Numéro National de Thèse : 2017LYSEN072

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée par

l'École Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale N°52
Physique et Astrophysique de Lyon (PHAST)

Spécialité de doctorat : Sciences de la Terre

Soutenue publiquement le 01/12/2017, par :

Jean-Loup CADIOU

Etude des mécanismes de fractionnement isotopique du cuivre par les cellules eucaryotes.

Vers le développement d'un nouveau biomarqueur non-invasif de l'apparition d'une chimio-résistance au cisplatine des cellules cancéreuses

---

Devant le jury composé de :

LANSIAUX, Amélie	Maître de conférences	Université Catholique de Lille	Rapporteure
VANHAECKE, Frank	Professor	Université de Gent	Rapporteur
MENOT, Guillemette	Professeur	ENS Lyon	Examinatrice
OGER, Philippe	Directeur de recherche	INSA Lyon	Examinateur
PICHAT, Sylvain	Maître de conférences	ENS Lyon	Directeur de thèse
ALBARÈDE, Francis	Professeur émérite	ENS Lyon	Co-directeur de thèse

Résumé

Le développement de cancer entraîne une dérégulation du métabolisme du cuivre (Cu) qui a notamment été étudiée par analyse de la composition isotopique naturelle du Cu. Les cellules tumorales hépatiques sont enrichies en isotopes lourds du Cu par rapport aux cellules péri-tumorales. Le but de cette thèse est d'identifier les mécanismes responsables de cette différence, en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* dont les mécanismes de réduction et d'import du Cu sont proches de ceux de l'Homme. En mutant les gènes codants pour les importateurs ou les réductases du Cu, j'ai montré que son import protéique génère un enrichissement intracellulaire en isotopes légers du Cu, qui est modulé par l'activité des réductases. Une modélisation numérique m'a permis de montrer que le flux de Cu par les importateurs haute-affinité Ctr est linéairement et négativement corrélé à la composition isotopique du Cu. Ce flux étant modulé par la capacité de réduction membranaire du Cu, j'ai pu lier l'enrichissement en isotopes lourds du Cu des cellules hépatiques tumorales à une diminution de l'activité des réductases membranaires. Par ailleurs, pour un même fond génétique, j'ai mis en évidence une corrélation entre un moindre enrichissement en isotopes légers du Cu et une résistance accrue à un médicament anticancéreux, le cisplatine. De plus, le traitement au cisplatine entraîne un enrichissement des cellules en isotopes lourds du Cu d'autant plus petit que la souche est résistante au cisplatine. Ainsi, ces résultats montrent que la mesure de la composition isotopique du Cu avant et après traitement au cisplatine pourrait permettre de suivre l'apparition d'une chimiorésistance chez les malades, caractérisée par un enrichissement en isotopes lourds du Cu dans les tumeurs, ce qui ouvre la voie au développement d'un nouveau biomarqueur non-invasif de l'apparition d'une résistance au cisplatine.

Abstract

Cancer development leads to Cu metabolism disregulation which were especially studied by the natural copper (Cu) isotopic composition. Hepatocellular carcinoma (hCC) are enriched in heavy Cu isotopes compared to peri-tumoral cells. The goal of this thesis is to identify the mechanism responsible for this difference. I used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* where Cu reduction and Cu import mechanism are close to the human. By mutating the genes coding for Cu reductases or Cu importers, I showed that protein Cu import generate an intracellular light Cu enrichment which is modulated by Cu reductases activity. With a numerical modelisation I calculated that the Cu flux through high-affinity Cu importers is linearly and negatively correlated to the natural Cu isotopic composition. This flux is modulated by the cell reduction ability. Therefore, I have linked the heavy Cu isotopes enrichment in hCC to a lower reductases activity. Besides, for a same genetic background, I observed a correlation between a lower light Cu enrichment and an higher resistance to a anti-tumoral drug, the cisplatin. Moreover, I observed that cisplatin treatment leads to an enrichment in heavy Cu isotopes which is lower for resistant to cisplatin strains. Those results shown that the Cu isotopes measurement in tumors before and after the cisplatin treatment might be used to trace the chemoresistance apparition in patient with cancer which is characaterize by a tumoral heavy Cu isotopes enrichment. This results might pave the way to the development of a new prognosis biomarker of the cisplatin resistance apparition.

Remerciements

Je tiens à remercier l'École Normale Supérieure de Lyon et l'École doctorale PHAST pour les financements alloués avant et durant ma thèse. Ils m'ont permis de travailler dans des bonnes conditions et de m'ouvrir à l'international. Je tiens également à remercier le Laboratoire de Géologie de Lyon : Terre-Planète Environnement. Outre ce caractère institutionnel, je tiens à souligner la disponibilité des directeurs du laboratoire et de l'école doctorale, des secrétaires et des techniciens.

Je tiens également à remercier mon encadrement de thèse. Francis Albarède, dont la pertinence et le recul de ses remarques m'a beaucoup aidé. Philippe Oger et Sylvain Pichat, qui ont initié un géologue aux mains lourdes aux délicates manipulations de biologie et de géochimie. Je tiens également à les remercier pour la patience dont ils ont fait preuve lors de la rédaction de mes différentes communications.

Un grand merci au pizzaiolo de la biologie : j'ai nommé Victor Bondanese. Sans son enthousiasme, sa disponibilité et ses brillantes idées cette thèse n'aurait pas été la même. Je regrette que la recherche fondamentale se prive de ses grandes qualités de chercheur et d'encadrant.

Je tiens à remercier l'association l'Enfant bleu et en particulier Mme Corinne Robert de Saint-Vincent, pour m'avoir aidé dans cette épreuve qu'a constitué pour moi la thèse.

Un merci DéMesuré à toute l'équipe du laboratoire DéMesure avec qui j'ai passé de supers moments. Comme dirait l'ancienne présidente : "je vous aime putain ;)"

Un grand merci à mes deux parents qui m'ont soutenu durant ces 24 années d'études. J'avoue que les déguisements de maternelle m'ont peu servis mais Papa m'a transmis sa créativité. Un grand merci à Maman, dite Mamema dont l'indéfectible soutien a été une force dans les moments difficiles. Par ailleurs, j'espère que la relecture de cette thèse ne lui aura pas fait faire des cauchemars à base de cancer et de cuivre.

Je souhaite aussi dire merci à mon Ulmite préféré, dit Coco l'asticot, dont les conseils de petit frère avisé m'ont beaucoup aidé. Merci à ce physicien dans l'âme d'avoir pris le temps de relire ma prose.

Une thèse est l'achèvement de (trop ?) nombreuses années d'études où le soutien de la famille est essentiel. Merci à mes grand-parents pour les repas durant mes années de prépa, à ma marraine Gabrielle pour sa capacité d'écoute, à Denis et Evelyne pour le fan club, à mon cousin Manu pour ses conseils et pour l'enthousiasme qu'il a porté à mon projet, à ma famille de coeur : Marie-Evelyne, Sophia, Mickaël et Ange.

Un balai d'or pour les collocs qui m'ont suivi pendant cette thèse. Un merci à Mickaël, Amélie, Audrey, Thomas et Romain. Et, un grand merci à Amélie pour sa préciseuse aide.

Un marteau d'or aux différents géologues qui m'ont aidé dans cette ligne droite. Un merci à Alexandre le super enseignant, à Simon pour ses idées pas trop tranchées et à Amaury pour son soutien à distance ;) !

Un énorme paquito pour tout les amis de l'ENS et d'ailleurs avec qui j'ai partagé mes repas, mes vacances, mon temps libre, mes doutes, mes craintes, mes blagues (désolé). Un merci à Paco, Baba, Benji, Maëlle et Romain qui ont partagé mes blagues pendant leurs pauses de midi :) ! Je me souviendrai longtemps (ou pas) des soirées posées (souvent chez les époux Paco et Nath Maurer) en compagnie d'Élo, Maëlle, Baba et Path et Naco qui finissent toujours par laisser des traces.

Table des matières

Remerciements v

Table des matières vii

Liste des figures xiii

Liste des tableaux xvii

Abbréviations et notations utilisées xix

1 Introduction 1

Introduction générale . . . 3

1.1 Importance du cuivre dans les processus cellulaires . . . 4

1.1.1 Propriétés physico-chimiques du cuivre et disponibilité pour les êtres vivants . . . 5

1.1.1.1 Physico-chimie du cuivre . . . 5

1.1.1.2 Biodisponibilité du cuivre . . . 5

1.1.2 Le cuivre : un élément indispensable pour le vivant . . . 6

1.1.3 De l'alimentation en cuivre à son utilisation dans les cellules humaines 7

1.1.3.1 Distribution du cuivre du bol alimentaire vers les cellules . . . 7

1.1.3.2 Structures et diversité des différentes protéines contenant du cuivre . . . 9

1.1.3.3 Exemples de protéines contenant du cuivre, dont l'activité est indispensable à la cellule . . . 11

1.2 Maladies humaines liées à des défauts du métabolisme du cuivre . . . 14

1.2.1 Maladies liées à un changement global du métabolisme du cuivre . . . 14

1.2.2 Cancer et perturbation du métabolisme du cuivre . . . 15

1.2.2.1 De la compréhension de la diversité des cancers à la recherche de biomarqueurs . . . 15
1.2.2.2 Mise en évidence d'une perturbation du métabolisme du cuivre lors du développement de cancers . . . 18
1.2.2.3 Origine cellulaire de l'altération de l'homéostasie du cuivre lors du développement d'un cancer . . . 21
1.2.3 Traitement chimiothérapique du cancer et cuivre . . . 25
1.2.3.1 Diversité des traitements anti-cancéreux . . . 25
1.2.3.2 Utilisation du cisplatine comme traitement anti-cancéreux . 26
1.2.3.3 Utilisation du cisplatine et apparition de résistances au cisplatine . . . 27
1.2.3.4 Origines moléculaires de l'apparition de résistances au cisplatine . . . 29
1.3 Utilisation des isotopes stables des métaux de transition comme biomarqueurs . . . 33
1.3.1 Origine biologiques des fractionnements biologiques des isotopes stables du zinc et du fer . . . 34
1.3.2 Composition isotopique en cuivre des eucaryotes . . . 35
1.3.3 Composition isotopique en cuivre d'organes et de cellules malades . 37
1.3.4 Les isotopes stables du cuivre, des biomarqueurs de l'évolution des maladies affectant le métabolisme du cuivre . . . 40
1.4 *Saccharomyces cerevisiae*, un organisme modèle pour comprendre l'origine moléculaire des fractionnements isotopiques du cuivre observés dans les cellules . . . 44
1.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*, un analogue des cellules humaines aisément modifiable génétiquement . . . 44
1.4.2 Comparaison du transport du cuivre chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'homme . . . 45
1.4.2.1 Protéines impliquées dans la réduction du cuivre . . . 45
1.4.2.2 Protéines impliquées dans l'import du cuivre . . . 46
1.4.2.3 Protéines impliquées dans le transport intracellulaire du cuivre 51
1.4.2.4 Protéines impliquées dans l'export du cuivre . . . 51
1.4.3 Différences dans la régulation de l'homéostasie en Cu chez l'homme et chez *Saccharomyces cerevisiae* . . . 54
1.5 Objectifs du travail de thèse . . . 56

2 Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells 59

Introduction (français) . . . 61

Article published in Scientific reports – Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells . . . 66
Materials and methods . . . 67
Saccharomyces cerevisiae genotypes and culture conditions . . . 67
Genetic manipulations . . . 68
Cell quantification . . . 68
Uptake and adsorption experiments . . . 68
Quantification of cellular copper reduction activity . . . 68
Chemical separation and purification procedures . . . 68
Elemental and isotopic copper measurements . . . 69
Results . . . 69
Effect of copper uptake on copper isotopes fractionation by *Saccharomyces cerevisiae* cells . . . 69
Impact of copper oxidation state on *Saccharomyces cerevisiae* $^{65}Cu/^{63}Cu$ . . . 70
Discussion . . . 70
Copper fractionation by copper importers during transport into the cell is modulated by the cell reductive ability . . . 70
Copper isotopic compositions fluctuate with time . . . 72
Affinity interactions with the reductases and transporters generate copper fractionation . . . 72
Using copper isotopic composition as a prognostic tool for cancer . . . 73
Supplementary information . . . 75

3 Lower copper import through Ctr1p and Ctr3p lead to a "tumor" like copper isotope composition 83
3.1 Introduction (français) . . . 85
3.2 *Article in preparation*: Lower copper import through Ctr1p and Ctr3p leads to tumor like copper isotopic composition . . . 88
Abstract . . . 88
Introduction . . . 89
3.2.1 Materials and methods . . . 90
3.2.1.1 Strains genotypes and culture conditions . . . 90
3.2.1.2 Genetic manipulations . . . 90
3.2.1.3 Uptake experiments . . . 92
3.2.1.4 Quantification of cellular copper reduction activity . . . 92
3.2.1.5 Chemical separation and purification procedures . . . 93
3.2.1.6 Copper elemental and isotopic measurements . . . 93

3.2.1.7 Numerical models . . . 93
3.2.2 Results . . . 94
3.2.2.1 Impact of copper transporter and copper reductase gene deletions on cellular copper isotopic composition . . . 94
3.2.2.2 Copper isotopic fractionation associated to copper importers 99
3.2.3 Discussion . . . 100
3.2.3.1 Copper import and reduction abilities define the copper Isotopic Phenotype of a cell . . . 100
3.2.3.1.1 Relative qualitative contribution of the different copper transporter proteins on the Cu Isotopic Phenotype. . . . 103
3.2.3.1.2 Role of reductases on the Cu Isotopic Phenotype. . . . 103
3.2.3.2 High-affinity copper importers are responsible for copper Isotopic Phenotype . . . 104
3.2.3.2.1 Solving the isotopic mass balance equation. . . . 104
3.2.3.3 Involvement of alternative transporters in copper uptake in double knockout mutants . . . 105
3.2.3.4 Natural copper isotopic composition measurement as a prognosis biomarker in cancer . . . 106
Conclusion . . . 107
Supplementary information . . . 109
Supplementary information – Material and Methods . . . 109
Supplementary information – Additional tables and figures . . . 111
Supplementary information – Numerical calculation . . . 115
Numerical calculation of the δ^{65}Cu associated to each Cu importer . . . 115
Box model . . . 123

4 The copper isotopic composition of cells monitors the resistance to the anticancerous drug cisplatin 135

4.1 Introduction (français) . . . 137
4.2 *Article in preparation:* Cisplatin resistant cells have a specific copper isotopic composition which is little affected by cisplatin treatment . . . 139
Abstract . . . 139
Introduction . . . 139
4.2.1 Material and method . . . 141
4.2.1.1 Genotype and culture conditions . . . 141
4.2.1.2 Cisplatin cytotoxicity assays . . . 141
4.2.1.3 Uptake experiments . . . 142

4.2.1.4 Elemental purification and analysis . . . 142
4.2.2 Results . . . 143
4.2.2.1 Survival rate as a function of cisplatin concentration . . . 143
4.2.2.2 Cisplatin resistance and, copper and platinium import . . . 143
4.2.2.3 Impact of cisplatin treatment on the cell Copper Isotopic Phenotype . . . 146
4.2.3 Discussion . . . 148
4.2.3.1 Cisplatin resistance levels are highly dependent on the genomic background . . . 148
4.2.3.2 The cell Copper Isotopic Phenotype and cisplatin resistance of isogenic strains are correlated. . . . 150
4.2.3.3 Copper Isotopic Phenotype as a tool to monitor the emergence of cisplatin resistant tumor cells . . . 151
4.2.4 Conclusion . . . 153
Supplementary information . . . 154

5 Conclusion générale **159**
5.1 Observation d'un phénotype isotopique du cuivre . . . 163
5.2 Le phénotype isotopique du cuivre est dû à l'import du cuivre par les importateurs à haute affinité et est modulé par la quantité de cuivre réduit . . . 163
5.3 Lien entre le phénotype isotopique du cuivre et le phénotype de résistance au cisplatine . . . 168
5.4 Utilisation potentielle du phénotype isotopique du cuivre comme biomarqueur prédictif du cancer . . . 170
5.5 Perspectives pour l'utilisation du phénotype isotopique du cuivre . . . 173

Bibliographie **175**

Résumé **201**

Liste des figures

1.1 Cycle métabolique du cuivre chez l'homme 8
1.2 Représentation des structures tertiaires de la superoxyde dismutase 1, de la céruloplasmine et de la cytochrome c oxydase 12
1.3 Importance du cuivre dans la chaîne respiratoire 13
1.4 Microphotographies du développement d'une tumeur utérine 16
1.5 Les différentes caractéristiques des cellules cancéreuses 17
1.6 Comparaison de la concentration en cuivre dans le sérum de trois lignées de souris atteintes de tumeurs par rapport à des souris saines 20
1.7 Méta-analyse du potentiel du "*Copper Status Indexes* (CSI)" comme biomarqueur pronostique du cancer 21
1.8 Effet du cuivre sur le développement tumoral chez la souris 22
1.9 Impact du cuivre sur le développement du cancer 23
1.10 Expression d'une des réductases membranaire du cuivre et développement des cancers hépatiques 24
1.11 Représentation de Cram du cis-diaminedichloroplatine(II) 26
1.12 Frise chronologique du développement des chimiothérapies à base de platine 28
1.13 Suivi de la survie relative de patients atteints de cancer des testicules et traités avec du cisplatine en France 29
1.14 Arbre généalogique des différents composés à base de platine utilisés en chimiothérapies 30
1.15 Mode d'action moléculaire du cisplatine sur l'ADN 31
1.16 Survie relative de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* en fonction de la concentration en cisplatine dans le milieu de culture 32
1.17 Mécanismes d'entrée/sortie du cisplatine dans les cellules 33

1.18 Variation de la composition isotopique du cuivre chez les mammifères et les plantes . . . 36
1.19 Composition isotopique du cuivre en fonction de la concentration en cuivre dans le sérum de patients atteints de la maladie de Wilson et de sujets sains 38
1.20 Composition isotopique du cuivre mesuré dans le sérum de patients atteints de cancer coloréctal et de cancer du sein et suivi longitudinale de cette composition mesurée dans le sérum de patientes atteintes de cancer du sein . . . 39
1.21 Composition isotopique du cuivre analysé dans le sérum, dans les globules rouges, dans les tissus tumoraux et péri-tumoraux de patients atteints de cancer du foie . . . 40
1.22 Variation de la composition isotopique du cuivre mesurée dans le sérum après transplantation du foie . . . 42
1.23 Suivi de la composition isotopique du cuivre dans des cellules souches cultivées pendant 24 heures en conditions hypoxiques ou normoxiques et en présence de différentes concentrations de cuivre . . . 43
1.24 Structure et mise en évidence de l'activité de réductase des protéines STEAP 47
1.25 Modèle structurel des transporteurs à haute affinité du cuivre eucaryote . 48
1.26 Structure en 3D de hCtr1p et d'un des monomères qui la compose . . . 49
1.27 Protéines impliquées dans l'import du cuivre chez l'homme et chez *Saccharomyces cerevisiae* . . . 50
1.28 Transport cellulaire du cuivre chez *Saccharomyces cerevisiae* . . . 52
1.29 De l'import du cuivre par les cellules hépatiques à son excrétion dans la bile 53

3.1 *Saccharomyces cerevisiae* copper transport . . . 91
3.2 Temporal evolution of the copper isotopic composition in the wild type (DTY165) and the SKY34 *Saccharomyces cerevisiae* strains during uptake experiments . . . 95
3.3 Temporal evolution of the copper isotopic composition in the wild type (DTY165), the SKY34 and the copper reductase knockout *Saccharomyces cerevisiae* strains during uptake experiments . . . 97
3.4 Temporal evolution of the copper isotopic composition in the wild type (DTY165), the SKY34 and the high-affinity copper importers knockout *Saccharomyces cerevisiae* strains during uptake experiments . . . 98
3.5 Temporal evolution of the copper isotopic composition in the wild type (DTY165), the SKY34 and the copper exporter knockout *Saccharomyces cerevisiae* strains during uptake experiments . . . 99
3.6 Copper reductase activity in the Fre knockout strains compared to the wild type and the SKY34 *Saccharomyces cerevisiae* strains . . . 100

3.7 Average copper isotopic composition after 120 min. of copper uptake in the wild type, the SKY34, the high-affinity copper importers knockout, the copper reductases knockout and the copper exporter knockout *Saccharomyces cerevisiae* strains 101

3.8 Average copper isotopic composition after 120 min. of copper uptake measured in the wild type and in the single knockout *Saccharomyces cerevisiae* strains as a function of the calculated relative copper fluxes through high-affinity copper importers during the first hour of uptake 102

S3.1 Temporal copper concentration evolution in the two single reductase knockout, the wild type and the SKY34 *Saccharomyces cerevisiae* strains 112

S3.2 Temporal copper concentration evolution in the two single high-affinity copper importer knockout, in the copper exporter knockout, the wild type and the SKY34 *Saccharomyces cerevisiae* strains 114

S3.3 Effect of each copper importer on the cell copper isotopic composition . . 122

S3.4 Comparison of the calculated and the measured values of the relative copper fluxes through high-affinity copper importers 123

S3.5 Average copper isotopic composition after 120 min. of copper uptake in the wild type and in the single knockout *Saccharomyces cerevisiae* strains as a function of the calculated relative copper fluxes through high-affinity copper importers during the first hour of uptake 124

S3.6 The different boxes used in the numerical box model 125

S3.7 Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition in a box model with only one copper importer 127

S3.8 Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition with various copper concentration in the growth medium 128

S3.9 Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition with various initial copper mass in the cell 129

S3.10 Modelisation of the temporal copper concentration evolution in cell with a copper influx "R" times higher than the copper exit 130

S3.11 Modelisation of the copper isotopic composition with various fraction of copper that enter cell through one copper importer 131

S3.12 Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition with various fractionation factor associated to copper export 132

S3.13 Comparison of the temporal evolution of the cell copper concentration and the cell copper isotopic composition in the *Saccharomyces cerevisiae* wild type strain measured *in vivo* and modelized with box model 133

4.1 Survival rate after cisplatin treatment in wild type, SKY34, a high-affinity Cu importer knockout (ctr1Δ) and a Cu reductase knockout (fre1Δ) *Saccharomyces cerevisiae* strains . . . 144
4.2 Temporal evolution of the copper concentration in cells cultivated in the presence of 0.5 mM of cisplatin and cultivated in the absence of cisplatin. 145
4.3 Temporal evolution of the platinium concentration after the addition of 0.5 mM of cisplatin in wild type, SKY34, a high-affinity Cu importer knockout (ctr1Δ) and a Cu reductase knockout (fre1Δ) *Saccharomyces cerevisiae* strains . . . 146
4.4 Temporal copper isotopic composition variation in a wild type, SKY34, a high-affinity Cu importer knockout (ctr1Δ) and a Cu reductase knockout *Saccharomyces cerevisiae* strains treated with 0.5 mM of cisplatin and not treated with cisplatin . . . 147
4.5 Difference between the copper isotopic composition after 120 min. of copper uptake in a wild type, a SKY34, a high affinity Cu importer (ctr1Δ) and a Cu reductase (fre1Δ) *Saccharomyces cerevisiae* strains treated with 0.5 mM of cisplatin and untreated. . . . 149
S4.1 Cisplatin cytotoxic assay procedure . . . 155
S4.2 Survival rate after cisplatin treatment in a wild type and two high-affinity Cu importers knockout (ctr1Δ, and ctr3Δ) *Saccharomyces cerevisiae* strains 156
S4.3 Survival rate after cisplatin treatment in a wild type and two Cu reductases knockout *Saccharomyces cerevisiae* strains . . . 157

5.1 Modèle théorique de l'origine du fractionnement isotopique du Cu lors de l'entrée du Cu dans la cellule . . . 162
5.2 Le fractionnement isotopique observé dans les cellules eucaryotes est dû à l'import du cuivre et est modulé par la réduction du cuivre . . . 165
5.3 La composition en isotopes stables du cuivre des cellules eucaryotes dépend linéairement du flux de cuivre au travers des importateurs à haute affinité du cuivre . . . 167
5.4 Composition isotopique du cuivre de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* cultivées en présence et en absence de cisplatine et sensibilité de ces souches au cisplatine . . . 169
5.5 La composition isotopique du cuivre spécifique des cellules tumorales hépatiques est dû à une moindre expression des réductases du cuivre membranaire . . . 172

Liste des tableaux

1.1 Propriétés principales du cuivre 5
1.2 Concentration en cuivre dans les différents réservoirs terrestres et dans certains organismes vivants 6
1.3 Masses de cuivre et protéines associées aux principaux organes impliqués dans le métabolisme du cuivre 9
1.4 Différentes classes de protéines contenant du cuivre 10
1.5 Concentration en cuivre dans le sérum de patients atteints d'un cancer comparée à la concentration en cuivre dans le sérum de sujets sains . . . 19
1.6 Tableau comparatif des protéines membranaires impliquées dans l'entrée et dans la sortie du cuivre des cellules humaines et des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* 54

3.1 *Saccharomyces cerevisiae* strains 92
S3.1 *Saccharomyces cerevisiae* genotype 109
S3.2 Genetic transformation primers used in the plasmid pYM-N6 109
S3.3 Primers used for checking the success of the transformation 109
S3.4 Long term external reproductibility of the copper isotopic measurements 110
S3.5 Qualitative temporal evolution of the copper importers amount in the membrane, reductase ability, and copper isotopic composition measured in the *Saccharomyces cerevisiae* strains 115
S3.6 The different calculation interval used to determine the copper isotopic fractionation associated to each importer in the wild type strain 120
S3.7 Numerical solutions of the Cu fractionation factor associated to Cu import 121

4.1 *Saccharomyces cerevisiae* strains 141
S4.1 *Saccharomyces cerevisiae* strains genotype 154

S4.2 Calculation of the potential copper flux across high-affinity copper importers when cells were treated with 0.5 mM of cisplatin 154
S4.3 Copper concentration after 240 min. of experiments in *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with cisplatin and cells untreated 156

Abbréviations et notations utilisées

Abbréviations

- **ADN** : Acide DesoxyriboNucléique
- **ARN** : Acide RiboNucléique
- **ARNm** : ARN messager
- **ARNsi** : ARN *small interfering* ou petit ARN interférent
- **ATP** : Adénosine Tri-Phosphate
- **cDDP** : cisplatine (cis-diaminedichloroplatine(II), aussi appellée cDDP)
- **Cp** : Céruloplasmine
- **Cu** : Cuivre
- **Cys** : Cystéine
- **Fe** : Fer
- **His** : Histidine
- ***H. sapiens*** : *Homo sapiens*
- **Met** : Méthionine
- **PCR** : Polymerase chain reaction
- **Pt** : Platine
- ***S. cerevisiae*** : la levure de bière, *Saccharomyces cerevisiae*
- **Zn** : Zinc

Notations

Notations utilisées dans le domaine de la biologie

- **Gène** : nom du gène écrit en lettres majuscules (ex : CTR1)
- **Protéine** : nom du gène codant la protéine écrit en lettres minuscules et se terminant par p (ex : Ctr1p)
- **Organisme dans lequel le gène est décrit** : l'organisme dans lequel le gène est décrit est abrégé devant le nom de la protéine (ex : hCtr1p = protéine Ctr1 humaine). Nos études portent principalement sur *S. cerevisiae*, de ce fait les protéines de levure seront notées telles quelles (Ctr1p au lieu de ScCtr1p)
- **Délétion d'un gène** : nom du gène écrit en minuscule et se terminant par Δ (ex : ctr1Δ)
- **Souche de levure** : les différentes souches de levure utilisées durant cette thèse sont parfois appellées par la mutation d'intérêt qu'elles portent (par exemple, la souche ctr1Δ est une souche CTR1 délétée)

Notations utilisées dans le domaine de la géologie

- $\delta^{\mathbf{65}}$**Cu** : notation utilisée pour rendre compte du rapport entre les deux isotopes stables du Cu (^{65}Cu et ^{63}Cu). Le rapport isotopique de l'échantillon (*sample*) est soustrait puis normalisé à un rapport isotopique de référence (*reference material*). Au vu des faibles différences entre le rapport analysé et le rapport de référence, cette valeur est multiplié par 1000. Le δ^{65}Cu est alors lié au ratio entre les deux isotopes stables du Cu par la formule Not.1 :

$$\delta^{65}\mathrm{Cu} = 1000 \times \left[\frac{\left(^{65}\mathrm{Cu}/^{63}\mathrm{Cu}\right)_{\text{sample}} - \left(^{65}\mathrm{Cu}/^{63}\mathrm{Cu}\right)_{\text{reference material}}}{\left(^{65}\mathrm{Cu}/^{63}\mathrm{Cu}\right)_{\text{reference material}}} \right] \qquad \text{(Not.1)}$$

- $\delta^{\mathbf{56}}$**Fe** : cette notation reprend le même concept que pour le δ^{65}Cu pour les deux isotopes stables du Fe (^{54}Fe et ^{56}Fe). Cette valeur est liée par la formule Not.2 :

$$\delta^{56}\mathrm{Fe} = 1000 \times \left[\frac{\left(^{56}\mathrm{Fe}/^{54}\mathrm{Fe}\right)_{\text{sample}} - \left(^{56}\mathrm{Fe}/^{54}\mathrm{Fe}\right)_{\text{reference material}}}{\left(^{56}\mathrm{Fe}/^{54}\mathrm{Fe}\right)_{\text{reference material}}} \right] \qquad \text{(Not.2)}$$

- $\delta^{\mathbf{X}}$**Zn** : cette notation reprend le même concept que pour le δ^{65}Cu pour les quatres isotopes stables du Zn (^{64}Zn, ^{66}Zn, ^{67}Zn, ^{68}Zn). Ici X représente les trois isotopes lourds du Zn. L'équation s'écrit alors :

$$\delta^{X}Zn = 1000 \times \left[\frac{\left(^{X}Zn/^{64}Zn\right)_{\text{sample}} - \left(^{X}Zn/^{64}Zn\right)_{\text{reference material}}}{\left(^{X}Zn/^{64}Zn\right)_{\text{reference material}}} \right] \qquad \text{(Not.3)}$$

CHAPITRE 1

Introduction

Questions scientifiques :

- En quoi le cuivre est-il indispensable au vivant ?
- Quelles sont les maladies liées au métabolisme du cuivre ?
- En quoi les isotopes stables du cuivre peuvent-ils être des biomarqueurs du développement de cancers ou d'apparition de résistances aux chimiothérapies ?
- Quel organisme modèle choisir pour l'étude de l'origine du fractionnement isotopique du cuivre ?

Introduction générale

Le cuivre (Cu) est un métal de transition, dont les propriétés physico-chimiques (1.1.1) en font un élément indispensable à faible concentration et toxique à haute concentration (oligo-élément) pour le vivant (1.1.2). Chez l'homme, il est distribué aux cellules *via* le sang (1.1.3). Dans les cellules, il est impliqué dans le fonctionnement de nombreuses protéines (1.1.3). Le mauvais fonctionnement du métabolisme du Cu entraîne des maladies neurologiques délétères (1.2.1). De plus, des changements du métabolisme du Cu ont parfois été observés concomitamment au développement de cancers (1.2.2). Ces changements métaboliques ont une origine cellulaire et sont souvent liés à une mutation dans un des gènes codant pour le transport transmembranaire du Cu (1.2.2.3). Les cellules ayant acquis ces mutations peuvent par ailleurs être plus résistantes que leurs congénères au cisplatine (un agent-chimiothérapique). Ainsi, l'apparition d'une résistance au cisplatine dans le développement de certains cancers humains peut être lié à un changement du métabolisme du Cu (1.2.3). La quantification des protéines transmembranaires transportant le Cu est utilisée comme biomarqueur pronostique du développement de cancer et comme biomarqueur pronostique et diagnostique de la résistance du cancer aux traitements chimiothérapiques. Les biomarqueurs pronostiques développés, se font sur des biopsies et demandent donc des opérations lourdes qui rendent le suivi longitudinal complexe. Un biomarqueur pronostique ou diagnostique mesurable dans une zone facile à prélever (par exemple un biomarqueur sanguin) et sensible à de faibles variations du métabolisme du Cu est ainsi recherché. Les méthodes de géochimie isotopique qui se basent sur l'étude de la variation du rapport entre différents isotopes d'un même élément permettent de tracer des variations fines des flux de cet élément vers un réservoir principal. Le sang ou le milieu de culture peut être considéré comme le réservoir principal de l'élément considéré dans lequel baignent les organes ou les cellules. Ainsi, toutes variations des flux entre le sang et les organes, comme c'est le cas pour le Cu lors du développement de certains cancers, devraient entraîner une variation de la composition isotopique du sang. Afin d'étudier l'effet d'un changement de flux sur la composition isotopique du réservoir, la composition en isotopes stables du réservoir doit être connu dans les conditions standard. Ainsi, la composition isotopique du Cu des organismes eucaryotes a été analysée : ils se caractérisent tous par un enrichissement en isotopes légers du Cu (1.3.2). Cet enrichissement diffère dans les cellules tumorales. Il a ainsi été observé que les cellules d'hépatocarcinomes sont enrichies en isotopes lourds du Cu en comparaison de cellules péri-tumorales d'un même patient. D'autres études se sont attachées à étudier la composition en isotopes stables du Cu du sang chez des patients atteints de cancers du sein, du foie et colorectal. Dans tous les cas de figure, le sérum ou les globules rouges des patients atteints de cancers sont enrichis en isotopes légers du Cu en comparaison des sujets sains (1.3.3). Par ailleurs, il est à noter que cet enrichissement est d'autant plus fort

que le cancer est malin (1.3.4). Le suivi longitudinal de la composition en isotopes stables du Cu dans le sang a ainsi été proposé comme un nouveau biomarqueur non-invasif du cancer. Cependant, aucune étude à ce jour ne proposait une explication mécanistique de cette différence de composition isotopique du Cu entre les cellules cancéreuses et les cellules saines. Cette thèse s'inscrit dans ce nouveau champ de recherche. Durant cette étude nous nous intéresserons tout d'abord à l'origine de la composition en isotopes stables du Cu des organismes eucaryotes. Nous étudierons ensuite l'origine moléculaire de la signature isotopique spécifique des cellules cancéreuses. Pour cela, nous ferons l'hypothèse que parmi les différents processus impliqués dans le métabolisme du Cu humain, seule la réduction du Cu, son entrée et sa sortie des cellules humaines (fonctionnement détaillé en 1.4.2) a un effet sur la composition isotopique du Cu. Nous étudierons cela dans un organisme modèle en biologie cellulaire : la levure de bière *Saccharomyces cerevisiae*, dont les gènes sont proches de ceux de l'homme (1.4.1). Il est à noter que seule la régulation de la concentration cellulaire en Cu diffère entre l'homme et la levure (1.4.3). Les gènes codant pour les importateurs, les réductases et les exportateurs du Cu sont très conservés et codent pour des protéines dont la fonction et la structure sont également très conservées (1.4.2). Les mécanismes de transport du Cu sont ainsi très proches entre l'homme et *S. cerevisiae*. La levure, est par conséquent un bon organisme pour l'étude de l'effet du transport du Cu sur son fractionnement isotopique. Lors de cette thèse, nous avons démontré que c'est l'import du Cu qui est à l'origine du fractionnement isotopique du Cu (Chapitre 2). Nous avons également proposé que la composition en isotopes stables du Cu dépend linéairement du flux de Cu aux travers des importateurs à haute affinité du Cu (Chapitre 3). Ces résultats ouvrent la voie au développement de la mesure longitudinale de la composition en isotopes stables du Cu du sang afin de déterminer de manière non invasive le développement de certains cancers et l'apparition de résistance aux chimiothérapies à base de cisplatine (Chapitre 4).

1.1 Importance du cuivre dans les processus cellulaires

Dans cette section, nous montrerons que le Cu est un puissant réducteur (1.1.1). Cette propriété est à l'origine de nombreuses réactions enzymatiques rendant cet élément indispensable au vivant (1.1.2). Nous étudierons dans un second temps le transport de cet élément au sein des organismes pluricellulaires tels que l'homme. Il y passe du bol alimentaire aux cellules *via* le sang. Ce Cu transporté par le sang, passe ensuite dans les cellules. Dans celles-ci, nous montrerons qu'il est indispensable à des nombreux processus cellulaires, tels que la respiration (1.1.3).

1.1.1 Propriétés physico-chimiques du cuivre et disponibilité pour les êtres vivants

1.1.1.1 Physico-chimie du cuivre

Le Cu est un métal chalcophile de numéro atomique 29 et de masse 63.5 u (Tableau 1.1). À l'état solide, la structure électronique du Cu est [Ar] $3d^{10}4s^1$. Tout comme pour le Zn et le Fe, la dernière sous-couche électronique de ce métal est incomplète, il s'agit d'un métal de transition.

Le Cu utilisé par les êtres vivants est toujours en solution [Nord, 1970], sous forme d'ions cuivreux (Cu^+) ou sous forme d'ions cuivriques (Cu^{2+}). De par son haut potentiel de réduction, le Cu est facilement impliqué dans des liaisons ioniques. En solution (comme c'est le cas pour un système biologique), le Cu peut lier quatre anions. Cette propension à former des complexes permet au Cu d'être facilement lié aux acides aminés des protéines (tels que la méthionine) et est donc rarement sous forme libre au sein des cellules.

Le Cu est naturellement présent sur Terre, sous la forme de deux isotopes stables : le ^{63}Cu (69.2%) et le ^{65}Cu (30.8%) (Tableau 1.1, [webelements.com, 2017]).

Tableau 1.1 – *Propriétés principales du cuivre.*
Les propriétés principales du Cu sont données sur le site de la Royal Society of Chemistry [rsc.org, 2017] et La proportion de chaque isotope est donnée sur le site de webelements [webelements.com, 2017].

Propriétés	Cuivre
Numéro atomique	29
Configuration électronique	[Ar] $3d^{10}4s^1$
Masse atomique	63.55 u
Isotopes stables	^{63}Cu (69.2%) et ^{65}Cu (30.8%)

1.1.1.2 Biodisponibilité du cuivre

Le Cu est formé par nucléosynthèse stellaire. Sa concentration dans l'univers est de 0.06 mg/kg [webelements.com, 2017]. Ce métal de transition s'est concentré dans la croûte terrestre lors de la différenciation de cette dernière (sa concentration y est en moyenne de 70 mg/kg, Tableau 1.2). Il est à noter, que seul le Cu sous forme soluble est utilisable par les êtres vivants. Dans le milieu de vie des êtres vivants, la concentration en Cu soluble est relativement faible(<1mg/kg dans les sols, 0.01 - 2.8 mg/L dans l'eau douce et 10^{-4} mg/kg dans l'eau de mer, Tableau 1.2). Ce Cu biodisponible sera utilisé tel quel par les organismes autotrophes pour le carbone (par exemple les végétaux), qui vont concentrer le Cu (Tableau 1.2). Ils sont donc une source de Cu dans l'alimentation des hétérotrophes pour le carbone, comme c'est le cas de l'homme [Pais and Jones Jr, 1997; Wapnir, 1998].

Tableau 1.2 – *Concentration en cuivre dans les différents réservoirs terrestre et dans certains organismes vivants.*
Le Cu est présent dans l'environnement sous forme soluble et sous forme minérale. Seule la forme soluble est disponible pour les êtres vivants (biodisponible). La concentration en Cu dans certains organismes pluricellulaires a également été reportée (d'après Pais and Jones Jr [1997]).

Caractéristiques générales	**Abondance lithosphérique** : 70 mg/kg **Valence usuelle** : Cu^{2+}
Concentration lithosphérique	**Concentration dans les sols** : 2-100 mg/kg
Bio-disponibilité	**Concentration dans les sols sous forme soluble** : < 1mg/kg **Concentration dans l'eau de mer** : 8×10^{-5} mg/L **Concentration dans l'eau douce** : 0.01 - 2.8 mg/L
Concentration dans certains organismes	**Concentration humaine** : muscle, 10 mg/kg ; os, 1-26 mg/kg ; sang, 1.01 mg/L ; rein, 1.07-4.19 mg/kg ; urine, 6.1-30.3 µg/L ; cuir chevelu, 26 mg/kg **Concentration dans certains animaux** : 2.4 mg/kg ; lait de vache, 0.3 mg/kg **Concentration dans les plantes** : 1-10 mg/kg ; concentration de référence, 10 mg/kg **Concentration dans l'alimentation usuelle** : 3 - 80 mg/kg

1.1.2 Le cuivre : un élément indispensable pour le vivant

Le Cu est plus concentré dans les organismes vivants, que sous forme soluble dans les sols (1.1.1). Au début du siècle, des études portant sur les nutriments nécessaires au vivant ont montré que le Cu est nécessaire à la survie des mammifères [Hart et al., 1928] et à la survie des plantes [Arnon and Stout, 1939]. Les concentrations en Cu nécessaires à la survie des organismes sont faibles en comparaison d'autres éléments tels que le potassium. Ce type de nutriment est appelé micronutriment [Arnon and Stout, 1939]. Cependant, il est à noter que de fortes concentrations en Cu dans l'environnement peuvent être létales pour les différentes espèces présentes dans le milieu [Flemming and Trevors, 1989]. Pour l'homme, la dose de Cu létale est élevé est correspond à plusieurs centaines de µg de Cu

par kg. Le seul cas connu de mort par intoxication au cuivre était dû à une ingestion massive de pièce de monnaie. Pour ce patient une concentration en Cu hépatique de 1160 µg/kg (contre 7 µg/g dans le cas normal) a été mesurée [Yelin et al., 1987].

À l'échelle cellulaire, une forte concentration en Cu (1 mM) dans le milieu de vie entraîne une plus grande perméabilité de la membrane cellulaire [Ohsumi et al., 1988; Suwalsky et al., 1998]. À l'échelle moléculaire, le Cu sous forme libre réagit avec l'oxygène et forme des radicaux libres (autrement appelés dérivés réactifs de l'oxygène ou « *Reactive oxygen species* ») [Nies, 1999] tels que des radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$) [Gaetke and Chow, 2003] ou hydroperoxydes ($ROOOH^{\bullet}$) [Rodriguez-Montelongo et al., 1993] :

$$Cu(I) + H_2O_2 \longrightarrow Cu(II) + OH^{\bullet} + OH^{-} \qquad \text{(Equ.1)}$$

Ces radicaux vont notamment perturber la respiration mitochondriale entraînant la mort de la cellule. En raison de sa réactivité à l'échelle moléculaire, le Cu est à la fois un micronutriment et létal à haute concentration. Il est qualifié d'oligo-élément [Linder, 2001; Lutsenko, 2010].

1.1.3 De l'alimentation en cuivre à son utilisation dans les cellules humaines

Le Cu est un oligo-élément pour le vivant (1.1.2). Pour les organismes multi-cellulaires, il est distribué du bol alimentaire aux organes et aux cellules. Nous développerons ici le cas de l'homme (1.1.3.1). Dans les cellules, le Cu est intégré à de nombreuses protéines contenant du Cu (1.1.3.2). Afin de comprendre l'intérêt du Cu à l'échelle moléculaire, le fonctionnement de trois d'entre elles sera détaillé (1.1.3.3).

1.1.3.1 Distribution du cuivre du bol alimentaire vers les cellules

Chez l'homme, la quantité de Cu nécessaire est de 8 mg par jour. Dans l'alimentation occidentale, le Cu provient surtout des légumes (48%), des féculents (17%) et des protéines d'origine animale (17%) [Sandstead, 1982]. Une faible proportion de ce Cu (1mg) [Cousins, 1985; Linder and Hazegh-Azam, 1996; Turnlund et al., 1998] passe du bol alimentaire au sang dans les microvillosités intestinales. Il est ensuite transporté vers le foie, qui le stocke [Turnlund, 1998]. Du foie, le Cu se dirige vers les autres organes *via* le sang (Figure 1.1). Dans le compartiment sanguin, il est transporté par la céruloplasmine sérique, dont la structure sera détaillée par ailleurs (1.1.3.3). Cette protéine transporte 93% du Cu sanguin [Harris, 1991]. La concentration en Cu dans les organes dépend de la demande. Par exemple, les tissus riches en cellules musculaires, par conséquent en mitochondries et donc en cytochrome c contenant 3 hèmes de Cu, seront plus riches en Cu. En cas, d'excès de Cu celui-ci est ré-excrété dans les voies intestinales, *via* le duodénum ou *via* son trans-

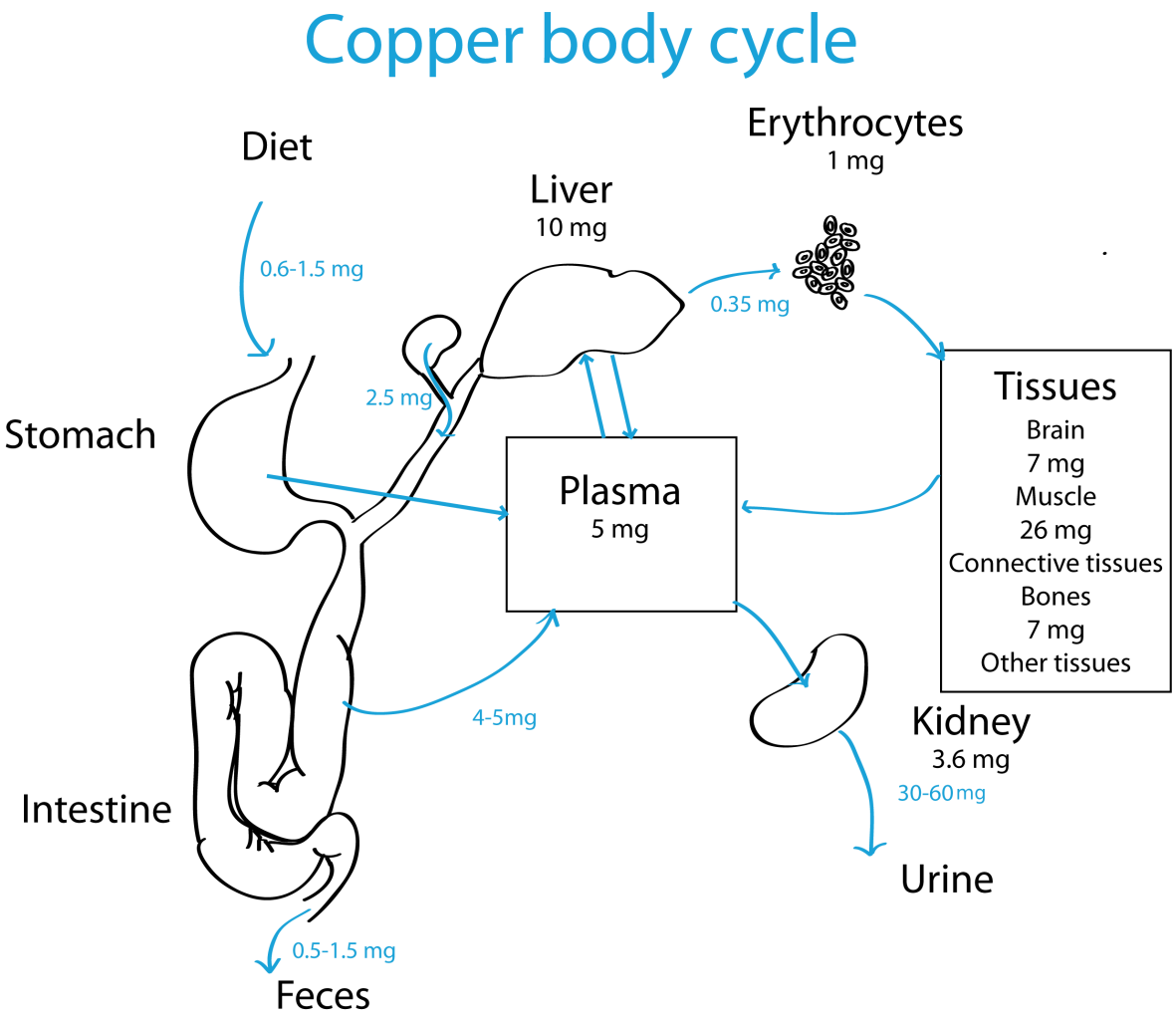


FIGURE 1.1 – ***Cycle métabolique du cuivre chez l'homme.***
Le Cu passe des nutriments ("Diet"*) à l'estomac (*"Stomach"*) et à l'intestin, (*"Intestine"*) où il passe dans le plasma ou dans les fèces. Il est stocké dans le foie (*"Liver"*) et délivré par le sang aux différents tissus. Il est excrété* via *le pancréas ou* via *le rein (*"Kidney"*) et l'urine (d'après Jaouen [2013]).*

fert du sang vers l'urée dans le rein (Figure 1.1). Le tableau 1.3 synthétise la concentration en Cu et les protéines associées au Cu dans les principaux tissus et organes humains.

Afin de comprendre le fonctionnement du cycle du Cu dans l'organisme, il convient de connaître le(s) temps de résidence dans ces différents réservoirs. Du Cu radioactif (^{64}Cu) a ainsi été intégré au bol alimentaire. Il a alors été observé que la radioactivité disparaît du sérum en deux heures et se retrouve à 40% dans le foie. Donc le foie stocke directement 40% du Cu intégré par l'organisme. Il se retrouve dans les autres organes trois jours après l'ingestion. Outre le stockage du Cu, le foie est l'acteur central du contrôle des concentrations en Cu dans l'organisme [Weiss and Linder, 1985].

Le Cu est distribué aux organes par le sang. Il reste à comprendre comment l'entrée du Cu se fait du sérum aux cellules. Dans le sang, le Cu est principalement lié à la céruloplasmine et à des métallothionéines. Son entrée dans la cellule se fait par les mêmes

Tableau 1.3 – *Masses de cuivre et protéines associées aux principaux organes impliqués dans le métabolisme du cuivre.*
Dans ce tableau est reportée la masse moyenne de Cu contenue dans les principaux organes ou tissus. Dans chaque organe ou tissus le Cu est principalement associé à une ou plusieurs protéines (d'après Jaouen [2013]). Dans les différents organes le Cu est importé via hCtr1p, et exporté via *hAtp7a ou hAtp7b : vers le milieu extracellulaire (MEC), vers le sang (Sg), vers la bile (B) ou vers le liquide céphalo-rachidien (LCR) (d'après Ohgami [2006]).*

Organes ou tissus	Masse de Cu (mg)	Protéines associées	Importateur(s) / Exportateur(s)
Plasma	5	céruloplasmine, albumine, transcupréine	
Hématies	1	superoxyde dismutase	hCtr1p/hAtp7a
Muscles	26	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	hCtr1p/hAtp7a (MEC)
Foie	10	métallothionéines, superoxyde dismutase	hCtr1p/hAtp7a et hAtp7b (B)
Cerveau	7	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	hCtr1p/hAtp7a (LCR), hAtp7b (Sg)
Rein	3.7	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	hCtr1p/hAtp7a (Sg)
Cœur	1.6	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	hCtr1p/hAtp7a (MEC)
Cheveux	0.4	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	hCtr1p/hAtp7a

voies d'entrée que le Cu provienne de la céruloplasmine ou des autres métallothionéines [Vulpe and Packman, 1995]. Dans les cellules, le Cu entre uniquement sous forme réduite. Or, il est transporté sous forme oxydé par la céruloplasmine. Il est ainsi réduit avant son entrée dans la cellule. Cette réduction se fait par des réductases de la famille des protéines STEAP (*"Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate"*). Le Cu entre alors activement dans la cellule, *via* des importateurs à haute affinité de la famille des protéines Ctr (*"Copper TRansporter"*). Les métaux de transition sont toxiques pour les cellules lorsqu'ils sont sous forme libre. Ainsi dans les cellules, ils sont complexés à différentes protéines, dont SOD 1 ("*SuperOxyde Dismutase 1*). Lorsqu'il est en excès, le Cu est excrété par la cellule (1.4.2).

1.1.3.2 Structures et diversité des différentes protéines contenant du cuivre

Dans les conditions physiologiques, le Cu peut avoir deux états d'oxydation (+1 ou +2). Grâce à ses propriétés, le Cu a été sélectionné comme catalyseur de réactions d'oxydo-

réduction (oxydases), au sein de protéines permettant le transfert d'électrons comme dans la chaîne respiratoire [Nord, 1970] ou dans les protéines impliquées dans le transport du Cu (Tableau 1.4). Dans ces protéines, le Cu change cycliquement d'état [Messerchmidt et al., 2004]. Comme le Cu est impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction, c'est un cofacteur essentiel au vivant [Karlin and Tyekelar, 1993]. Au sein des protéines on le retrouve lié de manière covalente aux acides-aminés au sein de centres Cu [Holm et al., 1996].

Tableau 1.4 – *Différentes classes de protéines contenant du cuivre.*
Liste de quelques classes de protéines et de leurs fonctions. Les cas de la cytochrome c oxydase et de la céruloplasmine seront discutés dans la partie 1.1.3.3 (adapté de [Nord, 1970]).

Protéines	Fonction	Exemples d'organismes exprimant cette protéine
Hémocyanine	Transporteur d'oxygène	Crustacés, arachnides, bivalves, gastéropodes
Erythrocupreine	Stockage et transport du cuivre	Mammifères
Azurine	Transport d'électrons	Eubactéries
Tyrosinase	Plusieurs fonctions d'oxydase	Métazoaires
Laccase	Oxydase	Plantes et champignons
Céruloplasmine	Protéine de transport du cuivre dans le sérum	Mammifères
Albumine	Protéine de transport du Cu dans le sérum	Mammifères
Monoamine oxydase	Oxydase	Eubactéries et mitochondries
Cytochrome c oxydase	Oxydase terminale de la chaîne respiratoire	Eubactéries et mitochondries

Le Cu se lie facilement aux acides aminés et est essentiel aux réactions d'oxydo-réduction du vivant. Ainsi, les gènes codant pour les protéines contenant du Cu sont soumis à une forte pression de sélection naturelle. De ce fait, ces protéines sont très conservées entre les trois domaines du vivant [Andreini et al., 2004] : 71% des protéines contenant du Cu des eubactéries ont des homologues dans les trois domaines du vivant. Le rôle de ces protéines est à 41% de maintenir l'homéostasie en Cu et à 43% de participer aux réactions d'oxydo-réduction. Il est à noter que 57% des protéines eucaryotes contenant du Cu sont spécifiques de ce domaine du vivant. Ceci est notamment le cas des protéines importatrices de Cu (*Ctr*) [Andreini et al., 2008]. Enfin, il est à noter que bien que le Cu soit un oligo-élément (le Cu ingéré correspond à 1 millionième du bol alimentaire), la propor-

tion de gènes codant pour des protéines contenant du Cu de l'homme et de *S. cerevisiae* correspond à 0.5% du génome total [Andreini et al., 2008]. Le Cu est ainsi présent dans une grande quantité de protéines au regard de sa concentration dans les tissus.

1.1.3.3 Exemples de protéines contenant du cuivre, dont l'activité est indispensable à la cellule

Afin de mettre en exergue l'importance du Cu dans la catalyse enzymatique nous allons détailler le fonctionnement de trois protéines contenant du Cu dont l'activité est vitale chez les mammifères. L'un des buts de cette partie est de comprendre comment le Cu est transporté *via* la céruloplasmine. L'autre but de cette partie est de comprendre le fonctionnement de la catalyse enzymatique par le Cu par l'étude de deux protéines : la cytochrome c oxydase et la protéine hSod1p.

La céruloplasmine est la protéine responsable du transport du Cu dans le sérum (Figure 1.2). Elle possède sept sites de liaison au Cu. Trois atomes de Cu sont intégrés à un seul et même groupe (groupe tri nucléaire), qui peut lier une molécule d'eau. Les atomes de Cu y sont liés à des Met. Les quatre autres atomes de Cu sont présents dans des sites mononucléaires et sont liés à une Cys et deux His. Cette protéine sérique permet ainsi le transport de 7 atomes de Cu.

La cytochrome c oxydase est une des protéines entrant en jeu dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette protéine transmembranaire contient deux centres Cu [Iwata et al., 1995]. Ces centres Cu se situent dans la partie membranaire de la protéine (IIa, Figure 1.3). Le centre Cu_A est responsable de la prise en charge d'électrons de la cytochrome c soluble (cytochrome c_{552}). Il délivre ensuite ses électrons à l'hème a_{S3}/Cu_B (Figure 1.2 et 1.3). Cet hème est alors responsable de la réduction du dioxygène moléculaire en eau (Figure 1.3, [Ostermeier and Michel, 1997]). Le Cu a donc un rôle majeur dans la respiration cellulaire.

La superoxyde dismutase 1 (Sod1p) est une protéine présente dans toutes les cellules eucaryotes hétérotrophes pour le carbone. La respiration cellulaire engendre des déchets hautement toxiques pour la cellule : les radicaux libres de l'oxygène. La protéine hSod1p catalyse la réaction de détoxification de ces radicaux libres de l'oxygène en transformant ceux-ci en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène. Le site actif de chaque sous-unité de cette protéine présente un Cu lié à trois His (Figure 1.2). Le Cu est donc nécessaire à l'activité de détoxification de la protéine Sod1p. Si cette protéine est non-fonctionnelle, ceci peut entraîner des maladies graves telles que le cancer ou la maladie d'Alzheimer.

Dans les trois protéines contenant du Cu étudiées ci-dessus, la quantité de Cu dans les protéines est minime : le Cu est un oligoélément à l'échelle moléculaire mais son implication dans la catalyse est majeur. Il est intéressant de remarquer que dans toutes ces protéines le Cu est lié à des acides aminés particuliers : la Met, la Cys et l'His.

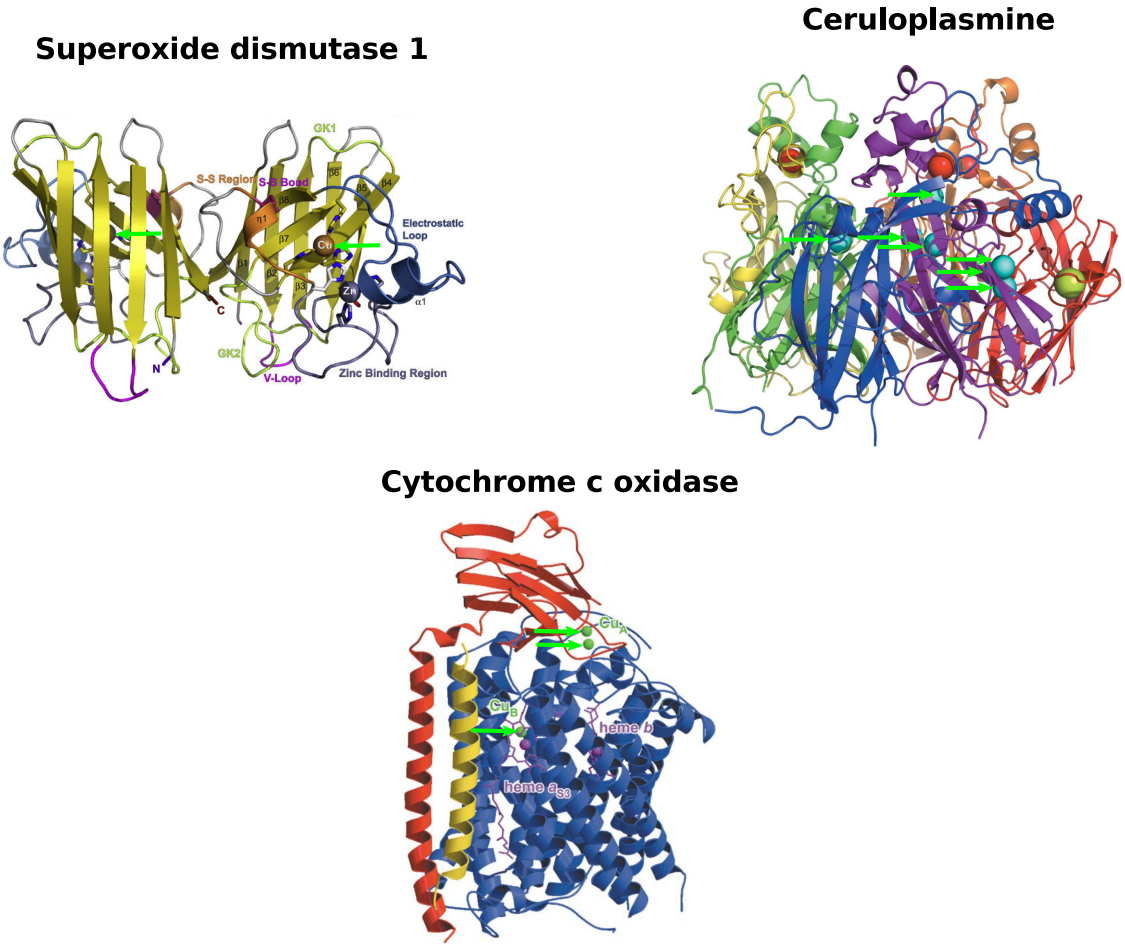


FIGURE 1.2 – ***Représentation des structures tertiaires de la superoxyde dismutase 1, de la céruloplasmine et de la cytochrome c oxydase. La position des atomes de cuivre est indiquée par une flèche verte.***

Dans ces trois représentations les hélices alpha sont représentées par des hélices, les feuillets bêta par des flèches et les liaisons simples par des tiges.

(Haut-Gauche) *Structure tertiaire de la superoxyde dismutase 1 humaine. Le Cu et le Zn sont présents dans le centre réactionnel de cette protéine [Perry et al., 2005].*

(Haut-Droite) *Structure tertiaire de la céruloplasmine humaine, une des protéines de transport du Cu dans le sang. Cette protéine lie 7 atomes de Cu (en bleu), 3 atomes de sodium (en rouge) et un atome de calcium (en jaune). On distingue 3 atomes de Cu au sein d'un site tri nucléaire (à droite de la protéine) et 4 atomes présents dans 4 centres mononucléaires [Bento et al., 2007].*

(Bas) *Représentation de la structure tertiaire de la cytochrome c oxydase de* T. Thermophilus *dans une vue parallèle à la membrane. Les trois sous-unités I, II et IIa sont représentées respectivement en bleu foncé, en rouge et en jaune. Les atomes de Cu sont représentés par des boules vertes [Messerchmidt et al., 2004].*

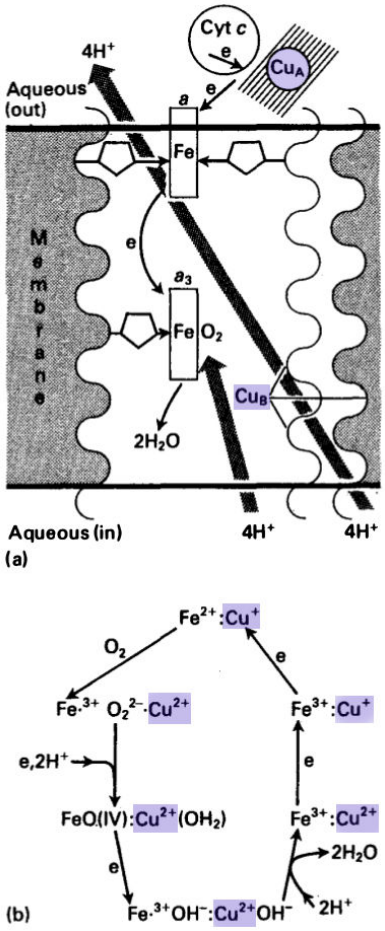


FIGURE 1.3 – *Importance du cuivre dans la chaîne respiratoire.*
(a) *Schématisation de la structure de la cytochrome c oxydase qui par le transfert d'électrons permet la réduction du dioxygène en eau et forme un gradient de protons (4 H^+). Les parties de la protéine possédant un centre Cu sont surlignées en bleus (adapté de Fraústo da Silva and Williams [2001]).*
(b) *Étapes intermédiaires des réactions de la cytochrome c oxydase. Les étapes où le Cu est indispensable sont surlignées en bleues (adapté de Fraústo da Silva and Williams [2001]).*

1.2 Maladies humaines liées à des défauts du métabolisme du cuivre

Nous venons de montrer que le Cu est indispensable au vivant, et est impliqué dans l'activité de nombreuses protéines, dont certaines sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (1.1.3). Au vu de son importance, un changement du métabolisme du Cu des organismes pluricellulaires eucaryotes entraîne le développement de maladies. Dans un premier temps, nous décrirons deux maladies (la maladie de Menkes et la maladie de Wilson), dont les causes sont liées à la mutation des gènes codant pour les exportateurs du Cu (1.2.1). Ces deux maladies montrent qu'un changement global du transport cellulaire du Cu a des effets délétères. Si de telles mutations apparaissent localement, ceci devrait mener à des effets délétères locaux. Lors du développement de cancers certaines mutations locales apparaissent. Ces mutations peuvent être un avantage pour le développement de la cellule cancéreuse et donc favoriser la carcinogenèse. Nous montrerons que le développement de cancers est associé dans de nombreux cas à un changement du métabolisme du Cu (1.2.2). Nous développerons ensuite l'origine cellulaire de ces changements (1.2.2.3). Enfin, l'utilisation de chimiothérapie induit une pression de sélection sur les cellules tumorales. Cette pression de sélection aboutit parfois à la sélection de mutations permettant aux cellules de survivre au traitement. Pour les traitements chimiothérapiques à base de platine, cette résistance acquise est parfois liée à des mutations dans les gènes codant pour les protéines important et exportant le Cu dans les cellules (1.2.3).

1.2.1 Maladies liées à un changement global du métabolisme du cuivre

Deux maladies sont directement liées à un trouble global du métabolisme du Cu : la maladie de Menkes et la maladie de Wilson. La première est une maladie gonosomale récessive qui touche 1 garçon sur 250 000 et qui entraîne une mort rapide du nourrisson [Menkes et al., 1962]. La seconde est une maladie autosomale récessive qui touche 1/100 000 personnes [Wilson, 1912]. Ces deux maladies sont dues à une mutation génique entraînant un mauvais transport intra-membranaire du Cu [Danks, 1989], en raison de l'absence d'exportateur du Cu cellulaire (hAtp7a) [Chelly et al., 1993; Vulpe et al., 1993] dans le cas de la maladie de Menkes et d'exportateur du Cu des cellules hépatiques (hAtp7b), dans le cas de la maladie de Wilson [Tanzi et al., 1993]. Ces mutations entraînent une accumulation du Cu dans la cellule qui y engendre une sur-concentration de radicaux libres. Ceci a des conséquences délétères et entraîne la mort des cellules neuronales dans le cas de la maladie de Menkes. Dans le cas de la maladie de Wilson, la sur-concentration en Cu dans le sang entraîne des problèmes graves tels que des hépatites.

1.2.2 Cancer et perturbation du métabolisme du cuivre

1.2.2.1 De la compréhension de la diversité des cancers à la recherche de biomarqueurs

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une croissance anormale et incontrôlée de cellules au sein d'un organe (Figure 1.4). Ces cellules, forment des amas non fonctionnels que l'on nomme tumeurs.

Le développement de ces tumeurs s'accompagne de l'acquisition d'une ou plusieurs caractéristiques cellulaires spécifiques que l'on peut regrouper en 6 grandes catégories (Figure 1.5, Hanahan and Weinberg [2011]).

Ces 6 caractéristiques sont les suivantes :

– **Expression cellulaire de signaux prolifératifs (*Sustaining proliferative signaling*).** Ces signaux prolifératifs activent des voies cellulaires induisant l'expression de facteur de croissance. L'un des exemples caractéristique est l'activation de RAS (gène oncogène du virus du sarcome) [Hahn and Weinberg, 2002].

– **Résistance aux inhibiteurs de croissance (*evading growth suppressors*).** Lorsque cette résistance est acquise les cellules cancéreuses résistent aux signaux inhibiteurs de la croissance cellulaire. L'une des mutations communes menant à cela est une mutation du gène p53 [Amin et al., 2015].

– **Cellules invasives et prolifératives (*activating invasion and metastasis*).** Dans les organismes pluricellulaires, les cellules ont une localisation particulière (par exemple dans le tissus épithélial) déterminée par les interactions avec les cellules voisines. Lorsqu'une cellule cancéreuse devient invasive, elle ne répond plus à ces signaux et peut envahir les tissus environnants (comme le tissu conjonctif par exemple). Lorsque ces cellules, ont la capacité d'envahir le réseau sanguin on parle de métastase. L'acquisition de ces caractéristiques se fait souvent par une mutation des protéines d'ancrage cellulaire [Martin et al., 2013].

– **Réplication à l'infini (*enabling replicative immortality*).** Les cellules cancéreuses pouvant se diviser à l'infini, c'est à dire échappant au contrôle du cycle cellulaire, seront sélectionnées positivement par le processus de carcinogenèse. Les mutations entraînant cela affectent préférentiellement les protéines de contrôle du cycle cellulaire telles que les cyclines.

– **Induction de l'angiogenèse (*inducing angiogenesis*).** L'angiogenèse est la formation de capillaires sanguins dans un tissu. L'induction de l'angiogenèse induit un plus grand apport de dioxygène et de nutriments au tissus. C'est un facteur de croissance de la tumeur. Une des mutations pouvant entraîner l'angiogenèse est une mutation de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [Nishida et al., 2006].

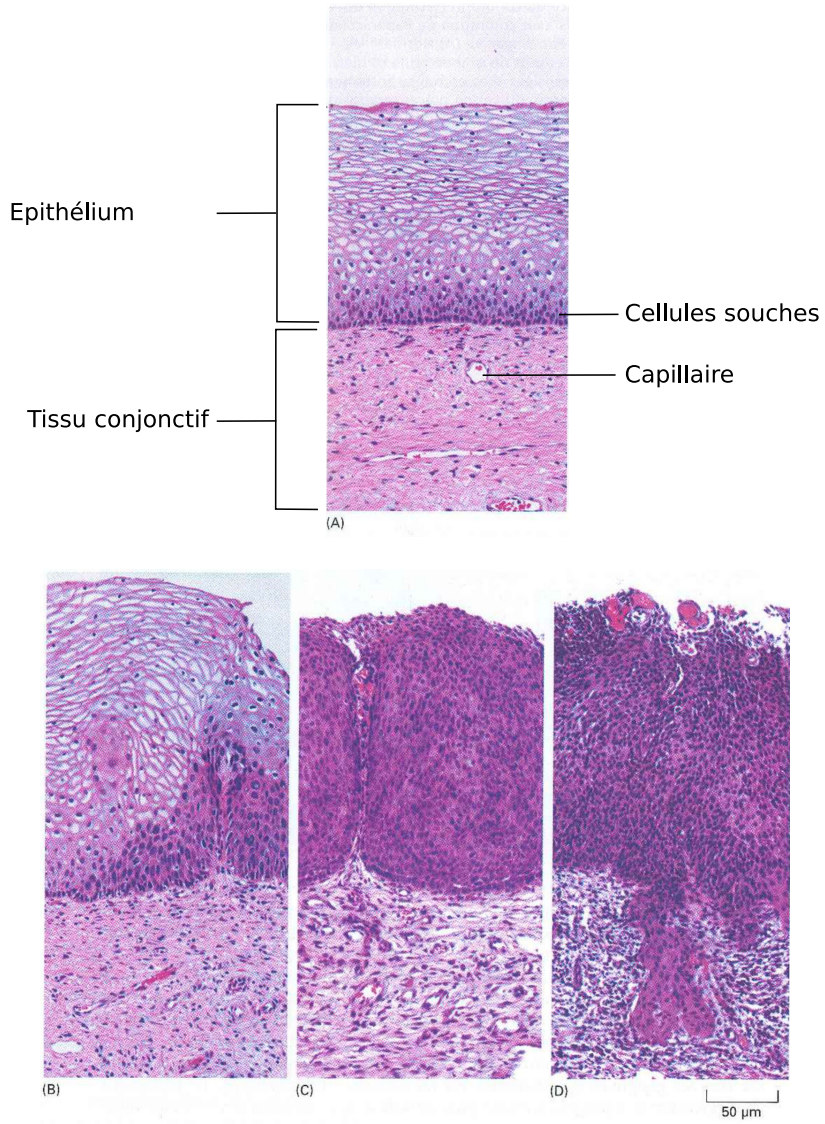


FIGURE 1.4 – ***Microphotographies du développement d'une tumeur utérine. Le stade le plus invasif est à droite.***

(A) *Tissus sain. On distingue sur la face basale du tissu, de nombreuses cellules souches (rapport nucléo-cytoplasmique élevé).*

(B) *Phase I du cancer. Les cellules souches devenues cancéreuses se divisent de manière incontrôlée et se développent dans le tissu épithélial.*

(C) *Phase II du cancer. Les cellules cancéreuses ont envahi l'intégralité du tissu épithélial et commencent à envahir le tissus conjonctif.*

(D) *Phase métastatique du cancer. Les cellules cancéreuses ont envahi le tissu conjonctif et peuvent migrer dans les vaisseaux sanguins. Dans ce cas, elles peuvent envahir d'autres organes (d'après Alberts et al. [2014]).*

– Résistance à la mort cellulaire (*resisting cell death*) . Lorsqu'une cellule accumule trop de mutations ou a un métabolisme anormal, des signaux de mort cellulaire sont exprimés par la cellule. Ces signaux induisent l'apoptose. Certaines cellules cancé-

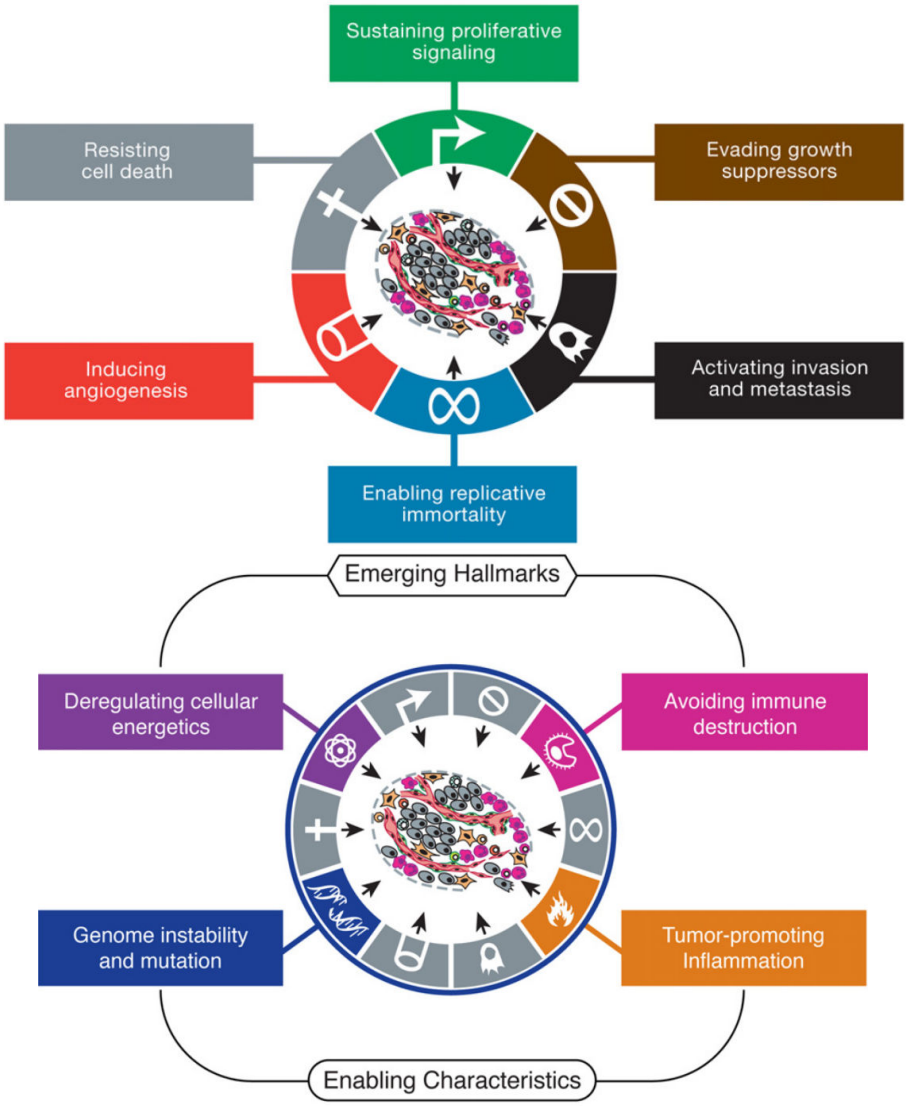


FIGURE 1.5 – *Les différentes caractéristiques des cellules cancéreuses.*
*(Haut) Les six caractéristiques principales des cellules cancéreuses. Elles peuvent exprimer des signaux prolifératifs (*Sustaining proliferative signaling*), résister aux inhibiteurs de croissance (*evading growth suppressors*), être invasives et/ou métastatiques (*activating invasion and metastasis*), se répliquer à l'infini (*enabling replicative immortality*), induire l'angiogenèse (*inducing angiogenesis*) et résister à la mort cellulaire (*resisting cell death*).*
*(Bas) Les caractéristiques émergentes (*emerging hallmarks*) et les caractéristiques permettant le développement du cancer (*enabling characteristics*). Les caractéristiques émergentes du cancer sont la dérégulation du métabolisme énergétique (*deregulating cellular energetics*) et la résistance à la destruction par le système immunitaire (*avoiding immune destruction*). Les caractéristiques cellulaires permettant le développement du cancer sont l'activation de l'inflammation (*tumor-promoting inflammation*) et l'instabilité du génome ainsi que l'accumulation de mutations (*Genome instability and mutation*) (d'après Hanahan and Weinberg [2011])*

reuses ne répondent plus à ces signaux cellulaires. Les cellules cancéreuses peuvent moduler ou échapper à leurs apoptoses *via* des mécanismes traductionnels, trans-

criptionnels et post-transcriptionnels [Fernald and Kurokawa, 2013].

A ces caractéristiques générales s'ajoutent des caractéristiques émergentes (Figure 1.5, Hanahan and Weinberg [2011]). La première est la dérégulation du métabolisme énergétique (*deregulating cellular energetics*). En raison du sur-développement des cellules cancéreuses, celles-ci se retrouvent souvent dans un environnement hypoxique dans lequel la respiration aérobie est peu efficace. Ainsi, une émergente lors du développement d'un cancer est la dérégulation des voies du métabolisme énergétique. La seconde est la résistance des cellules cancéreuses au système immunitaire (*avoiding immune destruction*). Lors du développement d'un cancer, le système immunitaire tend à détruire les cellules cancéreuses. Les cellules qui résisteront au système immunitaire seront alors favorisées.

