



**HAL**  
open science

## Transport et spéciation du fer dans la plante

Stephane Mari

► **To cite this version:**

| Stephane Mari. Transport et spéciation du fer dans la plante. Biologie végétale. 2014. tel-02801360

**HAL Id: tel-02801360**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02801360>**

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

**Université Montpellier 2  
Ecole Doctorale SIBAGHE**

Discipline : Biologie Végétale Intégrative

**Dossier présenté en vue de l'obtention  
de l'Habilitation à Diriger des Recherches**

Par

**Stéphane MARI**

Chargé de Recherche INRA  
Equipe Transport et Signalisation du Fer

Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes  
UMR 5004 CNRS/UMR 0386 INRA/SupAgro/UM2  
Institut de Biologie Intégrative des Plantes Claude Grignon  
2, Place Pierre Viala  
34060 Montpellier cedex 1

<p style="text-align: center;"><b>Docteur de l'Université Montpellier II</b> <b>Spécialisation: Physiologie et biochimie</b> <b>végétale</b></p>
--

## **FORMATION**

---

### **1998-2000**

Stage post doctoral dans le laboratoire de Philip Rea, Université de Pennsylvanie, USA

### **1993-1998**

Thèse de doctorat sous la direction du Pr. JJ MACHEIX.

Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétales Appliquées, Université Montpellier II.

Mention: "Félicitations du jury"

**Sujet de recherche:** Caractérisation biochimique de la Polyphénol oxydase de pulpe de pomme (*Pyrus malus* L. cv Granny Smith)

### **1992**

Diplôme d'Etudes Approfondies "**Bases de la Production Végétale**" option "**Biotechnologie Végétale**".

Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales, centre IRD, Montpellier, France.

Mention: "Bien"

**Sujet de recherche:** Etude histo-cytologique d'apex de caféiers (*Coffea racemosa* et *C. sessiliflora*) au cours de leur cryoconservation par encapsulation-déshydratation. Stage dirigé par Florent Engelmann.

### **1991**

#### **Maîtrise de Physiologie Végétale Appliquée**

Université Montpellier II Mention: "Assez bien"

Mémoire bibliographique: La trigonelline, biosynthèse et rôle physiologique.

### **1990**

#### **Licence de Physiologie Végétale Appliquée**

Université Montpellier II Mention: "Assez bien"

**Sujet de stage:** Teneurs en polyamines de grains de Maïs (*Zea mais* L.) infectés par *Fusarium moniliforme*.

Stage effectué au laboratoire de Physiologie Végétale de la Faculté de Pharmacie de Barcelone, sous la direction du professeur AF Tiburcio.

### **1989**

**DEUG B** option "**biologie**" Mention: "Assez bien"

### **1988**

**Baccalauréat section D** Mention: « Assez bien »

## **PARTICIPATION A DES TACHES COLLECTIVES**

---

- membre du jury de soutenances de L3 BFP, juin 2010

- membre du jury de soutenances de M1 BFP, juin 2013

- membre nommé du conseil de service du laboratoire BPMP (2012- )

- membre du conseil technique du laboratoire (2007-2013)

- membre nommé du Conseil Scientifique Spécialisé (CSS INRA, évaluation individuelle des chercheurs) depuis 2012
- membre du comité d'organisation des journées du Réseau des Microscopistes de l'INRA (RµI, 28-30 novembre 2012, INRA Montpellier).
- membre du jury de thèse de M'Barek Bouazaoui, soutenue le 9 juin 2010 à l'Université de Montpellier II.
- membre du jury de la thèse de Paulina Flis, soutenue le 30 octobre 2013 à l'Université de Pau et des pays de l'Adour.

## **LISTE DES PUBLICATIONS**

---

- Grillet L, Mari S, Schmidt W (2014) Iron in seeds – Loading pathways and subcellular localization. **Frontier in Plant Science**, 4 : 535
- Grillet et al. (2014) Metals : ascorbate opens the door. « **Research Highlights** », **Nat. Chem. Biol.**, vol 10
- Grillet\* L, Ouerdane\* L, Flis P, Hoang M, Isaure M-P, Lobinski R, Curie C, Mari S (2014) Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants. **J. Biol. Chem** 289 : 2515-2525
- Roschzttardtz H, Conéjéro G, Divol F, Alcon C, Verdeil J-L, Curie C, Mari S (2013) New insights into Fe localization in plant tissues. **Frontiers in Plant Science** 4 : 1-11
- Divol\* F, Couch\* D, Conéjéro G, Roschzttardtz H, Mari S, Curie C (2013) The Arabidopsis YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. **Plant Cell** 25 : 1040-1055.
- Roschzttardtz H, Grillet L, Isaure M-P, Conejero G, Ortega R, Curie C. Mari S (2011) Plant cell nucleolus as a hot spot for iron. **J. Biol. Chem.** 286: 27863-27866
- Cailliatte R, Schikora A, Briat JF, Mari S, Curie C (2010) High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for Arabidopsis Growth in Low Manganese Conditions. **Plant Cell** 22: 904-917
- Roschzttardtz H, Conéjéro G, Curie C, Mari S. (2010) Straightforward histochemical staining of Fe by adaptation of an old-school technique. Identification of the endodermal vacuole as the site of Fe storage in Arabidopsis. **Plant Signaling and Behavior**, 5 : 1-2.
- Roschzttardtz H, Conéjéro G, Curie C, Mari S. (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. **Plant Physiol.** 151(3):1329-38.
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.F., Mari, S., Curie, C (2009) The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. **Biochem., J.**, 422 (2) : 217-228.
- Dreyfus C, Lemaire D, Mari S, Pignol D, Arnoux P (2009) Crystallographic snapshots of iterative substrate translocations during nicotianamine synthesis in archea. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 106 : 16180-16184.
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Ann. Bot.** 103 : 1-11.
- Cassin G, Mari S, Curie C, Briat JF, Czernic P (2009) Increased sensitivity to iron deficiency in Arabidopsis thaliana overaccumulating nicotianamine. **J. Exp. Bot.** 60 : 1249-1259.
- Gendre D, Czernic P, Conejero G, Pianelli K, Briat JF, Lebrun M, Mari S (2007) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. **Plant J.** 49 : 1-15.
- Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat JF Lebrun M, Czernic P (2006) Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel

- chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **J. Exp. Bot.** 57 : 4111-4122.
- Prévéral S, Ansoborlo E, Mari S, Vavasseur A, Forestier C (2006) Metal(oid)s and radionuclides cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of YCF1, glutathione and effect of buthionine sulfoximine. **Biochimie.** 88 :1651-1663.
- Ouerdane L, Mari S, Czernic P, Lebrun M, Lobinski R (2006) Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. **J. Anal. Atom. Spectrom.** 21 : 676-683.
- Mari S, Lebrun M (2005) Metal immobilisation : where and how ? *Topics in Current Genetics, Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification* (TamasMJ and Martinoia E Eds, New York, Springer-Verlag) pp273-291.
- Le Jean, M., Schikora, A., Mari, S., Briat, J.F., & Curie, C (2005) A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. **Plant J.** 44 : 769-782.
- Pianelli K, Mari S, Marquès L, Lebrun P, Czernic P (2005) Nicotianamine over-accumulation confers resistance to nickel in *Arabidopsis thaliana*. **Transgenic Research.** 14: 739-748.
- \*Vatamaniuk OK, \*Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA. (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis: stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of arabidopsis thaliana PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. **J. Biol. Chem.** 279 : 22449-22460.
- Vacchina V, Mari S, Czernic P, Marquès L, Pianelli K, Schaumloeffel D, Lebrun M, Lobinski R (2003) Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. **Anal. Chem.** 75 : 2740-2745.
- Forzani C, Lobreaux S, Mari S, Briat JF, Lebrun M (2002) Metal resistance in yeast mediated by the expression of a maize 20S proteasome alpha subunit. **Gene.** 293:199-204.
- \*Vatamaniuk OK, \*Mari S, Lu Y-P and Rea PA (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase : blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed polymerization of glutathione and related thiol peptides **J. Biol. Chem.** 275 : 31451-31459
- \*Vatamaniuk OK, \*Mari S, Lu Y-P and Rea PA (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis* : isolation and in vitro reconstitution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96 : 7110-7115.
- Alami I, Mari S, and Clerivet A (1997) A glycoprotein from *Ceratocystis fimbriata* f sp. platani triggers phytoalexin synthesis in *Platanus X acerifolia* cell-suspension cultures. **Phytochemistry**, 48: 771-776.
- Mari S, Marquès L, Breton F, Berger S, Karamanos Y and Macheix J J (1998) Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, 49: 1213-1217.
- Mari S, Engelmann F, Chabbrillange N, Huet C and Michaux-Ferrière N (1995) Histocytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. **Cryo-letters**, 16: 289-298.
- \* auteurs ayant contribué de manière équivalente.

