces lots pouvant être très différents les uns des autres. Il est d'ailleurs très fortement déconseillé par le fabricant d'effectuer des rapports d'intensités issues de différents lots de membranes.

Reproductibilité des hybridations : Pour vérifier que les rapports d'expression moyens obtenus pour une comparaison représentent une variation réelle de la quantité de transcrits mesurée entre les deux conditions, la méthode de calcul de la « séparation standard » a été utilisée (Beissbarth *et al.*, 2000). Elle consiste à vérifier, pour chaque gène, que les intensités obtenues pour la première condition de la comparaison diffèrent significativement des

intensités obtenues pour la deuxième condition de la comparaison. Un schéma explicatif est représenté figure 66. Après calcul de la moyenne et de l'écart à la moyenne des intensités dans chaque condition, on analyse l'importance de cet écart à la moyenne. Si l'écart à la moyenne des intensités de la condition 1 « chevauche » l'écart à la moyenne des intensités de la condition 2, alors les intensités de la condition 1 ne sont pas significativement différentes des intensités de la condition 2 et l'expression du gène est considérée comme identique dans ces comparaisons. La valeur du rapport d'expression moyen est alors remplacée par 1. Si l'écart à la moyenne des intensités de la condition 1 ne « chevauche » pas l'écart à la moyenne des intensités de la condition 2, alors les intensités de la condition 1 sont significativement différentes des intensités de la condition 2 et l'expression du gène est considérée comme différente dans ces comparaisons. La valeur du rapport d'expression moyen est conservée.

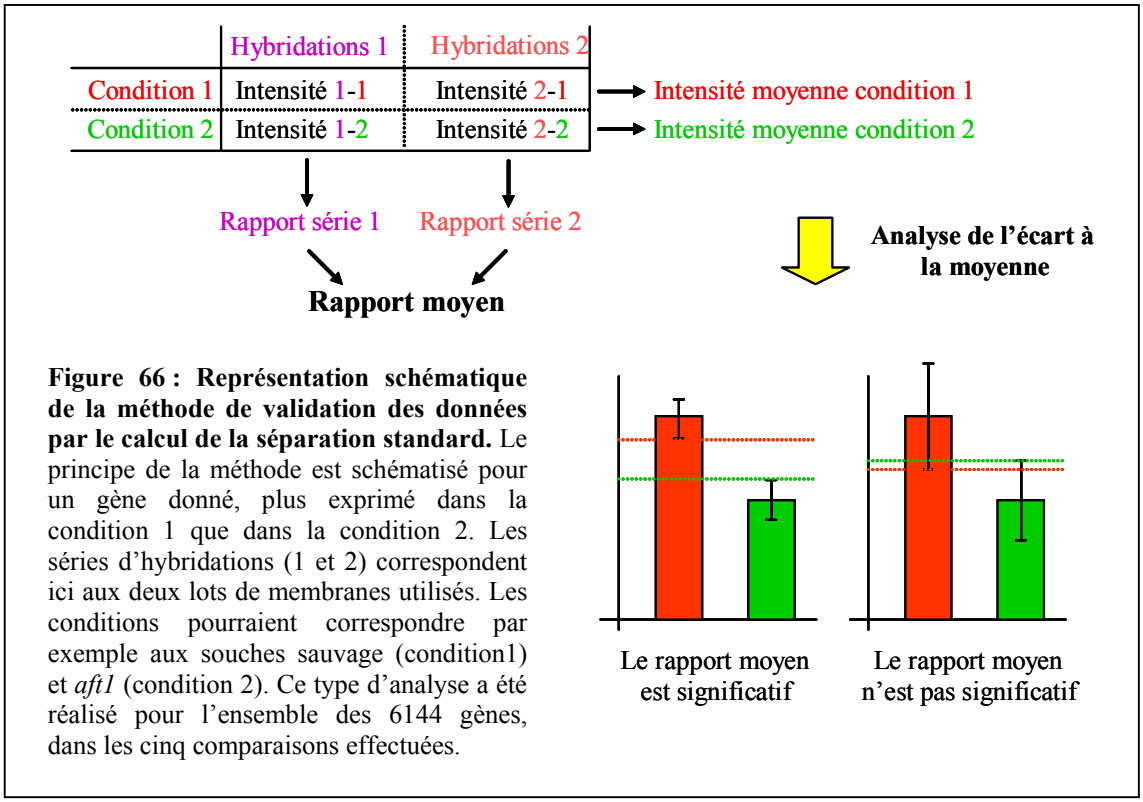

Figure 66 : Représentation schématique de la méthode de validation des données par le calcul de la séparation standard. Le principe de la méthode est schématisé pour un gène donné, plus exprimé dans la condition 1 que dans la condition 2. Les séries d'hybridations (1 et 2) correspondent ici aux deux lots de membranes utilisés. Les conditions pourraient correspondre par exemple aux souches sauvage (condition1) et *aft1* (condition 2). Ce type d'analyse a été réalisé pour l'ensemble des 6144 gènes, dans les cinq comparaisons effectuées.

Cette méthode d'analyse a été réalisée sur l'ensemble des données obtenues, ce qui permet de mettre en évidence à la fois les gènes pour lesquels il n'y a pas de variation d'expression, ainsi que les gènes pour lesquels la variation d'expression n'a pas été reproduite au cours des deux séries d'hybridation. Ceci représente 3446 gènes pour la comparaison sauvage/*aft1*, 3227 gènes pour la comparaison sauvage/aft2, 2420 gènes pour la comparaison

sauvage/*aft1aft2*, 3071 gènes pour la comparaison *aft1*/*aft1aft2* et 2902 gènes pour la comparaison *aft2*/*aft1aft2*, soit environ la moitié du génome de *S. cerevisiae*. Cette méthode de discrimination est quelque peu stringente ici, puisque les moyennes et les écarts-types ne sont calculés qu'avec deux valeurs d'intensités, ce qui maximise la possibilité de considérer l'expression d'un gène comme non significativement altérée. Cependant, la duplication des expériences ne reflète que les variations expérimentales, puisque les populations d'ARN totaux utilisées sont identiques, et il est donc primordial de privilégier une reproductibilité quasi-parfaite des expériences dans ces conditions. Il est à noter malgré tout que les ARN totaux avaient été utilisés précédemment dans des expériences de Northern blot, et que le profil d'expression de plusieurs gènes connus comme étant régulés par Aft1p avait été vérifié (Blaiseau *et al.,* 2001).

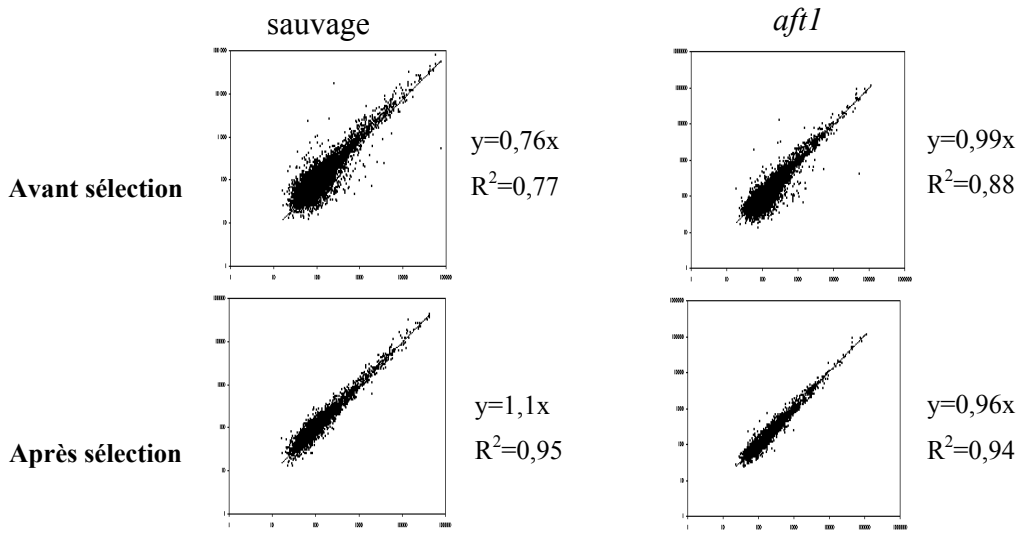

Figure 67 : Nuage de points des valeurs d'intensités pour les deux hybridations des conditions sauvage ou *aft1*. L'échelle des intensités est logarithmique. Sont indiquées les équations des régressions linéaires ainsi que le coefficient de corrélation obtenu.