Enfin, toutes les caractéristiques que nous avons décrites émanent de deux grandes propriétés des cellules cancéreuses (Figure 1.5, Hanahan and Weinberg [2011]). La première est la grande instabilité du génome des cellules cancéreuses et un fort taux de mutation (*Genome instability and mutation*). Cette grande plasticité génique entraîne une grande diversité génétique des cellules cancéreuses d'un même organisme. Cette diversité permet de pallier les variations du milieu. La seconde est de promouvoir l'inflammation (*Tumor-promoting inflammation*). La promotion de l'inflammation par les cellules cancéreuses active localement le système immunitaire. Ceci résulte en la sélection des cellules cancéreuses les plus actives.

Les caractéristiques du cancer montre bien la pluralité de l'ensemble des gènes et protéines pouvant être impliqués dans son développement. Afin de tracer la transition entre les différents états du cancer, des marqueurs ont été recherchés. Ces marqueurs sont qualifiés de biomarqueurs [Strimbu and Tavel, 2010]. Ils doivent pouvoir être mesurés de manière précise et reproductible.

1.2.2.2 Mise en évidence d'une perturbation du métabolisme du cuivre lors du développement de cancers

Afin de tracer la transition de cellules tumorales bénignes vers des cellules métastatiques, des biomarqueurs sanguin et tumoraux ont été recherchés. Par exemple, la concentration en éléments traces, tels que le Cu, a été mesurée dans différents types de cancers. Il a été montré que la concentration en Cu dans le sérum augmente avec le développement de leucémies [Delves et al., 1972; Ilicin, 1971; Mortazavi et al., 1972] et de lymphomes [Hrgovcic et al., 1973; Mortazavi et al., 1972; Roguljić et al., 1980]. Il est à noter que dans les cancers des voies oto-rhino-laryngologiques (ORL) et des cancers cérébraux, la concentration de Cu dans le sérum ne change pas avec le développement de la maladie [Garofalo et al., 1980].

Ces études sur des cancers plutôt peu fréquents (les leucémies ne représentent que

Tableau 1.5 – *Concentration en cuivre dans le sérum de patients atteints d'un cancer comparée à la concentration en cuivre dans le sérum de sujets sains.*
Le nombre de patients ayant participé à l'étude est noté entre crochets. Pour tous les cancers, la concentration en Cu dans le sérum de sujets malades est supérieure à la concentration en Cu dans le sérum de sujets sains (d'après Zowczak et al. [2001]).

Type de cancer	[Cu] (µmol/L)	[Cu] (µmol/L) du groupe contrôle
Sein	23.9 ± 3.4 [8]	15 ± 1.8 [21]
Poumon	22.9 ± 6.2 [14]	
Gastro-intestinal	20.1 ± 3.2 [26]	
Gynécologique	26.2 ± 7.0 [14]	

1% des cancers) ont été également menées sur d'autres plus fréquents, tels que le cancer du sein ou du poumon. Il a ainsi été montré que la concentration en Cu dans le sérum de ces patients atteints de ces maladies était significativement supérieure aux concentrations de Cu chez les personnes saines (Tableau 1.5). Comme le développement de cancers entraîne une augmentation de la concentration en Cu dans le sang [Zowczak et al., 2001], il est possible que la tumeur soit moins concentrée en Cu. Afin de comprendre l'origine de cette différence, des cellules tumorales humaines ou murines ont été introduites dans des souris (respectivement HCT et B16, Figure 1.6). La concentration en Cu dans des souris atteintes de mélanome (min, Figure 1.6) a également été étudiée. Dans les trois cas de figure, les concentrations en Cu mesurées dans le sérum ont été comparées à un groupe contrôle où aucune tumeur n'a été introduite dans les souris (HCT et B16) ou dans un groupe n'ayant pas développé de mélanome. Dans tous les cas de figure, la concentration en Cu dans le sérum du groupe contrôle (groupe sain) est inférieure à la concentration en Cu du sérum des souris atteintes de cancer. Par ailleurs, l'ajout externe de cellules tumorales dans une souris saine entraîne une augmentation de la concentration en Cu proche de celle observée chez des souris atteintes de cancers [Babich et al., 2013]. L'ajout de cellules tumorales dans une souris saine entraîne une augmentation de la concentration en Cu dans le sérum. Il est ainsi probable que les cellules tumorales relarguent du Cu dans le sérum.

Étant donné ce lien entre la concentration en Cu et le développement de cancers, la concentration en Cu dans le sérum a été étudiée chez l'homme afin d'en faire un biomarqueur pronostique. Ainsi, le Copper Status Index (CSI) a été développé. Cet index prend en compte la concentration sanguine en Cu, l'activité oxydante de la Céruloplasmine (la protéine permettant le transport du Cu dans le sérum) et son immunoréactivité. Ce biomarqueur a été étudié dans différents types de cancers et de cellules souches de cancer.

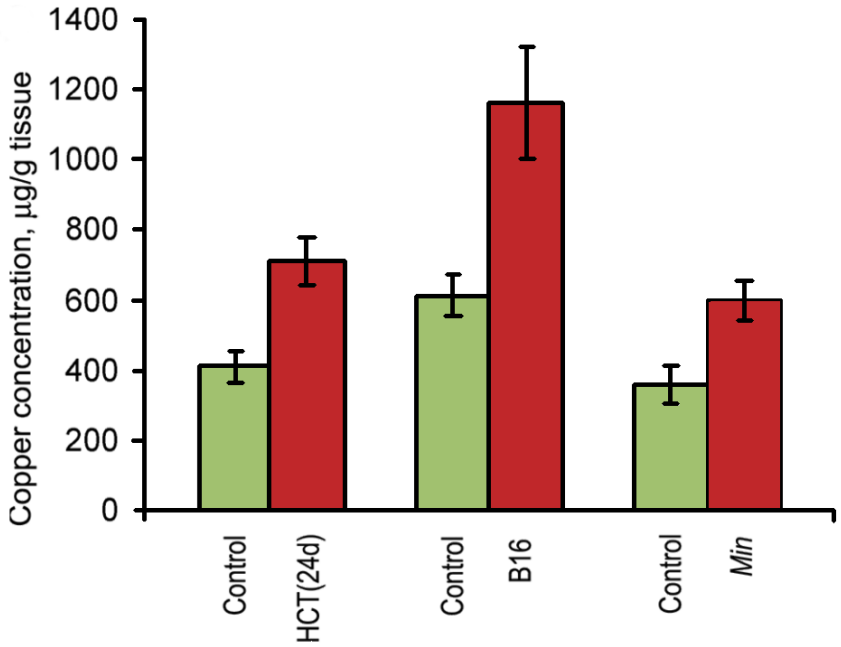


FIGURE 1.6 – ***Comparaison de la concentration en cuivre dans le sérum de trois lignées de souris atteintes de tumeurs (rouge) par rapport à des souris saines (vert).***
La lignée HCT correspond à des souris où des cellules souches de cancer colorectal humain ont été implantées. La lignée B16 correspond à des souris où des cellules de mélanome murin ont été implantées. La lignée min *correspond à des souris ayant développé un mélanome murin. Ces souris sont comparées à des souris saines ayant vécu dans les mêmes conditions (*control*) (d'après Babich et al. [2013]).*

Ainsi, dans 48 publications sur 51, le CSI augmente avec le développement du cancer et dans 26 de ces publications, le CSI peut être utilisé comme un biomarqueur pronostique du développement de cancers (Figure 1.7). Cependant, il est à noter que même si le CSI est supérieur dans la plupart des cancers, sa valeur est très variable selon les patients ce qui empêche son utilisation en pratique [Babich et al., 2013].

S'il y a une corrélation entre la concentration en Cu dans le sérum et le développement de tumeurs, il convient de comprendre son origine. Il est intéressant de noter que des souris atteintes de cancer et nourries avec de l'eau enrichie en Cu présentent un volume tumoral plus important (Figure 1.8). De ce fait, une augmentation de la concentration en Cu dans le sérum favorise la carcinogenèse. Du point de vue cellulaire, le lien entre le métabolisme du Cu et la carcinogenèse est bien documenté. Il a ainsi été montré qu'une dérégulation du transport du Cu entraîne une accumulation de Cu libre. Ceci est corrélé avec une progression de la tumeur. Par ailleurs, le Cu active de nombreux facteurs oncogéniques (Figure 1.9) tels que :

- le facteur VEGF " *vascular endothelial growth factor* ", un facteur angiogénique [Easter et al., 2010; Finney et al., 2007; Gérard et al., 2010].

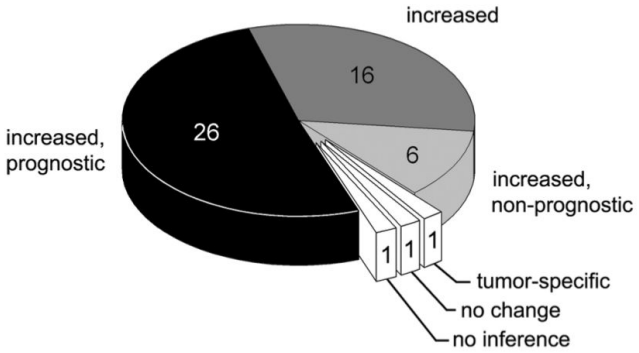


FIGURE 1.7 – *Méta-analyse du potentiel du "*Copper Status Indexes *(CSI)" comme biomarqueur pronostique du cancer.*
Cette méta-analyse quantifie le nombre d'articles ayant étudié l'évolution du CSI lors du développement d'un cancer. Plus de la moitié d'entre eux montre que le CSI peut être utilisé comme un biomarqueur pronostique du développement de cancers (d'après Babich et al. [2013]).

- la liaison de VEGF avec son récepteur favorise la migration tumorale et ainsi le développement de métastases [Fan et al., 2005; Wey et al., 2005; Yang et al., 2006].

- une surexpression des protéines "*Lysil oxidase like* (LOXL)" entraînant une plus grande motilité et mobilité des cellules tumorales et favorisant le développement de métastases [Payne et al., 2007; Schietke et al., 2010].

- une stabilisation de HIF 1α qui active les voies métaboliques anaérobies [Martin et al., 2005; Wenger, 2002], typiques des cellules cancéreuses pouvant survivre loin des vaisseaux sanguins.

De ce fait, le Cu est un des acteurs qui entraîne le passage d'un phénotype de cellules saines vers un phénotype de cellules cancéreuses. L'activation des LOXL par exemple peut être à l'origine du passage d'un cancer peu invasif à un cancer métastatique. Il est à noter que le Cu peut favoriser l'apoptose *via* la déstabilisation des liaisons " *X-linked inhibitor of apoptosis protein* " avec les caspases (Figure 1.9, [Burstein2004, Mufti2005]). C'est un mécanisme anti-oncogénique. Le Cu est donc majoritairement un facteur oncogène et dans une moindre mesure un facteur anti-oncogène.

1.2.2.3 Origine cellulaire de l'altération de l'homéostasie du cuivre lors du développement d'un cancer

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité de SOD1 nécessite du Cu. Son inactivité peut conduire au cancer. L'une des protéines impliquée dans l'entrée du Cu dans la cellule est le transporteur transmembranaire Ctr1p (1.4.2). Ainsi, la perte du gène codant pour cette protéine induit une diminution du taux de Cu intracellulaire et donc une diminution de la quantité de SOD1. Par ailleurs, cette intrication entre le métabolisme du Cu

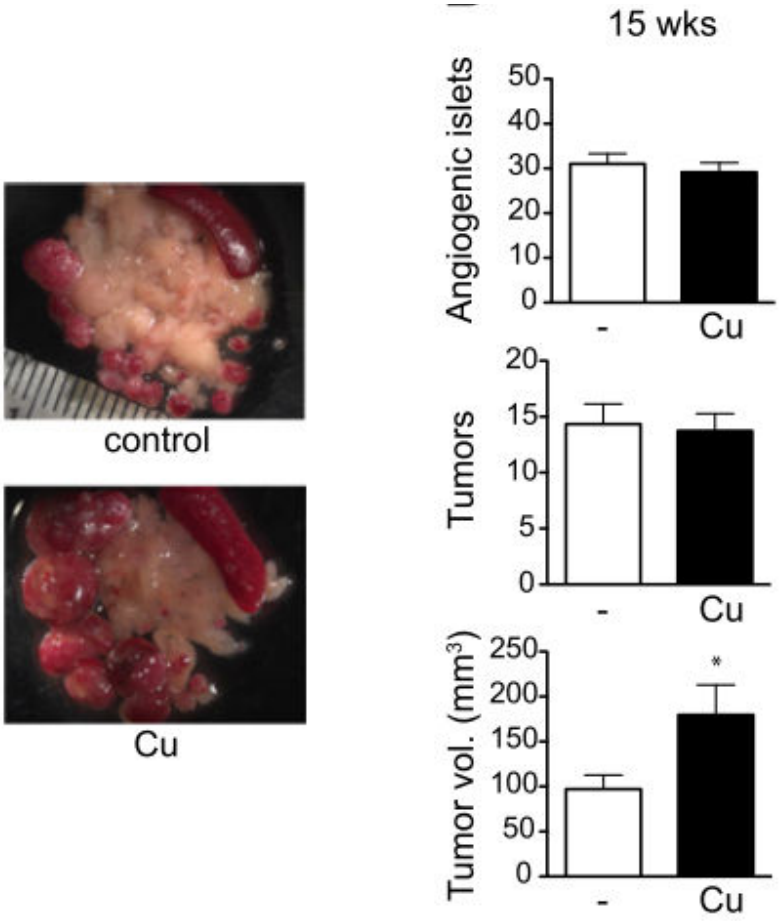


FIGURE 1.8 – ***Effet du cuivre sur le développement tumoral chez la souris.***
Des souris génétiquement modifiées et atteintes d'un cancer pancréatique ont été nourries avec de l'eau contenant 20 µM de Cu (Cu) ou de l'eau sans Cu.
(Gauche) *: Dissection des tumeurs pancréatiques après 15 jours de nourrissage en présence (absence) de Cu. Le pancréas sain se distingue par sa couleur blanche. En haut à droite de l'image on distingue la rate. Les tissus sphériques rouges sont des tumeurs. Une alimentation riche en Cu induit ainsi une augmentation de la taille des tumeurs.*
(Droite) *: Quantification du nombre d'îlots d'angiogenèse (*"Angiogenic islets"*), du nombre de tumeurs (*"tumors"*) et du volume des tumeurs (*"Tumor vol"*) en fonction d'une alimentation avec du Cu (Cu) ou sans Cu (-). Une alimentation riche en Cu entraîne une augmentation de la taille de la tumeur (d'après Ishida et al. [2013]).*

et SOD1 va plus loin. En effet, il a été récemment démontré que, par son contrôle du taux de Cu intracellulaire, Ctr1p est impliquée dans la voie de signalisation MAPK (*"Mitogen Activated Protein Kinase"*), qui elle-même a un rôle dans le développement de cancers [Tsai et al., 2012]. Ainsi, une protéine transmembranaire impliquée dans l'homéostasie du Cu a un rôle majeur dans la carcinogenèse.

Cette intrication entre le métabolisme cellulaire du Cu et le développement du cancer peut également être observée pour les réductases du Cu membranaire : les protéines

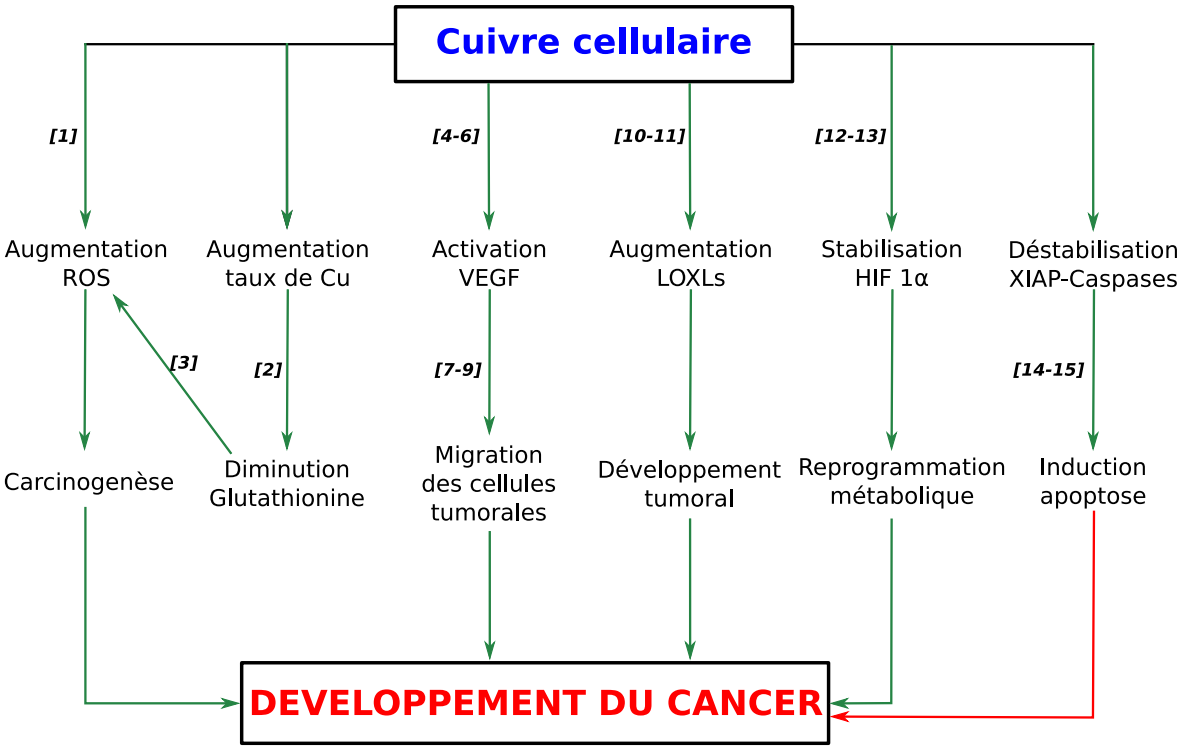


FIGURE 1.9 – *Impact du cuivre sur le développement du cancer.*
Le Cu peut entraîner le développement d'un cancer, via : l'augmentation de la quantité de ""Reactive oxygen species" *(ROS)" ([1] : [Valko et al., 2006]), la diminution du taux de Glutathionine ([2] : [Linder, 1991]) qui entraîne l'augmentation de la quantité de ROS ([3] : [Steinebach and Wolterbeek, 1994]), l'activation d'agents angiogéniques tels que le "Vascular endothelial growth factor (VEGF)" ([4-6] : [Easter et al., 2010; Finney et al., 2007; Gérard et al., 2010]) qui entraîne la migration des cellules tumorales ([7-9] : [Fan et al., 2005; Wey et al., 2005; Yang et al., 2006]), l'augmentation du taux de "Lysil oxidase like proteins (LOXLs)" qui entraîne un développement de la tumeur ([10-11] : [Payne et al., 2007; Schietke et al., 2010]) et enfin la stabilisation de HIF 1α qui entraîne une reprogrammation métabolique vers des voies anaérobies ([12-13] : [Martin et al., 2005; Wenger, 2002]). Grâce à l'activation de voies apoptotiques, la liaison Caspases-XIAP ("*X-linked inhibitor of apoptosis protein*"), est le seul mécanisme dépendant du Cu qui inhibe (rouge) le développement du cancer ([14-15] : [Burstein et al., 2004; Mufti et al., 2005]).*

STEAP. Le détail du fonctionnement de ces protéines sera détaillé en 1.4.2. Il est cependant à noter que les deux principales réductases du Cu sont STEAP3 et STEAP4 [Knutson, 2007]. Le Cu étant impliqué dans le développement de nombreux cancers, l'activité de ces réductases et plus particulièrement de STEAP3 a été étudiée en relation avec le développement du cancer du foie. Celui-ci peut se caractériser par une transition d'un état cirrhotique vers un état cancéreux. Les quantités d'ARNm de STEAP3 présents dans les cellules et des protéines STEAP3 présentent dans la membrane plasmique ont ainsi été mesurées dans des patients atteints de cancers du foie. La quantité d'ARNm codant pour STEAP3 est nettement plus faible chez les patients atteints de cancer (ES1 à ES4) que dans les foies

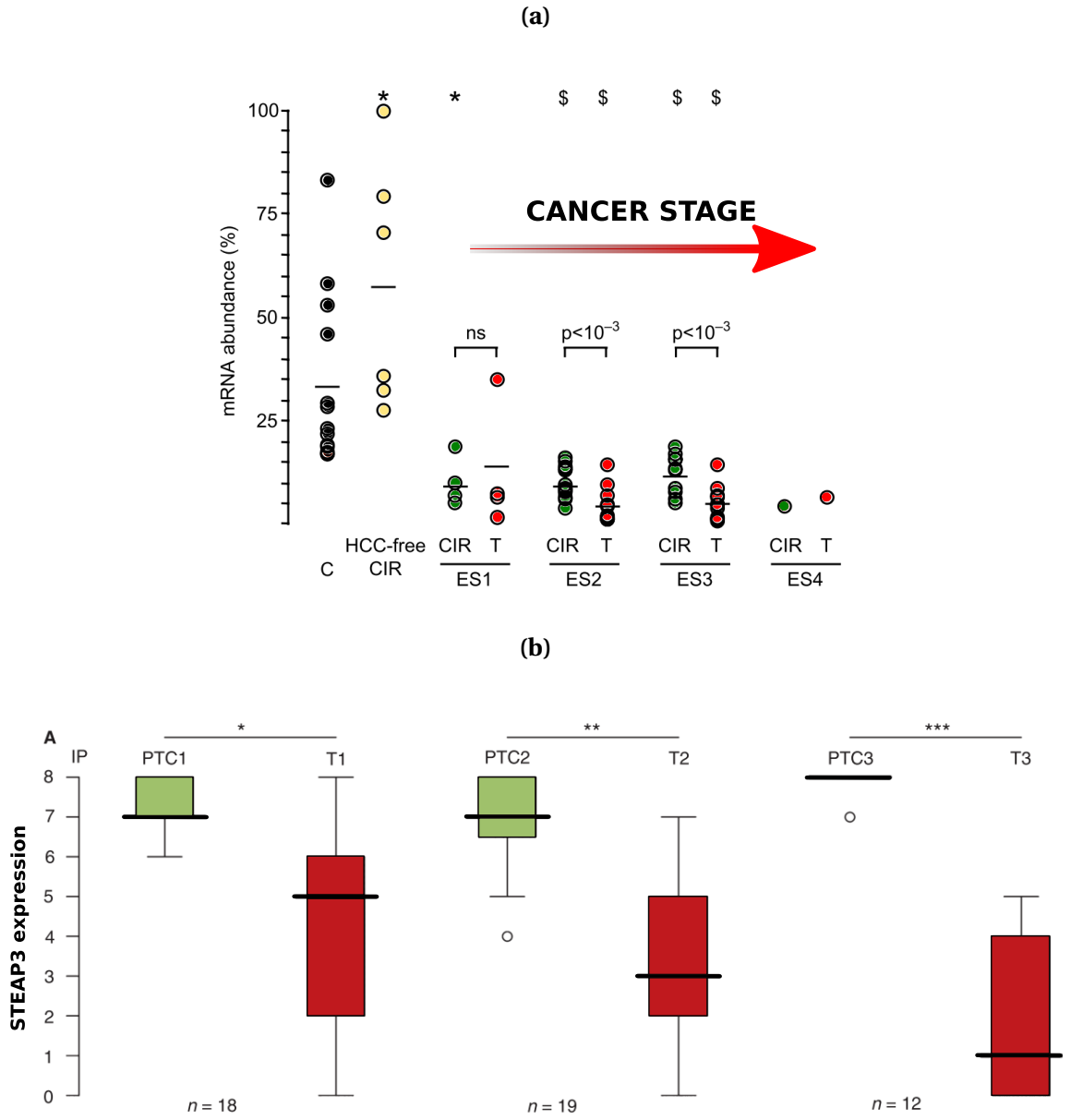


FIGURE 1.10 – ***Expression d'une des réductases membranaire du cuivre (STEAP 3) et développement des cancers hépatiques.***

(a) *Niveau d'expression de l'ARNm de STEAP3 dans des patients atteints de cancer (ES) comparé à des sujets sains (C) et des sujets atteint de cirrhose (HCC-free CIR). Pour chaque patient atteint de cancer, le niveau d'expression dans la partie cirrhotique (C) est comparé au niveau d'expression dans la partie tumorale (T). Les stades ES1 à ES4 correspondent à 4 stades du cancer, du plus bénin au plus malin. Une diminution de l'expression de l'ARNm de STEAP3 est observée chez les patients atteints de cancer. Plus, le cancer est avancé plus ce niveau est bas (d'après Coulouarn et al. [2005]).*
(b) *Quantité de STEAP3 dans la membrane de cellules tumorales hépatiques quantifiée par immunohistochimie. Ici, trois stades de cancer sont étudiés. Pour chaque cas, le niveau d'expression de STEAP3 dans les cellules cirrhotiques (PTC) est comparé au niveau d'expression dans les cellules tumorales (T) du même patient. Dans tout les cas, STEAP3 est sous-exprimé dans les cellules tumorales (d'après Caillot et al. [2009]).*

de sujets sains (C). Par ailleurs, le niveau d'expression de cet ARNm est supérieur dans les parties cirrhotiques (en vert) à son expression dans les parties tumorales (en rouge) (Figure 1.10, [Coulouarn et al., 2005]). Donc, une des réductases du Cu est moins exprimée au sein des tissus hépatiques cancéreux. Par ailleurs, la quantification par immunohistochimie de la protéine hSteap3p sur la membrane de cellules péri-tumorales (PTC) et tumorales (T) a montré que hSteap3p est moins produite dans les cellules tumorales. Ce niveau de production est d'autant plus bas que le cancer est grave (phase terminale ou phase 3, Figure 1.10, [Caillot et al., 2009]). Ainsi, la quantité de hSteap3p peut être utilisée comme biomarqueur pronostique de la transition de l'état cirrhotique à l'état cancéreux chez les patients atteints de cancer du foie. Plus le niveau d'expression de STEAP3 est bas, plus la probabilité d'un développement cancéreux est forte. Le défaut de ce biomarqueur pronostique est de pouvoir être utilisé uniquement sur des biopsies et pour un seul type de cancer.

1.2.3 Traitement chimiothérapique du cancer et cuivre

Nous venons de montrer que le Cu peut favoriser le développement de cancers ou bien que le cancer entraîne une dérégulation de l'homéostasie du Cu. Par exemple, les protéines impliquées dans l'entrée du Cu telles que les réductases ou l'importateur du Cu jouent un rôle dans le développement de la maladie. Nous aborderons brièvement la diversité des traitements anti-cancéreux (1.2.3.1). Nous traiterons par la suite uniquement des traitements à base de cisplatine, une des molécules utilisée en chimiothérapie. Puis, nous détaillerons les mécanismes d'import et d'export du cisplatine. Les protéines impliquées dans cet import sont les importateurs et les exportateurs du Cu (1.2.3.2). Avec le développement de la maladie, des résistances au traitement apparaissent (1.2.3.3). Nous montrerons que ces résistances sont pour la plupart dues à l'absence d'importateurs ou à la sur-expression des exportateurs du Cu (1.2.3.4).

1.2.3.1 Diversité des traitements anti-cancéreux

Afin de traiter le cancer, trois grandes approches peuvent être menée : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicaux. Les deux premiers sont préférentiellement utilisés pour des cas de tumeurs locales, le dernier est utilisé lorsque les cellules tumorales sont disséminées dans l'organisme (cancer métastatique) [ligue-cancer.net].

La chirurgie. La chirurgie consiste à détecter la tumeur puis à enlever chirurgicalement la tumeur et les tissus environnants.

La radiothérapie. La radiothérapie consiste au traitement via des rayons tel que le rayonnement X des tumeurs. Elle peut être administrée par voies externe ou interne.

Les traitements médicaux. Les traitements médicaux peuvent cibler différentes caractéristiques des cellules cancéreuses (voir 1.2.2.1). Ces traitements peuvent contenir une ou plusieurs molécules. Ils peuvent être réparties en quatre grandes catégories :

- *L'hormonothérapie.* Elle concerne uniquement les cancers hormono-dépendants tels que les cancers du sein et de la prostate. Pour le cancer du sein par exemple, un médicament anti-œstrogène, le tamoxifène, est utilisé.
- *Les traitements ciblés.* Ils consistent en la perturbation du métabolisme des cellules tumorales. Ils peuvent agir sur la croissance de la tumeur. Par exemple, lors du développement du cancer du sein, des récepteurs à l'*Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER2) agissent comme des facteurs de croissance tumoraux. Ces récepteurs peuvent être ciblés lors de traitements. Les cellules tumorales induisent également l'angiogenèse. Celle-ci peut être ciblée *via* des traitements bloquant VEGF (par exemple le Bevacizumab).
- *L'immunothérapie.* Elle consiste en l'activation des mécanismes immunitaires. Cependant, les cellules cancéreuses ont tendance à résister au système immunitaire (1.2.2.1). De ce fait, les traitements immunothérapiques sont souvent associés aux traitements chimiothérapiques. C'est le cas de l'association du Cetuximab (un inhibiteur de l'*Epidermal Growth Factor* (EGF)) avec de l'oxaliplatine.
- *La chimiothérapie.* Il s'agit de molécules toxiques administrées aux patients. Elles peuvent par exemple être antimitotiques, cytostatique ou cytotoxiques. Dans la suite de ce propos, nous détaillerons le fonctionnement du cisplatine, une molécule cytotoxique.

1.2.3.2 Utilisation du cisplatine comme traitement anti-cancéreux

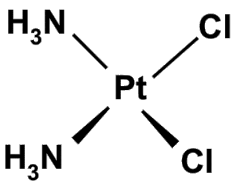


FIGURE 1.11 – ***Représentation de Cram du cis-diaminedichloroplatine(II) (cisplatine, cDDP).***

L'étude de l'effet de radiations électromagnétiques sur des cellules a permis de mettre fortuitement en évidence que le cisplatine (cis-diaminedichloroplatine(II), Figure 1.11) inhibe la division cellulaire chez *Escherichia coli* [Rosenberg et al., 1965]. Les propriétés du cisplatine permettent de résorber les sarcomes de souris [Rosenberg et al., 1969]. Il a ainsi été proposé comme nouvel agent chimiothérapique pouvant être utilisé chez

l'homme [Prestayko et al., 1979]. Le cisplatine a ainsi permis de soigner les cancers des testicules autrefois létaux. La figure 1.12 retrace l'historique de la mise en place des composés Pt comme traitement anti-cancéreux.

Ces traitements sont actuellement très efficaces pour certains cancers : par exemple plus de 90% des patients atteints de cancer des testicules sont en rémission (Figure 1.13). Il est également efficace dans les traitements des cancers des ovaires, de la vessie, cervicaux, oto-rhino-oto-rhino-laryngologiques, cérébraux et des cancers du poumon à petites cellules (*"small-cell lung cancer"*) [Loehrer and Einhorn, 1984]. Afin d'améliorer l'efficacité et de diminuer les effets secondaires (perte de cheveux, vomissements, leucopénies, thrombopénie, insuffisance rénale et surdité) du cisplatine, de nombreux composés dérivés de cette molécule tels que l'oxaliplatine ont été développés (Figure 1.14).

Il convient maintenant de comprendre l'effet du cisplatine au niveau cellulaire. Dans les conditions cellulaires, cette molécule perd un groupement chlore au profit d'un groupement hydroxyle [Davies et al., 1998]. Le cisplatine est alors chargé positivement et réagit plus facilement avec l'ADN chargé négativement. Ceci augmente la réactivité du composé Pt qui peut alors se lier à l'ADN et plus particulièrement aux bases puriques (préférentiellement à la guanine) [Fichtinger-Schepman et al., 1985], créant ainsi des liens intra- et inter-brins (Figure 1.15). Plus globalement, ceci inhibe la réparation de l'ADN et active de nombreux signaux de transduction, dont ceux impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, dans la mort cellulaire programmée et dans l'apoptose (revue par Siddik [2003]). En résumé, ceci entraîne la mort de la cellule. Les autres traitements à base de Pt se basent sur le même mode d'action. Ils tuent ainsi les cellules en division, détruisant ainsi les cellules cancéreuses et les cellules souches, ce qui explique la perte de cheveux et de poils.

1.2.3.3 Utilisation du cisplatine et apparition de résistances au cisplatine

Comme nous venons de le voir, le cisplatine est efficace dans le traitement de nombreux cancers, dont celui des testicules. Il est à noter que ce traitement peut entraîner les effets secondaires lourds suivants : la perte de cheveux, des vomissements, une leucopénie, une thrombopénie, une néphrotoxicité, une surdité et une atteinte bilatérale des fonctions vestibulaires de l'oreille interne pouvant entraîner des troubles de l'équilibre [Rancoule et al., 2016]. Afin de limiter ces effets secondaires, ces traitements ne peuvent être administrés à leurs doses maximales. C'est une des raisons pour lesquels certains types de cancers tels que celui du poumon à grandes cellules (*"non-small cell lung cancer"*) sont insensibles au traitement à base de cisplatine. Ces cancers sont dit résistants au cisplatine [Giaccone, 2000]. Par ailleurs, chez certains patients, les cellules tumorales deviennent résistantes avec la prise du traitement [Shen et al., 2012; Siddik, 2003; Wang and Lippard, 2005]. Cette résistance acquise peut se voir comme un processus de sélection « naturelle ». Les cellules tumorales ne sont plus contrôlées par la machinerie cellulaire et accumulent des mutations. Si l'une des mutations entraîne une plus grande résistance des cellules au

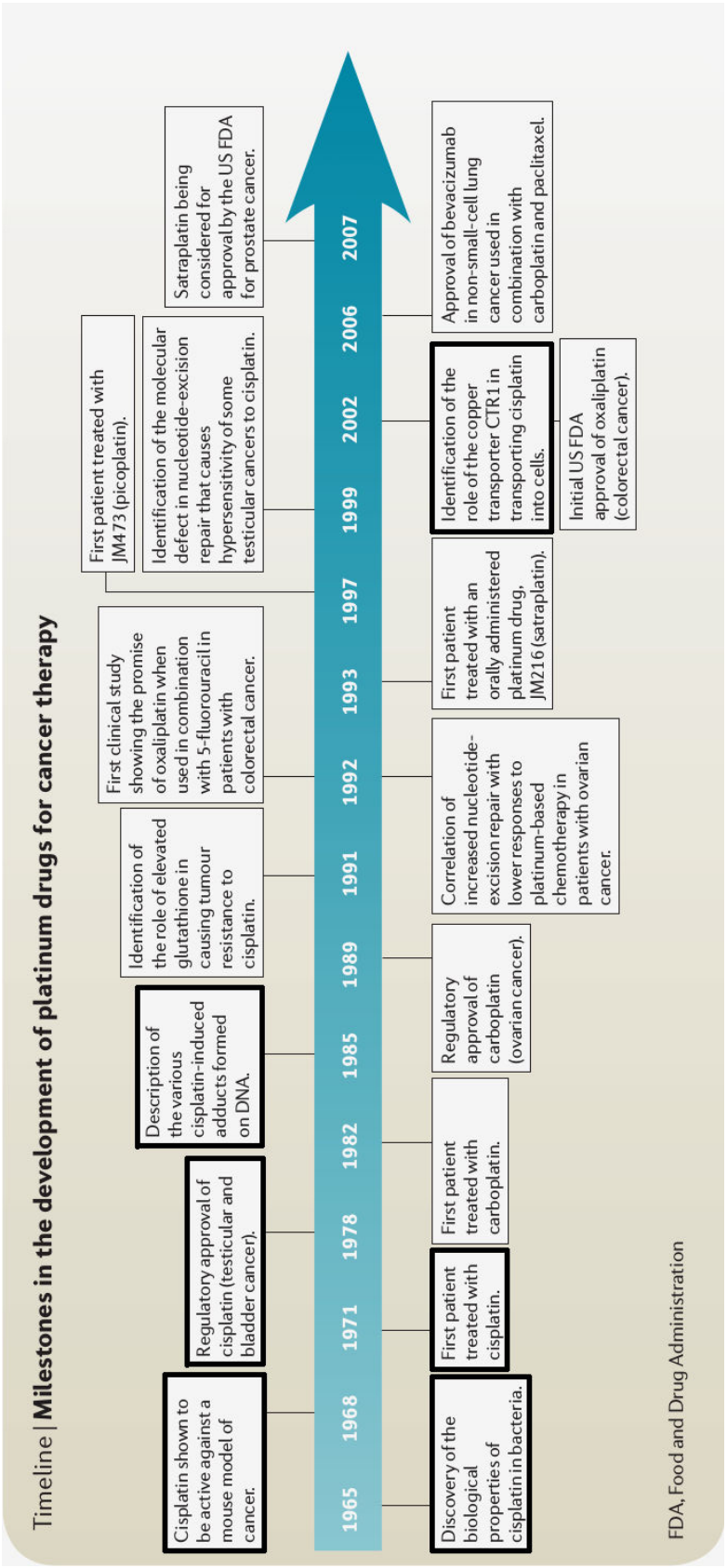


FIGURE 1.12 – ***Frise chronologique du développement des chimiothérapies à base de platine.***
Les principales étapes du développement du cisplatine comme traitement chimiothérapique, de la compréhension de son fonctionnement et de la compréhension des résistances associées sont présentées en gras (d'après Kelland [2007]).

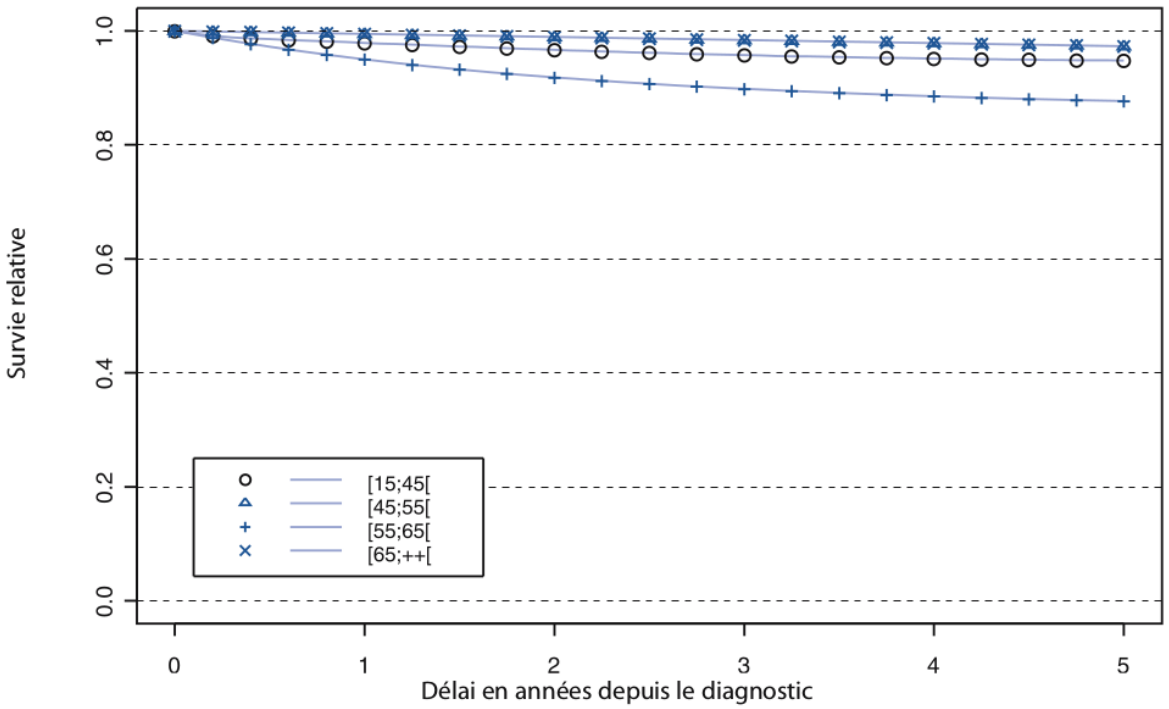


FIGURE 1.13 – *Suivi de la survie relative de patients atteints de cancer des testicules et traités avec du cisplatine en France.*

Cette étude s'est faite sur la période 1989-1997 dans 9 départements français. Les différentes courbes séparent les différentes classes d'âges. La taille de l'échantillon n'a pas été précisée FRANCIM [2007].

traitement, alors celles-ci survivent lors du traitement tandis que les autres décèdent. La prise de traitement va donc favoriser la survie de ces cellules et leur développement. Lors d'une reprise du traitement, la proportion de cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles sera ainsi augmentée. Rapidement, la tumeur dans son ensemble devient résistante au traitement. Cette résistance peut avoir deux origines, soit un moindre accès du cisplatine à l'ADN soit une moindre concentration du cisplatine dans les cellules.

Dans la suite de notre propos nous nous intéresserons uniquement au deuxième cas. Ainsi, il a été montré que des lignées de cellules souches cancéreuses plus résistantes au cisplatine accumulent moins ce composé dans la cellule que les lignées sensibles au traitement [Andrews and Howell, 1990; Loh et al., 1992]. Afin de comprendre l'origine moléculaire des résistances au cisplatine, il convient d'étudier ces modèles cellulaires accumulant moins de composés platines.

1.2.3.4 Origines moléculaires de l'apparition de résistances au cisplatine

Le cisplatine entre activement dans les cellules eucaryotes par un transporteur ionique couplé à la Na/K-ATPase [Gately and Howell, 1993], dont l'activité dépend de la température et du pH [Amtmann et al., 2001; Atema et al., 1993; Endo et al., 2000; Gately

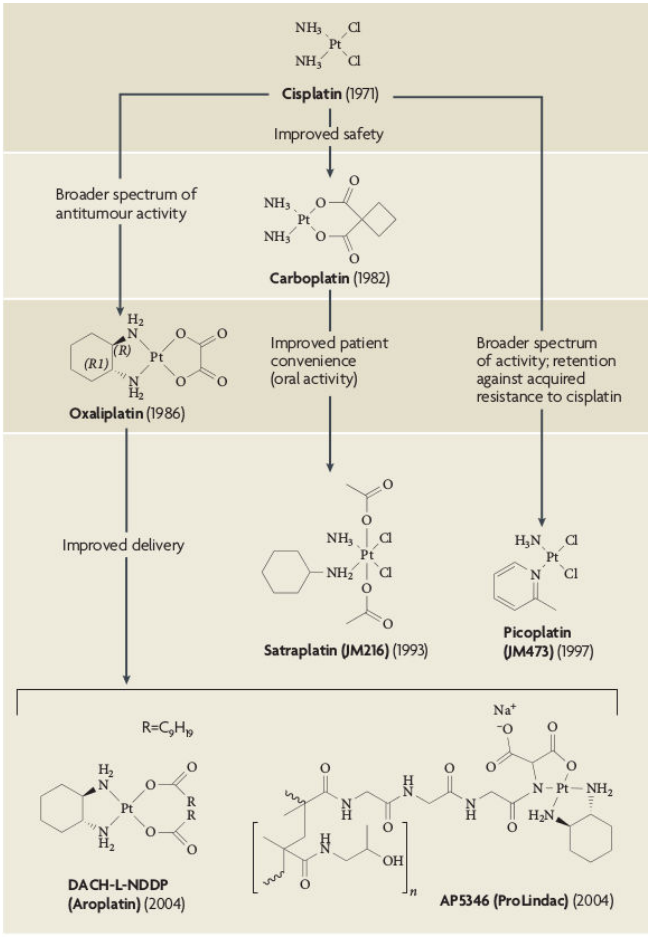


FIGURE 1.14 – ***Arbre généalogique des différents composés à base de platine utilisés en chimiothérapies.***

Les dates indiquent la première administration à un patient. Seules les molécules utilisées mondialement ont été considérées (d'après Kelland [2007]).

and Howell, 1993]. Le couplage à la Na/K ATPase et les gammes de pH et de températures dans lesquelles le cisplatine est efficaces sont analogues aux propriétés du transport intra-cellulaire du Cu. Par ailleurs, l'étude de différentes souches de levure au profils de résistance différents a permis de proposer l'origine des mécanismes de résistances au cisplatine [Ishida et al., 2002; Lin et al., 2002]. Les souches de levures étudiées étaient soit sauvages (WT), soit mutées dans un des transporteurs à haute affinité du Cu (Ctr1), soit mutées dans une des réductases du Cu (Fre1), soit mutées dans le facteur de transcription dépendant du Cu (Mac1) ou enfin mutées dans l'exportateur du Cu de la levure (Ccc2) (Figure 1.16). Il apparaît alors que le taux de survie des souches mutées dans les transporteurs du Cu, dans les réductases du Cu ou dans le facteur de transcription lié au Cu sont plus résistantes au cisplatine que les autres souches. Par contre, la souche dont l'exportateur est muté est plus sensible au cisplatine (Figure 1.16). Parallèlement, il apparaît que quand la souche est résistante au cisplatine la concentration cellulaire en Cu et la concentration en Pt décroissent. Le Cu et le cisplatine semblent entrer et sortir par les

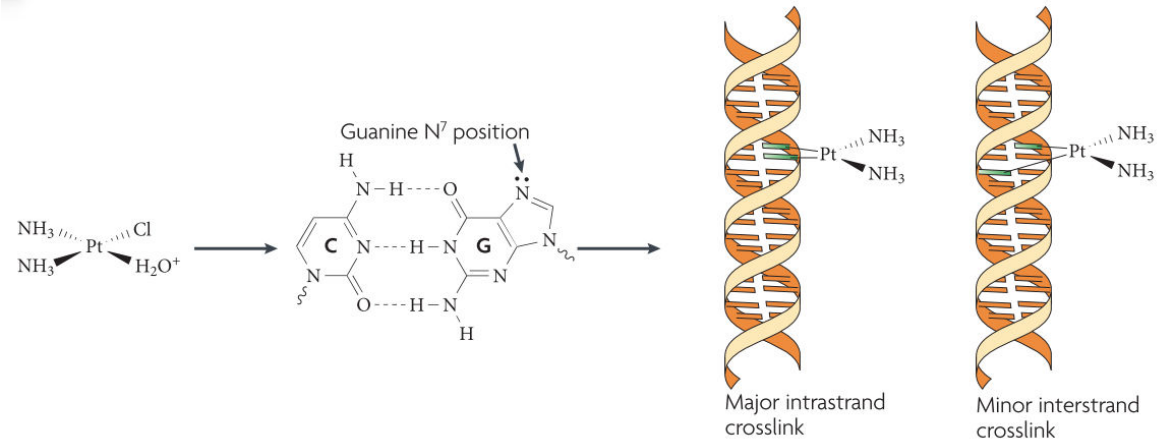


FIGURE 1.15 – ***Mode d'action moléculaire du cisplatine sur l'ADN.***
Après sa solvatation par l'eau, le cisplatine peut se lier à l'azote de la guanine. Ceci a pour conséquence de former des liaisons intra-brins et inter-brins qui amènent in fine *à la mort de la cellule (d'après Kelland [2007]).*

mêmes protéines [Ishida et al., 2002; Lin et al., 2002].

Au vu de la proximité génétique des protéines transportant le Cu, les mêmes mécanismes ont été proposés pour expliquer l'apparition de résistance chez l'homme. Pour vérifier cela, les deux allèles codant pour CTR1 ont été mutés dans des lignées de souris. Ces souris ont alors été traitées avec différentes concentrations de composés à bases de Pt (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine). Il a alors été montré que les souris mutantes sont 1.5 à 3 fois plus résistantes que leurs congénères de génotype sauvage [Holzer et al., 2006]. Ceci confirme les résultats obtenus avec la levure et montre que les principaux composés du Pt utilisés en médecine entrent dans la cellule par les importateurs du Cu.

Chez *S. cerevisiae*, l'exportateur du Cu (ccc2) entraîne une plus grande sensibilité au cisplatine. Il semble donc que tout comme pour les importateurs du Cu, les exportateurs du Cu peuvent transporter les composés Pt. L'effet du cisplatine a alors été testé sur des cellules souches dérivées de cancer du poumon et résistantes au cisplatine. Les souches résistantes au cisplatine présentent une plus grande quantité d'ARNm codant pour l'exportateur du Cu humain (hAtp7Ap) que les souches sensibles. Afin de préciser l'effet de cet exportateur du Cu, de l'ARNsi a été utilisé. Cette technique interdit temporairement la transcription du gène de ciblé. Ceci a pour conséquence de s'affranchir d'effets non contrôlés de la mutagenèse dirigée d'un gène. L'ajout d'ARNsi d'ATP7A entraîne une plus grande résistance des cellules au cisplatine [Li et al., 2012]. Donc, plus la protéine hAtp7ap est exprimée, plus la résistance cellulaire au cisplatine est grande.

L'entrée et la sortie du cisplatine de la cellule sont corrélées au métabolisme du Cu. La question qui se pose alors est : cette corrélation est-elle fonctionnelle ? Il a été montré que le cisplatine se lie avec les motifs riches en Met de la partie N terminale de la protéine de hCtr1p [Ma et al., 2015]. Cette liaison est donc analogue à la liaison du Cu avec la partie N

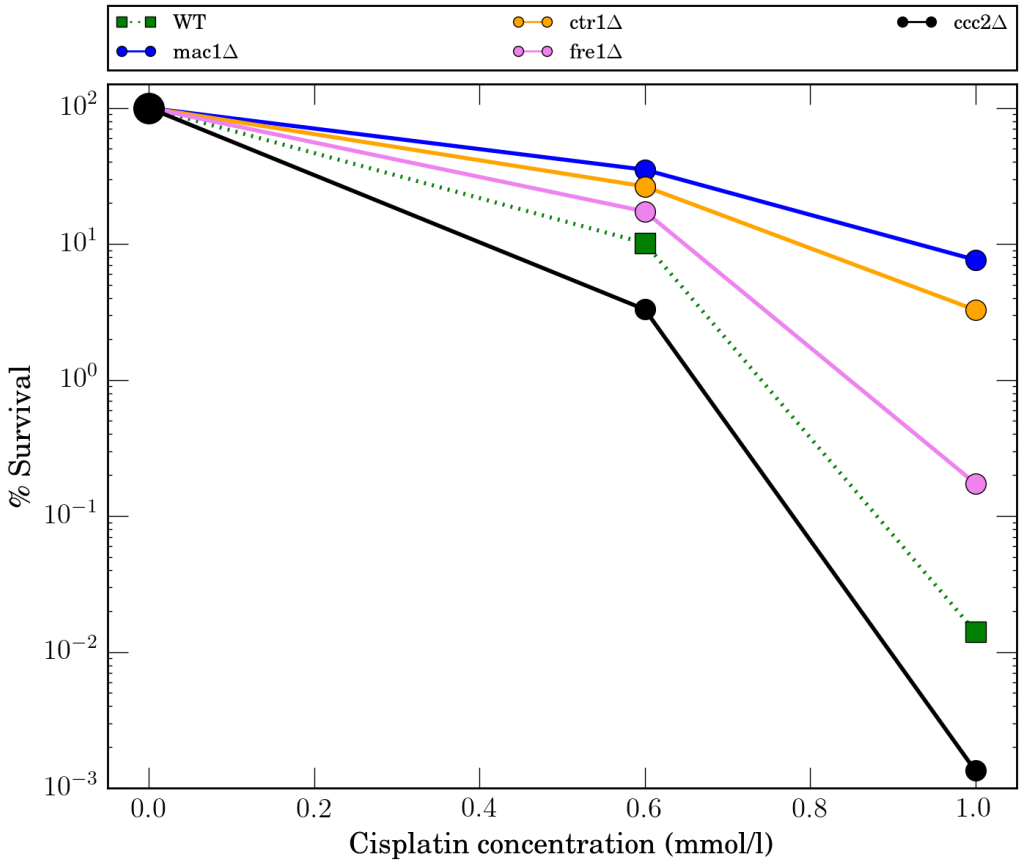


FIGURE 1.16 – ***Survie relative (*% survival*) de différentes souches de* Saccharomyces cerevisiae *en fonction de la concentration en cisplatine (*Cisplatin concentration*) dans le milieu de culture.*** *Effet de la mutation de gènes des importateurs à haute affinité du Cu (orange, Ctr1, Ctr2), de réductases du Cu (violet, Fre1), de l'exportateur du Cu (noir, ccc2) et du facteur de transcription Mac1 (bleu) sur le % de survie suite à un traitement au cisplatine. Ici la souche YSI1 a été testée (les données sont issues d'Ishida et al. [2002]).*

terminale de hCtr1p (1.4.2). Ce résultat suggère que le cisplatine entre dans la cellule, *via* les importateurs du Cu. De même, une mutation dans le site de liaison du Cu à l'exportateur du Cu hAtp7b entraîne une moindre sortie du cisplatine de la cellule [Leonhardt et al., 2009]. Ces deux résultats suggèrent que le Cu et le cisplatine empruntent les mêmes voies d'entrée et de sortie.

Ainsi, le cisplatine semble entrer et sortir par les mêmes voies d'entrée et de sortie que le Cu (Figure 1.17). La résistance au cisplatine des cellules est liée à la quantité d'importateurs et d'exportateurs du Cu qu'elles possèdent. Il a ainsi été montré que plus les patients atteints de cancer du poumon présentent une forte concentration d'hAtp7Ap dans les cellules moins ils étaient sensibles au traitement [Li et al., 2012]. Inversement, plus la quantité de hCtr1p dans les cellules tumorales est faible, plus les cellules sont résistantes au cisplatine [Kim et al., 2014]. L'étude immunohistochimique de la quantité d'hAtp7Ap ou de hCtr1p dans les cellules tumorales est ainsi un bon biomarqueur pronostique de la

résistance des tumeurs au cisplatine et probablement aux autres composés à base de Pt.

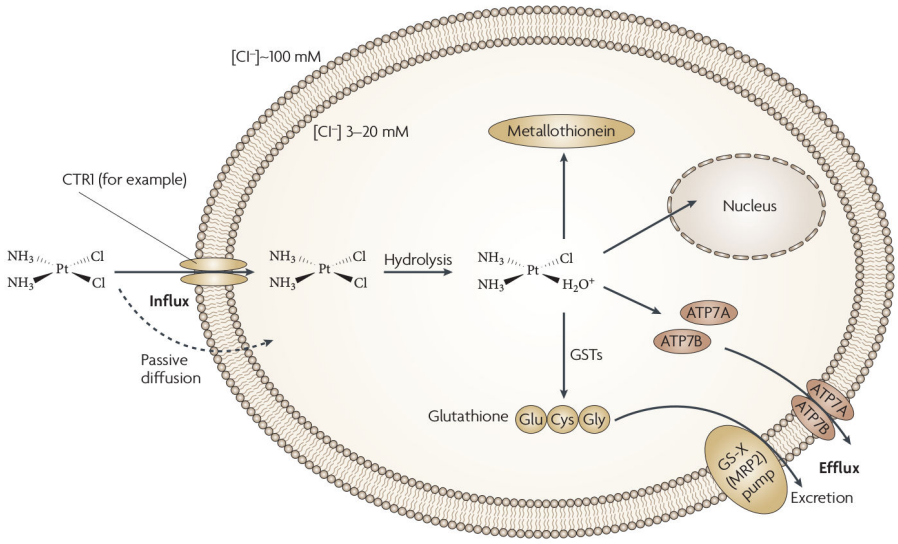


FIGURE 1.17 – *Mécanismes d'entrée/sortie du cisplatine dans les cellules.*
Le cisplatine entre dans les cellules de manière passive et par le transporteur du Cu (hCtr1p). Il peut ensuite se lier aux glutathionines et aux métallothionéines. Enfin, il sort de la cellule par les exportateurs du Cu (hAtp7ap et hAtp7b) (d'après Kelland [2007]).

1.3 Utilisation des isotopes stables des métaux de transition comme biomarqueurs

Dans la section précédente nous avons montré que les changements du métabolisme du Cu peuvent être concomitants au développement de cancers (1.2) et que les agents chimiothérapiques à base de Pt entrent et sortent des cellules par les mêmes protéines que celles transportant le Cu. L'absence ou la sur-expression des gènes codant respectivement pour les importateurs ou les exportateurs du Cu induit l'apparition de résistances au traitement à base de platine (1.2.3). La quantification de l'ARNm d'importateurs, de réductases, d'exportateurs du Cu ou de leurs quantifications présentes dans les membranes des cellules tumorales sont des biomarqueurs pronostiques du développement du cancer ou de sa résistance aux traitements à base de Pt. Cependant, ces marqueurs dépendent du cancer considéré et nécessitent le plus souvent une biopsie. Ainsi, le suivi longitudinal de la maladie est impossible. Il convient de développer un outil pronostique sensible aux variations du métabolisme du Cu et pouvant être étudié dans le sang. Dans cette thèse nous proposons d'utiliser des méthodes de géochimie isotopique afin de tracer ces variations du métabolisme du Cu. La mesure des isotopes stables d'un élément donné dans un réservoir est sensible à des variations fines des flux de métaux comme c'est le cas pour le métabolisme du Fe (1.3.1). Pour étudier les variations de la composition isotopique du Cu

des organismes eucaryotes, il convient tout d'abord d'étudier la composition en isotopes stables du Cu dans les conditions normales chez différents eucaryotes (1.3.2). Nous montrerons ensuite, que ces compositions changent avec le développement de maladies telles que le cancer (1.3.3). Enfin, nous détaillerons le fait que le suivi longitudinal de la composition isotopique en Cu dans le sang permet de tracer l'évolution des maladies étudiées (1.3.4).

1.3.1 Origine biologiques des fractionnements biologiques des isotopes stables du zinc et du fer

De par sa forte concentration dans les cellules sanguines (12-25 µmol/L) et de par son importance dans le transport du dioxygène, *via* l'hémoglobine, les compositions isotopiques en Fer ont été historiquement les premières à être étudiées *in vivo*. Il est tout d'abord à noter que les compositions isotopiques en ^{54}Fe et ^{56}Fe (noté δ^{56}Fe, équation Not.2) sont négatives dans le sérum humain. Ceci correspond bien à ce qui est attendu pour l'environnement réduit que constitue un être vivant. Il a été aussi montré que la composition isotopique en Fe est significativement différente entre les hommes et les femmes menstruées [Albarède et al., 2011; Jaouen et al., 2012; Walczyk and von Blanckenburg, 2002]. L'origine physiologique de cette différence restait à comprendre. Pour cela, Jaouen et al. [2013] ont étudié le δ^{56}Fe du sérum en fonction de l'âge. Il a alors été observé que la mise en place de la ménopause entraîne le passage de compositions isotopiques féminines vers des compositions masculines. Les menstruations seraient ainsi à l'origine de la différence de δ^{56}Fe observée entre le sang masculin et féminin [Jaouen and Balter, 2014; Jaouen et al., 2013]. Les menstruations induisent une perte significative de Fe par la perte de sang. Donc, une différence ténu de l'homéostasie en Fe semble entraîner une différence isotopique significative. Il est à noter que seule une corrélation a été observée et qu'aucun mécanisme cellulaire n'a pu être mis en relation avec ces observations.

Parallèlement à ces observations obtenues pour le Fe, la composition isotopique en Cu du sang de groupes d'hommes et de femmes a été étudiée. Il a été montré que le sang des femmes menstruées est significativement enrichi en isotopes légers du Cu en comparaison du sang de femmes non menstruées et des hommes [Van Heghe et al., 2014]. Comme pour le Fe, il est probable qu'un changement ténue de l'homéostasie en Cu due aux menstruations soit à l'origine de cette différence.

Chez les plantes, l'étude des isotopes stables du Zn a montré un enrichissement en isotopes légers des racines par rapport au sol [Jouvin et al., 2012; Moynier et al., 2009]. Afin de comprendre l'origine cellulaire de ces observations naturalistes, des plants d'*Arabidopsis halleri* (une espèce accumulant le Zn dans les racines) et de *Arabidopsis petraea* (une plante n'accumulant pas le Zn dans les racines) ont été cultivés dans un milieu hydroponique de composition isotopique donnée. Il a alors été montré que plus le flux de Zn

au travers des racines est grand, plus le fractionnement isotopique est fort. Il a ainsi été proposé que c'est le transport actif du Zn par les importateurs du Zn qui est à l'origine de ce fractionnement [Aucour et al., 2011].

Ces études sur la composition isotopique en Fe et en Zn ont montré que le flux de Zn et de Fe influence la composition isotopique de l'organisme considéré. Au vu des résultats obtenus pour les plantes, il est probable que ce soit le transport de ces métaux qui soit à l'origine des fractionnements isotopiques observés. Comme nous l'avons montré précédemment, un changement dans l'import, la réduction ou l'export du Cu peut entraîner le développement de maladies délétères (1.2). Les résultats obtenus avec les isotopes du Fe et du Zn suggèrent que le suivi de la composition isotopique en Cu pourrait être un traceur du développement de ces maladies.

1.3.2 Composition isotopique en cuivre des eucaryotes

Comme nous l'avons vu précédemment, la composition en isotopes stables des métaux de transition peut permettre de tracer des changements métaboliques. Pour utiliser les isotopes stables du Cu comme traceur de changement métabolique, il convient dans un premier temps de connaître la composition isotopique du Cu dans les conditions normales. Ainsi, la composition isotopique en Cu a été étudiée dans des organismes procaryotes (eubactéries), et dans divers organismes eucaryotes autotrophes pour le carbone (plantes) ou hétérotrophes pour le carbone (moutons, souris, homme). Le δ^{65}Cu de ces organismes est négatif pour les eubactéries (*Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*, [Navarrete et al., 2011]), négatif pour les plantes (par exemple égal à -0.32‰ dans la tige, à -0.71‰ dans les feuilles et à -0.75‰ à l'apex d'un plant de seigle, Figure 1.18b) et négatif dans la plupart des organes des mammifères (par exemple égal à -0.6‰ dans le sérum de mouton, Figure 1.18a).

Outre cette approche *in vivo*, l'effet d'une liaison entre le Cu (I ou II) et différents acides-aminés peut être calculé. Pour cela, des méthodes de chimie numérique basées sur des résultats de chimie quantique sont utilisées. Ces calculs appelés calculs *ab-initio* permettent la détermination des facteurs de fractionnement théorique liés à la liaison du Cu avec les acides-aminés ou à sa réduction en fonction de la température et du pH. Les acides aminés à choisir dans les calculs doivent être représentatifs des acides-aminés liant le Cu *in vivo*. Le Cu^+ étant un acide plus faible que Cu^{2+}, le Cu se lie à différents types d'acides aminés selon son degré d'oxydation [Messerchmidt et al., 2004]. Le Cu^+ forme préférentiellement des liaisons avec des acides aminés contenant du soufre [Messerchmidt et al., 2004] tels que la méthionine (Met) ou la cystéine (Cys) [Solomon et al., 1996]. Le Cu^{2+}, quant à lui se lie préférentiellement aux acides-aminés contenant de l'azote tels que l'histidine [Klinmann, 1996; Lewis and Tolman, 2004]. Grâce à l'analyse informatique de séquences génomiques de 57 organismes appartenant aux trois domaines du vivant,

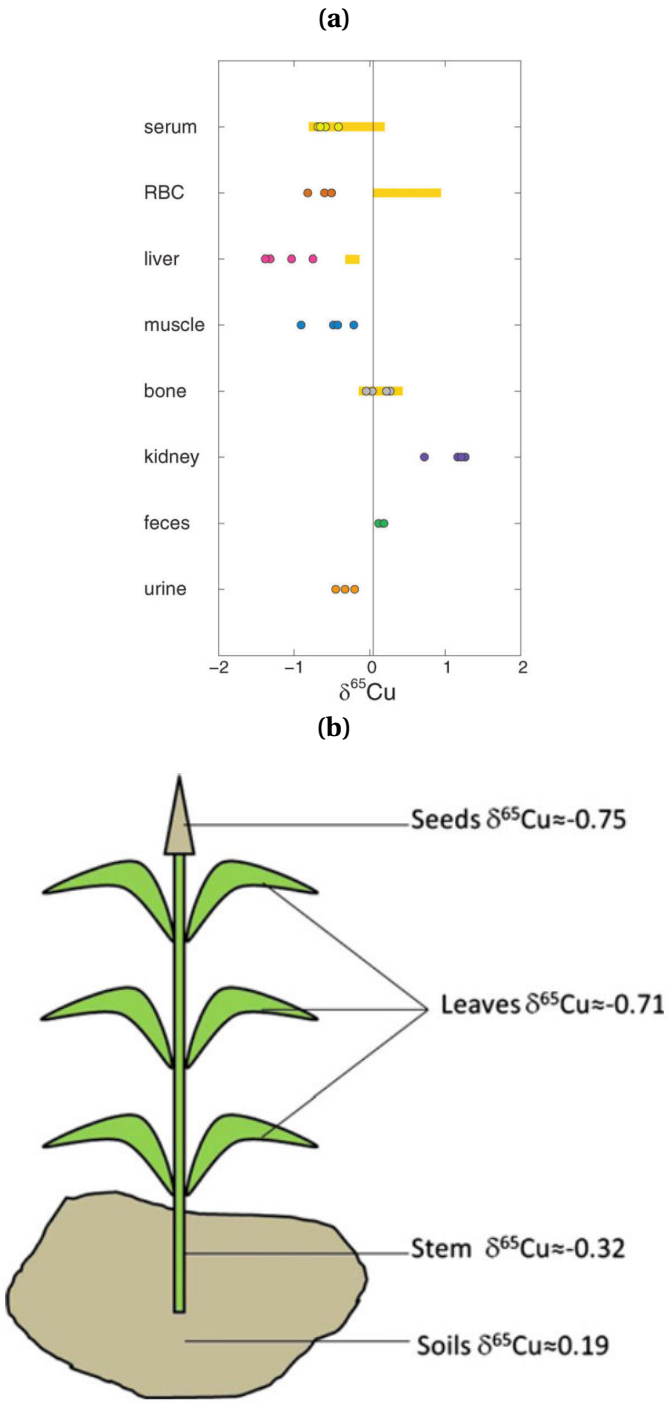


FIGURE 1.18 – ***Variation de la composition isotopique du cuivre chez les mammifères et les plantes.***

(a) *:* δ^{65}Cu *analysé dans différents organes de moutons (points). Les variations observées chez l'homme apparaissent en jaune. Les différents compartiments considérés sont : le sérum, les globules rouges (*RBC*), le foie (*liver*), les muscles, les os (*bone*), le rein (*kidney*), les fèces et l'urine. La plupart des organes sont donc enrichis en isotopes légers du Cu (d'après Balter et al. [2013]).*

(b) *:* δ^{65}Cu *des différentes parties d'un plant de seigle. Le sol (*soils*), la tige (*stem*), les feuilles (*leaves*) et les graines (*seeds*) sont considérés. L'enrichissement en isotopes légers du Cu augmente de la tige à l'apex caulinaire (d'après Weinstein et al. [2011]).*

Andreini et al. [2008] ont montré que l'His et la Cys participent à 65% des liaisons entre les protéines et le Cu. Un autre ligand commun est la Met (15%). Les calculs *ab-initio* devront donc identifier l'effet de la réduction du Cu et l'effet d'une liaison à la Met, la Cys et l'His sur la composition isotopique du Cu de la cellule. Il a été montré que la réduction du Cu dans les conditions du vivant (pH neutre, température de 25°C) aboutit à un enrichissement en isotopes légers du Cu. La liaison du Cu(II) à différents acides-aminés a également été étudiée. Il a été montré que par rapport au ^{63}Cu, le ^{65}Cu est préférentiellement lié à l'histidine par rapport à la cystéine [Albarède, 2015; Balter et al., 2013; Fujii et al., 2013, 2014]. Les calculs *ab-initio* prévoient une différence de composition isotopique en Cu en fonction des acides-aminés impliqués dans la liaison Cu-protéines et en fonction de l'état d'oxydation du Cu impliqué dans la liaison. Pour comprendre la conséquence d'une telle observation, il convient de modéliser conceptuellement ce qui se passe dans un organisme. Soit, deux compartiments (deux organes) contenus dans un réservoir non infini de Cu (le sang). Admettons que le Cu soit sous forme Cu(II) et lié aux cystéines dans le premier compartiment et sous forme de Cu(II) lié à une histidine dans le second compartiment. On admet dans cette situation que le réservoir a une composition isotopique de référence. Le premier compartiment sera dans ce cas plus enrichi en isotopes légers du Cu que le second. Si, le flux de Cu entrant dans le premier compartiment double, alors la quantité d'isotopes légers dans le premier compartiment va augmenter. Et, parallèlement à cela, la quantité relative d'isotopes lourds dans le réservoir va augmenter. Si on applique ce modèle à un organisme, les différents organes devraient avoir un δ^{65}Cu différent selon les protéines qu'ils contiennent. Et, c'est bien ce qui est observé pour les différents organes de mouton (Figure 1.18). Enfin, si le flux de Cu change dans un de ces organes (par exemple avec le développement d'une tumeur), alors la composition isotopique de l'organe (compartiment) change. Ce changement s'accompagne d'une variation de la composition isotopique du sang (réservoir). C'est ce que nous allons développer dans la prochaine partie.

1.3.3 Composition isotopique en cuivre d'organes et de cellules malades

Les résultats obtenus pour les isotopes stables du Zn et du Fe suggèrent une dépendance de la composition isotopique au transport du Cu. Or, des changements du transport du Cu peuvent entraîner des maladies graves telle que la maladie de Wilson. Par ailleurs, le transport du Cu est souvent affecté par le développement de cancer. Ces maladies sont en particulier liées à un manque d'importateurs et d'exportateurs du Cu, dont les acides-aminés lient le Cu lors du transport du Cu. Or, les calculs *ab-initio* prévoient un fractionnement isotopique lié à cette liaison. Ce fractionnement sera d'autant plus grand que la quantité de Cu importée sera grande. Ceci suggère que les cellules affectées par un cancer ou une maladie liée au métabolisme du Cu auront une composition isotopique en Cu

différente.

Ainsi, dans le sérum de 5 patients atteints de la maladie de Wilson (1.2.1), la concentration en Cu est deux à trois fois inférieure (de 120 à 520 µg/L) à celle de patients sains (de 890 à 1520 µg/L). Cette diminution de la concentration en Cu s'accompagne d'une diminution du δ^{65}Cu mesuré dans le sérum : les patients atteints de la maladie de Wilson présentent un très faible δ^{65}Cu (entre -2.8 et -1.1‰) alors que les individus sains ont une valeur de δ^{65}Cu supérieure (entre -1.1 et -0.3‰) (Figure 1.19, [Aramendía et al., 2013]).

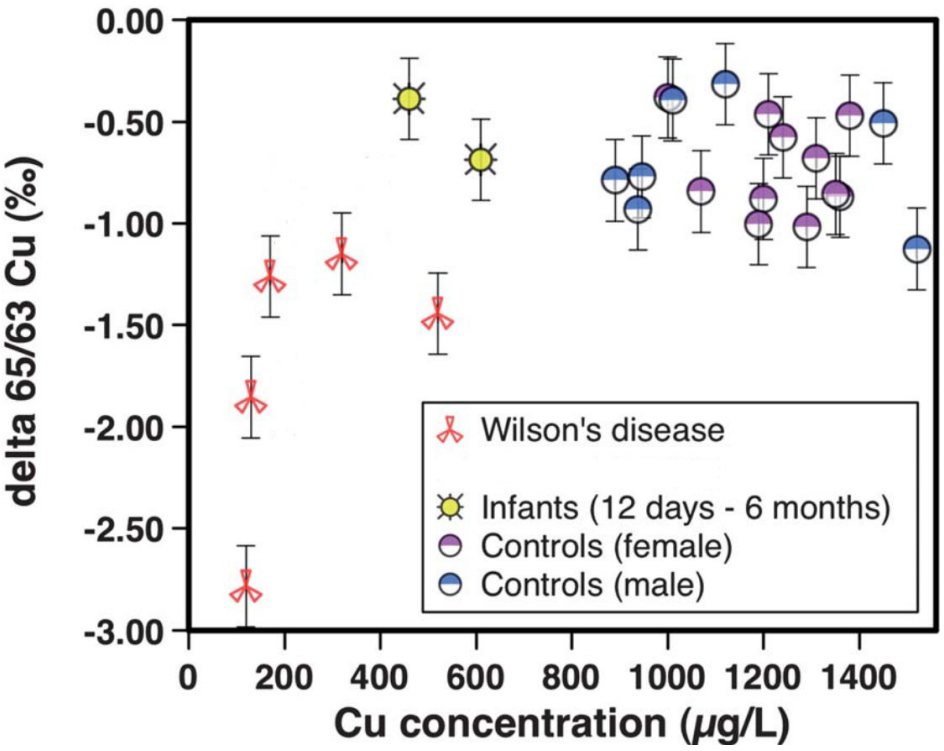


FIGURE 1.19 – ***Composition isotopique du cuivre en fonction de la concentration en cuivre dans le sérum de patients atteints de la maladie de Wilson et de sujets sains.***
Cette étude compare le δ^{65}Cu *et la concentration en Cu analysée dans le sérum de patients atteints de la maladie de Wilson, d'enfants et d'un groupe d'adultes témoins. Chaque point correspond à un sujet et les barres d'erreurs représentent l'erreur analytique (d'après Aramendía et al. [2013]).*

Comme nous l'avons vu dans les parties 1.2.2 et 1.2.2.3, le développement de cancers amène à un changement du métabolisme du Cu. La composition isotopique en Cu de patients atteints de cancers a été étudiée au cours de trois études de référence. Pour tous les types de cancers étudiés, une diminution du δ^{65}Cu dans le sérum ou dans les globules rouges a été observée. Ainsi, on observe une diminution de 0.25‰ dans le sérum de patientes atteintes de cancer du sein, une diminution de 0.14‰ dans le sérum de patients atteints de cancer colorectaux létaux ([Telouk et al., 2015], Figure 1.20), une diminution de 0.5‰ dans le sérum de patients atteints de cirrhose [Costas-Rodriguez et al., 2016] et une diminution de 0.3‰ dans les globules rouges de patients atteints d'hépatocarcinomes

(Figure 1.21). Les changements du métabolisme du Cu observés lors du développement de cancers se traduisent ainsi par une diminution du δ^{65}Cu sanguin.

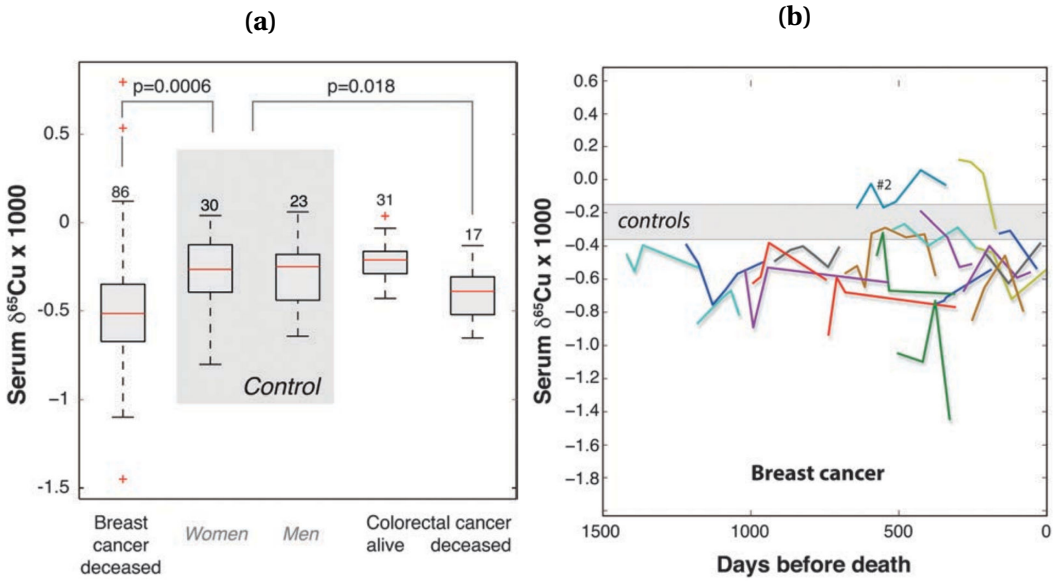


FIGURE 1.20 – ***Composition isotopique du cuivre (δ^{65}Cu) mesuré dans le sérum de patients atteints de cancer colorectal et de cancer du sein (gauche) et suivi longitudinale du δ^{65}Cu mesuré dans le sérum de patientes atteintes de cancer du sein (droite).***

(a) *Représentation de Whisker du δ^{65}Cu de n patients (le nombre de patients est indiqué au-dessus de la boite) atteints de cancer du sein ou de cancer colorectal. Les boîtes représentent le δ^{65}Cu chez 75% des patients et les barres le δ^{65}Cu chez 95% des patients. La ligne rouge donne la médiane. Une diminution significative (p-value < 0.05) du δ^{65}Cu mesuré dans le sérum de patients atteint de cancers mortels ("deceased") peut être observée (d'après Telouk et al. [2015]).*

(b) *Évolution du δ^{65}Cu mesuré dans le sérum de 20 patientes atteints de cancer du sein. Chaque ligne représente une patiente différente. On observe une diminution du δ^{65}Cu avec le développement du cancer (d'après Telouk et al. [2015]).*

Étant donné que les changements du métabolisme du Cu ont lieu au sein des tumeurs, la variation de signature isotopique entre le sang de patients cancéreux et le sang de sujets sains provient probablement d'un changement du δ^{65}Cu dans les tumeurs. Pour vérifier cela, des cellules tumorales et péri-tumorales de patients atteints d'hépatocarcinomes ont été analysées. Il a alors été montré que les cellules tumorales ont un δ^{65}Cu plus élevé que les cellules péri-tumorales. Cette variation est de l'ordre de 0.5 à 1‰ (Figure 1.21). Donc, les variations sanguines de la composition isotopique en Cu semblent corrélées à un enrichissement en isotopes lourds de la tumeur.