## **Activité d'encadrement de stagiaires, niveau Licence-Master :**

### **2003**

- Mathilde Séguéla M1 BFP : Recherche de gènes impliqués dans le transport de complexes phytochélatines-cadmium dans la vacuole.

### **2004**

- Mathilde Séguéla M2 BFP : Recherche de gènes impliqués dans le transport de complexes phytochélatines-cadmium dans la vacuole.

### **2007**

- Marine Déon M1 BFP : Caractérisation de la fonction des gènes de la famille des YSL chez *Arabidopsis thaliana*.

### **2008**

- Léonor Duriot L3 BFP : Transport et distribution du fer dans la plante / étude de la fonction des gènes AtYSL.

- Benoit Landrin L3 ENS Lyon : Caractérisation de deux cytochromes b5 réductase chez *Arabidopsis thaliana* et de leur rôle putatif dans l'homéostasie du Fer

### **2009**

- Justine Bresson M1 BFP : Mise en place d'un crible génétique de tolérance à la carence en fer.

- Fernando Clavijo L3 Licence Pro « Agriculture raisonnée et certification environnementale » : Etude du chargement en fer de la graine de pois (*Pisum sativum*)

### **2011**

- Amélie Saint-Cirel M1 Biotechnologies, Bioressources et Biodiversité : Caractérisation phénotypique et biochimique des mutants de réductases ferriques *fro2* et *fro6* chez *Arabidopsis thaliana*.

- Simon Vanderlinden, L3 BFP : Recherche de réductases ferriques intracellulaires d'*Arabidopsis thaliana* par expression hétérologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et analyse de mutants.

### **2012**

- Sandrine Chay, M2 BFP: Caractérisation de réductases ferriques potentiellement impliquées dans la remobilisation du fer vacuolaire chez *Arabidopsis thaliana*.

### **2013**

- Cassandre Tchekinian, BTS 1<sup>ère</sup> Biotechnologies, Montpellier

## 2014

- Cassandre Tchekinian, BTS 2<sup>ème</sup> Biotechnologies, Montpellier

### **Activité d'encadrement de thèses et post-doctorants (et publications associées)**

- Delphine Gendre (thèse) 2003-2005 : Caractérisation physiologique et moléculaire des transporteurs YSL de *Thlaspi caerulescens* : rôle dans l'hyperaccumulation polymétallique.

Gendre et al Plant J 2007

Mari et al J Exp Bot 2006

- Rémy Cailliatte (thèse) 2006-2008 : Caractérisation physiologique et fonctionnelle de la famille NRAMP de transporteurs de métaux chez *Arabidopsis thaliana*

Cailliatte et al Biochem J 2009

Cailliatte et al Plant Cell 2010

- Louis Grillet (thèse) 2010-2012 : Spéciation, transport et localisation subcellulaire du fer chez *Pisum sativum* et *Arabidopsis thaliana*.

Roschztardt et al JBC 2011

Grillet et al JBC 2014

Grillet et al., 2014 Front Plant Sci

- Hannetz Roschztardt (post-doc) 2008-2010 : projet ANR « DISTRIMET »

Roschztardt et al Plant Physiol 2009

Roschztardt et al Plant Signal Behav 2009

Roschztardt et al JBC 2011

Roschztardt et al Front Plant Sci 2013

- Hoang Thi Thanh Minh, (thèse) 2013-2015 : Caractérisation du transport du fer dans la graine.

Grillet et al JBC 2014

**Financements obtenus :**

Bourse FRM post doc 1999

Bonus Qualité Recherche (BQR) UMII 2001

« Tox Nuc E », projet TRANSPLAM (partenaire)

ANR CIDS (partenaire)

ANR DISTRIMET (partenaire)

ANR HEMOLI (partenaire)

ANR PlantMan (partenaire)

ANR Manomics (partenaire)

ANR SUBCELIF (porteur)

Bourse thèse INRA Louis Grillet

AAP Département Biologie Végétale INRA (1 sur projet « AsA Efflux », 1 pour équipement moyen « MP-AES »)



## SYNTHESE DES RECHERCHES

### **L'homéostasie des métaux lourds chez les plantes : clonage et caractérisation enzymologique de la phytochélatine synthase d'*Arabidopsis thaliana* (Post doctorat, Philadelphie).**

Le choix du laboratoire de Phil Rea pour réaliser mon stage post-doctoral découlait assez naturellement des travaux et de la thématique abordés pendant ma thèse, au Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétale Appliquée (Université Montpellier II), sous la direction de Jean-Jacques Macheix. Ce laboratoire était spécialisé dans l'étude du rôle physiologique des composés phénoliques chez les plantes, en se basant principalement sur de grandes compétences analytiques pour extraire, séparer et identifier les différents types de composés phénoliques. Les techniques d'extractions différentielles avec des solvants organiques, de chromatographie en couche mince et surtout de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) étaient utilisées en routine dans ce laboratoire. L'objectif de ma thèse, dans ce contexte, était d'apporter une composante biochimique et moléculaire par l'étude d'une enzyme du métabolisme phénolique, la polyphénol oxydase. Cette enzyme est responsable du brunissement des tissus végétaux, qui peut avoir lieu lors de blessures mécaniques ou d'attaques par des pathogènes. Au-delà des résultats obtenus pendant ces trois ans, j'ai été sensibilisé et très attiré par les problématiques liées au transport et à la compartimentation des composés phénoliques (synthèse dans le cytosol, accumulation principalement dans la vacuole). C'est à cette époque que le premier transporteur ABC (pour ATP Binding Cassette) d'origine végétale a été cloné et caractérisé.

L'équipe de Philip Rea venait en effet de cloner l'ADNc de AtMRP2 et avait montré par expression hétérologue dans la levure sa fonction de transport. Cette protéine était capable de catalyser le transport vacuolaire de composés d'origine chimique très variée (herbicides, composés phénoliques, catabolites de la chlorophylle), à condition d'être conjugués au glutathion. Au-delà de la simple identification d'un nouveau gène dans le règne végétal, cette découverte était fondatrice car elle permettait de comprendre comment les métabolites végétaux, très nombreux et chimiquement très divers, pouvaient être transportés dans la vacuole sans nécessiter

un nombre aussi important de systèmes de transport transmembranaire. La conjugaison avec le glutathion, *via* l'arsenal de glutathion-S-transférases, rendait les molécules reconnaissables et transportables par les protéines de la famille des MRP (qui ont été rebaptisées GS-X pumps). C'est dans ce contexte que j'ai décidé de réaliser mon stage post-doctoral avec Philip Rea, après obtention d'une bourse de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

### **La détoxification des métaux lourds chez les plantes : synthèse de phytochélatines et transport vacuolaire des complexes phytochélatines-métaux**