Pour illustrer l'efficacité de la méthode de « séparation standard » sur les deux conditions sauvage et *aft1*, les valeurs des intensités du premier lot de membranes (hydridation 1) ont été placées sur un graphique en fonction des valeurs des intensités du deuxième lot de membranes (hybridation 2), soit dans leur totalité, soit après avoir supprimé les gènes pour lesquels il n'y a pas de variation d'expression (valeur du rapport moyen remplacée par 1, figure 67). Les régressions linéaires sont nettement meilleures après

suppression des intensités non significatives, et ce pour les quatre conditions (données non montrées pour les hybridations *aft2* et *aft1aft2*).

Sélection des gènes affectés : L'expression d'un gène a été considérée comme altérée lorsque le rapport d'expression moyen est supérieur ou égal à 2 ou inférieur ou égal à 0,5. Avec ce critère de sélection, 1864 gènes ont été sélectionnés comme ayant une altération de leur expression dans au moins une des cinq comparaisons étudiée. Cependant, un rapport d'expression moyen égal à 2 par exemple, n'a pas la même signification selon qu'il a été calculé avec des valeurs d'intensités de 0,2 et 0,1, ou avec des valeurs d'intensités de 2000 et 1000. Il a donc fallu s'interroger sur la pertinence des valeurs des rapports sélectionnés, autrement dit, comparer le niveau d'expression (soit les valeurs d'intensités) des 1864 gènes sélectionnés avec la valeur du bruit de fond obtenu pour chaque hybridation.

La valeur de bruit de fond est donnée par le logiciel d'analyse sous sa forme brute, c'est-à-dire non normalisée. Elle correspond à l'intensité mesurée au centre de la membrane. De plus, pour chaque hybridation, il y a deux valeurs de bruit de fond (une valeur pour chaque membrane) ce qui implique de traiter deux sous-ensembles de gènes à chaque fois. Dans un premier temps, il a fallu normaliser le bruit de fond, en multipliant les valeurs brutes par le coefficient de normalisation utilisé par le logiciel lors de l'étape de normalisation des intensités. En ce qui concerne les hybridations avec la souche mutante *aft2*, les valeurs de bruit de fond n'ont pu être récupérées. Puisque cette souche ne possède pas le gène *AFT2*, il a été considéré que la valeur d'intensité normalisée obtenue pour le gène *AFT2* était identique à la valeur de bruit de fond.

Le niveau d'expression d'un gène a été considéré comme pertinent lorsque les deux valeurs d'intensités d'une des deux conditions de la comparaison sont supérieures à 1,5 fois le bruit de fond (définie comme valeur seuil). Si ces conditions ne sont pas remplies, le rapport d'expression moyen est considéré comme étant non pertinent, et est remplacé par 1. Le résumé de l'obtention des valeurs seuil est présenté dans le tableau 17. Il est à noter que les valeurs seuil obtenues pour les hybridations avec la souche mutante *aft2* sont du même ordre de grandeur que les valeurs seuil des autres hybridations, ce qui laisse penser que l'utilisation par défaut du signal *AFT2* comme valeur de bruit de fond dans la condition *aft2* était un choix judicieux. Avec ce critère de sélection, 375 gènes ont pu être éliminés parce n'étant pas suffisamment exprimés dans les cinq comparaisons, ce qui revient à dire que les valeurs des rapports de ces 454 gènes (pourtant supérieures ou égales à 2 ou inférieures ou égales à 0,5) ne sont pas différentes du bruit de fond des expériences.

Tableau 15 : Valeurs numériques des bruits de fond de chaque expérience et calcul des valeurs seuil. Pour chaque hybridation, une valeur de bruit de fond est donnée pour chaque membrane d'un lot (MI et MII). nd, non déterminé.

Condition	Hybridation		Bruit de fond	Coefficient de normalisation	Bruit de fond normalisé	Valeur seuil
sauvage	**1**	**M I**	5,37	8,7	46,7	**70**
		M II	5,61	6,9	38,5	**57,8**
	2	**M I**	5,04	6,7	33,8	**50,7**
		M II	3,10	6,6	20,4	**30,6**
aft1	**1**	**M I**	8,21	7,6	62,4	**93,6**
		M II	8,94	6,2	55,9	**83,9**
	2	**M I**	3,53	7,6	26,7	**40**
		M II	2,98	7,3	21,8	**32,7**
aft2	**1**	**M I**	nd	nd	55,3	**83**
		M II	nd	nd	55,3	**83**
	2	**M I**	nd	nd	55,8	**83,7**
		M II	nd	nd	55,8	**83,7**
aft1aft2	**1**	**M I**	3,89	23,8	92,7	**139**
		M II	3,86	17,3	67	**100,5**
	2	**M I**	2,92	23	67,3	**101**
		M II	2,62	19	50	**75**

Le dernière étape de l'analyse a consisté à associer les noms de phase ouverte de lecture des 1410 gènes sélectionnés (1864 - 454) à leur nom de gène à trois lettres et à leur fonction, en utilisant la base de données SGD (Saccharomyces Genome Database, www.yeastgenome.org/). Il s'est avéré que cinq de ces gènes avaient été supprimés des bases de données, suite à la correction des séquences. Au final, nous avons donc sélectionné 1405 gènes dont l'expression varie de manière pertinente dans au moins une des cinq comparaisons.

Immunoprécipitation de la chromatine

Préparation de la chromatine et immunoprécipitation

La chromatine des levures a été préparée à partir de 100mL de culture en phase exponentielle de croissance, selon le protocole suivant (Kuras et Struhl, 1999) : les cellules sont traitées avec 1% de formaldéhyde pendant 20 minutes à température ambiante (la solution mère contient le formaldéhyde 11%, HEPES-KOH 50mM pH7,5, EDTA 1mM) pour « crosslinker » les protéines à l'ADN, puis la réaction est stoppée en ajoutant 330mM de

glycine pendant 5 minutes. Les cellules sont centrifugées dans des tubes falcon de 50mL, lavées 2 fois avec 120mL de TBS froid (Tris-HCl 20mM pH7,5, NaCl 150mM) et une fois avec 5mL de tampon de lyse (HEPES-KOH 50mM pH7,5, EDTA 1mM, NaCl 150mM, sodium déoxycholate 0,5%, SDS 0,1%, inhibiteurs de protéases). Les cellules sont reprises dans 1mL de tampon de lyse et réparties dans deux tubes ependorf de 2mL. Un volume de 400µL de billes est alors ajouté dans chaque tube et les cellules sont lysées en vortexant 15 fois 1 minute avec des intervalles de 1 minute dans la glace. Le lysat est ensuite séparé des billes par filtration (un trou à l'aiguille est effectué au bas du tube ependorf, celui-ci est placé dans un tube à hémolyse, et le tout est centrifugé 2 minutes à 2000g. Sous la force centrifuge, le lysat « tombe » dans le tube à hémolyse, et les billes restent dans le tube ependorf). La chromatine « crosslinkée » est transférée dans un seul tube ependorf de 2 mL et centrifugée à 15000g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 750µL de tampon de lyse et la solution obtenue incubée 1 heure à 4°C sur roue. Elle est à nouveau centrifugée à 15000g pendant 30 minutes à 4°C, et reprise dans 1mL de tampon de lyse. L'étape de sonication (9 fois 20 secondes à 20kHz, avec des intervalles de 1 minutes dans la glace) permet alors de solubiliser la chromatine en fragmentant l'ADN en morceaux de taille comprise entre 100pb et 800pb. Après sonication, le volume est ajusté à 2mL avec du tampon de lyse, l'extrait est centrifugé à 15000g pendant 30 minutes à 4°C, et le surnageant contenant la solution chromatinienne est récupéré. Le volume de chromatine obtenue est alors ajusté à 4mL de tampon de lyse et stocké à -80°C.

Les immunoprécipitations sont réalisées en duplicata. 500µL de solution chromatinienne sont incubés pendant 1h30 à température ambiante sur une roue avec 8µg d'anticorps anti-HA (Santa Cruz) liés de façon non covalente à 10mg de protéine A-Sépharose CL-4B (sigma). De la protéine A-Sépharose CL-4B sans anticorps est utilisée comme témoin de bruit de fond. Les billes sont ensuite lavées 4 fois pendant 20 minutes avec 1,6mL de :

Lavage 1 et 2 : HEPES-KOH 50mM pH7,5, EDTA 1mM, sodium déoxycholate 0,5%, SDS 0,1%, NaCl 500mM.