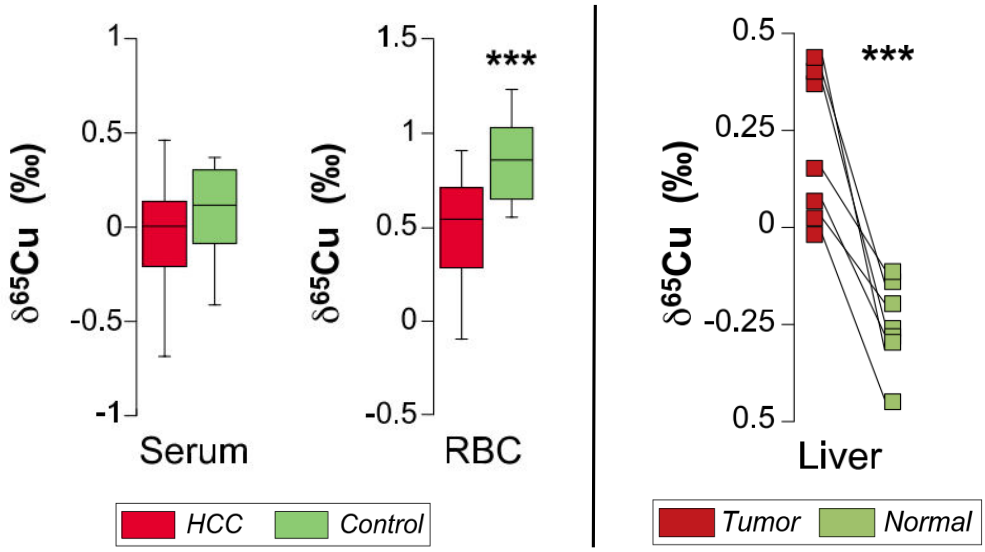


FIGURE 1.21 – ***Composition isotopique du cuivre analysé dans le sérum, dans les globules rouges (*RBC*), dans les tissus tumoraux (*T*) et péri-tumoraux (*PT*) de patients atteints de cancer du foie.***
(Gauche) *Analyse du* δ^{65}*Cu de sérum et des globules rouges de patients atteints d'un hépatocarcinome (HCC). Les globules rouges et dans une moindre mesure le sérum des patients atteints de cancer sont appauvris en isotopes légers du Cu (d'après Balter et al. [2015]).*
(Droite) *Analyse couplée du* δ^{65}*Cu de cellules péri-tumorales (PT, vert) et de cellules tumorales (T, rouge) de patients atteints d'hépatocarcinomes. L'enrichissement en isotopes légers du sang se reflète par un enrichissement en isotopes lourds dans la tumeur (d'après Balter et al. [2015]).*

1.3.4 Les isotopes stables du cuivre, des biomarqueurs de l'évolution des maladies affectant le métabolisme du cuivre

Dans de nombreuses maladies du foie telles que la maladie de Wilson, l'hépatite virale, lors du développement de cholestase et dans des cas d'alcoolisme grave, le Cu se concentre de manière anormale dans le foie [Lauwens et al., 2016]. Pour ces maladies, une transplantation du foie est souvent nécessaire. Cependant, cette transplantation n'aboutit pas toujours à une rémission. Les variations de la composition isotopique en Cu du sérum avant et après la transplantation du foie ont alors été étudiées. Avant la transplantation, le δ^{65}Cu mesuré dans le sérum est bas en comparaison avec le δ^{65}Cu de sujets sains. Après la transplantation, pour les patients en rémission le δ^{65}Cu du sérum augmente jusqu'à atteindre des valeurs proches des valeurs mesurées pour les patients sains (Figure 1.22). En revanche, un des patients de l'étude a développé un cancer après la transplantation. Dans ce cas, la composition isotopique en Cu diminue vers des valeurs très basses. Ainsi, si le δ^{65}Cu mesuré dans le sérum évolue vers des valeurs « normales », alors le patient est en rémission (Figure 1.22).

De la même façon, la composition isotopique en Cu dans le sérum a été suivie pendant plusieurs mois chez des patientes atteintes de cancer du sein. Pour toutes les patientes,

une diminution du δ^{65}Cu est observée avec le développement de la maladie (Figure 1.20). Cette diminution a lieu quelques semaines avant la variation de biomarqueurs classiques (par exemple CA 15-3) [Telouk et al., 2015]. Les changements du métabolisme du Cu survenant dans les cellules cancéreuses se traduisent probablement par une augmentation du δ^{65}Cu tumoral et par une diminution du δ^{65}Cu sérique. Plus ce changement est rapide, plus la tumeur est dangereuse. Le suivi longitudinal du δ^{65}Cu semble ainsi être un biomarqueur pronostique du développement du cancer.

Avant d'utiliser les isotopes stables du Cu comme biomarqueur pronostique du cancer, il est nécessaire de comprendre l'origine des différences observées entre les sujets sains et les patients atteints de cancers [Albarède, 2015]. De nombreuses molécules ont été proposées comme étant à l'origine des différences de composition isotopique en Cu observées chez les patients atteints de cancer. Afin de comprendre ces différences, il est pertinent d'utiliser les techniques de base de biologie moléculaire sur un ou plusieurs organismes dit modèles [Larner, 2016] comme cela a été fait pour les plantes [Aucour et al., 2011]. Cette approche a été utilisée par Bondanese et al. [2016]. Des cellules souches de tumeurs hépatiques ont été cultivées dans un environnement hypoxique (comme dans les tumeurs) et normoxique (comme dans les parties péri-tumorales). Dans ces cellules cultivées en hypoxie, il a été observé un enrichissement en isotopes lourds en comparaison des cellules cultivées dans un milieu normoxique (Figure 1.23). Ceci a permis de montrer que la différence de δ^{65}Cu observée entre les cellules péri-tumorales et les tumeurs peut être reproduite *in vitro* et est due à l'environnement des cellules tumorales. Malgré l'étude d'un grand nombre de gènes, l'origine génétique de cette différence n'a pas pu être identifiée. Durant cette thèse nous nous proposons d'étudier l'effet de l'entrée et de la sortie du Cu dans les cellules sur la composition isotopique en Cu afin d'éclairer la compréhension des mécanismes à l'origine des fractionnements isotopiques particuliers observés dans les tumeurs.

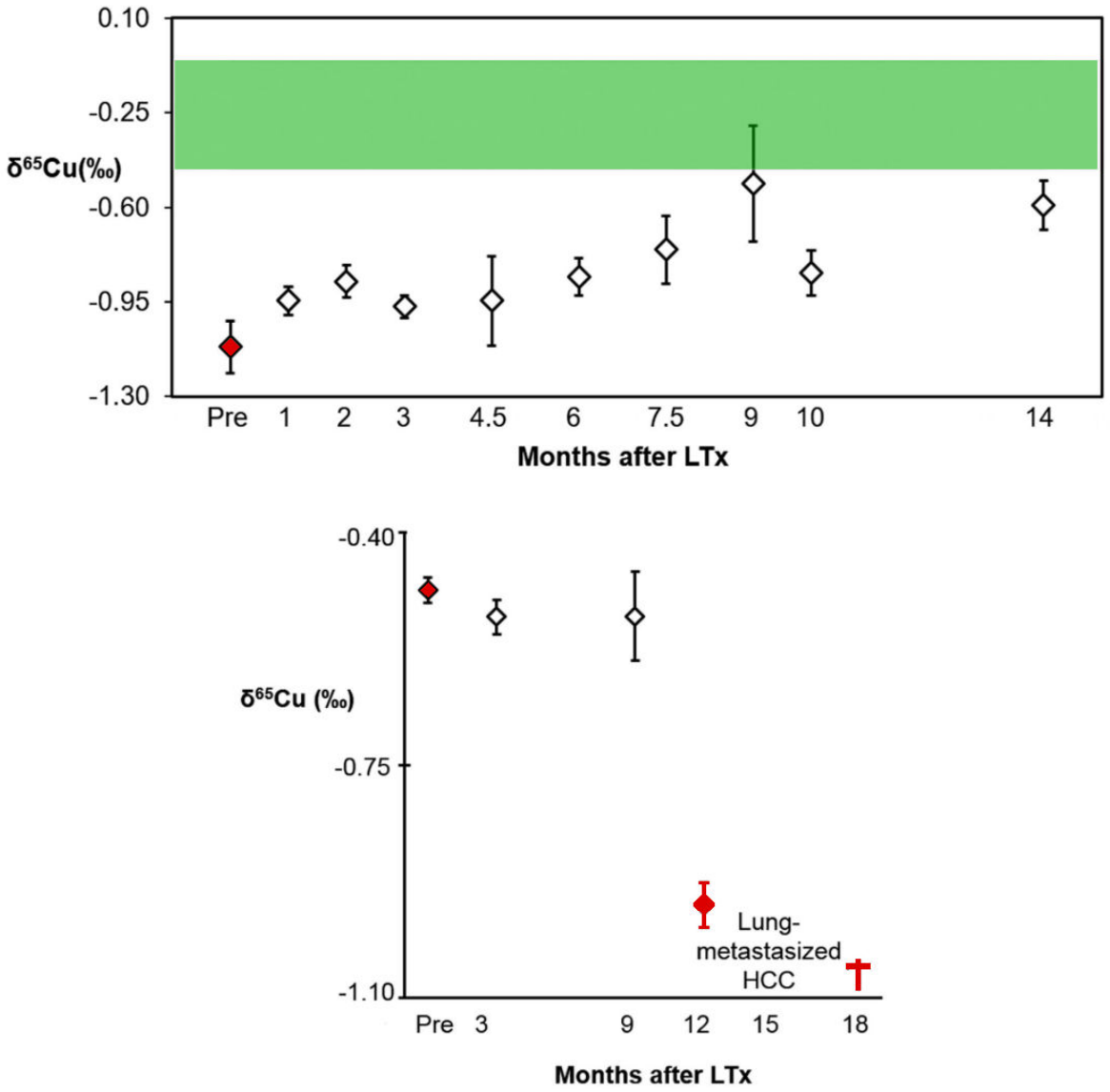


FIGURE 1.22 – ***Variation de la composition isotopique du cuivre mesurée dans le sérum après transplantation du foie (LT).***

Avant opération, les patients présentent un δ^{65}Cu *mesuré dans le sérum (en rouge) très inférieur à la normale (en vert). Après une opération de transplantation de foie (*Liver transplantation*), le* δ^{65}Cu *augmente vers des valeurs normales dans le cas d'une rémission (exemple du haut) et diminue considérablement chez le patient qui développe un cancer hépatique (HCC, exemple du bas) (d'après Lauwens et al. [2016]).*

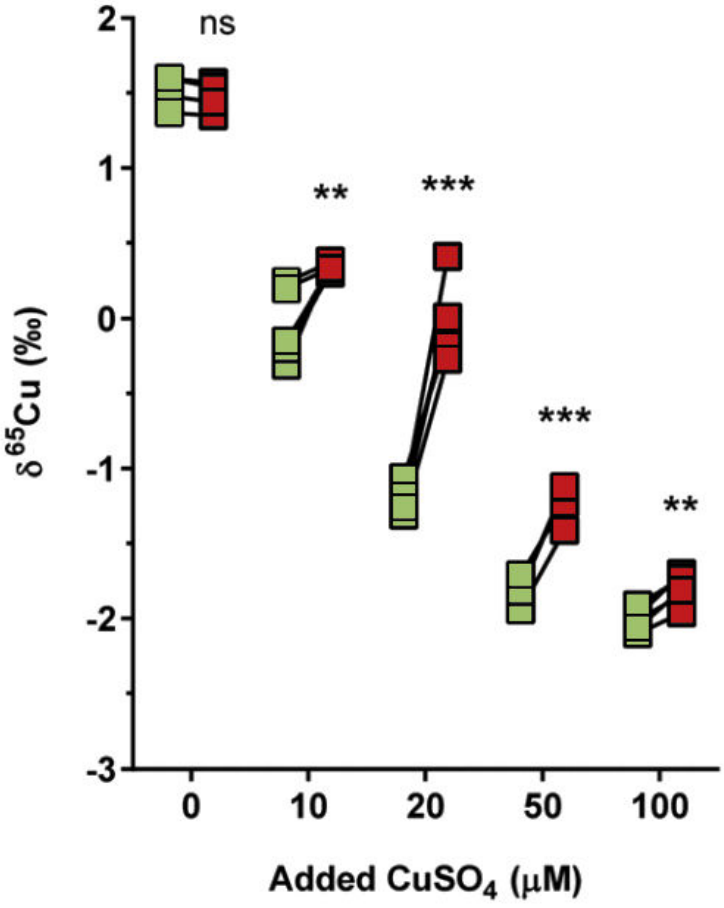


FIGURE 1.23 – ***Suivi de la composition isotopique du cuivre dans des cellules souches cultivées pendant 24 heures en conditions hypoxiques (rouge) ou normoxiques (vert) et en présence de différentes concentrations de cuivre.***

Des cellules souches de cancer du foie ont été cultivées en hypoxie (rouge, 1% de dioxygène) et en normoxie (vert, ≃20% de dioxygène). Ces cellules ont été mises en présence de différentes concentrations de Cu. Pour les concentrations physiologiques (20 μM), il a été observé que les cellules cultivées en hypoxie sont enrichies en ^{65}Cu par rapport aux mêmes cellules cultivées en normoxie (d'après Bondanese et al. [2016]).

1.4 *Saccharomyces cerevisiae*, un organisme modèle pour comprendre l'origine moléculaire des fractionnements isotopiques du cuivre observés dans les cellules

Dans la section précédente, nous avons montré que le δ^{65}Cu mesuré dans le sérum a pu être corrélé au développement de certains cancers (1.3.3 et 1.3.4). Cependant, l'approche naturaliste proposée dans ces études ne permet pas la compréhension mécanistique des fractionnements isotopiques du Cu observés. L'objectif de cette thèse est d'identifier les protéines à l'origine des fractionnements isotopiques du Cu observées dans les cellules saines et dans les cellules cancéreuses. Pour cela, il fallait choisir un modèle cellulaire où la mutagenèse dirigée est aisée. Les modèles pluricellulaires tels que les souris posent deux problèmes majeurs. Leurs utilisations posent des problèmes éthiques et la complexité du métabolisme du Cu ne permet pas un contrôle des différents paramètres d'entrées. Ainsi, une mutation d'un gène pourra avoir des conséquences sur de nombreux processus cellulaires ce qui rend l'effet de cette mutation difficile à identifier. Un organisme unicellulaire devait donc être choisi. Deux choix s'offrent alors : l'utilisation de cellules souches humaines ou l'utilisation de cellules de *S. cerevisiae*. Le premier choix présente l'avantage d'une plus grande proximité des mécanismes cellulaires avec les cellules humaines. Cependant ces cellules sont relativement complexes à cultiver et leur comportement dépend du type de cellule souche choisie. Le second organisme est plus aisé à cultiver et à modifier. Le choix de *S. cerevisiae*, un organisme aux gènes proches de l'homme (1.4.1) semble ainsi plus pertinent pour une étude préliminaire de l'effet des protéines transportant le Cu sur la composition isotopique du Cu cellulaire. Nous détaillerons dans cette section la proximité des mécanismes permettant le transport cellulaire du Cu chez l'homme et chez la levure (1.4.2). Nous montrerons que seul le contrôle de l'homéostasie en Cu diffère entre l'homme et la levure (1.4.3). Durant cette thèse, nous étudierons uniquement l'effet des protéines membranaires sur le fractionnement isotopique du Cu. Ainsi, les différences dans le contrôle de la concentration en Cu n'auront pas d'effet sur cette valeur. *S. cerevisiae* est ainsi un organisme de choix pour répondre aux questions posées durant cette thèse.

1.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*, un analogue des cellules humaines aisément modifiable génétiquement

S. cerevisiae est le premier organisme eucaryote à avoir été entièrement séquencé [Goffeau et al., 1996]. Cet organisme est proche de l'homme génétiquement puisque 30% des gènes de levure ont des orthologues (gènes issus d'un même ancêtre commun et n'ayant pas été dupliqués) humains et que 75% des gènes de levure ont une ou plusieurs sé-

quences en commun avec un gène humain. Ces gènes encodent des protéines aux structures et aux fonctions similaires à celles de l'homme [Botstein and Fink, 1985; Botstein et al., 1997]. Un effort de synthèse du rôle des différents gènes de la levure et des protéines associées a été fait et est disponible en ligne [Cherry et al., 2012; yeastgenome.org, 2017]. Par ailleurs, certains gènes humains peuvent être exprimés et être fonctionnels dans la levure [Hitzeman et al., 1981]. Cette homologie va jusque dans la fonction des protéines codées par ces gènes. Par exemple, le gène h-RAS humain a été exprimé dans une levure dont les gènes RAS avaient été enlevés. Dans ce cas, la viabilité de ces levures a été restaurée. Pour certains gènes, il y a à la fois conservation de leurs séquences mais aussi de leurs fonctions [Kataoka et al., 1985]. L'analogie génique entre la levure et l'homme a conduit à l'idée d'utiliser la levure pour la compréhension de maladies humaines. Pour utiliser la levure comme modèle de maladie il faut d'abord identifier un gène de levure orthologue d'un gène responsable d'une maladie humaine. L'étude des phénotypes de souches de levure, dont le gène d'intérêt est absent ou, dont l'expression est augmentée permet parfois d'en identifier la fonction puis, d'identifier la protéine associée à ce gène [Smith and Snyder, 2006]. Cette méthode a été utilisée dans tous les domaines de la biologie : de l'étude du métabolisme [Petranovic et al., 2010; Rinaldi et al., 2010; Steinmetz et al., 2002], aux études moléculaires [Goeckeler and Brodsky, 2011] en passant par l'étude de maladies humaines [Barros et al., 2010; Bharadwaj et al., 2010]. La levure a notamment permis la compréhension du cycle cellulaire, dont un dysfonctionnement entraîne le cancer [Hartwell, 2002] et a permis de développer une nouvelle technique pour la compréhension de l'effet des agents chimiothérapeutiques [Hartwell et al., 2009]. De par sa proximité génétique avec l'homme, la levure de bière est donc un modèle de choix pour l'étude du cancer humain. Outre cette proximité avec l'homme, cet organisme présente l'avantage d'être cultivable à température ambiante et d'avoir un temps de génération rapide (2h). Par ailleurs, l'obtention de mutants est aisée. Ceci permet d'obtenir rapidement de grands stocks de cellules ce qui est un pré-requis à une étude des isotopes stables du Cu. L'utilisation de *S. cerevisiae* pour l'étude de l'effet du transport cellulaire du Cu sur la composition isotopique est ainsi pertinent

1.4.2 Comparaison du transport du cuivre chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'homme

1.4.2.1 Protéines impliquées dans la réduction du cuivre

Les métaux de transition entrent dans les cellules sous forme réduite alors qu'ils sont principalement transportés dans le sang sous forme oxydée. Dans les milieux usuels de culture de levure, le Cu est également sous forme oxydé. Il est à noter que les voies d'entrée de ces métaux dans les cellules eucaryotes sont hautement conservées et très souvent interdépendantes. Par exemple, un gène responsable de l'anémie chez la souris a été

identifié : c'est le gène STEAP3. Ce gène code une protéine transmembranaire à trois domaines (Figure 1.24). En étudiant la séquence de ce gène et en la comparant aux génomes des mammifères, trois autres gènes analogues ont été identifiés. Ces gènes et les protéines qu'ils codent font partie de la famille STEAP [Ohgami, 2006]. Afin de comprendre la fonction de ces gènes impliqués dans l'homéostasie en Cu, ils ont été surexprimés dans des cellules souches de rein. Cette surexpression entraîne une augmentation de la réduction extra-cellulaire du Cu et du Fe. Les protéines transmembranaires de la famille des STEAP sont donc des réductases du Cu (Figure 1.24).

Chez *S. cerevisiae*, le Cu est réduit par des protéines transmembranaires avant son entrée dans les cellules. Tout comme pour l'homme, ces protéines sont des réductases du Fer [Lesuisse and Labbe, 1989; Lesuisse et al., 1987]. Ces protéines sont codées par des gènes de la famille des protéines Fre (« *Ferric REductase* ») [Georgatsou and Alexandraki, 1999; Georgatsou and Despina, 1994; Martins et al., 1998]. Tout comme les protéines humaines de la famille des STEAP, ces protéines sont des protéines transmembranaires [Dancis et al., 1990, 1992] indispensables à l'entrée du Cu dans la cellule. Fre1p est la protéine principalement impliquée dans la réduction du Cu et Fre2p est impliquée dans une moindre mesure. Si deux de ces gènes sont absents, alors la capacité de réduire le Cu de la cellule est diminué de 90% [Georgatsou et al., 1997; Hasset and Kosman, 1995]. Ces protéines sont donc l'analogue fonctionnelle des protéines STEAP humaines. Par ailleurs, tout comme les protéines STEAP, les protéines FRE ont six domaines transmembranaires. Malgré la distance phylogénique séparant *H. sapiens* de *S. cerevisiae*, les séquences codantes pour les protéines Fre et Steap sont homologues [Ohgami, 2006]. Les protéines Fre sont donc les analogues structurels et fonctionnels des protéines Steap. Il est probable que l'effet potentiel des protéines Fre sur la composition isotopique en Cu des levures soit analogue à l'effet des protéines Steap chez l'homme. Ainsi, les résultats obtenus *via* l'étude de l'effet de la réduction du Cu par les réductases sur la composition isotopique du Cu cellulaire chez *S. cerevisiae* devraient être transposables à l'homme.

1.4.2.2 Protéines impliquées dans l'import du cuivre

Après sa réduction par les protéines hSteapp, le Cu entre activement dans les cellules. Les protéines impliquées dans son transport ont d'abord été identifiées chez *S. cerevisiae*. Ces protéines font partie de la famille des protéines Ctr (*Copper TRansporter*) (Ctr1p et Ctr3p chez *S. cerevisiae*) et sont impliquées dans l'import du Cu (Figure 1.25). Il est remarquable que les protéines Ctr soient retrouvées uniquement dans les cellules eucaryotes et qu'elles soient toujours à l'origine du transport membranaire du Cu [Kaplan and Lutsenko, 2009]. Ces protéines de la famille Ctr sont qualifiées d'importateurs à haute affinité du Cu. Des analogues à ces gènes ont alors été recherchés dans le génome humain. L'un des candidats a été identifié et nommé hCTR1 [Lee et al., 2000]. Afin de vérifier le rôle de la protéine codée par ce gène, il a été inséré dans le génome de *S. cerevisiae*. Ces levures sont alors

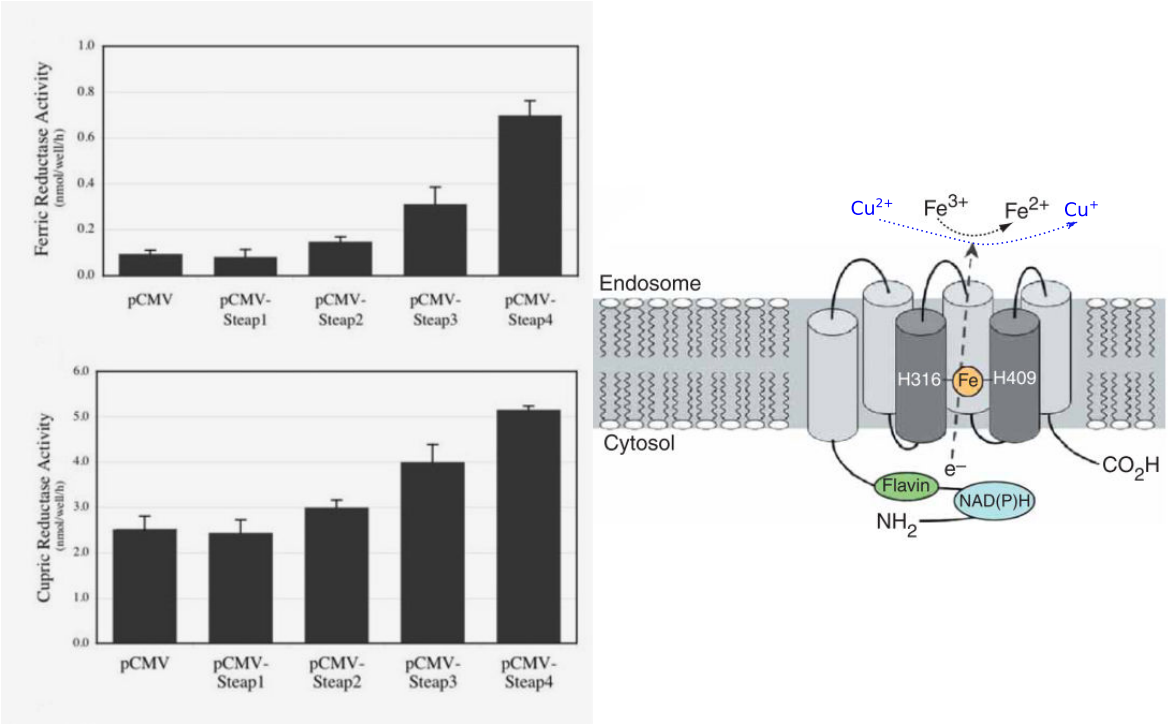


FIGURE 1.24 – *Structure et mise en évidence de l'activité de réductase des protéines STEAP.*
(Gauche) *Activité de réduction du Fe (haut) et de réduction du Cu (bas) chez des cellules souches de rein humain (HEK-293T :* Human embryonic kidney cells 293*) et surexprimant les protéines STEAP 1 à 4 [Ohgami, 2006]. Les protéines STEAP sont des réductases du Fe et du Cu.*
(Droite) *Structure des protéines STEAP. Les protéines STEAP sont des protéines transmembranaires à 3 domaines. Elles ont une activité de réductase du Cu et du Fe (d'après Ohgami et al. [2005]).*

plus sensibles (mortalité plus élevée que la normale) à un milieu concentré en Cu. Les mêmes auteurs ont étudié des lignées de *S. cerevisiae*, dont le gène de levure impliqué dans l'import était absent induisant un défaut de croissance. Dans ces lignées, les chercheurs ont introduit le gène humain de CTR1, ce qui a annihilé le défaut de croissance [Zhou and Gitschier, 1997]. Ceci implique deux choses : la protéine hCtr1p est impliquée dans l'import du Cu et les mécanismes d'import du Cu sont très conservés au sein des eucaryotes. Afin de vérifier le rôle de hCtr1p dans les cellules humaines, le gène CTR1 a été inséré dans des cellules souches humaines. Dans ce cas, le Cu entre massivement dans la cellule. hCtr1p est donc une protéine impliquée dans l'import du Cu dans les cellules de mammifères [Lee et al., 2002]. Dans ces mêmes cellules souches, il a été montré par immunofluorescence que hCtr1p est localisée dans la membrane plasmique.

Tout comme pour son homologue chez la levure, l'entrée de Cu dans cette protéine est couplée à la sortie de potassium de la cellule. L'importateur du Cu est donc un canal à ions, dont l'activité dépend de la pompe Na/K ATPase qui joue un rôle dans le maintien du potentiel de repos des cellules nerveuses. hCtr1p permet un flux de Cu de l'ordre de 10 ions/s [Argüello et al., 2012], ce qui est très faible en comparaison d'autres importateurs

tels que la pompe Na/K ATPase (où ce flux est égal à $10^{7\text{-}9}$ ions/s) [Hille, 2001]. Ce faible flux est sûrement à mettre en relation avec la nécessité pour la cellule de maintenir la concentration en Cu à un niveau relativement bas. D'autres gènes de la même famille ont été identifiés. Ils participent tous à l'import du Cu d'un compartiment de la cellule à un autre. Mais, chez l'homme seul hCtr1p a une localisation strictement plasmique.

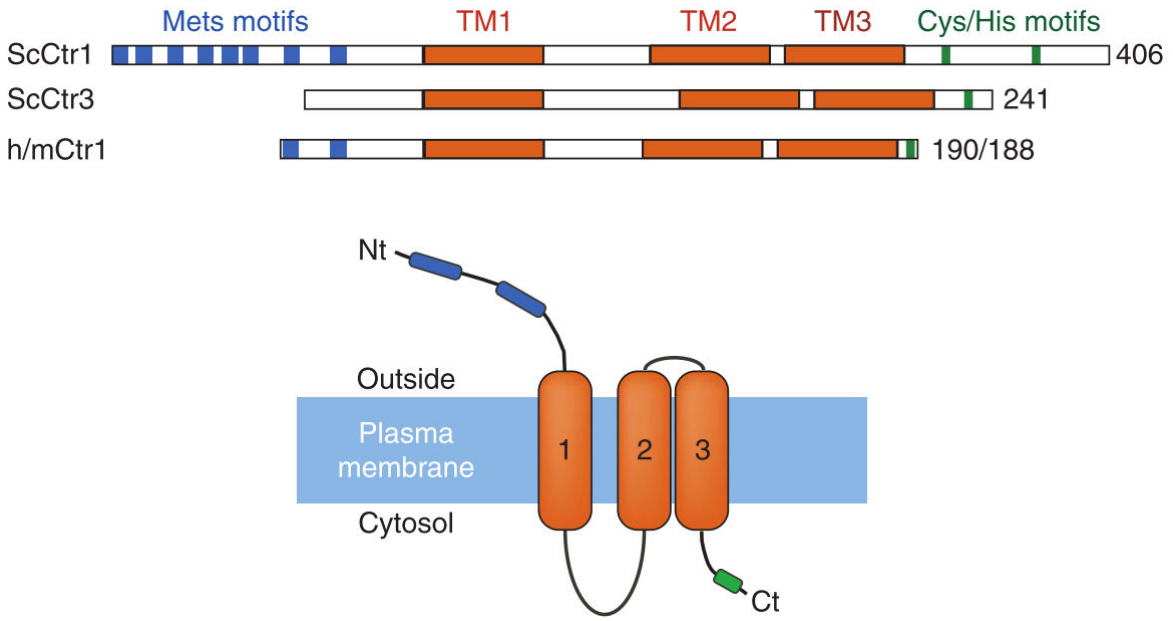


FIGURE 1.25 – *Modèle structurel des transporteurs à haute affinité du cuivre eucaryote.*
(Haut) *Séquence comparée des importateurs à haute affinités de* S. cerevisiae *(Sc) et de l'importateur à haute affinité humain (hCtr1) (d'après Puig and Thiele [2002]).*
(Bas) *Les protéines Ctr sont constituées de trois domaines transmembranaires (1,2,3). La partie N-terminale de la protéine se trouve sur la face cytosolique tandis que la partie C-terminale se trouve sur la face cytoplasmique. Les motifs liant le Cu sont des motifs riches en méthionines (en bleu) ou riches en cystéines (non représenté) (d'après Puig and Thiele [2002]).*

hCtr1p est une protéine relativement petite (23 kDa) et est impliquée dans le transport du Cu qui est un atome de grande taille. La structure primaire et secondaire de hCtr1p est donc en inadéquation avec sa fonction. Il faut par conséquent comprendre sa structure tertiaire. Le monomère codé par le gène CTR1 n'a que trois domaines transmembranaires [Eisses and Chi, 2005; Zhou and Gitschier, 1997] ce qui est trop peu pour former un canal pour les ions métalliques. Mais, trois monomères codés par CTR1 peuvent se lier entre eux pour former un trimère (Figure 1.26, [Klomp et al., 2003; Lee et al., 2002]). Cette association est essentielle au bon fonctionnement de la protéine [Aller et al., 2004]. La structure exacte de hCtr1p a alors pu être décrite. Cette protéine est une protéine homotrimérique transmembranaire (Figure 1.26, [Aller and Unger, 2006; De Feo et al., 2009; Dumay et al., 2006]). Tout comme hCtr1p, Ctr1p et Ctr3p possèdent toutes deux trois domaines transmembranaires et des résidus Cys sur la partie cytoplasmique de la cellule. Ces résidus Cys

permettent le transfert du Cu du transporteur vers la chaperone Atox1p ou Ccsp (Figure 1.25, [Xiao and Wedd, 2002; Xiao et al., 2004]).

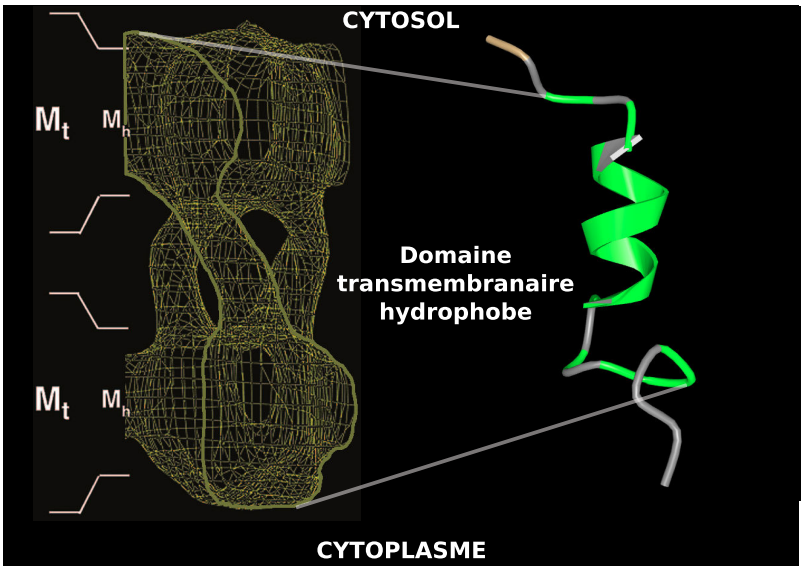


FIGURE 1.26 – *Structure en 3D de hCtr1p (gauche) et d'un des monomères qui la compose (droite).* (Gauche) *: Structure en 3D du transporteur holotrimérique à haute affinité du Cu humain (hCtr1p). Cette protéine transmembranaire (les deux feuillets de membrane sont indiqué par M) est composée de trois monomères (l'un des monomères est entouré en jaune) (d'après Aller and Unger [2006]).* (Droite) *: Structure d'un des monomères de la protéine hCtr1p. L'hélice correspond à une hélice alpha. Les parties hydrophobes sont représentées en vert (d'après ncbi.gov [2017]).*

De par sa structure, hCtr1p forme un pore suffisamment large pour laisser passer le Cu. Mais, le mécanisme par lequel le Cu se lie à la partie extracellulaire de la protéine reste à comprendre. Étant donné que la partie N terminale de la protéine se trouve sur la face extracellulaire, c'est cette partie qui est à l'origine de la liaison avec le Cu. Le Cu se lie préférentiellement aux acides aminés tels que l'His, la Cys et la Met. Dans la partie N terminale hydrophobe de hCtr1p on trouve trois Met associées sous forme d'un plan trigonal [Rubino et al., 2010]. Cette structure favorise la liaison à un ou plusieurs Cu. Par ailleurs, la partie N terminale de la protéine hCtr1p est très riche en Met. Cette partie est donc un autre site de liaison potentiel [Eisses and Chi, 2005]. Quel que soit le site de liaison préférentiel, il faut noter que le Cu se lie préférentiellement à une ou plusieurs Met. Chez *S. cerevisiae*, ces protéines ont une structure proche de la protéine Ctr1 humaine [Puig and Thiele, 2002]. Il est à noter que tout comme la protéine humaine hCtr1p, la protéine de levure Ctr1p lie le Cu *via* les résidus Met sur sa partie extra-cellulaire. Par contre, la protéine Ctr3p lie le Cu *via* la Cys [Puig and Thiele, 2002]. La différence de structure des protéines humaines et des protéines de levure est donnée en figure 1.25. Ainsi, les mécanismes d'import du Cu chez *S. cerevisiae* et chez l'homme sont très proches aussi bien du point de vue génétique, structural et moléculaire. *S. cerevisiae* est ainsi un bon outil

biologique pour étudier l'effet des importateurs à haute affinité du Cu sur la composition isotopique en Cu cellulaire.

L'étude qui a permis l'identification de hCtr1p comme un transporteur à haute affinité du Cu a également mis en évidence une autre protéine de la même famille : hCtr2p [Zhou and Gitschier, 1997]. Le rôle exact de cette protéine n'est pas encore connu [Puig and Thiele, 2002]. Il est possible que cette protéine soit un transporteur à basse affinité du Cu comme le propose Nevitt et al. [2012] (Figure 1.27). Un analogue de cette protéine est retrouvé chez la levure et permet le transport vacuolaire du Cu [Kampfenkel et al., 1995; Portnoy et al., 2001; Rees et al., 2004]. Dans les deux cas, des études proposent une relocalisation membranaire de cette protéine dans les cellules de mammifères ou dans les cellules de levure lorsque les autres importateurs à haute affinité sont mutés.

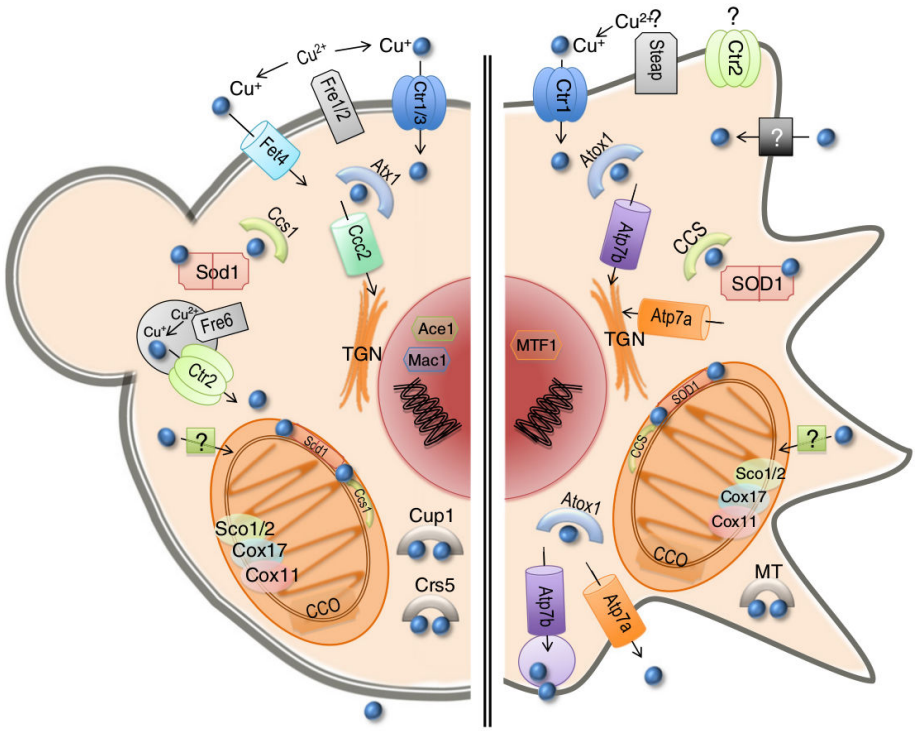


FIGURE 1.27 – ***Protéines impliquées dans l'import du cuivre chez l'homme (droite) et chez* Saccharomyces cerevisiae *(gauche).***

Tout comme chez l'homme, le Cu est importé chez S. cerevisiae *par des protéines de type Ctr. Cette importation a lieu après une réduction du Cu par des enzymes membranaires (Fre chez la levure, Steap chez l'homme). Dans la cellule le Cu est toujours lié à des métallothionéines qui sont identiques chez l'homme et chez* S. cerevisiae*. Le Cu est directement exporté par les protéines de type Atp7 chez l'homme. Chez* S. cerevisiae*, le Cu est exporté par la protéine Ccc2,* via *le réseau golgien (TGN :* Trans-Golgi Network*) (d'après Nevitt et al. [2012]).*

Même si peu de voies permettant le transport à basse affinité du Cu ont été identifiées chez l'homme [Arredondo et al., 2003; Nevitt et al., 2012], deux voies ont été identifiées chez *S. cerevisiae*. Ces voies d'entrée ne sont pas spécifiques du Cu mais spécifiques du Fe

et du Zn. Ainsi, le Cu peut entrer de manière significative par le transporteur du Fe Fet4p [Hasset et al., 2000] et par le transporteur de Zn Smf1p [Liu et al., 1997] (Figure 1.28). Le potentiel effet sur le fractionnement isotopique de l'import du Cu au travers de ces importateurs ne pourra donc pas être applicable à l'homme. Les mécanismes de liaison du Cu à ces importateurs sont peu connus. De ce fait, leur effet sur le fractionnement isotopique du Cu est inconnu.

1.4.2.3 Protéines impliquées dans le transport intracellulaire du cuivre

Après son transfert du milieu extracellulaire à la cellule, le Cu se lie aux protéines contenant du Cu dont l'activité est nécessaire à la survie de la cellule. Le Cu sous forme libre est hautement toxique pour la cellule (1.1.2). Il sera ainsi toujours complexé à une protéine dans les cellules. Ces protéines sont par exemple les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale telles que la cytochrome c oxydase (Cco, Figure 1.2 (structure), Figure 1.3 (localisation)). Le Cu peut aussi se lier à des métallothionéines qui permettent son stockage dans la cellule. Ces métallothionéines sont diverses. Les principales sont hSod1p, hCccsp et hAtox1p (Figure 1.2 et 1.3). Ces protéines humaines ne sont pas toutes présentes chez la levure. Les sites de liaison du Cu dans ces protéines sont divers. Chaque protéine devrait ainsi avoir une composition isotopique propre. Cependant, seule la composition isotopique globale de la cellule peut-être étudiée. Ainsi, même s'il existe des différences dans les protéines cellulaires liant le Cu chez l'homme et chez *S. cerevisiae*, leurs effets sur la composition en isotopes stables du Cu ne peuvent pas être pris en compte. La levure reste ainsi un bon outil pour l'étude du fractionnement isotopique observé dans les cellules humaines.

1.4.2.4 Protéines impliquées dans l'export du cuivre

Le Cu qui entre dans les levures est alors distribué *via* les chaperones à Cu à tous les compartiments cellulaires. Il est par ailleurs stocké dans la vacuole *via* l'activité de la protéine Ccc2p. De la vacuole, il pourra être re-mobilisé grâce à l'activité d'une protéine de la famille des protéines Ctr : la protéine Ctr2p (Figure 1.28, [Kampfenkel et al., 1995; Portnoy et al., 2001; Rees et al., 2004]). Si la concentration intracellulaire en Cu est trop grande, le Cu est excrété grâce à la fusion de la vacuole avec la membrane plasmique. Ainsi, la protéine Ccc2p agit comme un exportateur membranaire. Son effet sur la composition en isotopes du Cu de la cellule devrait être analogue.

Nous avons vu que, le Cu entre dans les cellules humaines *via* la protéine hCtr1p. Il est ensuite stocké ou utilisé par les protéines cytoplasmiques. Une partie de ce Cu sort activement de la cellule. Les protéines responsables de cette sortie chez l'homme sont au nombre de deux et dépendent toutes deux de la phosphorylation de l'ATP. La première, la protéine hAtp7ap (pour *human Atp-ase7a protein*) est présente dans tous les types cellu-

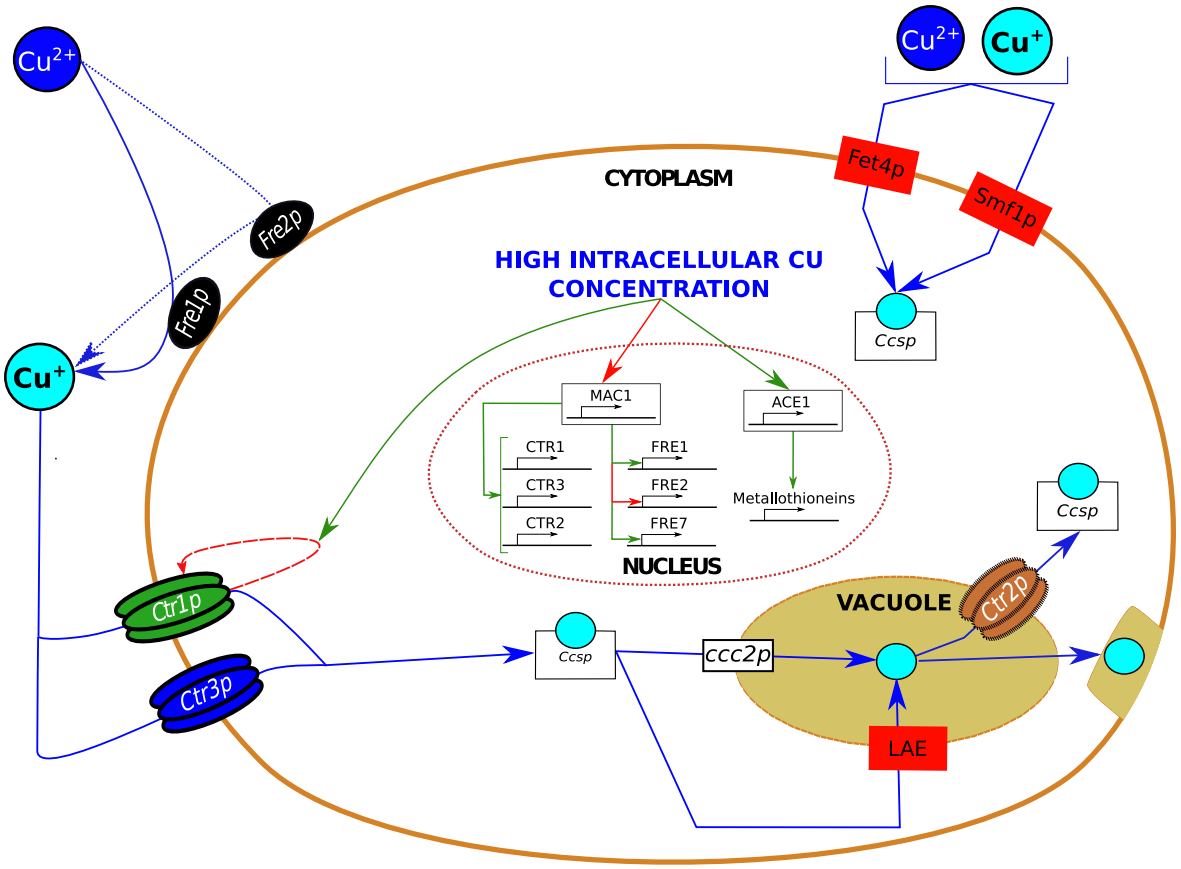


FIGURE 1.28 – *Transport cellulaire du cuivre chez* Saccharomyces cerevisiae.
Avant d'entrer dans les cellules, le Cu est réduit par des réductases membranaires du Cu : Fre1p et Fre2p [Georgatsou and Alexandraki, 1999; Georgatsou et al., 1997; Hasset and Kosman, 1995; Martins et al., 1998]. Le Cu est ensuite importé via *des importateurs transmembranaire à haute affinité constitués de trois monomères : Ctr1p [Dancis et al., 1994a,b] et Ctr3p [Knight et al., 1996; Peña et al., 2000]. Le Cu peut aussi entrer dans les cellules sous forme Cu(I) ou Cu(II)* via *des importateurs à basse affinité (Fet4p et Smf1p) [Hasset et al., 2000; Liu et al., 1997]. Le Cu est ensuite distribué aux différents compartiments cellulaires notamment* via *les métallothionéines dont Ccsp [Robinson and Winge, 2010]. Le Cu est excrété* via *Ccc2p qui est l'équivalent des protéines hATP7 humaines et probablement* via *des exportateurs à basse affinité. L'import du Cu est régulé* via *le facteur de transcription Mac1p [Graden and Winge; Jungmann et al., 1993; Keller et al., 2005; Labbé et al., 1997; Peña et al., 2000]. Cette protéine régule l'expression des importateurs à haute affinité du Cu et des réductases du Cu. La protéine Ctr1p est également régulée au niveau protéique. Quand les importateurs à haute affinité (Ctr1p et Ctr3p) sont absents, la réductase Fre7p et l'importateur vacuolaire à haute-affinité sont sur-exprimés grâce à Mac1p.*

laires et permet la sortie du Cu dans le milieu extra-cellulaire (résumé dans Nevitt et al. [2012]). La seconde, la protéine hAtp7b est présente uniquement dans certains types cellulaires. Elle a par exemple pour rôle de faire sortir le Cu du foie vers la bile et du fœtus vers la mère (Tableau 1.3). Ces deux protéines sont qualifiées de pompes à Cu, dont l'activité nécessite de l'ATP. Elles permettent le transfert du Cu lié au métallochaperones telles que

hAtox1p vers le milieu extracellulaire. Chez *S. cerevisiae*, l'export du Cu se fait de manière indirecte *via* un pré-stockage dans la vacuole. Ce pré-stockage se fait *via* l'activité d'une protéine appelée Ccc2. Tout comme les protéines hAtp7a et hAtp7b, la protéine Ccc2 est une ATPase [Axelsen and Palmgren, 1998]. Par conséquent, Ccc2 est l'analogue structurelle et fonctionnelle aux ATPase à Cu (Figure 1.28).

Les exportateurs du Cu de *S. cerevisiae* et de l'homme ont des structures analogues. Ils se distinguent par 8 domaines transmembranaires en hélice et possèdent un domaine permettant la phosphorylation de l'ATP [Wittung-Stafshede, 2015]. Ils ont surtout la caractéristique de posséder 6 domaines cytoplasmiques de liaison au Cu. Ces liaisons Cu-acides aminés se font soit au niveau de trois Met alignées dans une géométrie trigonale plane (comme pour hCtr1p) ou par la liaison du Cu avec deux cystéines et une méthionine (ce qui diffère de hCtr1p) [Lutsenko et al., 2007]. Étant donné l'analogie structurelle des exportateurs de *S. cerevisiae* et humain, l'effet de l'export sur la composition isotopique en Cu cellulaire sera similaire dans ces deux organismes.

Les mécanismes de réduction, d'import et d'export du Cu sont donc analogues entre *S. cerevisiae* et l'homme (résumé dans la figure 1.27). Leurs effets sur la composition isotopique en Cu de la cellule a pu être estimé grâce aux calculs *ab-initio* (résumé dans le tableau 1.6).

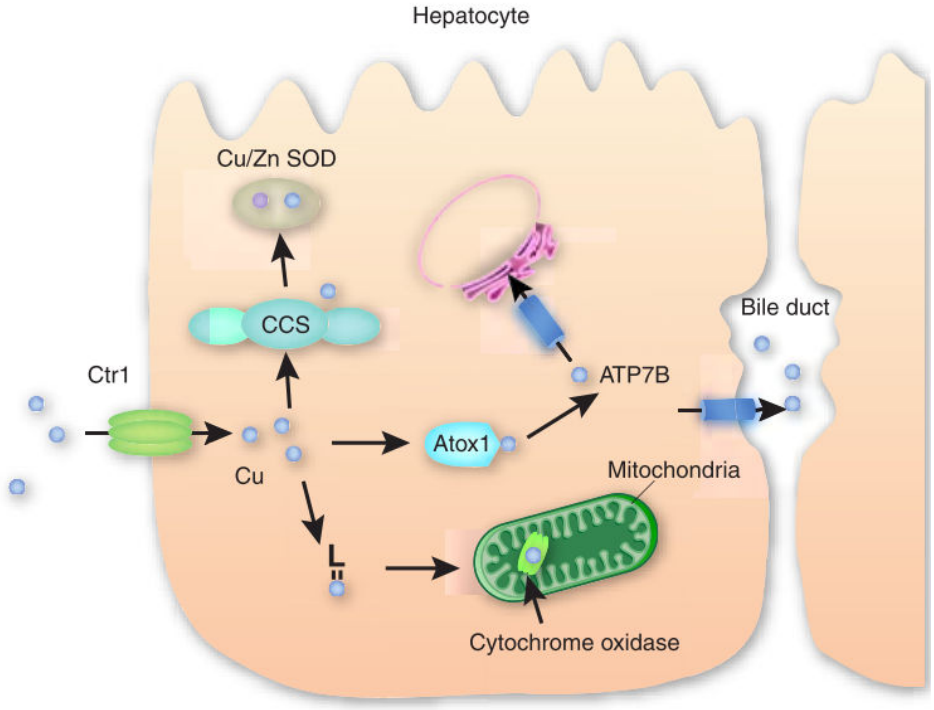


FIGURE 1.29 – *De l'import du cuivre par les cellules hépatiques à son excrétion dans la bile.*
Le Cu^+ est importé par hCtr1p dans la membrane plasmique. Il est ensuite distribué aux différents compartiments cytoplasmiques via hCccsp et hAtox1p. Cette dernière peut délivrer le Cu à hAtp7b qui exporte le Cu vers le réticulum endoplasmique ou vers la bile (d'après Kim et al. [2008]).

Tableau 1.6 – *Tableau comparatif des protéines membranaires impliquées dans l'entrée et dans la sortie du cuivre des cellules humaines et des cellules de* Saccharomyces cerevisiae.
Les différentes protéines humaines sont soulignées. La description exacte de la structure et de la fonction de ces protéines est reportée dans le texte. L'homologie entre les protéines humaines et les protéines de levure peut être fonctionnelle (quand une protéine a la même fonction) et/ou structurelle (quand la protéine a la même structure). Enfin, les effets théoriques de ces protéines sur le $\delta^{65}Cu$ *cellulaire sont reportés.*

Protéines		Localisation et structures	Liaison Cu-Acide aminé	Homologie avec l'homme	Effet théorique sur le $\delta^{65}Cu$ cellulaire
Réductase	hSteap 1-4	Transmembranaires, site actif sur la partie extra-cellulaire	Inconnue		Diminution
	Fre 1 à 6	Transmembranaires, site actif sur la partie extra-cellulaire	Inconnue	Fonctionnelle et structurelle	Diminution
Importateurs à haute affinité	hCtr1p	Transmembranaire, holotrimérique, pore actif secondaire	Cu-Méthionine		Diminution
	Ctr1p	Protéines transmembranaires, holotrimériques, pore actif secondaire	Cu-Méthionine	Fonctionnelle et structurelle	Diminution
	Ctr3p	Transmembranaire, holotrimériques, pore actif secondaire	Cu-Cystéine	Fonctionnelle et structurelle	Diminution
Importateurs à basse affinité	h?	Inconnue	Inconnue		Inconnue
	Fet4p	Protéine transmembranaire transportant le Fe	Inconnue	Inconnue	Inconnue
	Smf1p	Protéine transmembranaire transportant le Zn	Inconnue	Inconnue	Inconnue
Exportateurs	hAtp7a	Pompe à Cu ATPasique de type 1 présente dans tout les types cellulaires	Cu-Méthionine et Cu-cystéine		Augmentation
	hAtp7b	Pompe à Cu ATPasique de type 1 présente dans tout les types cellulaires	Cu-Méthionine et Cu-cystéine		Augmentation
	Ccc2	Pompe à Cu ATPasique de type 1 présente dans tout les types cellulaires	Cu-Méthionine et Cu-cystéine	Fonctionnelle et structurelle	Augmentation

1.4.3 Différences dans la régulation de l'homéostasie en Cu chez l'homme et chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chez l'homme, le contrôle de l'homéostasie en Cu se fait au niveau du foie qui contrôle la concentration en Cu dans le sang (Figure 1.1). *S. cerevisiae* est un organisme unicellulaire, le contrôle du taux de Cu intracellulaire se fait ainsi directement dans les cellules. Le facteur de transcription activé par de faibles concentrations cellulaires en Cu est la protéine Mac1p [Jungmann et al., 1993]. Cette protéine se lie aux promoteurs de différents gènes. Elle active la transcription de FRE1 [Graden and Winge; Labbé et al., 1997], de CTR1 [Keller et al., 2005] et de CTR3 [Peña et al., 2000] alors qu'elle inhibe la transcription de FRE2 (Figure 1.28). Lorsque la concentration de Cu intra-cellulaire est élevée, la protéine Ace1p est activée et la protéine Mac1 est inhibée. La protéine Ace1p va activer l'expression des

métallothionéines telles que Sod1p [Gralla et al., 1991]. Ces protéines vont lier le Cu libre qui peut être toxique pour la cellule. La différence majeure entre la levure *S. cerevisiae* et l'homme réside dans la régulation intracellulaire des protéines permettant l'entrée du Cu dans la cellule. Ceci aura une incidence sur la dynamique de l'expression des gènes et donc sur la quantité d'importateurs et de réductases dans la membrane et non sur le fonctionnement des protéines codées par ces gènes. Or, seule l'activité des différentes protéines a une influence sur la composition isotopique en Cu cellulaire. Ainsi, la régulation par Mac1p des différentes protéines impliquées changera uniquement le flux par ces protéines. Cette régulation ne changera pas les mécanismes de liaisons des protéines au Cu et n'influe ainsi pas sur le fractionnement isotopique lié à chaque protéine.

1.5 Objectifs du travail de thèse

Les mécanismes de réduction du Cu et d'import du Cu sont proches chez la levure *S. cerevisiae* et chez l'homme (résumé dans la figure 1.27). La levure est un organisme modèle facile à cultiver et à muter, il a ainsi été choisi comme modèle d'étude durant cette thèse. Les calculs *ab-initio* prédisent que les mécanismes de réduction, d'import et d'export du Cu peuvent être à l'origine de fractionnements isotopiques du Cu mesurables dans les cellules (de l'ordre de -1‰) (résumés dans le tableau 1.6). Ces mécanismes sont des candidats potentiels pour expliquer l'origine du fractionnement isotopique du Cu chez l'homme. *In fine* le but de cette thèse était de comprendre l'effet de chacune de ces protéines sur le fractionnement isotopique du Cu. Afin de simplifier le système je me suis placé dans des conditions où seuls la réduction et l'import du Cu pouvaient avoir une incidence sur la composition isotopique du Cu de la cellule. **Le but de cette étude était de connaître la valeur du facteur de fractionnement isotopique associé à chaque réductase et importateur du Cu de la cellule (Figure 1.28).** Ce travail a donné lieu à une publication dans *Scientific Reports* (Cadiou et al. [2017], Chapitre 2) et deux manuscrits en préparation qui seront soumis à *Metallomics* (Cadiou et al. [in preparation-1], Chapitre 3) et à *Scientific Reports* (Cadiou et al. [in preparation-2], Chapitre 4).

La première étude avait pour but de déterminer qui des réductases du Cu ou des importateurs du Cu étaient responsables des fractionnements isotopiques du Cu observés. Le premier objectif de cette étude était de reproduire l'enrichissement en isotopes légers du Cu observés dans certaines cellules saines humaines. Pour cela, des levures (*S. cerevisiae*) ont été cultivées dans un milieu, dont la concentration en Cu était suffisante au bon développement cellulaire (0.8 µM). Puis, ces levures ont été placées dans un milieu dopé en Cu (80 µM). J'ai alors vérifié que ces conditions expérimentales permettaient d'observer un enrichissement en isotopes légers du Cu. J'ai ensuite cherché à identifier qui de la réduction ou de l'import du Cu était responsable du fractionnement isotopique du Cu observé. Ainsi, j'ai choisi, pour cette première étude, de comparer trois souches de levure. La première était une souche dite sauvage (*wild type*, (WT)), représentée en vert dans les différentes figures de cette thèse. La seconde présentait un très faible nombre de réductases membranaires et un très faible nombre d'importateurs du Cu (SKY34, représentée en bleu). Enfin, la troisième ne possédait pas de transporteurs à haute affinité du Cu (MPY17, représentée en rouge). Afin de caractériser l'effet de la réduction sur le fractionnement isotopique du Cu, nous avons cultivé des cellules de la souche SKY34 dans un milieu totalement réduit et nous avons créé une souche SKY34 où les protéines de réductases était surexprimée (SKY FRE). Les différentes expériences menées m'ont permis de montrer que l'import du Cu est responsable du fractionnement isotopique du Cu observé chez *S. cerevisiae*. Cet organisme est un organisme modèle du transport du Cu chez les eucaryotes, mes résultats peuvent ainsi être étendus aux eucaryotes. De plus, j'ai pu

montrer que le fractionnement isotopique du Cu est modulé par l'activité des réductases membranaires. Cette étude a été publiée dans la revue "*Scientific Reports*".

Le but de la deuxième étude était de comprendre l'effet spécifique de chaque importateur du Cu et de chaque réductase du Cu sur la composition isotopique en Cu des cellules. Pour cela différentes souches isogéniques de levure ont été utilisées. Ces souches étaient soit déficientes en transporteurs à haute affinité du Cu (représentées en orange), soit déficientes en réductases du Cu (représentées en rose), soit déficientes en exportateurs du Cu (représentées en noir). En utilisant le même protocole que celui utilisé dans la première étude, j'ai pu montrer que chaque génotype est caractérisé par une composition isotopique en Cu différente et que le transport du Cu par les importateurs à haute affinité (Ctr1p et Ctr3p) est responsable du fractionnement isotopique du Cu. J'ai également montré que plus le flux par ces importateurs est élevé, plus la cellule est enrichie en isotopes légers du Cu. En faisant l'hypothèse que les mécanismes protéiques de fractionnement isotopique du Cu sont similaires chez l'homme et chez la levure, j'ai proposé que l'enrichissement en isotopes lourds observé dans les tumeurs provient d'une diminution du flux de Cu au travers des transporteurs à haute affinité humain : le transporteur hCtr1p. Cette diminution peut notamment être liée à une moindre expression des réductases humaines du Cu. Cette étude sera soumise à la revue "*Metallomics*".

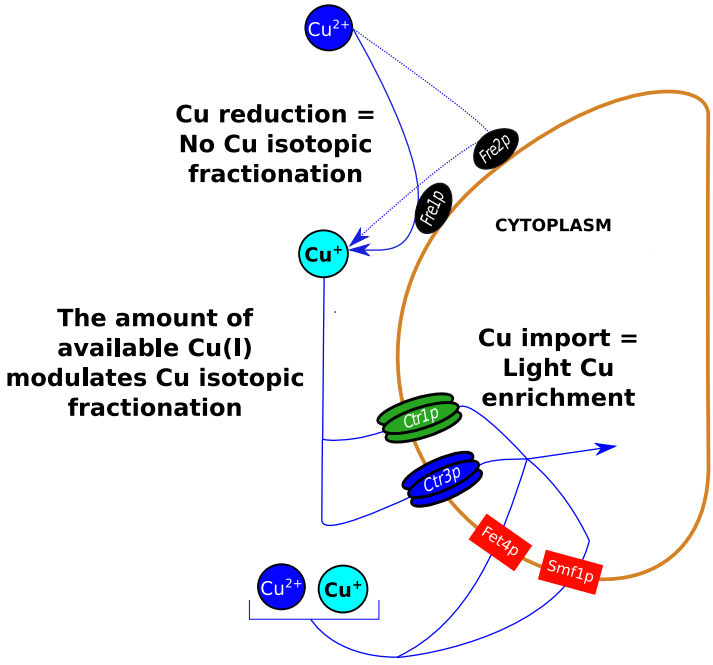
Le cisplatine, un agent cytotoxique utilisé dans les traitements contre le cancer, entre dans la cellule par les mêmes transporteurs que le Cu. Il existe des cancers résistants au traitement, et dans d'autres cas, malgré un succès initial, les cellules cancéreuses finissent par survivre au traitement. Cela signifie que le cancer est donc intrinsèquement résistant au cisplatine, ou le devient au cours du traitement. Un des mécanismes de résistance au cisplatine est sa non-accumulation dans la cellule liée à une diminution de l'import. Je me suis intéressé spécifiquement à cet effet. **Le premier but de cette troisième étude était d'étudier le lien entre la composition isotopique du Cu et la résistance au cisplatine. Le second but était de tester l'effet d'un traitement au cisplatine sur la composition isotopique du Cu.** Pour lier le phénotype isotopique du Cu à un phénotype de résistance au cisplatine, j'ai étudié le lien existant entre la résistance au traitement au cisplatine et la composition isotopique en Cu dans différentes souches de levure. J'ai montré que les souches résistantes au cisplatine sont moins enrichies en isotopes légers du Cu que la souche sauvage sensible au traitement. J'ai également observé que l'ajout de cisplatine au milieu de culture entraîne un enrichissement en isotopes lourds du Cu des cellules et ce, quelle que soit la souche considérée. Il est notable que la différence de composition isotopique du Cu entre des cellules d'une même souche cultivées avec et sans cisplatine est d'autant plus grande que la souche est sensible au cisplatine. Étant donné que les protéines impliquées dans l'import du Cu et du cisplatine chez l'homme et chez la levure sont proches, j'ai proposé que l'effet du cisplatine sur la composition isotopique du Cu est identique chez ces deux organismes. Les résultats obtenus chez *S. cerevisiae* suggèrent que l'ap-

parition d'une résistance au cisplatine entraîne un moindre enrichissement en isotopes légers du Cu. Appliqué à l'homme le suivi de la composition isotopique du Cu avant et après un traitement au cisplatine permettrait de détecter l'apparition d'une résistance au cisplatine de la tumeur. Si les cellules tumorales sont plus enrichies en isotopes lourds du Cu après le traitement qu'avant le traitement, alors une résistance au cisplatine a été acquise. Ceci ouvre la voie à la potentielle utilisation des isotopes stables du Cu comme biomarqueur diagnostique de la résistance au cisplatine. Cette étude sera soumise à la revue "*Scientific reports*".

CHAPITRE 2

Les transporteurs du cuivre sont responsables du fractionnement isotopique du cuivre des cellules eucaryotes

Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells



Résumé graphique – Graphical Summary

Introduction (français)

Les organismes eucaryotes ont la caractéristique commune de présenter un enrichissement en isotopes légers du Cu. Ceci a par exemple été observé dans des plants de tomate [Jouvin et al., 2012] et dans la plupart des organes de mammifères [Balter et al., 2013]. Pour les plantes, un enrichissement en isotopes légers du Zn a également été observé [Aucour et al., 2011]. Le contrôle du milieu de culture et la facilité de prélèvement des différentes parties des plantes a permis d'étudier plus précisément l'origine de ces fractionnements isotopiques du Cu et du Zn. Pour ces organismes l'enrichissement en isotopes légers du Cu est probablement dû à sa réduction par les enzymes membranaires et l'enrichissement en isotopes légers du Zn par son import au travers des importateurs membranaires [Aucour et al., 2011; Jouvin et al., 2012]. Un lien entre le transport protéique des métaux de transition et la composition isotopique des cellules a ainsi été établi chez les plantes. Il est ainsi probable qu'un changement du transport du Cu dans les cellules eucaryotes entraîne un changement de la composition isotopique du Cu. De tels changements ont été observés lors du développement de cancers [Babich et al., 2013]. Ceci suggère un changement de composition isotopique du Cu chez les patients atteints de cancer. Afin de vérifier ce changement *in vivo*, la composition isotopique du Cu a été étudiée dans le sang et les tumeurs de deux cohortes de patients atteints de cancer du foie. Les globules rouges des patients de la première cohorte sont enrichis en isotopes légers du Cu par rapport à des globules rouges de patients sains, tandis que les cellules tumorales des patients de la deuxième cohorte sont enrichies en isotopes lourds en comparaison des cellules péritumorales de ces mêmes patients [Balter et al., 2015]. Le but de cette thèse était de comprendre l'origine protéique de la différence de composition isotopique du Cu entre les cellules tumorales et les cellules péri-tumorales. Plusieurs molécules, telles que le lactate (un ose sérique liant le Cu) ont été proposées comme étant responsables de ce fractionnement [Albarède, 2015]. Cependant, le fait que les cellules tumorales soient enrichies en isotopes lourds du Cu suggère une origine cellulaire du fractionnement isotopique du Cu. C'est l'hypothèse qui a été étudiée durant cette thèse.

Avant d'entrer dans les cellules eucaryotes le Cu est réduit par des enzymes membranaires appelées réductases. Il est ensuite importé dans les cellules via des transporteurs transmembranaires. Théoriquement, la réduction du Cu dans les conditions cellulaires entraîne un enrichissement en isotopes légers du Cu [Balter et al., 2013; Fujii et al., 2013]. Avant d'être transporté par les transporteurs membranaires, le Cu réduit se lie à des acides-aminés des importateurs du Cu, tels que la méthionine ou la cystéine. D'après les calculs *ab-initio* la liaison du Cu(II) à la cystéine entraîne un enrichissement en isotopes légers du Cu [Balter et al., 2013; Fujii et al., 2013]. Dans cette première étude, ces mêmes calculs ont été effectués afin de prédire dans les conditions cellulaires le fractionnement isotopique du Cu lié à la liaison du Cu(I) aux acides-aminés des importateurs. Ces cal-

culs prévoient un enrichissement en isotopes légers du Cu dans les cellules, en lien avec son transport transmembranaire. Ainsi, la réduction du Cu et son transport transmembranaire entraînent théoriquement un enrichissement en isotopes légers du Cu dans les cellules. Il conviendra de vérifier cet enrichissement dans un modèle cellulaire.

Dans cette première étude, nous avons testé *in vivo* l'effet de la réduction enzymatique du Cu et de son transport au travers des importateurs transmembranaires du Cu sur la composition isotopique du Cu dans les cellules. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae* : *S. cerevisiae*) dont les mécanismes de réduction et d'import du Cu sont proches de ceux de l'homme [Nevitt et al., 2012]. Cet organisme présente l'intérêt d'être un organisme unicellulaire facilement modifiable génétiquement. Le but de l'étude était de comparer différents mutants de levure afin de comprendre l'effet de l'import et de la réduction du Cu sur la composition isotopique de la cellule.

Avant de tester l'origine du fractionnement isotopique du Cu chez *S. cerevisiae*, il convenait de vérifier que la levure est un bon modèle de l'enrichissement en isotopes légers du Cu observé notamment chez l'homme. Pour cela, nous avons cultivé des cellules de levure dans un milieu peu concentré en Cu (0.8 µM). Ces cellules ont ensuite été placées dans un milieu contenant 80 µM de Cu et leurs concentrations ainsi que leurs compositions isotopiques du Cu ont été mesurées au cours du temps. Ces expériences sont dites expériences d'*uptake*. Conformément à ce qui était attendu, nous avons observé une augmentation de la concentration cellulaire en Cu au cours de l'expérience. Cette augmentation est corrélée à un enrichissement en isotopes légers du Cu pour la souche sauvage de levure ($\delta^{65}Cu_{240min.}$ = -0.85 ‰/10^8cellules). **Le protocole expérimental utilisé pour *S. cerevisiae* reproduit ainsi l'enrichissement en isotopes légers du Cu observé dans les cellules saines humaines.**

Le but de cette étude était de quantifier l'effet de la réduction et de l'import du Cu sur la composition isotopique du Cu des cellules. Les processus passifs à l'origine du fractionnement isotopique du Cu devaient être négligeables dans les expériences menées. Or, il a été observé pour les bactéries telles que *Escherichia coli* que l'absorption du Cu par les parois cellulaires entraîne un fractionnement isotopique du Cu [Navarrete et al., 2011]. Afin, de vérifier si l'absorption cellulaire du Cu était négligeable dans nos expériences, nous avons réalisé une expérience d'*uptake* à 0°C. Dans ces conditions, l'activité enzymatique est nulle. Nous avons observé que la concentration en Cu dans les cellules ne varie pas après l'addition de Cu dans le milieu. **L'absorption pouvait être négligée dans nos expériences.**

Afin de comprendre l'effet de l'import du Cu sur le fractionnement isotopique du Cu nous avons utilisé trois souches différentes de levure. Ces souches étaient :

- une souche sauvage (DTY165, en vert tout au long de l'étude),

- une souche mutée dans un des importateurs à haute afffinité du Cu (CTR1) et dans le facteur de transcription promotteur des réductases et des importateurs du Cu (MAC1) (SKY34, en bleu tout au long de l'étude), [Gross et al., 2000; Nevitt et al., 2012],

- Une souche mutée où Ctr1p et Ctr3p, les deux importateurs à haute affinité du Cu, étaient absents (MPY17, en rouge tout au long de l'étude).

Dans la souche SKY34, la quantité de réductases [Georgatsou et al., 1997] et de Ctr3p est faible en comparaison avec la souche sauvage. Afin de vérifier la faible activité des réductases dans la souche SKY34, nous avons étudié la capacité à réduire le Cu de cette souche et de la souche sauvage. Nous avons alors mis en évidence une capacité à réduire le Cu quatre fois inférieure dans la souche SKY34 par rapport à la souche sauvage.

Nous avons ensuite étudié le δ^{65}Cu de la souche SKY34 afin de le comparer à la souche sauvage. Nous avons montré que cette valeur y est proche de 0‰/10^8cellules alors que le δ^{65}Cu de la souche sauvage et de la souche MPY17 décroît avec le temps pour atteindre des valeurs de -0.85 et de -0.67‰/10^8cellules respectivement. La souche SKY34 qui réduit et importe peu le Cu ne présente pas d'enrichissement en isotopes légers du Cu. Ainsi, l'import et la réduction du Cu sont responsables du fractionnement isotopique du Cu. Il restait à comprendre l'effet relatif de l'import et de la réduction du Cu sur le fractionnement isotopique du Cu. Pour cela, nous avons réalisé une expérience d'uptake en présence d'un réducteur fort (l'acide ascorbique) avec la souche SKY34. Dans ces conditions, nous avons vérifié que l'intégralité du Cu disponible pour les importateurs est réduit. Ceci fait que seul le transport du Cu peut avoir un effet sur le δ^{65}Cu de la cellule. Dans ces conditions, nous avons observé un δ^{65}Cu identique à celui de la souche sauvage. Si les réductases avaient eu un effet sur le fractionnement isotopique du Cu alors nous aurions dû mesurer dans cette expérience un δ^{65}Cu différent de celui de la souche sauvage. Comme ce n'est pas le cas, ceci nous a permis de proposer que la réduction du Cu n'a pas d'effet sur le fractionnement isotopique cellulaire du Cu et que c'est l'import du Cu qui en est responsable. Pour confirmer cela, nous avons changé le promoteur d'une des réductases du Cu dans le fond génétique de SKY34. Cette souche (SKY FRE) a une capacité à réduire le Cu intermédiaire entre la souche sauvage et la souche SKY34 et corrélativement à cela, un δ^{65}Cu intermédiaire entre la souche sauvage et la souche SKY34. **Ainsi, l'activité des réductases module la quantité de Cu(I) disponible pour les importateurs et module ainsi le fractionnement isotopique du Cu lié aux importateurs.**

Cette étude nous a ainsi permis de mettre en place un protocole expérimental permettant l'étude de l'effet des réductases membranaires et des importateurs du Cu sur la composition isotopique du Cu cellulaire. Nous avons montré que c'est l'import du Cu qui est à l'origine de l'enrichissement en isotopes légers du Cu observés chez les eucaryotes. Cet enrichissement est modulé par l'activité des réductases membranaires du Cu. Or, une

moindre expression d'une réductase du Cu humaine a été observée dans les cancers hépatiques [Caillot et al., 2009; Coulouarn et al., 2005]. C'est dans ces mêmes cancers qu'une augmentation du δ^{65}Cu dans les cellules tumorales a été observée [Balter et al., 2015]. **Nos résultats suggèrent ainsi que l'augmentation du δ^{65}Cu dans les cellules tumorales est due à la diminution de la quantité de réductases membranaires dans les cellules tumorales hépatiques.**

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells

Received: 18 August 2016
Accepted: 06 February 2017
Published: 17 March 2017

Jean-Loup Cadiou[1], Sylvain Pichat[1], Victor P. Bondanese[1], Alexandre Soulard[2], Toshiyuki Fujii[3], Francis Albarède[1] & Philippe Oger[1,2]

Copper isotopic composition is altered in cancerous compared to healthy tissues. However, the rationale for this difference is yet unknown. As a model of Cu isotopic fractionation, we monitored Cu uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, whose Cu import is similar to human. Wild type cells are enriched in ^{63}Cu relative to ^{65}Cu. Likewise, ^{63}Cu isotope enrichment in cells without high-affinity Cu transporters is of slightly lower magnitude. In cells with compromised Cu reductase activity, however, no isotope fractionation is observed and when Cu is provided solely in reduced form for this strain, copper is enriched in ^{63}Cu like in the case of the wild type. Our results demonstrate that Cu isotope fractionation is generated by membrane importers and that its amplitude is modulated by Cu reduction. Based on *ab initio* calculations, we propose that the fractionation may be due to Cu binding with sulfur-rich amino acids: methionine and cysteine. In hepatocellular carcinoma (HCC), lower expression of the *STEAP3* copper reductase and heavy Cu isotope enrichment have been reported for the tumor mass, relative to the surrounding tissue. Our study suggests that copper isotope fractionation observed in HCC could be due to lower reductase activity in the tumor.

As other transition metals, copper (Cu) is an essential micronutrient for living organisms, but can become toxic if in excess. At low concentrations, Cu is essential for the activity of proteins such as cytochrome c oxidase, which is involved in mitochondrial respiration. At high concentrations, Cu generates reactive oxygen species that are highly toxic[1,2]. Therefore, living organisms have evolved regulatory mechanisms to control the cellular speciation and content of this metal and avoid its toxicity[3]. Transmembrane proteins allow controlled cellular import and export, and Cu is transported between different organs tightly bound to organic molecules. In contrast, many cancer types exhibit a dysregulation of cellular Cu homeostasis[4,5]. Several eukaryotes seem to react similarly to some cancers: Cu concentration in the blood-serum of healthy mice or humans is lower than that of tumor-bearing mice or human patients affected by breast, lung, or colon cancers[5], respectively. A way of better understanding dysregulation of transmembrane Cu transport is to use Cu isotopes. Indeed, in a preliminary study, Fosset *et al.*[6] used copper enriched in ^{65}Cu for Cu fluxes tracing in cells. Instead natural variability of ^{65}Cu/^{63}Cu along biochemical pathways, a method similar to that has been used to trace fluxes of various elements through various geological reservoirs[7], has been used to trace fluxes in living cells or among organs. It has been found that the ^{65}Cu/^{63}Cu ratio (reported as δ^{65}Cu, *i.e.* the relative enrichment of ^{65}Cu relative to a reference material: $\delta^{65}Cu = 1000 \times [(^{65}Cu/^{63}Cu)_{sample}/(^{65}Cu/^{63}Cu)_{standard} - 1]$) in blood serum decreases with cancer progression[8]. The red blood cells δ^{65}Cu values were found to be lower for patients with hepatocellular carcinoma (HCC) relative to healthy subjects, and accompanied by an increase of δ^{65}Cu in the tumor mass compared to peritumor tissue[9]. To date, the explanations of these isotopic variations observed between healthy and HCC patients remain unclear[10]. Because these variations involve affinity interactions or changes of valence, several steps of Cu transport and translocation between organs, such as Cu reduction, Cu transport through the membrane or Cu fixation on organic ligands, have the potential to generate fractionation. Interestingly, it has been demonstrated that during the development of some cancers, there is a dysregulation of the expression of Cu importers[11] and/or of reductases[12,13] in cancerous cells. Here we explore the possibility that the dysregulation of Cu homeostasis is responsible for the modification of the cellular Cu isotopic composition.