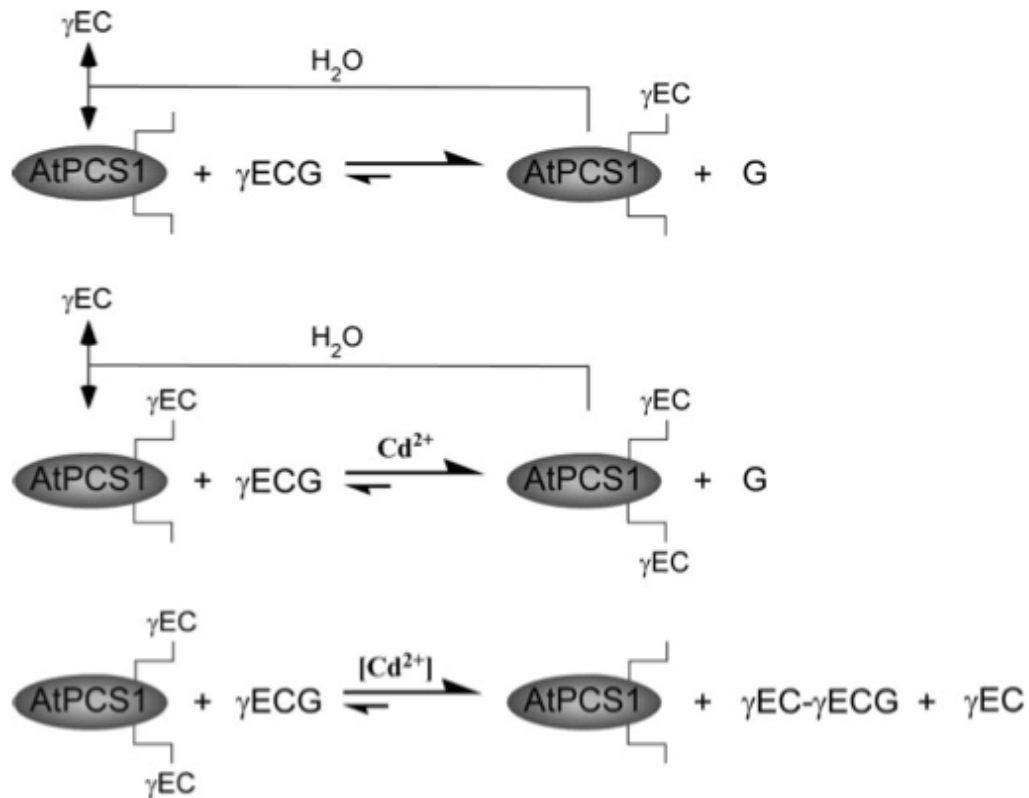
Les métaux essentiels (Fe, Zn, Cu...) jouent un rôle majeur dans les cellules, principalement en tant que cofacteurs pour de nombreuses protéines de grandes fonctions comme la respiration, la photosynthèse ou la synthèse d'ADN. Ces ions métalliques, à des concentrations supra optimales, ainsi que les ions métalliques non essentiels (Cd, Hg, As, Pb...) sont potentiellement toxiques pour les cellules car ils peuvent entraîner le déplacement de co-facteurs endogènes, une forte réactivité avec les groupements thiols protéiques ou la production d'espèces réactives de l'oxygène. Le maintien de l'homéostasie des métaux nécessite, notamment, la synthèse de ligands ayant une forte affinité pour ces métaux, permettant leur détoxification. Chez les plantes, trois classes de peptides peuvent jouer cette fonction : le glutathion (GSH), les métallothionéines (MTs) et les phytochélatines (PCs). Le GSH est un tripeptide (g-glutamyl-cystéinyl-glycine) synthétisé par voie enzymatique. Capable de complexer *in vitro* de nombreux ions métalliques, le GSH est surtout l'anti-oxydant majeur de la cellule. Les MTs sont des protéines de faible taille (4 à 8 kDa), riches en cystéine, capables de complexer de nombreux métaux *in vitro* et chez les mammifères. Chez les plantes la fonction des MTs, difficile à appréhender, semble restreinte à l'homéostasie du Cu (Mari and Lebrun, 2006). Les PCs sont des polymères de type (g-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly, formés par synthèse enzymatique (PC synthase) à partir du GSH. Grâce à l'addition de groupements thiols, l'affinité des PCs pour les ions métalliques est fortement augmentée par rapport au monomère initial, le GSH. Le mécanisme de détoxification des ions métalliques PC-dépendant a été complètement élucidé chez *Schizosaccharomyces pombe* : l'exposition aux métaux lourds (Cd en l'occurrence) provoque l'accumulation

de PCs, qui vont complexer les ions métalliques puis les complexes PCs-métaux sont accumulés dans la vacuole grâce au transporteur ABC tonoplastique HMT1 (Ortiz et al., 1992; Ortiz et al., 1995). L'accumulation de PCs après exposition aux métaux lourds est un mécanisme ubiquitaire chez les plantes (Mari and Lebrun, 2006). Par analogie avec *S. pombe*, l'activité tonoplastique de transport de complexes PC-métaux, étudiée chez l'avoine, possède toutes les caractéristiques biochimiques d'un transporteur ABC : utilisation d'ATP-Mg comme source directe d'énergie, insensible au gradient de protons et sensible au vanadate (Salt and Rauser, 1995).

À mon arrivée dans le laboratoire de Philip Rea, les gènes codant pour la PC synthase d'une part et le système de transport vacuolaire de complexes PC-métaux n'avaient pas encore été identifiés. Toutefois, un crible de tolérance au Cd avait été réalisé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, par expression hétérologue d'une banque d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*. Ce crible avait permis d'isoler un ADNc codant pour une protéine soluble de 55 kDa, dont la fonction était jusqu'alors inconnue. J'ai alors été sollicité pour travailler sur l'identification de la fonction de cette protéine, baptisée AtCRF1 pour Cadmium Resistance Factor1. Dans un premier temps, nous avons généré une version de AtCRF1 fusionnée à l'étiquette FLAG, vérifié que la fusion était fonctionnelle sur la base de la tolérance au Cd, pour pouvoir purifier la protéine et l'étudier *in vitro*. En parallèle, nous avons analysé le contenu cellulaire en Cd, par fractionnement d'extraits de levures exprimant AtCRF1 exposées à du  $^{109}\text{Cd}$ . Ceci nous a permis d'établir que l'expression de AtCRF1 induisait l'apparition de molécules de faible poids moléculaire capables de complexer du Cd. Suspectant que ces molécules pouvaient être des phytochélatines, nous avons décidé de développer un outil analytique permettant de détecter et quantifier les PCs, par chromatographie liquide (HPLC) suivie d'une dérivation permettant de quantifier les groupements thiols. Nous avons pu établir que les levures exprimant AtCRF1 accumulaient effectivement des phytochélatines d'ordre 2 (PC<sub>2</sub>) et 3 (PC<sub>3</sub>) et surtout que la protéine AtCRF1-FLAG, purifiée, était nécessaire et suffisante pour catalyser *in vitro* des PCs à partir du substrat, le GSH et en présence de Cd dans le milieu (Vatamaniuk et al., 1999). À partir de cette découverte, la protéine fut rebaptisée AtPCS1 pour *Arabidopsis thaliana* PhytoChelatin Synthase1 (E.C. 2.3.2.15).

Chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons montré par Northern blot que l'expression de AtPCS1 est constitutive dans les racines et les parties aériennes et qu'elle n'est pas régulée par l'exposition à des ions métalliques. Par ailleurs, une des caractéristiques originale de l'activité PC synthase est la stricte nécessité de métaux pour la synthèse de PCs (Grill et al., 1989). L'accumulation de PCs étant quant à elle induite dans les plantes traitées avec des excès de métaux, il apparaissait donc que la régulation de la synthèse de PCs n'avait pas lieu au niveau de l'expression de la PC synthase mais plutôt à un niveau post-traductionnel. Nous nous sommes donc focalisés sur la caractérisation biochimique de la réaction de synthèse de phytochélatines catalysée par AtPCS1 *in vitro*. L'activation de l'enzyme par les métaux pouvait avoir lieu soit par fixation des ions métalliques directement sur la protéine soit par une réaction avec le substrat. Dans les conditions de synthèse optimales, en présence de concentrations en GSH et Cd de l'ordre du millimolaire et micromolaire, respectivement, l'analyse thermodynamique des espèces chimiques réalisée *in silico* avec le logiciel Solwin prédisait que la totalité du Cd se retrouvait spontanément sous la forme de complexe *bis-glutathionato*-Cd (Cd-GS<sub>2</sub>). On pouvait alors considérer que AtPCS1 nécessitait non pas un seul substrat, le GSH, mais deux, le GSH libre et le Cd-GS<sub>2</sub>. La coordination d'un atome de Cd par deux GSH est obtenue par déprotonation des thiols et formation de thiolates. La fonction d'activation des métaux pouvait donc en fait se résumer au fait de générer un substrat avec le groupement thiol bloqué, ce qui a été confirmé en montrant que AtPCS1 était capable de synthétiser des PCs à partir de glutathion-S-méthylé comme unique substrat (Vatamaniuk et al., 2000). Grâce à ces nouvelles données, nous avons pu alors revisiter les cinétiques enzymatiques en considérant l'existence de deux substrats (GSH + Cd-GS<sub>2</sub>) et nous avons alors pu démontrer que la synthèse de phytochélatines suivait un mécanisme réactionnel à deux substrats de type ping-pong (Vatamaniuk et al., 2000). Selon ce type de schéma réactionnel, l'enzyme réagit avec un premier substrat pour former un premier produit plus un intermédiaire enzyme-substrat, puis c'est l'arrivée du deuxième substrat qui déplace le substrat lié à l'enzyme pour former le deuxième produit. En utilisant du GSH radioactif marqué soit sur la cystéine soit sur la glycine terminale, nous avons montré que la première étape consistait en un clivage de la liaison covalente entre la cystéine et la glycine, formation d'un intermédiaire acylé entre la protéine et le  $\gamma$ -Glu-Cys avec libération de glycine libre. L'arrivée du deuxième substrat provoquait le transfert du  $\gamma$ -Glu-Cys sur

un GSH accepteur pour former la PC d'ordre 2 ayant pour formule  $\gamma$ -Glu-Cys- $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (Fig. 1). Enfin, une approche de mutagenèse dirigée a permis de mettre en évidence que la cystéine 56 de AtPCS1 était vraisemblablement un résidu clé pour l'activité enzymatique (Vatamaniuk et al., 2004).