Lavage 3 : Tris-HCl 10mM pH8, LiCl 0,25mM, EDTA 1mM, NP-40 0,5%, sodium déoxycholate 0,5%.

Lavage 4 : TE (Tris-HCl 100mM pH7,5, EDTA 10mM pH8).

L'élution des complexes chromatiniens retenus par les anticorps s'effectue à 65°C pendant 15 minutes dans 500µL de Tris-HCl 25mM pH7,5, EDTA 10mM, SDS 0,5%.

L'ADN contenu dans les fractions immunoprécipitées ou dans 50µL d'extrait chromatinien brut (témoin ADN total) est ensuite séparé des protéines par une incubation avec 600µg de protéinase K (Sigma) pendant 1 heure à 37°C puis 18 heures à 65°C, et il est enfin purifié à l'aide du kit de purification d'ADN Quiaquick (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN issu des immunoprécipitations (avec ou sans anticorps) est repris dans 30µL de TE, l'ADN issu de la chromatine non immunoprécipitée est repris dans 50µL de TE.

Analyse par PCR quantitative

Les PCR quantitatives ont été réalisées en duplicata, comme décrit plus haut (RT-PCR quantitative). Contrairement à l'analyse par RT-PCR quantitative, les CP obtenus n'ont pas été « convertis » en quantité d'ADN selon une gamme standard. Les CP de 5 dilutions successives de l'ADN total (de concentration inconnue) ont été utilisés pour générer la droite CP=log(dilution) dont la pente permet de calculer l'efficacité (E) du couple d'oligonucléotides utilisés ($E = 10^{-1/\text{pente de la droite}}$). L'occupation de la protéine d'intérêt sur un fragment d'ADN testé a ensuite été calculée comme décrit précédemment (Cobb *et al.*, 2003) :

Occupation = $(E^{(\text{CP total - CP immunoprécipité})}) / (E^{(\text{CP total - CP bruit de fond})})$.

La moyenne des résultats obtenus a été effectuée sur les deux immunoprécipitations. L'enrichissement de la protéine d'intérêt sur un promoteur donné a été calculé en divisant la valeur d'occupation de la protéine sur ce promoteur par la moyenne des valeurs d'occupation de cette protéine sur les séquences codantes de *POL1* et *RPO21* (contrôles négatifs).

Manipulations des protéines chez *S. cerevisiae*

Extractions protéiques

Les protéines sont extraites et précipitées à froid à partir de 5mL de culture en phase exponentielle par addition de NaOH 185mM / β-mercaptoéthanol 0,1% pendant 10 minutes,

puis d'acide trichloroacétique (TCA) 5%. Après centrifugation de 5 minutes à 5000g, le précipité de protéines est repris dans 50µL d'une solution Laemmli/Tris-base (Volland *et al.*, 1992).

Gels SDS-PAGE

Les protéines sont séparées sur gel de polyacrylamide SDS 8%, durant 1 heure à 100V, selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970) et avec le système Bio-Rad Mini Protean. Le tampon de migration est constitué de Tris-HCl 50mM, glycine 380mM, SDS 0,1%. 5µL d'extraits protéiques obtenus chez *S. cerevisiae* sont déposés par puits. Les protéines sont révélées par coloration au Bleu de Coomassie.

Immunoempreinte

Après électrophorèse, les protéines du gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose 0,45µM par transfert actif (1h15 à 150V) dans du tampon Tris-HCl 50mM, glycine 380mM, éthanol 17,5%, SDS 0,02%. La vérification du transfert s'effectue par coloration de la membrane au Rouge Ponceau.

Les membranes sont saturées avec une solution de TBS-T/BSA (Tris-HCl 20mM pH7,5, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%, BSA 3%(w/v)). Les anticorps primaires et secondaires sont incubés chacun durant 1 heure à température ambiante dans la solution bloquante, et la membrane est lavée 3 fois dans du TBS après chaque incubation.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

Anticorps monoclonal anti-HA (Santa Cruz) : dilution 1/1000^{e}

Anticorps monoclonal anti-Pgk1 (Roche) : dilution 1/5000^{e}

L'anticorps secondaire utilisé pour révéler les protéines d'intérêt (IgG anti-souris, dilution 1/1000^{e}, Sigma) est couplé à la peroxydase de raifort (HRP). La révélation se fait en présence de peracide, de luminol et de catalyseurs tels que le phénol. Le peracide oxyde la HRP et celle-ci, à son tour, va oxyder le luminol. Ce dernier se trouve alors dans un état excité et le retour à l'état initial s'accompagne d'une émission de lumière. La révélation se fait donc par application d'une pellicule photo sur la membrane.

BIBLIOGRAPHIE

Abboud, S. et Haile, D.J. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.* **275**, 19906-19912.

Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W.G., Naylor, S., Benson, L.M.*, et al.* (2000) Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 549-562.

Althaus, E.W., Outten, C.E., Olson, K.E., Cao, H. et O'Halloran, T.V. (1999) The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**, 6559-6569.

Alves, R., Herrero, E. et Sorribas, A. (2004) Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism: I. The role of the protein pair ferredoxin-ferredoxin reductase (Yah1-Arh1). *Proteins* **56**, 354-366.

Amillet, J.M., Galiazzo, F. et Labbe-Bois, R. (1996) Effect of heme and vacuole deficiency on *FRE1* gene expression and ferrireductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**, 25-29.

An, Z., Mei, B., Yuan, W.M. et Leong, S.A. (1997a) The distal GATA sequences of the sid1 promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with Urbs1, a GATA family transcription factor. *Embo J.* **16**, 1742-1750.

An, Z., Zhao, Q., McEvoy, J., Yuan, W.M., Markley, J.L.*, et al.* (1997b) The second finger of Urbs1 is required for iron-mediated repression of sid1 in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5882-5887.

Anderson, G.J., Lesuisse, E., Dancis, A., Roman, D.G., Labbe, P.*, et al.* (1992) Ferric iron reduction and iron assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inorg. Biochem.* **47**, 249-255.

Andrews, S.C., Le Brun, N.E., Barynin, V., Thomson, A.J., Moore, G.R.*, et al.* (1995) Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme-free variants. *J. Biol. Chem.* **270**, 23268-23274.

Andrews, S.C., Robinson, A.K. et Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215-237.

Archibald, F. (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiology Letters* **19**, 29-32.

Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P.S., Li, L.*, et al.* (1994) The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**, 403-410.

Askwith, C.C. et Kaplan, J. (1998) Site-directed mutagenesis of the yeast multicopper oxidase Fet3p. *J. Biol. Chem.* **273**, 22415-22419.

Auclair, K., Huang, H.W., Moenne-Loccoz, P. et Ortiz de Montellano, P.R. (2003) Cloning and expression of a heme binding protein from the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* **28**, 340-349.

Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S.*, et al.* (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**, 1709-1712.

Bagg, A. et Neilands, J.B. (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**, 5471-5477.

Balk, J., Pierik, A.J., Netz, D.J., Muhlenhoff, U. et Lill, R. (2004) The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *Embo J.* **23**, 2105-2115.

Balk, J., Pierik, A.J., Aguilar Netz, D.J., Muhlenhoff, U. et Lill, R. (2005) Nar1p, a conserved eukaryotic protein with similarity to Fe-only hydrogenases, functions in cytosolic iron-sulphur protein biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 86-89.

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

Beinert, H. et Kiley, P. (1996) Redox control of gene expression involving iron-sulfur proteins. Change of oxidation-state or assembly/disassembly of Fe-S clusters? *FEBS Lett.* **382**, 218-221.

Beinert, H., Holm, R.H. et Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653-659.

Beissbarth, T., Fellenberg, K., Brors, B., Arribas-Prat, R., Boer, J.*, et al.* (2000) Processing and quality control of DNA array hybridization data. *Bioinformatics* **16**, 1014-1022.

Belli, G., Molina, M.M., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J.E. et Herrero, E. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J. Biol. Chem.* **279**, 12386-12395.

Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P.*, et al.* (2002) Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8695-8700.

Bird, A., Evans-Galea, M.V., Blankman, E., Zhao, H., Luo, H.*, et al.* (2000) Mapping the DNA binding domain of the Zap1 zinc-responsive transcriptional activator. *J. Biol. Chem.* **275**, 16160-16166.