[1]Univ Lyon, ENS de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5276, Lyon, France. [2]Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA-Lyon, CNRS, UMR5240, Villeurbanne, France. [3]Division of Sustainable Energy and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.P. (email: spichat@ens-lyon.fr) or P.O. (email: philippe.oger@insa-lyon.fr)

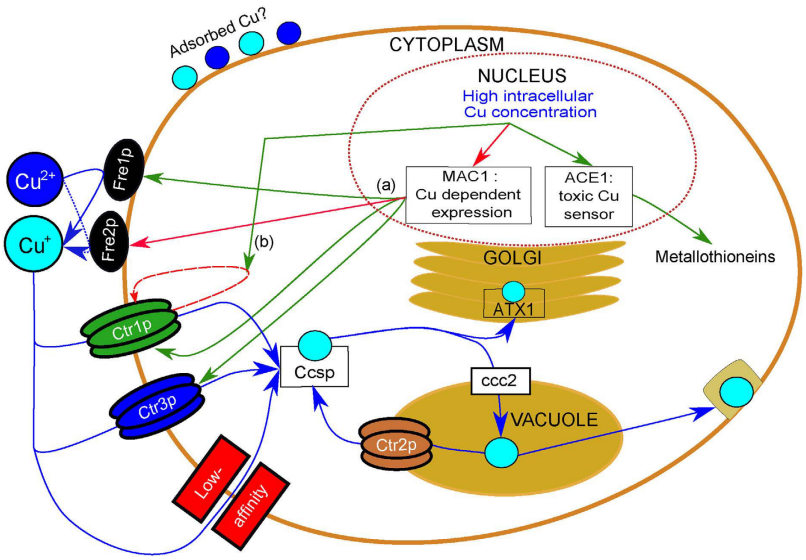


Figure 1. Copper pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Copper fluxes are represented by blue arrows. Regulatory loops are indicated in red (activation) and green (repression). Monovalent and divalent Cu are represented by dark blue and light blue circles, respectively. The first step of Cu import is the reduction of Cu(II) to Cu(I) by the *Fre* reductases, followed by the import through either high-affinity transporters represented in green (*Ctr1p*) and blue (*Ctr3p*) or low-affinity transporters such as *Fet* proteins (red). Copper is subsequently transported in the different compartments of the cell cytoplasm by different protein chaperones such as *Ccsp*, *ATX1* or *ccc2*. Copper transport is regulated by *MAC1* which senses high intracellular Cu concentrations and down regulates the expression of the high-affinity transporters *CTR1* and *CTR3* and of the reductase *FRE1*, while it activates the expression of the *FRE2* reductase[3,14–18,21–25,52].

To test this hypothesis, we used the yeast model-organism *Saccharomyces cerevisiae*, a long-recognized genetic model for Cu metabolism in eukaryotes, which transmembrane Cu transport mechanisms (Fig. 1) are very similar to those of human cells (review by Nevitt *et al.*[3]), and which is prone to genetic manipulation. In *S. cerevisiae*, Cu is first reduced by reductases such as the Fre1 and Fre2 proteins (*Fre1p* and *Fre2p*)[14,15]. Reduced Cu enters the cell through two high-affinity importers Ctr1p[16] and Ctr3p[17] as well as through low-affinity transporters such as Fet proteins[18]. The expression of the *FRE1*, *FRE2*, *CTR1* and *CTR3* genes is controlled by the *Mac1p* transcription factor[19]. Under low Cu, *Mac1p* induces the expression of both *FRE1* and the high-affinity Cu transporters. Under high Cu conditions, the expression of the *MAC1* gene and the activity of *Mac1p* is inhibited, leading to the lower expression of *CTR1*, *CTR3*, and *FRE1*[14,20–22]. *CTR1* is further regulated at the protein level through endocytosis and vacuolar degradation[23–25]. Here, we have monitored Cu uptake and isotopic composition of *S. cerevisiae* mutants, with deletions of high-affinity transporters or impaired Cu reductase activity, in order to identify and quantify the isotopic fractionation associated which each step of the transport process. Our study demonstrates that copper uptake leads to isotopic fractionation between cells and growth-medium, and that this fractionation is generated by Cu importers and modulated by Cu reductases.

Materials and Methods

***Saccharomyces cerevisiae* genotypes and culture conditions.** Four strains of *S. cerevisiae* were used in this study: a wild type (DTY165), a Δctr1Δctr3 mutant (MPY17), a Δctr1Δmac1 mutant (SKY34) and a SKY34 strain where *FRE1* was expressed under the constitutive promoter of ADH (alcohol dehydrogenase). See detailed genotypes in Table 1. DTY165, MPY17, and SKY34 strains were kindly provided by the Thiele Laboratory (Duke University Medical Center, USA). *S. cerevisiae* cells were routinely maintained in Yeast-extract Peptone Dextrose (YPD) medium, which contains low concentrations of Cu (0.25 μmol/l). For our experiments, we used the Yeast Nitrogen Base (YNB) growth medium which contains 0.15 μmol/l of Cu.

Genetic manipulations. Expression of FRE1 was re-established in strain SKY34, by substituting the endogenous *FRE1* promoter (Mac1p dependent) with the ADH promoter. The PCR product obtained using the plasmid pYM-N6[26] and the following primers (forward: CTAATTTCTCGCATATTCACGCCGACGGAAGAACGAGCCGGATCAATATGCGTACGCTGCAGGTCGAC; reverse: ACCGTAGCAAAAAAAGATATAAATAAGCAGAATAATACACGGGTTCTAACCATCGATGAATTCTCTGTCG) was transformed into SKY34 cells followed by selection on YPD-agar plates containing 200 mg/l of G418 (Gibco). Successful promoter substitution was confirmed by PCR screen using the forward primer AACCCAAACATTTTCGCCGA (upstream the recombination region) and the reverse primer KanB1 TGTACGGGCGACAGTCACAT (annealing within the resistance cassette).

Strain	Cu importers		Cu transcription factor	Cu reductases	activity	Genotype	Reference
	Ctr1	Ctr3	MAC1	FRE 1 promoter			
DTY165	(+)	(+)	(+)	wt	+++	MATα ura3-52 his6 leu2-3,-112 his3-Δ 200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ	51
MPY17	(−)	(−)	(+)	wt	+++	MATα ctr1::ura3::Kanr ctr3::TRP1 his3 lys2-801 $CUP1^r$	47
SKY34	(−)	(+)	(−)	wt	+	MATα gal1 trp1-1 his3 ade8 $CUP1^r$ ctr1::TRP1 mac1	47
SKY FRE	(−)	(+)	(−)	ADH	++	MATα gal1 trp1-1 his3 ade8 $CUP1^r$ ctr1::TRP1 mac1 pFRE1Δ::Kanr-pADH	This study

Table 1. Genotype of the four studied *S. cerevisiae* strains. (−) knockout, (+) expressed gene. The relative Cu reductase activity is given by the number of '+' in the 6th column ("activity"). Colors used in this table for each strain are the ones used in the figures.

Cell quantification. Cells were quantified by three different approaches. First, cell growth was monitored by measuring the culture optical density (OD) at 600 nm. Second, cells were counted directly using a Thoma cell. Third, in order to normalize the activity of transporters, total cell protein content was measured using a procedure adapted from Zhang *et al.*[27] and Kushnirov *et al.*[28].

Uptake and adsorption experiments. Uptake experiments were started from pre-cultures grown in YPD at 30 °C with 160 rpm shaking and harvested in late exponential phase. Cells were inoculated at a final concentration of 10^8 cell per ml in fresh 500 ml of YNB containing 2% D-Glucose. The inoculated cultures were doped with 80 μmol/l of Cu ($\delta^{65}Cu = -0.23 \pm 0.06$‰, 2σ, N = 33) at the start of the uptake experiment (t = 0) and incubated at 25 °C with shaking. At each time point, 1 ml of the culture was sampled for cell quantification and 50 ml for Cu elemental and isotopic analyses. Cells were pelleted by centrifugation at 10000 rpm and 2 °C. Cells were washed once with YNB and centrifuged. The cell pellet was then processed for metal analysis. For each time point, 1 ml of the culture supernatant was sampled to measure the concentration and isotopic composition of the culture medium. To test the impact of the Cu oxidation state on its import, similar uptake experiments were performed in presence of 1 mM of ascorbic acid, a strong reducing agent.

Cu adsorption on *S. cerevisiae* cells was monitored as described previously[29] using the experimental conditions described above for uptake experiments, except that cells were incubated on ice to inhibit biological activity, *e.g.* copper uptake by cells.

Preliminary experiments conducted during the development of our experimental settings have shown that the Cu concentration in *S. cerevisiae* cells did not vary significantly between ca. 120–180 min and 240 min and that the number of cells stayed stable between 0–240 min. Some cellular division could occur after ca. 260 min hence possibly modifying the Cu concentration in *S. cerevisiae* cells. Thus, to avoid the effect of cell division on Cu concentration, and a potential impact on Cu isotopic composition, the uptake experiments were limited to 0–240 min. The observation of a plateau for Cu concentration reached after 120–180 min, depending on the strain, is in good agreement with previous studies[18]. Two or three independent experiments, hereafter referred to as "replicate experiments", were performed, with the exception of experiments involving SKY FRE (see Table S1 for details).

Quantification of cellular Cu reduction activity. Cu reduction was measured using a reductase assay modified from Georgatsou *et al.*[14,30]. Briefly, *S. cerevisiae* cells grown as described above were harvested in the late exponential phase. Cells were inoculated at a concentration of 10^9 cells/ml of YNB supplemented with 5% D-Glucose, 2 mM bathocuproine disulfonic acid (BCS) - a Cu chelator that becomes red in the presence of Cu(I) -, and 1 mM $CuSO_4$, and incubated with shaking at 25 °C for 40 min. Since BCS-Cu complexes have a stoichiometry of 2:1[31], our assay contains twice as much BCS as Cu. Reduced Cu was quantified by measuring the optical density at 482 nm[14].

Chemical separation and purification procedures. Cell samples were dissolved following a procedure adapted from the study of Moynier *et al.* on plants[32]. After weighing, samples were placed in 90 ml PTFE jars and dissolved by sequential addition of concentrated HNO_3, then a mixture of concentrated HNO_3:H_2O_2 30% (50:50, v-v). After evaporation, samples were placed in H_2O_2 30% under UV light for two hours at room temperature. The photolysis induced by UV light destroys organic matter[33], which improves the accuracy of the subsequent metal concentration and isotope analyses.

Cellular Cu was separated and purified by anion-exchange chromatography following the procedure described in Maréchal *et al.*[34]. Briefly, the sample was loaded on 1.6 ml of macroporous anion-exchange resin (AG-MP1, 100–200 mesh, Bio-Rad) in 1 ml of 7 N HCl - H_2O_2 0.001%. The matrix was then eluted in 10 ml 7 N HCl - H_2O_2 0.001%, finally Cu was eluted in 20 ml 7 N HCl - H_2O_2 0.001%. This process was repeated once to ensure a complete purification of Cu from the matrix. The whole procedure blank was 8 ng, which is well below the amount of Cu in *S. cerevisiae* samples (>300 ng).

For the growth medium, the separation procedure had to be adapted because of the high organic content of the medium. Briefly, the first purification step was performed with a resin (1.6 ml of AG-MP1, 100–200 mesh, Bio-Rad) conditioned with 20 ml of a mixture of 80% EtOH (96%): 20% (7 N HCl- H_2O_2 0.001%) (v:v), then the

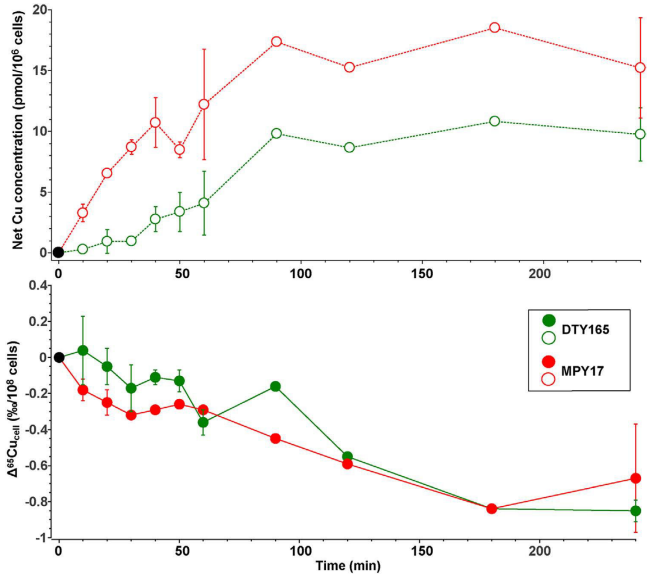


Figure 2. Net variations of the Cu concentration and isotopic composition in *S. cerevisiae* for the wild-type (green) and the Δctr1Δctr3 double-knockout strain (red). Upper panel: variations of the Cu concentration over 240 min. during uptake experiments. Values are reported as the difference Cu(t) − Cu(t = 0) normalized to 10^8 cells (see text for details). Lower panel: variations of the Cu isotopic composition (reported as $\Delta^{65}Cu_{cell} = \delta^{65}Cu(t) - \delta^{65}Cu(t=0)$, see text for details) normalized to 10^8 cells. The error bars are the standard deviation between independent experiments (see Table S1 for details).

sample was loaded in 1 ml of 7 N HCl-H_2O_2 0.001%. The matrix was eluted in 50 ml of 80% EtOH (96%): 20% (7 N HCl- H_2O_2 0.001%) (v:v) followed by the elution of Cu in 30 ml of 7 N HCl-H_2O_2 0.001%. A second purification step was performed as described above for *S. cerevisiae* samples.

Elemental and isotopic Cu measurements. Cu concentrations were measured by Quadrupole Inductively-Coupled Plasma Mass-Spectrometry (Q-ICP-MS, Agilent 7500cx) and Cu stable isotope compositions by Multi-Collector Inductively-Coupled Plasma Mass-Spectrometry (MC-ICP-MS, Nu500 HR, Nu Instrument) in wet plasma mode. For this purpose, 50 ml aliquots were taken from the culture medium at *ca.* 10^8 cells/ml for each time point (see details in the "Uptake and adsorption experiments" subsection). The instrumental mass fractionation was corrected for using Zn-doping and standard-sample bracketing following the procedure developed by Maréchal *et al.*[34]. Samples were diluted to match the concentration of the standard mixture (typically Zn 0.3 ppm - Cu 0.3 ppm). The mass-dependence of isotope fractionation has been systematically checked. The $\delta^{65}Cu$ is reported relative to the isotopic solution reference material NIST SRM 976. Measurements were repeated several times over the course of independent MC-ICP-MS sessions (see Supplementary Table S1 for details), hereafter referred to as "replicate measurements". The long-term external reproducibility was assessed by measuring (1) aliquots of the same *S. cerevisiae* sample (Supplementary Table S2) in four runs over the course of three months: $\delta^{65}Cu = -1.47 \pm 0.04$‰ (2σ, N = 8), and (2) the Cu solution used for *S. cerevisiae* cultures doping, which was analyzed for each batch of cultures: $\delta^{65}Cu = -0.23 \pm 0.06$‰ (2σ, N = 33). Thus, we define the external error for our measurements at 0.06‰ (2σ).

Results

Effect of Cu uptake on Cu isotopes fractionation by *S. cerevisiae* cells. During uptake experiments, the Cu concentration in the wild type strain (DTY165) and the high-affinity importer knockout strain (MPY17) increased quickly and reached a plateau after approximately 120 minutes (Fig. 2). It is worth noting that a Cu concentration plateau reached after *ca.* 120 min is in agreement with previous studies conducted on Cu uptake by *S. cerevisiae*[18]. It can be considered that this time signals the compensation of Cu import by Cu export. We found that the plateau is remarkably high, reaching 16.6 pmol per 10^6 cells, in MPY17 - the strain lacking high-affinity importers – relative to DTY165 (9.7 pmol per 10^6 cells) (Fig. 2).

The contribution of Cu adsorption on Cu content in *S. cerevisiae* cells was evaluated by uptake experiments on ice, which limits active import. Our results show that adsorption on *S. cerevisiae* cells is very limited and does not vary with time (Fig. 3) and therefore does not contribute significantly to the cellular Cu content.

The experimental conditions were designed so that Cu uptake by cells was negligible relative to the metal stock in the growth medium. Concentration in the medium throughout the experiments remained indeed stable, within analytical error (± 5%), around the initial concentration (Supplementary Fig. S1). We also confirmed that Cu uptake by cells did not impact the isotopic composition of the medium (Supplementary Fig. S1). The Cu stock in the growth medium can therefore be considered infinite relative to *S. cerevisiae* uptake. Its isotopic composition ($\delta^{65}Cu_{medium}$) at any given time is equal to that of the Cu doping solution ($\delta^{65}Cu = -0.23$‰ ± 0.06‰, 2σ, N = 33). The cellular isotopic composition relative to the growth medium at time t can be defined as $\Delta^{65}Cu$

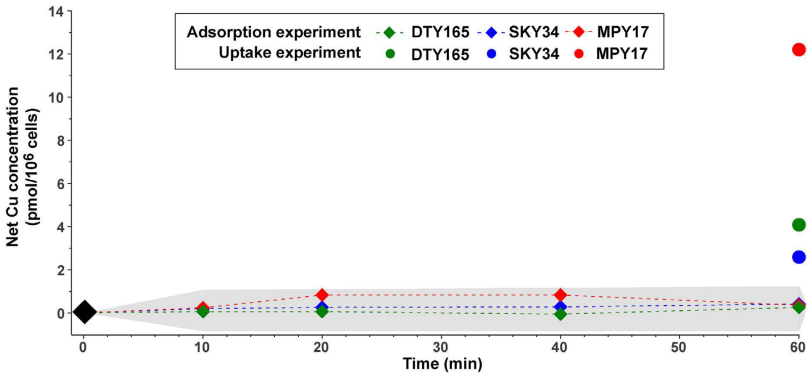


Figure 3. Cu adsorption on *S. cerevisiae* cells (diamonds) over 60 min. Cell contents (circles) at 60 min in uptake experiments are indicated for comparison. The grey range represents the analytical uncertainty on the measurement.

$(t) = \delta^{65}Cu_{cell}(t) - \delta^{65}Cu_{medium}$. To compare the evolution of cellular isotopic compositions over time between the various strains, we subtracted the initial $\Delta^{65}Cu$ (0) value for each strain to the $\Delta^{65}Cu$ (t) at each sampling time t. Thus, we define $\Delta^{65}Cu_{cell}(t) = \Delta^{65}Cu(t) - \Delta^{65}Cu(0) = \delta^{65}Cu_{cell}(t) - \delta^{65}Cu_{cell}(0)$. Finally, each value was normalized to 10^8 cells and is thus expressed as ‰/10^8 cells. An example of the full calculation is given in Table S1.

The $\Delta^{65}Cu_{cell}$ decreases with time and reaches a plateau at -0.85 ± 0.06‰/10^8cells for DTY165 and -0.67 ± 0.30‰/10^8cells for MPY17 (Fig. 2). Therefore, when the plateau is reached, the presence or absence of copper high-affinity transporters does not seem to have a major influence on Cu fractionation in *S. cerevisiae*.

Impact of Cu oxidation state on *S. cerevisiae* $^{65}Cu/^{63}Cu$. In solution, at neutral pH, Cu is present as Cu(II), whereas transport through the membrane involves Cu(I)[15]. Before entering cells, Cu is reduced by two *S. cerevisiae* proteins: *Fre1p* and *Fre2p*[14–15]. The impact of the copper oxidation state on fractionation was addressed through three different approaches. We first tested the evolution of Cu uptake and isotopic composition of a *MAC1* knockout *S. cerevisiae* strain (SKY34). Such mutation leads to a lower Cu reduction activity compared to the wild type. Indeed, *Mac1p* allows *FRE1* transcription by binding to its promoter region, thus in a *MAC1* knockout the expression of *FRE1* is largely suppressed[14]. It was verified that the overall Cu reduction ability of SKY34 is greatly impaired, being three times lower (1.25 ± 0.003 μmol.l^{-1}.min^{-1}) than in the wild type strain DTY165 (3.62 ± 0.12 μmol.l^{-1}.min^{-1}) (Fig. 4). Our analyses show that the Cu content measured in SKY34 is not significantly different from that measured in the wild type DTY165 (Fig. 5). Although the *MAC1* knockout and the lower Cu reduction ability of the SKY34 strain show no effect on Cu uptake, it affects the isotopic composition relative to the wild type or MPY17 cells with deleted high-affinity importers. Indeed, the $\Delta^{65}Cu_{SKY34}$ values oscillated around -0.01 ± 0.08‰/10^8cells (2σ, N = 10) between t = 0 and 240 min (Fig. 5). One possible explanation for this observation is the low availability of Cu(I) for transport.

To test whether Cu reduction is the limiting step for Cu uptake and monitor the effect on Cu isotopic fractionation, we cultured SKY34 cells in a growth medium containing exclusively Cu(I). In effect, the addition of ascorbic acid to the growth-medium reduces copper in solution to its monovalent form (see the Experimental Procedures section for details). Copper uptake by SKY34 cells under these conditions was increased by a factor of six and the $\Delta^{65}Cu_{cell}$ of SKY34 cells reached plateau values (-0.90 ± 0.02‰/10^8 cells) comparable to those of the DTY165 and MPY17 strains (Fig. 5).

To confirm this link between Cu reduction and higher Cu uptake, we used the SKY FRE strain in which *FRE1* expression is rescued. The reduction rate for this strain was 2.07 ± 0.32 μmol.l^{-1}.min^{-1}, which is twice that of SKY34 (Fig. 4). The consequence of this higher reduction rate is that twice as much Cu was taken up by SKY FRE cells (Fig. 5). This indicated that the availability of Cu in its transportable form Cu(I) for the cell is limiting for the uptake of copper by SKY34 cells under normal culture conditions. Under normal culture conditions, the isotopic composition of the SKY FRE strain varies between that of the SKY34 and the wild type DTY165 strains (Fig. 5). We conclude that the greater the ability for the cell to reduce Cu, the stronger the enrichment in light Cu.

Finally, the $\Delta^{65}Cu_{cell}$ of DTY165 reached its minimal value (-0.85‰/10^8cells) with small oscillations with a maximum oscillation rate of 7.43 10^{-3}‰/10^8cells/min. The maximum oscillation rate for SKY34 is similar: 7.60 10^{-3}‰/10^8cells/min. In the strain without high-affinity importers (MPY17), the maximum oscillation rate is slower (3.09 10^{-3}‰/10^8cells/min).

Discussion

Copper fractionation by Cu importers during transport into the cell is modulated by the cell reductive ability. In this study, we used *S. cerevisiae* as a model system to explore the origin of copper fractionation in cells, notably because its Cu transport mechanisms are similar to those of human cells (Fig. 1)[3]. *S. cerevisiae* is a versatile genetic model allowing the impact of genetic mutations on cell functions to be tested. The present study demonstrates a preferential ^{63}Cu uptake by yeast, consistent with observations on bacteria and plants[29,35]. To trace the preference for one of the two Cu isotopes, we used the $\Delta^{65}Cu_{cell}$ notation (see Results for details). If $\Delta^{65}Cu_{cell}$ is negative, there is a preferential uptake of ^{63}Cu, *i.e.* an enrichment in the light Cu isotope. Under steady-state conditions, there is an enrichment in light Cu that after 240 min reaches

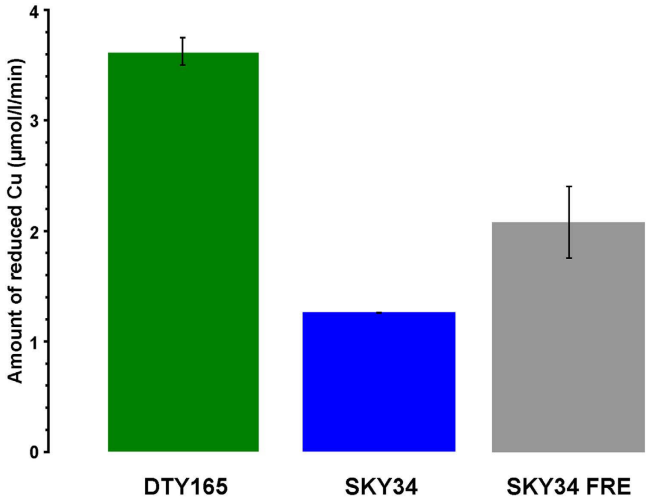


Figure 4. Copper reductase activity in DTY165, SKY34, and SKY FRE. Amount of reduced Cu for the wild type strain (DTY165), the Δctr1Δmac1 knockout strain (SKY34), and the SKY34 strain where *FRE1* is under the control of ADH promoter (SKY FRE). All experiments were duplicated. Error bars are the 2σ on the measurements. For SKY 34, error bar is lower than 0.05 µmol/L/min.

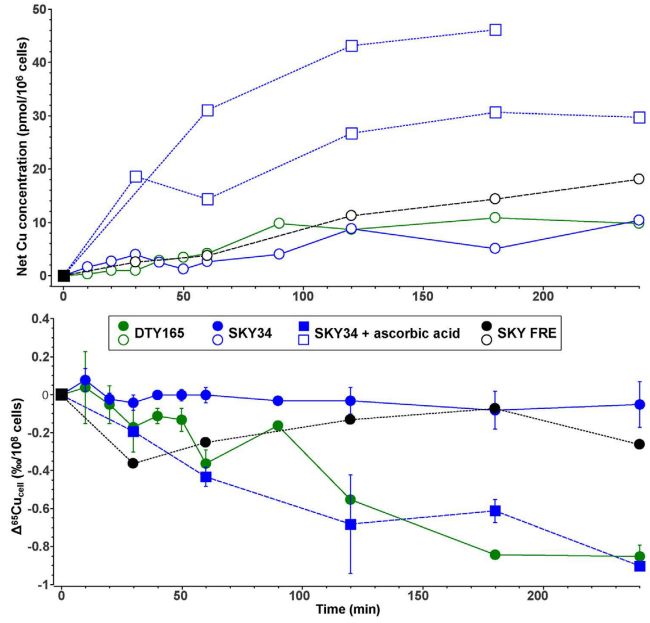


Figure 5. Net variations of the Cu concentration and isotopic composition in *S. cerevisiae* for the wild-type (DTY165, green), the Δctr1Δmac1 double-knockout strain (SKY34, blue), and the Δctr1Δmac1 strain where FRE1 is under the promoter of ADH (SKY FRE, black). Upper panel: variations of the Cu concentration (see Fig. 2 caption for details) during uptake experiments in absence (circles) or presence of ascorbic acid (squares). Lower panel: Variations of the Cu isotopic composition (see Fig. 2 caption for details) during uptake experiments in absence (circles) or presence of ascorbic acid (squares). The error bars are the standard deviation between independent experiments (see Table S1 for details).

$\Delta^{65}Cu_{cell} = -0.85 \pm 0.06‰/10^8$ cells. Three mechanisms can fractionate copper isotopes in cells: adsorption on cell surface, reduction of divalent to monovalent ions, and transport through the cell membrane (Fig. 1). Adsorption of Cu on organic or mineral surfaces is known to induce isotopic fractionation depending on both the type of surface and the environmental conditions[29,36–38]. The present results clearly show that adsorption on the surface of the cells is very limited (Fig. 3), which rules out adsorption as a mechanism generating Cu fractionation in *S. cerevisiae*.

In our experiments, the impact of cellular export, notably exocytosis (Fig. 1), can be safely neglected since in *S. cerevisiae* Cu homeostasis is mainly regulated at the level of the import[3]. Indeed, after ca. 120–180 min (depending on the strain) and up to 240 min, Cu concentrations stay relatively stable for all the studied *S. cerevisiae*

strains. Cu isotopic compositions do also stay relatively stable after ca. 120–180 min (Figs 2 and 5). Therefore, we assume that, after 180 min, inward and outward Cu fluxes across the *S. cerevisiae* cell membrane are very small compared to what occurred during the Cu uptake phase, *i.e.* before 120–180 min, depending on the strain. As a consequence, the Cu isotopic fractionation due to Cu uptake by *S. cerevisiae* is likely to be very small compared to what is happening during the uptake phase. Thus, we assume that the changes in Cu isotopic fractionation due to Cu uptake can be neglected once the plateau is reached. In addition, strains compared in this study have similar genetic backgrounds for the export. Thus, any potential effect of export on the intracellular Cu isotopic composition should have been similar for all strains. Similarly, after 180 min, the Cu isotopic fractionation due to Cu uptake by *S. cerevisiae* was likely to be very small compared to what was happening in the phase during which the intracellular concentration increased, *i.e.* before 120–180 min. This is indeed what we observed (Figs 2 and 5).

It is known from both experimental studies and *ab initio* calculations that changes in the oxidation state of Cu can lead to fractionation[39–42]. To estimate the role of the reductase on Cu isotopic fractionation in *S. cerevisiae* using biological approaches, we used a Cu reductase deficient mutant (SKY34). In this strain, Cu uptake was similar to the wild type but there was virtually no Cu isotopic fractionation ($\Delta^{65}Cu_{SKY34} = -0.02 \pm 0.07‰/10^8$cells). To distinguish the role of reductase from the role of importers, the copper-reductase deficient SKY34 strain was fed solely with monovalent copper using ascorbic acid to ensure full reduction. In this case, Cu isotope fractionation is similar to that of the wild type strain ($\Delta^{65}Cu_{SKY34,\ ascorbic\ acid} = -0.90 \pm 0.02‰/10^8$cells, Fig. 5). In the experiments with ascorbic acid, there is no Cu(I) derived from reductase activity. Thus, it is reasonable to assume that Cu fractionation in *S. cerevisiae* is due to the passage of Cu through transmembrane importers.

To explain the absence of fractionation for SKY34 cultivated under normal growth conditions, we hypothesize that the availability of transportable Cu(I) for the cell is limiting because the reductase activity is twice lower compared to the wild type. As a consequence, all Cu(I) produced by the reductase activity is transported inside the cell by the importers, which does not allow for fractionation of copper isotopes at that step. This hypothesis is corroborated by the fact that when copper is directly provided in excess as monovalent ions to this strain, *i.e.* in the ascorbic acid uptake experiments, isotopic fractionation does occur and reaches that of the wild type (Fig. 5). When the ability of SKY34 to reduce Cu is enhanced, *i.e.* in the SKY FRE strain (Fig. 4), the Cu(I) pool increases which permits the fractionation by importers. We indeed observe a decrease of the $\Delta^{65}Cu_{cell}$ for the SKY FRE strain which falls between the values of the wild type and SKY 34 (Fig. 5). Thus, the ability of cells to reduce Cu controls the quantity of available Cu(I) which in turn modulates the amplitude of the isotopic fractionation. This is the first experimental demonstration of a direct link between the activity of transporters and isotopic fractionation.

Copper isotopic compositions fluctuate with time. Copper transport in *S. cerevisiae* is tightly regulated. It has been demonstrated that high intracellular Cu concentrations lead to a rapid decrease of the *CTR3* gene expression[43] and to a rapid decrease of the membrane *CTR1* content, which in turn leads to the reduction of copper entry[24,25]. The extremely rapid and efficient degradation of the transporter proteins leads to a drastic depletion at the membrane, which is compensated by fine-tuning of the expression of the transporter genes. These regulations generate specific and very reproducible oscillations in transcription levels in the first ca. 90 min[43]. During our monitoring of *S. cerevisiae*, we observed oscillations of the isotopic composition of copper in strains expressing high-affinity transporters, *i.e.* the wild-type DTY165 and SKY34 strains (Fig. 5). A possible explanation for these oscillations may be that they occur in response to the oscillations in the transcriptional regulation of the high-affinity transporters and may thus result from the fine-tuning of Cu transport. Demonstration of a direct or indirect connection between copper uptake regulation and the oscillations of the isotopic phenotype of yeast would require additional work using a different experimental setting, and is beyond the scope of this study.

Affinity interactions with the reductases and transporters generate Cu fractionation. Cu(II) present in the growth medium, either free or more likely bound to various ligands[5], is reduced by the Fre1p and Fre2p proteins[14,15]. However, there is no current understanding of how Cu(I) is maintained in its reduced form prior to its uptake by the high-affinity copper importers *CTR1* and *CTR3*[44]. There could be a direct interaction between the reductases and the transporters or intermediate ligands that bind Cu(I). Extracellular Cu(I) is bound to the amino acids present on the N-terminal domain of the high-affinity Cu importers: methionine (Met), histidine (His), and cysteine (Cys)[45]. *CTR1* notably has methionine-rich sites (Mets motifs) that are thought to bind Cu(I) prior to its transport across the membrane[46]. *CTR3* lacks these Met-motifs on its extracellular side but has an abundance of cysteine residues[47] that could bind extracellular Cu(I). The precise transmembrane transport mechanism is yet not fully understood. It has been proposed that exchanges between several binding sites allow Cu(I) to move through the membrane to the amino acid residues located at the C terminus of the *Ctr* proteins where it is presented to cytosolic Cu chaperones[46–48]. The intracellular C domain of *CTR1 and CTR3* contains Cys/His motifs that can bind Cu(I)[49]. *Ab initio* calculations give a theoretical prediction of the isotopic fractionation occurring between metal ligands. Several Cu(II) ligands have already been studied[39,41]. Similarly, we can determine an isotopic fractionation between the amino acid complexes that bind extracellular Cu(I) and the cytosolic Cys/His motifs of the importers. We calculated the values of the isotopologue partition functions ratio lnβ for the various Cu(I)-amino acid complexes (Supplementary Table S3) to calculate the theoretical fractionation induced by the transfer of Cu(I) from Met (*CTR1*) and Cys (*CTR3*) to His or Cys ligands. Histidine has two coordination sites that we have named His(1) and His(2), with His(1) having the largest lnβ for Cu(I). At the temperature of our experiments (298 K), the calculations predict a ^{63}Cu enrichment due to the transfer of Cu(I) through the transporters for exchanges between Met and His(1) for *CTR1* ($\delta^{65}Cu = -0.78‰$), and Cys and His(1) for *CTR3* ($\delta^{65}Cu = -0.73‰$). While *ab initio* calculations represent a simplified approach to the complexity of the biological mechanisms and the match between the experimental results and *ab initio* calculations is not perfect, the amplitude of the fractionation predicted by *ab initio* calculation are, to the first order, in

agreement with the experimental results presented in this study. Thus, the cellular enrichment in ^{63}Cu in the wild type strain DTY165, in the SKY34 mutant with ascorbic acid, and in the SKY FRE mutant could be explained by the transport of the extracellular Cu(I) bound to the sulfur-rich amino acids methionine and cysteine to the cytosolic histidine-containing motifs of the high-affinity *CTR1* and *CTR3* transporters. Interestingly, experiments performed with MPY17 which lacks the high-affinity copper transporters show that Cu is fractionated to an extent only slightly lower than that of the wild type (Fig. 2). Although it is difficult to know which low-affinity transporters are responsible for Cu transport in strain MPY17, our observations and *ab initio* calculation results suggest that several steps of chelation of copper might also be involved in the transmembrane transfer of Cu by these low-affinity transporters.

Using Cu isotopic composition as a prognostic tool for cancer. In this study, we show that a decrease in the overall capacity of the cell to reduce Cu via an impaired transcription of the reductases leads to an increase of the SKY34 cells $\delta^{65}Cu$ of *ca*. 0.9‰ compared to that of the wild type without modification of the intracellular Cu concentration (Fig. 5). This situation is close to what is observed in hepatocellular carcinoma (HCC) patients, for which $\delta^{65}Cu$ is higher in the tumor relative to the peritumor, despite no significant differences in Cu concentration[9]. Such an enrichment in the tumor is mirrored by lower $\delta^{65}Cu$ in the serum of HCC patients compared to healthy donors. In human cells, Cu is reduced by *FRE* homologs, the STEAP proteins[50]. Intriguingly, in HCC patients, immunohistochemical evidence shows that the level of STEAP3 protein is lower in the tumor mass compared to the surrounding tissue[13]. Moreover, STEAP3 expression has been shown to be a good prognostic marker of the transition from cirrhosis to HCC[12,13]. We hypothesize that the mechanism leading to Cu isotope fractionation observed in HCC is similar to the mechanism inferred for *S. cerevisiae*: a decrease in the ability to reduce Cu via a lower expression of STEAP3 protein leads to higher cellular $\delta^{65}Cu$ values compared to the surrounding healthy tissues. It has also been shown that the increase of the $\delta^{65}Cu$ values in the tumor is correlated with a decrease of the $\delta^{65}Cu$ values in red blood cells[9]. Thus, monitoring the $\delta^{65}Cu$ in red blood cells might constitute a non-invasive prognostic test to quickly detect the transition from liver cirrhosis to carcinoma.

Conclusions

In the present study, we have demonstrated that the main mechanism responsible for the enrichment in light Cu isotope in the model organism *S. cerevisiae* is the import of Cu via high- (Ctr1p and Ctr3p) and low-affinity transporters. We have also shown that the ability of the cell to reduce Cu modulates the amplitude of the fractionation. Copper adsorption on the membrane does not play a significant role. Based on *ab initio* calculation results, we propose that Cu fractionation may be due to the binding of Cu(I) with the sulfur-rich amino acids of the metallic center of the transporter, cysteine and methionine and its subsequent transport to the cytosol. Because of the high conservation of Cu transport in eukaryotic cells, our observations can be extended to Cu homeostasis in human cells. During the transition from cirrhosis to hepatocellular carcinoma, the expression of copper reductases is decreased and an enrichment in heavy Cu isotopes in the tumors is observed. Our study suggests that these two observations may be functionally connected and thus $\delta^{65}Cu$ could be a good tool to trace changes in Cu fluxes in liver cancer patients.

References

1. Lutsenko, S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr. Op. Chem. Biol.* **14,** 211–217, doi: 10.1016/j.cbpa.2010.01.003 (2010).
2. Linder, M. C. Copper and genomic stability in mammals. *Mutat. Res.* **475,** 141–152, doi: 10.1016/S0027-5107(01)00076-8 (2001).
3. Nevitt, T., Öhrvik, H. & Thiele, D. J. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *BBA-Mol. Cell Res.* **1823,** 1580–1593, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.011 (2012).
4. Denoyer, D., Masaldan, S., La Fontaine, S. & Cater, M. A. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics* **7,** 1459–1476, doi: 10.1039/c5mt00149h (2015).
5. Majumder, S. *et al.* The role of copper in drug-resistant murine and human tumors. *Biometals* **22,** 377–384, doi: 10.1007/s10534-008-9174-3 (2009).
6. Fosset, C., McGaw, B. A., Reid, M. D. & McArdle, H. J. A non-radioactive method for measuring Cu uptake in HepG2 cells. *J. Inorg. Biochem.* **99,** 1018–1022, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.01.005 (2005).
7. Albarède, F. *et al.* Precise and accurate isotopic measurements using multiple-collector ICPMS. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68,** 2725–2744, doi: 10.1016/j.gca.2003.11.024 (2004).
8. Telouk, P. *et al.* Copper isotope effect in serum of cancer patients. A pilot study. *Metallomics* **7,** 299–308, doi: 10.1039/c4mt00269e (2015).
9. Balter, V. *et al.* Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **112,** 982–985, doi: 10.1073/pnas.1415151112 (2015).
10. Albarede, F., Albalat, E. & Telouk, P. Instrumental isotope fractionation in multiple-collector icp-ms. *J. Anal. At. Spectrom.* **30,** 1736–1742, doi: 10.1039/c5ja00188a (2015).
11. Holzer, A. K. *et al.* Expression of the human copper influx transporter 1 in normal and malignant human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **54,** 1041–1049, doi: 10.1369/jhc.6A6970.2006 (2006).
12. Caillot, F. *et al.* Down-regulated expression of the TSAP6 protein in liver is associated with a transition from cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Histopathology* **54,** 319–327, doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03224.x (2009).
13. Coulouarn, C. *et al.* Global gene repression in hepatocellular carcinoma and fetal liver, and suppression of dudulin-2 mRNA as a possible marker for the cirrhosis-to-tumor transition. *J. Hepatol.* **42,** 860–869, doi: 10.1016/j.jhep.2005.01.027 (2005).
14. Georgatsou, E., Mavrogiannis, L. A., Fragiadakis, G. S. & Alexandraki, D. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* **272,** 13786–13792, doi: 10.1074/jbc.272.21.13786 (1997).
15. Hassett, R. & Kosman, D. Evidence for Cu(II) reduction as a component of Cu uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270,** 128–134, doi: 10.1074/jbc.270.1.128 (1995).
16. Dancis, A., Haile, D., Yuan, D. S. & Klausnert, R. D. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). J. *Biol. Chem.* **269,** 25660–25667 (1994).
17. Knight, S. A. B., Labbé, S., Kwon, L. F., Kosman, D. J. & Thiele, D. J. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Gene. Dev.* **10,** 1917–1929, doi: 10.1101/gad.10.15.1917 (1996).

18. Hasset, R., Dix, D. R., Eide, D. J. & Kosman, D. J. The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **351,** 477–484, doi: 10.1042/0264-6021:3510477 (2000).
19. Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O. & Winge, D. R. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J. Biol. Chem.* **275,** 32310–32316, doi: 10.1074/jbc.M005946200 (2000).
20. Heredia, J., Crooks, M. & Zhu, Z. Phosphorylation and Cu^{+} Coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *J. Biol. Chem.* **276,** 8793–8797, doi: 10.1074/jbc.M008179200 (2001).
21. Labbé, S., Zhu, Z. & Thiele, D. J. Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.* **272,** 15951–15958, doi: 10.1074/jbc.272.25.15951 (1997).
22. Jungmann, J. *et al.* MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* **12,** 5051–5056 (1993).
23. Wu, X., Sinani, D., Kim, H. & Lee, J. Copper transport activity of yeast Ctr1 is down-regulated via its C terminus in response to excess copper. *J. Biol. Chem.* **284,** 4112–4122, doi: 10.1074/jbc.M807909200 (2009).
24. Liu, J., Sitaram, A. & Burd, C. G. Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic* **8,** 1375–1384, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00616.x (2007).
25. Ooi, C. E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J. S. & Klausner, R. D. Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctrlp in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* **15,** 3515–3523 (1996).
26. Janke, C. *et al.* A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21,** 947–962, doi: 10.1002/yea.1142 (2004).
27. Zhang, T. *et al.* An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **28,** 795–798, doi: 10.1002/yea.1905 (2011).
28. Kushnirov, V. V. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16,** 857–860, doi: 10.1002/1097-0061(20000630)16:9< 857::AID-YEA561>3.0.CO;2-B (2000).
29. Navarrete, J. U., Borrok, D. M., Viveros, M. & Ellzey, J. T. Copper isotope fractionation during surface adsorption and intracellular incorporation by bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* **75,** 784–799, doi: 10.1016/j.gca.2010.11.011 (2011).
30. Georgatsou, E. & Alexandraki, D. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14,** 3065–3073 (1994).
31. Campos, C., Guzmán, R., López-Fernández, E. & Casado, Á. Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC-BCS assay. *Anal. Biochem.* **392,** 37–44, doi: 10.1016/j.ab.2009.05.024 (2009).
32. Moynier, F. *et al.* Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chem. Geol.* **267,** 125–130 (2009).
33. Buldini, P. L., Cavalli, S. & Sharma, J. L. Determination of transition metals in wine by IC, DPASV-DPCSV, and ZGFAAS Coupled with UV Photolysis. *J. Agri. Food Chem.* **47,** 1993–1998 (1999).
34. Maréchal, C. N., Telouk, P. & Albarède, F. Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem. Geol.* **156,** 251–273 (1999).
35. Weinstein, C. *et al.* Isotopic fractionation of Cu in plants. *Chem. Geol.* **286,** 266–271 (2011).
36. Li, D., Liu, S.-A. & Li, S. Copper isotope fractionation during adsorption onto kaolinite: Experimental approach and applications. *Chem. Geol.* **396,** 74–82, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2014.12.020 (2015).
37. Balistrieri, L. S., Borrok, D. M., Wanty, R. B. & Ridley, W. I. Fractionation of Cu and Zn isotopes during adsorption onto amorphous Fe(III) oxyhydroxide: Experimental mixing of acid rock drainage and ambient river water. *Geochim. Cosmochim. Acta* **72,** 311–328, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2007.11.013 (2008).
38. Pokrovsky, O. S., Viers, J., Emnova, E. E., Kompantseva, E. I. & Freydier, R. Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hydr)oxides: Possible structural control. *Geochim. Cosmochim. Acta* **72,** 1742–1757, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2008.01.018 (2008).
39. Fujii, T., Moynier, F., Blichert-Toft, J. & Albarède, F. Density functional theory estimation of isotope fractionation of Fe, Ni, Cu, and Zn among species relevant to geochemical and biological environments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **140,** 553–576, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2014.05.051 (2014).
40. Balter, V. *et al.* Contrasting Cu, Fe, and Zn isotopic patterns in organs and body fluids of mice and sheep, with emphasis on cellular fractionation. *Metallomics* **5,** 1470–1482, doi: 10.1039/c3mt00151b (2013).
41. Fujii, T., Moynier, F., Abe, M., Nemoto, K. & Albarède, F. Copper isotope fractionation between aqueous compounds relevant to low temperature geochemistry and biology. *Geochim. Cosmochim. Acta* **110,** 29–44, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2013.02.007 (2013).
42. Jouvin, D. *et al.* Stable Isotopes of Cu and Zn in Higher Plants: Evidence for Cu reduction at the root surface and two conceptual models for isotopic fractionation processes. *Environ. Sci. Technol.* **46,** 2652–2660 (2012).
43. Peña, M. M., Koch, K. A. & Thiele, D. J. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **18,** 2514–2523 (1998).
44. Kim, B.-E., Nevitt, T. & Thiele, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* **4,** 176–185, doi: 10.1038/nchembio.72 (2008).
45. Rubino, J. T., Chenkin, M. P., Keller, M., Riggs-Gelasco, P. & Franz, K. J. A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper(I)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments. *Metallomics* **3,** 61–73, doi: 10.1039/c0mt00044b (2011).
46. Rubino, J. T., Riggs-Gelasco, P. & Franz, K. J. Methionine motifs of copper transport proteins provide general and flexible thioether-only binding sites for Cu(I) and Ag(I). *J. Biol. Inorg. Chem.* **15,** 1033–1049, doi: 10.1007/s00775-010-0663-9 (2010).
47. Peña, M. M., Puig, S. & Thiele, D. J. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J. Biol. Chem.* **275,** 33244–33251, doi: 10.1074/jbc.M005392200 (2000).
48. Öhrvik, H. & Thiele, D. J. How copper traverses cellular membranes through the mammalian copper transporter 1, Ctr1. *Ann. NY Acad. Sci.* **1314,** 32–41, doi: 10.1111/nyas.12371 (2014).
49. Puig, S. & Thiele, D. J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Op. Chem. Biol.* **6,** 171–180, doi: http://dx.doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00298-3 (2002).
50. Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A. & Fleming, M. D. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* **108,** 1388–1394, doi: 10.1182/blood-2006-02-003681 (2006).
51. Li, Z.-S., Szczypka, M., Lu, Y.-P., Thiele, D. J. & Rea, P. A. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione. J. *Biol. Chem.* **271,** 6509–6517, doi: 10.1074/jbc.271.11.6509 (1996).
52. Zhou, P. & Thiele, D. J. Copper and gene regulation in yeast. *Biofactors* **4,** 105–115 (1993).

Acknowledgements

J.L.C. is thankful to the ED PHAST for his PhD salary support. J.L.C., S.P., and P.O. are thankful to the theme "Biosignatures" of the Laboratoire de Géologie de Lyon for financial support for the experiments and to the Instrument National ICP-MS (INSU-CNRS and ENS de Lyon) for support to the instruments. M. Simon, P. Télouk, E. Albalat, and F. Arnaud-Godet are thanked for their help in the clean lab and with the ICP-MS. We are thankful to two anonymous reviewers for the thoughtful and constructive review that improved the manuscript.

Author Contributions

S.P. and P.O. conceived the research. J.L.C., S.P., P.O., and V.P.B. designed the experiments. A.S. designed the primers and supervised the yeast genetics. J.L.C. and S.P. designed the geochemical settings. J.L.C., S.P. and P.O. analyzed the data. J.L.C., S.P., P.O., V.P.B., and F.A. interpreted the data. T.F. calculated the partition functions ratio for *ab initio* calculations. J.L.C., S.P., P.O., and V.P.B. wrote the paper. S.P., J.L.C., and P.O. revised and all authors approved the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing Interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Cadiou, J.-L. *et al.* Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells. *Sci. Rep.* **7**, 44533; doi: 10.1038/srep44533 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017

Supplementary Information

Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells

Jean-Loup Cadiou[1], Sylvain Pichat[1,*], Victor P. Bondanese[1], Alexandre Soulard[2], Toshiyuki Fujii[3], Francis Albarède[1], Philippe Oger[1,4,*]

[1] Univ Lyon, ENS de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5276, Lyon, France
[2] Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA-Lyon, CNRS, UMR5240, Villeurbanne, France
[3] Division of Sustainable Energy and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan
[4] Univ Lyon, INSA-Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5240, Villeurbanne, France

* Corresponding authors
e-mail: sylvain.pichat@ens-lyon1.fr and philippe.oger@insa-lyon.fr

The supplementary information includes:

Table S1. Calculated average relative Cu concentrations and Cu isotopic compositions

Table S2. Isotopic composition measurement of the same *S. cerevisiae* sample aliquot during four runs over the time course of 3 months

Fig. S1. Evolution of Cu concentrations at a given time over Cu initial concentration and isotopic composition in the growth medium as a function of time.

Table S3. Logarithm of the reduced partition function, lnβ (‰), for the pair ^{65}Cu–^{63}Cu of Cu(I)–amino acid complexes with a description of the computational methods.

Table S1. Calculated net Cu concentrations and Cu isotopic compositions (see text as well as [1] and [2] below for details).
NA: not applicable

Strain	Time step (min)	Number of replicate experiments	Average net Cu concentration (ppm/10^6 cells) [1]	S.D. between replicate experiments	Average $\Delta^{65}Cu_{cell}(t)$ (‰/10^8 cells) [2]	S.D. between replicate experiments	For each replicate experiment	
							Number of replicate measurements [3]	S.D. between replicate measurements [4]
DTY165	0	3	0		0		1 / 4 / 1	NA / 0.01/ NA
	10	2	0.27	*0.23*	0.04	*0.19*	4 / 3	0.06 / 0.03
	20	2	0.93	*0.98*	-0.05	*0.10*	2 / 3	0.04 / 0.02
	30	2	0.95	*0.27*	-0.17	*0.13*	4 / 3	0.04 / 0.00
	40	2	2.77	*1.03*	-0.11	*0.04*	4 / 3	0.06 / 0.02
	50	2	3.37	*1.62*	-0.13	*0.06*	4 / 2	0.04 / 0.00
	60	2	4.09	*2.62*	-0.36	*0.07*	4 / 3	0.01 / 0.05
	90	1	9.80	*NA*	-0.16	*NA*	1	NA
	120	1	8.66	*NA*	-0.55	*NA*	1	NA
	180	1	10.81	*NA*	-0.84	*NA*	1	NA
	240	3	8.97	*2.05*	-0.85	*0.06*	1 / 2 / 3	NA / 0.04 / 0.01
MPY17	0	3	0		0		1 / 8	NA / 0.02
	10	2	3.27	*0.71*	-0.18	*0.09*	1 / 5	NA / 0.03
	20	2	6.54	*0.32*	-0.25	*0.10*	2 / 5	0.11 / 0.04
	30	2	8.70	*0.59*	-0.32	*0.02*	2 / 4	0.04 / 0.02
	40	2	10.72	*2.05*	-0.29	*0.01*	4 / 5	0.01 / 0.03
	50	2	8.49	*0.65*	-0.26	*0.02*	4 / 5	0.08 / 0.05
	60	2	12.21	*4.55*	-0.29	*0.02*	4 / 4	0.07 / 0.02
	90	1	17.35	*NA*	-0.45	*NA*	2	0.00
	120	1	15.23	*NA*	-0.59	*NA*	2	0.00
	180	1	18.52	*NA*	-0.84	*NA*	2	0.02
	240	2	15.22	*4.13*	-0.67	*0.30*	2 / 6	0.02 / 0.02

Strain	Time step (min)	Number of replicate experiments	Average net Cu concentration (ppm/10^6 cells) [1]	S.D. between replicate experiments	Average $\Delta^{65}Cu_{cell}(t)$ (‰/10^8 cells) [2]	S.D. between replicate experiments	For each replicate experiment	
							Number of replicate measurements [3]	S.D. between replicate measurements [4]
SKY34	0	5	0		0		1 / 4 / 2 / 2 / 1	NA / 0.05 / 0.01 / 0.12 / NA
	10	2	1.61	*1.29*	0.08	*0.06*	2 / 3	0.02 / 0.05
	20	2	2.68	*2.09*	-0.02	*0.03*	2 / 4 / 3	0.06 / 0.08
	30	3	4.98	*2.60*	-0.04	*0.04*	1 / 3	NA / 0.06 / 0.07
	40	2	2.49	*0.32*	0.00	*0.01*	4 / 3	0.1 / 0.03
	50	2	1.16	*1.36*	0.00	*0.03*	1 / 3	NA / 0.02
	60	3	5.52	*5.08*	0.00	*0.04*	1 / 4 / 4 / 3	NA / 0.01 / 0.05 / 0.01
	90	1	3.96	*NA*	-0.03	*NA*	1	NA
	120	2	8.89	*0.14*	-0.03	*0.07*	2 / 3	0.03 / 0.06
	180	2	7.50	*3.45*	-0.08	*0.10*	2 / 3	0.00 / 0.00
	240	5	9.69	*3.02*	-0.02	*0.07*	2 / 2 / 2 / 2 / 3	0.01 / 0.03 / 0.03 / 0.00
SKY34 + ascorbic acid	0	3	0		0		2 / 4 / 3	0.01 / 0.00 / 0.06
	30	1	19.72	*NA*	-0.19	*NA*	3	0.03
	60	2	22.70	*11.83*	-0.43	*0.05*	2 / 3	0.02 / 0.03
	120	3	27.67	*15.00*	-0.68	*0.26*	4 / 2 / 3	0.01 / 0.03 / 0.00
	180	2	36.95	*8.91*	-0.61	*0.06*	4 / 2	0.01 / 0.06
	240	2	22.68	*9.98*	-0.90	*0.02*	4 / 3	0.02 / 0.03
SKY FRE	0	1	0		0		3	0.01
	30	1	2.50	*NA*	-0.36	*NA*	3	0.02
	60	1	3.75	*NA*	-0.25	*NA*	3	0.03
	120	1	11.25	*NA*	-0.13	*NA*	3	0.03
	180	1	14.36	*NA*	-0.07	*NA*	3	0.03
	240	1	18.06	*NA*	-0.26	*NA*	3	0.02

[1] The net Cu concentration reported here is: Cu(t) - Cu(t=0), normalized to 10^6 cells (see Materials and methods for details).

(2) $\Delta^{65}Cu_{cell}$ (t) = $\Delta^{65}Cu$ (t) - $\Delta^{65}Cu$ (0) with $\Delta^{65}Cu$ (t) = $\delta^{65}Cu_{cell}$ (t) - $\delta^{65}Cu_{medium}$.
Thus, $\Delta^{65}Cu_{cell}$ (t) = ($\delta^{65}Cu_{cell}$ (t) - $\delta^{65}Cu_{medium}$) - ($\delta^{65}Cu_{cell}$ (0) - $\delta^{65}Cu_{medium}$) = $\delta^{65}Cu_{cell}$ (t) - $\delta^{65}Cu_{cell}$ (0).
The $\Delta^{65}Cu_{cell}$ (t) value was then normalized to 10^8 cells (see Materials and methods for details).

For example, for DTY165, at t = 240 min, in the third independent experiment (3rd replicate experiment) the $\delta^{65}Cu_{DTY165}$ (240) was measured 3 times, *i.e.* 3 replicate measurements, and the average value was $\delta^{65}Cu_{DTY165}$(240) = -1.84 ± 0.01‰ (1σ). The $\delta^{65}Cu_{DTY165}$(0) was measured at -1.22‰, thus $\Delta^{65}Cu_{DTY165}$(240) = -0.62‰. The number of cells in the 240 min sample was 0.68×10^8 cells. Thus, the normalized value of the $\Delta^{65}Cu_{DTY165}$(240) for the third experiment was calculated to be -0.91‰/10^8 cells.

(3) number of replicate measurements of the Cu isotopic composition for each culture replicate experiment, e.g. “4 / 3” means that 4 replicate measurements were made on the first replicate experiment and 3 on the second replicate experiment.

(4) standard deviation (S.D.) between the replicate measurements made for each replicate experiment.

Table S2. Isotopic composition measurement of the same *S. cerevisiae* sample aliquot during four runs over the time course of 3 months.

Sample	Date	δ^{65}Cu (‰)
MPY 17, t=240min	31/04/2015	-1.46
		-1.49
		-1.46
	04/07/2015	-1.46
	14/07/2015	-1.51
	31/07/2015	-1.47
		-1.47
		-1.46
	Average	**-1.47 ± 0.04** (2σ)

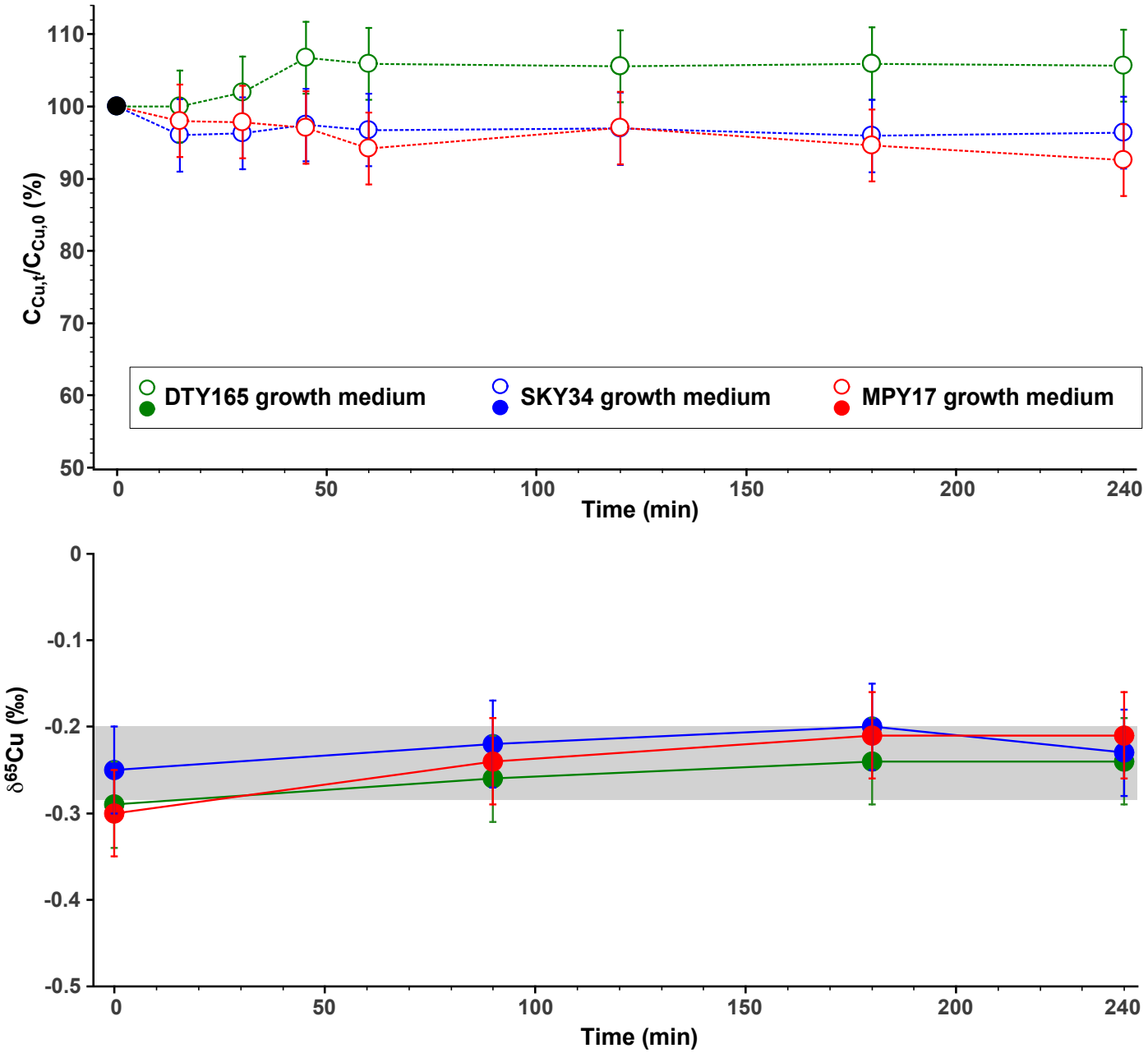


Figure S1: Evolution of Cu concentrations at a given time over Cu initial concentration (upper panel) and isotopic composition (lower panel) in the growth medium as a function of time. The grey area represents the analytical uncertainty of the measures (2σ = 0.1‰).

Table S3. Logarithm of the reduced partition function, lnβ (‰), for the pair ^{65}Cu–^{63}Cu of Cu(I)–amino acid complexes. Computational methods are given below.

		Temperature (K)				
		273	298	310	323	373
$Cu^{I}(Met)(H_2O)^{+}$		3.101	2.628	2.438	2.254	1.710
$Cu^{I}(Cys)(H_2O)^{+}$		3.157	2.677	2.483	2.296	1.742
$Cu^{I}(His)(H_2O)^{+}$	His (1)	4.013	3.408	3.165	2.930	2.230
$Cu^{I}(His)(H_2O)^{+}$	His (2)	2.474	2.090	1.937	1.789	1.353

Computational methods

Orbital geometries and vibrational frequencies of aqueous Cu(I) species were computed using the density functional theory (DFT) as implemented by the Gaussian09 code[1-2]. The DFT method employed here is a hybrid density functional consisting of Becke's three-parameter non-local hybrid exchange potential (B3)[3] with Lee *et al.* (LYP)[4] non-local functionals. Using the 6-311+G(d,p) basis set or higher is recommended for calculating the Cu complexes by de Bruin *et al.*[5]. The 6-311+G(d,p) basis set, which is an all-electron basis set, was therefore chosen for H, C, N, O, S, and Cu. Molecules were modeled without any forced symmetry. An "ultrafine" numerical integration grid was used and the SCF (self-consistent field) convergence criterion was set to 10^{-8}.

The isotope enrichment factor due to intramolecular vibrations can then be evaluated from the reduced partition function ratio[6] $(s/s')f$, also noted β,

$$ln\frac{s}{s'}f = \sum\left[ln\,b(u_i') - ln\,b(u_i)\right] \quad (1)$$

where

$$ln\,b(u_i) = -ln\,u_i + \frac{u_i}{2} + ln\left(1 - e^{-u_i}\right) \quad (2)$$

and

$$u_i = \frac{h\nu_i}{kT} \quad (3)$$

in which ν stands for vibrational frequency, s for the symmetry number of the Cu compound, h the Plank constant, k the Boltzmann constant, and T the absolute temperature. The subscript i denotes the ith mode of molecular vibration, and primed variables refer to the light isotopologue. The isotope enrichment factor due to molecular vibrations can be evaluated from the frequencies (ν) summed over all the different modes.

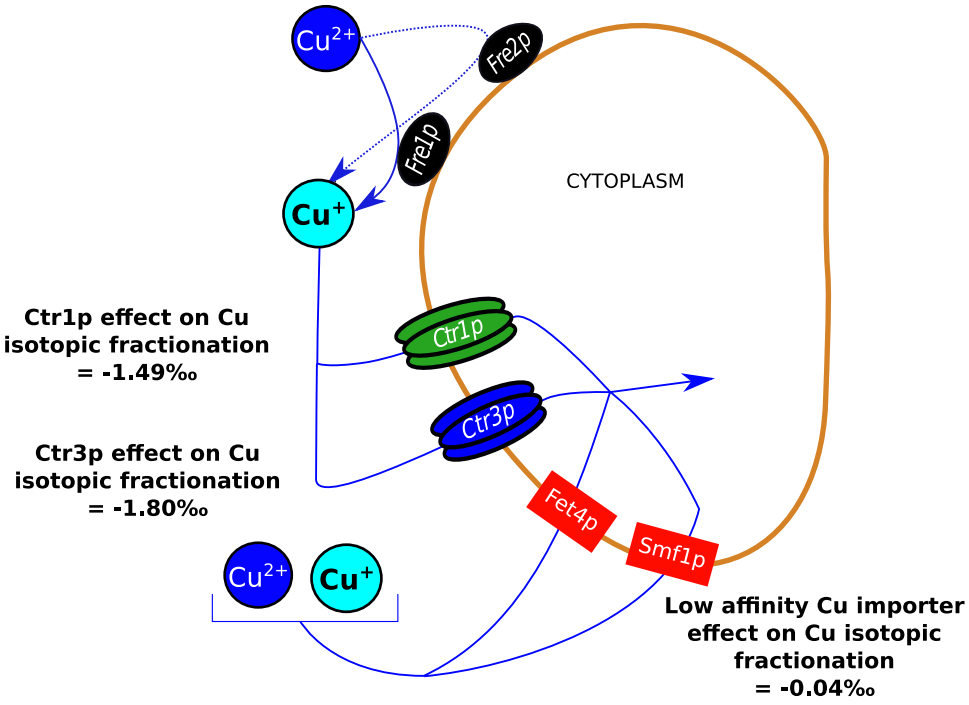
References

1. Dennington, R., Keith, T. & Millam, J. GaussView, *Version 5.0.9*. Semichem Inc., Shawnee Mission KS (2009).
2. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian 09, *Revision E.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT (2009).
3. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648-5652, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.464913 (1993).
4. Lee, C., Yang, W. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785-789 (1988).
5. de Bruin, T. J. M., Marcelis, A. T. M., Zuilhof, H. & Sudholter, E. J. R. Geometry and electronic structure of bis-(glycinato)-Cu $^{II}\cdot 2H_2O$ complexes as studied by density functional B3LYP computations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, 4157-4163, doi:10.1039/a903018b (1999).
6. Bigeleisen, J. & Mayer, M. G. Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *J. Chem. Phys.* **15**, 261-267, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.1746492 (1947).

CHAPITRE 3

Une diminution de l'import du cuivre par les importateurs Ctr1p et Ctr3p est à l'origine d'une composition isotopique proche de celle des cellules tumorales

Lower copper import through Ctr1p and Ctr3p lead to a "tumor" like copper isotope composition



Résumé graphique – Graphical abstract

3.1 Introduction (français)

Le but de cette thèse était de comprendre l'origine de l'enrichissement en isotopes lourds du Cu observé dans les cellules tumorales hépatiques par rapport aux cellules péritumorales [Balter et al., 2015]. Notre première étude a permis de développer un protocole expérimental pour étudier l'évolution de la composition isotopique du Cu (notée δ^{65}Cu) de différentes souches de *S. cerevisiae*. Le δ^{65}Cu reste relativement stable après 2 heures d'expériences. Cette valeur à l'équilibre (notée $\delta^{65}Cu_{plateau}$) dépend à la fois du génotype et de l'environnement de la cellule (réduit ou non). Ces deux propriétés sont celles d'un phénotype. Afin de faciliter la compréhension de nos résultats de géochimie à un plus large panel de chercheurs, nous proposons dans cette nouvelle étude de nommer la valeur du $\delta^{65}Cu_{plateau}$ comme étant le phénotype isotopique du Cu. Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord vérifié pour les différentes souches de levures testées que le δ^{65}Cu reste stable après deux heures d'expérience. Ceci nous a permis de confirmer pour toutes les souches testées le bien fondé de la notion de phénotype isotopique. Nous avons ensuite cherché à quantifier l'effet de chaque mutation des réductases ou des importateurs du Cu sur ce phénotype.

Pour répondre aux différentes questions de cette nouvelle étude il convenait de choisir des souches de levures adéquates. Il est à noter que les souches utilisées pour notre première étude n'étaient pas isogéniques. Les souches SKY34 et MPY17 présentent respectivement une mutation dans le facteur de transcription régulant l'expression des réductases et des importateurs du Cu (MAC1) et une surexpression d'une protéine séquestrant le Cu (CUP1). Ces deux mutations ont une influence sur le transport intracellulaire du Cu et probablement sur le phénotype isotopique du Cu. Afin de pallier ce problème nous avons choisi dans cette nouvelle étude de créer des souches isogéniques de levure à partir de la souche sauvage (DTY165) étudiée dans l'étude précédente. Nous avons étudié le phénotype isotopique de ces nouvelles souches grâce au protocole développé lors de notre précédente étude [Cadiou et al., 2017].

Notre première étude nous a permis de montrer que c'est l'import du Cu qui est à l'origine de l'enrichissement en isotopes légers du Cu observé. Le Cu entre dans les cellules de *S. cerevisiae via* des importateurs à haute affinité du Cu (Ctr1p et Ctr3p) et par des importateurs à basse affinité du Cu (par exemple Fet4p). Le but principal de cette étude sera de déterminer l'effet de chacun de ces transporteurs sur le fractionnement isotopique du Cu. Pour cela, nous avons muté les gènes codant pour ces importateurs. Par ailleurs, nous avons montré lors de notre première étude que le fractionnement isotopique du Cu est modulé par la quantité de Cu(I) elle-même lié à l'activité des réductases du Cu (Fre1p et Fre2p). Pour vérifier cette relation, nous avons utilisé différentes souches de levures réduisant plus ou moins le Cu.

Afin de vérifier la relation qui existe entre la composition isotopique cellulaire du Cu

et la capacité de la cellule à réduire le Cu [Cadiou et al., 2017], nous avons muté les gènes codant pour ces réductases dans trois nouvelles souches de levure. Deux sont respectivement mutées dans le gène FRE1 (la souche fre1Δ représentée par des carrés roses) et dans le gène FRE2 (la souche fre2Δ représentée par des triangles roses) et une est mutée dans ces deux gènes (la souche fre1-2Δ représentée par des cercles magenta).

La capacité de réduire le Cu des différentes souches mutées dans les réductases du Cu a été comparée à deux souches de notre première étude (la souche sauvage DTY165 en vert et la souche SKY34 en bleu). Il a été observé que la capacité de réduire le Cu est supérieure à la souche sauvage pour fre2Δ, est intermédiaire entre ces deux souches pour fre1Δ et est équivalente à la souche SKY34 pour fre1-2Δ. A l'aune des résultats de la première étude, le $\delta^{65}Cu_{plateau}$ de la souche fre2Δ devrait être proche de celui de la souche sauvage, le $\delta^{65}Cu_{plateau}$ de la souche fre1-2Δ devrait être proche de SKY 34 et le δ^{65}Cu de la souche fre1Δ devrait être intermédiaire entre ces deux valeurs. Nous avons confirmé cela pour les souches fre1Δ et fre2Δ. Ceci confirme le fait que la quantité de Cu(I) disponible module le fractionnement isotopique du Cu. **La confirmation de ce lien permet de relier l'observation de l'augmentation du δ^{65}Cu des cellules hépatiques tumorales [Balter et al., 2015] à une diminution de la quantité de réductases membranaires dans ces mêmes cellules [Caillot et al., 2009; Coulouarn et al., 2005]**.

Afin d'étudier l'effet des différents importateurs du Cu sur le fractionnement isotopique nous avons muté certains gènes codant pour ces importateurs. Les importateurs à basse affinité du Cu sont des importateurs du Zn et du Fe et sont vitaux pour la cellule. Il est létal de les muter. Nous avons alors créé trois souches de levures mutées dans les importateurs à haute affinité du Cu : deux étaient respectivement mutées dans le gène CTR1 (ctr1Δ, représentée par des carrés orange) et dans le gène CTR3 (ctr3Δ, représentée par des triangles orange) et une était mutée dans ces deux gènes. La dernière de ces souches n'était pas viable et n'as pas été étudiée. Enfin, nous avons muté le gène codant pour la protéine important le Cu dans la vacuole (ccc2Δ, représentée par des cercles noirs). Cette protéine est indirectement responsable de l'export du Cu. L'absence de cette protéine entraîne une moindre excrétion et ainsi une accumulation intracellulaire de Cu et par conséquent une répression du facteur de transcription MAC1. Ainsi, cette souche a la particularité de présenter un plus faible nombre d'importateurs à haute affinité du Cu dans la membrane que la souche sauvage [Gudin, 2008]. C'est l'équivalent d'une souche où l'expression des gènes codant pour les importateurs à haute affinité du Cu est partiellement réprimée.

D'après le modèle de la première étude, la mutation d'un des importateurs à haute affinité du Cu où la moindre expression de ces importateurs devrait entraîner une augmentation du δ^{65}Cu. Ceci a été vérifié pour les souches dont les transporteurs du Cu étaient mutées (ctr1Δ et ctr3Δ) et pour la souche ccc2Δ. Par ailleurs, dans la souche ctr3Δ nous avons observé un $\delta^{65}Cu_{plateau}$ supérieur au $\delta^{65}Cu_{plateau}$ de la souche ctr1Δ. Ceci nous a

permis d'affirmer que **l'importateur du Cu Ctr3p favorise plus les isotopes légers du Cu que Ctr1p**.

Pour finir nous avons cherché à calculer l'effet de chacun des importateurs du Cu sur le fractionnement isotopique du Cu. Pour cela, nous avons résolu numériquement l'équation de conservation de la masse isotopique (*"isotopic mass balance equation"*) pour les souches de levure isogénique et simplement mutées. Cette équation lie le δ^{65}Cu cellulaire au flux relatif de Cu entrant et sortant par les différentes protéines sur un intervalle de temps donné ($\varphi_i^{\Delta t}$) multiplié par l'effet de chaque protéine sur le δ^{65}Cu ($\delta^{65}Cu_{protein}$). L'export du Cu est négligeable dans nos expériences, l'équation de conservation de la masse isotopique peut s'écrire pour les soixantes premières minutes d'*uptake* (0-60) en considérant uniquement les importateurs à haute affinité du Cu (Ctr1p et Ctr3p) et les importateurs à basse affinité du Cu (LAIp) (équation 3.1) :

$$\delta^{65}Cu_{cell} = \varphi_{Ctr1p}^{0-60} \times \delta^{65}Cu_{Ctr1p} + \varphi_{Ctr3p}^{0-60} \times \delta^{65}Cu_{Ctr3p} + \varphi_{LAIp}^{0-60} \times \delta^{65}Cu_{LAIp} \quad (3.1)$$

Nous avons résolu par itération cette équation en comparant les résultats numériques aux $\delta^{65}Cu_{plateau}$ mesurées *in vivo*. **Ceci nous a permis d'estimer que le fractionnement isotopique du Cu lié à Ctr1p est égal à -1.49‰, lié à Ctr3p est égal à -1.80‰ et lié aux importateurs à basse affinité est égal à -0.04‰**. Ces coefficients ont permis le calcul du flux relatif de Cu aux travers des différents importateurs et montré que le flux de Cu au travers des importateurs à haute affinité (φ_{HAIp}) du Cu est linéairement lié au $\delta^{65}Cu_{plateau}$ ($\delta^{65}Cu_{plateau}$= -1.908 φ_{LAIp}^{0-60} + 0.122). Un modèle numérique de boîtes a été utilisé pour vérifier la pertinence de ces valeurs calculées de flux de Cu au travers des différents importateurs et de fractionnement isotopique du Cu lié à chaque protéine. L'évolution du δ^{65}Cu ainsi modélisée est proche de l'évolution *in vivo*. Ce modèle semble ainsi pertinent.

En résumé, nous avons montré dans cette étude que le δ^{65}Cu mesuré dans les cellules est fonction linéaire du flux de Cu au travers des transporteurs à haute affinité du Cu. Ce flux est modulé par l'activité des réductases du Cu qui *a fortiori* module le fractionnement isotopique du Cu.

3.2 *Article in preparation*: Lower copper import through Ctr1p and Ctr3p leads to tumor like copper isotopic composition

Authors: Jean-Loup Cadiou, Sylvain Pichat, Victor P. Bondanese, Natalia Guschinskaya, Théo Tacail, Jean-Alexis Hernandez, Alexandre Soulard, Francis Albarède, Philippe Oger

Potential journal: Metallomics

Abstract

One of the big challenges in cancer research is to develop prognosis biomarkers that can predict its evolution. A good candidate is natural copper (Cu) isotopes composition, expressed as $\delta^{65}Cu$, where $\delta^{65}Cu = \left[\left(^{65}Cu/^{63}Cu\right)_{sample} / \left(^{65}Cu/^{63}Cu\right)_{reference\ material} - 1\right] \times 1000$. In blood serum, the $\delta^{65}Cu$ decrease with cancer development. This decrease is probably due to an increase of the $\delta^{65}Cu$ (+0.5‰) in tumoral cells compared to peritumoral cells. In order to use the blood $\delta^{65}Cu$ value as a prognosis biomarker, the origin of Cu fractionation had to be identified and quantified. In 2016, we used *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) as a tumoral cell model and found that a potential origin of the specific tumoral cell Cu isotope composition is a lower transport through Cu importer. This lower transport can be due to a lower reductase activity. To identify the specific impact of each high-affinity Cu importer (CTR1 and CTR3), of two Cu reductases (FRE1 and FRE2) and of the Cu exporter (CCC2) gene deletion on the Cu isotopic composition, we knockout those genes in six isogenic strains. We confirmed that after approximately 120 min. of uptake the $\delta^{65}Cu$ reached an equilibrium which depends on the genotype. We demonstrated that each mutation leads to an increase of the $\delta^{65}Cu$ compared to the WT. This increase is due to Cu import through high-affinity Cu importers (HAIp) and modulated by the Cu reductases activity. We solved with a numerical model the isotopic mass balance equation for the different single mutant isogenic strains. We estimated for the first time *in vivo* the effect of each Cu importers activity on the cell $\delta^{65}Cu$: $\delta^{65}Cu_{Ctr1p} = -1.49‰$, $\delta^{65}Cu_{Ctr3p} = -1.80‰$, and $\delta^{65}Cu_{LAIp} = -0.04‰$. We also calculated that the $\delta^{65}Cu$ linearly depends on the relative Cu fluxes through high-affinity Cu importers during the first hour of uptake. Thus, tumor like Cu isotopic composition is due to a lower Cu uptake by Ctr proteins.