**Figure 1 : Modèle mécanistique de l'acylation multiple de AtPCS1, avec génération concomitante de glycine libre,  $\gamma$ -Glu-Cys et  $\text{PC}_2$ .** La première étape représente la formation de l'intermédiaire acylé avec  $\gamma$ -Glu-Cys, indépendamment du  $\text{Cd}^{2+}$ , par le clivage d'une molécule de GSH et libération de Gly. Au cours de la deuxième étape, l'enzyme subit une autre acylation, cadmium dépendante, par le clivage d'une deuxième molécule de GSH. Lors de la troisième étape, une unité de  $\gamma$ -Glu-Cys de l'enzyme di-acylée est transférée à une molécule de GSH (ou de  $\text{PC}_n$ ) pour former la phytochélatine d'ordre 2,  $\text{PC}_2$  (ou  $\text{PC}_{n+1}$ ). Au cours des trois étapes une hydrolyse des intermédiaires acylés est possible, avec transfert de  $\gamma$ -Glu-Cys à une molécule d'eau. L'énergie libérée au cours de ce transfert pourrait être requise pour générer une nouvelle liaison peptidique (formation de  $\text{PC}_2$  à partir de GSH ou  $\text{PC}_{n+1}$  à partir de  $\text{PC}_n$ ).

En conclusion, bien que l'objectif initial de travailler sur les transporteurs ABC n'ait pas été atteint, mon stage post-doctoral m'a permis de participer à une autre

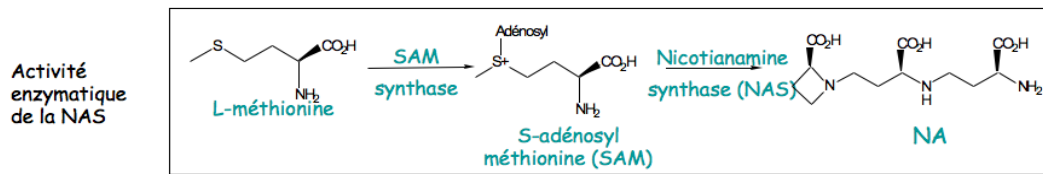
aventure tout aussi passionnante et néanmoins liée aux mécanismes d'homéostasie des métaux. Le clonage et l'identification de l'enzyme responsable de la synthèse de phytochélatines m'a permis de découvrir un nouveau domaine de recherche concernant la spéciation des ions métalliques dans les systèmes biologiques, c'est-à-dire l'étude des ligands synthétisés par les cellules pour détoxifier, transporter, stocker et délivrer les ions métalliques aux sites où ils sont requis. Cette thématique a depuis lors été le fil conducteur majeur de mon activité de recherche.

**Les plantes hyperaccumulatrices de métaux : nouveaux modèles pour l'étude des mécanismes de tolérance et de circulation des métaux lourds. (recrutement CR INRA, Montpellier, BPMP, équipe « métaux »).**

### **1. Clonage de la nicotianamine synthase de *Thlaspi caerulescens* et tolérance au nickel**

Généralement, la stratégie de tolérance des métaux lourds, pour les plantes non-hyperaccumulatrices, est de limiter le transport des métaux vers les parties aériennes et de les séquestrer dans les racines. Les plantes hyperaccumulatrices de métaux, souvent endémiques de sites métallifères, ont deux particularités physiologiques qui en font des modèles de choix pour étudier l'homéostasie des métaux : d'une part une forte tolérance vis-à-vis de concentrations en métaux lourds qui seraient létales pour des espèces non-hyperaccumulatrices et d'autre part un transport massif de ces métaux lourds, des racines vers les parties aériennes.

Une approche avait été initiée dans l'équipe « métaux » visant à identifier des gènes impliqués dans la tolérance au nickel de la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*. Pour cela, une banque d'ADNc avait été générée afin de réaliser un crible de tolérance au Ni par expression hétérologue de cette banque dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette approche était conduite par Pierre Czernic, maître de conférence récemment recruté dans l'équipe. Ce crible avait permis d'isoler un ADNc codant pour la nicotianamine synthase. La nicotianamine (NA) est un métabolite ubiquitaire, capable de complexer *in vitro* différents métaux (Mn, Fe, Zn, Cu, Ni...). La fonction de cette molécule était connue principalement à travers l'étude d'un mutant de tomate, *chloronerva*, dépourvu de NA.



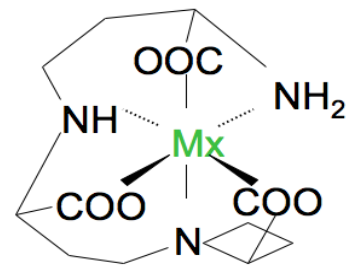
Forte affinité de la NA avec de nombreux métaux:

Métaux divalents	Mn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
Constante d'affinité (log K)	8,8	12,4	15,05	14,8	16,1	18,6



Mutant de tomate  $\Delta NAS$

Défaut de circulation du Fe et Cu:  
 -pas d'acheminement du fer aux jeunes feuilles  
 -pas de translocation racine/feuille du Cu



**Figure 2 : La nicotianamine (NA), un ligand majeur des métaux essentiels ou non-essentiels chez les plantes.**

En résumé (Fig. 2), la NA est impliquée dans le transport du Cu des racines vers les feuilles, vraisemblablement en formant un complexe Cu-NA dans le xylème, ainsi que dans la « solubilisation » intracellulaire du Fe (Curie et al., 2009). Le fait de pouvoir associer la NA avec la tolérance à un métal lourd était très original à ce moment et ouvrait de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes de tolérance et de transport à longue distance des métaux lourds chez les plantes, en particulier les hyperaccumulatrices. Il était clair qu'il fallait mettre tous nos efforts en commun pour faire avancer ce projet très prometteur. Le premier outil que j'ai mis en place pour pouvoir poursuivre ce projet, grâce à mon expérience récente sur les phytochélatines, a été une méthode de détection de la NA, par HPLC, en me basant sur les protocoles disponibles pour doser les acides aminés (la NA étant un dérivé d'acide aminé). Un protocole a donc été mis en place, par dérivation avec de l'o-phthalaldialdéhyde (OPA) et chromatographie en phase inverse avec détection par fluorescence. Dans un premier temps, nous avons appliqué ce

protocole aux levures qui exprimaient la NA synthase et nous avons montré que ces levures accumulaient effectivement de la NA alors que les levures contrôle en étaient dépourvues. Cette donnée montrait que la NA synthase clonée était fonctionnelle et suggérait que la tolérance au Ni induite par l'expression de cette enzyme était vraisemblablement liée à la capacité de la NA à complexer les métaux.

## **2. Formation du complexe Nickel-nicotianamine *in vivo***

Le tournant de ce projet a été la collaboration établie avec le laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique Environnement (LCABIE, CNRS Université de Pau), dirigé par Ryszard Lobinski. Ce laboratoire est spécialisé dans le développement d'instrumentations de chimie analytique visant caractériser les formes chimiques des métaux dans un environnement donné (la spéciation chimique). Lors de mes premiers contacts avec Ryszard Lobinski, l'activité du LCABIE était axée sur des problématiques environnementales. Nous étions alors les premiers biologistes à manifester un intérêt pour l'étude de la spéciation des métaux. Le défi, fort passionnant, que j'ai dû relever a été (i) de comprendre le type d'informations que les techniques du LCABIE étaient susceptibles de générer à partir de matériel biologique, (ii) d'expliquer à nos collaborateurs l'importance que pouvait avoir l'étude de la spéciation des métaux dans un système biologique. Ce dialogue, que je considère comme une part importante de l'animation scientifique du projet, a été d'une grande richesse pour les deux partenaires. En effet, nous avons dû nous initier aux techniques de la chimie analytique, pour en comprendre les applications, les résultats générés ainsi que les limitations, alors que nos collaborateurs devaient acquérir les notions de base de biologie, en portant une attention particulière aux notions de compartiments sub-cellulaires, avec les contraintes que cela suppose.