Birnboim, H.C. et Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Blaiseau, P.L., Lesuisse, E. et Camadro, J.M. (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 34221-34226.

Bode, H.P., Dumschat, M., Garotti, S. et Fuhrmann, G.F. (1995) Iron sequestration by the yeast vacuole. A study with vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **228**, 337-342.

Bossier, P., Fernandes, L., Rocha, D. et Rodrigues-Pousada, C. (1993) Overexpression of *YAP2,* coding for a new yAP protein, and *YAP1* in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline. *J. Biol. Chem.* **268**, 23640-23645.

Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H. et Jacquet, M. (1998) Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180**, 1044-1052.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Braun, V. et Killmann, H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 104-109.

Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. et Helmann, J.D. (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.* **29**, 189-198.

Butler, G. et Thiele, D.J. (1991) *ACE2*, an activator of yeast metallothionein expression which is homologous to *SWI5*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 476-485.

Camadro, J.M. et Labbe, P. (1982) Kinetic studies of ferrochelatase in yeast. Zinc or iron as competing substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* **707**, 280-288.

Carmen, A.A., Milne, L. et Grunstein, M. (2002) Acetylation of the yeast histone H4 N-terminus regulates its binding to heterochromatin protein SIR3. *J. Biol. Chem.* **277**, 4778-4781.

Casas, C., Aldea, M., Espinet, C., Gallego, C., Gil, R.*, et al.* (1997) The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 621-637.

Casey, J.L., Hentze, M.W., Koeller, D.M., Caughman, S.W., Rouault, T.A., *et al.* (1988) Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* **240**, 924-928.

Cavadini, P., O'Neill, H.A., Benada, O. et Isaya, G. (2002) Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 217-227.

Chen, O.S. et Kaplan, J. (2000) *CCC1* suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *J. Biol. Chem.* **275**, 7626-7632.

Chen, O.S., Crisp, R.J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D.R., *et al.* (2004) Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 29513-29518.

Chen, X.Z., Peng, J.B., Cohen, A., Nelson, H., Nelson, N., *et al.* (1999) Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J. Biol. Chem.* **274**, 35089-35094.

Chloupkova, M., LeBard, L.S. et Koeller, D.M. (2003) *MDL1* is a high copy suppressor of *ATM1*: evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J. Mol. Biol.* **331**, 155-165.

Cobb, J.A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C. et Gasser, S.M. (2003) DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *Embo J.* **22**, 4325-4336.

Cohen, B.A., Pilpel, Y., Mitra, R.D. et Church, G.M. (2002) Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 1608-1614.

Colangelo, E.P. et Guerinot, M.L. (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**, 3400-3412.

Conklin, D.S., McMaster, J.A., Culbertson, M.R. et Kung, C. (1992) *COT1*, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3678-3688.

Connolly, E.L., Fett, J.P. et Guerinot, M.L. (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**, 1347-1357.

Crisp, R.J., Pollington, A., Galea, C., Jaron, S., Yamaguchi-Iwai, Y., *et al.* (2003) Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. *J. Biol. Chem.* **278**, 45499-45506.

Crosa, J.H. et Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223-249.

Culotta, V.C., Joh, H.D., Lin, S.J., Slekar, K.H. et Strain, J. (1995) A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J. Biol. Chem.* **270**, 29991-29997.

Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., *et al.* (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **272**, 23469-23472.

Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F., *et al.* (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**, 346-349.

Dancis, A., Klausner, R.D., Hinnebusch, A.G. et Barriocanal, J.G. (1990) Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2294-2301.

Dancis, A., Roman, D.G., Anderson, G.J., Hinnebusch, A.G. et Klausner, R.D. (1992) Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3869-3873.

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

Daum, G., Lees, N.D., Bard, M. et Dickson, R. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1471-1510.

Davis-Kaplan, S.R., Askwith, C.C., Bengtzen, A.C., Radisky, D. et Kaplan, J. (1998) Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13641-13645.

Davis-Kaplan, S.R., Ward, D.M., Shiflett, S.L. et Kaplan, J. (2004) Genome-wide analysis of iron-dependent growth reveals a novel yeast gene required for vacuolar acidification. *J. Biol. Chem.* **279**, 4322-4329.

De Freitas, J.M., Liba, A., Meneghini, R., Valentine, J.S. et Gralla, E.B. (2000) Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J. Biol. Chem.* **275**, 11645-11649.

de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. et Neilands, J.B. (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J. Bacteriol.* **169**, 2624-2630.

de Silva, D., Davis-Kaplan, S., Fergestad, J. et Kaplan, J. (1997) Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **272**, 14208-14213.

De Silva, D.M., Askwith, C.C., Eide, D. et Kaplan, J. (1995) The *FET3* gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J. Biol. Chem.* **270**, 1098-1101.

Delaveau, T., Delahodde, A., Carvajal, E., Subik, J. et Jacq, C. (1994) *PDR3*, a new yeast regulatory gene, is homologous to *PDR1* and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 501-511.

DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P.*, et al.* (2000) Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett.* **470**, 156-160.

DeRisi, J.L., Iyer, V.R. et Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686.

di Patti, M.C., Pascarella, S., Catalucci, D. et Calabrese, L. (1999) Homology modeling of the multicopper oxidase Fet3 gives new insights in the mechanism of iron transport in yeast. *Protein Eng.* **12**, 895-897.

Dix, D., Bridgham, J., Broderius, M. et Eide, D. (1997) Characterization of the *FET4* protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *J. Biol. Chem.* **272**, 11770-11777.

Dix, D.R., Bridgham, J.T., Broderius, M.A., Byersdorfer, C.A. et Eide, D.J. (1994) The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26092-26099.

Dohrmann, P.R., Butler, G., Tamai, K., Dorland, S., Greene, J.R.*, et al.* (1992) Parallel pathways of gene regulation: homologous regulators SWI5 and ACE2 differentially control transcription of HO and chitinase. *Genes Dev.* **6**, 93-104.

Dohrmann, P.R., Voth, W.P. et Stillman, D.J. (1996) Role of negative regulation in promoter specificity of the homologous transcriptional activators Ace2p and Swi5p. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1746-1758.

Doolin, M.T., Johnson, A.L., Johnston, L.H. et Butler, G. (2001) Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol. Microbiol.* **40**, 422-432.

Dutkiewicz, R., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E.A.*, et al.* (2003) Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J. Biol. Chem.* **278**, 29719-29727.

Eide, D.J., Bridgham, J.T., Zhao, Z. et Mattoon, J.R. (1993) The vacuolar H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **241**, 447-456.

Eisenstein, R.S. et Ross, K.L. (2003) Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *J. Nutr.* **133**, 1510S-1516S.

Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R. et Morelli, L. (2000) Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 695-703.

Emerson, L.R., Nau, M.E., Martin, R.K., Kyle, D.E., Vahey, M.*, et al.* (2002) Relationship between chloroquine toxicity and iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 787-796.

Escolar, L., de Lorenzo, V. et Perez-Martin, J. (1997) Metalloregulation in vitro of the aerobactin promoter of *Escherichia coli* by the Fur (ferric uptake regulation) protein. *Mol. Microbiol.* **26**, 799-808.

Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J.C., Lombardia, L., Soularue, P.*, et al.* (2002) Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol. Cell.* **9**, 713-723.

Felice, M.R., De Domenico, I., Li, L., Ward, D.M., Bartok, B.*, et al.* (2005) Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. *J. Biol. Chem.* **280**, 22181-22190.

Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. et Struhl, K. (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6982-6993.

Finegold, A.A., Shatwell, K.P., Segal, A.W., Klausner, R.D. et Dancis, A. (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 31021-31024.

Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L.*, et al.* (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531-1545.

Foury, F. et Talibi, D. (2001) Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J. Biol. Chem.* **276**, 7762-7768.

Foury, F. et Roganti, T. (2002) Deletion of the mitochondrial carrier genes *MRS3* and *MRS4* suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J. Biol. Chem.* **277**, 24475-24483.

Fragiadakis, G.S., Tzamarias, D. et Alexandraki, D. (2004) Nhp6 facilitates Aft1 binding and Ssn6 recruitment, both essential for *FRE2* transcriptional activation. *Embo J.* **23**, 333-342.

Fu, D., Beeler, T. et Dunn, T. (1994) Sequence, mapping and disruption of *CCC1*, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csg1* mutants. *Yeast* **10**, 515-521.