Introduction

Copper (Cu) is an essential micro-nutrient. It is involved in mitochondrial respiration as part of the electron carrier chain acceptor in the electron transfer and is involved in oxygen reduction as part of the cytochrome c oxidase [Iwata et al., 1995]. However, when Cu is in excess in cells, it creates free reactive oxygen species which are highly toxic [Linder, 2001; Lutsenko, 2010]. Thus, organisms have evolved complex mechanisms to regulate the intracellular Cu concentrations [Nevitt et al., 2012]. When a gene involved in regulation of Cu homeostasis is damaged, the dysfunction can lead to severe illnesses, such as cancer. Natural stable Cu isotopes in the serum or red blood cells of cancerous patients have been analyzed [Balter et al., 2015; Costas-Rodriguez et al., 2016; Lobo et al., 2016; Telouk et al., 2015]. For patients with hepatocellular carcinoma, Balter et al. [2015] have proposed that the light Cu enrichment measured in red blood cells is due to the enrichment in heavy Cu isotope observed in tumors. In addition, Bondanese et al. [2016] have shown in hepatocellular carcinoma-derived cell lines (HepG2) that the tumoral isotopic signature is due to hypoxia. However, although several proteins were tested for their potential effect on isotopic signature, none could be identified as the drivers for the observed Cu isotopes fractionation. Bondanese et al. [2016] proposed that the human high-affinity Cu importer might be responsible for this isotopic signature.

To circumvent the ethical and technical problems associated with the genetic manipulations of human cell lines, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, for which Cu import mechanisms are similar to that of human [Nevitt et al., 2012] has been used to explore the genetics of Cu fractionation. In *S. cerevisiae*, Cu is first reduced by membrane reductases: Fre1p or Fre2p [Georgatsou et al., 1997; Hasset and Kosman, 1995] which are the yeast homologs of human Steap proteins (Figure 3.1). Then Cu enters cells through high-affinity Cu importers called Ctr1p [Dancis et al., 1994a,b] and Ctr3p [Peña et al., 2000] and low-affinity Cu importers, for instance Fet4p [Hasset et al., 2000] or Smf1p [Liu et al., 1997] (Figure 3.1). The high-affinity Cu importers are close to human ones: hCtr1p [Nevitt et al., 2012]. After it entrance in cells, Cu is delivered to Cu chaperone such as Ccsp. To export Cu out of the cell, Cu is exported out of the cell through a vacuolar ATPase pump: the Ccc2 protein which is an homolog of human Cu-ATPases, *i.e.* hAtp7ap and hAtp7bp [Fu et al., 1995] (Figure 3.1). Using *S. cerevisiae* has several advantages: its genome is extremely well-known, as it was the first eukaryotic genome to be sequenced [Goffeau et al., 1996], and is easy to transform [Delorme, 1989; Gietz and Woods, 2002; Gietz et al., 1995; Hinnen et al., 1978; Ito et al., 1983; Karube et al., 1985]. In addition, culturing *S. cerevisiae* is easier and quicker than human cell lines. *S. cerevisiae* have also been used to better understand the molecular origin of diseases such as cancer. Thus, this organism is a good tool for understanding the effect of Cu transport on Cu isotopes fractionation. An earlier study has shown that cells reach an isotopic equilibrium in less than two hours and

show a genotype-specific variable enrichment in light Cu isotopes. This value depends on Cu import and is modulated by the ability of the cell to reduce Cu [Cadiou et al., 2017]. Interestingly, the Cu isotope composition at equilibrium fulfills the biological definition of a phenotype: it is observable, it depends on the genotype, and it depends on the environment, *i.e.* on the amount of Cu(I) available for the importers. We can thus define the Copper Isotopic Phenotype as the intracellular natural Cu isotopic composition at the plateau phase ($\delta^{65}Cu_{plateau}$). Previous studies did not allow to pinpoint the genes involved in Cu fractionation because the four strains used were not isogenic and did not target all the genes possibly involved in Cu import into the cells [Cadiou et al., 2017]. To assay the impact of each gene possibly involved in Cu transport, *i.e.* CTR1, CTR3, CCC2, FRE1 and FRE2, has been excised from the genome in the same genomic background , alone or in combination. We monitored both the intracellular Cu concentration and isotopic composition in the different mutants. We show that each mutant has a specific CuIP. We demonstrate that the Cu fractionation depends solely on the flux of Cu through the high-affinity Cu importers Ctr1p and Ctr3p. Hence, heavy Cu isotope enrichments in tumoral cells are likely due to a reduction of Cu flux through the high-affinity Cu transporter hCtr1p.

3.2.1 Materials and methods

3.2.1.1 Strains genotypes and culture conditions

The aim of this study is to understand the role of all the proteins involved in transmembrane Cu trafficking in Cu isotopic fractionation. Therefore, we have deleted of all the genes of interest (see part 3.2.1.2 for details) in a Cu import wild type (WT) background (strain DTY165, SEY6210 genomic background). The genotypes of the different strains and mutants used in this study are summarized in table 3.1 and supplementary table S3.5. Strains DTY165 and SKY34 were kindly provided by the Thiele Laboratory (Duke University Medical center, USA). Strains were stored in 20% glycerol at -80°C [Jeong et al., 2012] and were routinely cultured in Yeast-extract Peptone Dextrose medium (YPD) which contains 0.25 µmol/l of Cu.

3.2.1.2 Genetic manipulations

The mutant strains used in this study were generated by homologous recombination. The entire coding sequence of the high-affinity Cu importers (Ctr1p, Ctr3p), Cu-reductases (Fre1p, Fre2p) and the Cu-exporter (Ccc2p) were deleted during the construction. The primers listed in Supplementary Table S3.2 were used in combination with the plasmids PYM-N6 or PYM-17 as outlined in Janke et al. [2004]. PCR products were transformed into DTY165 cells followed by selection on YPD-agar plates containing 200 mg/L of G418 or 150 mg/L of ClonNat, as appropriate. Successful homologous recombination, *i.e.* gene deletion, were confirmed by PCR using a gene-specific forward primer directly up-stream

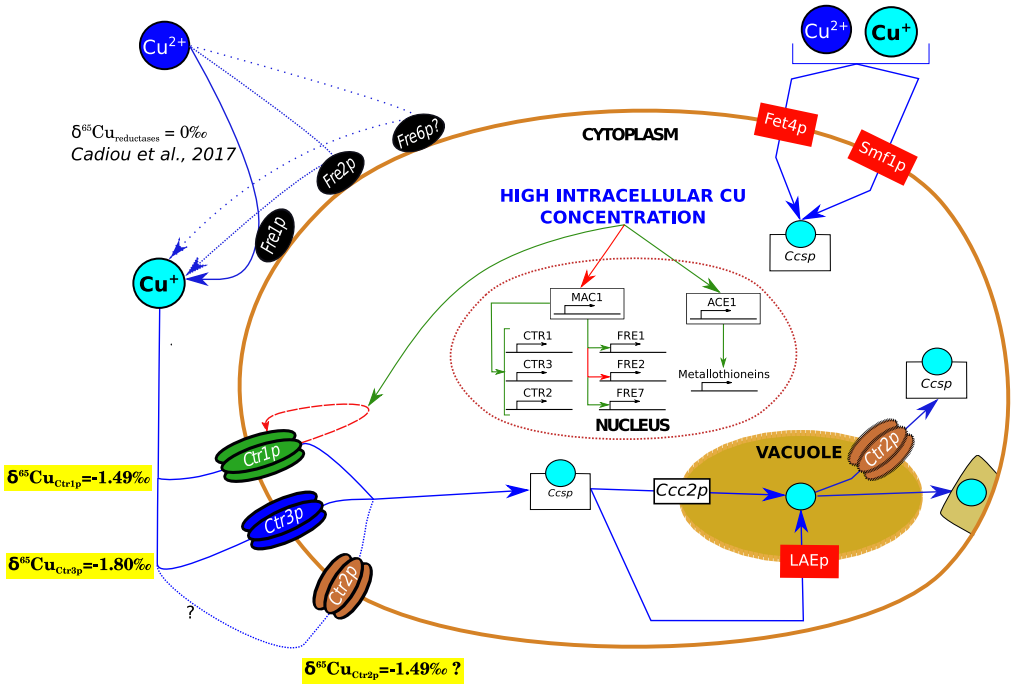


Figure 3.1 – Saccharomyces cerevisiae *copper transport.*

Copper fluxes are represented by blue arrows. Regulatory loops are indicated in red (repression) and green (activation). Monovalent and divalent Cu are represented by dark blue and light blue circles, respectively. The first step of Cu import is the reduction of Cu(II) to Cu(I) by the Fre reductases (Fre1p, Fre2p and maybe Fre7p) [Georgatsou et al., 1997; Hasset and Kosman, 1995], followed by the import through either high-affinity Cu importers represented in green (Ctr1p) [Dancis et al., 1994a,b] and blue (Ctr3p) [Peña et al., 2000] or low-affinity transporters such as Fet and Smf proteins represented in red [Hasset et al., 2000; Liu et al., 1997]. Copper is subsequently transported in the different compartments of the cell cytoplasm by different protein chaperones such as Ccsp. Cu is also transported toward the vacuole by Ccc2p which are the equivalent of Cu exporters [Fu et al., 1995] and by low-affinity Cu exporters (LAEp). Copper transport is regulated by MAC1 which senses high intracellular Cu concentrations and down regulates the expression of the high-affinity Cu transporters CTR1, CTR2 and CTR3 and of the reductase FRE1, while it activates the expression of the FRE2 reductase [Jungmann et al., 1993; Kampfenkel et al., 1995; Liu et al., 2012; Martins et al., 1998; Rees et al., 2004]. In Cadiou et al. [2017], we proved that Cu reduction have no effect on the cell Cu isotopic composition ($\delta^{65}Cu = 0‰$). In this study, we calculated the Cu isotopic fractionation due to Cu import through Ctr1p, Ctr3p and LAIp (values are highlighted in yellow). Our results, also suggest a relocalisation of Ctr2p and Fre6p (blue dot lines) in the cell membrane when CTR1 and CTR3 or FRE1 and FRE2 are missing.

---

of the targeted region, and a universal reverse primer (Kan B1) annealing within the resistance cassette (Supplementary Table S3.3).

Table 3.1 – Saccharomyces cerevisiae *strains*.

The presence (+) and absence (-) of the different Cu importers, Cu reductases and Cu exporters genes are reported.

Strain	Cu - import		Cu-reduction		Cu-export	Cu-transcription factor
	CTR 1	CTR 3	FRE 1	FRE 2	CCC 2	MAC 1
DTY 165	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
SKY 34	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
ctr1Δ	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ctr3Δ	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
fre1Δ	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
fre2Δ	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
fre1-2Δ	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
ccc2Δ	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

3.2.1.3 Uptake experiments

Uptake experiments were performed essentially as described in Cadiou et al. [2017]. Briefly, cells were harvested from overnight liquid cultures in YPD. Cell densities were estimated by direct count using a Thoma cell or by quantification of the cell protein content as described previously in Cadiou et al. [2017]. For the uptake experiments, cells were inoculated in Yeast Nitrogen Base (YNB) medium containing 2% of D-Glucose and 0.15 µmol/l of Cu at a cellular density of 10^8 cells/ml. The cultures were sampled at t=0min. immediately prior the doping with Cu to reach a concentration of 80 µmol/l, in order to determine the Cu content of cells at the start of the experiment accurately. Uptake experiments were monitored for 240 min. One additional experiment was monitored for 400 min. At each time point we sampled 1ml (*i.e.* $\sim 10^8$ cells) of culture for protein quantification, 1ml for Cu quantification in the growth medium, and 50ml (*i.e.* $\sim 0.5 \times 10^9$ cells) for isotopic measurements. Samples for isotopic and elemental analyses were rinsed with YNB-20% D-Glucose prior to storage at -20°C.

3.2.1.4 Quantification of cellular copper reduction activity

Cellular Cu reduction activity was quantified using the reductase assay described in Cadiou et al. [2017] using cells grown overnight in YPD medium and harvested in the late exponential phase. Cells were inoculated at a concentration of 10^9 cells/ml of YNB supplemented with 5% D-Glucose, 2 mM bathocuproine disulfonic acid (BCS) and incubated with shaking at 25°C for 40 min. Reduced Cu was quantified by measuring the optical den-

sity at 482 nm.

3.2.1.5 Chemical separation and purification procedures

Cu was extracted and purified following the procedures described in Cadiou et al. [2017]. Briefly, samples were first dissolved in concentrated distilled HNO_3 and evaporated to dryness. The organic matter was subsequently mineralized using a mixture of concentrated distilled HNO_3:H_2O_2 30% (50:50, v:v). To ensure the total destruction of the organic matter, the samples were placed under UV light in H_2O_2 30% for two hours at room temperature after evaporation to dryness. Copper was extracted from the matrix by anion-exchange chromatography (AG-MP1, 100–200 mesh, Bio-Rad) following a procedure modified from Maréchal et al. [1999]: samples were loaded in 4 ml 7M HCl – 0.001% H_2O_2, then matrix eluted in 7 ml 7M HCl – 0.001% H_2O_2, finally Cu was eluted in 20 ml 7M HCl – 0.001% H_2O_2. Copper was further purified on a second anion-exchange column following the procedure described in Maréchal et al. [1999]. The total procedural blank was 2 ng.

3.2.1.6 Copper elemental and isotopic measurements

Copper concentrations were measured by Quadrupole Inductively-Coupled Plasma Mass-Spectrometry (Q-ICP-MS, Agilent 7500 cx). Copper isotopic compositions were measured in wet plasma mode by Multi-Collector Inductively-Coupled Plasma Mass-Spectrometry (MC-ICP-MS, Nu500 HR, Nu instrument). The instrumental mass fractionation was corrected for using Zn-doping and standard-sample bracketing (see Cadiou et al. [2017] for details). The δ^{65}Cu is reported relative to the isotopic solution reference material NIST SRM 976. Each sample was analyzed three times in independent sessions. The long-term external reproducibility was assessed by measuring 6 different samples during several independent sessions over the course of 5 months (Supplementary Table S3.4). For each sample, the standard deviation between the different measurements was always under 0.03‰ (1σ). We thus define the external reproducibility of our measurement at 0.03‰. We define the temporal δ^{65}Cu variations (labeled δ^{65}Cu variation in the figure) between t and t=0, *i.e.* "δ^{65}Cu variation" = δ^{65}Cu(t) – δ^{65}Cu(t=0).

3.2.1.7 Numerical models

The goal of this study is to quantify the Cu isotopic fractionation associated with each protein involved in Cu trafficking. As the Cu fractionation factor for each protein cannot be measured, we have modeled Cu trafficking in the cell to extract the fraction factors. The Cu cell isotopic composition depends on the relative Cu fluxes through each Cu reductase (φ_{red}), each Cu importer (φ_{imp}) and each Cu exporter (φ_{exp}) and on the Cu fractionation due to each protein ($\delta^{65}Cu_{protein}$). These parameters are linked by the isotopic mass bal-

ance equation for a given time interval (Δt):

$$\delta^{65}Cu_{cell}^{\Delta t} = \varphi_{red}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{red} + \varphi_{imp}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{imp} - \varphi_{exp}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{exp} \quad (3.2)$$

As Cu reductases and Cu exporter have a neglible effect on cell Cu isotopic fractionation, the equation 3.2 can be written with solely high-affinity Cu importers (Ctr1p and Ctr3p) and low-affinity Cu importers (LAIp):

$$\delta^{65}Cu_{cell}^{\Delta t} = \varphi_{Ctr1p}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{Ctr1p} + \varphi_{Ctr3p}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{Ctr3p} + \varphi_{LAIp}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{LAIp} \quad (3.3)$$

$\delta^{65}Cu_{cell}$ was calculated by iteration varying the different parameters of the equation: $\varphi^{\Delta t}$ and $\delta^{65}Cu_{protein}$ (See Supplementary Table S3.6 for details) during the first 60 min. of Cu uptake. The calculated parameters were used as input for the steady-state box model (ISOPyBOX) to model the experimental data and confirm the validity of the parameters (see detailed procedures in the Supplementary information – Numerical calculation section). The interval of values tested for the relative Cu fluxes through high-affinity Cu importers in the WT and in Cu importers knockout strains was estimated from the experimental data (see Supplementary information – Numerical calculation for details). For the other strains, we used values ranging from 0 to 1. The tested δ^{65}Cu values varied between -2 and 0‰.

3.2.2 Results

3.2.2.1 Impact of copper transporter and copper reductase gene deletions on cellular copper isotopic composition

As expected from previous studies [Rome and Gadd, 1987], Cu uptake in WT and mutant strains occurred in two distinct phases (Supplementary Figure S3.1 and S3.2). For example, in the WT strain DTY165 and MAC1 mutant (SKY34), the cellular Cu concentration increased quickly from 0 to 60 minutes, with an average flux of 0.15 pmol/10^6cells.min and 0.049 pmol/10^6cells.min, respectively. Thereafter, it increased at lower fluxes of 0.070 and 0.024 pmol/10^6cells.min, respectively. Similarly, we observed the same two main phases for the evolution of the Cu isotopic composition. It decreased rapidly in the first 60 min of Cu uptake (-2.24×10^{-2} ‰/min) and then more slowly at a rate of -8.31×10^{-4} ‰/min for the the WT strain for example. After 120 min the natural Cu isotopic composition is essentially stable for all strains (Figures 3.2-3.5). It will be referred to as $\delta^{65}Cu_{plateau}$ in the following sections, and will correspond to the numeric average of the Cu isotopic composition from 120 to 240 min.

Previous study has shown that the cell Cu isotopic composition changes when Cu uptake is impaired [Cadiou et al., 2017]. Here we monitored Cu uptake and Cu isotopic compositions from three different knockout mutants impaired in the main Cu reductases, *i.e.*

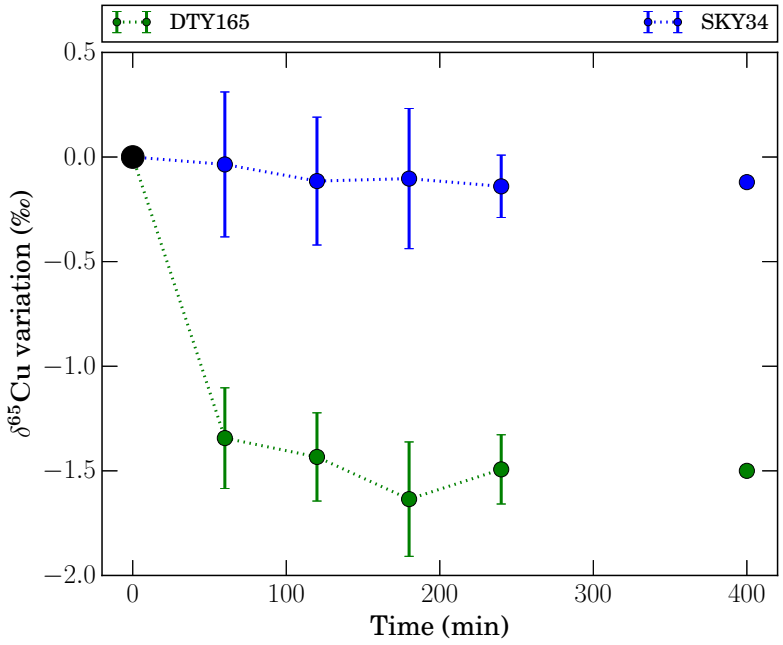


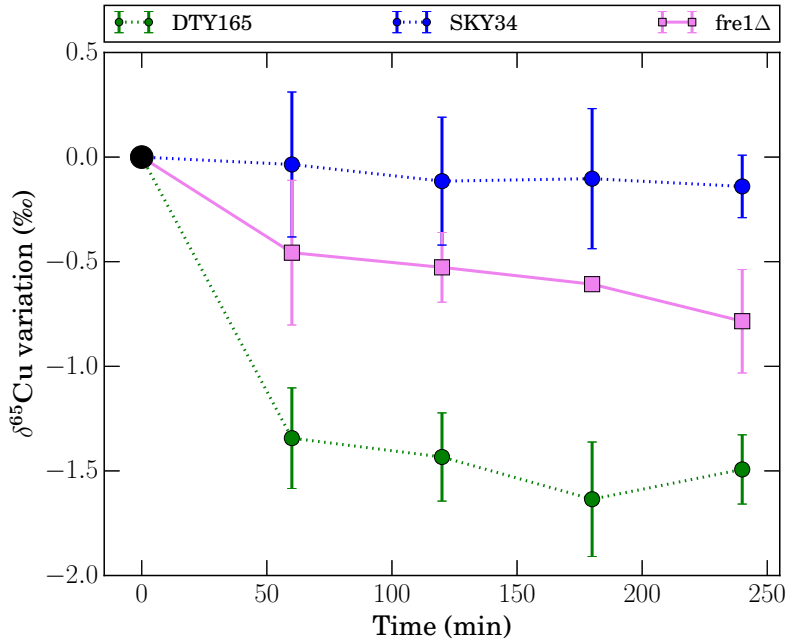
Figure 3.2 – ***Temporal evolution of the copper isotopic composition (δ^{65}Cu) in the wild type (DTY165) and the SKY34*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains during uptake experiments.***
The calculation of the δ^{65}Cu variation for each time step is given in the text. Reported values are the average (along the dashed lines) and the standard deviation (error bars) of three independent experiments. One of these experiments was continued up to 6 hours (400 min).

Fre1p and Fre2p (Table 3.1) [Georgatsou and Alexandraki, 1999; Georgatsou et al., 1997; Hasset and Kosman, 1995] and two different high-affinity Cu importer (HAI) mutants (*i.e.* ctr1Δ and ctr3Δ) and a Cu exporter mutant (ccc2Δ).

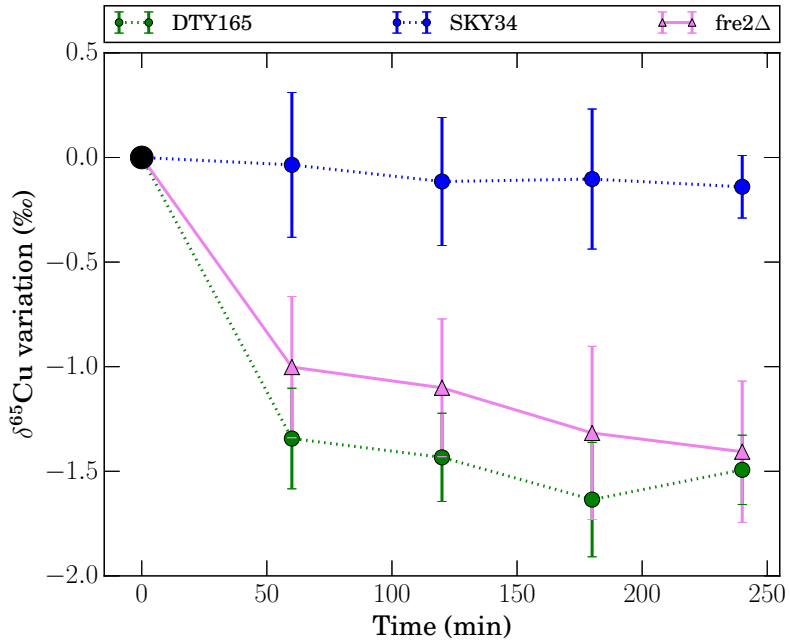
The reduction ability of the fre1Δ, fre2Δ and fre1-2Δ mutants were 2.85±0.46 µmol/L.min, 4.91±0.62 µmol/l.min and 1.23±0.65 µmol/l.min, respectively (Figure 3.6). After 240 min. of Cu uptake, cells reached a cellular Cu concentration of 8.1 pmol/l.10^{6}cells, 12.7 pmol/l.10^{6}cells and 6.97 pmol/l.10^{6}cells in the fre1Δ, fre2Δ and fre1-2Δ mutants respectively (Supplementary Figure S3.1), while their Cu isotopic composition are -0.65±0.21‰ (n=5), -1.27±0.33‰ (n=8) and -1.43±0.09‰ (n=8), respectively (Figures 3.3 and 3.7). Interestingly, the double reductase knockout mutant has the lowest reduction ability (Figure 3.6) but in contrast to expectations a Cu isotopic composition close to that of the WT (Figure 3.3).

After 240 minutes, Cu concentrations in the three HAI mutants were 10.4 pmol/l.10^6 cells, 7.1 pmol/l.10^{6}cells and 9.56 pmol.10^{6}cells in mutants ctr1Δ, ctr3Δ and ccc2Δ respectively (Supplementary Figure S3.2). Those concentrations are lower than those observed in the WT (13.1 pmol/l.10^{6}cells). Similarly, the δ^{65}Cu$_{plateau}$ for the two HAI mutants and Cu exporter mutant were significantly higher than that of the WT, *i.e.* -1.22 ±0.24‰ (n=6), -0.76±0.23‰ (n=6) and -1.05±0.24‰ (n=6) respectively, *vs.* -1.51±0.18‰

(a)


DTY165
SKY34
fre1Δ
0.5
0.0
−0.5
−1.0
−1.5
−2.0
δ65Cu variation (‰)
0
50
100
150
200
250
Time (min)

(b)


DTY165
SKY34
fre2Δ
0.5
0.0
−0.5
−1.0
−1.5
−2.0
δ65Cu variation (‰)
0
50
100
150
200
250
Time (min)

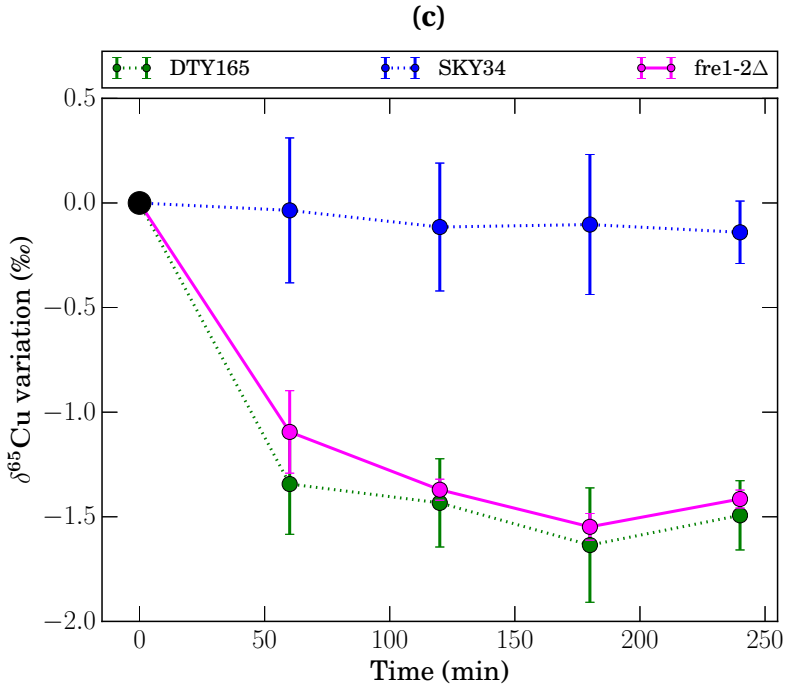


Figure 3.3 – ***Temporal evolution of the copper isotopic composition (δ^{65}Cu) in the wild type (DTY165), the SKY34 and the copper reductase knockout*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains during uptake experiments.***

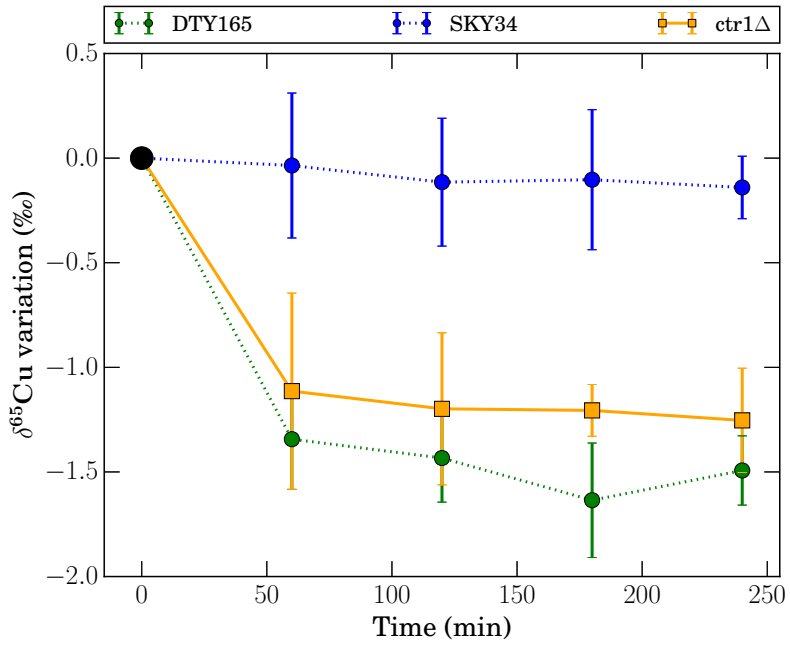
The calculation of the δ^{65}Cu variation for each time step is given in the text. Reported values are the average and standard deviation of three (two for fre1Δ) independent experiments.

(a) δ^{65}Cu *variation in the fre1Δ strain (pink squares) compared to the WT (DTY165 in green) and the SKY34 (blue) strains.*

(b) δ^{65}Cu *variation in the fre2Δ strain (pink triangles) compared to the WT and the SKY34 strains.*

(c) δ^{65}Cu *variation in the fre1-2Δ strain (magenta circles) compared to the WT and the SKY34 strains.*

(a)



(b)

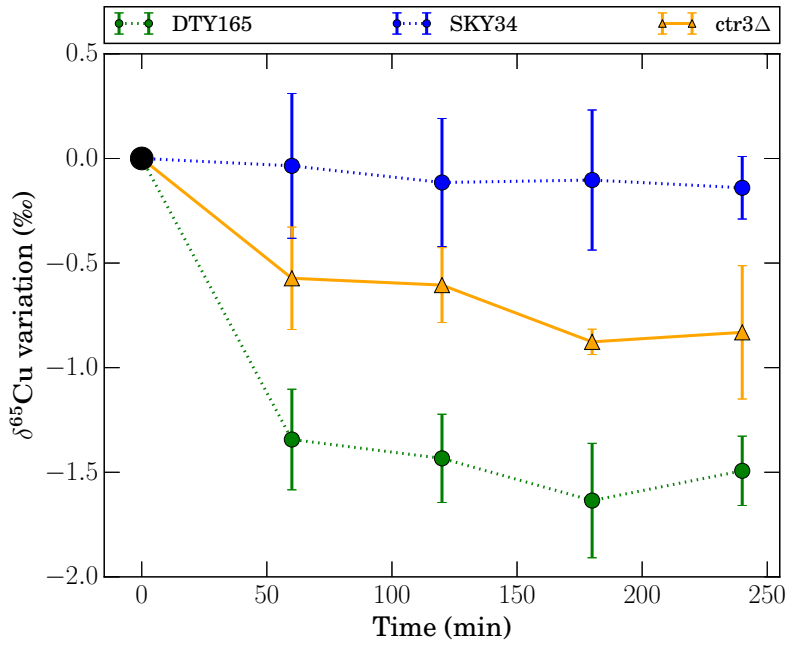


Figure 3.4 – ***Temporal evolution of the copper isotopic composition*** *(*δ^{65}Cu*)* ***in the wild type (DTY165), the SKY34 and the high-affinity copper importers knockout*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains during uptake experiments.***

The calculation of the δ^{65}Cu *variation for each time step is given in the text. Reported values are the average and standard deviation of three independent experiments.*

(a) δ^{65}Cu *variation in the ctr1Δ strain (orange triangle) compared to the WT (green) and the SKY34 (blue) strains.*

(b) δ^{65}Cu *variation in the ctr3Δ strain (orange squares) compared to the WT (green) and the SKY34 strains.*

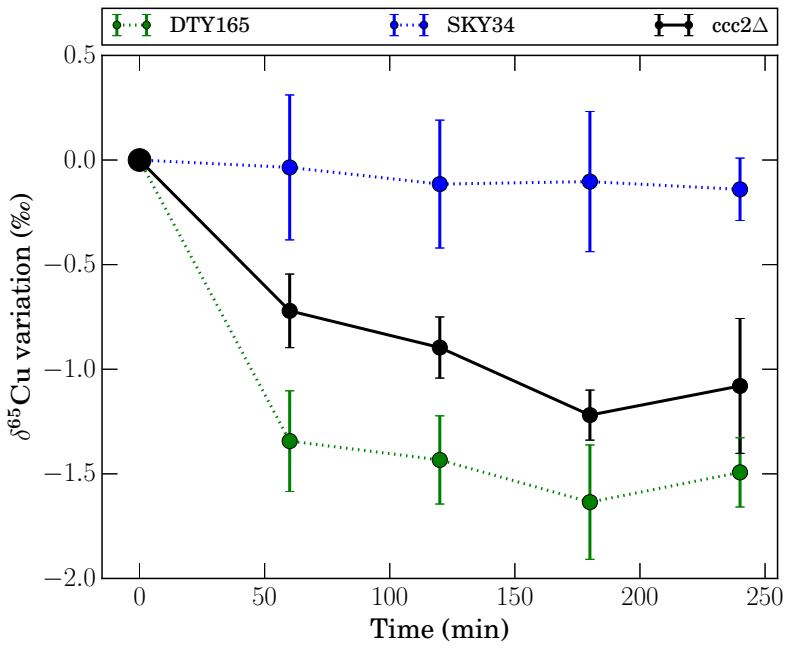


Figure 3.5 – ***Temporal evolution of the copper isotopic composition (*δ^{65}**Cu***) in the wild type (DTY165), the SKY34 and the copper exporter knockout* **Saccharomyces cerevisiae** *strains during uptake experiments.***

The calculation of the δ^{65}C*u variation for each time step is given in the text. Reported values are the average and standard deviation of three independent experiments.* δ^{65}C*u variation in the ccc2Δ strain (black) compared to the wild type (green) and the SKY34 (blue) strains.*

(n=9) for the WT (Figure 3.7).

3.2.2.2 Copper isotopic fractionation associated to copper importers

The Cu cell isotopic composition is described by the isotopic mass balance equation (equation 3.2). According to previous studies, two terms in this equation can be neglected for its resolution: Cu reduction and Cu export [Cadiou et al., 2017]. Therefore, the isotopic mass balance equation can be written for a given time interval (Δt) as:

$$\delta^{65}Cu_{cell} = \varphi^{\Delta t}_{imp}\delta^{65}Cu_{imp} = \varphi^{\Delta t}_{Ctr1p}\delta^{65}Cu_{Ctr1p} + \varphi^{\Delta t}_{Ctr3p}\delta^{65}Cu_{Ctr3p} + \varphi^{\Delta t}_{LAIp}\delta^{65}Cu_{LAIp} \quad (3.4)$$

where Ctr1p and Ctr3p represent the two *S. cerevisiae* high-affinity Cu importers and LAIp the low-affinity Cu importers. φ_x the relative Cu flux through a given transporter ($\sum \varphi_x = 1$) and $\delta^{65}Cu_x$ the Cu isotopic fractionation due to a given transporter. We have solved this equation using an iterative model (see details in Supplementary information – Numerical calculation) and have obtained very similar values for δ^{65}Cu regardless of the number of iteration steps used (from 10 to 50). For further calculations we used the average of all these values, *i.e.* $\delta^{65}Cu_{Ctr1p} = -1.49 \pm 0.16$‰, $\delta^{65}Cu_{Ctr3p} = -1.80 \pm 0.03$‰, and $\delta^{65}Cu_{LAIp} = -0.04 \pm 0.05$‰. We used these values in our iterative model to fix the Cu

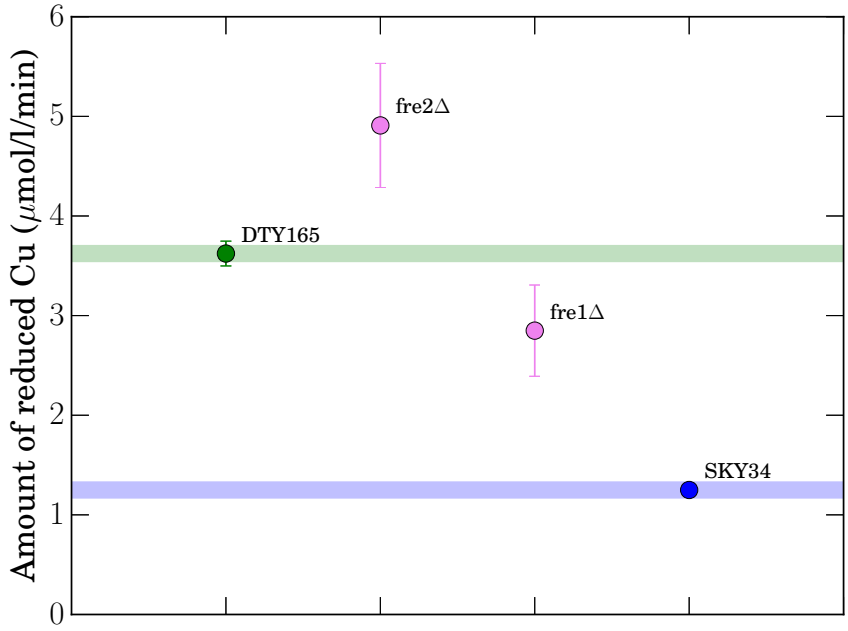


Figure 3.6 – ***Copper reductase activity in the Fre knockout strains (pink and magenta) compared to the wild type (green) and the SKY34 (blue)*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains.***
fre1Δ and fre2Δ (pink) are single reductase knockout strains, fre1-2Δ (magenta) is a double reductase knockout strain. All three have the same genetic background as the wild type strain DTY165 (green). SKY34 (blue) is a mac1Δ-ctr1Δ strain. Reported values are the average of two independent experiments. The error bars show the standard deviation.

fractionation factors and recalculate without any hypothesis the relative copper fluxes through high-affinity Cu importers (φ^{0-60}_{HAIp}). The calculated values agreed with measured fluxes, for example in the ctr3Δ strain, φ^{0-60}_{HAIp} = 0.497 and φ^{0-60}_{HAIp} = 0.520 for the calculated and measured value respectively. Our modeling allowed to calculate the relative Cu fluxes through the HAIp in knockout mutants, *i.e.* fre1Δ, fre2Δ, ccc2Δ, for which it could not be measured. We observed that the measured $\delta^{65}Cu_{cell}$ obtained were dependent solely on the relative flux of Cu through the HAIp during the first hour of uptake (φ^{0-60}_{HAIp}) according to the following linear relationship: $\delta^{65}Cu_{plateau}$ = -1.908 φ^{0-60}_{HAIp} + 0.122, r^2 = 0.989 (Figure 3.8).

3.2.3 Discussion

3.2.3.1 Copper import and reduction abilities define the copper Isotopic Phenotype of a cell

The aim of the current study was to quantify accurately the Cu fractionation potential for each of the proteins involved in Cu trafficking in the yeast cell, *i.e.* Cu reductases and Cu

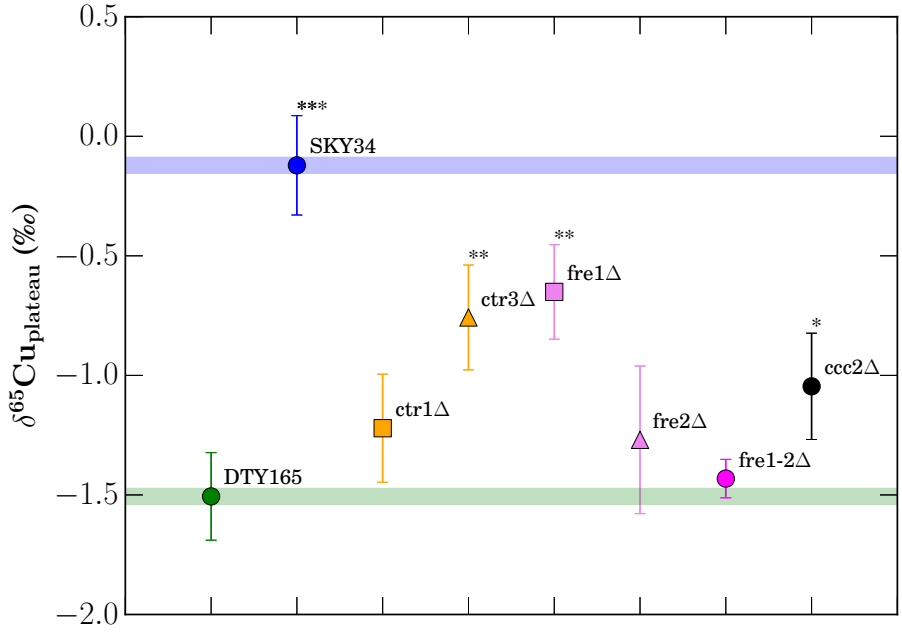


Figure 3.7 – ***Average copper isotopic composition after 120 min. of copper uptake*** **($\delta^{65}Cu_{plateau}$)** ***in the wild type, the SKY34, the high-affinity copper importers knockout, the copper reductases knockout and the copper exporter knockout*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains.***
We compared the $\delta^{65}Cu_{plateau}$ of the wild type (green circle), of the SKY 34 (blue circle), of the ctr1Δ knockout (orange square), of the ctr3Δ knockout (orange triangle), of the fre1Δ knockout (pink triangle), of the fre2Δ knockout (pink square), of the fre1-2Δ knockout (magenta circle) and of the ccc2Δ (black circle) knockout S. cerevisiae *strains. Reported values are the average and standard deviation of three independent experiments. The number of stars depend on the p-value calculated with a t-test. Here we tested the different value of $\delta^{65}Cu_{plateau}$ measured in knockout strains against the $\delta^{65}Cu_{plateau}$ value measured in DTY165 ("*" if p-value was <0.1, "**" if p-value was <0.01, "***" if p-value was <0.001).*

importers. To address this question we have performed the clean removal of the genes coding for these proteins in the DTY165 genomic background. Copper uptake and fractionation in all mutants followed a similar logarithmic pattern. The maximum of Cu fractionation was reached during the first 120 min. of uptake. After that, the δ^{65}Cu reached a plateau (Figure 3.2, 3.3, 3.4, 3.5). Our results clearly confirm that the isotopic compositions of cells tend to reach a value at equilibrium which is specific for each mutant. This value varies between that observed for the wild type strain and that observed for a ctr1;mac1Δ mutant, *i.e.* -1.51‰ and 0‰, respectively. The Cu isotopic composition of each cellular type is influenced by both the ability to reduce the Cu present in the environment and the ability to transport it inside the cells [Cadiou et al., 2017]. We have defined this genotype-specific equilibrium value as the Cu Isotopic Phenotype. It is note-

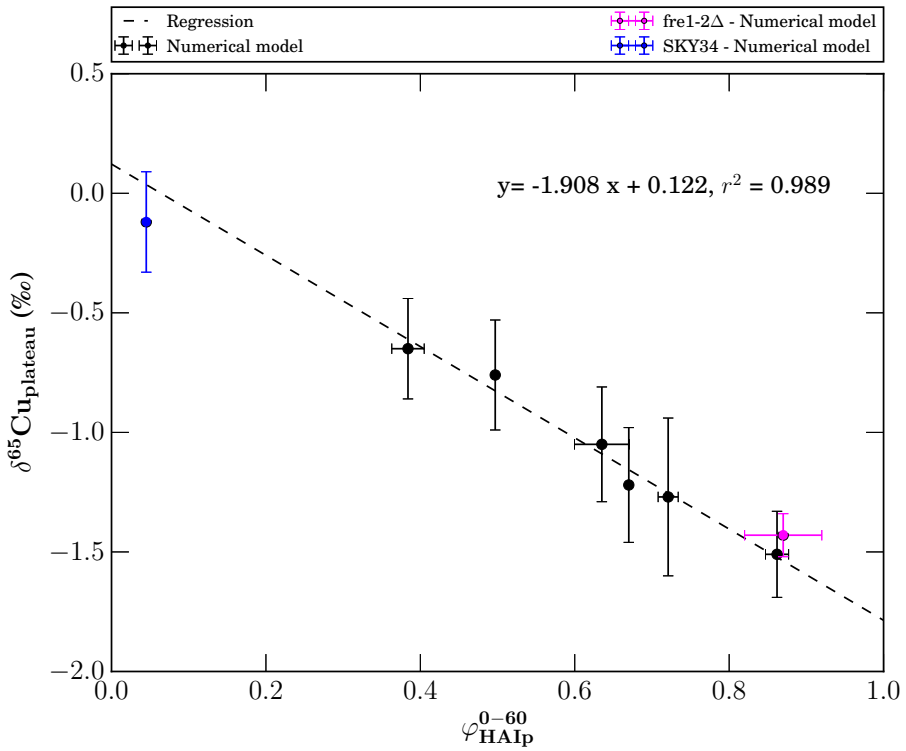


Figure 3.8 – ***Average copper isotopic composition after 120 min. of copper uptake*** **($\delta^{65}Cu_{plateau}$)** ***measured in the WT and in the single knockout*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains as a function of the calculated relative copper fluxes through high-affinity copper importers during the first hour of uptake*** **(φ^{0-60}_{HAIp}).**

Relative copper fluxes through high-affinity importers (φ^{0-60}_{HAIp}) were calculated with a numerical model (see Supplementary information – Numerical calculation for details). We plotted this value against the average Cu isotopic composition after 120 min. of Cu uptake ($\delta^{65}Cu_{plateau}$) measured in the WT, the ctr1Δ, the ctr3Δ, the fre1Δ, the fre2Δ and the ccc2Δ strains (black). The plain line represent the linear regression. We also reported the $\delta^{65}Cu_{plateau}$ and the calculated φ^{0-60}_{HAIp} for the SKY34 (blue) and the fre1-2Δ (magenta) strains which where not used for the linear regression.

worthy that the Cu Isotopic Phenotype value reported here for the WT strain DTY165 is substantially lower by 0.66‰ than that reported earlier [Cadiou et al., 2017]. The main reason for this difference stems from the procedure followed in the two studies. In the previous study, we measured the δ^{65}Cu of the cells at t=0min after adding Cu to the culture medium. Our further experiments of uptake showed that, due to the very quick Cu uptake at the start of the experiment, the minute necessary for sampling and cooling of the samples was sufficient to allow significant uptake and Cu isotopic fractionation. Since the δ^{65}Cu value at equilibrium is the difference between that at the plateau and the one at t=0 min., the values reported in Cadiou et al. [2017] are underestimating the fractionation of the cells. To avoid this underestimation, the δ^{65}Cu of cells was measured in cells sampled prior to Cu addition to the growth medium.

3.2.3.1.1 Relative qualitative contribution of the different copper transporter proteins on the Cu Isotopic Phenotype. In order to quantify the relative impact of each Cu transporter on the Cu isotope composition, the amount of Cu transported through these transporters at a given time had to be estimated (Supplementary Table S3.5). In our experimental conditions we used a high Cu concentration. Under these conditions, high-affinity Cu importers genes (CTR1 and CTR3) expression are repressed by Mac1p within approximatively 90 min. [Heredia et al., 2001; Jungmann et al., 1993] (Figure 3.1). Furthermore, Ctr1p is removed from the membranes within less than 10 minutes *via* endocytosis and protein degradation [Ooi et al., 1996; Wu et al., 2009] (Figure 3.1). Thus, after 90 min, the amount of high-affinity Cu importers in the membrane is likely to be negligible [Peña et al., 1998]. Thereafter, Cu enters the cell through low-affinity importers only and goes out through Cu exporters. Since the expression of these proteins are constitutive, the flux of Cu passing through them can be considered constant through time, and correspond to the only Cu trafficking in cells at equilibrium, *i.e.* past 120 min. of experiment. If Cu import through LAIp and Cu export had an influence on Cu isotopic fractionation, one would expect a drift of the Cu Isotopic Phenotype after 120 min. Our data show during this time interval only negligible variations of the isotopic compositions, *i.e.* lower than 0.3‰, suggesting that Cu export and Cu import through low-affinity Cu importers have a negligible effect on Cu isotopic fractionation. Furthermore, Cu fractionation in the mutant ccc2Δ, lacking the gene coding for the protein responsible for Cu export *via* the vacuole [Fu et al., 1995; Yuan et al., 1997], remains stable at uptake equilibrium, suggesting that neither Cu import through the LAIp nor Cu export through the exporters can generate fractionation in the cell. In good agreement, the $\delta^{65}Cu_{LAIp}$ value for LAIp calculated in our numerical model is close to 0‰ (-0.04±0.05‰).

3.2.3.1.2 Role of reductases on the Cu Isotopic Phenotype. Previous study has proposed that Cu reduction did not generate Cu fractionation ($\delta^{65}Cu_{reductases}$ = 0‰, equation 3.4, Figure 3.1), but that the level of Cu reducing activity could modify the flux of Cu going through the Cu importers and influence their ability to generate Cu isotopic fractionation [Cadiou et al., 2017]. In the present study, Cu uptake and fractionation were monitored in mutants in which each or both major Cu reductase genes [Martins et al., 1998], *i.e.* FRE1 and FRE2 [Hasset and Kosman, 1995], were removed. Both genes are regulated by Cu central regulator MAC1, but while MAC1 upregulates the expression of the FRE1 gene, it represses that of FRE2 [Georgatsou et al., 1997] (Figure 3.1). The removal of FRE1 will lead to the overexpression of MAC1 and the repression of FRE2, leading to a lower reduction ability of the cells (Figure 3.6). The removal of FRE2 will activate MAC1 expression, which will lead to the overexpression of FRE1 and an increase of the cell reduction ability. In contrast, a mutation of both reductases (in fre1-2Δ strain) will lead to a low-reduction ability (Figure 3.6). Based on the model proposed by [Cadiou et al., 2017], we

expected a significantly higher $\delta^{65}Cu_{plateau}$ in the fre1Δ mutant, a WT like $\delta^{65}Cu_{plateau}$ in the fre2Δ mutant, and no fractionation in the double mutant. As expected, the measured $\delta^{65}Cu_{plateau}$ for the fre1Δ mutant is indeed 0.86‰ higher, and that of the fre2Δ is similar to, that of the WT (Figure 3.3 and 3.7). Surprisingly, the $\delta^{65}Cu_{plateau}$ of the double reductases mutant fre1-2Δ is close to the WT and not close to 0‰. For single mutant strains these values confirm previous observations, and are compatible with a scenario in which the Cu Isotopic Phenotype is modulated by the ability of the cell to reduce Cu.

3.2.3.2 High-affinity copper importers are responsible for copper Isotopic Phenotype

3.2.3.2.1 Solving the isotopic mass balance equation. The isotopic mass balance of Cu trafficking through the yeast cell during a given time interval (Δt) can be written as:

$$\delta^{65}Cu_{cell} = \varphi_{red}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{red} + \varphi_{imp}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{imp} - \varphi_{exp}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{exp} \quad (3.5)$$

where $\varphi_i^{\Delta t}$ and $\delta^{65}Cu_i$ are the relative Cu fluxes and the Cu isotopic fractionation in Cu reductases (red), Cu importers (imp) and Cu exporter (exp) respectively. Since there is no impact of Cu reductases and Cu exporters on Cu isotopic fractionation [Cadiou et al., 2017], it can be simplified as follows:

$$\delta^{65}Cu_{cell} = \varphi_{imp}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{imp} = \varphi_{Ctr1p}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{Ctr1p} + \varphi_{Ctr3p}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{Ctr3p} + \varphi_{LAIp}^{\Delta t}\delta^{65}Cu_{LAIp} \quad (3.6)$$

where Ctr1p and Ctr3p are the two high-affinity Cu importers and LAIp are the low-affinity Cu importers. According to both *in vitro* experiments and *ab-initio* calculation, the fractionation factors associated to Cu proteins have to be negative and should be comprised in the 0 to -2‰ range [Cadiou et al., 2017; Navarrete et al., 2011]. We estimated the relative Cu fluxes through HAIp in DTY165 and the Ctr mutants from our experimental data, while this parameter was left free in the Cu reductase and the Cu exporter mutants cases (Supplementary information – Numerical calculation). The calculated Cu isotopic fractionation factors for the HAIp Ctr1p and Ctr3p were $\delta^{65}Cu_{Ctr1p} = -1.49 \pm 0.16$‰ and $\delta^{65}Cu_{Ctr3p} = -1.80 \pm 0.03$‰, respectively (See Supplementary information – Numerical calculation for the detailed procedure).

In this study, we monitored the δ^{65}Cu variation through time in infinite medium, so the fractionation factors of the proteins are independent of the isotopic composition of the medium. The experimental fractionation factor between the growth medium (M) and the cell (Y), *i.e.* $\alpha_{YM}^{protein}$, can be written for each protein as $\alpha_{YM}^{protein} = \exp\left(\delta^{65}Cu_Y^{protein}/1000\right)$. The calculated values for the HAIp and LAIp in the current experiment are $\alpha_{YM}^{Ctr1p} = 0.9985$, $\alpha_{YM}^{Ctr3p} = 0.9982$, and $\alpha_{YM}^{LAIp} = 0.99996$. These values are consistent with previously reported values for the SOD1 (-1.60 ‰) and the Cu-metallothionein (-2.13 ‰) obtained in *in vitro* studies [Zhu et al., 2002]. Contrary to that, the *ab-initio* calculation of the fractionation

factor in biological conditions associated to the transfer of Cu(I) to amino-acids (for example the exchange between Cu(I) - Methionine and Cu(I) - Histidine in Ctr1p results to a fractionation factor equal to 0.9992) [Balter et al., 2013; Cadiou et al., 2017; Fujii et al., 2014] are more remotely related to those found in this study suggesting that several important parameters were probably missing or underestimated in the *ab initio* calculations.

The fractionation factors were used to estimate the Cu fluxes through high-affinity Cu importers in each strain. Our results confirm that the absence of CTR1 or CTR3 can be partially compensated by an increase in the flux of Cu *via* the remaining transporter [Jungmann et al., 1993]. However, Cu transport is not fully restored, since we observed a 19% reduction of Cu import in ctr1Δ and 37% in ctr3Δ. Similarly, we observe the expected reduction of Cu import through HAIp, e.g. *ca.* 23%, in the ccc2Δ mutant [Gudin, 2008]. In addition we could calculate for the fist time the reduction in Cu transport through HAIp in the reductase mutants, e.g. a 47% reduction in fre1Δ and a 14% reduction in fre2Δ. Thus, although Fre1p is supposed to compensate the lack of Fre2p in terms of Cu reduction, the amount of Cu that goes through Ctr1p and Ctr3p still remain lower than WT. It remains unclear whether there is a direct interaction between Fre and Ctr proteins in the cell membrane [Peña et al., 1999]. However, the increased reductase ability in the fre2Δ mutant associated with the reduced flux through HAIp would suggest that Fre1p is not in close contact with the transporters. Finally, our results allow for the first time to establish a clear relationship between the Copper Isotopic Phenotype (CuIP reported as the $\delta^{65}Cu_{plateau}$) and the flux of Cu entering the cell (Figure 3.8) through the high-affinity Cu importers. In yeast, $\delta^{65}Cu_{plateau} = -1.908 \times \varphi_{HAIp}^{0-60} + 0.122$, $r^2 + 0.989$. Thus, we establish for the first time *in vivo* that the Cu Isotopic Phenotype of a cell depends solely on the flux of Cu entering it through high-affinity Cu transporters. These results establish the molecular basis of the observed Cu fractionation in cells.

3.2.3.3 Involvement of alternative transporters in copper uptake in double knockout mutants

The study of high-affinity Cu importer and Cu reductase mutants in yeast clearly show that Cu fractionation depends solely on the activity of the two known HAIs of yeast, Ctr1p and Ctr3p. This model is unable to explain the origin of the Cu fractionation reported in the CTR1-CTR3 double mutant in Cadiou et al. [2017], nor the evolution of the δ^{65}Cu in the FRE1-FRE2 double knockout mutant (fre1-2Δ). For both mutants, the observed Cu Isotopic Phenotype is close to that of the WT strain DTY165:-0.67 for the Ctr1-3Δ mutant MPY17 in [Cadiou et al., 2017] conditions where the WT Cu Isotopic Phenotype was equal to -0.85‰ ([Cadiou et al., 2017], Figure 2), and -1.43‰ for the fre1-2Δ mutant where the WT Cu Isotopic Phenotype was equal to -1.51‰, Figure 3.3, 3.7), although no transport through Ctr1p and Ctr3p occurs for the first mutant and the reduction ability of the second is as low as that of the MAC1 mutant SKY34 (Figure 3.6). The calculated

Cu flux across a potential “high-affinity Cu importer” in the fre1-2Δ mutant is equivalent to that of the WT, suggesting the existence of at least an unidentified Ctr-like protein involved in Cu uptake in the fre1-2Δ mutant. Both MPY17 and fre1-2Δ mutants should not express the CTR1 and CTR3 genes, due to mutations (MPY17) or regulation (fre1-2Δ). It is noticeable that the major difference between these two mutants and SKY34, which Copper Isotopic Phenotype is close to 0‰, is the mutation in MAC1 in SKY34, which impairs Cu-dependent gene regulation in this later mutant. It is thus probable that the putative Cu HAIp that might fractionate Cu in those two strains must be MAC1-dependent. Kampfenkel et al. [1995], have identified a Ctr-like low-affinity importer: Ctr2p. Ctr2p is localized in the vacuolar membrane [Portnoy et al., 2001], and is responsible for the mobilization of Cu stored in the vacuole under low intracellular Cu concentration. Cu uptake by this protein depends on the Fre6p Cu reductase. FRE6 and CTR2 transcription are upregulated by MAC1 [Liu et al., 2012]. Ctr2p has no apparent impact on Cu uptake from the medium when Ctr1p is present but it can restore Cu uptake when both Ctr1p and Ctr3p are absent. However, the protein is undetectable in the plasma membrane. If it has been shown that Ctr2p can restore a normal Cu concentration in ctr1-3Δ mutants, the mobilization of the vacuolar Cu in ctr1-3Δ cannot explain how these mutants are able to import Cu from the growth medium. In human cells, the hCTR2 gene codes a late endosome and lysosome, the equivalent of the yeast vacuole, Cu importer [Van den Berghe et al., 2007]. Using gfp-tagged CTR2, hCtr2p could be detected in the cell plasma membrane, allowing Cu uptake [Bertinato et al., 2008]. The WT CuIP we observe in the MPY17 and the fre1-2Δ mutants suggest that a similar reorganization of Cu import occurs in yeast cells in which both genuine plasma membrane high-affinity Cu transporters Ctr1p and Ctr3p are impaired to restore Cu import. The most probable scenario would imply a re-localization of part of the Ctr2p to the plasma membrane (dash lines, Figure 3.1), although it remains possible that a yet unknown transporter might be involved. In depth, experiments to localize Ctr2p at the sub-cellular level would be required to confirm this hypothesis.

3.2.3.4 Natural copper isotopic composition measurement as a prognosis biomarker in cancer

There is an increasing number of studies showing that cellular dysfunction, and especially the development of cancer, affects the Cu isotopic composition of patient cells, red-blood cells or serum [Balter et al., 2015; Lauwens et al., 2016; Lobo et al., 2016; Telouk et al., 2015]. For example, an *in vivo* study has shown that hepatocellular carcinoma (HCC) tumoral cells are characterized by a higher δ^{65}Cu (+0.44±0.18‰) than peri-tumoral cells [Balter et al., 2015]. Assuming that the relationship evidenced for yeast Cu transport can be applied to human cell due to the proximity of the two Cu transport apparatus, we can calculate the flux of Cu through the high-affinity Cu importers with the δ^{65}Cu measured in HCC cells and in the peritumoral cells to quantify the extent of the putative Cu flux decrease

between the two cell types. According to the model, the difference between tumoral and peri-tumoral cells can be explained by a 27±0.12% decrease in the Cu flux through hCtr1p. Possible origins for this flux decrease are double, either a decrease in activity/quantity of the HAIp Cu importer proteins, *i.e.* hCtr1p, or a decrease in Cu reductase activity, *i.e.* of the STEAP3 protein [Ohgami, 2006]. Using liver cancer stem cells, Bondanese et al. [2016] proved that the specific Cu tumoral isotopic composition is due to hypoxia, but were unable to identify the genes responsible for fractionation in HCC. It is interesting to note that in patients with HCC, the expression of the STEAP3 gene is repressed and the amount of the Steap3 protein in the membrane reduced, and is further reduced with the development of the cancer [Caillot et al., 2009; Coulouarn et al., 2005]. The decrease of the Cu reductase decrease is expected to lead to a lower Cu reduction ability which should convert into a lower flux of Cu through hCtr1p, and therefore a higher δ^{65}Cu, as observed by Balter et al. [2015]. Thus, it becomes possible to link the tumoral δ^{65}Cu increase to a STEAP3 expression decrease with cancer degree.

Furthermore, because of mass balance, the amount of light and heavy Cu isotopes must stay stable in one organism. If one organ is enriched in one isotope, the reservoir (blood) is enriched in the other. Therefore, δ^{65}Cu increase in tumoral cells should lead to a decrease of the blood δ^{65}Cu. This assumption is confirmed *in vivo* where HCC development leads to a decrease of red-blood cells δ^{65}Cu [Balter et al., 2015]. It has been proposed previously that δ^{65}Cu could be used as a biomarker and even a prognosis marker for cancer [Albarède, 2015; Larner, 2016; Telouk et al., 2015]. However, until now, two major elements were missing to allow the development of this tool: first, it was necessary to establish the origin of fractionation in the cell, and in the organs, which is critical to understand which process the biomarker reports. Second, in order to predict a process it was necessary to establish a clear correlation between the value that could be measured (δ^{65}Cu) and the process to be monitored. In the present study, we have addressed and answered both of these critical issues. To be able to apply this approach for cancer prognosis, further experiments will be necessary to establish the correlation between δ^{65}Cu and Cu transport *via* Ctr1p. To address this issue, the approach developed by Bondanese et al. [2016] could prove very useful. If the relation between Cu reductases expression and tumoral δ^{65}Cu can be confirmed, red-blood cells δ^{65}Cu analysis might become a new non-invasive prognosis biomarker of the HCC development.

Conclusion

In this study, we observed that natural Cu isotopic composition reaches an equilibrium after two hours of Cu uptake. The value of this equilibrium depends on the genotype. We proved that this value depends on Cu import through high-affinity Cu importers. We proposed a linear relation between Cu flux through Ctr1p and Ctr3p ($\varphi_{\mathrm{HAIp}}^{0-60}$) – the two

high-affinity Cu importers - and the δ^{65}Cu at equilibrium (reported as $\delta^{65}Cu_{plateau}$= -1.91 $\times\varphi^{0-60}_{HAIp}$ + 0.122). Cu flux through high-affinity importers decreases when one of the Cu importers gene is deleted or when Cu reductases are less expressed. Finally, we proposed that the heavy Cu isotope enrichment observed in hepatocellular carcinoma is due to a lower expression of Cu reductases. This observation might pave the way to the developpement of a new non invasive prognosis biomarker of the transition from cirrhosis to hepatocellular carcinoma.

Supplementary information

Supplementary information – Material and Methods

Supplementary Table S3.1 – Saccharomyces cerevisiae *genotype.*

Strain	Genotype	Reference
DTY 165	MATα ura3-52 his6 leu2-3,-112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ	Li et al. [1996]
SKY 34	MATα gal1 trp1-1 his3 ade8 CUP1^r ctr1::TRP1 mac1Δ	Peña et al. [2000]
ctr1Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ ctr1::KanM	This study
ctr3Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ ctr3::KanM	This study
fre1Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ fre1::KanM	This study
fre2Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ fre2::KanM	This study
fre1-2Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ fre1::KanM fre2::G418	This study
ccc2Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ ccc2::KanM	This study

Supplementary Table S3.2 – *Genetic transformation primers used in the plasmid pYM-N6*

Strain	Plasmid primers
ctr1Δ–fw	GAAGAATCGAATAGAAAATAAAAAAAAGTGTATTATATTTGACATTCAAACGTACGCTGCAGGTCGAC
ctr1Δ–rev	ATAGAGATATTGGAAGAAGAAGATATAGGTGGACGAACCTTGTCTAGTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
ctr3Δ– fw	GAAGAAGAGGGATAACAACAGACGAAAACACATTTAAGGGCTATACAAAGCGTACGCTGCAGGTCGAC
ctr3Δ– rev	TCAATTTTTGAAACAAACCTCTCGGCTTTCCTCTATTCATTTTTGTCTTTATCGATGAATTCGAGCTCG
fre1Δ– fw	CATCTAATTTCTCGCATATTCACGCCGACGGAAGAACGAGCCGGATCAATCGTACGCTGCAGGTCGAC
fre1Δ– rev	AAGCAACAAAATAACAAAAGTATGCGTGCAAGAATTATTAACAAGGGGCCATCGATGAATTCGAGCTCG
fre2Δ–fw	GTTGTAATAAAGTCTTTTTTATCCAAAGCTTATGAAACCCAACGAATATACGTACGCTGCAGGTCGAC
fre2Δ– rev	AATTTGGATAGGTATTATTAATGAAATGACTAGTTTTAAGTAAAAAATGAATCGATGAATTCGAGCTCG
ccc2Δ– fw	TTCGTAAATTTTGCGGCCAAGGAGTTGAGGTGTTTAATACTTAAAACGAACGTACGCTGCAGGTCGAC
ccc2Δ– rev	AAATCTATATGCTCGTGGATTTTTTTAAATAAATTAGACTTACCTGTTATATCGATGAATTCGAGCTCG

Supplementary Table S3.3 – *Primers used for checking the success of the transformation*

Strain	Primers
Kan B1	TGTACGGGCGACAGTCACAT
ctr1Δ– fw	GGCGGCGACTCAAATTACAT
ctr3Δ– fw	ACATTCTCTTCACTTCTCCGATAGAC
fre1Δ– fw	TTTCTCGCATATTCACGCCG
fre2Δ– fw	CCAAAGCTTATGAAACCCAACG
ccc2Δ– fw	CGAGACCTTTTGCACACACT

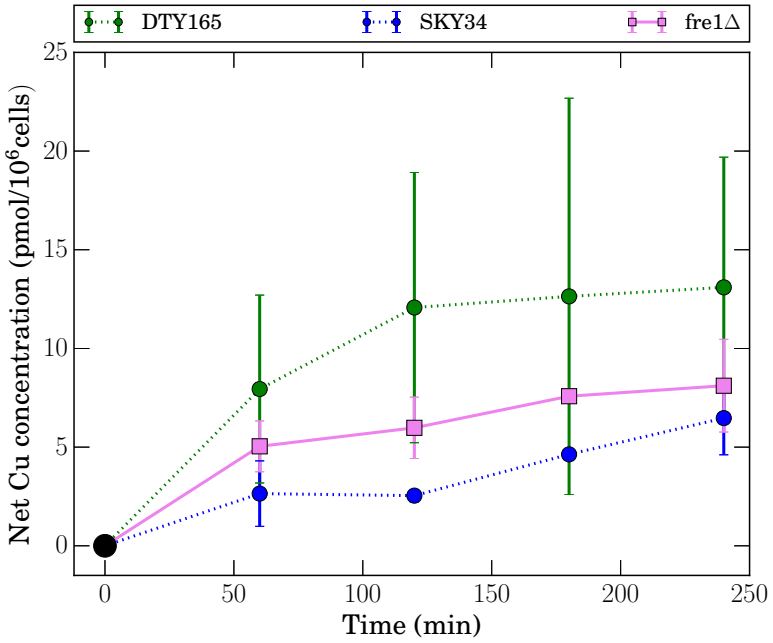
Supplementary Table S3.4 – ***Long term external reproductibility of the copper isotopic measurements.***

The Cu isotopic composition of several samples were run during independent sessions. The average Cu isotope composition and the standard deviation are reported.

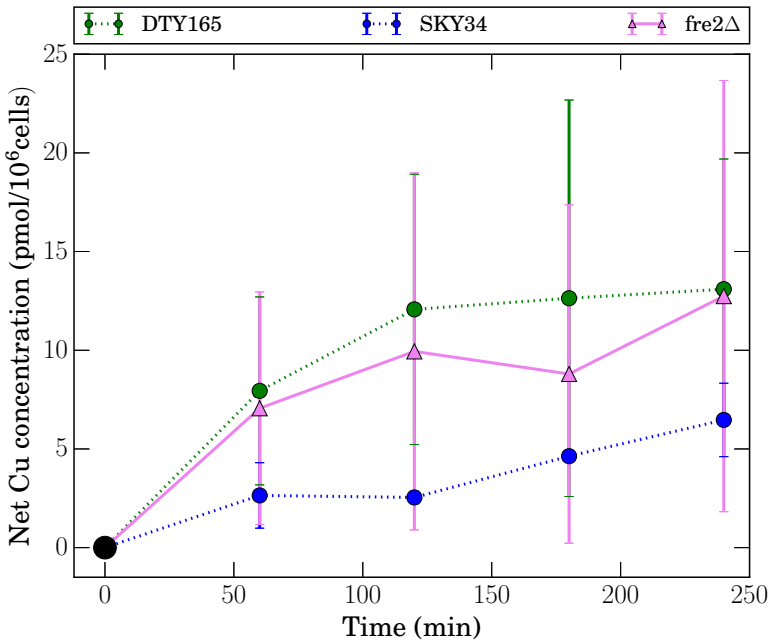
Sample	Session date	δ^{65}Cu (‰)	Average δ^{65}Cu	S.D.
Exp.1–DTY 165 – t=60 min.	09/09/16	-1.55 -1.59 -1.59	-1.58	0.02
	07/11/16	-1.58 -1.6		
Exp.1 – DTY 165 – t=120 min.	09/09/16	-1.72 -1.69 -1.67	-1.70	0.02
	07/11/16	-1.7		
Exp. 1 – SKY 34 – t=60 min.	09/09/16	-1.42 -1.47 -1.44	-1.44	0.03
	07/11/16	-1.4 -1.45		
Exp.1 – ctr1Δ– t=60 min.	09/09/16	-1.90 -1.86 -1.87	-1.88	0.02
	07/11/16	-1.90		
Exp.1 – ctr1Δ– t=240 min.	25/08/16	-1.75 -1.73 -1.79	-1.76	0.02
	08/11/16	-1.81 -1.76 -1.77 -1.75		
	09/11/16	-1.75 -1.75		
	10/11/16	-1.75 -1.76		
Exp.2 – DTY 165 – t=240 min.	08/11/16	-1.96 -1.98	-1.96	0.03
	10/11/16	-2.03		
	24/01/17	-1.94 -1.97 -1.91 -1.97		
	25/01/17	-1.94 -1.96 -1.99		
	30/01/17	-1.96		

Supplementary information – Additional tables and figures

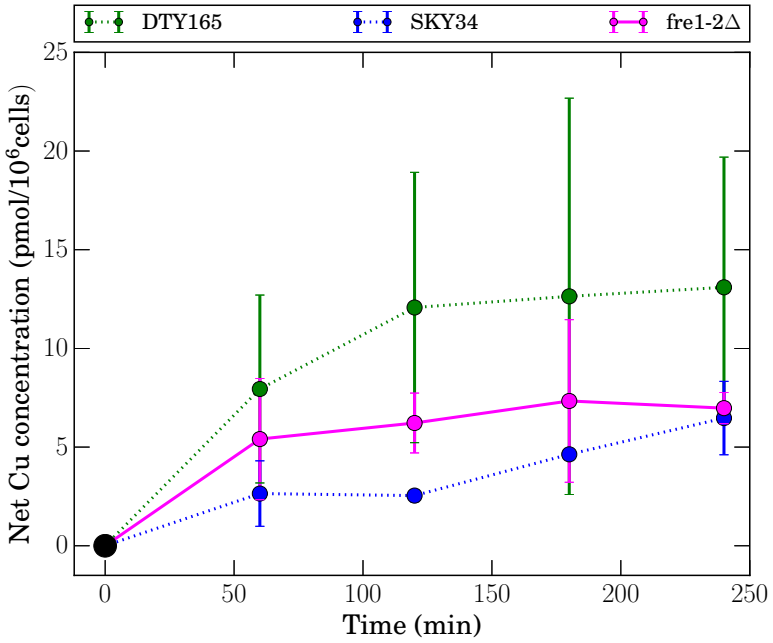
(a)



(b)



(c)



Supplementary Figure S3.1 – ***Temporal copper concentration evolution in the two single reductase knockout, the wild type and the SKY34*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains.***

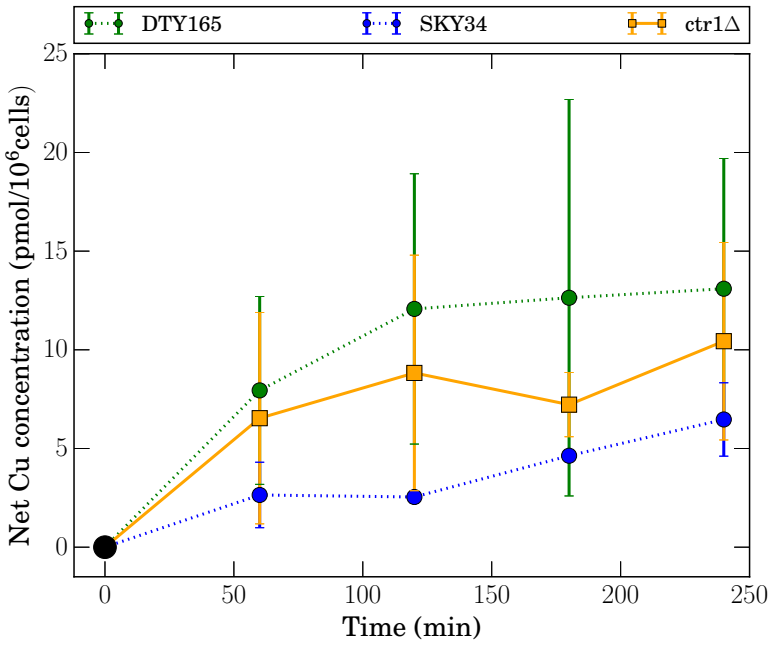
Reported values are the average and standard deviation of three independent experiments.

(a) *Temporal Cu concentration evolution in the fre1Δ strain (pink squares) compared to the wild type (DTY165, green circles) and the SKY34 strain (blue circles).*

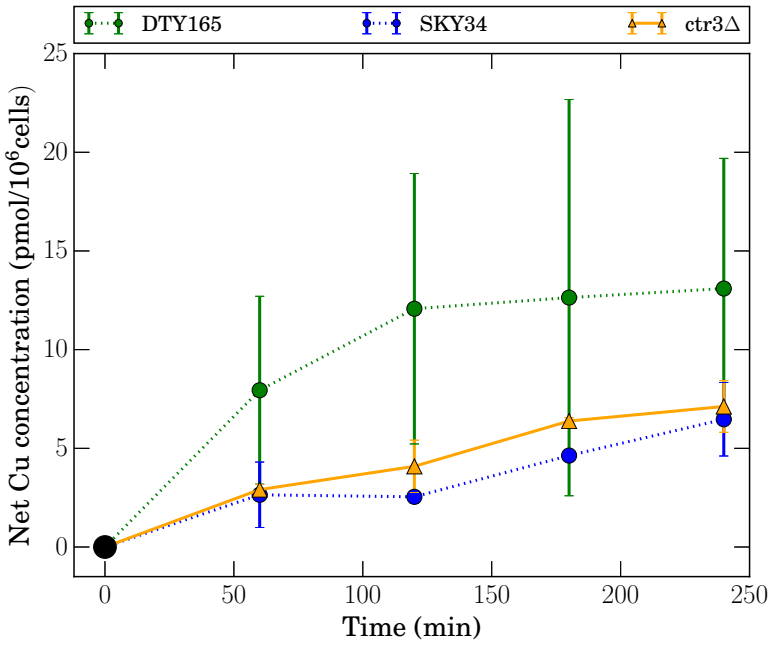
(b) *Temporal Cu concentration evolution in the fre2Δ strain (pink triangles) compared to the WT and the SKY34 strain.*

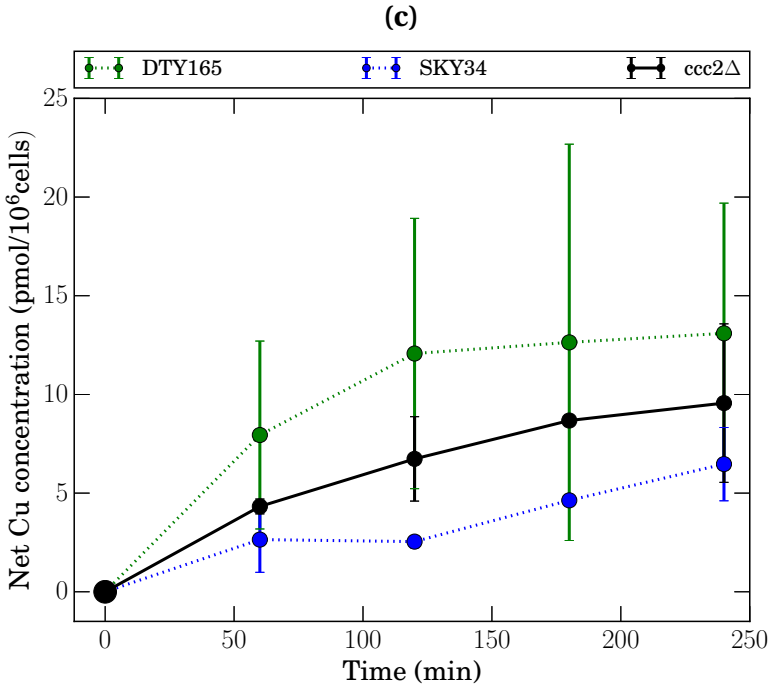
(c) *Temporal Cu concentration evolution in the fre1-2Δ strain (magenta circles) compared to the WT and the SKY34 strain.*

(a)


DTY165
SKY34
ctr1Δ
Net Cu concentration (pmol/10^6cells)
Time (min)
0
5
10
15
20
25
0
50
100
150
200
250

(b)


DTY165
SKY34
ctr3Δ
Net Cu concentration (pmol/10^6cells)
Time (min)
0
5
10
15
20
25
0
50
100
150
200
250



Supplementary Figure S3.2 – ***Temporal copper concentration evolution in the two single high-affinity copper importer knockout, in the copper exporter knockout, the wild type and the SKY34*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains.***

Reported values are the average and standard deviation of three independent experiments.