Nous avons débuté la collaboration avec un système biologique assez simple, les levures tolérantes au nickel par expression d'une NA synthase fonctionnelle (TcNAS). Notre objectif était d'essayer de montrer que le phénotype de tolérance au Ni était dû à la complexation du métal avec la NA dans les cellules. J'ai effectué plusieurs séjours à Pau pour fournir le matériel biologique (extraits de levures, nicotianamine pure) et participer aux premières expériences dédiées à l'analyse de la spéciation du nickel dans les levures transformées avec TcNAS. L'identification chimique formelle de complexes métalliques est obtenue par spectrométrie de masse, de type electrospray ionization (ESI). Dans un spectre de masse, un



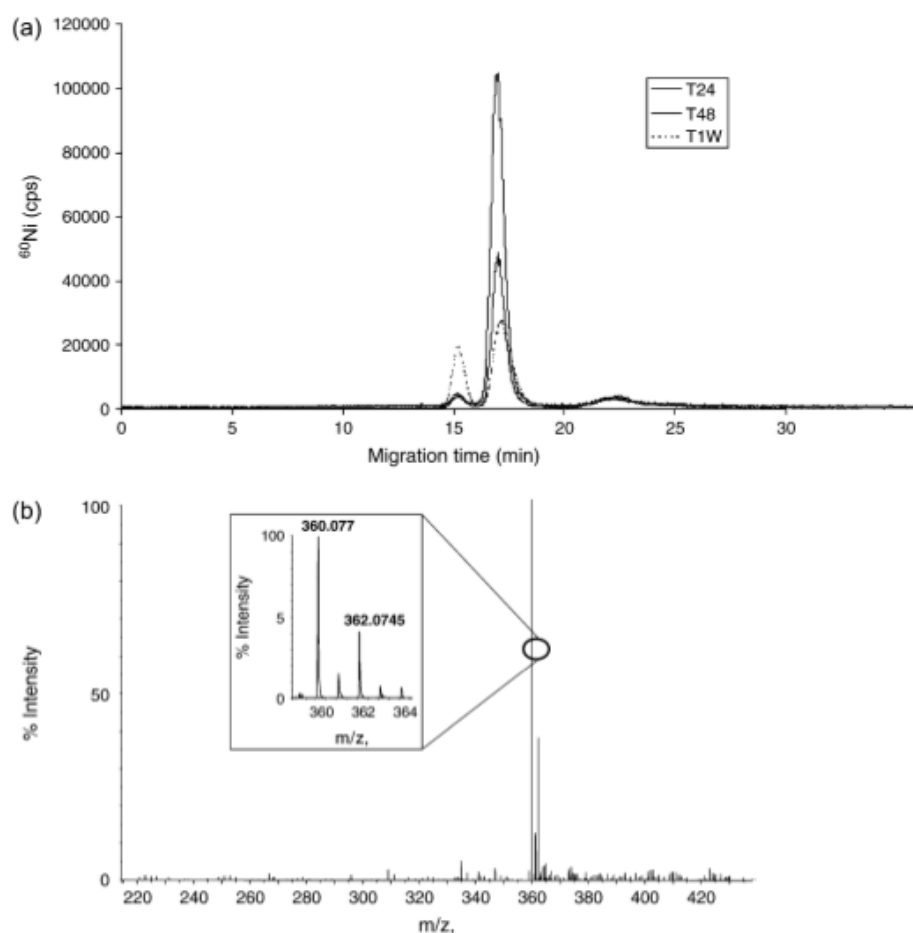
complexe métallique va avoir une trace particulière, due à la proportion relative des différents isotopes naturels des métaux. Par exemple, un complexe contenant un atome de nickel va générer deux espèces chimiques différentes, séparées de deux unités de masse correspondant aux isotopes  $^{58}\text{Ni}$  et  $^{60}\text{Ni}$ , dans une proportion 70%-30% respectivement. Pour que ceci soit visible, il faut néanmoins que le complexe métallique soit suffisamment stable et ne pas se dissocier pendant l'analyse. Au cours de ces travaux, nous avons montré qu'il était possible de reconstituer le complexe nickel-nicotianamine (Ni-NA) *in vitro* et obtenir le spectre de masse correspondant ( $m/z$  360) et que ce complexe était formé *in vivo* dans les levures exprimant TcNAS. Ces travaux ont donné lieu à une publication conjointe (équipe « métaux » à Montpellier et LCABIE) qui a eu un grand impact dans la communauté de la chimie analytique en temps que « proof of concept », puisqu'il représentait le premier exemple de mise en pratique des approches de spéciation sur du matériel biologique, permettant de révéler la fonction d'un gène (Vacchina et al., 2003).

### **3. Rôle de la NA dans la circulation du nickel chez *Thlaspi caerulescens***

#### **3.1. Caractérisation physiologique de la circulation de NA et formation *in planta* du complexe nickel-NA**

Forts de cette expérience et à la lumière de ces nouvelles données sur la capacité de la NA à complexer le Ni *in vitro*, nous nous sommes alors focalisé sur notre plante modèle, *Thlaspi caerulescens* et l'hyperaccumulation de Ni. Cette partie du travail a été menée à « quatre mains » par Pierre Czernic (MCF UMII) et moi-même, avec la participation de deux thésardes, Delphine Gendre et Katia Pianelli, ainsi que la participation active de nos collaborateurs à Pau, en l'occurrence Laurent Ouerdane (ATER au LCABIE à ce moment). Nous avons utilisé des plantes de *Thlaspi caerulescens* et de *Thlaspi arvense* (plante non-tolérante et non-accumulatrice servant de contrôle) exposées à différentes concentrations de Ni, sur lesquelles différents types de mesures ont été effectuées. Nous avons quantifié les concentrations en NA et nickel ainsi que l'expression de TcNAS dans les racines et les parties aériennes des plantes, ce qui a permis de mettre en évidence un mécanisme de circulation de NA et du complexe nickel-NA chez *Thlaspi caerulescens*, rendant compte de la capacité de cette espèce à hyperaccumuler le Ni

dans les parties aériennes. La NA, synthétisée apparemment exclusivement dans les parties aériennes, est transportée vers les racines lors d'une exposition au Ni, puis NA et nickel sont retrouvés dans la sève du xylème. L'analyse de la spéciation du nickel dans la sève du xylème de *Thlaspi caerulescens* a alors montré la présence du complexe Ni-NA dans cet échantillon, ce qui représentait la première preuve moléculaire et structurale du rôle de la nicotianamine dans la formation de complexes avec des métaux in planta et sa fonction dans le processus d'hyperaccumulation (Mari et al., 2006). D'un point de vue quantitatif, le complexe Ni-NA pouvait représenter jusqu'à environ 30% du nickel circulant (Fig. 3).



**Figure 3 : Formation du complexe nickel-nicotianamine *in vivo* dans le xylème de *Thlaspi caerulescens*.** Les plantes ont été cultivées en hydroponie avec 100 $\mu\text{M}$  de  $\text{NiSO}_4$ , le xylème prélevé après 24h (T24), 48h (T48) ou une semaine (T1W). (a) séparation des molécules contenant du nickel, par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la détection du Ni par ICP-MS ; (b) analyse par spectrométrie de masse électrospray des fractions contenant du Ni. L'insert représente un agrandissement de la zone de masse 358-364 (m/z) montrant le profil isotopique caractéristique du complexe nickel-nicotianamine.