Fu, D., Beeler, T.J. et Dunn, T.M. (1995) Sequence, mapping and disruption of *CCC2*, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu(2+)-ATPase subfamily. *Yeast* **11**, 283-292.

Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. et Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 837-848.

Garland, S.A., Hoff, K., Vickery, L.E. et Culotta, V.C. (1999) *Saccharomyces cerevisiae ISU1* and *ISU2*: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **294**, 897-907.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B.*, et al.* (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 4241-4257.

Georgatsou, E. et Alexandraki, D. (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3065-3073.

Georgatsou, E., Mavrogiannis, L.A., Fragiadakis, G.S. et Alexandraki, D. (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* **272**, 13786-13792.

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

Gerber, J., Muhlenhoff, U. et Lill, R. (2003) An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**, 906-911.

Gerber, J., Neumann, K., Prohl, C., Muhlenhoff, U. et Lill, R. (2004) The yeast scaffold proteins Isu1p and Isu2p are required inside mitochondria for maturation of cytosolic Fe/S proteins. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4848-4857.

Gil, R., Zueco, J., Sentandreu, R. et Herrero, E. (1991) *RCS1*, a gene involved in controlling cell size in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 1-14.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B.*, et al.* (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-567.

Goffeau, A., Park, J., Paulsen, I.T., Jonniaux, J.L., Dinh, T.*, et al.* (1997) Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* **13**, 43-54.

Gourley, B.L., Parker, S.B., Jones, B.J., Zumbrennen, K.B. et Leibold, E.A. (2003) Cytosolic aconitase and ferritin are regulated by iron in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **278**, 3227-3234.

Graf, E. et Eaton, J.W. (1984) Effects of phytate on mineral bioavailability in mice. *J. Nutr.* **114**, 1192-1198.

Graham, L.A., Flannery, A.R. et Stevens, T.H. (2003) Structure and assembly of the yeast V-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 301-312.

Greene, J.R., Brown, N.H., DiDomenico, B.J., Kaplan, J. et Eide, D.J. (1993) The *GEF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol. Gen. Genet.* **241**, 542-553.

Gruenheid, S., Canonne-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackam, D.J., Grinstein, S.*, et al.* (1999) The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J. Exp. Med.* **189**, 831-841.

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F.*, et al.* (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482-488.

Guo, B., Phillips, J.D., Yu, Y. et Leibold, E.A. (1995) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **270**, 21645-21651.

Haas, H., Zadra, I., Stoffler, G. et Angermayr, K. (1999) The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. *J. Biol. Chem.* **274**, 4613-4619.

Halliwell, B. et Gutteridge, J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14.

Hanson, E.S., Foot, L.M. et Leibold, E.A. (1999) Hypoxia post-translationally activates iron-regulatory protein 2. *J. Biol. Chem.* **274**, 5047-5052.

Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172-177.

Harbison, C.T., Gordon, D.B., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D.*, et al.* (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**, 99-104.

Harris, Z.L., Durley, A.P., Man, T.K. et Gitlin, J.D. (1999) Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10812-10817.

Harrison, K.A. et Marzluf, G.A. (2002) Characterization of DNA binding and the cysteine rich region of SRE, a GATA factor in *Neurospora crassa* involved in siderophore synthesis. *Biochemistry* **41**, 15288-15295.

Hassett, R. et Kosman, D.J. (1995) Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 128-134.

Hassett, R., Romeo, A.M. et Kosman, D.J. (1998a) Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Role of dioxygen and Fe. *J. Biol. Chem.* **273**, 7628-7636.

Hassett, R., Yuan, D.S. et Kosman, D.J. (1998b) Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. *J. Biol. Chem.* **273**, 23274-23282.

Hassett, R., Dix, D.R., Eide, D.J. et Kosman, D.J. (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.

Haurie, V., Boucherie, H. et Sagliocco, F. (2003) The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 45391-45396.

Hausmann, A., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Pierik, A.J., Muhlenhoff, U*., et al.* (2005) The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3266-3271.

Hentze, M.W., Rouault, T.A., Caughman, S.W., Dancis, A., Harford, J.B*., et al.* (1987) A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6730-6734.

Hentze, M.W. et Kuhn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8175-8182.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. et Andrews, N.C. (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285-297.

Heymann, P., Ernst, J.F. et Winkelmann, G. (1999) Identification of a fungal triacetylfusarinine C siderophore transport gene (*TAF1*) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily. *Biometals* **12**, 301-306.

Heymann, P., Ernst, J.F. et Winkelmann, G. (2000a) A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* **13**, 65-72.

Heymann, P., Ernst, J.F. et Winkelmann, G. (2000b) Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 221-227.

Hoffman, C.S. et Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.

Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J*., et al.* (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**, 717-728.

Huber, C. et Wachtershauser, G. (1997) Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe,Ni)S under primordial conditions. *Science* **276**, 245-247.

Huber, C. et Wachtershauser, G. (1998) Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: implications for the origin of life. *Science* **281**, 670-672.

Hubert, N. et Hentze, M.W. (2002) Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12345-12350.

Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., *et al.* (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691.

Jensen, L.T. et Winge, D.R. (1998) Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **17**, 5400-5408.

Jensen, L.T. et Culotta, V.C. (2000) Role of *Saccharomyces cerevisiae ISA1* and *ISA2* in iron homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3918-3927.

Jensen, L.T. et Culotta, V.C. (2002) Regulation of S*accharomyces cerevisiae FET4* by oxygen and iron. *J. Mol. Biol.* **318**, 251-260.

Kaffman, A., Rank, N.M. et O'Shea, E.K. (1998) Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.* **12**, 2673-2683.

Kammler, M., Schon, C. et Hantke, K. (1993) Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 6212-6219.

Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D. et Goldberg, A.L. (2004) Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol. Cell.* **13**, 771-781.

Kang, D.K., Jeong, J., Drake, S.K., Wehr, N.B., Rouault, T.A., *et al.* (2003) Iron regulatory protein 2 as iron sensor. Iron-dependent oxidative modification of cysteine. *J. Biol. Chem.* **278**, 14857-14864.

Kassir, Y., Adir, N., Boger-Nadjar, E., Raviv, N.G., Rubin-Bejerano, I., *et al.* (2003) Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int. Rev. Cytol.* **224**, 111-171.

Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G. et Lill, R. (2000) Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J. Biol. Chem.* **275**, 15955-15961.

Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B. et Lander, E.S. (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* **423**, 241-254.

Kellis, M., Birren, B.W. et Lander, E.S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617-624.

Keyer, K. et Imlay, J.A. (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13635-13640.

Kim, Y., Yun, C.W. et Philpott, C.C. (2002) Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **21**, 3632-3642.

Kim, Y., Lampert, S.M. et Philpott, C.C. (2005) A receptor domain controls the intracellular sorting of the ferrichrome transporter, ARN1. *Embo J.* **24**, 952-962.

Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. et Lill, R. (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.* **418**, 346-350.

Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. et Lill, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J.* **18**, 3981-3989.

Knight, S.A., Sepuri, N.B., Pain, D. et Dancis, A. (1998) Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **273**, 18389-18393.

Kovacech, B., Nasmyth, K. et Schuster, T. (1996) *EGT2* gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3264-3274.

Kuge, S., Jones, N. et Nomoto, A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J.* **16**, 1710-1720.

Kuo, M.H. et Allis, C.D. (1999) *In vivo* cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* **19**, 425-433.

Kuras, L. et Struhl, K. (1999) Binding of TBP to promoters *in vivo* is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* **399**, 609-613.

Kuras, L. (2004) Characterization of protein-DNA association *in vivo* by chromatin immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.* **284**, 147-162.

Kurtzman, C.P. et Robnett, C.J. (2003) Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces complex*' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* **3**, 417-432.

Kwast, K.E., Burke, P.V. et Poyton, R.O. (1998) Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.* **201**, 1177-1195.

Labbe-Bois, R. (1990) The ferrochelatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Sequence, disruption, and expression of its structural gene *HEM15*. *J. Biol. Chem.* **265**, 7278-7283.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lan, C.Y., Rodarte, G., Murillo, L.A., Jones, T., Davis, R.W.*, et al.* (2004) Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **53**, 1451-1469.

Lange, H., Kaut, A., Kispal, G. et Lill, R. (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1050-1055.

Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G.*, et al.* (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* **2**, 715-720.