(a) *Temporal Cu concentration evolution in the ctr1Δ strain (orange squares) compared to the wild type (DTY165, green circles) and the SKY34 strain (blue circles).*

(b) *Temporal Cu concentration evolution in the ctr3Δ strain (orange triangles) compared to the wild type and the SKY34 strain.*

(c) *Temporal Cu concentration evolution in the ccc2Δ (black circles) strain compared to the wild type and the SKY34 strain.*

Supplementary Table S3.5 – *Qualitative temporal evolution of the copper importers amount in the membrane, reductase ability, and copper isotopic composition measured in the* Saccharomyces cerevisiae *strains.*

The amount of protein in the membrane of the different knockout strains during the experiment have been compared to the WT amount. We chose to represent three time period. The first time period (1), represent the first minutes of Cu uptake when proteins are repressed at the protein level. The second (2) time period, is for the first 120 min. of uptake when the transcription of genes that code Cu importers or reductases are repressed. The third (3) time period (from 120 to 240 min.), is for the period where the amount of HAIp in the membrane is negligible [Gross et al., 2000; Heredia et al., 2001; Jungmann et al., 1993; Ooi et al., 1996]. The different arrows represents the regulation of the considered transporters: (↓) quick protein repression, (↘) repression of the gene transcription, (→) No regulation, (0) absence of the protein in the cell membrane, (∅) absence of the gene. We have also represented the reductases activity (RA) measured with the reductase assay (see 3.2.1.4 for details). Finally the Copper Isotopic Phenotype (CuIP) measured during uptake experiments (see 3.2.1.3 for details) is also reported.

Strain	Importers									Exporters		RA (µmol/l.min)	CuIP
	Ctr1p			Ctr3p			LAIp			Ccc2p	LAEp		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)				
DTY 165	WT			WT			WT			WT	WT	3.62 ± 0.12	-1.51 ± 0.18‰
	↓	↘	0	↘	↘	0	→	→	→				
SKY 34	∅			<< WT			WT			WT	WT	1.25 ± 0.03	-0.12 ± 0.21‰
ctr1Δ	∅			> WT			WT			WT	WT	Not measured	-1.22 ± 0.24‰
ctr3Δ	> WT			∅			WT			WT	WT	Not measured	-0.76 ± 0.23‰
ccc2Δ	< WT			< WT			WT			∅	WT	Not measured	-1.05 ± 0.24‰
fre1Δ	Unknown			Unknown			Unknown			Unknown	Unknown	2.85 ± 0.46	-0.65 ± 0.21‰
fre2Δ	Unknown			Unknown			Unknown			Unknown	Unknown	4.91 ± 0.62	-1.27 ± 0.33‰
fre1-2Δ	Unknown			Unknown			Unknown			Unknown	Unknown	1.23 ± 0.65	-1.49 ± 0.09‰

Supplementary information – Numerical calculation

Numerical calculation of the copper isotopic composition associated to each copper importer

The aim of this model was to calculate the effect of the Cu transporters on the δ^{65}Cu of cell. We used the experimental data to solve the isotopic mass balance equation:

$$\delta^{65}Cu_{cell} = \varphi_{in}^{strain,\Delta t} \times \delta^{65}Cu_{in}^{strain} - \varphi_{out}^{strain,\Delta t} \times \delta^{65}Cu_{out}^{strain} \quad \text{(S3.1)}$$

where φ_{in}^{strain} is the relative copper fluxes through the different Cu importers during a given time interval (Δt), φ_{out}^{strain} is the relative copper fluxes through the different Cu exporters during a given time interval, $\delta^{65}Cu_{in}$ and $\delta^{65}Cu_{out}$ the isotopic fractionation due to Cu import and Cu export respectively. Because of proteins regulation, the amount of

Cu transporters in the membrane change with time. Consequently, the relative copper fluxes through one Cu transporter (φ) change with time. Therefore, the equation S3.1 had to be solved for a given time interval (Δt) where the $\varphi^{\Delta t}$ associated to each Cu transporter can be considered as constant. The relative Cu fluxes through a Cu importer "i" for a given time interval (Δt) depends on the relative amount of Cu imported by the protein during this time interval which is equivalent to the concentration variation during this time interval ($C_i^{\Delta t}$) divided by the total amount of Cu imported by the cell ($\sum_j C_j^{\Delta t}$):

$$\varphi_i^{\Delta t} = \frac{C_i^{\Delta t}}{\sum_j C_j^{\Delta t} = C_{cell}} \tag{S3.2}$$

Cu flux (Φ_i) through a transporter during a time interval Δt is equal to $\Phi_i = \frac{C_i^{\Delta t}}{\Delta t}$. During this time interval, the total Cu flux is equal to the sum of Cu flux across the different transporters ($\sum_j \Phi_j^{\Delta t}$). Therefore, we have:

$$\varphi_i^{\Delta t} = \frac{\Phi_i \Delta t}{\Delta t \times \left(\sum_j \Phi_j^{\Delta t}\right)} = \frac{\Phi_i}{\sum_j \Phi_j^{\Delta t}} \tag{S3.3}$$

We used the measured Cu concentration to estimate the $\varphi_{HAIp}^{\Delta t}$. According to equation S3.3 and S3.7, the equation S3.2 can be written for a given time interval as:

$$\varphi_i^{\Delta t} = \frac{\Phi_i^{\Delta t}}{\sum_j \Phi_j^{\Delta t} = \Phi_{HAI}^{\Delta t} + \Phi_{LAIp}^{\Delta t}} = \frac{\Phi_i^{\Delta t}}{\Phi_{cell}^{\Delta t}} \tag{S3.4}$$

To do our calculations, the $\varphi_i^{\Delta t}$ and therefore Cu fluxes ($\Phi_i^{\Delta t}$) associated to Cu importers has to be determined. In our experiments, the cell Cu concentration and therefore Cu flux were measured. At the beginning of the experiments (e.g. at t = 0min.), all Cu importers are present in the membrane. As a consequence, the cell Cu flux is equal to the sum of the Cu flux across those importers:

$$\Phi_{cells}^{\Delta t} = \Phi_{HAIp}^{\Delta t} + \Phi_{LAIp}^{\Delta t} = \Phi_{Ctr1p}^{\Delta t} + \Phi_{Ctr3p}^{\Delta t} + \Phi_{LAIp}^{\Delta t} \tag{S3.5}$$

In this study we only knocked out the different genes and did not change the genes coding Cu transporters. Hence, the Cu proteins structure that is probably involved in Cu fractionation [Cadiou et al., 2017; Fujii et al., 2014] does not change among the different tested strains. Therefore, the $\delta^{65}Cu_{protein}^{strain}$ associated to each protein is independent of the strain and can be written in equation S3.1 as $\delta^{65}Cu_{protein}$.

During the first two hours of our experiments, Cu concentration increased and there-

fore Cu uptake was much higher than Cu export: we thus neglected Cu export in our calculations. According to Cadiou et al. [2017], Cu reduction has no effect on cell δ^{65}Cu: we did not consider Cu reduction in our calculations. In *S. cerevisiae* cells, Cu enters cell through high-affinity Cu-importers (HAIp: Ctr1p and Ctr3p, [Dancis et al., 1994a; Knight et al., 1996]) and low-affinity Cu importers (LAIp, Hasset et al. [2000]; Liu et al. [1997]). The goal of this model was to calculate the effect of each of those proteins on the cell δ^{65}Cu by solving the simplified isotopic mass balance equation for each considered strain:

$$\delta^{65}Cu_{cell}^{strain} = \overbrace{\varphi_{Ctr1p}^{strain,\Delta t} \times \delta^{65}Cu_{Ctr1p} + \varphi_{Ctr3p}^{strain,\Delta t} \times \delta^{65}Cu_{Ctr3p}}^{\text{HAIp}} + \overbrace{\varphi_{\text{LAI}p}^{strain,\Delta t} \times \delta^{65}Cu_{\text{LAI}p}}^{\text{LAIp}} \tag{S3.6}$$

To determine the δ^{65}Cu associated to each Cu importer, we calculated the cell δ^{65}Cu with variable $\varphi_{imp}^{\Delta t}$ and $\delta^{65}Cu_{imp}$ values. According to our biological and isotopic comprehension of the system, we estimated an interval where $\varphi_{imp}^{\Delta t}$ and $\delta^{65}Cu_{imp}$ values should fall. This interval is named "calculation interval". The values tested in this interval were used in equation S3.6. We calculated the difference (named *diff*) between the numerical solution and the measured $\delta^{65}Cu_{plateau}$. The goal of the calculation was to minimize *diff*. Therefore, we compared the *diff* value to a given value (R). R value was always chosen to be as close as possible to 0‰. We chose it under 0.05‰ which is the instrumental error obtained with the MC-ICP-MS. To minimize the time of calculation and obtain a sufficent number of solution (between 5 and 100), we chose lower R values when we increased the number of tested φ and δ^{65}Cu values. We chose R values from 0.0025 to 0.05‰. Finally, when the *diff* value was under R, we considered the δ^{65}Cu values associated to the different Cu importers as probable solution of equation S3.6.

To avoid the potential effect of other proteins than Cu importers such as metalochaperone on the Cu import, we decided to do the calculations in isogenic strains, hence SKY34 and MPY17 were not considered in the calculation. In addition, since the Cu uptake mechanism is not well constrained in the fre1-2Δ strain, we did not consider this strain in our calculations. In the ccc2Δ strain, MAC1 is down-regulated and consequently CTR1 and CTR3 transcription are down regulated [Gudin, 2008]. In our calculations, we considered the ccc2Δ strain as a high-affinity Cu importers knockdown strain. In this strain, Ctr1p and Ctr3p are still present but the associated $\varphi^{\Delta t}$ are lower than in the wild type.

In order to solve the equation S3.6, the $\varphi^{\Delta t}$ associated to each Cu importer has to be determined. Cu that actively enter *S. cerevisiae* cell enter through the two high-affinity Cu importer (HAIp) and through low-affinity Cu importers (LAIp):

$$\varphi_{cell}^{\Delta t} = 1 = \varphi_{HAIp}^{\Delta t} + \varphi_{LAIp}^{\Delta t} \tag{S3.7}$$

Cu that enters cells through high-affinity Cu importers goes through Ctr1p and Ctr3p:

$$\varphi_{HAIp}^{\Delta t} = \varphi_{Ctr1p}^{\Delta t} + \varphi_{Ctr3p}^{\Delta t} \tag{S3.8}$$

According to equation S3.7, we have for a given $\varphi_{HAIp}^{\Delta t}$:

$$\varphi_{LAIp}^{\Delta t} = 1 - \varphi_{HAIp}^{\Delta t} \tag{S3.9}$$

According to equation S3.8, we have for a given $\varphi_{HAIp}^{\Delta t}$ and a given $\varphi_{Ctr1p}^{\Delta t}$:

$$\varphi_{Ctr3p}^{\Delta t} = \varphi_{HAIp}^{\Delta t} - \varphi_{Ctr1p}^{\Delta t} \tag{S3.10}$$

Consequently, equation S3.6 can be solved with a given $\varphi_{HAIp}^{\Delta t}$ and $\varphi_{Ctr1p}^{\Delta t}$. However, if all the possible φ values (*i.e.* from 0 to 1) were tested the numerical model did not converge toward solutions. Therefore, the φ values were estimated with the experimental data.

In order to estimate the φ values with experimental data, the regulation of Cu importers have to be understand. High-affinity Cu importers are tightly regulated as a function of free Cu concentration in the cell. When cells are cultivated in a medium with a high Cu concentration, high-affinity Cu importers are repressed both at the transcription level through the transcription factor MAC1 and at the proteins level [Keller et al., 2005; Liu et al., 2007; Ooi et al., 1996; Peña et al., 2000; Wu et al., 2009]. When Cu is added to the medium, the transcription of high-affinity Cu importers is repressed within one or two hours and the protein repression occurs within the first minutes. Thus, we considered that Cu import through high-affinity Cu importers was negligible after two hours of Cu uptake *i.e.* $\Phi_{HAIp}^{120-240} = 0$. Consequently, $\Phi_{cells}^{120-240} = \Phi_{LAIp}^{120-240}$. Low-affinity Cu importers are also Zn and Fe importers hence are not regulated by the Cu concentration. Consequently, we considered that Cu flux through low-affinity Cu importers was constant through time ($\Phi_{LAIp}^{\Delta t} = cte$). Thanks to that relation, Cu flux through low-affinity Cu importers during experiments can thus be calculated:

$$\Phi_{LAIp} = \Phi_{cell}^{120-240} \tag{S3.11}$$

where $\Phi_{cell}^{120-240}$ is the average cell Cu flux between 120 and 240 min. measured during our experiments. With equation S3.11, we can re-write equation S3.5 for the first hour of experiments:

$$\Phi_{cell}^{0-60} = \Phi_{HAIp}^{0-60} + \Phi_{LAIp} \tag{S3.12}$$

Thanks to equation S3.12, Cu flux through high-affinity Cu importers during the first

hour of Cu uptake can be estimated:

$$\Phi_{\mathrm{HAIp}}^{0-60} = \Phi_{\mathrm{cell}}^{0-60} - \Phi_{\mathrm{LAIp}} \tag{S3.13}$$

With equations S3.4 and S3.13 we can calculate the relative Cu fluxes through high-affinity Cu importers during the first hour of Cu uptake:

$$\varphi_{\mathrm{HAIp}}^{0-60} = \left(\frac{\Phi_{\mathrm{HAI}}^{0-60}}{\Phi_{\mathrm{cell}}^{0-60}}\right)_{\mathrm{strain}} = \left(\frac{\Phi_{\mathrm{cell}}^{0-60} - \Phi_{\mathrm{LAIp}}}{\Phi_{\mathrm{cell}}^{0-60}}\right)_{\mathrm{strain}} \tag{S3.14}$$

Equation S3.12 can be written for the first and second hours of Cu uptake. For the first and the second hours of Cu uptake in the wild type, we found respectively that 77% and 66% of the total imported Cu are imported through high-affinity Cu importers. It is important to notice that with the Cu concentration in the medium used during our experiments, high-affinity Cu importers regulation occurs mainly during the first hour of Cu uptake [Keller et al., 2005; Liu et al., 2007; Ooi et al., 1996; Peña et al., 2000; Wu et al., 2009]. Therefore, we chose the time interval [0-60min] for our calculations. The difference between Cu import during the first or the second hour of Cu uptake is lower than 10%. Consequently, we estimated that the relative Cu fluxes through high-affinity Cu importers is restricted in the interval of $\varphi_{\mathrm{HAIp}}^{0-60} \pm 0.1$. During our calculation, we tested high-affinity Cu importers φ values restricted in this interval.

As explained by equations S3.9 and S3.10, only $\varphi_{\mathrm{Ctr1p}}^{0-60}$ and $\varphi_{\mathrm{HAIp}}^{0-60}$ have to be determined to solve the isotopic mass balance equation (S3.6). Therefore, we have to determine which $\varphi_{\mathrm{Ctr1p}}^{0-60}$ values we wanted to test. We have no clue whether Cu is imported through Ctr1p or Ctr3p. Therefore, the relative Cu fluxes through Ctr1p is superior or equal to 0 and is inferior or equal to $\varphi_{\mathrm{HAIp}}^{0-60}$. Hence, in our calculations we tested $\varphi_{\mathrm{Ctr1p}}^{0-60}$ values from 0 to $\varphi_{\mathrm{HAIp}}^{0-60}$. With equations S3.7 and S3.8, and with a fixed $\varphi_{\mathrm{HAIp}}^{0-60}$ and a fixed $\varphi_{\mathrm{Ctr1p}}^{0-60}$, we calculated $\varphi_{\mathrm{Ctr3p}}^{0-60}$ and $\varphi_{\mathrm{LAIp}}^{0-60}$.

To solve the isotopic mass balance equation different δ^{65}Cu values associated to each importer has to be tested. In the different experiments, we always found that the cell δ^{65}Cu is between 0 and -1.5‰. Moreover, the *ab-initio* calculation estimated that Cu binding to Ctr1p or Ctr3p [Cadiou et al., 2017] induce a Cu isotopic fractionation equal to -0.78‰ and -0.73‰ respectively. Moreover, the effect of metalothionein and SOD1 on the Cu isotopic fractionation have been measured *in vitro* and is equal to -2.1 and -1.6‰ respectively [Zhu et al., 2002]. Therefore, we considered that the effect of each Cu importer on the cell δ^{65}Cu is restricted to -2‰ to 0‰. The different calculation intervals used in the WT model are summarized in table S3.6. In those intervals we used a calculation step equal to the difference between the two extremum of the interval divided by the precision p (p varies from 10 to 50). We obtained a range of p potential values. Those values were all tested in equation S3.6 and are called iteration variable. $\varphi_{\mathrm{Ctr3p}}^{0-60}$ and $\varphi_{\mathrm{LAIp}}^{0-60}$ were fixed with

φ^{0-60}_{Ctr1p} and φ^{0-60}_{LAIp} and were not used in the iteration calculation ("no iterative" values).

Supplementary Table S3.6 – The different calculation interval used to determine the copper isotopic fractionation associated to each importer in the wild type strain.

The net Cu flux across high-affinity importers was calculated with the measured Cu flux (Φ, highlighted in yellow). The net Cu flux across LAIp and Ctr3p can be calculated with the net Cu flux across high-affinity importers and Ctr1 (Equations S3.9 and S3.10). δ^{65}Cu values were estimated to be in between -2 and 0‰.

	Variable	Variable values		
		Formula	Calculation interval	Iterative
NET Cu FLUXES	φ_{HAIp}	$\varphi^{0-60}_{HAIp} = \frac{\Phi^{0-60}_{cell} - \Phi_{LAIp}}{\Phi^{0-60}_{cell}}$	$\left[\varphi^{0-60}_{HAIp} - 0.1\ ;\ \varphi^{0-60}_{HAIp} + 0.1\right]$	Yes
	φ^{0-60}_{Ctr1p}		$\left[0\ ;\ \varphi^{0-60}_{HAIp}\right]$	Yes
	φ^{0-60}_{Ctr3p}	$\varphi^{0-60}_{Ctr3p} = \varphi^{0-60}_{HAIp} - \varphi^{0-60}_{Ctr1p}$		No
	φ^{0-60}_{LAIp}	$\varphi^{0-60}_{LAIp} = 1 - \varphi^{0-60}_{HAIp}$		No
δ^{65}Cu	$\delta^{65}Cu_{Ctr1p}$		$[-2\ ;\ 0]$	Yes
	$\delta^{65}Cu_{Ctr3p}$		$[-2\ ;\ 0]$	Yes
	$\delta^{65}Cu_{LAIp}$		$[-2\ ;\ 0]$	Yes

We tested p values of φ_{HAIp}, φ_{Ctr1p}, $\delta^{65}Cu_{Ctr1p}$, $\delta^{65}Cu_{Ctr3p}$ and $\delta^{65}Cu_{LAIp}$ restricted in the different calculation interval. We used those values to calculate the WT δ^{65}Cu with equation S3.6 and compared it to the $\delta^{65}Cu_{plateau}$ measured in the WT. When the difference (*diff*) was under the error (R) value, we obtained three sets of solution for $\delta^{65}Cu_{Ctr1p}$, $\delta^{65}Cu_{Ctr3p}$, and $\delta^{65}Cu_{LAIp}$, respectively. We named those sets of solutions as $sol\left(\delta^{65}Cu_{Ctr1p}\right)^{WT}$, $sol\left(\delta^{65}Cu_{Ctr3p}\right)^{WT}$, and $sol\left(\delta^{65}Cu_{LAIp}\right)^{WT}$. At the end of the calculation, we obtained a set of potential δ^{65}Cu values associated to each Cu importers which match the WT values. This set is named sol_{WT} and is define as:

$$sol_{WT} = \left[sol\left(\delta^{65}Cu_{Ctr1p}\right)^{WT}; sol\left(\delta^{65}Cu_{Ctr3p}\right)^{WT}; sol\left(\delta^{65}Cu_{LAIp}\right)^{WT}\right] \quad \text{(S3.15)}$$

The aim of the model is to understand the effect of Cu importers on the cell δ^{65}Cu in all strains. Hence, we first tested the potential sol_{WT} δ^{65}Cu values in Cu importers knockout strains (ctr1Δ and ctr3Δ). We estimated that the relative Cu fluxes through high-affinity Cu importer with the same method as the one used for the WT. For high-affinity Cu importer knockout mutants, we obtained a smaller number of solution (sol_{imp-ko}) than for the WT.

Finally, we tested the sol_{imp-ko} values to solve the isotopic mass balance equation

for the fre1Δ strain, the fre2Δ strain and the ccc2Δ strain. The effect of a mutation in Cu reductases or Cu exporter gene on the Cu uptake through high-affinity Cu importers is hard to decipher. Therefore, the calculation interval for the relative Cu fluxes through high-affinity Cu importers was [0,1]. We obtained a small number of solution (less than an 100) for δ^{65}Cu values associated to each importer. Those values matched the experimental data for all single mutant isogenic strains. The different δ^{65}Cu values converged to solutions with a maximum standard deviation of 0.15‰ (Figure S3.3). As explained before, we did not use the nonisogenic strains (SKY34 and MPY17) and the fre1-2Δ strain in our calculation.

To check the model sensibility on the minimal δ^{65}Cu values (*i.e.* -2‰) used for the calculation we have done calculations with a δ^{65}Cu interval associated to each Cu importers from -2.5‰ to 0‰. We obtained similar solution in this interval (-1.51±0.14 for Ctr1p, -1.81±0.03 for Ctr3p and -0.01±0.07 for LAIp) than from the [-2 ; 0‰] interval (-1.49±0.16 for Ctr1p, -1.80±0.03 for Ctr3p and -0.04±0.05 for LAIp, Figure S3.3). Those results confirmed *a posteriori* the design of the [-2 ; 0‰] interval (Supplementary Table S3.7).

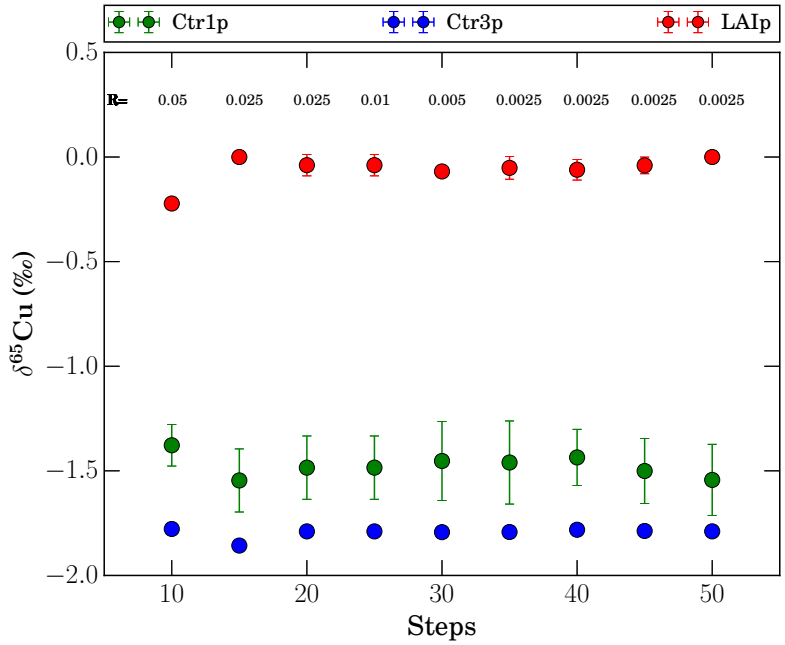
Supplementary Table S3.7 – Numerical solutions of the Cu fractionation factor associated to Cu import.

The values of the δ^{65}C*u and Cu fractionation factor* (α_{YM}) *associated to the Cu import through the two* S. cerevisiae *high-affinity Cu importers (Ctr1p and Ctr3) and low-affinity Cu importers (LAIp) were calculated with a numerical iterative model (see text for details). Two intervals were chosen for the potential* δ^{65}C*u values : [-2.5 ; 0 ‰] and [-2 ; 0 ‰].*

Cu importer	[-2.5 ; 0 ‰]		[-2 ; 0 ‰]	
	δ^{65}Cu (‰)	α_{YM}	δ^{65}Cu	α_{YM}
Ctr1p	-1.51±0.14	0.99849	-1.49±0.16	0.99851
Ctr3p	-1.81±0.03	0.99819	-1.80±0.03	0.99820
LAIp	-0.01±0.07	0.99999	-0.04±0.05	0.99996

Finally, we used the δ^{65}Cu values associated to each importer to calculate the relative Cu fluxes through Ctr1p and Ctr3p. We tested values from 0 to 1 to avoid *a priori* choices on the φ_{HAIp}^{0-60}. We obtained huge variation on the relative Cu fluxes through each high-affinity Cu importer but few for φ_{HAIp}^{0-60}. For the WT strain, the ctr1Δ and the ctr3Δ strains, we compared the calculated φ_{HAIp}^{0-60} against the measured φ_{HAIp}^{0-60} and found that the two values are equal ± 10% (Figure S3.4). We confirmed *a posteriori* the chosen confidence interval (10%).

We also plotted the calculated φ_{HAIp}^{0-60} as a function of the cell δ^{65}Cu measured *in vivo* (Figure S3.5). We found a linear relation between those two variable ($\delta^{65}Cu_{plateau} = -1.908 \times \varphi_{HAIp}^{0-60}$, $r^2 = 0.989$. We have also plotted the calculated φ_{HAIp}^{0-60} and the measured δ^{65}Cu for the two strains that were not considered in the calculation (*i.e.* fre1-2Δ in magenta and SKY34 in blue). Those two strains also verify the linear relation.



Supplementary Figure S3.3 – ***Effect of each copper importer on the cell copper isotopic composition.***

Reported values are the average and standard deviation of the different solutions of the calculation. We reported the solutions found for the δ^{65}Cu *associated to each Cu importer for a given error value (R) and a given step value. Calculation details are given in the text.*

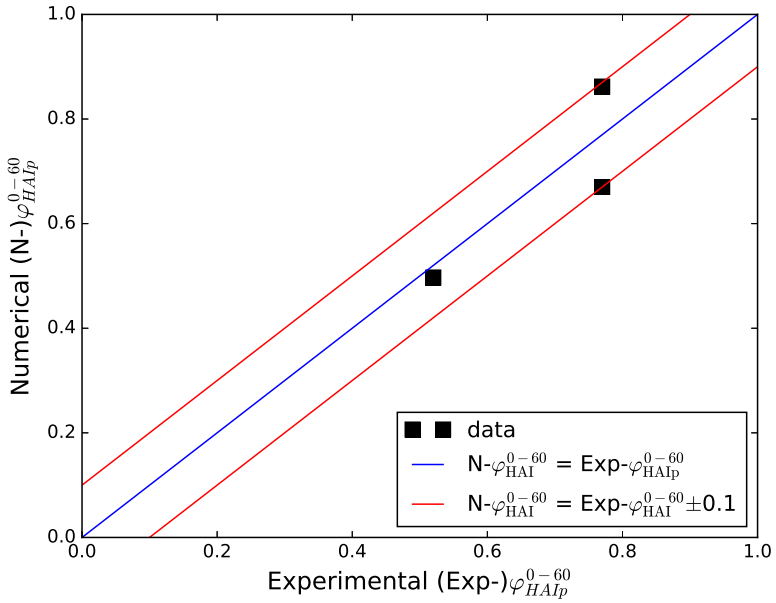
Finally, we calculated with the δ^{65}Cu associated to each Cu importer, the fractionation factor (α_{CM}) between the medium (M) and cells (C) for each Cu importer. The calculation of this value is described in [Allègre, 2008]:

$$\alpha_{CM}^{protein} = \frac{\exp\left(\delta^{65}Cu_{C}^{protein} - \delta^{65}Cu_{M}^{protein}\right)}{1000} \tag{S3.16}$$

Here we have done the experiment in an infinite medium. Therefore, the reported δ^{65}Cu is independent from the medium δ^{65}Cu. Hence, α_{CM} can be calculated as:

$$\alpha_{CM}^{protein} = \frac{\exp\left(\delta^{65}Cu_{C}^{protein}\right)}{1000} \tag{S3.17}$$

According to equation S3.17 and the numerical solution of the δ^{65}Cu associated to each Cu importer, we calculated the fractionation factor associated to each Cu importer. For Ctr1p, Ctr3p and LAIp we found that $\alpha_{CM}^{Ctr1p} = 0.9985$, $\alpha_{CM}^{Ctr3p} = 0.9982$ and $\alpha_{CM}^{LAIp} = 0.99996$ respectively.

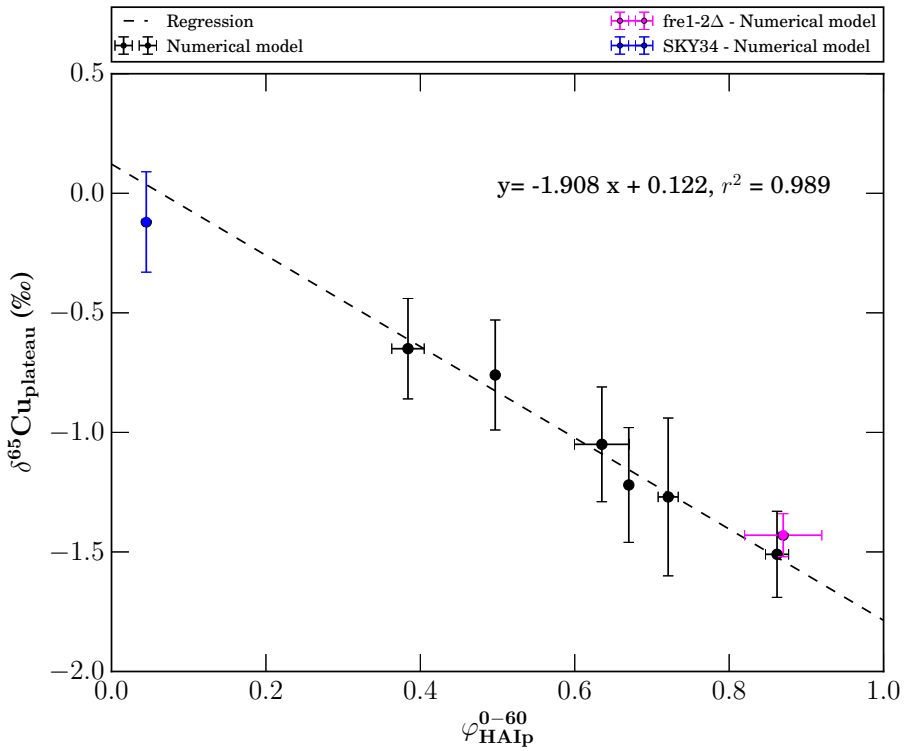


Supplementary Figure S3.4 – ***Comparison of the calculated and the measured values of the relative copper fluxes through high-affinity copper importers.***
We compared numerical (N-) and experimental (Exp-) values of the relative Cu fluxes through high-affinity Cu importer during the first hour of Cu uptake (φ_{HAIp}^{0-60}) in the wild type and in the Ctr knock-out strains. Numerical values of the φ_{HAIp}^{0-60} were calculated with the δ^{65}Cu associated to each importer obtained with the numerical modelisation (see text for details). The experimental φ_{HAIp}^{0-60} was calculated with Cu concentration measured in vivo. *If the data point (black) is on the blue line, experimental and numerical φ_{HAIp}^{0-60} are equivalent. If it falls between the two red lines, experimental and numerical φ_{HAIp}^{0-60} are equivalent within the 10% interval.*

Box model

Box model design. The numerical calculation of the δ^{65}Cu and the φ^{0-60} values associated to each Cu importer have to match our experimental data. To check that, we used those values to modelised the cell Cu concentration evolution and the δ^{65}Cu evolution with steady-state box model (ISOPyBOX). In this model, any box is defined by the mass of Cu in the box i (m_i^{Cu}), the mass of each Cu isotope in the considered box (m_i^{63} and m_i^{65}), the molar mass of the two Cu isotopes (M^{63} and M^{65}), and the Cu flux between two boxes ($\Phi_{i\rightarrow j}^{Cu}$). The isotope ratio ($R_i$) is defined as:

$$R_i = \left(\frac{m^{65}}{m^{63}}\right)_i \times \frac{M^{63}}{M^{65}} \tag{S3.18}$$



Supplementary Figure S3.5 – ***Average copper isotopic composition after 120 min. of copper uptake ($\delta^{65}Cu_{plateau}$) in the wild type and in the single knockout*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains as a function of the calculated relative copper fluxes through high-affinity copper importers during the first hour of uptake (φ^{0-60}_{HAIp}).***

Relative Cu fluxes through high-affinity importers (φ^{0-60}_{HAIp}) were calculated with a numerical model. We plotted this value against the average Cu isotopic composition after 120 min. of Cu uptake ($\delta^{65}Cu_{plateau}$) measured in the WT, the ctr1Δ, the ctr3Δ, the fre1Δ, the fre2Δ and the ccc2Δ strain (black). The plain line represent the linear regression. We also reported the $\delta^{65}Cu_{plateau}$ and the φ^{0-60}_{HAIp} of the SKY34 and the fre1-2Δ strains which where not used for the linear regression.

We also define the relative fractionation coefficient ($D^{65/63}_{i\rightarrow j}$) between ^{65}Cu and ^{63}Cu from the box i to j as:

$$D^{65/63}_{i\rightarrow j} = \frac{\Phi^{65}_{i\rightarrow j}/\Phi^{63}_{i\rightarrow j}}{m^{65}_i/m^{63}_i} \tag{S3.19}$$

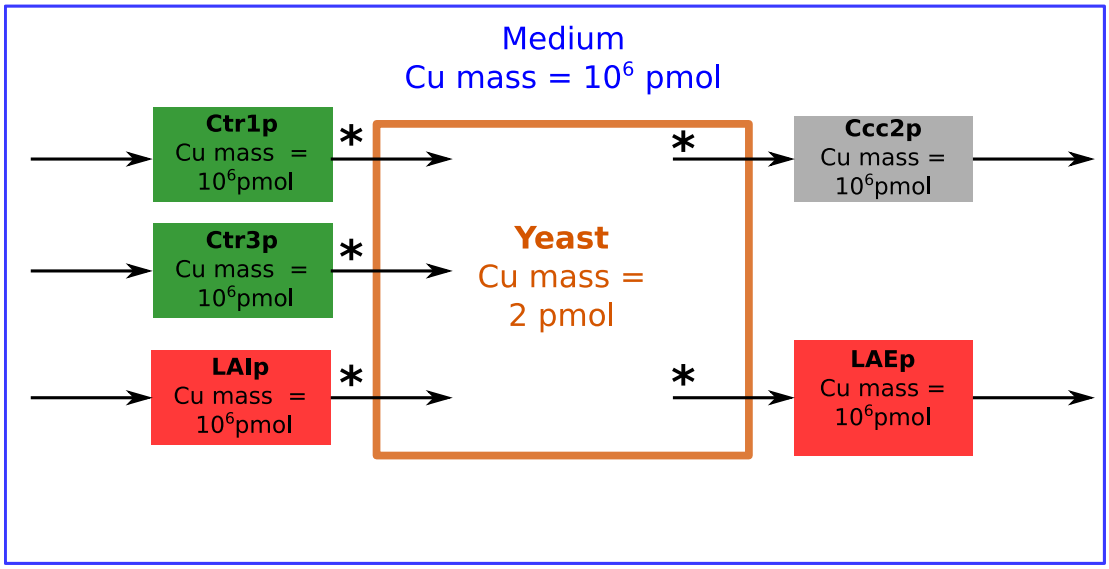
where $\Phi^{65}_{i\rightarrow j}$ and $\Phi^{63}_{i\rightarrow j}$ are respectively the Cu flux of ^{65}Cu and ^{63}Cu from the box i to the box j.

The aim of this box model is to predict Cu mass evolution and isotope ratios ($\frac{dR_i}{dt}$) evolution as a function of time in the different boxes. For each couple of boxes (i,j), we fix with a constant value the Cu mass fluxes ($\Phi^{Cu}_{i\rightarrow j}$), the initial Cu mass in the considered box (m^{Cu}_i) and the fractionation coefficients between those boxes ($D^{65/63}_{i\rightarrow j}$). Cu mass in the boxes are free to evolve with Cu fluxes. Note that this model can only be used with constant Cu flux. The isotope ratio at each time step is calculated with equation S3.20 in

all boxes:

$$\frac{dR_i}{dt} = R_i \sum_{j \neq i} \frac{\Phi^{Cu}_{i \to j}}{m^{Cu}_i} \left(1 - D^{65/63}_{i \to j}\right) + \sum_{j \neq i} \frac{\Phi^{Cu}_{j \to i}}{m^{Cu}_j} \left(D^{65/63}_{j \to i} R_j - R_i\right) \frac{m^{Cu}_j}{m^{Cu}_i} \quad \text{(S3.20)}$$

In order to use this box model with our experiments, the different boxes and the Cu mass in the different boxes have to be defined. In the previous study [Cadiou et al., 2017], we proved that Cu importers are responsible for Cu isotopic fractionation. Therefore, we did not consider Cu reductases in the box model. As described previously (Figure 3.1), Cu enter cells through three pathways: Ctr1p, Ctr3p and low-affinity importers (LAIp) and exit cells *via* Ccc2p and perhaps *via* low-affinity exporters (LAEp) (Figure 3.1). *In vivo*, no Cu passing through transporters stays into it. Cu transporters act as a Cu flux from medium to the cell. For modeling purposes, however, each Cu transporter has been defined as an independent box. The Cu mass in the transporters was fixed equal to Cu mass in the experimental medium and the Cu flux that enter the transporter is equal to the Cu flux that exit the transporter. We considered that isotopic fractionation occurs only at the interface between the transporter and the cell (stars in the Figure S3.6).



Supplementary Figure S3.6 – ***The different boxes used in the numerical box model.***
Arrows represents Cu-fluxes between the different boxes. The filled colored boxes represents the importers and exporters proteins. The "LAIp" box represent the Low-Affinity Importers and "LAEp" box represent the Low-Affinity Exporters. Cu mass in medium and yeast are the same as the one we used in uptake experiments. Stars represents the interface where we considered that Cu isotopic fractionation occurs.

Before using the box model, Cu fluxes and the initial mass of Cu in cells has to be determined. In the experimental data and in the modelisation, we chose the pmol/min and the pmol for Cu fluxes and Cu masses, respectively. In this study we normalized Cu concentration by 10^6 cells. In the box model we considered that 10^6 cells are one "yeast"

box. In our *in vivo* experiments, there are 10^6 cells in 0.1 mL of growth medium. Hence, we fix the Cu mass in the "medium" box with the mass of Cu in 0.1 mL of growth medium (e.g. 8×10^5pmol). The same value was used to set the Cu mass in “Cu-transporter” boxes. Finally, we fixed the Cu mass in cells as the Cu mass in 10^6 cells at the beginning of our experiments (e.g. 2 pmol for the WT).

The numerical modelisation of the δ^{65}Cu associated to each Cu importer has been performed during the first hour of Cu uptake. In the box model, we modeled the yeast δ^{65}Cu and Cu mass evolution during this phase. We calculated the Cu flux through high-affinity Cu importers (Φ_{HAIp}^{0-60}) with the modelized relative Cu fluxes through high-affinity Cu importers ($\left(\varphi_{HAIp}^{0-60}\right)_{model}$) calculated with the previous model and Cu flux during the first hour of uptake ($\left(\Phi_{cell}^{0-60}\right)_{measured}$) measured during our experiments:

$$\Phi_{HAIp}^{0-60} = \left(\varphi_{HAIp}^{0-60}\right)_{model} \times \left(\Phi_{cell}^{0-60}\right)_{measured} \tag{S3.21}$$

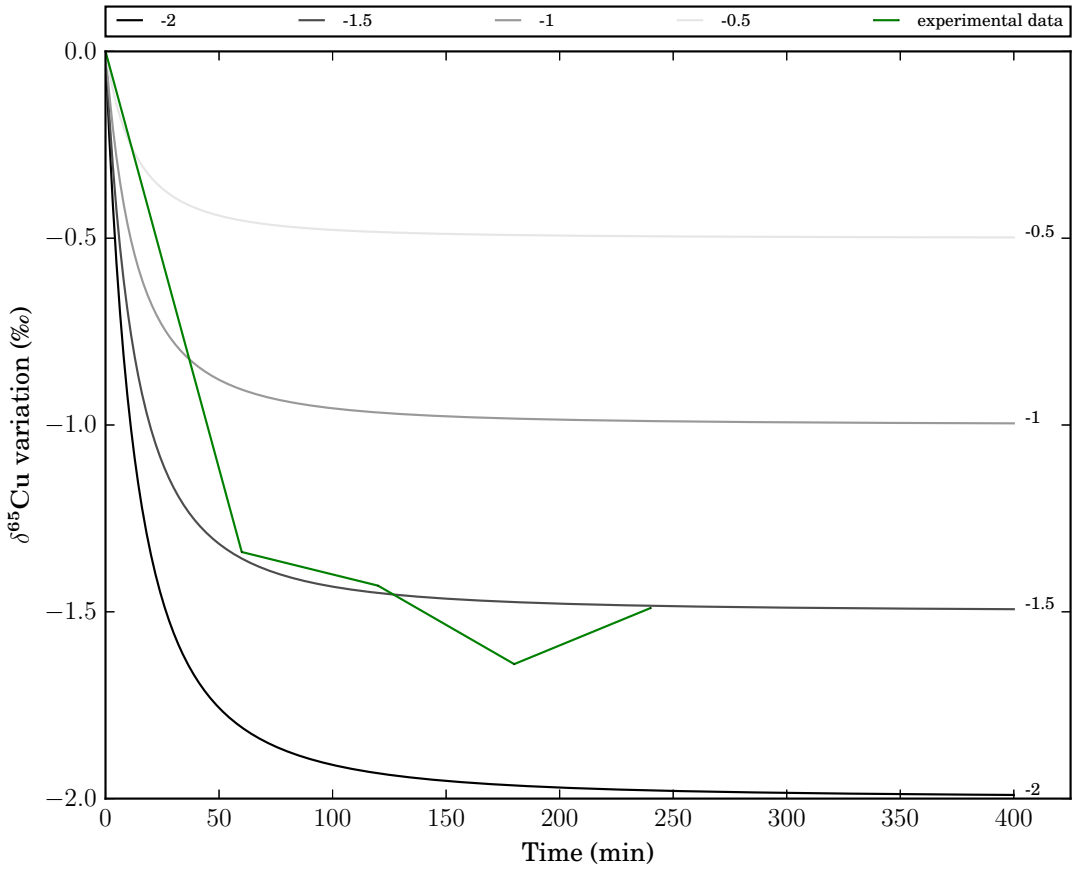
The Cu flux measured during the first hour of Cu uptake ($\left(\Phi_{cell}^{0-60}\right)_{measured}$) is equal to the sum of Cu flux through high- (Φ_{HAIp}^{0-60}) and low-affinity (Φ_{LAIp}^{0-60}) Cu importers. Consequently, the Cu flux through low-affinity importers can be calculated with equation S3.22:

$$\Phi_{LAIp}^{0-60} = \left(\Phi_{cell}^{0-60}\right)_{measured} - \Phi_{HAIp}^{0-60} \tag{S3.22}$$

Sensitivity tests. The goal of the box modeling is to check if we can reproduce the observed values with the calculated φ^{0-60} and δ^{65}Cu associated to Cu importers. The sensibility of the model to the box design, to the amount of Cu in the growth medium, to the initial amount of Cu in yeast and to the ratio between Cu import and Cu export has to be tested.

We tested a simplify box model design to check if the box model can reproduce the observed data. In this simple model, we considered that Cu enter cell and exit cells through one importer and one exporter. As expected with the experimental data, we considered that Cu fractionation is due to Cu import. Therefore, we tested different δ^{65}Cu values (from -0.5 to -2 ‰) associated to the unique importer (Figure S3.7). For a δ^{65}Cu equal to -1.5 ‰, we modelized a δ^{65}Cu evolution (in black) close to the observed δ^{65}Cu evolution in the WT (in green). The box-model is well-designed for our experiments.

We designed the mass of Cu in the medium and in the importers boxes with the Cu mass in the experimental medium. We considered in the experiment that the Cu amount in the medium is infinite compared to the cell. To verify that, we have tested the box model sensibility on the Cu mass in the medium. We did models with various Cu mass in the medium (from 8 to 8×10^9 pmol). We observed that the δ^{65}Cu evolution is independent of the mass of Cu in the medium as long as this value is above 80 pmol (Figure S3.8). We checked that the concentration of Cu used in our experiments is well above this value

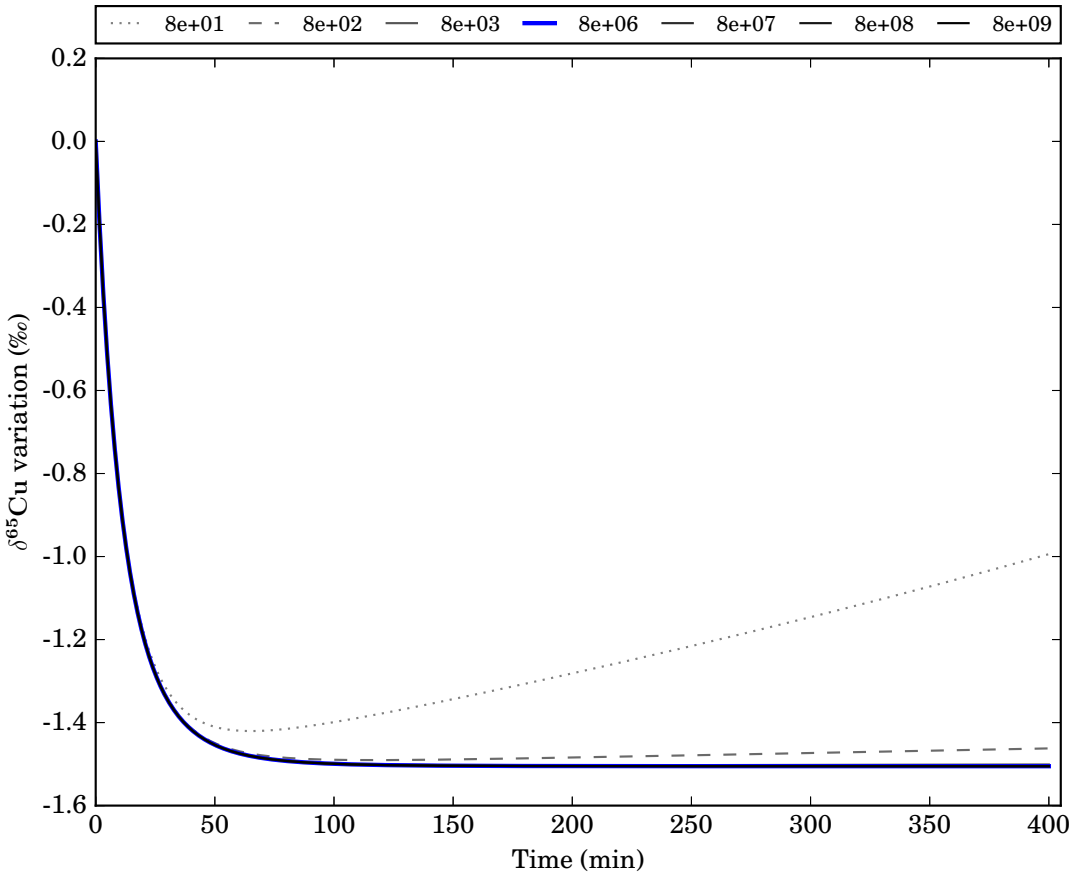


Supplementary Figure S3.7 – ***Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition (δ^{65}Cu) in a box model with only one copper importer.***
We tested different δ^{65}Cu associated to an unique Cu importer in a box model. The green line represent the δ^{65}Cu measured in vivo *in the wild type strain.*

and therefore the medium can be considered as infinite. Cu mass in the medium does not influence the δ^{65}Cu at equilibrium. We found the same results when we tested the model sensitivity to the mass of Cu in proteins boxes.

The initial Cu mass in the modelized cell was assesed with experimental values. However, those values are very variable with the different experiments and the different strains. Hence, we tested the effect of the initial Cu mass on the δ^{65}Cu evolution with the box model. We tested initial Cu mass from 1 to 10 pmol which is within the *in vivo* range. We observed that for each initial concentration the cell δ^{65}Cu reaches the same δ^{65}Cu value at equilibrium. The time when equilibrium was reached was higher when the initial Cu concentration in cell was higher (Figure S3.9). Thus, the δ^{65}Cu at equilibrium is independent from the initial Cu mass in cells.

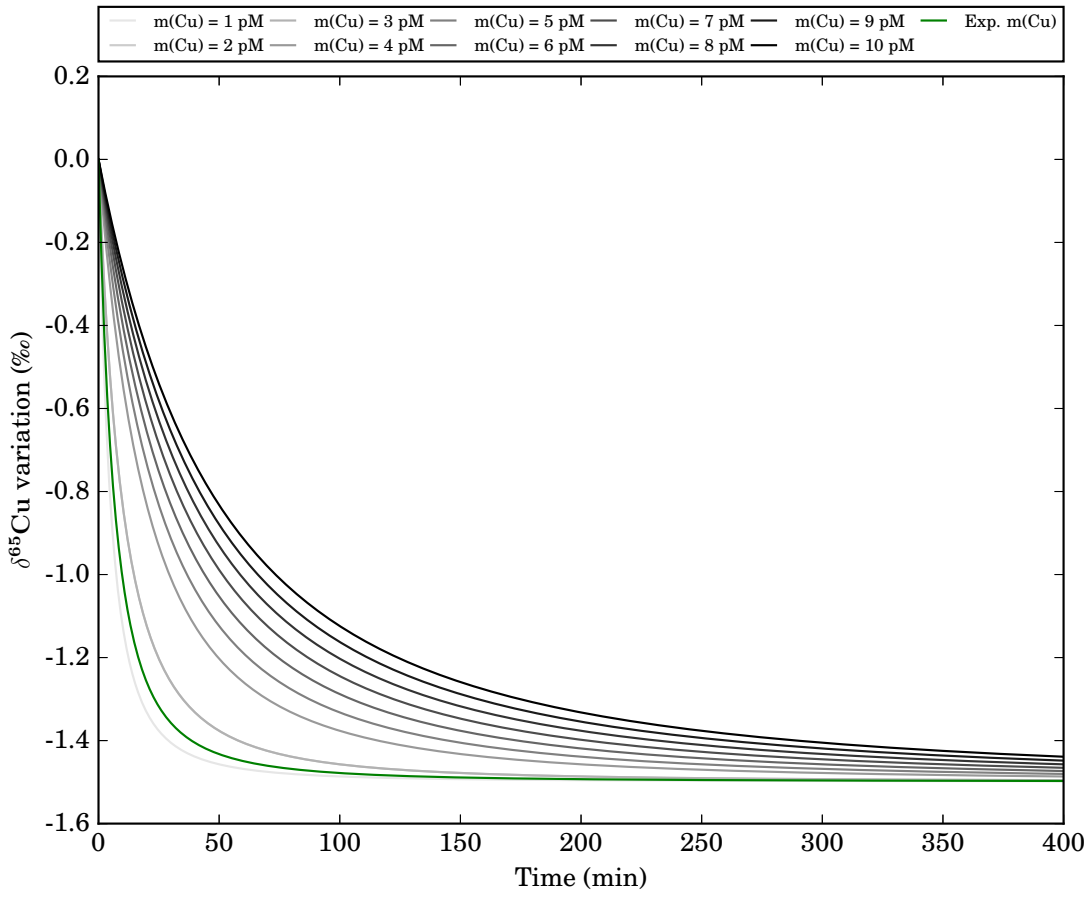
In the *in vivo* experiments we observed two phases of Cu uptake. During the first two hours of Cu uptake Cu concentration increases until it reaches a plateau. The box model have to reflect those observations. This model takes into account Cu influx and Cu exit.



Supplementary Figure S3.8 – ***Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition (*δ^{65}**Cu*****) with various copper concentration in the growth medium.***
Growth medium containing less than 80 pmol of Cu are represented with dashed lines. The blue line represents the δ^{65}*Cu evolution with the same Cu mass as the one used during experiments (*8e+06 pmol*). Temporal* δ^{65}*Cu variation with Cu mass above 8e+03 are all equivalent.*

During the first two hours of Cu uptake, Cu concentration increases and therefore Cu influx is higher than Cu exit fluxes. Here, we tested different ratio of Cu influx over Cu exit flux and compared it to the Cu concentration evolution in DTY165. We found that a ratio of 2 matches the experimental data during the first two hours of uptake (Figure S3.10). If we wanted to model the second phase of Cu uptake, a ratio of 1 has to be chosen. Here, we wanted to model the δ^{65}Cu evolution during the first phase of Cu uptake. Thus, we chose a ratio of 2 in our modelisation.

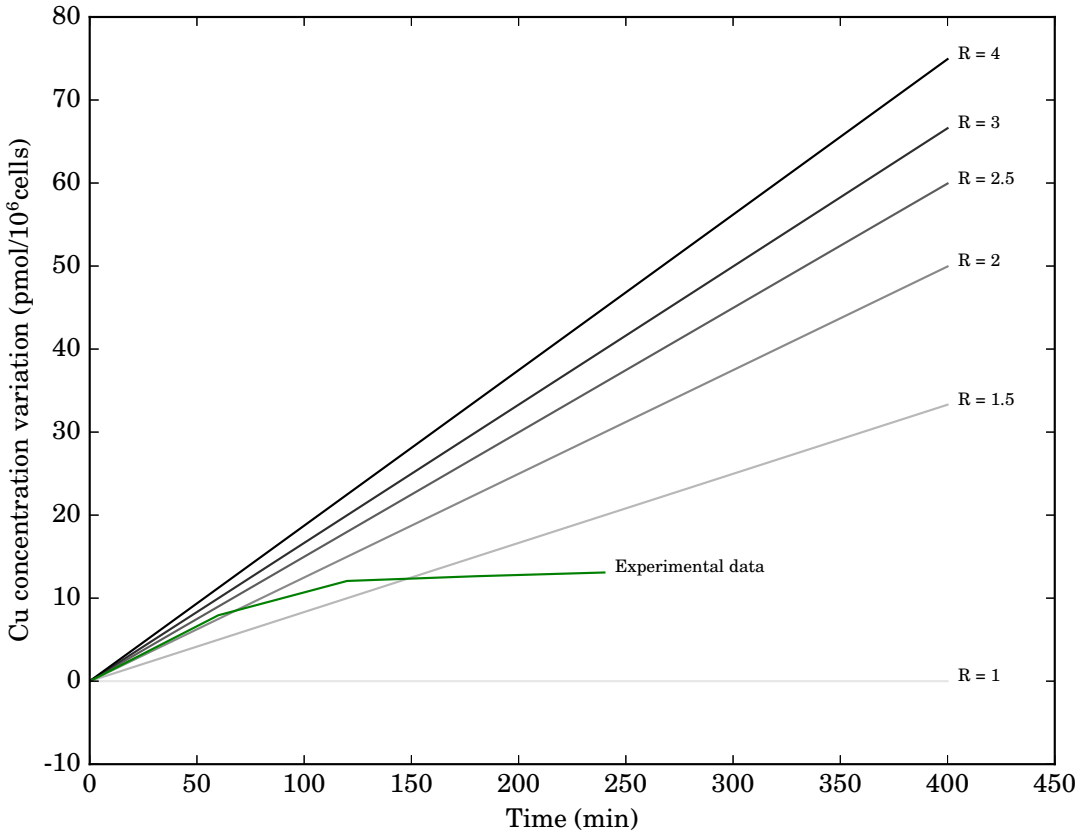
The previous model do not give us the relative Cu fluxes through Ctr1p or Ctr3p. For a given value of the Cu flux through high-affinity importers, x percent might enter cell through Ctr1p. We tested the different value of x in the box model (Figure S3.11). We observed that experimental values standard deviation is higher than the calculated δ^{65}Cu with the different "x" values. In the following, we chose a value of 50% to avoid *a priori* choices.



Supplementary Figure S3.9 – ***Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition (δ^{65}Cu) with various initial copper mass (m(Cu)) in the cell.***
One model have been performed with the initial Cu concentration measured in vivo *in the wild type strain (Exp. m(Cu), green).*

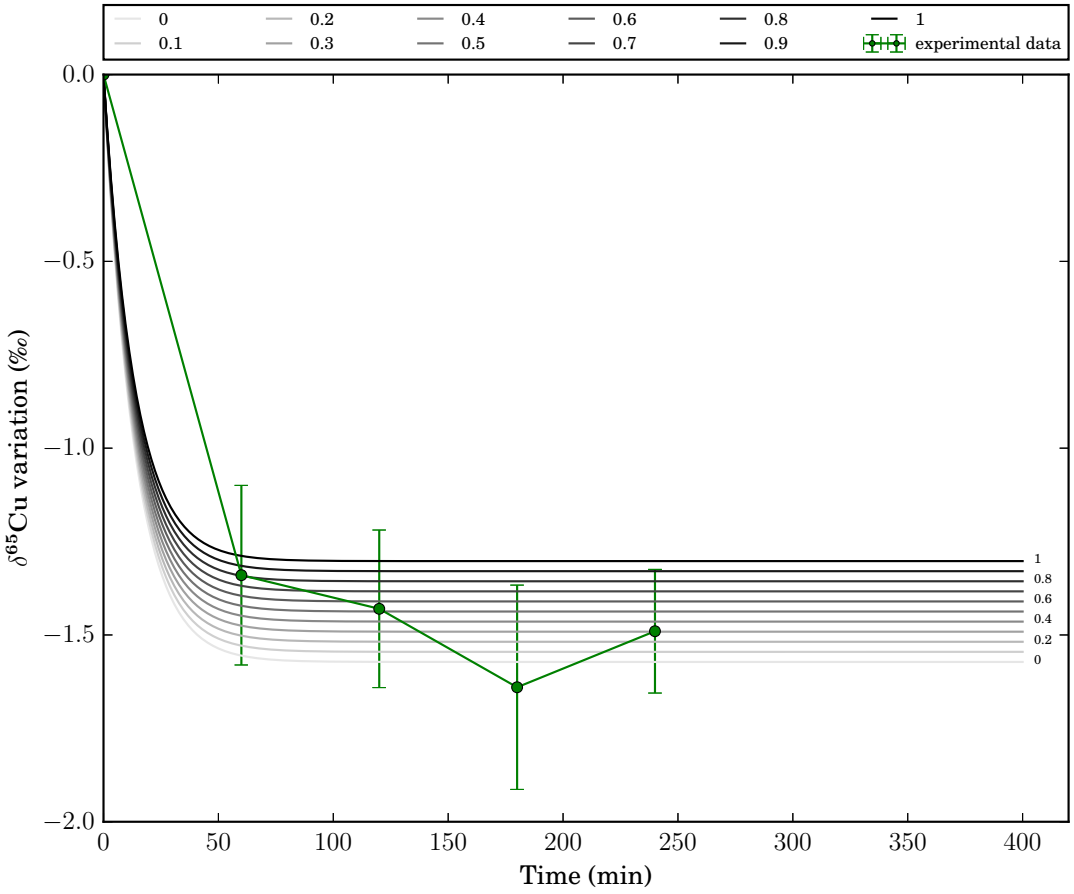
In our experiments, we considered that Cu export has no effect on the δ^{65}Cu evolution. The final goal of the box model was to confirm this hypothesis. In the *in vivo* experiments, we considered that Cu export is constant through time. It is noticeable that after 120 min. of Cu uptake in our experiments, Cu import is nearly equal to Cu export. If Cu export has an effect on the cell δ^{65}Cu it must be observed after 120 min. With the box model, we tested different δ^{65}Cu values associated with Cu export and compared it the δ^{65}Cu values analyzed between 120 and 240 min (Figure S3.12). We modelized that if Cu export has an effect on cell δ^{65}Cu it is very low (between -0.1‰ and +0.3 ‰) and thus is considered as negligible.

Finally, we modelized with this box model the Cu concentration and the δ^{65}Cu evolution in a box model with the calculated ($\varphi^{0-60}_{\mathrm{HAIp}}$, $\delta^{65}\mathrm{Cu}_{\mathrm{Ctr1p}}$, $\delta^{65}\mathrm{Cu}_{\mathrm{Ctr3p}}$ and $\delta^{65}\mathrm{Cu}_{\mathrm{LAIp}}$) and the measured ($\Phi^{0-60}_{\mathrm{cell}}$) WT parameters. We found that the modelized Cu concentration and δ^{65}Cu evolution are close to the *in vivo* observation (Figure S3.13).

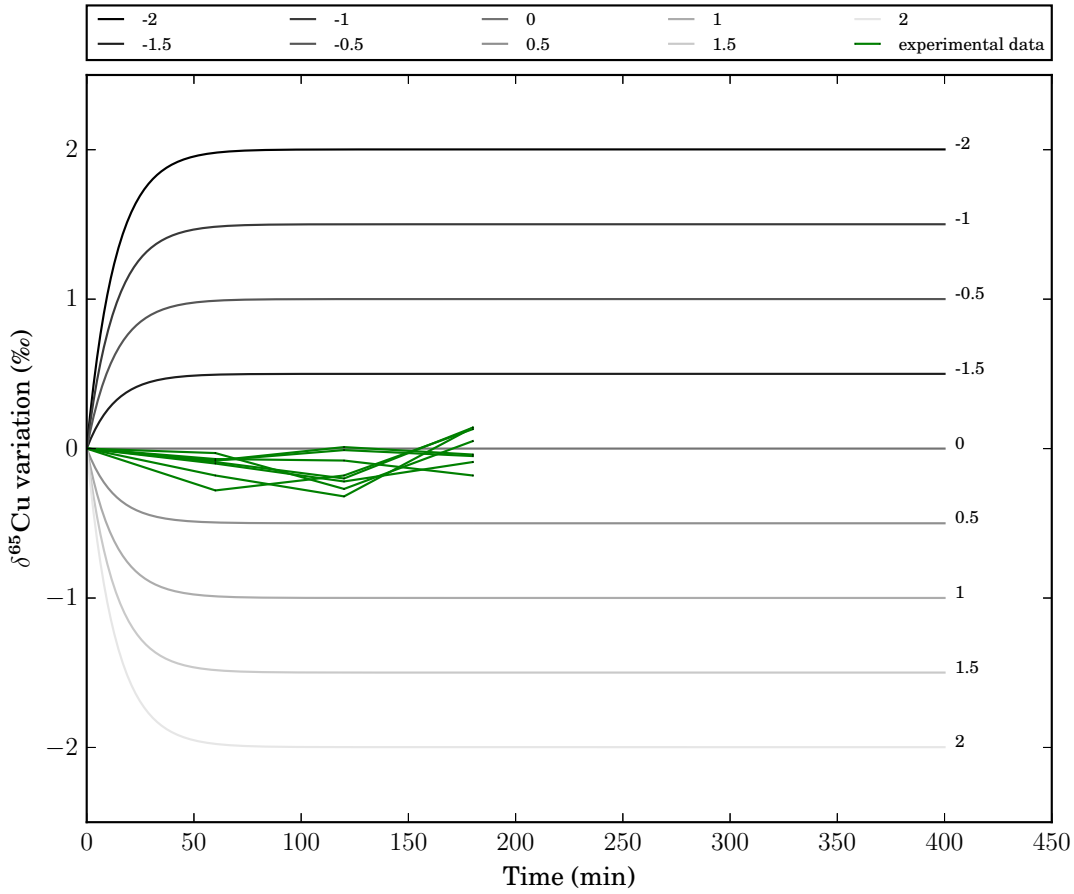


Supplementary Figure S3.10 – ***Modelisation of the temporal copper concentration evolution in cell with a copper influx "R" times higher than the copper exit.***

In this box model Cu enter cell through one importer and goes out through one exporter. Temporal Cu concentration evolution measured in vivo *in the wild type strain (experimental data) is reported in green.*

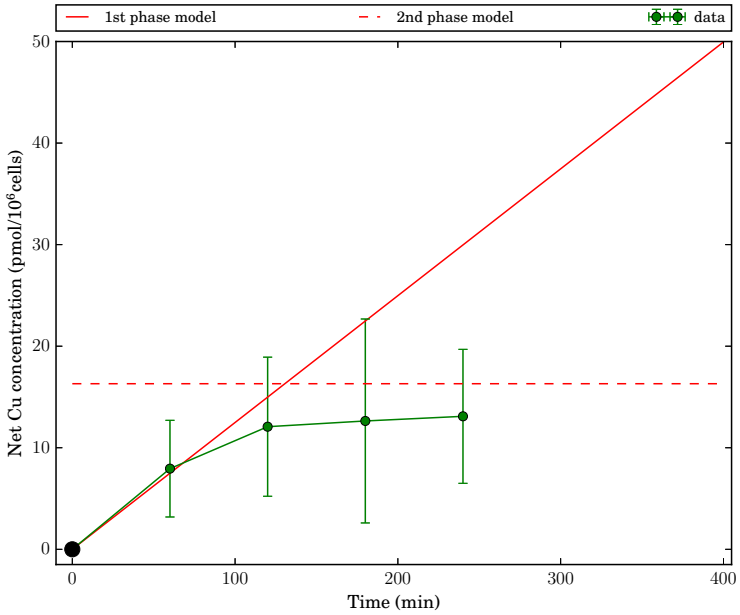


Supplementary Figure S3.11 – ***Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition (δ^{65}Cu) with various fraction of copper that enter cell through one copper importer.*** *Here, we modelized δ^{65}Cu variation in a box model where Cu isotopic fractionation is only due to Ctr1p and Ctr3p (see text for details). For a value of 0.5, 50% of the Cu that enter cell through high-affinity Cu importer go through Ctr1p. The green line represent the δ^{65}Cu measured* in vivo *in the wild type strain.*

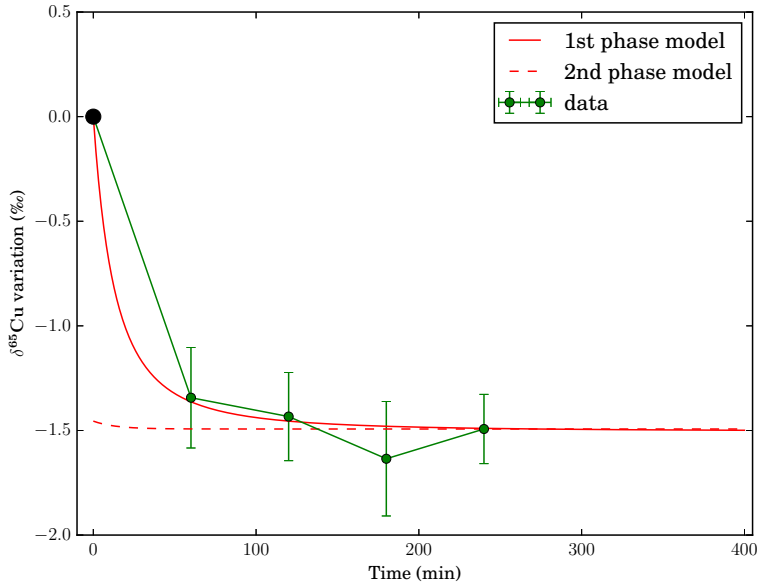


Supplementary Figure S3.12 – ***Modelisation of the temporal evolution of the copper isotopic composition (*δ^{65}Cu*) with various fractionation factor associated to copper export.***
We modelized δ^{65}Cu *evolution in a box model where Cu importers have no effect on the cell* δ^{65}Cu*. We tested variable fractionation factor associated to Cu export. The temporal* δ^{65}Cu *evolution between 120 and 240 min. in the different strains is reported in green.*

(a)



(b)



Supplementary Figure S3.13 – ***Comparison of the temporal evolution of the cell copper concentration and the cell copper isotopic composition in the*** **Saccharomyces cerevisiae** ***wild type strain measured*** **in vivo** ***and modelized with box model.***

Two phases were modelized. During the first phases all Cu importers were considered, during the second phase only low affinity Cu importers were considered. We compared the model values (red) to the experimental data (in green) measured in the WT.

(a) *Comparison of the temporal Cu concentration evolution in the WT calculated with the box model and measured* in vivo.

(b) *Comparison of the temporal* δ^{65}*Cu evolution in the WT calculated with the box model and measured* in vivo.

CHAPITRE 4

La composition en isotopes stables du cuivre des cellules marque leur résistance au cisplatine, une molécule anti-tumorale

The copper isotopic composition of cells monitors the resistance to the anticancerous drug cisplatin

---

Résumé du chapître : *Le but de ce chapître est d'identifier le lien qui existe entre la résistance de différentes souches de levures au cisplatine et leurs phénotypes isotopiques du cuivre mesurés lors de l'étude du chapître 3 et de caractériser l'effet d'un traitement au cisplatine sur leur phénotypes isotopiques du cuivre.*

4.1 Introduction (français)

Le cisplatine [cis-diamminedichloroplatinum(II)] est un traitement anti-tumoral. Cette molécule se lie à l'ADN inhibant ainsi la division cellulaire ce qui entraîne la mort des cellules. Avec le développement du cancer, certaines cellules deviennent insensibles au traitement le rendant inefficace. Cette résistance acquise peut venir de la mutation d'un ou de plusieurs gènes codant pour les protéines importatrices du Cu (*Ctr*). Ainsi, une quantité faible de hCtr1p (la protéine Ctr humaine) dans la membrane de cellules souches humaines induit une plus grande résistance au cisplatine [Beretta et al., 2004; Holzer et al., 2004]. Cette protéine a été quantifiée dans des biopsies de patients atteints de cancer du poumon. Il apparaît que plus la quantité de hCtr1p est faible plus le pronostique de résistance au traitement est élevé [Chen et al., 2012]. La résistance au cisplatine des cellules cancéreuses peut apparaitre avec le développement de la maladie. Il conviendrait ainsi de réaliser des biopsies régulières pour diagnostiquer l'apparition de résistance au cisplatine ce qui est médicalement infaisable. Pour que ce marqueur pronostique soit utilisé de manière répétée, il faudrait trouver un marqueur sanguin de l'apparition de telles résistances.

Il a été montré par ailleurs que les patients atteints d'hépatocarcinomes sont caractérisés par un enrichissement en isotopes légers du Cu dans les globules rouges probablement dû à un enrichissement en isotopes lourds dans les cellules tumorales [Balter et al., 2015]. Le suivi de la composition isotopique du Cu a ainsi été proposé comme un biomarqueur non invasif du cancer. Dans une précédente étude [Cadiou et al., in preparation-1], il a été montré que l'augmentation du δ^{65}Cu observée dans les cellules tumorales hépatiques [Balter et al., 2015] est probablement due à une diminution de l'expression des réductases membranaires [Caillot et al., 2009; Coulouarn et al., 2005]. Au vu de l'étroite relation qui existe entre le métabolisme du Cu et l'acquisition d'une résistance au cisplatine, et entre les mécanismes d'entrée du Cu dans la cellule et le phénotype isotopique du Cu [Cadiou et al. [2017], Cadiou et al. [in preparation-1]], il est probable que le suivi de la composition isotopique du Cu dans le sang puisse permettre de suivre l'apparition d'une résistance au cisplatine.

L'enjeu de cette étude est de mettre en relation la composition isotopique du Cu avec un phénotype de résistance au cisplatine. Dans les deux études précédentes, la mesure du δ^{65}Cu de différentes souches de levure a permis de montrer que les souches mutées pour les importateurs ou les réductases du Cu ont un δ^{65}Cu plus élevé que la souche sauvage. Or, ces souches sont théoriquement plus résistantes au cisplatine que la souche sauvage [Ishida et al., 2002]. Nous avons alors étudié la résistance au cisplatine des souches de levures de l'étude précédente [Cadiou et al., in preparation-1]. Pour cela, nous avons cultivé des cellules de levure en présence de différentes concentrations de cisplatine (de 0 à 2mM) pendant 4 heures. Puis ces levures ont été déposées sur une boite de Petri et

nous avons dénombré les colonies formées après deux jours de culture en conditions normales. Ceci nous a permis de confirmer que les souches mutées dans les réductases du Cu ou dans les importateurs du Cu étaient plus résistantes au cisplatine que la souche sauvage. **Pour les souches isogéniques nous pouvons mettre en relation un phénotype de résistance au cisplatine avec un $\delta^{65}Cu_{plateau}$ plus élevé.** Par contre, un phénotype de résistance au cisplatine analogue à la souche sauvage a été trouvé pour la souche SKY34. Or, la souche SKY34 n'est pas isogénique avec la souche DTY165 dite sauvage. Au vu de ces résultats et des résultats de Ishida et al. [2002], il semble qu'il soit inapproprié de comparer le phénotype de résistance au cisplatine de souches non isogéniques.

Nous avons par ailleurs montré dans l'étude précédente que l'enrichissement en isotopes légers du Cu des cellules est linéairement lié au flux net de Cu entrant par les importateurs à haute affinité du Cu [Cadiou et al., in preparation-1]. Or, le cisplatine entre dans les cellules par ces protéines [Ishida et al., 2002; Liang et al., 2009; Lin et al., 2002; Song et al., 2004]. Ainsi, une augmentation du δ^{65}Cu est attendue lors du traitement au cisplatine. Pour vérifier cela, nous avons ajouté du cisplatine dans le milieu de culture pour atteindre une concentration de 0.5 mM. Puis nous avons mené des expériences d'*uptake* et étudié la concentration en Cu et la composition isotopique du Cu des cellules. Quatre souches de levure ont été choisies : DTY165 et SKY34 qui font office de référence pour les études précédentes et deux souches fortement résistantes au cisplatine et respectivement mutées pour une réductase du Cu (fre1Δ) et un importateur du Cu (ctr1Δ). **Comme prévu par le modèle de notre seconde étude, nous avons observé une augmentation du δ^{65}Cu vers des valeurs proches de 0‰ lorsque du cisplatine était ajouté au milieu de culture.**

Pour les souches isogéniques nous avons observé une différence de $\delta^{65}Cu_{plateau}$ entre les expérience en présence et en absence de cisplatine d'autant plus faible que la souche est résistante au cisplatine. Si ces résultats sont vérifiés chez l'homme, alors l'acquisition d'une résistance au cisplatine durant le traitement devrait pouvoir être tracée par une augmentation du δ^{65}Cu tumoral après le traitement en comparaison de cette valeur mesurée avant le traitement. Au vu de la corrélation entre l'augmentation du δ^{65}Cu dans les tumeurs et la diminution du δ^{65}Cu des globules rouges pour les cancers hépatiques, il est probable qu'une augmentation du δ^{65}Cu tumoral dû à une acquisition d'une résistance au cisplatine entraîne une diminution du δ^{65}Cu sanguin. **Si ceci est vérifié chez l'homme, cela ouvrirait la voie au développement d'un biomarqueur non-invasif de l'acquisition d'une résistance au cisplatine des cellules tumorales.**

4.2 *Article in preparation:* Cisplatin resistant cells have a specific copper isotopic composition which is little affected by cisplatin treatment

Authors: Jean-Loup Cadiou, Sylvain Pichat, Victor P. Bondanese, Alexandre Soulard, Francis Albarède, Philippe Oger

Potential journal: Scientific reports

Abstract

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum(II)) drug is used to efficiently treat several cancers. However, tumors development leads to the accumulation of mutation in cells which can induce cisplatin resistance. For instance, when one of the Copper-importers genes is disrupted (e.g. CTR1), eukaryotic cells became more resistant to the treatment. Therefore, a lower quantity of Ctr1 in tumoral cells marked a higher resistance to cisplatin. The main issue with this method is that it needs biopsies which do not allow the direct detection in tumors of the acquisition of a resistance to cisplatin. A blood prognosis biomarker has been sought for. A good candidate is the blood monitoring of the natural copper (Cu) isotopes composition, reported as $\delta^{65}Cu = 1000 \times [(^{65}Cu / {}^{63}Cu)_{sample} / (^{65}Cu/^{63}Cu)_{reference\ material} - 1]$. In patients with hepatocellular carcinoma it has been found that the $\delta^{65}Cu$ of cancerous cells is higher compared to healthy cells. This increase is mirrored by a red-blood cells $\delta^{65}Cu$ decrease. In previous studies, we demonstrated in *Saccharomyces cerevisiae* that a higher $\delta^{65}Cu$ is due to a lower Cu import through high-affinity Cu importers. This lower Cu import might be correlated to a cisplatin resistance phenotype. In this study, we confirmed that isogenic strains (such as CTR1 knockout strain) with a higher $\delta^{65}Cu$ are more resistant to cisplatin. The second goal of this study was to understand the cisplatin effect on the $\delta^{65}Cu$. Therefore, we performed Cu uptake experiments in a medium containing 0.5 mM of cisplatin. In four yeast strains treated with 0.5 mM of cisplatin we observed an increase of the $\delta^{65}Cu$. Those results might have medical application. We predicted an increase of the tumoral $\delta^{65}Cu$ and a correlated decrease of the blood $\delta^{65}Cu$ with the acquisition of cisplatin resistance. If the results found in *Saccharomyces cerevisiae* are translatable to human cells, this conceptual model may became a revolutionary non-invasive cisplatin resistance prognosis biomarker.