### **3.2. Spéciation du nickel dans le xylème : mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse par chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC)**

La participation de Laurent Ouerdane à ce projet a été décisive car au-delà de ses connaissances en spectrométrie de masse « classique », Laurent a introduit une nouvelle façon de purifier les complexes métalliques, en amont de l'identification par spectrométrie de masse. L'écueil majeur rencontré lors de la chromatographie des complexes métallique par exclusion stérique est la faible stabilité de nombreux complexes métalliques dans ces conditions chromatographiques, ce qui entraîne un faible rendement et de grandes pertes en métaux qui restent adsorbés à la phase stationnaire. Pour contourner ce problème, Laurent Ouerdane a introduit un autre type de chromatographie, par interactions hydrophiles (HILIC) à la place de l'exclusion stérique (SE-HPLC) trop agressive pour les complexes métalliques. Grâce à cette modification majeure, l'intégrité des complexes a été très sensiblement améliorée (de 20% pour la SE-HPLC à 80% pour la HILIC), permettant alors de réaliser une étude beaucoup plus exhaustive et détaillée des complexes du nickel circulant dans la sève de *Thlaspi caerulescens* (Ouerdane et al., 2006). Parmi les complexes ainsi identifiés, certains, comme le complexe Ni-(histidine)<sub>2</sub>, avaient déjà été proposés dans le contexte de plantes hyperaccumulatrices (Krämer et al., 1996) mais jamais identifiés clairement, alors que d'autres comme Ni-(citrate)<sub>2</sub>, Ni<sub>2</sub>-(citrate)<sub>2</sub> et Ni-(malate)<sub>2</sub> n'avaient jamais été clairement envisagés ou proposés. Clairement, cette amélioration technique a permis d'avoir accès à un plus grand nombre de complexes métalliques, notamment ceux dont la faible stabilité chimique rendait l'identification impossible jusqu'alors. Enfin, cette nouvelle méthodologie a permis de revisiter les données quantitatives des proportions des différents complexes et il est finalement apparu que le complexe nickel-NA était non seulement le plus stable chimiquement mais aussi le plus abondant (près de 45% du Ni total).

En résumé, la collaboration avec le LCABIE a été très fructueuse, avec la publication de plusieurs articles en commun. De nouveaux développements technologiques ont été réalisés, permettant de surmonter les difficultés liées à des échantillons végétaux comme la grande complexité chimique des ligands présents, la faible stabilité des complexes ainsi que leur faible concentration.

#### **4. Caractérisation moléculaire, physiologique et fonctionnelle des transporteurs de la famille YSL (thèse Delphine Gendre)**

La circulation de nicotianamine dans la plante, seule ou sous forme de complexes métalliques, implique le passage de membranes cellulaires pour le chargement ou le déchargement du système vasculaire. Puisque la circulation de complexes Ni-nicotianamine semblait être un mécanisme important pour l'hyperaccumulation de Ni chez *Thlaspi caerulescens*, nous avons décidé d'étudier les systèmes de transport trans-membranaire de complexes NA-métaux. Il faut savoir que jusqu'alors ces transporteurs n'avaient pas été identifiés. Les candidats évidents pour cette activité de transport étaient les gènes de la famille YSL, pour Yellow Stripe1-Like. Chez les monocotylédones, le gène *YS1* code pour un transporteur racinaire de complexes fer-phytosidérophores, jouant un rôle majeur dans l'acquisition du fer de la rhizosphère (Curie et al., 2001). Les phytosidérophores sont des molécules dérivées de la nicotianamine, excrétés par les racines pour complexer le fer qui est ensuite absorbé sous la forme Fe-phytosidérophore. L'identification de gènes homologues de *YS1* chez les dicotylédones, ne produisant pas de phytosidérophores, (huit YSL chez *Arabidopsis thaliana*), nous a amené à considérer que ces protéines devaient transporter des complexes structurellement proches du complexe Fe-PS, en l'occurrence des complexes NA-métaux.

##### **4.1. Clonage de gènes YSL chez *Thlaspi caerulescens***

*Thlaspi caerulescens* n'étant pas une plante modèle, la recherche et le clonage de gènes YSL ont été conduits « à l'ancienne », c'est-à-dire en utilisant des oligonucléotides dégénérés choisis à partir d'alignements des séquences des huit gènes YSL identifiés chez *Arabidopsis thaliana*. Des amplifications PCR réalisées sur de l'ADN génomique et sur des ADNc ont permis d'amplifier trois fragments différents ayant de fortes homologues avec AtYSL3, AtYSL5 et AtYSL7. Ces trois fragments ont alors été utilisés comme sondes pour cribler une banque d'ADNc issus de feuilles de *Thlaspi caerulescens* (générée par Pierre Czernic avant mon arrivée) pour isoler des clones contenant des ADNc de pleine longueur. À l'issue de ce criblage, *TcYSL7* a été cloné en pleine longueur et un fragment a été cloné pour *TcYSL3* pour lequel il manquait vraisemblablement une partie en 5', par comparaison

avec AtYSL3. Les fragments manquants (5' pour *TcYSL3*, 5' et 3' pour *TcYSL5*) ont alors été obtenus par RACE-PCR.

#### 4.2 Les TcYSL sont des transporteurs de complexes NA-métaux

D'un point de vue chronologique, à ce moment du projet, la fonction de transport de complexes NA-métaux (ou phytosidérophores-métaux) n'avait été établie que pour ZmYS1 (Schaaf et al., 2004) et OsYSL2 (Koike et al., 2004), deux protéines de monocotylédones (maïs et riz respectivement). Sur la base d'expression en ovocytes de xénopes, OsYSL2 est capable de transporter exclusivement les complexes Fe<sup>II</sup>-NA et Mn<sup>II</sup>-NA. La spécificité de substrat est nettement plus large pour ZmYS1, membre fondateur de la famille. En se basant sur des tests de complémentation de mutants de levures déficients dans l'acquisition de métaux et sur des approches d'électrophysiologie par expression en oocyte de xénope, il a pu être établi que ZmYS1 peut transporter des complexes avec le DMA (Fe<sup>III</sup>, Ni, Zn, Cu, Mn et Cd) et avec la NA (Fe<sup>II</sup>, Fe<sup>III</sup>, Zn, Cu et Ni). Ce système de transport, dépendant d'un gradient de protons et sensible à un protonophore, possède toutes les caractéristiques d'un symport H<sup>+</sup>/DMA-métal ou H<sup>+</sup>/NA-métal (Schaaf et al., 2004).

Une telle activité de transport n'avait alors jamais été décrite pour des YSL de dicotylédones. Des tests de complémentation de mutants de levures, réalisés avec AtYSL1 (Le Jean et al., 2005) et AtYSL2 (Schaaf et al., 2005) s'étaient révélés infructueux, et ce malgré la très forte homologie de séquence existant entre AtYSL1, AtYSL2 et ZmYS1. Il existait donc un réel enjeu d'établir de manière définitive que les protéines YSL, issues de plantes ne produisant pas de phytosidérophores mais uniquement de la NA, était en effet capable de transporter des complexes NA-métaux. Les trois *TcYSL* isolés ont donc été sous-clonés dans des vecteurs permettant l'expression hétérologue en levure, en vue de réaliser des tests de complémentation. La souche de levure communément utilisée pour ce type de tests est le double mutant *fet3fet4*, incapable de se développer sur un milieu très pauvre en fer (Spizzo et al., 1997). Le test de complémentation consiste à transformer la souche *fet3fet4*, puis à la cultiver sur milieu sélectif contenant une faible concentration en Fe (5-10µM) en variant la forme chimique du fer apporté : (i) FeSO<sub>4</sub>, très peu disponible, ne permettant pas la croissance de la souche *fet3fet4*

(c'est un contrôle négatif), (ii) Fe-citrate, source de fer très disponible (contrôle positif de croissance) et (iii) Fe-nicotianamine, qui est une forme de fer uniquement utilisable par des levures exprimant un transporteur d'influx de Fe-NA. Ce test a permis de montrer que TcYSL3 était capable de compléter la souche *fet3fet4* lorsque le fer est apporté sous les formes Fe<sup>II</sup>-NA et Fe<sup>III</sup>-NA (Gendre et al., 2006).

Des mesures d'influx de <sup>55</sup>Fe-NA *in vitro* ont permis de confirmer que TcYSL3 était effectivement capable de catalyser l'absorption de fer sous la forme de complexes avec la nicotianamine. Enfin, puisque les conditions de mesures d'influx *in vitro* étaient maîtrisées, nous avons alors utilisé du <sup>63</sup>Ni et montré que les levures exprimant TcYSL3 étaient également capables de transporter le complexe <sup>63</sup>Ni-NA (Gendre et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats a donc montré qu'un des membres de la famille TcYSL est capable de catalyser le transport de complexes NA-métaux (*in vivo* et *in vitro*), ce qui a permis de confirmer le rôle, jusqu'alors putatif, des YSL dans le transport de complexes nicotianamine-métaux chez des plantes non graminées. Dans le contexte particulier de *Thlaspi caerulescens* et de l'hyperaccumulation de nickel, nous avons donc mis en évidence d'une part la formation du complexe Ni-NA dans le xylème de plantes exposées à du nickel et d'autre part la capacité de TcYSL3 de transporter ce complexe, permettant le passage de membranes cellulaires. La suite du travail de thèse de Delphine Gendre a consisté à étudier le profil d'expression spatio-temporel des gènes TcYSL chez *Thlaspi caerulescens*.