Lapinskas, P.J., Lin, S.J. et Culotta, V.C. (1996) The role of the *Saccharomyces cerevisiae CCC1* gene in the homeostasis of manganese ions. *Mol. Microbiol.* **21**, 519-528.

Lascaris, R.F., Mager, W.H. et Planta, R.J. (1999) DNA-binding requirements of the yeast protein Rap1p as selected in silico from ribosomal protein gene promoter sequences. *Bioinformatics* **15**, 267-277.

Laser, H., Bongards, C., Schuller, J., Heck, S., Johnsson, N.*, et al.* (2000) A new screen for protein interactions reveals that the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins Nhp6A/B are involved in the regulation of the *GAL1* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13732-13737.

Lee, G.R., Nacht, S., Lukens, J.N. et Cartwright, G.E. (1968) Iron metabolism in copper-deficient swine. *J. Clin. Invest.* **47**, 2058-2069.

Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z.*, et al.* (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**, 799-804.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. et Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.

Lesuisse, E. et Labbe, P. (1989) Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 257-263.

Lesuisse, E., Casteras-Simon, M. et Labbe, P. (1996) Evidence for the *Saccharomyces cerevisiae* ferrireductase system being a multicomponent electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **271**, 13578-13583.

Lesuisse, E., Casteras-Simon, M. et Labbe, P. (1997) Cytochrome P-450 reductase is responsible for the ferrireductase activity associated with isolated plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 147-152.

Lesuisse, E., Simon-Casteras, M. et Labbe, P. (1998) Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the *SIT1* gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology* **144**, 3455-3462.

Lesuisse, E., Blaiseau, P.L., Dancis, A. et Camadro, J.M. (2001) Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **147**, 289-298.

Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B.F., Knight, S.A., Camadro, J.M., *et al.* (2003) Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum. Mol. Genet.* **12**, 879-889.

Lesuisse, E., Knight, S.A., Courel, M., Santos, R., Camadro, J.M., *et al.* (2005) Genome-wide screen for genes with effects on distinct iron uptake activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **169**, 107-122.

Li, J., Kogan, M., Knight, S.A., Pain, D. et Dancis, A. (1999) Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J. Biol. Chem.* **274**, 33025-33034.

Li, J., Saxena, S., Pain, D. et Dancis, A. (2001a) Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **276**, 1503-1509.

Li, L., Chen, O.S., McVey Ward, D. et Kaplan, J. (2001b) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 29515-29519.

Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczypka, M., Thiele, D.J., *et al.* (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 42-47.

Lieb, J.D., Liu, X., Botstein, D. et Brown, P.O. (2001) Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat. Genet.* **28**, 327-334.

Lin, S.J., Pufahl, R.A., Dancis, A., O'Halloran, T.V. et Culotta, V.C. (1997) A role for the *Saccharomyces cerevisiae ATX1* gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* **272**, 9215-9220.

Lin, S.J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., *et al.* (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* **418**, 344-348.

Ling, H.Q., Pich, A., Scholz, G. et Ganal, M.W. (1996) Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 87-92.

Ling, H.Q., Bauer, P., Bereczky, Z., Keller, B. et Ganal, M. (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13938-13943.

Liu, X.F., Supek, F., Nelson, N. et Culotta, V.C. (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae BSD2* gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 11763-11769.

Liu, X.F. et Culotta, V.C. (1999) Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Smf1p, a member of the Nramp family of metal transporters. *J. Mol. Biol.* **289**, 885-891.

Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., *et al.* (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-961.

Loper, J.E. et Henkels, M.D. (1999) Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to Pseudomonas putida in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5357-5363.

Lovley, D.R., Baedecker, M.J., Lonergan, D.J., Cozzarelli, I.M., Phillips, E.J.P., *et al.* (1989) Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* **339**, 297-299.

Lucau-Danila, A., Delaveau, T., Lelandais, G., Devaux, F. et Jacq, C. (2003) Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon. *J. Biol. Chem.* **278**, 52641-52650.

Lyons, P. (2003) Advances in spotted microarray resources for expression profiling. *Brief. Funct. Genomic Proteomic* **2**, 21-30.

Lyons, T.J., Gasch, A.P., Gaither, L.A., Botstein, D., Brown, P.O., *et al.* (2000) Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7957-7962.

Lyons, T.J., Villa, N.Y., Regalla, L.M., Kupchak, B.R., Vagstad, A., *et al.* (2004) Metalloregulation of yeast membrane steroid receptor homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5506-5511.

MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A. et Eide, D.J. (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **19**, 2845-2855.

MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A. et Eide, D.J. (2003) Induction of the *ZRC1* metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *J. Biol. Chem.* **278**, 15065-15072.

Mamnun, Y.M., Pandjaitan, R., Mahe, Y., Delahodde, A. et Kuchler, K. (2002) The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **46**, 1429-1440.

Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., *et al.* (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J.* **15**, 2227-2235.

Martins, L.J., Jensen, L.T., Simon, J.R., Keller, G.L. et Winge, D.R. (1998) Metalloregulation of *FRE1* and *FRE2* homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 23716-23721.

Masse, E. et Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 4620-4625.

McBride, H.J., Yu, Y. et Stillman, D.J. (1999) Distinct regions of the Swi5 and Ace2 transcription factors are required for specific gene activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 21029-21036.

McHugh, J.P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., *et al.* (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**, 29478-29486.

McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., *et al.* (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell.* **5**, 299-309.

McKie, A.T., Latunde-Dada, G.O., Miret, S., McGregor, J.A., Anderson, G.J., *et al.* (2002) Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 722-724.

Mei, B., Budde, A.D. et Leong, S.A. (1993) sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 903-907.

Melefors, O., Goossen, B., Johansson, H.E., Stripecke, R., Gray, N.K., *et al.* (1993) Translational control of 5-aminolevulinate synthase mRNA by iron-responsive elements in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 5974-5978.

Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., *et al.* (2004) Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *Embo J.* **23**, 386-395.

Mitchell, P.J. et Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-378.

Moazed, D. (2001) Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol. Cell.* **8**, 489-498.

Moore, R.E., Kim, Y. et Philpott, C.C. (2003) The mechanism of ferrichrome transport through Arn1p and its metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5664-5669.

Muckenthaler, M., Gray, N.K. et Hentze, M.W. (1998a) IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol. Cell.* **2**, 383-388.

Muckenthaler, M., Gunkel, N., Frishman, D., Cyrklaff, A., Tomancak, P.*, et al.* (1998b) Iron-regulatory protein-1 (IRP-1) is highly conserved in two invertebrate species--characterization of IRP-1 homologues in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* **254**, 230-237.

Muhlenhoff, U. et Lill, R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1459**, 370-382.

Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G. et Lill, R. (2002) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2025-2036.

Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. et Lill, R. (2003a) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J.* **22**, 4815-4825.

Muhlenhoff, U., Stadler, J.A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T.*, et al.* (2003b) A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *J. Biol. Chem.* **278**, 40612-40620.

Muhlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J.T., Sipos, K.*, et al.* (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 36906-36915.

Naumov, G.I., Naumova, E.S., Masneuf, I., Aigle, M., Kondratieva, V.I.*, et al.* (2000) Natural polyploidization of some cultured yeast *Saccharomyces sensu stricto*: auto- and allotetraploidy. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**, 442-449.

O'Neill, E.M., Kaffman, A., Jolly, E.R. et O'Shea, E.K. (1996) Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* **271**, 209-212.

Oberegger, H., Schoeser, M., Zadra, I., Abt, B. et Haas, H. (2001) SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **41**, 1077-1089.

Ohno, S. (1970) Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, NY.

Okorokov, L.A., Kulakovskaya, T.V., Lichko, L.P. et Polorotova, E.V. (1985) H+/ion antiport as the principal mechanism of transport systems in the vacuolar membrane of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Lett.* **192**, 303-306.

Onda, M., Ota, K., Chiba, T., Sakaki, Y. et Ito, T. (2004) Analysis of gene network regulating yeast multidrug resistance by artificial activation of transcription factors: involvement of Pdr3 in salt tolerance. *Gene* **332**, 51-59.

Pantopoulos, K. et Hentze, M.W. (1998) Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10559-10563.

Pantopoulos, K. (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1012**, 1-13.

Patzer, S.I. et Hantke, K. (2000) The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 24321-24332.

Paull, T.T., Carey, M. et Johnson, R.C. (1996) Yeast HMG proteins NHP6A/B potentiate promoter-specific transcriptional activation in vivo and assembly of preinitiation complexes *in vitro*. *Genes Dev.* **10**, 2769-2781.