Introduction

During the last decades, a relationship between Cu metabolism and chemotherapy resistance has been discovered. Rosenberg et al. [1965] discovered a chemical agent that could

kill cells by binding the DNA: cisplatin [cis-diaminedichloroplatinum(II)]. This chemical compound was able to cause tumors in mice to shrink [Rosenberg et al., 1969] and it was rapidly adopted for human cancer treatment [Prestayko et al., 1979]. Cisplatin treatment can be curative in several cancer types and it has proven to be very effective in particuliar on advanced testicular cancer [Loehrer and Einhorn, 1984]. However, a number of cancers are traditionally less sensitive to cisplatin, and with time cases of cisplatin resistance emerged also in patients with cancers that would normally respond to this treatment [Giaccone, 2000; Ozols, 1991]. One possible resistance mechanism is a lower uptake of cisplatin by cells [Loh et al., 1992] through gated transporters [Gately and Howell, 1993]. Moreover, cisplatin uptake have common characteristics with Cu uptake [Amtmann et al., 2001; Atema et al., 1993; Endo et al., 2000; Gately and Howell, 1993; Lee et al., 2002]. In 2002, it was proven that some human ovarian carcinoma cell lines are both resistant to cisplatin toxicity and Cu toxicity at high concentration in the growth medium [Katano et al., 2002]. Such phenotype was also found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) [Ishida et al., 2002; Lin et al., 2002]. In the latter, as well as in human cells, cisplatin resistance was shown to occur upon disruption of Cu-transport *via* the high-affinity Cu importer: Ctr1p [Ishida et al., 2002; Lin et al., 2002]. Thus, the amount of hCtr1p protein in the cell membrane has been suggested as a useful prognosis biomarker of the potential tumor resistance to cisplatin in non-small-cells lung cancer [Chen et al., 2012; Kim et al., 2014]. However, non-invasive prognosis biomarkers for cisplatin resistance have not been identified yet. Changes in Cu homeostasis have long been recognized to occur in cancer [Babich et al., 2013; Ishida et al., 2013; Knutson, 2007; Zowczak et al., 2001]. Since the natural Cu isotopic composition (reported as $\delta^{65}Cu = 1000 \times [(^{65}Cu / {}^{63}Cu)_{sample} / (^{65}Cu/^{63}Cu)_{reference\ material} - 1]$ of a given reservoir (such as blood) depends on the Cu isotopic composition of the imported Cu and of the net Cu fluxes toward this reservoir [Albarède, 2003; Albarède et al., 2011], the isotopic composition of Cu in cancer patients has recently been studied. The serum of patients with breast or colorectal cancer and the red-blood cells of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) were found to be enriched in light Cu isotopes compared to healthy controls [Balter et al., 2015; Telouk et al., 2015]. Importantly, it was found that in HCC [Balter et al., 2015] and oral squamous cell carcinoma [Lobo et al., 2016] tumors are characterized by heavy Cu isotopes enrichment compared to the adjacent normal tissue (hereafter tumor Cu Isotopic Phenotype). It confirms the potential for $\delta^{65}Cu$ to become a novel non-invasive tumor biomarker. To this end, a better understanding of the origin of the Cu isotopic composition in tumoral cells and underlying processes is needed. Bondanese et al. [2016] have shown, *in vitro*, that hypoxia leads to heavy Cu isotopes enrichment in several human cell lines. Using *S. cerevisiae* as a model organism, we proved that the "tumor Cu Isotopic Phenotype" probably results from lower Cu import through high-affinity Cu importers [Cadiou et al., in preparation-1]. We showed that, after two hours of Cu uptake, the Cu isotopic composition reaches a

stable value that depends on the genotype. This Cu isotopic composition can be referred to as Cu Isotopic Phenotype and we speculated that this phenotype might also correlate with the degree of cisplatin resistance. Because cisplatin enters cells through the same transporters as Cu, and therefore it competes with copper for the same transporters, we predicted that cisplatin treatment would reduce the Cu flux through high-affinity transporters. In turn, this would change the strain Cu Isotopic Phenotype toward higher δ^{65}Cu values. Here, we tested these hypotheses and quantitatively characterized the relationship between the Cu Isotopic Phenotype, cisplatin sensitivity, and cisplatin treatment.

4.2.1 Material and method

4.2.1.1 Genotype and culture conditions

Six different strains were used in this study (see Table 4.1 and Supplementary Table S4.1 for details): the wild type strain DTY165, which is derived from the SEY6210 genomic background [Li et al., 1996], four DTY165 knockout mutants in the high-affinity Cu transporter genes CTR1 (ctr1Δ) and CTR3 (ctr3Δ) or the Cu reductase genes FRE1 (fre1Δ) and FRE2 (fre2Δ) [Cadiou et al., in preparation-1], and a mac1Δ strain (SKY34) derived from another genomic background [Peña et al., 2000]. Cells were maintained on Yeast Peptone Dextrose (YPD) - agar plates. 12h cultures in liquid YPD medium were used for cisplatin cytotoxicity assay and uptake experiments. Cells density were estimated by direct count using a Thoma cell or by quantification of the cell protein content as described previously [Cadiou et al., 2017].

Table 4.1 – Saccharomyces cerevisiae *strains*.

The presence (+) and absence (-) of the different Cu importers and Cu reductases genes is reported

Strain	Cu - importers		Cu reductases		Cu-transcription factor	Reference
	CTR 1	CTR 3	FRE 1	FRE 2	MAC 1	
DTY 165	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Li et al. [1996]
SKY 34	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	Peña et al. [2000]
ctr1Δ	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	Cadiou et al. [in preparation-1]
ctr3Δ	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	Cadiou et al. [in preparation-1]
fre1Δ	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	Cadiou et al. [in preparation-1]
fre2Δ	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	Cadiou et al. [in preparation-1]

4.2.1.2 Cisplatin cytotoxicity assays

The cisplatin solution was prepared extemporaneously from cisplatin powder (CAS 15663-27-1, Sigma-Aldrich) in Dimethylsulfoxyde (DMSO) [Schuldes et al., 1997]. To test for cytotoxicity, we used the classic colony formation assay [Ishida et al., 2002; Lin et al., 2002]

where cells were in contact with cisplatin for 4 hours [Lin et al., 2002]. Briefly, cells from a liquid YPD preculture in late exponential phase were harvested by centrifugation. Cells were resuspended at a cellular concentration of 10^8cells/ml in YNB-20% D-Glucose at various cisplatin concentration (0, 0.5, 1, 1.5, 2 mM) and incubated for 4 hours at 30°C with shaking. Cells were then spotted in triplicate on YPD-agar medium for colony formation numbering (colony forming units, cfu) and incubated 2 days in the dark (See Supplementary Figure S4.1 for details). The survival rate is defined as the number of cfu after cisplatin treatment divided by the number of cfu for cells cultivated in the same conditions but without cisplatin (reported in %, Figure 4.1 and Supplementary Figure S4.2 and S4.3).

4.2.1.3 Uptake experiments

Uptake experiments were performed as described in Cadiou et al. [2017] in presence of 0.5 mM cisplatin, which was the cisplatin concentration emphasizing the maximum survival differences between the four strains (Figure 4.1). At each time point we sampled 1ml of culture for protein quantification (*i.e.* 10^8 cells), 1ml for measuring copper and platinum (Pt) concentration and 50ml (*i.e.* 5×10^9 cells) for isotopic measurement from a 400 ml culture volume. Samples for isotopic and elemental analyses were rinsed with YNB-20% D-Glucose prior to storage at -20°C. We compared the results to Cadiou et al. [in preparation-1] obtained in a medium without cisplatin.

4.2.1.4 Elemental purification and analysis

Samples were mineralized and Cu as reported in Cadiou et al. [2017]. Elemental concentrations were measured using a Quadrupole Inductively-Coupled Mass-Spectrometer (Q-ICP-MS, Agilent 7500cx). Cu and Pt concentrations were normalized to 10^6cells. Cu stable isotope compositions were measured with a Multi-Collector Inductively-Coupled Plasma Mass-Spectrometer (MC-ICP-MS, Nu500 HR, Nu instrument) in wet plasma mode. The natural Cu isotopic composition is reported as $\delta^{65}Cu = 1000 \times [(^{65}Cu / {}^{63}Cu)_{sample} / (^{65}Cu/^{63}Cu)_{NIST\ STM\ 976} - 1]$. The NIST SRM 976 is the referenced material used for reporting our results. The instrumental mass fractionation was corrected as described in Cadiou et al. [2017] using Zn as a doping element and the standard-sample bracketing method. Each samples were analyzed three times in independent sessions. The long-term external reproducibility was assessed by measuring 6 different samples during several independent sessions over the course of 5 months. For each sample, the standard deviation between the different measurements was always under 0.03‰ (1σ) [Cadiou et al., in preparation-1].

4.2.2 Results

4.2.2.1 Survival rate as a function of cisplatin concentration

The disruption of either high-affinity Cu importers, Cu reductases or Mac1p was already known to increase the resistance to cisplatin [Ishida et al., 2002]. As a consequence, we used the six yeast strains studied in Cadiou et al. [in preparation-1] (Table 4.1) to study the link between cisplatin sensitivity and the cellular Cu Isotopic Phenotype. We compared DTY165, a wild type strain, to a series of knockout strains: either fre1Δ, fre2Δ, ctr1Δ, ctr3Δ or mac1Δ (SKY34 strain). The yeast genes FRE1 and FRE2 code for two Cu reductases that are involved in Cu import [Georgatsou et al., 1997; Hasset and Kosman, 1995] similarly to the human Steap proteins. Ctr1p [Dancis et al., 1994a,b] and Ctr3p [Peña et al., 2000] are high-affinity Cu importers. Cu import is also made through low-affinity importers (e.g. Fet4p, Smf1) [Hasset et al., 2000; Liu et al., 1997]. The transcription of Cu reductases and high-affinity Cu importers is induced by the transcription factor Mac1p which is inhibited by high intracellular Cu concentrations [Gross et al., 2000; Jungmann et al., 1993]. We determined the degree of cisplatin resistance in the six yeast strains according to a procedure previously described [Ishida et al., 2002; Lin et al., 2002] (See section 4.2.1.2 for details). For a given strain, the survival rate is expressed as the ratio between the colony formation unit's (cfu) for cisplatin-treated cells and untreated cells. As expected, the survival rate generally decreased with increasing cisplatin concentrations (Figure 4.1 and Supplementary Figure S4.2 and S4.3). For cisplatin concentration equal to 0.5 and 1mM, the wild type strain DTY165 is the most sensitive to cisplatin (in green, Figure 4.1). Compared to wild type, the mac1Δ strain SKY34 appears to be marginally cisplatin resistant only at the lowest cisplatin concentrations used (in blue, Figure 4.1). This appears to be in contrast with previously published results [Ishida et al., 2002]. Using DTY165 as the parental strain (the strain used for the knockout strain construction), CTR1 knockout sensibly increases cisplatin resistance, while CTR3 knockout leads to a modest increase of the resistance only at the lowest cisplatin concentrations (Figure 4.1 and Supplementary Figure S4.2). The disruption of the Cu reductases genes (FRE1 and FRE2) had the largest impact on cisplatin resistance (Figure 4.1 and Supplementary Figure S4.3). Indeed, the highest resistance was observed for the fre1Δ strain, which was almost insensitive to cisplatin concentrations up to 2 mM (Figure 4.1). Both findings on Cu reductases or Cu importers knockout mutants are consistent with the results of Ishida et al. [2002].

4.2.2.2 Cisplatin resistance and, copper and platinium import

Cisplatin resistance has previously been associated with a competition for high-affinity Cu transporters between Cu and Pt leading to a lower uptake of Cu in the presence of Pt [Lin et al., 2002]. We performed detailed uptake and isotopic analyses on four strains representing each genotype class: DTY165 (wild type), SKY34 (mac1Δ), ctr1Δ, and the fre1Δ

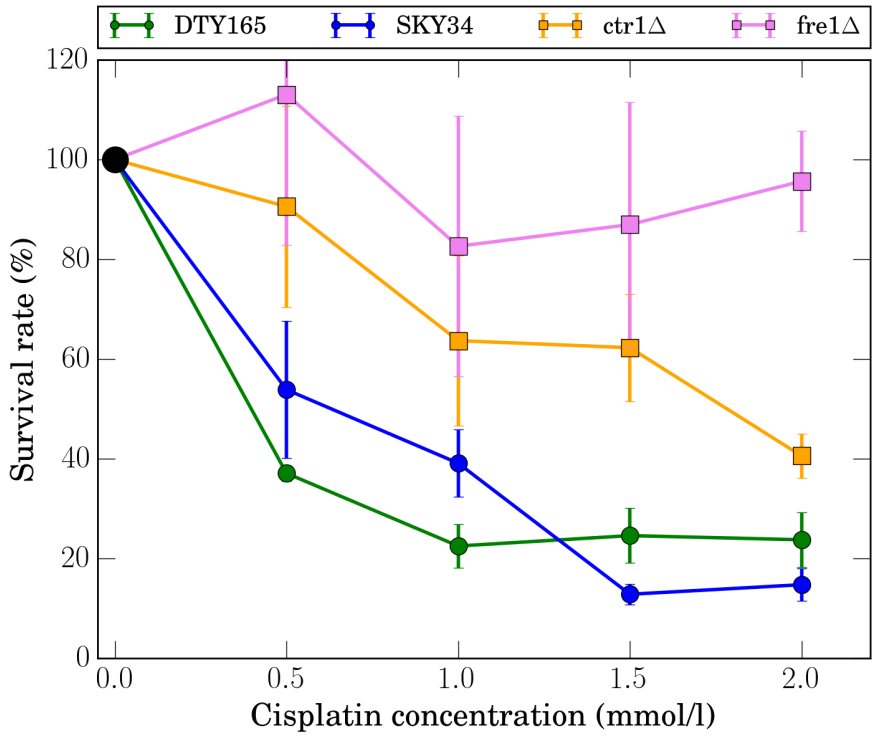


Figure 4.1 – ***Survival rate (in %) after cisplatin treatment in wild type (green), SKY34 (mac1Δ, blue), a high-affinity Cu importer knockout (ctr1Δ, orange) and a Cu reductase knockout (fre1Δ, pink)*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains.***

The survival rate is defined as the number of colony formation units (cfu) after cisplatin treatment divided by the number of cfu for cells cultivated in the same conditions but without cisplatin (reported in %). Each point correspond to the average cfu of three deposits (see Supplementary Figure S4.1 for details).

strain. The latter two mutants were preferred to ctr3Δ and fre2Δ because of their higher cisplatin resistance. We monitored Cu concentration evolution when cells were cultured with 0.5 mM of cisplatin and compared it to experiments without cisplatin (from Cadiou et al. [in preparation-1]). As what we have done in Cadiou et al. [2017], we compared the average Cu concentration at the end of the experiment (at 240 min.). In wild type, Cu import is 70% lower in the presence of 0.5 mM cisplatin compared to cells cultivated in the same conditions but without cisplatin (In green in Figure 4.2, Supplementary Table S4.3). In the importer and reductase mutants (*i.e.* ctr1Δ and fre1Δ), the decrease in Cu import is less pronounced. The addition of cisplatin in the medium containing the ctr1Δ or the fre1Δ strains lead respectively to a 35% (from 10.4±5 to 6.8±2.7 pmol/10^6cells) and 15% (from 10.8±2.3 to 9.7±1.9 pmol/10^6cells) decrease of the cellular Cu concentration (in orange and in pink in Figure 4.2, Supplementary Table S4.3). In contrast, Cu uptake is 20% higher (from 5.34±0.06 to 6.5±1.8 pmol/10^6cells) in the mac1Δ strain SKY34. This higher Cu uptake when cells were treated with cisplatin is probably due to a low Cu uptake in SKY34 in both cases. Overall, the trends of Cu uptake without or with cDDP are similar for

this latter strain (Figure 4.2, Supplementary Table S4.3)

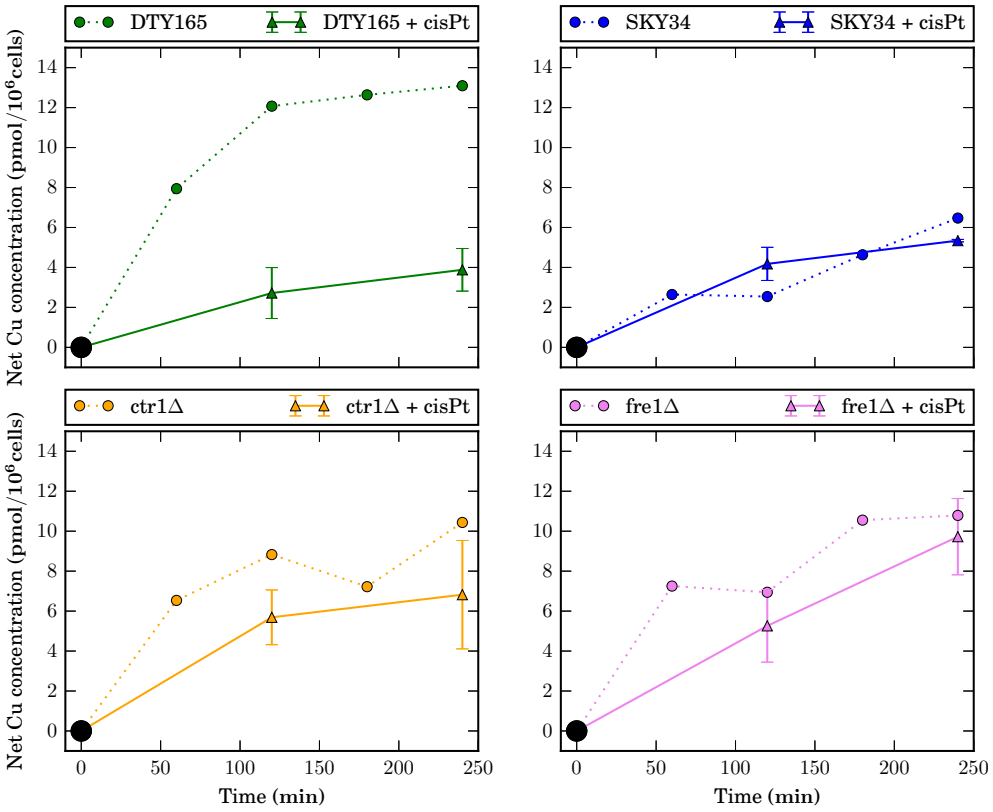


Figure 4.2 – ***Temporal evolution of copper concentration in 10^6 cells cultivated in the presence of 0.5 mM of cisplatin (triangles – plain lines) and cultivated in the absence of cisplatin (circles – dash lines, published in Cadiou et al. [in preparation-1]).***

We reported the difference between Cu concentration at time t and at the beginning of the experiment (net Cu concentration) in 10^6cells cultivated with cisplatin (+cisPt) or without cisplatin (published in Cadiou et al. [in preparation-1]). We compared four different strains: a wild type (DTY165, green), a mac1Δ (SKY 34, blue), a high-affinity Cu importer knockout (ctr1Δ, orange) and a Cu reductase knockout (fre1Δ, pink). Error-bars in the experiment with 0.5 mM of cisplatin correspond to the standard deviation between two independent experiments.

We also verified the correlation between Pt concentration and cisplatin sensitivity [Ishida et al., 2002; Katano et al., 2002]. Pt concentration increases almost linearly over the whole duration of the uptake assay to reach 17.1±5 pmol/l/10^6cells in the wild type strain (Figure 4.3). The Pt concentration observed in the SKY34 strain is significantly lower (11.0±1 pmol/l/10^6 cells). Pt uptake is similar to wild type in the ctr1Δ mutant, while it is slightly higher than wild type in the fre1Δ mutant. It is interesting to note that we do not observe the clear correlation between high Pt resistance and low Pt uptake reported previously [Ishida et al., 2002; Katano et al., 2002], since the most resistant mutant (fre1Δ) exhibits the highest intracellular Pt content.

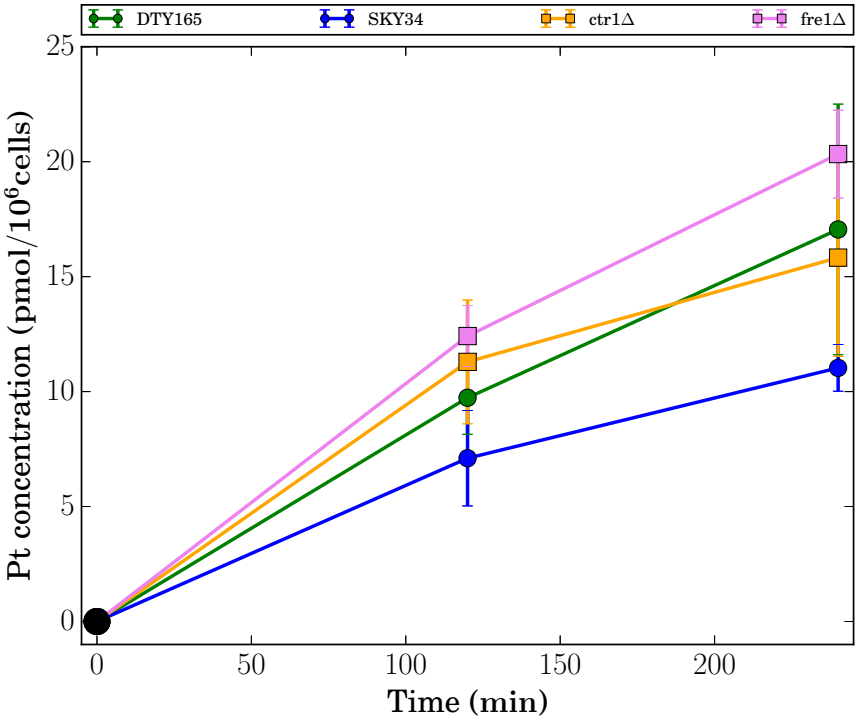


Figure 4.3 – ***Temporal evolution of the platinium concentration after the addition of 0.5 mM of cisplatin in wild type, SKY34, a high-affinity Cu importer knockout (ctr1Δ) and a Cu reductase knockout (fre1Δ)*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains.***
Evolution of the Pt concentration in 10^6 cells measured after the addition of 80 µM of Cu and 0.5 mM of cisplatin in the growth medium. We reported the concentration in a wild type strain (DTY 165, green), a mac1Δ strain (SKY 34, blue), a high-affinity Cu importer knockout strain (ctr1Δ, orange), and a Cu reductase knockout strain (fre1Δ, pink). Error-bars are the standard-deviation between two independent experiments.

4.2.2.3 Impact of cisplatin treatment on the cell Copper Isotopic Phenotype

In a previous report [Cadiou et al., in preparation-1], we defined the Cu Isotopic Phenotype as the δ^{65}Cu value at the plateau phase (*i.e.* between 120 and 240 min.). Because of the lower time resolution of the uptake experiments made with cisplatin it is impossible to confirm that the plateau phase is reached. Here, we extended the definition of the Cu Isotopic Phenotype for cells cultivated with cisplatin and estimated its value as the average δ^{65}Cu between 120 and 240 min. Even if, it was unclear if the plateau phase was reached, we decided to named "$\delta^{65}Cu_{plateau}$" the δ^{65}Cu values between 120 and 240 min.. Since the light Cu enrichment of a cell is higher when the transport of Cu through high-affinity transporters is higher [Cadiou et al., in preparation-1], the addition of a competitive inhibitor, such as Pt, should decrease Cu uptake through high-affinity Cu importers and therefore should affect the Cu Isotopic Phenotype and displace it towards an enrichment in heavy Cu isotopes (higher $\delta^{65}Cu_{plateau}$ values) [Cadiou et al., in preparation-1]. In the

absence of cisplatin, the Cu Isotopic Phenotypes of the wild type ($\delta^{65}Cu_{plateau}$(DTY165) = -1.51±0.18‰) and the mac1Δ strain ($\delta^{65}Cu_{plateau}$(SKY34) = -0.12±0.21‰) represent the opposite extremes of the Cu Isotopic Phenotype variability range of all the strains analyzed (Figure 4.4, [Cadiou et al., 2017, in preparation-1]). The Cu Isotopic Phenotype of the ctr1Δ mutant is $\delta^{65}Cu_{plateau}$(ctr1Δ) = -1.22±0.24‰ and that of the fre1Δ strain is $\delta^{65}Cu_{plateau}$(fre1Δ) = -0.65±0.21‰ [Cadiou et al., in preparation-1] (Figure 4.4). To the exception of the mac1Δ strain, the Cu Isotopic Phenotype values result to be directly correlated with the level of cisplatin resistance of the strain.

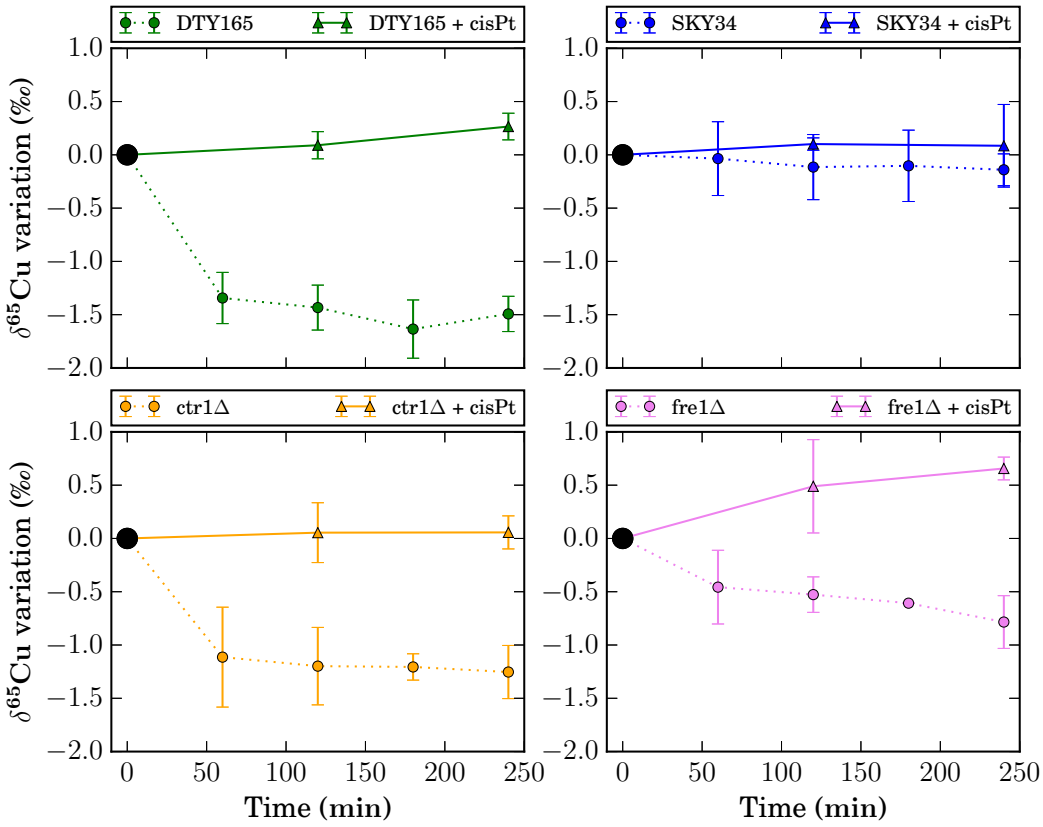


Figure 4.4 – ***Temporal copper isotopic composition variation (δ^{65}Cu) in a wild type, SKY34, a high-affinity Cu importer knockout (ctr1Δ) and a Cu reductase knockout*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains treated with 0.5 mM of cisplatin (triangles, plain lines) and not treated with cisplatin (circle, dash lines, published in Cadiou et al. [in preparation-1]).***

Cu isotopic composition evolution in four strains: a wild type (DTY 165, green), a mac1Δ knockout (SKY 34, blue), a high-affinity Cu importer knockout (ctr1Δ), a Cu reductase knockout strain (fre1Δ). Experiments without cisplatin (circles – dash lines) have been performed in three independent experiments and are published in Cadiou et al. [in preparation-1]. Experiments with 0.5 mM of cisplatin (triangles – plain lines) have been duplicate. Errors-bars are equal to the standard-deviation between two or three independent experiments.

The addition of 0.5 mM cisplatin, causes the Cu Isotopic Phenotype of all strains to

become significantly higher than the Cu Isotopic Phenotype measured in cells cultivated without cisplatin, *i.e.* it induces an enrichment in heavy Cu isotopes (Figure 4.5). Indeed, the Cu Isotopic Phenotype shift to 0.18 ± 0.14‰, 0.06 ± 0.19‰, 0.57 ± 0.28‰, and 0.09±0.23‰ for the strains DTY165, ctr1Δ, fre1Δ and SKY34, respectively (Figure 4.5). Therefore, in the presence of cisplatin the Cu Isotopic Phenotype of the wild type and mutant strains approach the Copper Isotopic Phenotype of the SKY34 strain with no cisplatin (-0.12 ± 0.21‰). The difference between the δ^{65}Cu measured in the presence of cisplatin and in the absence of cisplatin is maximal for the wild type strain, the most sensitive to cisplatin strain (1.68‰), while the cisplatin resistant strains are less affected (the difference is equal to 1.28‰ for ctr1Δ strain and equal to 1.22‰ for fre1Δ). In contrast, δ^{65}Cu difference is almost null (0.21‰) for the mac1Δ strain SKY34 (4.5).

4.2.3 Discussion

4.2.3.1 Cisplatin resistance levels are highly dependent on the genomic background

The aim of the present study was to explore the existence of a correlation between cisplatin resistance phenotype and the cellular Cu Isotopic Phenotype. This phenotype correspond to the average δ^{65}Cu during the plateau phase. It depends on the genotype [Cadiou et al., in preparation-1]. The correlation between the Cu Isotopic Phenotype (Figure 4.5) and the cisplatin resistance phenotype (Figure 4.1) would suggest that Cu isotopic analysis in cancer patients might constitute a novel prognostic or diagnostic tool for cisplatin treatment efficacy, and eventually aid in patient treatment personalization. In order to be able to easily model cisplatin resistance in cells, we have used the genetically tractable eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* as an analog for human cells. Our results confirm previous observations that gene disruption in any gene of the Cu import pathway, e.g. CTR and FRE genes, leads to increased cisplatin resistance (Figure 4.1 and Supplementary Figure S4.2 and S4.3, [Ishida et al., 2002]). However, in contrast to previous studies, in the yeast background used in this study, *i.e.* SEY6210 [Li et al., 1996], the single knockout mutation which leads to the highest cisplatin resistance was the one of the Cu reductase gene FRE1, and not the one in the high-affinity transporter gene CTR1, as reported previously for the yeast W303-1 genomic background (Figure 4.1, [Ishida et al., 2002]). As [Ishida et al., 2002] noticed, we observed a high resistance to cisplatin for Cu reductases knockout mutants. However, the biological reason for this difference is still unknown. In the same line, we also observed a higher cisplatin resistance in the DTY165 fre1Δ mutant than in the mac1Δ strain SKY34 (Figure 4.1), although this mutation was shown to lead to the highest resistance in the BR10 genomic background [Ishida et al., 2002]. Therefore, the genomic background have an influence on the cell cisplatin sensitivity.

Consistent with the literature, we observe an impact of cisplatin on Cu transport, and

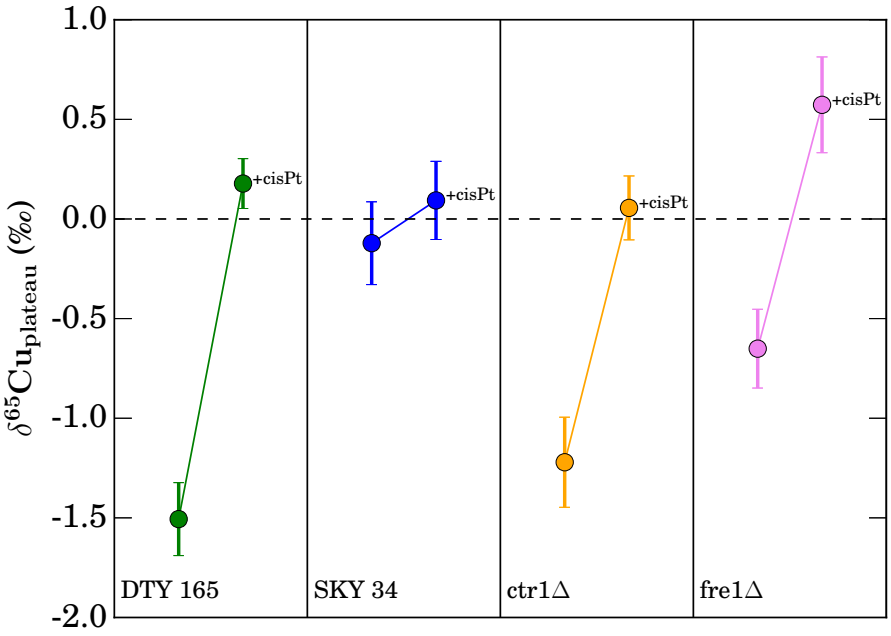


Figure 4.5 – ***Difference between the copper isotopic composition after 120 min. of copper uptake*** **($\delta^{65}Cu_{plateau}$)** ***in a wild type, SKY34, a high affinity Cu importer (ctr1Δ) and a Cu reductase (fre1Δ)*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains treated with 0.5 mM of cisplatin (+cisPt) and untreated.***

We compared the average Cu isotopic composition (from 120 min. to 240 min. of uptake) in the presence of 0.5 mM of cisplatin (+cisPt) and in the absence of cisplatin in a wild type strain (DTY 165, green) and three knockout strains. Those three strains are : a MAC1 knockout strain (SKY34, blue), a high-affinity Cu importer knockout strain (ctr1Δ, orange) and a Cu reductase knockout strain (fre1Δ, pink). δ^{65}Cu *values of cells untreated with cisplatin are already published in Cadiou et al. [in preparation-1]. The error-bars correspond to the standard deviation between nine measurements for the experiment without cisplatin and between four measurements for the experiment performed with 0.5 mM of cisplatin.*

---

a direct correlation between the decrease in Cu uptake and the level of resistance to cisplatin. However, no clear correlation can be observed between Pt cell content and the level of cisplatin resistance in the DTY165 mutants (ctr1Δ and fre1Δ). In fact, the most resistant mutant (fre1Δ) accumulated more Pt than wild type (Figure 4.3). In contrast, as expected from the literature, the mac1Δ strain (SKY34) accumulated significantly less Pt than all other strains (Figure 4.3), despite exhibiting lower resistance to cisplatin than the ctr1Δ and fre1Δ mutants. Such genotypic differences reported here and in the literature confirm that relevant comparisons of cisplatin resistance can only be conducted with nearly isogenic strains, *i.e.* derived from the same genomic background. SKY34 have a different genomic background than DTY165, ctr1Δ and fre1Δ (see Supplementary Table 4.1

for details). Therefore, we did not considered SKY34 in the following discussion.

4.2.3.2 The cell Copper Isotopic Phenotype and cisplatin resistance of isogenic strains are correlated.

For DTY165 and its two derivatives - ctr1Δ and fre1Δ -, the Cu Isotopic Phenotypes (-1.51±0.18‰, -1.22±0.24‰, and -0.65±0.21‰, respectively) are correlated with their level of resistance to cisplatin (survival rate of 37%, 91% and 100% to 0.5 mM cisplatin exposure, respectively). These results establish for the first time a correlation between cisplatin resistance and the Cu Isotopic Phenotype of a cell. In eukaryotic cells, platinum compounds such as cisplatin are imported thanks to Cu high-affinity transporters [Ma et al., 2015]. Cell resistance to cisplatin is essentially due to a lower uptake of Pt [Loh et al., 1992], which has been correlated with a competition between Cu and Pt for the high-affinity Cu transporters. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and human cells, one of the most studied cisplatin resistance models consists in impaired copper transport by the high-affinity Cu transporter Ctr1 [Ishida et al., 2002; Katano et al., 2002; Lin et al., 2002]. Our recent modeling of Cu fractionation in yeast has proven that most of the fractionation that occurs during uptake results from the transport of Cu *via* high-affinity importers [Cadiou et al., in preparation-1]. According to our Cu isotopic fractionation model [Cadiou et al., in preparation-1], $\delta^{65}Cu_{plateau}$ is inversely correlated to the net Cu fluxes through high-affinity Cu importers (φ_{HAIp}):

$$\delta^{65}Cu_{plateau} = -1.91 \times \varphi_{HAIp} + 0.122 \tag{4.1}$$

Hence, because of the decrease of Cu import through high-affinity transporters in cisplatin resistant cells, our fractionation model predicts that those cells would be characterized by heavy Cu isotopes enrichment. Thus, we might expect to observe a significant shift towards positive values of the Cu Isotopic Phenotype in cisplatin resistant human cells, in comparison to sensitive ones. It is interesting to note that in the present study, the most resistant engineered mutant does not harbor a mutation in the Cu transporter itself, rather it is a knockout of one of the Cu reductases (fre1Δ, figure 4.1 and supplementary figures S4.2 and S4.3). This is indeed important, since the nature of the mutations leading to the acquisition of resistance in human cells is not fully characterized, and may not affect the high-affinity transporter CTR1 gene.

Competition between Pt and Cu affects the Cu isotopic composition of cells. In all strains, the incubation in the presence of 0.5mM of cisplatin leads to a significant decrease in Cu uptake. The highest impact is seen for the most sensitive strain, the wild type parent strain DTY165 (70% reduction of import, Figure 4.1) confirming previous observations that cisplatin reduces the accumulation of Cu in cisplatin sensitive cells [Lin et al., 2002]. This decrease has been linked to the inhibition of Cu uptake through the Ctr1p

transporter (Figure 6A of Lin et al. [2002]). Moreover, cells from the human hepatoma cell line (Huh7) are more resistant to cisplatin when they are cultivated with a Cu chelator (BathoCuproine diSulfonate: BCS): Cu deficiency affect cell resistance to cisplatin [Leonhardt et al., 2009]. In contrast to previous results, we observe a slight decrease of Cu import in the ctr1Δ strain when cisplatin was added to the medium (Figure 4.2) whereas this decrease was huge in ctr1Δ strain from other genetic background [Lin et al., 2002]. A potential explanation is that in the strains used in the study by Lin et al. [2002], the gene for the other high-affinity transporter, CTR3, was absent. As a consequence, Cu uptake was largely impaired when CTR1 was knocked-out and moreover did not occur through high-affinity transporters. In addition to a decrease of Cu import, we observe a strong impact of cisplatin on the Cu isotopic composition of cells, since the Copper Isotopic Phenotype of cells in the presence of cisplatin is positive ($\delta^{65}Cu_{plateau}$> 0‰), showing an enrichment in heavy Cu isotopes compared to cells cultivated without cisplatin (Figure 4.5). According to equation 4.1, the enrichment in heavy Cu isotopes can be observed only when Cu import does not occur through high-affinity Cu transporters, but through low-affinity transporters (Supplementary Table S4.2). Thus, the relative enrichment in heavy Cu isotopes when cells were cultured with cisplatin is probably due to the absence of Cu uptake through high-affinity Cu importers. This interpretation agrees with previous observations that in presence of cisplatin there is a strong shift of Cu import from the high-affinity transporters to low-affinity transporters [Cyert and Philpott, 2013; Ooi et al., 1996]. It has been proposed that Pt displaces Cu transport through competition for the Cu chelation sites of the high-affinity Cu importers [Lin et al., 2002]. Thus, if Pt displaces Cu from the high-affinity transporters, our isotopic model predicts that the degree of light Cu isotopes enrichment will be strongly diminished, *i.e.* the Cu Isotopic Phenotype would shift toward higher δ^{65}Cu values [Cadiou et al., in preparation-1]. Here, we confirmed this prediction experimentally, in living cells (Figure 4.4).

4.2.3.3 Copper Isotopic Phenotype as a tool to monitor the emergence of cisplatin resistant tumor cells

As mentioned above, platinum compounds, notably cisplatin are among the most, efficient chemicals to treat several cancer types (testicular, ovarian, bladder, cerebral, small cell lung, head and neck) [Kelland, 2007]. Thus, the development of cisplatin resistance in some tumors, is a major concern in terms of continuation of treatment efficiency, and eventually survival of the patients. Understanding the basis of cisplatin resistance, and developing prognosis biomarkers to monitor the emergence of resistance have been major challenges in the last decades (review in Kelland [2007]). The link between Cu homeostasis and cisplatin resistance in cancerous cells is now well established. The excessive variability of intracellular or serum Cu concentration prevents the use of this parameter as a prognosis biomarker [Babich et al., 2013]. However, monitoring the expression of the

CTR1 gene in tumors has been used for several years with some success as a prognosis biomarker [Chen et al., 2012; Kim et al., 2014]. In the present study, we have shown that the level of cisplatin resistance of eukaryotic cells is correlated to their Cu Isotopic Phenotype. Hence, variations of the Cu Isotopic Phenotype in biopsies of patients treated with cisplatin, specifically the enrichment in heavy Cu isotopes, would signal the setting in of increased resistance to cisplatin. Furthermore, as shown in several recent studies [Balter et al., 2015; Lobo et al., 2016], the heavy Cu isotopes enrichment in the tumor is correlated to a depletion of heavy Cu isotopes compared to healthy subjects, in the circulating fluids of the body such as blood serum or red blood cells. We propose that the heavy Cu isotopes depletion in the circulating fluids is due to the enrichment in heavy Cu isotopes in tumors. To test the validity of this hypothesis, we performed a theoretical isotopic mass balance calculation. We hypothesized the Cu mass conservation in the organism before and during cancer. We used the data from various studies for the Cu mass and the Cu isotopic composition in red blood cells, serum, healthy liver as well as tumoral and peritumoral cells [Albarède et al., 2011; Balter et al., 2015; Lech and Sadlik, 2007]. We calculated the potential percentage of liver affected by cancer by using those data and hypothesizing a mass conservation of Cu between those reservoirs (red blood cells, serum, healthy liver, tumoral and peritumoral liver) before and during cancer. Our calculations showed that a cancer that affects 1 to 6% of the liver can change the blood Cu isotopic composition towards lower values, *i.e.* an enrichment in light Cu isotopes. This result suggests that the enrichment in heavy Cu isotopes in cancerous cells might affect the blood Cu isotopic composition. Thus, in patients undergoing cisplatin chemotherapy, monitoring the Cu Isotopic Phenotype of their blood would constitute a non-invasive method to monitor the emergence of cisplatin resistance. This could be achieved in two or three sets of successive analyses: i) prior the treatment to obtain the baseline Cu Isotopic Phenotype of the patient, ii) during treatment a downwards shift would testify effective uptake of cisplatin by tumor cells, and iii) after each cycle of chemotherapy, the patient's blood Cu Isotopic Phenotype would be expected to reach higher values than baseline if the treatment was effective. Outside of treatment periods, any increase in tumor Cu Isotopic Phenotype, thus any decrease in blood Cu Isotopic Phenotype, would reflect the appearance of cisplatin resistance. More research would be required in order to develop this tool as a cisplatin resistance biomarker. Firstly, one would need to determine the time window needed for the disappearance of the cisplatin impact on the Cu Isotopic Phenotype of the patients due to treatment. Secondly, validating this tool will require the monitoring of a large cohort of healthy and cancer patients treated or not with cisplatin. Importantly, such a validation phase could not have been envisioned in the past years because of the heavy workload necessary for isotopic analysis, but nowadays it begins to become feasible thanks to key developments in automated Cu separation systems, e.g. in [Enge et al., 2016].

4.2.4 Conclusion

In this study, we proved by using *Saccharomyces cerevisiae* isogenic strains that the natural Cu isotopic composition is correlated with the cells' resistance degree to cisplatin (an anti-tumoral drug). In fact, higher resistance to cisplatin are correlated to higher δ^{65}Cu values. Here, we experimentally confirmed our hypothesis that the presence of cisplatin in the growth medium leads to lower Cu uptake through high-affinity Cu importers, and therefore leads to an increase of the cellular δ^{65}Cu. We found that the difference in the cellular δ^{65}Cu between cells treated or not treated with cisplatin is lower when cells are more resistant to cisplatin. Finally, we proposed a medical application for our findings. The degree of cisplatin resistance after cisplatin treatment would be proportionnal to the degree of heavy copper enrichment in tumoral cells and perhaps to the degree of light copper enrichment in blood compared to those copper isotopic composition before the cisplatin treatment.

Supplementary information

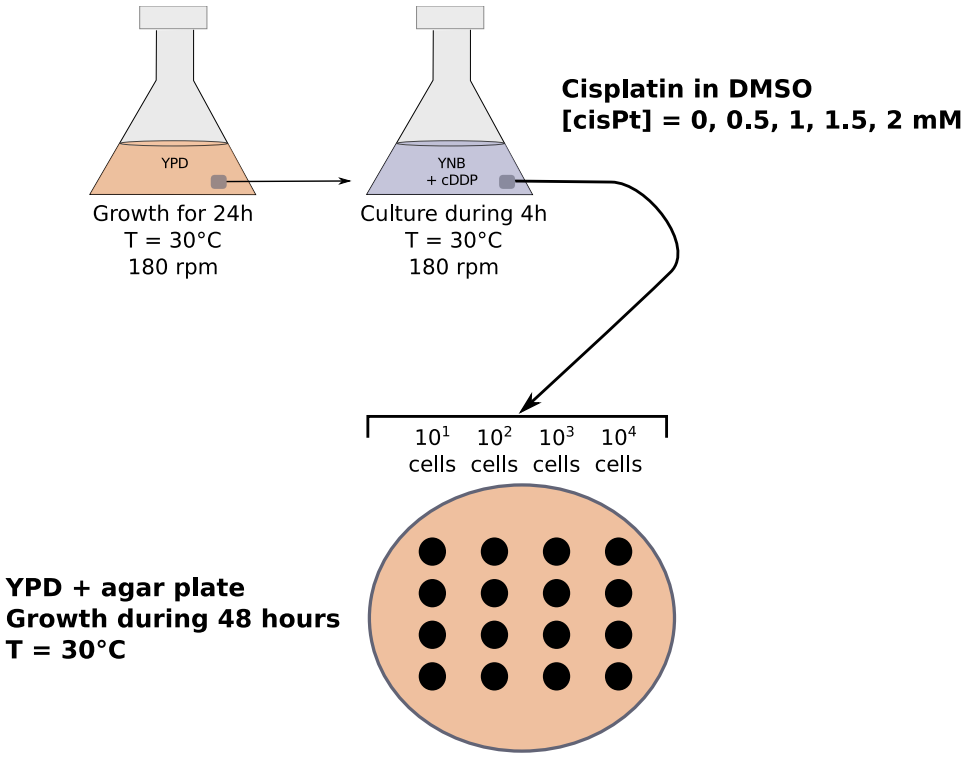
Supp. Table S4.1 – Saccharomyces cerevisiae *strains genotype.*

Strain	Genotype	Reference
DTY 165	MATα ura3-52 his6 leu2-3,-112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ	Li et al. [1996]
SKY 34	MATα gal1 trp1-1 his3 ade8 CUP1^r ctr1::TRP1 mac1Δ	Peña et al. [2000]
ctr1Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ ctr1::KanM	Cadiou et al. [in preparation-1]
ctr3Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ ctr3::KanM	Cadiou et al. [in preparation-1]
fre1Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ fre1::KanM	Cadiou et al. [in preparation-1]
fre2Δ	MATα ura3-52 his6 leu2-3,- 112 his3-Δ200 trp1-901 lys2-801 suc2-Δ fre2::KanM	Cadiou et al. [in preparation-1]

Supp. Table S4.2 – *Calculation of the potential Cu flux (φ^{0-60}_{HAIp}) across high-affinity copper importers when cells were treated with 0.5 mM of cisplatin.*

We reported the Cu Isotopic Phenotype (CuIP) measured in cells treated with cisplatin ($CuIP_{+cisplatin}$) and not treated cells (CuIP, published in Cadiou et al. [in preparation-1]). We estimated the potential Cu flux across high-affinity importers by using the relation described in Cadiou et al. [in preparation-1]: $\delta^{65}Cu = -1.91 \times \varphi^{0-60}_{HAIp} + 0.122$.

Strain	CuIP	$CuIP_{+cisplatin}$	φ^{0-60}_{HAIp}
DTY 165	-1.51±0.18‰	0.18±0.14‰	-0.03
ctr1Δ	-1.22 ±0.24‰	0.06±0.19‰	0.03
fre1Δ	-0.65±0.21‰	0.57±0.28‰	Not applicable
SKY 34	-0.12±0.21‰	0.09±0.23‰	0.02



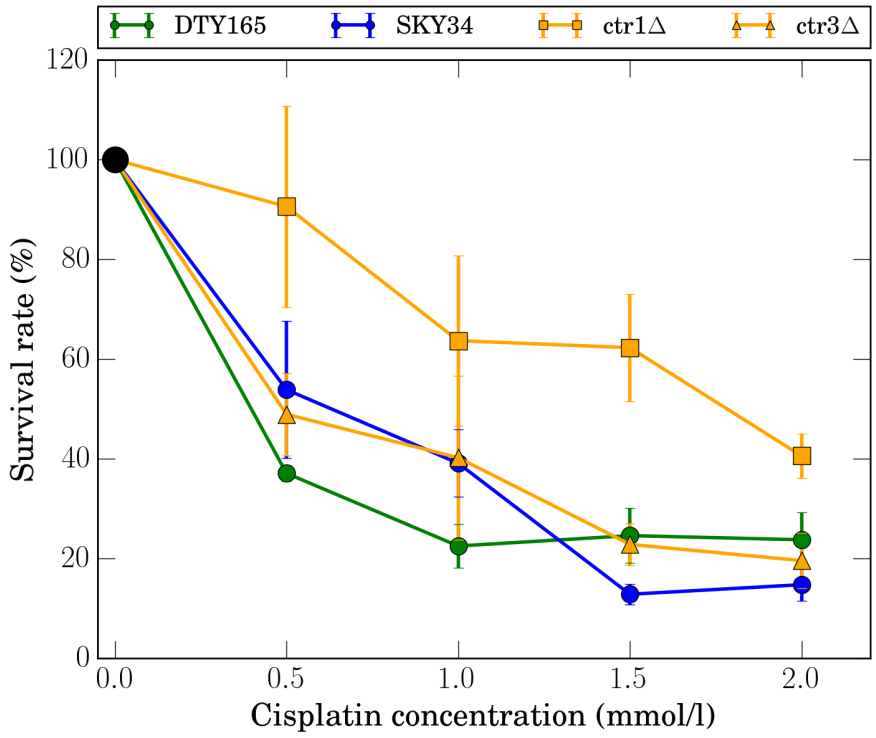
Supp. Figure S4.1 – *Cisplatin cytotoxic assay procedure.*

Cells were grown in YPD and harvested at the late exponential phase after 24 hours. Then, cells were cultured in a medium with YNB-20% D-Glucose at various concentration of cisplatin (cisPt). The cisplatin solution was made in dimethylsulfoxyde (DMSO). After 4 hours, cells were plated in YPD-agar at different cell concentrations. Colonies were grown for two days at 30°C and counted after that.

Supp. Table S4.3 – *Copper concentration ([Cu]) after 240 min. of experiments in* Saccharomyces cerevisiae *cells treated with cisplatin (+cisplatin) and cells untreated.*

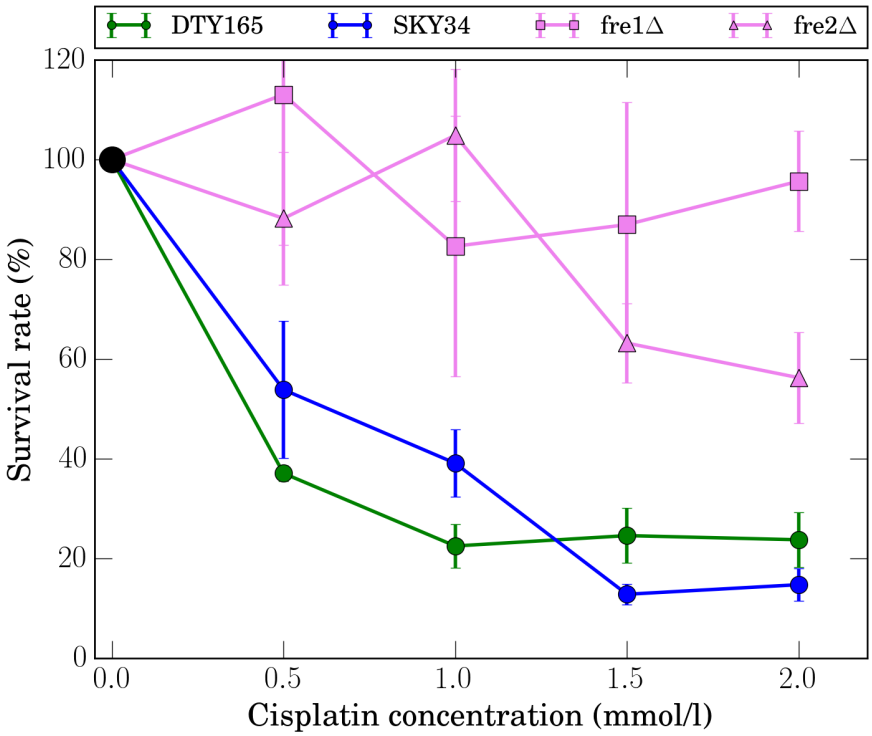
We measured the Cu concentration after 240 min. of uptake in a wild type strain (DTY165), a mac1Δ strain, a high-affinity Cu importer knockout strain (ctr1Δ) and a Cu reductase knockout strain (fre1Δ). Cu concentration value in cells untreated or treated with cisplatin respectively corespond to the average of Cu concentration after 240 min. of uptake in three independent experiments or in two independent experiments.

Strain	[Cu] (pmol/l/10^6cells)	[Cu] (+ cisplatin) (pmol/l/10^6cells)
DTY165	13.1±6	3.8±1
SKY34	5.34±0.06	6.5±1.8
ctr1Δ	10.4±5	6.8±2.7
fre1Δ	10.8±2.3	9.7±1.9



Supp. Figure S4.2 – *Survival rate after cisplatin (cisPt) treatment in wild type (green) and two high-affinity Cu importers knockout (ctr1Δ: orange squares and ctr3Δ: orange triangles)* Saccharomyces cerevisiae *strains.*

The survival rate is defined as the number of colony formation units (cfu) after cisplatin treatment divided by the number of cfu for cells cultivated in the same conditions but without cisplatin (reported in %). Each point correspond to the average cfu of three deposits (see Supplementary Figure S4.1 for details).



Supp. Figure S4.3 – ***Survival rate (in %) after cisplatin treatment in wild type (green)and two Cu reductases knockout (fre1Δ: pink squares and fre2Δ: pink triangle)*** **Saccharomyces cerevisiae** ***strains.***

The survival rate is defined as the number of colony formation units (cfu) after cisplatin treatment divided by the number of cfu for cells cultivated in the same conditions but without cisplatin (reported in %). Each point correspond to the average cfu of three deposits (see Supplementary Figure S4.1 for details).

CHAPITRE 5

Conclusion générale

Résumé du chapitre : *Ce travail de recherche a permis de montrer que le fractionnement isotopique du cuivre observé dans les cellules est dû à son import par les importateurs à haute affinité du cuivre. Cette relation permet d'envisager le développement de biomarqueur pronostique et diagnostique non-invasif du développement du cancer du foie et de l'apparition de résistance aux chimiothérapies à base de platine.*

La composition en isotopes stables du cuivre (Cu) a été étudiée chez l'Homme, sur des individus sains et des individus atteints de maladie affectant le métabolisme du Cu (maladie de Wilson, maladies du foie, de cancers) [Aramendía et al., 2013; Balter et al., 2015; Lauwens et al., 2016; Lobo et al., 2016; Telouk et al., 2015]. Chez l'homme, le développement de maladies liées au métabolisme du Cu entraîne un changement de la composition isotopique du Cu des cellules tumorales et du sang [Balter et al., 2015; Costas-Rodriguez et al., 2016; Lobo et al., 2016; Telouk et al., 2015]. Par exemple, le développement d'un cancer du foie est accompagné d'un enrichissement en isotopes lourds du Cu dans les cellules tumorales par rapport aux cellules péri-tumorales [Balter et al., 2015]. Parallèlement à ces changements à l'échelle cellulaire, un enrichissement en isotopes légers du Cu dans les globules rouges a été observé [Balter et al., 2015]. Dans quatre types de cancers, une diminution du δ^{65}Cu ($\delta^{65}Cu = (^{65}Cu/^{63}Cu)_{échantillons}/ (^{65}Cu/^{63}Cu)_{référence} - 1] \times 1000$) dans le sang a été observée corrélativement au développement de la maladie. Ainsi, le suivi du δ^{65}Cu du sang a été proposé comme un biomarqueur potentiel de la carcinogenèse. L'origine protéique de cette corrélation entre le développement de cancers et le changement de composition isotopique du sang et des cellules tumorales est très discutée et aucun résultat expérimental n'expliquait cette différence. Durant cette thèse, j'ai cherché à comprendre les mécanismes biologiques à l'origine des fractionnements isotopiques du Cu observés dans les cellules eucaryotes afin de construire un modèle prédictif de l'effet de la présence ou de l'absence des protéines membranaires transportant le Cu sur la composition isotopique globale de la cellule. Pour cela, j'ai utilisé la levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae* : *S. cerevisiae*) comme organisme modèle.

Lors de mes travaux, j'ai fait l'hypothèse que l'enrichissement en isotopes légers du Cu des cellules se fait lors du transport du Cu entre le milieu extra-cellulaire et le milieu cellulaire. Après son entrée active dans la cellule, le Cu peut être activement excrété. Les conditions expérimentales choisies pendant cette thèse permettent de s'affranchir de l'effet des protéines exportatrices du Cu. Avant son entrée dans les cellules de *S. cerevisiae*, le Cu est réduit par des enzymes membranaires appelées protéines Fre [Georgatsou et al., 1997; Hasset and Kosman, 1995]. Le Cu entre ensuite dans la cellule, *via* des transporteurs à haute affinité (protéines Ctr) [Dancis et al., 1994a,b; Peña et al., 2000] et *via* des transporteurs à basse affinité du Cu [Hasset et al., 2000; Liu et al., 1997]. Chez l'homme, le Cu est réduit par des protéines proches des protéines Fre : les protéines STEAP [Ohgami, 2006; Ohgami et al., 2005] et est ensuite transporté par hCtr1p (un analogue des protéines Ctr de levure) [Lee et al., 2000] et par des transporteurs à basse affinité [Nevitt et al., 2012]. Les mécanismes de réduction et d'import du Cu sont ainsi proches entre *S. cerevisiae* et l'Homme. Pour ce qui est de la réduction et de l'import du Cu, les calculs théoriques prédisent un enrichissement en isotopes légers du Cu lié à ces deux phénomènes [Fujii et al., 2013, 2014]. L'un des buts de mon étude était de connaître le fractionnement isotopique lié à la réduction par les réductases ($\epsilon_{reductases}$) et le fractionnement isotopique lié à l'im-

port par les transporteurs du Cu ($\epsilon_{importers}$) (Figure 5.1). Ces deux valeurs dépendent à la fois : (i) du fractionnement isotopique dû à la réduction du Cu ($\delta^{65}Cu_{red}$) et dû à l'import du Cu ($\delta^{65}Cu_{imp}$) et (ii) du flux net de Cu au travers des réductases (φ_{red}) et des importateurs du Cu (φ_{imp}). Si la protéine réduit ou transporte l'intégralité du Cu disponible alors aucun fractionnement isotopique n'a lieu ($\varphi_{red} = 1$ ou $\varphi_{imp} = \varphi_{red}$). Le δ^{65}Cu de la cellule est lié à ces coefficients par l'équation de conservation de la masse (*"isotopic mass balance equation"*) où le δ^{65}Cu est égal à la somme du produit de la fraction de Cu transportée par la protéine i (φ_i) par le fractionnement isotopique lié à chaque protéine ($\delta^{65}Cu_i$) :

$$\delta^{65}Cu_{cell} = \sum_i \varphi_i \delta^{65}Cu_i \tag{5.1}$$

Par ailleurs, les protéines impliquées dans le transport et la réduction du Cu sont très proches entre *S. cerevisiae* et l'Homme [Nevitt et al., 2012]. Par conséquent, la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine du fractionnement isotopique du Cu chez la levure pourra être transposée à l'Homme. Ceci devrait permettre de comprendre l'origine biologique de la différence de composition isotopique du Cu entre les cellules cancéreuses et les cellules saines. Le but de cette thèse était de comprendre l'origine des fractionnements isotopiques du Cu observés dans les cellules cancéreuses *via* l'utilisation de différents mutants de levure.

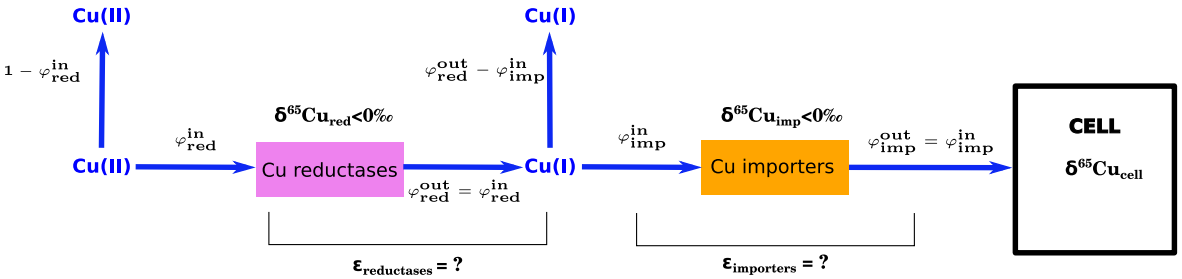


FIGURE 5.1 – ***Modèle théorique de l'origine du fractionnement isotopique du Cu lors de l'entrée du Cu dans la cellule.***

Une fraction du Cu(II) disponible pour les réductases est réduit (φ^{in}_{red}). La réduction du Cu entraîne dans les conditions cellulaires un enrichissement en isotopes légers du Cu ($\delta^{65}Cu_{red} < 0$‰). Ce fractionnement est réalisé si et seulement si le flux net de Cu au travers des réductases est inférieur à 1. Le fractionnement associé à la réduction du Cu par les réductases dépendra du flux de Cu par les réductases (φ^{in}_{red}) et est noté $\epsilon_{reductases}$. De même, l'entrée du Cu par les importateurs à haute affinité et à basse affinité entraîne un enrichissement théorique en isotopes légers du Cu ($\delta^{65}Cu_{imp}$) si et seulement si le flux au travers des importateurs (φ^{in}_{imp}) est inférieur au flux net au travers des réductases (φ^{in}_{red}). Le facteur de fractionnement associé à l'import du Cu par les importateurs est noté $\epsilon_{importers}$. L'un des buts de cette thèse était de connaître l'effet de la réduction ($\epsilon_{reductases}$) et de l'import actif du Cu ($\epsilon_{importers}$) sur la composition isotopique de la cellule ($\delta^{65}Cu_{cell}$).

5.1 Observation d'un phénotype isotopique du cuivre

Avant de comprendre l'effet de l'import du Cu et de sa réduction sur le fractionnement isotopique en Cu il convenait de vérifier que la levure est un organisme modèle de l'enrichissement en isotopes légers du Cu observé dans de nombreux organismes eucaryotes [Balter et al., 2013; Navarrete et al., 2011]. Pour cela, il fallait vérifier que l'ajout de Cu dans le milieu de culture de la souche sauvage de *S. cerevisiae* entraînait un enrichissement en isotopes légers du Cu dans la cellule (un δ^{65}Cu négatif). Dans une première étude, j'ai montré que la souche sauvage est enrichie en isotopes légers du Cu après 240 mn. en présence de 80 µM de Cu (δ^{65}Cu = -0.9‰, Chapître 2, Figure 5), faisant de *S. cerevisiae* un bon outil pour la compréhension des mécanismes sous-tendant les fractionnements isotopiques en Cu observés chez l'Homme.

J'ai ensuite étudié l'évolution du δ^{65}Cu dans différentes souches de levures. Ces souches présentaient une mutation dans les gènes codant pour une ou plusieurs réductases du Cu, codant pour un ou plusieurs importateurs du Cu, codant pour l'exportateur du Cu ou codant pour le facteur de transcription MAC1. Il est à noter que dans l'intégralité de mes études, les gènes codant pour les protéines transportant le Cu n'ont pas été modifiés. Ainsi, la structure de ces protéines est restée identique. Or, le fractionnement isotopique du Cu lié aux protéines est dû à leurs activités. Donc, le fractionnement isotopique du Cu dû à une protéine sera vraisemblablement le même quelle que soit la souche considérée. Pour toutes les souches, j'ai observé que le δ^{65}Cu atteint une valeur d'équilibre qui dépend du génotype de la levure. A ce génotype particulier est associé un protéome particulier. Ainsi, chaque protéome présente un δ^{65}Cu spécifique. Cette propriété est identique à celle d'un phénotype au sens biologique du terme. J'ai alors proposé de définir la valeur du δ^{65}Cu à l'équilibre isotopique ($\delta^{65}Cu_{plateau}$) comme étant le phénotype isotopique du Cu (« *Copper Isotopic Phenotype* » ou CuIP, chapitre 3). La valeur de ce phénotype correspond à la valeur du $\delta^{65}Cu_{cell}$ à l'équilibre présenté dans le modèle théorique proposé (Figure 5.1)

5.2 Le phénotype isotopique du cuivre est dû à l'import du cuivre par les importateurs à haute affinité et est modulé par la quantité de cuivre réduit

J'ai montré que le phénotype isotopique du Cu dépend du génotype. Il convient alors de comprendre les mécanismes biologiques à l'origine de ce phénotype. Lors de mes expériences, l'export du Cu est négligeable devant l'import du Cu. Ainsi, seuls deux phénomènes cellulaires peuvent être à l'origine du fractionnement isotopique du Cu : la réduction du Cu et l'import du Cu. Il reste donc à déterminer la part de ces deux phénomènes

dans le fractionnement isotopique du Cu observé dans les cellules.

Pour répondre à cette question j'ai utilisé une souche de *S. cerevisiae* où la quantité d'importateurs à haute affinité et de réductases du Cu était basse : la souche SKY34. La faible expression de ces protéines entraîne un faible flux de Cu au-travers des réductases et des importateurs du Cu. Lors des expériences d'*uptake*, aucun fractionnement isotopique du Cu n'a été observé dans cette souche (le δ^{65}Cu reste proche de 0‰ au cours du temps, Chapître 2, Figure 5 et Chapitre 3, Figure 3.2). Ainsi, lorsque le flux de Cu au travers des protéines membranaires est bas, aucun fractionnement isotopique du Cu n'est observé alors qu'un fractionnement est observé dans la souche sauvage où l'on sait que $\varphi_{imp} \leq \varphi_{red} \leq 1$. Ainsi, dans le modèle de la figure 5.1, le cas de SKY34 correspond à un cas où le flux net de Cu au travers des importateurs du Cu (φ_{imp}) est égal au flux net de Cu au-travers des réductases du Cu (φ_{red}) lui-même égal à 1 ($\varphi_{red} = 1$). Pour expliquer les résultats obtenus pour DTY165 trois cas sont possible : $\varphi_{imp} = \varphi_{red} < 1$ (cas 1) ou $\varphi_{imp} < \varphi_{red} < 1$ (cas 2) ou $\varphi_{imp} < \varphi_{red} = 1$ (cas 3).

Pour vérifier lequel de ces trois cas est celui observé dans les cellules, j'ai mené une expérience avec SKY34 dans un milieu où le Cu était totalement réduit grâce à l'ajout d'acide ascorbique. Dans cette expérience, seul le Cu(I) est présent dans le milieu cellulaire et seul l'import du Cu peut être responsable du fractionnement isotopique en Cu observé. Dans les expériences *in vivo*, j'ai mesuré un $\delta^{65}Cu_{plateau}$ proche de celui de la souche sauvage. Ceci confirme que c'est le cas 3 qui prévaut et ainsi que c'est l'import du Cu qui est à l'origine du fractionnement isotopique du Cu mesuré. De ce fait, le modèle introductif peut être complété : l'import du Cu entraîne un enrichissement en isotopes légers du Cu ($\epsilon_{importers}$ <0‰ et $\varphi_{imp} < \varphi_{red}$) alors que la réduction du Cu n'a aucun effet ($\epsilon_{reductases}$ = 0‰ et $\varphi_{red} = 1$). Ainsi, l'intégralité du Cu disponible pour les réductases est réduit. La quantité de Cu disponible pour les importateurs dépendra uniquement de l'activité des réductases du Cu. D'après ce modèle, une diminution de la quantité de Cu(I) par une moindre activité de réduction devrait amener à un moindre fractionnement isotopique du Cu et donc à des compositions isotopiques intermédiaires entre la souche sauvage et la souche SKY34.

J'ai alors vérifié le lien entre la quantité de Cu réduit et le δ^{65}Cu mesuré par une approche génétique. Dans le fond génétique de SKY34, j'ai changé le promoteur d'un des gènes codant pour une réductase du Cu (FRE1). En temps normal, ce gène est activé par Mac1p (un facteur de transcription activé par une faible concentration cellulaire en Cu) lorsque la concentration en Cu intracellulaire est faible. Dans le cas de la souche SKY34, l'absence de MAC1 entraîne une faible expression du gène FRE1. Pour s'affranchir de l'effet de MAC1, j'ai rendu l'expression de FRE1 indépendante de MAC1 et dépendante d'un promoteur constitutif (souche SKY FRE). La capacité de la souche SKY FRE à réduire le Cu y a ainsi été augmentée et est comprise entre la capacité de la souche sauvage et de la souche SKY34 (Chapitre 2, Figure 4) . D'après le modèle proposé (Figure 5.2), je m'at-

tendais à un δ^{65}Cu intermédiaire entre SKY34 et la souche sauvage. C'est ce que j'ai observé (Chapitre 2, Figure 5). Par ailleurs, j'ai muté les gènes codants pour une des deux réductases du Cu (Fre1p et Fre2p) dans le fond génétique de la souche sauvage. La souche FRE1 mutée (fre1Δ) présente une capacité à réduire le Cu intermédiaire entre la souche sauvage et la souche SKY34. Tandis que la souche FRE2 mutée (fre2Δ) a une capacité à réduire le Cu supérieure à la souche sauvage (Chapître 3, Figure 3.6). D'après le modèle proposé (Figure 5.2), le $\delta^{65}Cu_{plateau}$ de la souche fre1Δ devrait être intermédiaire entre la souche sauvage et de la souche SKY34 tandis que la souche fre2Δ devrait avoir un $\delta^{65}Cu_{plateau}$ proche de celui de la souche sauvage. Ceci a été vérifié *in vivo* (Chapître 3, Figure 3.3) où :

- $\delta^{65}Cu_{plateau}(fre1\Delta) = -0.65 \pm 0.21‰ >> \delta^{65}Cu_{plateau}(WT) = -1.51 \pm 0.18‰$
- $\delta^{65}Cu_{plateau}(fre2\Delta) = -1.27 \pm 0.24‰ > \quad \delta^{65}Cu_{plateau}(WT) = -1.51 \pm 0.18‰$

Les résultats obtenus pour les souches SKY FRE, fre1Δ et fre2Δ confirment les prédictions du modèle. Ainsi, le Cu disponible pour les réductases est réduit dans son intégralité et aucun fractionnement isotopique du Cu n'est lié à l'activité des réductases du Cu ($\varphi_{red} = 1$). Une partie constante du Cu(I) est transportée par chaque importateur du Cu (φ_{imp} est constant). Si la quantité de Cu(I) est faible alors la quasi-intégralité de ce Cu disponible pour les importateurs entrera dans la cellule ($\varphi_{imp} \simeq \varphi_{red} = 1$) : le fractionnement isotopique du Cu ne pourra être réalisé (c'est le cas de SKY34). Inversement si la quantité de Cu(I) est grande (si $\varphi_{imp} << \varphi_{red}$), alors le fractionnement isotopique sera grand (c'est le cas de la souche DTY165 et de la souche fre2Δ). Si, la quantité de Cu(I) disponible est intermédiaire (si $\varphi_{imp} < \varphi_{red}$) alors le fractionnement isotopique du Cu sera intermédiaire (cas des souches SKY FRE et fre1Δ).

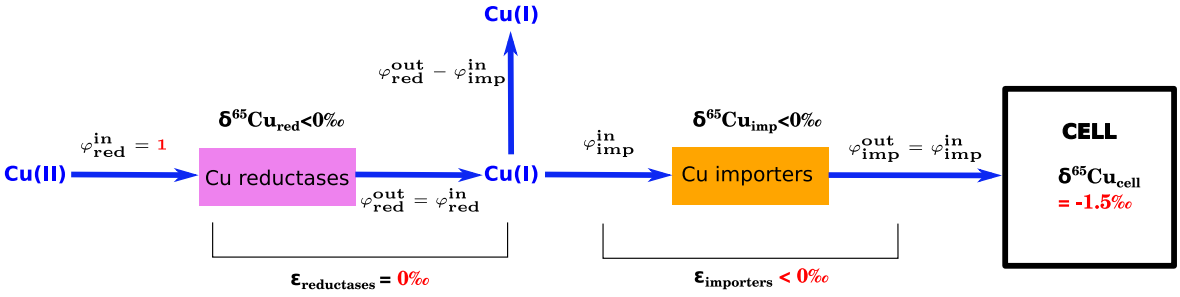


FIGURE 5.2 – ***Le fractionnement isotopique observé dans les cellules eucaryotes est dû à l'import du cuivre et est modulé par la réduction du cuivre.***

Le flux de Cu au travers des réductases du Cu est égal à la quantité de Cu disponible pour les réductases. Ainsi, $\varphi^{in}_{red} = 1$ *et par conséquence* $\epsilon_{reductases} = 0‰$. *Par contre, le flux de Cu au travers des importateurs est inférieur ou égal au flux de Cu par les réductases* ($\varphi^{in}_{imp} \leq \varphi^{out}_{red}$). *Le fractionnement isotopique du Cu lié à l'import du Cu* ($\epsilon_{importers}$) *sera négatif.*

Chez *S. cerevisiae*, le fractionnement isotopique du Cu est donc réalisé par les importateurs du Cu. Il restait alors à comprendre l'effet de chaque importateur du Cu sur le fractionnement isotopique du Cu. Chez la levure, le Cu entre dans les cellules par les importateurs à haute affinité (Ctr1p et Ctr3p) et par des transporteurs à basse affinité (« *Low affinity Cu importers*» abrégé en LAIp). D'après les résultats précédents un ou plusieurs de ces transporteurs est à l'origine du fractionnement isotopique en Cu. Pour comprendre l'effet de chacun de ces transporteurs sur la composition isotopique cellulaire, j'ai muté les gènes codant pour les deux importateurs à haute affinité du Cu. Dans les deux cas, la composition isotopique du Cu après 240 mn. est intermédiaire entre la composition observée dans la souche sauvage et celle de la souche SKY34 (Chapitre 3, Figure 3.4). Dans un second temps, j'ai muté l'exportateur vacuolaire du Cu (Ccc2p). Cette mutation a pour effet de réprimer le facteur de transcription MAC1 et ainsi de réprimer la transcription de CTR1 et CTR3. La quantité de transporteurs à haute affinité du Cu dans la membrane y est donc diminuée. Étant donné que le fractionnement isotopique du Cu est inversement corrélé au flux de Cu au travers des importateurs (équation 5.1), je m'attendais à une augmentation du δ^{65}Cu cellulaire dans cette souche où les importateurs sont sous-exprimés. Cette augmentation a été vérifiée *in vivo* (Chapitre 3, Figure 3.5). Ainsi, le fractionnement isotopique du Cu observé dans la souche sauvage est en partie dû à l'import du Cu par les transporteurs à haute affinité.

Il restait alors à quantifier l'effet de chacun des transporteurs à haute affinité sur la composition isotopique du Cu. Dans la souche ctr3Δ où seul l'importateur Ctr1p est présent, la valeur du $\delta^{65}Cu_{plateau}$ est de -0.76 ± 0.23‰. Cette valeur est très supérieure au $\delta^{65}Cu_{plateau}$ de la souche sauvage ($\delta^{65}Cu_{plateau} = -1.51 \pm 0.18$‰). Ainsi, l'activité de Ctr1p n'explique qu'une partie du phénotype isotopique observé. J'ai également observé que la souche CTR3 mutée a un $\delta^{65}Cu_{plateau}$ supérieur à la souche CTR1 mutée (-1.22 ± 0.24‰). Cette valeur est relativement proche de celle mesurée dans la souche sauvage ($\delta^{65}Cu_{plateau} = -1.51 \pm 0.18$‰). Par conséquent, l'effet de Ctr3p sur le fractionnement isotopique du Cu est supérieur à l'effet de Ctr1p et son activité dans la souche ctr1Δ permet quasiment de reproduire le phénotype isotopique du Cu de la souche sauvage. Le modèle de la partie précédente peut ainsi être affiné en considérant l'ensemble des importateurs du Cu. Les résultats précédents montrent que $\epsilon_{Ctr3p} < \epsilon_{Ctr1p} < 0$‰.

Afin d'estimer l'effet exact de chacun des importateurs du Cu sur la composition isotopique du Cu de la cellule, j'ai résolu par itération l'équation de conservation de la masse isotopique du Cu. Cette équation a été résolue pour la souche sauvage et les souches isogéniques présentant une mutation d'un gène codant soit pour un importateur, soit pour une réductase ou pour l'exportateur du Cu. Cette équation lie le δ^{65}Cu de la cellule aux flux relatifs de Cu entrant dans la cellule par les différents transporteurs multipliés par les fractionnements isotopiques associés à chaque transporteur (équation 5.1). Au vu des résultats précédents, j'ai fait l'hypothèse que le facteur de fractionnement ϵ lié à Ctr1p, à

Ctr3p et aux LAIp est négatif. J'ai estimé les flux de Cu au travers des différents importateurs grâce aux résultats expérimentaux. La résolution de ce système d'équation, donne les solutions numériques suivantes : $\epsilon_{Ctr3p} = -1.80 < \epsilon_{Ctr1p} = -1.49 < \epsilon_{LAIp} = -0.04‰$. Ces solutions numériques vérifient ainsi l'hypothèse de départ obtenue grâce aux données obtenues *in vivo* ($\epsilon_{Ctr3p} < \epsilon_{Ctr1p} < 0‰$).

Ces différents facteurs de fractionnement permettent de calculer indépendamment des résultats obtenus *in vivo*, la fraction du Cu importée passant au travers des importateurs à haute affinité du Cu (φ_{HAIp}). J'ai alors trouvé une relation linéaire entre le $\delta^{65}Cu_{plateau}$ et la fraction de Cu transportée au travers des importateurs à haute affinité pour toutes les souches simplement mutées. Cette équation est donnée dans le chapitre 3, figure 3.8 et est :

$$\delta^{65}Cu_{plateau} = -1.91 \times \varphi_{HAIp} + 0.122 \tag{5.2}$$

J'ai ensuite utilisé les valeurs calculées du δ^{65}Cu associées à chaque importateur, les valeurs calculées de la fraction de Cu entrant par les importateurs à haute affinité et le flux de Cu mesuré dans les cellules comme paramètres d'entrées à un modèle de boîtes à l'équilibre. J'ai montré que ce modèle numérique reproduit l'évolution de la quantité de Cu et le δ^{65}Cu cellulaire observés *in vitro*.

Le modèle proposé précédemment (Figure 5.2) peut ainsi être étoffé en ajoutant les coefficients de fractionnements associés à chaque importateur du Cu (chiffres en rouge de la Figure 5.3).