#### **4.3 Etude de l'expression de TcYSL3, TcYSL5 et TcYSL7**

Deux approches complémentaires ont été utilisées : la RT-PCR en temps réel (Q-PCR) pour quantifier l'expression des trois gènes dans les différents organes ou en fonction de traitements avec du nickel et l'hybridation *in situ*, permettant de localiser l'expression des gènes au niveau tissulaire et cellulaire. Globalement, le patron d'expression des trois gènes selon les organes correspond assez bien à celui des orthologues chez *Arabidopsis thaliana* (résultats obtenus dans l'équipe « Fer », non publiés). *TcYSL7* est majoritairement exprimé dans les fleurs, *TcYSL5* est assez fortement exprimé dans les parties aériennes alors que l'expression de *TcYSL3* est équivalente dans tous les organes de la plante. Cependant, l'analyse quantitative des niveaux d'expression de ces trois YSL a montré que chez *Thlaspi caerulescens*

les TcYSL sont 10 à 100 fois plus fortement exprimés que leurs orthologues chez *Arabidopsis thaliana*. Cette apparente dérégulation de gènes potentiellement impliqués dans l'homéostasie des métaux lourds semble être une caractéristique générale chez des espèces hyperaccumulatrices de métaux, puisqu'elle a été décrite pour d'autres gènes chez *Thlaspi caerulescens* (Pence et al., 2000) (Roosens et al., 2004) et également chez *Arabidopsis halleri* (Drager et al., 2004) (Becher et al., 2004) (Weber et al., 2004) (Talke et al., 2006).

L'analyse des territoires d'expression des TcYSL a nécessité la mise au point de la technique d'hybridation in situ sur des échantillons de *Thlaspi caerulescens*. L'utilisation de la plateforme Montpellier RIO Imaging et notamment la collaboration avec Geneviève Conéjéro ont été déterminantes pour mener avec succès cette approche. De nombreuses mises au point techniques ont dû être apportées au protocole standard pour permettre d'obtenir des signaux d'hybridation suffisamment intenses et fiables. Les résultats obtenus ont montré que TcYSL3 et TcYSL7 étaient exprimés principalement autour des vaisseaux de la plante, quels que soient les organes analysés. Ce profil d'expression, qui semble caractéristique des YSL (Curie et al., 2009), est compatible avec la fonction proposée de ces gènes dans le chargement et le déchargement des vaisseaux en complexes NA-métaux.

## 5. Conclusion

Le choix de l'espèce hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens* comme modèle végétal pour caractériser, au niveau moléculaire, les mécanismes de tolérance aux métaux lourds (transport, circulation, séquestration...) s'est révélé justifié et a été validé par l'obtention de résultats marquants. Il a permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes dans la circulation du Ni dans la plante. Une nouvelle fonction a été attribuée à la nicotianamine, qui était jusque-là impliquée dans la circulation du Cu et l'homéostasie du Fe, sans toutefois connaître en détail son mode d'action vis-à-vis de ces deux métaux essentiels. La suite logique a été le clonage de trois TcYSL et surtout la mise en évidence de la fonction de transport de complexes NA-métaux par TcYSL3, premier membre issu de non-graminées pour lequel une telle fonction a été établie. La force et l'originalité de ce travail a été l'apport de la chimie analytique via la collaboration avec le LCABIE. Des résultats nouveaux et solides ont été obtenus, desquels a découlé le développement de nouvelles

technologies plus adaptées au matériel végétal, ce qui a posé les bases pour de futurs projets en commun.

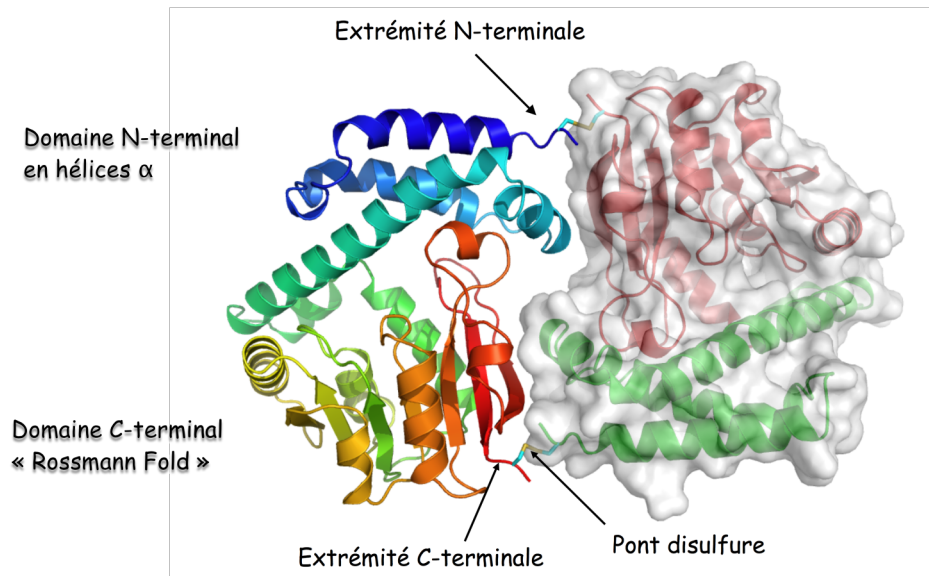
Dans l'UMR Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, la thématique concernant la circulation des ions métalliques dans la plante, notamment le rôle de la nicotianamine et des protéines YSL, était au coeur de l'activité de l'équipe « Homéostasie du fer » dirigée par Jean-François Briat. Considérant que le travail sur *Thlaspi caerulescens* était arrivé à un terme et désirant développer l'étude de la circulation avec sur *Arabidopsis thaliana*, j'ai décidé de rejoindre l'équipe « homéostasie du fer », à partir du 1<sup>er</sup> septembre 2004. Mon nouveau projet a donc porté, à partir de cette date, sur la caractérisation physiologique et moléculaire de la circulation *intra* plante d'ions métalliques, principalement le fer, le zinc et le cuivre.

### **Caractérisation structurale et enzymologique d'une nicotianamine synthase de *Methanothermobacter thermautotrophicus*.**

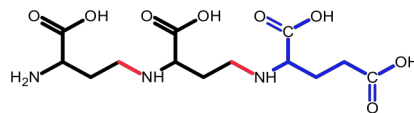
Une partie de mon projet scientifique portait sur la caractérisation biochimique de la nicotianamine synthase (NAS). Pour mener à bien ce travail, un projet comportant trois partenaires avait été soumis à l'ANR en 2007 (projet HEMOLI) et accepté. Ce projet était porté par David Pignol (CEA Cadarache Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire) le troisième partenaire étant Florine Cavelier (Laboratoire les Amino Acides et Protéines, CNRS/Université Montpellier II). Initialement, il s'agissait de cloner et produire en système hétérologue des versions eucaryotes de NAS (*Arabidopsis thaliana*, *Thlaspi caerulescens*, riz) pour essayer d'obtenir des protéines recombinantes purifiées. Tous les tests réalisés ont été infructueux, il avait donc été décidé de rechercher des homologues de NAS chez les archées ou chez les bactéries car l'expérience avait montré que la production d'enzymes d'origine procaryotique était nettement plus aisée. La recherche d'homologues de NAS a permis d'identifier une nouvelle protéine de *Methanothermobacter thermautotrophicus* qui a 30% d'identité avec les NAS végétales, les acides aminés les plus conservés correspondaient au domaine de fixation de la S-adénosyl-méthionine. Ce gène a été cloné et exprimé chez *E. coli* en fusion avec une étiquette hexa(histidine). L'enzyme a été purifiée, cristallisée et sa structure a été déterminée



par diffraction des RX (en utilisant la méthode MAD). Il s'agit de la première structure d'un membre de la famille des nicotianamine synthases.