Pelletier, B., Beaudoin, J., Mukai, Y. et Labbe, S. (2002) Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 22950-22958.

Pelletier, B., Beaudoin, J., Philpott, C.C. et Labbe, S. (2003) Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4332-4344.

Pelzer, W., Muhlenhoff, U., Diekert, K., Siegmund, K., Kispal, G.*, et al.* (2000) Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett.* **476**, 134-139.

Perego, P. et Howell, S.B. (1997) Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**, 312-318.

Perry, H.M.J., Tipton, I.H., Schroeder, H.A. et Cook, M.J. (1962) Variability in the metal content of human organs. *J. Lab. Clin. Med.* **60**, 245-253.

Philpott, C.C., Rashford, J., Yamaguchi-Iwai, Y., Rouault, T.A., Dancis, A.*, et al.* (1998) Cell-cycle arrest and inhibition of G1 cyclin translation by iron in *AFT1-1(up)* yeast. *Embo J.* **17**, 5026-5036.

Piskur, J. et Langkjaer, R.B. (2004) Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Mol. Microbiol.* **53**, 381-389.

Portnoy, M.E., Liu, X.F. et Culotta, V.C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7893-7902.

Portnoy, M.E., Jensen, L.T. et Culotta, V.C. (2002) The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochem. J.* **362**, 119-124.

Proft, M. et Struhl, K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol. Cell.* **9**, 1307-1317.

Protchenko, O., Ferea, T., Rashford, J., Tiedeman, J., Brown, P.O.*, et al.* (2001) Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 49244-49250.

Protchenko, O. et Philpott, C.C. (2003) Regulation of intracellular heme levels by *HMX1*, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 36582-36587.

Puig, S., Askeland, E. et Thiele, D.J. (2005) Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**, 99-110.

Radisky, D.C., Snyder, W.B., Emr, S.D. et Kaplan, J. (1997) Characterization of *VPS41,* a gene required for vacuolar trafficking and high-affinity iron transport in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5662-5666.

Raguzzi, F., Lesuisse, E. et Crichton, R.R. (1988) Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **231**, 253-258.

Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G.*, et al.* (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* **290**, 2306-2309.

Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. et Fink, G.R. (2000) The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5984-5988.

Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L. et Guerinot, M.L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**, 694-697.

Rodriguez-Manzaneque, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J. et Herrero, E. (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 1109-1121.

Rosenfeld, E. et Beauvoit, B. (2003) Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**, 1115-1144.

Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M.*, et al.* (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**, 215-217.

Rouault, T.A., Hentze, M.W., Caughman, S.W., Harford, J.B. et Klausner, R.D. (1988) Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science* **241**, 1207-1210.

Rouault, T.A. et Tong, W.H. (2005) Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 345-351.

Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W. et Walden, W.E. (2003) A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *Embo J.* **22**, 4826-4835.

Ruone, S., Rhoades, A.R. et Formosa, T. (2003) Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form yFACT complexes and to reorganize nucleosomes. *J. Biol. Chem.* **278**, 45288-45295.

Rutherford, J.C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P.O. et Winge, D.R. (2001) A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14322-14327.

Rutherford, J.C., Jaron, S. et Winge, D.R. (2003) Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J. Biol. Chem.* **278**, 27636-27643.

Rutherford, J.C. et Bird, A.J. (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot. Cell* **3**, 1-13.

Rutherford, J.C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff, U., Lill, R.*, et al.* (2005) Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 10135-10140.

Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T.A. et Klausner, R.D. (1994) Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 30904-30910.

Santos, R., Dancis, A., Eide, D., Camadro, J.M. et Lesuisse, E. (2003) Zinc suppresses the iron-accumulation phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* lacking the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Biochem. J.* **375**, 247-254.

Sato, M., Sato, K. et Nakano, A. (2004) Endoplasmic reticulum quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the golgi. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1417-1424.

Schiestl, R.H. et Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**, 339-346.

Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H. et Craig, E. (1999) Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10206-10211.

Schmitt, A.P. et McEntee, K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5777-5782.

Schmitt, M.E., Brown, T.A. et Trumpower, B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**, 3091-3092.

Schuller, H.J. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **43**, 139-160.

Seoighe, C. et Wolfe, K.H. (1999) Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* **238**, 253-261.

Serrano, R., Bernal, D., Simon, E. et Arino, J. (2004) Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J. Biol. Chem.* **279**, 19698-19704.

Severance, S., Chakraborty, S. et Kosman, D.J. (2004) The Ftr1p iron permease in the yeast plasma membrane: orientation, topology and structure-function relationships. *Biochem. J.* **380**, 487-496.

Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J.*, et al.* (2004) Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1233-1243.

Shatwell, K.P., Dancis, A., Cross, A.R., Klausner, R.D. et Segal, A.W. (1996) The *FRE1* ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 14240-14244.

Sherman, F., Fink, G.R. et Hicks, J. (1986) Laboratory course manual for methods in yeast genetics. *CSH*.

Shi, X., Chabarek, K., Budai, A. et Zhu, Z. (2003) Iron requirement for *GAL* gene induction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 43110-43113.

Slekar, K.H., Kosman, D.J. et Culotta, V.C. (1996) The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* **271**, 28831-28836.

Slivka, A., Kang, J. et Cohen, G. (1986) Hydroxyl radicals and the toxicity of oral iron. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 553-556.

Smith, R.L. et Johnson, A.D. (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 325-330.

Solomon, E.I., Sundaram, U.M. et Machonkin, T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563-2606.

Souciet, J., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M.*, et al.* (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Lett.* **487**, 3-12.

Spiro, T.G. et Saltman, P. (1969) Polynuclear complexes of iron and their biological implications. *Structure and Bonding* **6**, 116-121.

Spizzo, T., Byersdorfer, C., Duesterhoeft, S. et Eide, D. (1997) The yeast *FET5* gene encodes a *FET3*-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol. Gen. Genet.* **256**, 547-556.

Srinivasan, C., Liba, A., Imlay, J.A., Valentine, J.S. et Gralla, E.B. (2000) Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.* **275**, 29187-29192.

Stadler, J.A. et Schweyen, R.J. (2002) The yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance. *J. Biol. Chem.* **277**, 39649-39654.

Stearman, R., Yuan, D.S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R.D. et Dancis, A. (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**, 1552-1557.

Stehling, O., Elsasser, H.P., Bruckel, B., Muhlenhoff, U. et Lill, R. (2004) Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 3007-3015.

Stojiljkovic, I. et Hantke, K. (1995) Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Genet.* **247**, 199-205.

Stookey, L.L. (1970) Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* **42**, 779-781.

Strain, J., Lorenz, C.R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G.A., *et al.* (1998) Suppressors of superoxide dismutase (*SOD1*) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **273**, 31138-31144.

Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. et Nelson, N. (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5105-5110.

Szczypka, M.S., Zhu, Z., Silar, P. et Thiele, D.J. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in vacuole function are defective in copper detoxification and iron-responsive gene transcription. *Yeast* **13**, 1423-1435.

ter Linde, J.J., Liang, H., Davis, R.W., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., *et al.* (1999) Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**, 7409-7413.

Theil, E.C. (2004) Iron, ferritin, and nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 327-343.

Thevelein, J.M. et de Winde, J.H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **33**, 904-918.

Thomas, D. et Surdin-Kerjan, Y. (1997) Metabolism of sulfur amino acids in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 503-532.

Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L. et Despied, S. (1995) Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli:* protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* **177**, 2305-2314.

Ueta, R., Fukunaka, A. et Yamaguchi-Iwai, Y. (2003) Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 50120-50127.

Urban-Grimal, D. et Labbe-Bois, R. (1981) Genetic and biochemical characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* blocked in six different steps of heme biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **183**, 85-92.

Urban-Grimal, D., Volland, C., Garnier, T., Dehoux, P. et Labbe-Bois, R. (1986) The nucleotide sequence of the *HEM1* gene and evidence for a precursor form of the mitochondrial 5-aminolevulinate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **156**, 511-519.

Urbanowski, J.L. et Piper, R.C. (1999) The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 38061-38070.

Velayudhan, J., Hughes, N.J., McColm, A.A., Bagshaw, J., Clayton, C.L., *et al.* (2000) Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* **37**, 274-286.

Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., *et al.* (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**, 1223-1233.

Vik, A. et Rine, J. (2001) Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6395-6405.