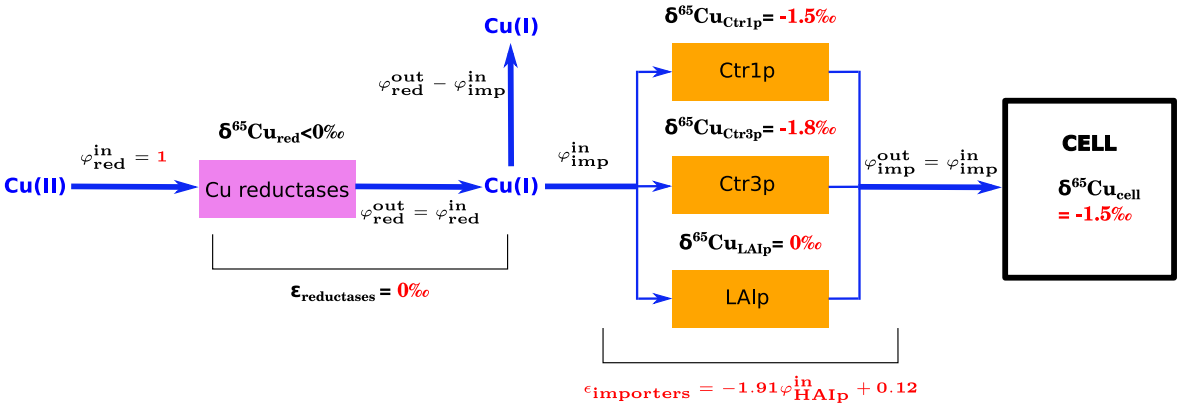


FIGURE 5.3 – ***La composition en isotopes stables du cuivre de la cellule dépend linéairement du flux de cuivre au travers des importateurs à haute affinité du cuivre (HAIp).***
Le fractionnement isotopique du Cu se fait lors de l'import du Cu par les importateurs à haute affinité. Les importateurs à haute affinité (Ctr1p et Ctr3p) sont majoritairement à l'origine de l'enrichissement en isotopes légers de la cellule ($\delta^{65}Cu_{Ctr1p}$ = -1.49‰ et $\delta^{65}Cu_{Ctr3p}$ = -1.81‰ respectivement). Les importateurs à basse affinité (LAIp) n'enrichissent quasiment pas la cellule en isotopes légers du Cu ($\delta^{65}Cu_{LAIp}$ = -0.04‰). Une relation linéaire entre le flux net de Cu au travers des importateurs à haute affinité (φ_{HAIp}) et le δ^{65}Cu cellulaire a pu être mis en évidence.

J'ai proposé un modèle explicatif et prédictif de l'origine du fractionnement isoto-

pique en Cu dans les cellules. Cependant, deux souches étudiées lors de ces études contredisent le modèle proposé. La première est la souche MPY17 où les deux importateurs à haute affinité du Cu sont absents. D'après le modèle proposé cette souche devrait présenter un phénotype isotopique du Cu proche de celui de SKY34. Toutefois, cette souche a le même phénotype isotopique du Cu que la souche sauvage (Chapître 2, Figure 2). La seconde souche est doublement mutée dans les deux réductases du Cu (souche fre1-2Δ). Elle présente une faible activité de réduction du Cu. Ainsi, le modèle prévoit un phénotype isotopique du Cu analogue à celui de SKY34. Cependant, j'ai observé une composition isotopique du Cu proche de celle de la souche sauvage (Chapitre 3, Figure 3.3). Pour que le modèle proposé reste valable, il s'agit de trouver une explication plausible à ces deux contre-exemples. Contrairement à SKY34 ces deux souches portent encore le gène MAC1. Si la concentration intracellulaire du Cu est faible alors ce gène active l'expression d'autres protéines de type Ctr. L'une de ces protéines est la protéine Ctr2p [Liu et al., 2012] : l'importateur du Cu vacuolaire. Tout comme pour les autres protéines Ctr, l'import du Cu par Ctr2p est précédé par une réduction du Cu *via* la protéine Fre6p. Dans des cellules souches humaines dont l'importateur hCtr1p était absent une relocalisation plasmique du transporteur hCtr2p a été observée [Bertinato et al., 2008]. Si cette relocalisation est confirmée dans les souches fre1-2Δ et MPY17 étudiées dans cette thèse alors le modèle proposé s'appliquerait à toutes les protéines de type Ctr.

5.3 Lien entre le phénotype isotopique du cuivre et le phénotype de résistance au cisplatine

J'ai montré précédemment que le phénotype isotopique dépend de la fraction de Cu importé par les importateurs à haute affinité. Afin d'utiliser le phénotype isotopique du Cu comme biomarqueur, il restait à relier ce phénotype à un phénotype cellulaire portant un intérêt médical.

Lors du traitement du cancer, le cisplatine est communément utilisé. De nombreux cancers présentent une apparition progressive d'une résistance au traitement [Kelland, 2007]. Or, l'entrée de cette molécule est médiée par les importateurs du Cu [Ishida et al., 2002; Song et al., 2004]. De plus, la mutation ou la dérégulation des importateurs du Cu entraîne une plus grande résistance au traitement. Les différentes souches de levure que j'ai utilisées dans cette étude devaient donc être plus résistantes au cisplatine. Pour vérifier cela, j'ai mesuré la croissance des levures après traitement avec des quantités croissantes de cisplatine. J'ai montré que les souches isogéniques simplement mutées étaient toutes plus résistantes au traitement à base de cisplatine que la souche sauvage (Figure 5.4b). Ces souches se caractérisent par un phénotype isotopique du Cu plus élevé que la souche sauvage (Figure 5.4a). Ainsi, une souche de levure résistante au cisplatine aura un

phénotype isotopique du Cu plus élevé que la souche sauvage.

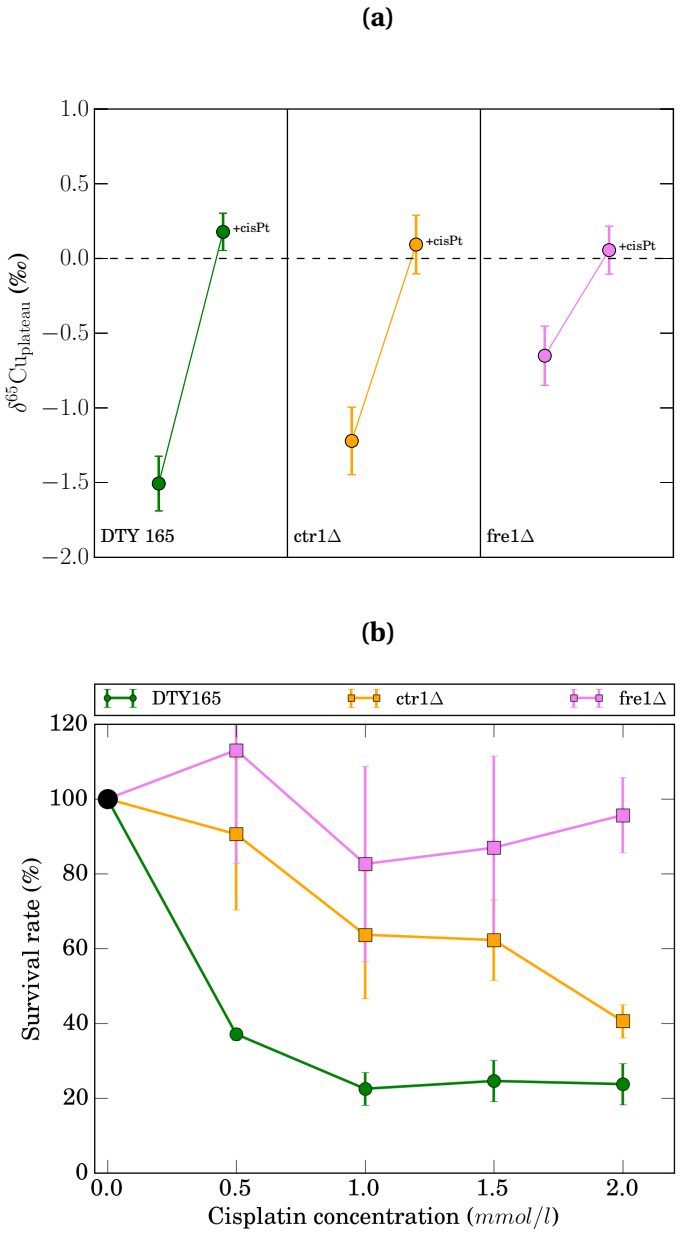


FIGURE 5.4 – ***Composition isotopique du cuivre de cellules de* Saccharomyces cerevisiae *cultivées en présence et en absence de cisplatine et sensibilité de ces souches au cisplatine.***

Ici, trois souches de levure ont été comparées : une souche sauvage (DTY 165), une souche où l'importateur CTR1 a été muté (ctr1Δ) et une souche où une des réductases du Cu a été mutée (fre1Δ).

(a) Moyenne des valeurs de la composition isotopique du Cu après deux heures d'expériences ($\delta^{65}Cu_{plateau}$). Ici, des cellules cultivées en présence de 0.5 mM de cisplatine (+cisPt) et en l'absence de cisplatine ont été comparées.

(b) Nombre de colonies de levures (reporté en % de survie) après un traitement au cisplatine et une culture pendant 48 heures.

Les cellules résistantes au cisplatine présentent une valeur du δ^{65}Cu plus élevée que la souche sauvage sensible. Le cisplatine entraîne une augmentation du δ^{65}Cu. Cette augmentation est d'autant plus forte que la souche est sensible au cisplatine.

Afin de comprendre l'effet du cisplatine sur la composition isotopique du Cu des levures, j'ai suivi le δ^{65}Cu des cellules de trois souches de levure après ajout de 0.5 mM de cisplatine et 80 µM de Cu. Pour toutes ces souches, l'ajout de cisplatine entraîne une augmentation du δ^{65}Cu cellulaire (Figure 5.4a).

J'ai montré précédemment que l'ajout de cisplatine au milieu de culture entraîne un enrichissement en isotopes lourds du Cu. Je me suis alors intéressé à l'amplitude de cet enrichissement en fonction du profil de résistance. Pour les souches isogéniques, j'ai montré que cette amplitude est d'autant plus petite que la souche est résistante au cisplatine (Figure 5.4a).

Les souches isogéniques résistantes au cisplatine présentent ainsi un phénotype isotopique du Cu plus élevé. Par ailleurs, le traitement entraîne une augmentation de ce phénotype d'autant plus petit que la souche est résistante au cisplatine. Or, les mécanismes d'import et de réduction du Cu sont très conservés entre *S. cerevisiae* et l'homme [Nevitt et al., 2012]. Les résultats obtenus sont probablement transposables à l'homme. Si tel est le cas, alors l'acquisition d'une résistance au cisplatine durant le traitement devrait aboutir à une augmentation du δ^{65}Cu tumoral par rapport à cette valeur mesurée avant le traitement. Si mes résultats sont applicables à l'homme, le suivi du δ^{65}Cu dans les tumeurs des patients après un traitement au cisplatine pourrait marquer l'apparition d'une résistance au traitement. Le suivi du δ^{65}Cu serait le premier biomarqueur médical à marquer l'apparition d'une résistance acquise aux chimiothérapies à base de Pt.

5.4 Utilisation potentielle du phénotype isotopique du cuivre comme biomarqueur prédictif du cancer

La proximité structurale et fonctionnelle des réductases du Cu et des protéines Ctr humaines et de levures permet d'envisager la transposition de mes résultats aux cellules humaines. La quantité de STEAP 3 (une des réductases du Cu humaine) dans la membrane de cellules hépatiques et son expression génique cellulaire diminue lors de la transition d'une cirrhose vers un cancer hépatique (Figure 5.5d, Caillot et al. [2009]; Coulouarn et al. [2005]). Ce changement est d'autant plus drastique que le cancer est grave. La quantification de STEAP 3 dans les biopsies de patients atteints de cirrhose ou d'hépatocarcinomes est ainsi un marqueur pronostique de l'évolution du cancer. Parallèlement, le δ^{65}Cu d'hépatocarcinomes est plus élevé que le δ^{65}Cu des cellules péri-tumorales des mêmes patients (Figure 5.5c, Balter et al. [2015]). Mes études ont montré qu'une diminution de la quantité de Cu réduit par les réductases (Figure 5.5b) module la quantité de Cu disponible pour les importateurs et entraîne une diminution du δ^{65}Cu cellulaire (Figure 5.5a). Ceci suggère que l'augmentation du δ^{65}Cu observé dans les hépatocarcinomes peut être lié à une diminution de la quantité de STEAP3 dans la membrane cellulaire. Si des études cou-

plées de la quantité de STEAP3 membranaire et du δ^{65}Cu tumoral confirmaient ce lien alors la mesure du δ^{65}Cu tumoral serait un biomarqueur pronostique de la transition de la cirrhose vers le cancer. De plus, il est à noter que l'étude du δ^{65}Cu de tumeurs et de globules rouges de deux cohortes de patients atteints d'hépatocarcinomes a montré une anti-corrélation entre ces deux valeurs [Balter et al., 2015]. La force de l'outil isotopique réside dans le fait que l'augmentation du δ^{65}Cu dans les tumeurs est corrélée à une diminution significative de cette valeur dans les globules rouges. A l'aune des résultats obtenus pour *S. cerevisiae* il est possible que le suivi du δ^{65}Cu des globules rouges puisse être un biomarqueur pronostique de la transition de la cirrhose vers le cancer. Cette approche permettrait un suivi longitudinal des patients, et ce, sans biopsie.

Dans le cancer du sein et le cancer colo-rectal une diminution du δ^{65}Cu mesuré dans le sérum a été observé [Telouk et al., 2015]. Si cette diminution est corrélée à une augmentation de la valeur tumorale de ce marqueur, alors le δ^{65}Cu sanguin pourrait être utilisé pour tracer une variation du δ^{65}Cu des organes. Mes études prévoient que l'apparition d'une résistance au cisplatine des cellules tumorales durant le traitement entraînerait une augmentation du δ^{65}Cu de la tumeur. Si les hypothèses précédentes sont correctes alors cette augmentation pourrait être tracée par une diminution du δ^{65}Cu sanguin. Ceci marquerait le début du développement d'un biomarqueur pronostique sanguin de la résistance des tumeurs aux traitements ce qui permettrait d'adapter rapidement le traitement à chaque individu au cours du développement de la maladie.

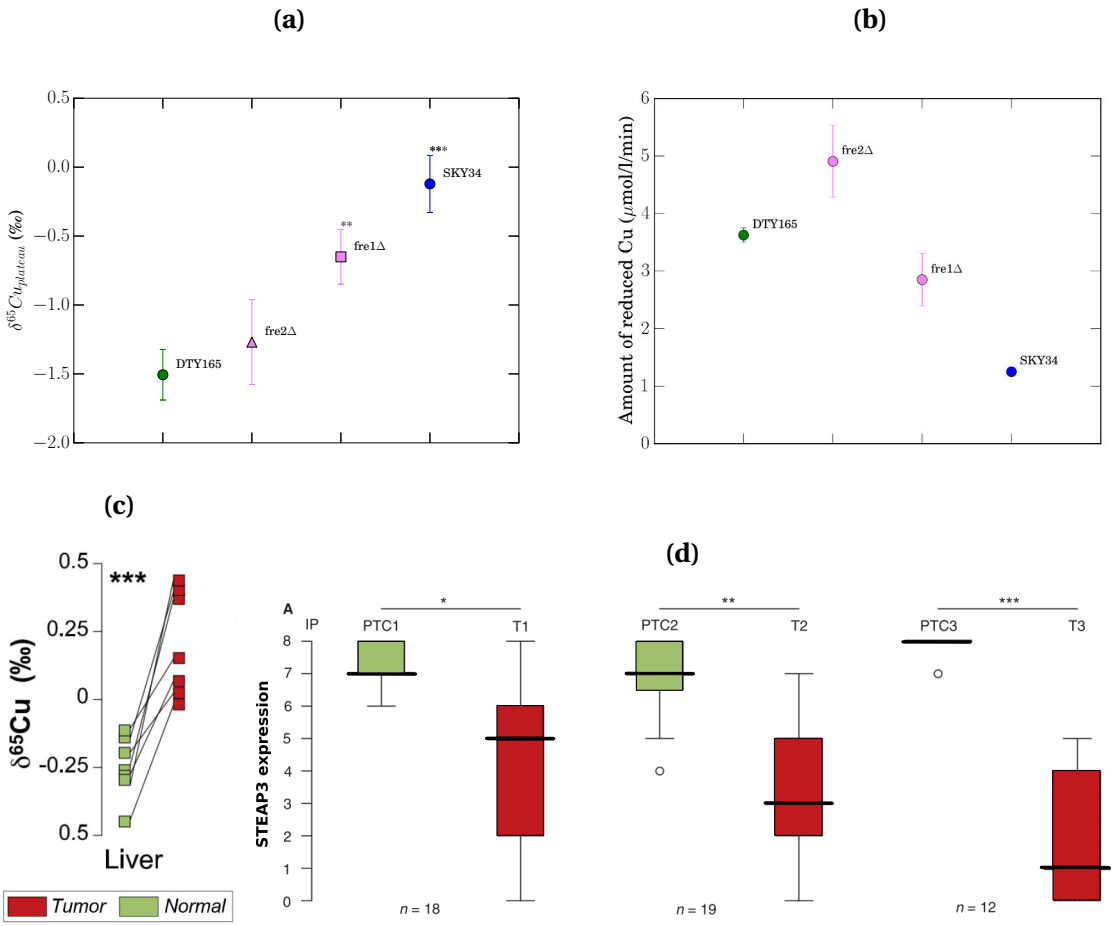


FIGURE 5.5 – ***La composition isotopique du cuivre spécifique des cellules tumorales hépatiques est dû à une moindre expression des réductases du cuivre membranaire.***

(a) *Mesure de la composition isotopique du Cu à l'équilibre (*$\delta^{65}Cu_{plateau}$*) dans trois expériences indépendantes et pour 4 souches de levure.*

(b) *Capacité de réduire le Cu pour ces quatres mêmes souches.*

(c) *Mesure du* δ^{65}Cu *dans des cellules péri-tumorales (vert) et tumorales de foie (rouge) de patients atteints d'hépatocarcinomes (d'après Balter et al. [2015]).*

(d) *Quantification de l'expression d'une réductase du Cu (STEAP3) dans des cellules péri-tumorales (vert, PTC 1) et tumorales (T, rouge) de patients atteints d'hépatocarcinomes. A droite, les hépatocarcinomes les plus malins sont représentés (d'après Caillot et al. [2009]).*

Chez l'homme il a été observé indépendamment une diminution de la quantité de réductases du Cu membranaire et une augmentation du δ^{65}**Cu.** ***A l'aune des résultats obtenus chez la levure, il est probable que ce soit la diminution de l'expression des STEAP3 qui soit à l'origine de la différence de*** δ^{65}**Cu.**

5.5 Perspectives pour l'utilisation du phénotype isotopique du cuivre

La définition du phénotype isotopique du Cu devra être précisée. En effet, les modèles de boîtes utilisés durant cette thèse prédisent que le phénotype isotopique du Cu est indépendant de la concentration en Cu dans le milieu aussi longtemps que le milieu est un réservoir infini de Cu pour la cellule et est indépendant de la concentration initiale en Cu dans la levure. Ceci devra être vérifié *in vivo*.

De plus, la relation linéaire entre le phénotype isotopique du Cu et le flux de Cu par les importateurs à haute affinité pourrait aboutir à une mesure qualitative de la quantité d'importateurs du Cu présents dans la membrane. Ceci permettrait de mettre en place un biomarqueur pronostique de la quantité de hCtr1p dans la membrane. Pour vérifier ce lien il faudra établir une relation plus robuste entre le phénotype isotopique du Cu et les flux de Cu au travers des importateurs à haute affinité. Il conviendra ensuite de vérifier si ces résultats sont transposables aux cellules humaines.

Par ailleurs, le modèle présenté dans cette étude prédit une relation entre l'apparition d'un phénotype de résistance au cisplatine et le phénotype isotopique du Cu. Ce lien a été établi dans les cellules de *S. cerevisiae*. Il doit maintenant être vérifié pour d'autres souches de levures et dans les cellules souches humaines.

Les études réalisées sur des patients couplées à mes résultats suggèrent que l'apparition d'un phénotype de résistance au cisplatine doit s'accompagner d'un enrichissement en isotopes lourds du Cu dans la tumeur et d'un enrichissement en isotopes légers dans le sérum ou les globules rouges. Ceci devra être vérifié chez l'homme. Pour cela, l'étude de biopsies de patients atteints de cancers Oto-Rhino-Laryngologique (ORL) semble pertinente. Ces biopsies de larynx ont l'avantage de pouvoir être comparées à des amygdales saines. Par ailleurs, on dénombre deux grands types de cancer ORL. Le premier est lié aux papillomavirus et est sensible au traitement chimiothérapique à base de platine. Le second est lié au tabagisme et est résistant au traitement. L'étude des biopsies et du sang de ces patients devra se faire sur une large cohorte, statistiquement représentative. Pour ce faire, les récents développements permettant la mise en place d'une séparation automatisée du Cu pourrait engendrer une analyse rapide d'un nombre significatif d'échantillons [Enge et al., 2016].

Bibliographie

Albarède, F. *Geochemistry: an introduction*. Cambridge University press, 2003. doi: 10.1017/cbo9780511807435.004. 140

Albarède, F. and Beard, B. Analytical Methods for Non-Traditional Isotopes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 55(1):113–152, 2004. doi: 10.2138/gsrmg.55.1.113.

Albarède, F. The Stable Isotope Geochemistry of Copper and Zinc. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*, 55:409–427, 2004. doi: 10.2138/gsrmg.55.1.409.

Albarède, F. Metal Stable Isotopes in the Human Body: A Tribute of Geochemistry to Medicine. *Elements*, 11:265–270, 2015. doi: 10.2113/gselements.11.4.265. 37, 41, 61, 107

Albarède, F., Télouk, P., Lamboux, A., Jaouen, K., and Balter, V. Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics*, 3(9):926–933, 2011. doi: 10.1039/c1mt00025j. 34, 140, 152

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 6 edition, 2014. 16

Allègre, C. *Isotope Geology*. Cambridge University press, 2008. doi: 10.1017/cbo9780511809323.009. 122

Aller, S. G. and Unger, V. M. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(11):3627–3632, 2006. doi: 10.1073/pnas.0509929103. 48, 49

Aller, S. G., Eng, E. T., De Feo, C. J., and Unger, V. M. Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51):53435–53441, 2004. doi: 10.1074/jbc.M409421200. 48

Amin, A. R. M. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., Dong, J.-t., Kucuk, O., Khan, G. N., Huang, G. S., Mi, S., Lee, H.-y., Reichrath, J., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C. S., Ciriolo, M. R., Chen, S., Mohammed, S. I., Azmi, A. S., Keith, W. N., Bhakta, D., Halicka, D., Niccolai, E., Fujii, H., Aquilano, K., Ashraf, S. S., Nowsheen, S., Yang, X., Bilsland, A., and Shin, D. M. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*, 35:S55–S77, 2015. ISSN 1044-579X. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.02.005. 15

Amtmann, E., Zöller, M., Wesch, H., and Schilling, G. Antitumoral activity of a sulphur-containing platinum complex with an acidic pH optimum. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 47:461–466, 2001. doi: 10.1007/s002800000261. 29, 140

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., and Rosato, A. Bioinformatic Comparison of Structures and Homology-Models of Matrix Metalloproteinases. *Journal of proteome research*, 3:21–31, 2004. doi: 10.1021/pr0340476. 10

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A. Occurrence of copper proteins through the three domains of life: a bioinformatic approach. *Journal of proteome research*, 7: 209–216, 2008. doi: 10.1021/pr070480u. 10, 11, 37

Andrews, P. and Howell, S. Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer cells*, 2(2):35–43, 1990. doi: 10.1007/978-1-4615-2632-2_11. 29

Aramendía, M., Rello, L., Resano, M., and Vanhaecke, F. Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28:675–681, 2013. doi: 10.1039/c3ja30349g. 38, 161

Argüello, J. M., Raimunda, D., and González-Guerrero, M. Metal Transport across Biomembranes: Emerging Models for a Distinct Chemistry. *The Journal of biological chemistry*, 287(17):13510–13517, 2012. doi: 10.1074/jbc.R111.319343. 47

Arnon, D. and Stout, P. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant physiology*, 14(2):371–375, 1939. doi: 10.1104/pp.14.2.371. 6

Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C. V., and Nùñez, M. T. DMT1, a physiologically relevant apical Cu^+ transporter of intestinal cells. *American journal of physiology*, 284(6):1525–1530, 2003. doi: 10.1152/ajpcell.00480.2002. 50

Atema, A., Buurman, K. J., Noteboom, E., and Smets, L. A. Potentation of DNA-adduct formation and cytotoxicity of platinum-containing drugs by low pH. *International Journal of Cancer*, 54:166–172, 1993. doi: 10.1002/ijc.2910540126. 29, 140

Aucour, A. M., Pichat, S., Macnair, M. R., and Oger, P. Fractionation of Stable Zinc Isotopes in the Zinc Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and Nonaccumulator *Arabidopsis petraea*. *Environmental Science and Technology*, 45:9212–9217, 2011. doi: 10.1021/es200874x. 35, 41, 61

Axelsen, K. B. and Palmgren, M. G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of molecular evolution*, 46(1):84–101, 1998. doi: 10.1007/pl00006286. 53

Babich, P. S., Skvortsov, A. N., Rusconi, P., Tsymbalenko, N. V., Mutanen, M., Puchkova, L. V., and Broggini, M. Non-hepatic tumors change the activity of genes encoding copper trafficking proteins in the liver. *Cancer Biology and Therapy*, 14(7):614–624, 2013. doi: 10.4161/cbt.24594. 19, 20, 21, 61, 140, 151

Balistrieri, L. S., Borrok, D. M., Wanty, R. B., and Ridley, W. I. Fractionation of Cu and Zn isotopes during adsorption onto amorphous Fe(III) oxyhydroxide: Experimental mixing of acid rock drainage and ambient river water. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72:311–328, 2008. doi: 10.1016/j.gca.2007.11.013.

Balter, V., Lamboux, A., Zazzo, A., Télouk, P., Leverrier, Y., Marvel, J., Moloney, A. P., Monahan, F. J., Schmidt, O., and Albarède, F. Contrasting Cu, Fe, and Zn isotopic patterns in organs and body fluids of mice and sheep, with emphasis on cellular fractionation. *Metallomics*, 5(11):1470–1482, 2013. doi: 10.1039/c3mt00151b. 36, 37, 61, 105, 163

Balter, V., Nogueira da Costa, A., Bondanese, V. P., Jaouen, K., Lamboux, A., Sangrajrang, S., Vincent, N., Fourel, F., Télouk, P., Gigou, M., Lécuyer, C., Srivatanakul, P., Bréchot, C., Albarède, F., and Hainaut, P. Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(4):982–985, 2015. doi: 10.1073/pnas.1415151112. 40, 61, 64, 85, 86, 89, 106, 107, 137, 140, 152, 161, 170, 171, 172

Barros, M. H., Oliveira, G. A., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. Mechanisms of Ageing and Development. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131:494–502, 2010. doi: 10.1016/j.mad.2010.04.008. 45

Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*, 98(7):5648–5652, 1993. doi: 10.1063/1.464913.

Bento, I., Peixoto, C., Zaitsev, V. N., and Lindley, P. F. Ceruloplasmin revisited: Structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallographica*, 63 (2):240–248, 2007. doi: 10.1107/S090744490604947X. 12

Beretta, G. L., Gatti, L., Tinelli, S., Corna, E., Colangelo, D., Zunino, F., and Perego, P. Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells. *Biochemical Pharmacology*, 68(2):283–291, 2004. doi: 10.1016/j.bcp.2004.03.022. 137

Bertinato, J., Swist, E., Plouffe, L. J., Brooks, S. P., and L'Abbé, M. R. Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *Biochemical journal*, 740:731–740, 2008. doi: 10.1042/BJ20071025. 106, 168

Bharadwaj, P., Martins, R., and Macreadie, I. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Research*, 10:961–969, 2010. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00658.x. 45

Bigeleisen, J. and Mayer, M. G. Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *Journal of Chemical Physics*, 261(15):261–267, 1947. doi: 10.1063/1.1746492.

Bondanese, V. P., Lamboux, A., Simon, M., Lafont, J. E., Albalat, E., Pichat, S., Vanacker, J.-M., Telouk, P., Balter, V., Oger, P., and Albarède, F. Hypoxia induces copper stable isotope fractionation in hepatocellular carcinoma, in a HIF-independent manner. *Metallomics*, 8:1177–1184, 2016. doi: 10.1039/C6MT00102E. 41, 43, 89, 107, 140

Botstein, D. and Fink, G. R. Yeast: An Experimental Organism for Modern Biology. *Science*, 1:1439–1443, 1985. doi: 10.1126/science.3287619. 45

Botstein, D., Chervitz, S. A., and Cherry, J. M. Yeast as a Model Organism. *Science*, 277 (5330):1259–1260, 1997. doi: 10.1126/science.277.5330.1259. 45

Buldini, P. L., Cavalli, S., and Sharma, J. L. Determination of Transition Metals in Wine by IC, DPASV-DPCSV, and ZGFAAS Coupled with UV Photolysis. *Journal of agricultural Food chemistry*, 47(5):1993–1998, 1999. doi: 10.1021/jf980573j.

Burstein, E., Ganesh, L., Dick, R. D., van De Sluis, B., Wilkinson, J. C., Klomp, L. W., Wijmenga, C., Brewer, G. J., Nabel, G. J., and Duckett, C. S. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *The EMBO journal*, 23(1):244–254, 2004. doi: 10.1038/sj.emboj.7600031. 23

Cadiou, J.-L., Pichat, S., Bondanese, V. P., Soulard, A., Fujii, T., Albarède, F., and Oger, P. Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells. *Scientific reports*, 17:44533–44543, 2017. doi: 10.1038/srep44533. 56, 85, 86, 90, 91, 92, 93, 94, 99, 101, 102, 103, 104, 105, 116, 117, 119, 125, 137, 141, 142, 144, 147

Cadiou, J.-L., Oger, P., Bondanese, V. P., Guschinskaya, N., Soulard, A., Hernandez, J.-A., Tacail, T., Albarède, F., and Pichat, S. Lower copper import through Ctr1p and Ctr3p lead to a "tumor" like Cu isotope composition. *Metallomics*, in preparation-1. 56, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 154

Cadiou, J.-L., Pichat, S., Bondanese, V. P., Soulard, A., Albarède, F., and Oger, P. The cu isotopic composition of cells monitors the resistance to the anticancerous drug cisplatin. *Scientific Reports*, in preparation-2. 56

Caillot, F., Daveau, R., Daveau, M., Lubrano, J., Saint-Auret, G., Hiron, M., Goria, O., Scotte, M., Francois, A., and Salier, J. P. Down-regulated expression of the TSAP6 protein in liver

is associated with a transition from cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Histopathology*, 54(3):319–327, 2009. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03224.x. 24, 25, 64, 86, 107, 137, 170, 172

Campos, C., Guzmán, R., López-Fernández, E., and Casado, A. Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC-BCS assay. *Analytical Biochemistry*, 392 (1):37–44, 2009. doi: 10.1016/j.ab.2009.05.024.

Chelly, J., Tümer, Z., Tønnesen, T., Petterson, A., Ishikawa-Brush, Y., Tommerup, N., Horn, N., and Monaco, A. P. Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature genetics*, 3:14–19, 1993. doi: 10.1038/ng0193-14. 14

Chen, H. H. W., Yan, J.-J., Chen, W.-C., Kuo, M. T., Lai, Y.-H., Lai, W.-W., Liu, H.-S., and Su, W.-C. Predictive and prognostic value of human copper transporter 1 (hCtr1) in patients with stage III non-small-cell lung cancer receiving first-line platinum-based doublet chemotherapy. *Lung cancer*, 75(2):228–234, 2012. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.06.011. 137, 140, 152

Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S., and Wong, E. D. *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 40:700–705, 2012. doi: 10.1093/nar/gkr1029. 45

Costas-Rodriguez, M., Delanghe, J., and Vanhaecke, F. High-precision isotopic analysis of essential mineral elements in biomedicine: Natural isotope ratio variations as potential diagnostic and/or prognostic markers. *Trends in Analytical Chemistry*, 76:182–193, 2016. doi: 10.1016/j.trac.2015.10.008. 38, 89, 161

Coulouarn, C., Derambure, C., Lefebvre, G., Daveau, R., Hiron, M., Scotte, M., François, A., Daveau, M., and Salier, J.-P. Global gene repression in hepatocellular carcinoma and fetal liver, and suppression of dudulin-2 mRNA as a possible marker for the cirrhosis-to-tumor transition. *Journal of hepatology*, 42(6):860–869, 2005. doi: 10.1016/j.jhep.2005.01.027. 24, 25, 64, 86, 107, 137, 170

Cousins, R. J. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological reviews*, 65(2):238–309, 1985. 7

Cyert, M. S. and Philpott, C. C. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(3):677–713, 2013. doi: 10.1534/genetics.112.147207. 151

Dancis, A., Klausner, R., Hinnebusch, A., and Barriocanal, J. Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 10(5):2294–2301, 1990. doi: 10.1128/mcb.10.5.2294. 46

Dancis, A., Yuan, D., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J., and Klausner, R. D. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell*, 76(2):393–402, 1994a. doi: 10.1016/0092-8674(94)90345-X. 52, 89, 91, 117, 143, 161

Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., and Klausner, R. D. Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89:3869–3873, 1992. doi: 10.1073/pnas.89.9.3869. 46

Dancis, A., Haile, D., Yuan, D. S., and Klausnert, R. D. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). *The Journal of Biological Chemistry*, 269(41):25660–25667, 1994b. 52, 89, 91, 143, 161

Danks, D. *The metabolic Basis of Inherited Diseases*. 1989. doi: 10.1007/978-4-431-68120-5_36. 14

Davies, M. S., Berners-Price, S. J., and Hambley, T. W. Rates of platination of AG and GA containing double-stranded oligonucleotides: Insights into why cisplatin binds to GG and AG but not GA sequences in DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 120 (44):11380–11390, 1998. doi: 10.1021/ja981725u. 27

De Bruin, T. J. M., Marcelis, A. T. M., Zuilhof, H., and Sudho, E. J. R. Geometry and electronic structure of bis-(glycinato)-$Cu^{II} \cdot 2H_2O$ complexes as studied by density functional B3LYP computations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1:4157–4163, 1999. doi: 10.1039/a903018b.

De Feo, C. J., Aller, S. G., Siluvai, G. S., Blackburn, N. J., and Unger, V. M. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11):4237–42, 2009. doi: 10.1073/pnas.0810286106. 48

Delorme, E. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by Electroporation. *Applied and environmental microbiology*, 55(9):2242–2246, 1989. 89

Delves, H., Alexander, F., and Lay, H. Copper and Zinc Concentration in the Plasma of Leukaemic children. *British Journal of Haematology*, 24:525–531, 1972. doi: 10.1111/j.1365-2141.1973.tb01678.x. 18

Dennington, R., Keith, T., and R., M. J. GaussView. *Version 5.0.9*, Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2009.

Denoyer, D., Masaldan, S., La Fontaine, S., and Cater, M. a. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics*, 7:1459–1476, 2015. doi: 10.1039/C5MT00149H.

Dumay, Q. C., Debut, A. J., Nahla, M. M., and Milton, H. S. J. The copper transporter (Ctr) family of Cu^+ uptake systems. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 11: 10–19, 2006. doi: 10.1159/000092815. 48

Easter, R. N., Chan, Q., Lai, B., Ritman, E. L., Caruso, J. A., and Qin, Z. Vascular metallomics: copper in the vasculature. *Vascular Medicine*, 15(1):61–69, 2010. doi: 10.1177/1358863X09346656. 20, 23

Eisses, J. F. and Chi, Y. Stable plasma membrane levels of hCTR1 mediate cellular copper uptake. *The Journal of biological chemistry*, 280(10):9635–9639, 2005. doi: 10.1074/jbc.M500116200. 48, 49

Endo, T., Kimura, O., and Sakata, M. Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line. *Toxicology*, 146:187–195, 2000. doi: 10.1016/s0300-483x(00)00176-1. 29, 140

Enge, T. G. G., Field, M. P., Jolley, D. F., Ecroyd, H., Kim, M. H., and Dosseto, A. An automated chromatography procedure optimized for analysis of stable Cu isotopes from biological materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31:2023–2030, 2016. doi: 10.1039/C6JA00120C. 152, 173

Fan, F., Wey, J. S., McCarty, M. F., Belcheva, A., Liu, W., Bauer, T. W., Somcio, R. J., Wu, Y., Hooper, A., Hicklin, D. J., et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 24(16):2647–2653, 2005. doi: 10.1038/sj.onc.1208246. 21, 23

Fernald, K. and Kurokawa, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12): 620–633, 2013. doi: 10.1016/j.tcb.2013.07.006. 18

Fichtinger-Schepman, A. M. J., Van der Veer, J. L., Den Hartog, J. H., Lohman, P. H., and Reedijk, J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, 24(3):707–713, 1985. doi: 10.1021/bi00324a025. 27

Finney, L., Mandava, S., Ursos, L., Zhang, W., Rodi, D., Vogt, S., Legnini, D., Maser, J., Ikpatt, F., Olopade, O. I., and Glesne, D. X-ray fluorescence microscopy reveals large-scale relocalization and extracellular translocation of cellular copper during angiogen-

esis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7):2247–2252, 2007. doi: 10.1073/pnas.0607238104. 20, 23

Flemming, C. and Trevors, J. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air and Soil Pollution*, 44:143–158, 1989. doi: 10.1007/bf00228784. 6

Fosset, C., McGaw, B., Reid, M. D., and McArdle, H. J. A non-radioactive method for measuring Cu uptake in HepG2 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(5):1018–1022, 2005. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.01.005.

FRANCIM, R. *Survie des patients atteints de cancer en France*. 2007. 29

Fraústo da Silva, J. and Williams, R. *The biological chemistry of the elements - The inorganic chemistry of life*. Oxford University Press, second edition, 2001. 13

Frisch, M. et al. Gaussian 09. *Revision E.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

Fu, D., Beeler, T. J., and Dunn, T. M. Sequence, Mapping and Disruption of CCC2, a Gene that Cross-complements the Ca^{2+}-sensitive Phenotype of csgl Mutants and Encodes a P-type ATPase Belonging to the Cu^{2+}-ATPase Subfamily. *Yeast*, 11:283–292, 1995. doi: 10.1002/yea.320110310. 89, 91, 103

Fujii, T., Moynier, F., Abe, M., Nemoto, K., and Albarède, F. Copper isotope fractionation between aqueous compounds relevant to low temperature geochemistry and biology. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 110:29–44, 2013. doi: 10.1016/j.gca.2013.02.007. 37, 61, 161

Fujii, T., Moynier, F., Blichert-Toft, J., and Albarède, F. Density functional theory estimation of isotope fractionation of Fe, Ni, Cu, and Zn among species relevant to geochemical and biological environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 140:553–576, 2014. doi: 10.1016/j.gca.2014.05.051. 37, 105, 116, 161

Gaetke, L. M. and Chow, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189:147–163, 2003. doi: 10.1016/S0300-483X(03)00159-8. 7

Garofalo, J., Erlandson, E., Strong, E., Lesser, M., Gerold, F., Spiro, R., Schwartz, M., and Good, R. Serum zinc, serum copper, and the Cu/Zn ratio in patients with epidermoid cancers of the head and neck. *Journal of surgical oncology*, 15(4):381–386, 1980. doi: 10.1002/jso.2930150413. 18

Gately, D. P. and Howell, S. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal of Cancer*, 67:1171–1176, 1993. doi: 10.1038/bjc.1993.221. 29, 140

Georgatsou, E. and Alexandraki, D. Regulated Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* FRE1/FRE2p Fe/Cu Reductase Related Genes. *Yeast*, 64(8):573–584, 1999. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199905)15:7<573::AID-YEA404>3.0.CO;2-7. 46, 52, 95

Georgatsou, E. and Despina, A. Two Distinctly Regulated Genes Are Required for Ferric Reduction, the First Step of Iron Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 14(5):3065–3073, 1994. doi: 10.1128/MCB.14.5.3065. 46

Georgatsou, E., Mavrogiannis, L., Fragiadakis, G. S., and Alexandraki, D. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(21): 13786–13792, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.21.13786. 46, 52, 63, 89, 91, 95, 103, 143, 161

Gérard, C., Bordeleau, L. J., Barralet, J., and Doillon, C. J. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials*, 31(5):824–831, 2010. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.009. 20, 23

Giaccone, G. Clinical Perspectives on Platinum Resistance. *Drugs*, 59:9–17, 2000. doi: 10.2165/00003495-200059004-00002. 27, 140

Gietz, R. and Woods, R. A. Transformation of Yeast by Lithium Acetate/Single-Stranded Carrier DNA/Polyethylene Glycol Method. *Methods in enzymology*, 350(2001):87–96, 2002. doi: 10.1016/s0076-6879(02)50957-5. 89

Gietz, R., Schietstl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure. *Yeast*, 11:355–360, 1995. doi: 10.1002/yea.320110408. 89

Goeckeler, J. and Brodsky, J. Molecular chaperones and substrate ubiquitination control the efficiency of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Diabetes Obesity metabolism*, 12:32–38, 2011. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01273.x.Molecular. 45

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R., et al. Life with 6000 genes. *Science*, 274 (5287):546, 1996. doi: 10.1126/science.274.5287.546. 44, 89

Graden, J. A. and Winge, D. R. Copper-mediated repression of the activation domain in the yeast Mac1p transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94:5550–5555. doi: 10.1073/pnas.94.11.5550. 52, 54

Gralla, E. B., Thiele, D. J., Silar, P., and Valentine, J. S. Ace1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19):8558–8562, 1991. doi: 10.1073/pnas.88.19.8558. 55

Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O., and Winge, D. R. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41):32310–32316, 2000. doi: 10.1074/jbc.M005946200. 63, 115, 143

Gudin, S. *Etude de l'ATPase cuivre eucaryote Ccc2 de Saccharomyces cerevisiae : De la localisation à la fonction*. PhD thesis, Université Joseph Fourier - Grenoble I, 2008. 86, 105, 117

Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. A subway map of cancer pathways. *Nature posters*, 2(5), 2002. 15

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5): 646–674, 2011. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. URL http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013. 15, 17, 18

Harris, E. D. Copper transport: an overview. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 196(2):130–140, 1991. doi: 10.3181/00379727-196-43171b. 7

Hart, E., Waddell, J., and Elvehjem, C. Iron in nutrition. IV. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 77:797 – 812, 1928. doi: 10.1111/j.1753-4887.1987.tb06082.x. 6

Hartwell, L. H. Yeast and Cancer. *Bioscience Reports*, 22:373–394, 2002. doi: 10.1023/a:1020918107706. 45

Hartwell, L. H., Szankasi, P., Roberts, C. J., Murray, A. W., and Friend, S. H. Integrating Genetic Approaches into the Discovery of Anticancer Drugs. *Science*, 278:1064–1068, 2009. doi: 10.1126/science.278.5340.1064. 45

Hasset, R., Dix, D., Eide, D., and Kosman, D. The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical journal*, 351:477–484, 2000. doi: 10.1042/0264-6021:3510477. 51, 52, 89, 91, 117, 143, 161

Hasset, R. and Kosman, D. Evidence for Cu(II) reduction as a component of Cu uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 270:128–134, 1995. doi: 10.1074/jbc.270.1.128. 46, 52, 89, 91, 95, 103, 143, 161

Heredia, J., Crooks, M., and Zhu, Z. Phosphorylation and Cu^+ Coordination-dependent DNA Binding of the Transcription Factor Mac1p in the Regulation of Copper Transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(12):8793–8797, 2001. doi: 10.1074/jbc.M008179200. 103, 115

Hille, B. *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, third edition, 2001. doi: 10.1007/springerreference_33998. 48

Hinnen, A., Hicks, J. B., and Fink, G. R. Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(4):1929–1933, 1978. doi: 10.1073/pnas.75.4.1929. 89

Hitzeman, R. A., Hagie, F. E., Levine, H. L., Goeddel, D. V., Ammerer, G., and Hall, B. D. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*, 293:717, 1981. doi: 10.1038/293717a0. 45

Holm, R. H., Kennepohl, P., and Solomon, E. I. Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chemical reviews*, 96:2239–2314, 1996. doi: 10.1021/cr9500390. 10

Holzer, A. K., Samimi, G., Katano, K., Naerdemann, W., Lin, X., Safaei, R., and Howell, S. B. The Copper Influx Transporter Human Copper Transport Protein 1 Regulates the Uptake of Cisplatin in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Molecular pharmacology*, 66(4):817–823, 2004. doi: 10.1124/mol.104.001198.that. 137

Holzer, K., Varki, N. M., Le, Q. T., Gibson, M., Naredi, P., and Howell, S. B. Expression of the human copper influx transporter 1 in normal and malignant human tissues. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 54(9):1041–1049, 2006. doi: 10.1369/jhc.6A6970.2006. 31

Hrgovcic, M., Tessmer, C. F., Thomas, F. B., Ong, P. S., Gamble, J., and Shullenberger, C. Serum copper observations in patients with malignant lymphoma. *Cancer*, 32(6):1512–1524, 1973. doi: 10.1002/1097-0142(197312)32:6<1512::aid-cncr2820320631>3.0.co;2-p. 18

Ilicin, G. Serum copper and magnesium levels in leukaemia and malignant lymphoma. *The Lancet*, 298(7732):1036–1037, 1971. doi: 10.1016/s0140-6736(71)90353-9. 18

Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., and Herskowitz, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22):14298–14302, 2002. doi: 10.1073/pnas.162491399. 30, 31, 32, 137, 138, 140, 141, 143, 145, 148, 150, 168

Ishida, S., Andreux, P., Poitry-Yamate, C., Auwerx, J., and Hanahan, D. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48):19507–19512, 2013. doi: 10.1073/pnas.1318431110. 22, 140

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations. *Journal of bacteriology*, 153(1):163–168, 1983. doi: 10.1080/00021369.1984.10866161. 89

Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. Structure at 2.8Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 376:660–669, 1995. doi: 10.1038/376660a0. 11, 89

Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., et al. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11):947–962, 2004. doi: 10.1002/yea.1142. 90

Jaouen, K. *Les isotopes stables des métaux de transition (Cu, Fe, Zn) au service de l'anthropologie*. PhD thesis, École Normale de Lyon, 2013. 8, 9

Jaouen, K. and Balter, V. Menopause effect on blood Fe and Cu isotope compositions. *American Journal of Physical Anthropology*, 153(2):280–285, 2014. doi: 10.1002/ajpa.22430. 34

Jaouen, K., Balter, V., Herrscher, E., Lamboux, A., Telouk, P., and Albarède, F. Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *American journal of physical anthropology*, 148(3):334–340, 2012. doi: 10.1002/ajpa.22053. 34

Jaouen, K., Gibert, M., Lamboux, A., Telouk, P., Fourel, F., Albarède, F., Alekseev, A. N., Crubézy, E., and Balter, V. Is aging recorded in blood Cu and Zn isotope compositions? *Metallomics*, 5(8):1016–24, 2013. doi: 10.1039/c3mt00085k. 34

Jeong, S., Le, A. Q., and Lee, K. The viability and recovery of *Saccharomyces cerevisiae* after freezing at -84°C with different concentrations of glycerol. *The expedition*, 1, 2012. 90

Jouvin, D., Weiss, D. J., Mason, T. F. M., Bravin, M. N., Louvat, P., Zhao, F., Ferec, F., Hinsinger, P., and Benedetti, M. F. Stable isotopes of Cu and Zn in higher plants: Evidence for Cu reduction at the root surface and two conceptual models for isotopic fractionation processes. *Environmental Science and Technology*, 46(5):2652–2660, 2012. doi: 10.1021/es202587m. 34, 61

Jungmann, J., Reins, H.-A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D., and Jentsch, S. MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *The EMBO journal*, 12(13):5051–5056, 1993. 52, 54, 91, 103, 105, 115, 143

Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inzé, D., and Van Montagu, M. Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *The Journal of biological chemistry*, 270(47):28479–28486, 1995. doi: 10.1074/jbc.270.47.28479. 50, 51, 91, 106

Kaplan, J. H. and Lutsenko, S. Copper transport in mammalian cells: special care for a metal with special needs. *The Journal of biological chemistry*, 284(38):25461–25465, 2009. doi: 10.1074/jbc.R109.031286. 46

Karlin, K. D. and Tyekelar, Z. *Bioinorganic chemistry of Copper*. Champan and Hall, 1993. doi: 10.1007/978-94-011-6875-5. 10

Karube, I., Tamiya, E., and Matsuoka, H. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. *FEBS Letters*, 182(1):90–94, 1985. doi: 10.1016/0014-5793(85)81160-1. 89

Katano, K., Kondo, A., Safaei, R., Holzer, A., Samimi, G., Mishima, M., Kuo, Y.-m., Rochdi, M., and Howell, S. B. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Research*, 62:6559–6565, 2002. 140, 145, 150

Kataoka, T., Powers, S., Cameron, S., Fasano, O., Goldfarb, M., Broach, J., and Wigler, M. Functional Homology of Mammalian and Yeast RAS Genes. *Cell*, 3:19–26, 1985. doi: 10.1016/0092-8674(85)90304-6. 45

Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews*, 7:573–584, 2007. doi: 10.1038/nrc2167. 28, 30, 31, 33, 151, 168

Keller, G., Bird, A., and Winge, D. R. Independent metalloregulation of Ace1 and Mac1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(11):1863–1871, 2005. doi: 10.1128/EC.4.11.1863-1871.2005. 52, 54, 118, 119

Kim, B., Nevitt, T., and Thiele, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature*, 4(3):176–185, 2008. doi: 10.1038/nchembio.72. 53

Kim, E. S., Tang, X., Peterson, D. R., Kilari, D., Chow, C.-W., Fujimoto, J., Kalhor, N., Swisher, S. G., Stewart, D. J., Wistuba, I. I., and Siddik, Z. H. Copper transporter CTR1 expression and tissue platinum concentration in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 85(1):88–93, 2014. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.04.005. 32, 140, 152

Klinmann, J. P. Mechanisms whereby mononuclear copper proteins functionalize organic substrates. *Chemical reviews*, 96:2541–2561, 1996. doi: 10.1021/cr950047g. 35

Klomp, A. E. M., Juijn, J. A., Van der Gun, L. T. M., van den Berg, I. E. T., Berger, R., and Klomp, L. W. J. The N-terminus of the human copper transporter 1 (hCTR1) is localized extracellularly, and interacts with itself. *The Biochemical journal*, 370:881–889, 2003. doi: 10.1042/BJ20021128. 48

Knight, S., Labbé, S., Kwon, L. F., Kosman, D. J., and Thiele, D. J. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes and Development*, 10(15):1917–1929, 1996. doi: 10.1101/gad.10.15.1917. 52, 117

Knutson, M. D. Steap proteins: implications for iron and copper metabolism. *Nutrition reviews*, 65(7):335–340, 2007. doi: 10.1301/nr.2007.jul.335. 23, 140

Kushnirov, V. V. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 16(9):857–860, 2000. doi: 10.1002/1097-0061(20000630)16:9<857::AID-YEA561>3.0.CO;2-B.

Labbé, S., Zhu, Z., and Thiele, D. J. Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(25):15951–15958, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.25.15951. 52, 54

Larner, F. Can we use high precision metal isotope analysis to improve our understanding of cancer? *Analytical and Bioanlytical chemistry*, 408:345–349, 2016. doi: 10.1007/s00216-015-9201-5. 41, 107

Lauwens, S., Costas-rodríguez, M., Vlierberghe, H. V., and Vanhaecke, F. Cu isotopic signature in blood serum of liver transplant patients: a follow-up study. *Scientific report*, 6:30683–30690, 2016. doi: 10.1038/srep30683. 40, 42, 106, 161

Lech, T. and Sadlik, J. Copper concentration in body tissues and fluids in normal subjects of southern poland. *Biology of trace elements research*, (118), 2007. 152

Lee, C., Yang, W., and Robert, G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review*, 37(2):785–789, 1988. doi: 10.1103/physrevb.37.785.

Lee, J., Prohaska, J. R., Dagenais, S. L., Glover, T. W., and Thiele, D. J. Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene*, 254(1):87–96, 2000. doi: 10.1016/s0378-1119(00)00287-0. 46, 161

Lee, J., Peña, M. M. O., Nose, Y., and Thiele, D. J. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6):4380–4387, 2002. doi: 10.1074/jbc.M104728200. 47, 48, 140

Leonhardt, K., Gebhardt, R., Mössner, J., Lutsenko, S., and Huster, D. Functional interactions of Cu-ATPase ATP7B with cisplatin and the role of ATP7B in the resistance of cells to the drug. *The Journal of biological chemistry*, 284(12):7793–802, 2009. doi: 10.1074/jbc.M805145200. 32, 151

Lesuisse, E. and Labbe, P. Reductive and Non-reductive Mechanisms of Iron Assimilation by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 135:257–263, 1989. doi: 10.1099/00221287-135-2-257. 46

Lesuisse, E., Raguzzi, F., and Crichton, R. Iron Uptake by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of a Reduction Step. *Journal of General Microbiology*, 133:3229–3236, 1987. doi: 10.1099/00221287-133-11-3229. 46

Lewis, E. A. and Tolman, W. B. Reactivity of Dioxygen - Copper Systems. *Chemical reviews*, 104:1047–1076, 2004. doi: 10.1002/chin.200421292. 35

Li, D., Liu, S.-A., and Li, S. Copper isotope fractionation during adsorption onto kaolinite: Experimental approach and applications. *Chemical Geology*, 396:74–82, 2015. doi: 10.1016/j.chemgeo.2014.12.020.

Li, Z.-S., Szczypka, M., Lu, Y.-P., Thiele, D., and Rea, P. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *Journal of Biological Chemistry*, 271:6509–6517, 1996. doi: 10.1074/jbc.271.11.6509. 109, 141, 148, 154

Li, Z.-h., Qiu, M.-z., Zeng, Z.-l., Luo, H.-y., Wu, W.-j., Wang, F., Wang, Z.-q., Zhang, D.-s., Li, Y.-h., and Xu, R.-h. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7A) is associated with platinum-resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Translational Medicine*, 10(1):21, 2012. doi: 10.1186/1479-5876-10-21. 31, 32

Liang, Z. D., Stockton, D., Savaraj, N., and Kuo, M. T. Mechanistic Comparison of Human Copper Transporter hCtr1-Mediated Transports between Copper Ion and Cisplatin. *Molecular pharmacology*, 1(4):167–187, 2009. doi: 10.1124/mol.109.056416. 138

ligue-cancer.net, . ligue-cancer.net. https://www.ligue-cancer.net/shared/brochures/traitements-cancers.pdf. 25

Lin, X., Okuda, T., Holzer, A., and Howell, S. B. The Copper Transporter CTR1 Regulates Cisplatine Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular pharmacology*, 62(5):1154–1159, 2002. doi: 10.1124/mol.62.5.1154. 30, 31, 138, 140, 141, 142, 143, 150, 151

Linder, C. and Hazegh-Azam, M. Copper biochemistry and molecular biology. *American society for clinical nutrition*, 63:797–811, 1996. doi: 0.1385/1-59259-288-0:003. 7

Linder, M. C. *Biochemistry of Copper*. Springer Science, first edition, 1991. doi: 10.1007/978-1-4757-9432-8_4. 23

Linder, M. C. Copper and genomic stability in mammals. *Mutation Research*, 475(1-2):141–152, 2001. doi: 10.1016/S0027-5107(01)00076-8. 7, 89

Liu, J., Sitaram, A., and Burd, C. G. Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic*, 8(10):1375–1384, 2007. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00616.x. 118, 119

Liu, L., Qi, J., Yang, Z., Peng, L., and Li, C. Low-affinity copper transporter CTR2 is regulated by copper-sensing transcription factor Mac1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(3):600–604, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.040. 91, 106, 168

Liu, X. F., Supek, F., Nelson, N., and Culotta, V. C. Negative Control of Heavy Metal Uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (18):11763–11769, 1997. 51, 52, 89, 91, 117, 143, 161

Lobo, L., Costas-rodríguez, M., Vicente, J. C. D., Pereiro, R., Vanhaecke, F., and Sanz-medel, A. Elemental and isotopic analysis of oral squamous cell carcinoma tissues using sector-field and multi-collector ICP-mass spectrometry. *Talanta*, 165:92–97, 2016. doi: 10.1016/j.talanta.2016.12.007. 89, 106, 140, 152, 161

Loehrer, P. and Einhorn, L. Diagnosis and treatment, Drugs five years later: cisplatin. *Annals of internal medicins*, 100:704–713, 1984. 27, 140

Loh, S., Mistry, P., Kelland, L., Abel, G., and Harrap, K. Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes. *Breast Journal of cancer*, 118:1109–1115, 1992. doi: 10.1038/bjc.1992.419. 29, 140, 150

Lutsenko, S., Barnes, N. L., Bartee, M. Y., and Dmitriev, O. Y. Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiological Reviews*, 87(3):1011–1046, 2007. doi: 10.1152/physrev.00004.2006. 53

Lutsenko, S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Current opinion in chemical biology*, 14(2):211–217, 2010. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.01.003. 7, 89

Ma, G., Wu, Q., Wu, X., Arnesano, F., Natile, G., Sletten, E., and Liu, Y. The reaction of a platinated methionine motif of CTR1 with cysteine and histidine is dependent upon the type of precursor platinum complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 153:239–246, 2015. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.07.010. 31, 150

Majumder, S., Chatterjee, S., Pal, S., Biswas, J., Efferth, T., and Choudhuri, S. K. The role of copper in drug-resistant murine and human tumors. *Biometals*, 22(2):377–384, 2009. doi: 10.1007/s10534-008-9174-3.

Maréchal, C. N., Télouk, P., and Albarède, F. Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology*, 156:251–273, 1999. doi: 10.1016/S0009-2541(98)00191-0. 93

Martin, F., Linden, T., Katschinski, D. M., Oehme, F., Flamme, I., Mukhopadhyay, C. K., Eckhardt, K., Tröger, J., Barth, S., Camenisch, G., et al. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood*, 105(12):4613–4619, 2005. doi: 10.1182/blood-2004-10-3980. 21, 23

Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., and Jiang, W. G. Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective. 2013. 15

Martins, L. J., Jensen, L. T., Simons, J. R., Keller, G. L., and Winge, D. R. Metalloregulation of FRE1 and FRE2 Homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273(37):23716–23721, 1998. doi: 10.1074/jbc.273.37.23716. 46, 52, 91, 103

Menkes, J. H., Alter, M., Steigleder, G. K., Weakley, D. R., and Sung, J. H. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics*, 29(5):764–779, 1962. 14

Messerchmidt, A., Bode, W., and Cygler, M. *Handbook of metalloproteins*. Wiley, 4 edition, 2004. doi: 10.1002/0470028637. 10, 12, 35

Mortazavi, S., Bani-Hashemi, A., Mozafari, M., and Raffi, A. Value of serum copper measurement in lymphomas and several other malignancies. *Cancer*, 29(5):1193–1198, 1972. doi: 10.1002/1097-0142(197205)29:5<1193::aid-cncr2820290510>3.0.co;2-6. 18

Moynier, F., Pichat, S., Pons, M. L., Fike, D., Balter, V., and Albarède, F. Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chemical Geology*, 267:125–130, 2009. doi: 10.1016/j.chemgeo.2008.09.017. 34

Mufti, A. R., Burstein, E., and Duckett, C. S. XIAP: Cell Death Regulation Meets Copper Homeostasis. *Biophysical Chemistry*, 257(5):2432–2437, 2005. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.017. 23

Navarrete, J. U., Borrok, D. M., Viveros, M., and Ellzey, J. T. Copper isotope fractionation during surface adsorption and intracellular incorporation by bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(6):997–1003, 2011. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021. Secreted. 35, 62, 104, 163

ncbi.gov. NCBI web-site – Protein Structure. www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure, 2017. 49

Nevitt, T., Öhrvik, H., and Thiele, D. J. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9):1580–1593, 2012. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.011. 50, 52, 62, 63, 89, 161, 162, 170

Nies, D. H. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:730–750, 1999. doi: 10.1007/s002530051457. 7

Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3):213, 2006. doi: 10.2147/vhrm.2006.2.3.213. 15

Nord, F. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, volume 33. Wiley, 1970. 5, 10

Ohgami, R. S. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4):1388–1394, 2006. doi: 10.1182/blood-2006-02-003681. 9, 46, 47, 107, 161

Ohgami, R. S., Campagna, D. R., Greer, E. L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J. J., Fujiwara, Y., Barker, J. E., and Fleming, M. D. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature genetics*, 37(11):1264–1269, 2005. doi: 10.1038/ng1658. 47, 161

Öhrvik, H. and Thiele, D. J. The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 31:178–182, 2015. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.03.006.

Ohsumi, Y., Kitamoto, K., and Anraku, Y. Changes Induced in the Permeability Barrier of the Yeast Plasma Membrane by Cupric Ion. *Journal of bacteriology*, 170(6):2676–2682, 1988. doi: 10.1128/jb.170.6.2676-2682.1988. 7

Ooi, C. E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacinol, J. S., and Klausner, R. D. Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *The EMBO Journal*, 15(14): 3515–3523, 1996. 103, 115, 118, 119, 151

Ostermeier, C. and Michel, H. *Transition metals in microbial metabolism*, chapter Cytochrome *c* oxidase – the key enzyme of aerobic respiration. Harwood Academic publisher, 1997. doi: 10.1007/978-94-007-0443-5_1. 11

Ozols, R. F. Ovarian cancer: New clinical approaches. *Cancer Treatment Reviews*, 18:77–83, 1991. doi: 10.1016/0305-7372(91)90027-w. 140

Pais, I. and Jones Jr, J. B. *The handbook of trace elements*, chapter Copper. CRC Press, 1997. doi: 10.2134/jeq1998.00472425002700040041x. 5, 6

Payne, S. L., Hendrix, M. J. C., and Kirschmann, D. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer–a prospect. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(6):1338–1354, 2007. doi: 10.1002/jcb.21371. 21, 23

Peña, M. M., Koch, K., and Thiele, D. J. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 18(5):2514–2523, 1998. doi: 10.1128/mcb.18.5.2514. 103

Peña, M. M. O., Lee, J., and Thiele, D. J. A delicate balance: homeostatic control of Copper Uptake and distribution. *Journal of Nutrition*, 129:1251–1260, 1999. 105

Peña, M. M. O., Puig, S., and Thiele, D. J. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (43):33244–33251, 2000. doi: 10.1074/jbc.M005392200. 52, 54, 89, 91, 109, 118, 119, 141, 143, 154, 161

Perry, J., Shin, D., Getzoff, E., and Tainer, J. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et biophysica acta*, 257(5):2432–2437, 2005. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage. 12

Petranovic, D., Tyo, K., Vemuri, G. N., and Nielsen, J. Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS Yeast Research*, 10:1046–1059, 2010. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00689.x. 45

Pokrovsky, O. S., Viers, J., Emnova, E. E., Kompantseva, E. I., and Freydier, R. Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hydr)oxides: Possible structural control. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72:1742–1757, 2008. doi: 10.1016/j.gca.2008.01.018.

Portnoy, M., Schmidt, P., Rogers, R., and Culotta, V. C. Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(5):873–882, 2001. doi: 10.1007/s004380100482. 50, 51, 106

Prestayko, A. W., D'Aoust, J., Issell, B., and Crooke, S. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum). *Cancer Treatment Reviews*, 6:17–39, 1979. 27, 140

Puig, S. and Thiele, D. J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current opinion in chemical biology*, 6(2):171–180, 2002. 48, 49, 50

Rancoule, C., Guy, J.-b., Vallard, A., Mrad, M. B., Rehailia, A., and Magné, N. Les 50 ans du cisplatine. *Bulletin du cancer*, 2016. 27

Rees, E. M., Lee, J., and Thiele, D. J. Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(52):54221–54229, 2004. doi: 10.1074/jbc.M411669200. 50, 51, 91

Rinaldi, T., Dallabona, C., Ferrero, I., Frontali, L., and Bolotin-fukuhara, M. Mitochondrial diseases and the role of the yeast models. *FEMS Yeast Research*, 10:1006–1022, 2010. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00685.x. 45

Robinson, N. J. and Winge, D. R. Copper metallochaperones. *Annual review of biochemistry*, 79:537–62, 2010. doi: 10.1146/annurev-biochem-030409-143539. 52

Rodriguez-Montelongo, L., Farias, R. N., and Massa, E. M. Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 1144:77–84, 1993. doi: 10.1016/0162-0134(92)84139-e. 7

Roguljić, A., Roth, A., Kolarić, K., and Maričić, Ž. Iron, copper, and zinc liver tissue levels in patients with malignant lymphomas. *Cancer*, 46(3):565–569, 1980. doi: 10.1002/1097-0142(19800801)46:3<565::aid-cncr2820460324>3.0.co;2-n. 18

Rome, L. D. and Gadd, G. Measurement of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae* using a Cu^{2+}-selective electrode L. *Microbiology*, 43:283–287, 1987. doi: 10.1111/j.1574-6968.1987.tb02159.x. 94

Rosenberg, B., Van Camp, L., and Krigas, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(4972):698–699, 1965. doi: 10.1111/j.1574-6968.1987.tb02159.x. 26, 139

Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E., and Mansour, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222:385–386, 1969. 26, 140

rsc.org. The Royal society chemistry website – Periodic table. http://www.rsc.org/periodic-table/element/29/copper, 2017. 5

Rubino, J. T., Riggs-Gelasco, P., and Franz, K. J. Methionine motifs of copper transport proteins provide general and flexible thioether-only binding sites for Cu(I) and Ag(I). *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(7):1033–1049, 2010. doi: 10.1007/s00775-010-0663-9. 49

Rubino, J. T., Michael P., C., Matthew, K., Pamela, R.-G., and Katherine J., F. A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper(I)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments. *Metallomics*, 3:61–73, 2011. doi: 10.1039/c0mt00044b.

Sandstead, H. H. Copper bioavailability and requirements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 35(4):809–814, 1982. 7

Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schodel, J., Mole, D. R., Campean, V., Amann, K., Goppelt-Struebe, M., Behrens, J., Eckardt, K.-U., and Wiesener, M. S. The Lysyl Oxidases LOX and LOXL2 Are Necessary and Sufficient to Repress E-cadherin in Hypoxia: Insights Into Cellular Transformation Processes Mediated by HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9):6658–6669, 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.042424. 21, 23

Schuldes, H., Bade, S., Knobloch, J., and Jonas, D. Loss of *in vitro* cytotoxicity of cisplatin after storage as stock solution in cell culture medium at various temperatures. *Cancer*, 79:1723–1728, 1997. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19970501)79:9<1723::AID-CNCR13>3.0.CO;2-\#. 141

Shen, D.-W., Pouliot, L. M., Hall, M. D., and Gottesman, M. M. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacological reviews*, 64(3):706–721, 2012. doi: 10.1124/pr.111.005637. 27

Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47):7265–79, 2003. doi: 10.1038/sj.onc.1206933. 27

Smith, M. G. and Snyder, M. Yeast as a Model for Human Disease. *Current Protocols in Human Genetics*, 48:1–8, 2006. doi: 10.1002/0471142905.hg1506s48. 45

Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical reviews*, 96:2563 – 2603, 1996. doi: 10.1002/chin.199710268. 35

Song, I.-s., Savaraj, N., Siddik, Z. H., Liu, P., Wei, Y., Wu, C. J., and Kuo, M. T. Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. 3:1543–1550, 2004. 138, 168

Steinebach, O. M. and Wolterbeek, H. T. Role of cytosolic copper, metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. *Toxicology*, 92(1-3): 75–90, 1994. doi: 10.1016/0300-483X(94)90168-6. 23

Steinmetz, L. M., Scharfe, C., Deutschbauer, A. M., Mokranjac, D., Herman, Z. S., Chu, A. M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P. J., and Davis, R. W. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nature*, 31:400–404, 2002. doi: 10.1038/ng929. 45

Strimbu, K. and Tavel, J. A. What are Biomarkers? *Current opinion HIV AIDS*, 5(6):463–466, 2010. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.What. 18

Suwalsky, M., Ungerer, B., Quevedo, L., Aguilar, F., and Sotomayor, C. P. Cu^{2+} ions interact with cell membranes. *Journal of inorganic biochemistry*, 70:233–238, 1998. doi: 10.1016/s0162-0134(98)10021-1. 7

Tanzi, R. E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J. L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D. M., Parano, E., Pavone, L., and Brzustowicz, L. M. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature genetics*, 5(4): 344–350, 1993. doi: 10.1038/ng1293-344. 14

Telouk, P., Puisieux, A., Fujii, T., Balter, V., Bondanese, V., Morel, A.-P., Clapisson, G., Lamboux, A., and Albarède, F. Copper Isotope Effect in Serum of Cancer Patients. A Pilot study. *Metallomics*, 7:299–308, 2015. doi: 10.1039/C4MT00269E. 38, 39, 41, 89, 106, 107, 140, 161, 171

Tsai, C. Y., Finley, J. C., Ali, S. S., Patel, H. H., and Howell, S. B. Copper influx transporter 1 is required for FGF, PDGF and EGF-induced MAPK signaling. *Biochemical Pharmacology*, 84(8):1007–1013, 2012. doi: 10.1016/j.bcp.2012.07.014. 22

Turnlund, J. R. Human whole-body copper metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67:960–964, 1998. 7

Turnlund, J. R., Keyes, W. R., Peiffer, G. L., and Scott, K. C. Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope ^{65}Cu. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67:1219–1225, 1998. 7

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1):1–40, 2006. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009. 23

Van den Berghe, P. V., Folmer, D. E., Malingré, H. E., Van Beurden, E., Klomp, A. E., Van de Sluis, B., Merkx, M., Berger, R., and Klomp, L. W. Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochemical journal*, 59:49–59, 2007. doi: 10.1042/BJ20070705. 106

Van Heghe, L., Deltombe, O., Delanghe, J., Depyperec, H., and Vanhaecke, F. The in fluence of menstrual blood loss and age on the isotopic composition of Cu, Fe and Zn in human whole blood. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29:478–482, 2014. doi: 10.1039/c3ja50269d. 34

Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S., and Gitschier, J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper–transporting ATPase. *Nature genetics*, 3:7–13, 1993. doi: 10.1038/ng0193-7. 14

Vulpe, C. D. and Packman, S. Cellular copper transport. *Annual Review of nutrition*, 15: 293–322, 1995. doi: 10.1146/annurev.nu.15.070195.001453. 9

Walczyk, T. and von Blanckenburg, F. Natural iron isotope variations in human blood. *Science*, 295(5562):2065–2066, 2002. doi: 10.1126/science.1069389. 34

Wang, D. and Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews*, 4(4):307–320, 2005. doi: 10.1038/nrd1691. 27

Wapnir, R. A. Copper absorption and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67:1054–1060, 1998. 5

webelements.com. Webelements website. https://www.webelements.com/copper/isotopes.html, 2017. 5

Weinstein, C., Moynier, F., Wang, K., Paniello, R., Foriel, J., Catalano, J., and Pichat, S. Isotopic fractionation of Cu in plants. *Chemical Geology*, 286(3-4):266–271, 2011. doi: 10.1016/j.chemgeo.2011.05.010. 36

Weiss, K. C. and Linder, M. C. Copper transport in rats involving a new plasma protein. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 249(1):E77–E88, 1985. 8

Wenger, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O_2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O_2-regulated gene expression. *The FASEB journal*, 16(10):1151–1162, 2002. doi: 10.1096/fj.01-0944rev. 21, 23

Wey, J. S., Fan, F., Gray, M. J., Bauer, T. W., McCarty, M. F., Somcio, R., Liu, W., Evans, D. B., Wu, Y., Hicklin, D. J., et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer*, 104(2):427–438, 2005. doi: 10.1002/cncr.21145. 21, 23

Wilson, K. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *The Lancet*, 179(4626):1115–1119, 1912. doi: 10.1016/S0140-6736(01)67414-2. 14

Wittung-Stafshede, P. Unresolved questions in human copper pump mechanisms. *Quarterly reviews of biophysics*, 48(4):471–478, 2015. doi: 10.1017/S0033583515000128. 53

Wu, X., Sinani, D., Kim, H., and Lee, J. Copper transport activity of yeast Ctr1 is down-regulated via its C terminus in response to excess copper. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(7):4112–4122, 2009. doi: 10.1074/jbc.M807909200. 103, 118, 119

Xiao, Z. and Wedd, A. G. C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1. *Chemical communications*, 126: 588–589, 2002. doi: 10.1039/b111180a. 49

Xiao, Z., Loughlin, F., George, G. N., Howlett, G. J., and Wedd, A. G. C-terminal domain of the membrane copper transporter Ctr1 from *Saccharomyces cerivisiae* binds four Cu(I) ions as a cuprous-thiolate polynuclear cluster ; sub-femtomolar Cu(I) affinity of three proteins involved in copper trafficking. *Journal of the American Chemical Society*, 126: 3081–3090, 2004. doi: 10.1021/ja0390350. 49

Yang, A. D., Camp, E. R., Fan, F., Shen, L., Gray, M. J., Liu, W., Somcio, R., Bauer, T. W., Wu, Y., Hicklin, D. J., et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer research*, 66(1):46–51, 2006. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3086. 21, 23

yeastgenome.org. Saccharomyces genome database. www.yeastgenome.org, 2017. 45

Yelin, G., Taff, M. L., and Sadowski, G. E. Copper toxicity following massive ingestion of coins. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 8(1):78–85, 1987. doi: 10.1097/00000433-198703000-00019. 7

Yuan, S., Dancis, D., and Klausner, R. Restriction of Copper Export in *Saccharomyces cerevisiae* to a Late Golgi or Post-Golgi Compartment in the Secretory Pathway. *The Journal of biological chemistry*, 272(41):25787–25793, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.41.25787. 103

Zhang, T., Jie, L., Hanjiang, Y., Kun, X., Rui, W., and Zhiying, Z. An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 26(10):545–551, 2011. doi: 10.1002/yea.

Zhou, B. and Gitschier, J. hCtr1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94:7481–7486, 1997. doi: 10.1073/pnas.94.14.7481. 47, 48, 50

Zhou, P. and Thiele, D. Copper and gene regulation in yeast. *BioFactors*, 4:105–115, 1993.

Zhu, X. K., Guo, Y., Williams, R., O'Nions, R. K., Matthews, A., Belshaw, N. S., Canters, G. W., de Waal, E. C., Weser, U., Burgess, B. K., and Salvato, B. Mass fractionation processes of transition metal isotopes. *Earth and Planetary Science Letters*, 200(1-2):47–62, 2002. doi: 10.1016/S0012-821X(02)00615-5. 104, 119

Zowczak, M., Iskra, M., Torlinski, L., and Cofta, S. Analysis of serum copper and zinc concentrations in cancer patients. *Biol Trace Elem Res*, 82(1-3):1–8, 2001. doi: 10.1385/bter:82:1-3:001. 19, 140

Résumé

Le développement de cancer entraîne une dérégulation du métabolisme du cuivre (Cu) qui a notamment été étudiée par analyse de la composition isotopique naturelle du Cu. Les cellules tumorales hépatiques sont enrichies en isotopes lourds du Cu par rapport aux cellules péri-tumorales. Le but de cette thèse est d'identifier les mécanismes responsables de cette différence, en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* dont les mécanismes de réduction et d'import du Cu sont proches de ceux de l'Homme. En mutant les gènes codants pour les importateurs ou les réductases du Cu, j'ai montré que son import protéique génère un enrichissement intracellulaire en isotopes légers du Cu, qui est modulé par l'activité des réductases. Une modélisation numérique m'a permis de montrer que le flux de Cu par les importateurs haute-affinité Ctr est linéairement et négativement corrélé à la composition isotopique du Cu. Ce flux étant modulé par la capacité de réduction membranaire du Cu, j'ai pu lier l'enrichissement en isotopes lourds du Cu des cellules hépatiques tumorales à une diminution de l'activité des réductases membranaires. Par ailleurs, pour un même fond génétique, j'ai mis en évidence une corrélation entre un moindre enrichissement en isotopes légers du Cu et une résistance accrue à un médicament anticancéreux, le cisplatine. De plus, le traitement au cisplatine entraîne un enrichissement des cellules en isotopes lourds du Cu d'autant plus petit que la souche est résistante au cisplatine. Ainsi, ces résultats montrent que la mesure de la composition isotopique du Cu avant et après traitement au cisplatine pourrait permettre de suivre l'apparition d'une chimiorésistance chez les malades, caractérisée par un enrichissement en isotopes lourds du Cu dans les tumeurs, ce qui ouvre la voie au développement d'un nouveau biomarqueur non-invasif de l'apparition d'une résistance au cisplatine.

Abstract

Cancer development leads to Cu metabolism disregulation which were especially studied by the natural copper (Cu) isotopic composition. Hepatocellular carcinoma (hCC) are enriched in heavy Cu isotopes compared to peri-tumoral cells. The goal of this thesis is to identify the mechanism responsible for this difference. I used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* where Cu reduction and Cu import mechanism are close to the human. By mutating the genes coding for Cu reductases or Cu importers, I showed that protein Cu import generate an intracellular light Cu enrichment which is modulated by Cu reductases activity. With a numerical modelisation I calculated that the Cu flux through high-affinity Cu importers is linearly and negatively correlated to the natural Cu isotopic composition. This flux is modulated by the cell reduction ability. Therefore, I have linked the heavy Cu isotopes enrichment in hCC to a lower reductases activity. Besides, for a same genetic background, I observed a correlation between a lower light Cu enrichment and an higher resistance to a anti-tumoral drug, the cisplatin. Moreover, I observed that cisplatin treatment leads to an enrichment in heavy Cu isotopes which is lower for resistant to cisplatin strains. Those results shown that the Cu isotopes measurement in tumors before and after the cisplatin treatment might be used to trace the chemoresistance apparition in patient with cancer which is characaterize by a tumoral heavy Cu isotopes enrichment. This results might pave the way to the development of a new prognosis biomarker of the cisplatin resistance apparition.