Voisard, C., Wang, J., McEvoy, J.L., Xu, P. et Leong, S.A. (1993) urbs1, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7091-7100.

Voisine, C., Cheng, Y.C., Ohlson, M., Schilke, B., Hoff, K., *et al.* (2001) Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1483-1488.

Volland, C., Garnier, C. et Haguenauer-Tsapis, R. (1992) *In vivo* phosphorylation of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* **267**, 23767-23771.

von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.F., Khodr, H.*, et al.* (1999) Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol.* **119**, 1107-1114.

Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C.*, et al.* (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.* **21**, 195-199.

Wallace, M.A., Liou, L.L., Martins, J., Clement, M.H., Bailey, S.*, et al.* (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.

Wandersman, C. et Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 611-647.

Wang, D., Hu, Y., Zheng, F., Zhou, K. et Kohlhaw, G.B. (1997) Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J. Biol. Chem.* **272**, 19383-19392.

Wang, J., Chen, G., Muckenthaler, M., Galy, B., Hentze, M.W.*, et al.* (2004) Iron-mediated degradation of IRP2, an unexpected pathway involving a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase activity. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 954-965.

Wang, T. et Brown, M.J. (1999) mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem.* **269**, 198-201.

Wang, T.P., Quintanar, L., Severance, S., Solomon, E.I. et Kosman, D.J. (2003) Targeted suppression of the ferroxidase and iron trafficking activities of the multicopper oxidase Fet3p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 611-620.

Waters, B.M. et Eide, D.J. (2002) Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J. Biol. Chem.* **277**, 33749-33757.

Weinberg, E.D. (1997) The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* **40**, 578-583.

Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**, 487-511.

Wientjes, F.B. et Segal, A.W. (1995) NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin. Cell. Biol.* **6**, 357-365.

Wilson, D.F., Erecinska, M. et Dutton, P.L. (1974) Thermodynamic relationships in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **3**, 203-230.

Winterbourn, C.C. (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* **82-83**, 969-974.

Wisnicka, R., Krzepilko, A., Wawryn, J. et Bilinski, T. (1997) Iron toxicity in yeast. *Acta Microbiol. Pol.* **46**, 339-347.

Wolfe, K.H. et Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-713.

Xu, X., Pin, S., Gathinji, M., Fuchs, R. et Harris, Z.L. (2004) Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1012**, 299-305.

Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A. et Klausner, R.D. (1995) AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **14**, 1231-1239.

Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A. et Klausner, R.D. (1996) Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *Embo J.* **15**, 3377-3384.

Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A. et Sasaki, R. (2002) Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 18914-18918.

Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M.*, et al.* (2003) Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 336-340.

Yoon, T. et Cowan, J.A. (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6078-6084.

Yoon, T. et Cowan, J.A. (2004) Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 25943-25946.

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

Yuan, D.S., Dancis, A. et Klausner, R.D. (1997) Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 25787-25793.

Yuan, W.M., Gentil, G.D., Budde, A.D. et Leong, S.A. (2001) Characterization of the *Ustilago maydis* sid2 gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. *J. Bacteriol.* **183**, 4040-4051.

Yun, C.W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P.O.*, et al.* (2000a) Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J. Biol. Chem.* **275**, 10709-10715.

Yun, C.W., Tiedeman, J.S., Moore, R.E. et Philpott, C.C. (2000b) Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J. Biol. Chem.* **275**, 16354-16359.

Yun, C.W., Bauler, M., Moore, R.E., Klebba, P.E. et Philpott, C.C. (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.

Zhang, Y., Lyver, E.R., Knight, S.A., Lesuisse, E. et Dancis, A. (2005) Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 19794-19807.

Zhao, H. et Eide, D.J. (1996a) The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2454-2458.

Zhao, H. et Eide, D.J. (1996b) The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 23203-23210.

Zhao, H. et Eide, D.J. (1997) Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5044-5052.

Zhao, H., Butler, E., Rodgers, J., Spizzo, T., Duesterhoeft, S.*, et al.* (1998) Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J. Biol. Chem.* **273**, 28713-28720.

Zhou, L., Haas, H. et Marzluf, G.A. (1998) Isolation and characterization of a new gene, sre, which encodes a GATA-type regulatory protein that controls iron transport in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 532-540.

Zhou, L. et Marzluf, G.A. (1999) Functional analysis of the two zinc fingers of SRE, a GATA-type factor that negatively regulates siderophore synthesis in *Neurospora crassa*. *Biochemistry* **38**, 4335-4341.

Résumé

Le fer est à la fois indispensable et toxique pour les cellules. Un contrôle strict de son métabolisme est nécessaire pour pourvoir aux besoins des cellules tout en évitant ses effets délétères. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae,* ce contrôle est assuré par les activateurs transcriptionnels paralogues Aft1p et Aft2p. En condition de carence en fer, Aft1p active la transcription des gènes du transport à haute affinité du fer extracellulaire en se fixant sur la séquence *cis*-régulatrice 5'-TGCACCC-3'. Le rôle d'Aft2p est moins bien caractérisé ; il reconnaît *in vitro* la même séquence consensus qu'Aft1p et active la transcription de plusieurs gènes régulés par Aft1p lorsqu'il est surexprimé ou sous une forme mutée constitutivement active.

Nous avons cherché à mieux comprendre le rôle d'Aft2p en condition de carence en fer en identifiant ses gènes cibles et en caractérisant son mode d'action, par une combinaison d'expériences d'analyses globales de transcriptome, de Northern blot et d'immunoprécipitation de la chromatine réalisées avec les souches sauvage et délétées d'*AFT1* et/ou d'*AFT2*.

Nous avons montré qu'Aft2p, mais pas Aft1p, active directement la transcription des gènes de l'utilisation et du stockage du fer intracellulaire. Nous avons mis en évidence que la séquence *cis*-régulatrice des gènes régulés par Aft2p n'est pas 5'-TGCACCC-3', mais une séquence plus courte, 5'-(G/A)CACCC-3'. Aft2p joue également un rôle direct dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes du métabolisme du zinc, et il pourrait intervenir dans la régulation des gènes du métabolisme de l'ergostérol et des acides gras.

Par ailleurs, nous avons montré l'existence d'une régulation par le fer de la quantité des protéines Aft1p et Aft2p. La variation de quantité d'Aft1p semble résulter de son auto-régulation transcriptionnelle, alors que la variation de quantité d'Aft2p implique une régulation post-transcriptionnelle.

Mots clés : Aft1p, Aft2p, paralogues, régulation transcriptionnelle, *Saccharomyces cerevisiae*, métabolisme du fer, immunoprécipitation de la chromatine.

Summary

Iron is an essential nutrient, but its accumulation can be highly cytotoxic. Iron homeostasis must be tightly regulated in order to satisfy cell demand without damage. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this regulation is mediated by two paralogous transcription factors: Aft1p and Aft2p. Under iron starvation conditions, Aft1p activates the transcription of high affinity iron transport related genes by specific binding to the DNA consensus sequence 5'-TGCACCC-3' found in the promoters of these genes. The role of Aft2p remains poorly understood. Aft2p is capable of binding *in vitro* to the Aft1p DNA consensus sequence and it activates the transcription of some of the Aft1p target gene under specific conditions, such as overexpression, or expression of a gain-of-function allele.

We aimed at further understanding the role of Aft2p in a physiological context, by identification of its target genes and characterisation of its mode of action. For this purpose, we performed global transcriptome analyses, Northern blot and chromatin immunoprecipitation experiments using wild type and Δ*aft1* and/or Δ*aft2* mutant strains grown under iron depleted conditions.

We demonstrated that Aft2p directly activates the transcription of genes that are essential for the iron intracellular sub-compartimentalization and use, while Aft1p does not. We discovered that the consensus sequence in the promoter region of genes specifically activated by At2p was not the 5'-TGCACCC-3' sequence, but the shorter 5'-(G/A)CACCC-3'. Aft2p plays also a direct role in the transcriptional regulation of some genes involved in zinc metabolism, and it could be involved in the regulation of ergosterol and fatty acid metabolism.

We also showed that Aft1p and Aft2p proteins amount is iron-regulated. The modulation of Aft1p protein amount can be attributed to its own transcriptional regulation, while the modulation of Aft2p protein amount involves post-transcriptional regulation.

Keywords : Aft1p, Aft2p, paralogs, transcriptional regulation, *Saccharomyces cerevisiae*, iron metabolism, chromatin immunoprecipitation.