Cette structure présente au sein de son centre actif (situé au fond d'une cavité entre les domaines N et C-terminaux) une densité électronique correspondant à une petite molécule vraisemblablement synthétisée par l'enzyme et bloquée lors des étapes de purification. Sur les bases de la carte de densité électronique, confirmé par une approche de spectrométrie de masse, nous avons pu mettre en évidence qu'il s'agissait d'une nouvelle molécule apparentée à la nicotianamine, que nous avons baptisé thermo-Nicotianamine (tNA) et dont la formule est la suivante :



Cette molécule ne serait pas issue de la condensation de 3 molécules de S- adénosylméthionine (SAM), comme c'est le cas pour la nicotianamine, mais de 2 SAM et d'une molécule d'acide glutamique. Nous avons poursuivi nos travaux en cocrystallisant l'enzyme en présence de ces différents substrats et produits. De plus, un intermédiaire réactionnel a été synthétisé (partenaire 3) et cocrystallisé avec l'enzyme. Un total de 6 structures cristallines ont été obtenues. L'ensemble de ces résultats nous permet ainsi de proposer un mécanisme catalytique pour cette famille d'enzyme. Ce mécanisme procède à partir d'un seul centre actif et implique une double translocation du substrat : le glutamate serait le premier substrat présent à l'entrée de la cavité, lors du transfert du premier groupement aminopropyl (issu de la première molécule de SAM) sur le glutamate, l'intermédiaire se déplacerait vers

l'intérieur de la cavité pour pouvoir accepter le deuxième groupement aminopropyl et achever la synthèse de la tNA (Dreyfus et al., 2009).

## **Le transport de fer, manganèse et cadmium chez *Arabidopsis thaliana* : rôle des transporteurs NRAMP (thèse Rémy Cailliatte).**

Les NRAMP (pour Natural Resistance Associated Macrophage Protein) sont des transporteurs de métaux divalents découverts dans un premier temps chez les animaux. Chez *Arabidopsis thaliana*, la famille *NRAMP* compte six membres. Le premier *AtNRAMP* cloné, *AtNRAMP1*, est induit en carence de fer dans les racines et code pour une protéine capable de transporter du fer et du manganèse, sur la base de tests de complémentation en levure (Curie et al., 2000). Depuis, l'équipe de Sébastien Thomine (ISV, Gif-sur-Yvette) a établi l'implication des protéines tonoplastiques NRAMP3 et NRAMP4 dans la remobilisation du fer vacuolaire lors de la germination de la graine (Lanquar et al., 2005). Cet axe de recherche, initié par Catherine Curie dans l'équipe « homéostasie du fer », a été relancé avec le démarrage de la thèse de Rémy Cailliatte. J'ai été impliqué dans la co-direction de cette thèse en raison de mon expérience sur la biochimie des transporteurs et l'homéostasie des métaux lourds.

### **1. *AtNRAMP6* transporte du cadmium dans un compartiment intracellulaire**

Dans un premier temps, nous avons montré que le gène *AtNRAMP6* était exprimé dans les tissus conducteurs des feuilles, dans les sépales, le septum des siliques et le funicule de la graine, grâce à des lignées exprimant la séquence promotrice de *AtNRAMP6* fusionnée au gène rapporteur GUS. Pour caractériser l'activité de transport de *AtNRAMP6*, l'ADNc a été exprimé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ce système expérimental, *AtNRAMP6* n'est pas capable de transporter du fer ou du manganèse, substrats typiques de nombreux NRAMP de diverses origines. Néanmoins, l'expression de *AtNRAMP6* provoque une plus grande

sensibilité au cadmium. Des résultats similaires ont été obtenus *in planta*, où la surexpression de *AtNRAMP6* provoque une plus grande sensibilité au Cd alors qu'une lignée knock-out pour ce gène est plus tolérante. La concentration de Cd ne variant pas, ni dans la levure, ni dans la plante, nous avons envisagé que la protéine *AtNRAMP6* pouvait être localisée sur un système membranaire d'un organe intracellulaire. Pour vérifier cette hypothèse, des fusions *AtNRAMP6*-GFP ont été exprimées en plante. Cette approche s'est révélée infructueuse, vraisemblablement à cause de l'instabilité de la protéine chimérique. De plus, le faible niveau d'expression de ce gène ne permettait pas d'envisager une approche d'immuno-localisation de la protéine native. Nous avons cependant tiré profit du fait que la fusion *AtNRAMP6*-HA était fonctionnelle dans la levure pour réaliser des immuno-localisations, grâce à une collaboration avec Bruno Lapeyre (CRBM, CNRS, Montpellier). Les images obtenues par immunofluorescence confirment la présence de *AtNRAMP6* sur des vésicules intracellulaires non identifiées, qui ne correspondent cependant ni à des mitochondries ni à des vacuoles (Cailliatte et al., 2009).

## **2. *AtNRAMP2* participe à l'acheminement du Mn vers le chloroplaste**

Il avait été précédemment publié que *AtNRAMP2* n'était pas régulé par la nutrition ferrique et que son expression dans la levure ne restaurait pas la croissance des mutants de transport de fer, zinc et manganèse (Curie et al., 2000). Rémy a repris ce travail et obtenu des résultats particulièrement intéressants. L'un des trois homologues NRAMP de la levure, le transporteur *Smf2p*, est localisé à la surface de vésicules intracellulaires et participe à l'apport de Mn à la mitochondrie (Luk and Culotta, 2001). En effet, le mutant *smf2Δ* présente une activité réduite de la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD), enzyme mitochondriale. Rémy a réussi à mettre au point un test de révélation de l'activité SOD sur gel d'acrylamide natif, permettant de visualiser les différentes isoformes de SOD (FeSOD, MnSOD et CuZnSOD). Ainsi, il a pu montrer que l'expression de *AtNRAMP2* restaure la croissance du mutant *smf2Δ* et surtout l'activité de la MnSOD, alors que *AtNRAMP2* ne restaure pas la croissance du mutant *smf1Δ* qui est déficient dans l'entrée du Mn dans la cellule. Ce résultat est cohérent avec la présence, révélée par Western blot, de la protéine *AtNRAMP2* dans des fractions de protéines endomembranaires

et son absence dans des fractions de membrane plasmique. Le mutant nul *nramp2* d'*Arabidopsis* est chlorotique et nain. Etant donné que AtNRAMP2 complémente le mutant *smf2Δ*, nous avons recherché un défaut d'homéostasie du Mn dans le mutant *nramp2*. Les deux protéines à Mn majeures des cellules végétales sont la MnSOD mitochondriale et le complexe d'évolution de l'oxygène (OEC) du photosystème II dans le chloroplaste. Nous avons montré que l'activité de la MnSOD n'était pas affectée dans le mutant *nramp2*. Par contre, l'activité photosynthétique, et en particulier l'activité du PSII, est fortement diminuée. De plus, cette diminution est corrélée à une forte réduction de la teneur en Mn des chloroplastes (facteur 3). L'observation au microscope confocal de fusions AtNRAMP2-GFP montre que la protéine n'est pas adressée au chloroplaste mais est localisée sur des vésicules d'origine indéterminée. Nous cherchons maintenant à identifier ces vésicules afin de comprendre comment AtNRAMP2 contribue à l'acheminement du Mn au chloroplaste. Ce travail n'est pas encore publié.

### **3. AtNRAMP1 est un transporteur racinaire de Mn à haute affinité**

Il avait été initialement établi que *AtNRAMP1* était un gène exprimé dans la racine, modérément induit par la carence de fer, codant pour une protéine capable de transporter du fer et du manganèse par expression hétérologue dans la levure (Curie et al., 2000). L'analyse de lignées transgéniques exprimant des fusions de la séquence promotrice de *AtNRAMP1* avec le gène rapporteur GUS a montré que *AtNRAMP1* est exprimé dans le cortex racinaire. Depuis, nous avons isolé un mutant knock-out du gène *NRAMP1* chez *Arabidopsis*. *nramp1-1* ne montre pas de phénotype associé à un défaut d'homéostasie du fer. Par contre, il est hypersensible à la carence en Mn tandis que des lignées surexpresses de *AtNRAMP1* sont hyper tolérantes. L'analyse au microscope confocal d'une fusion NRAMP1-GFP, fonctionnelle car capable de complémente le phénotype du mutant *nramp1-1*, montre un adressage de la protéine NRAMP1 à la membrane plasmique. Sur la base des résultats obtenus (protéine plasmalemmique, localisée dans le cortex racinaire, capable de transporter du Mn et dont la disruption entraîne une sensibilité à la carence en Mn), nous avons décidé de tester le rôle de *AtNRAMP1* dans le prélèvement du Mn par les racines. Par des mesures d'influx racinaires en temps

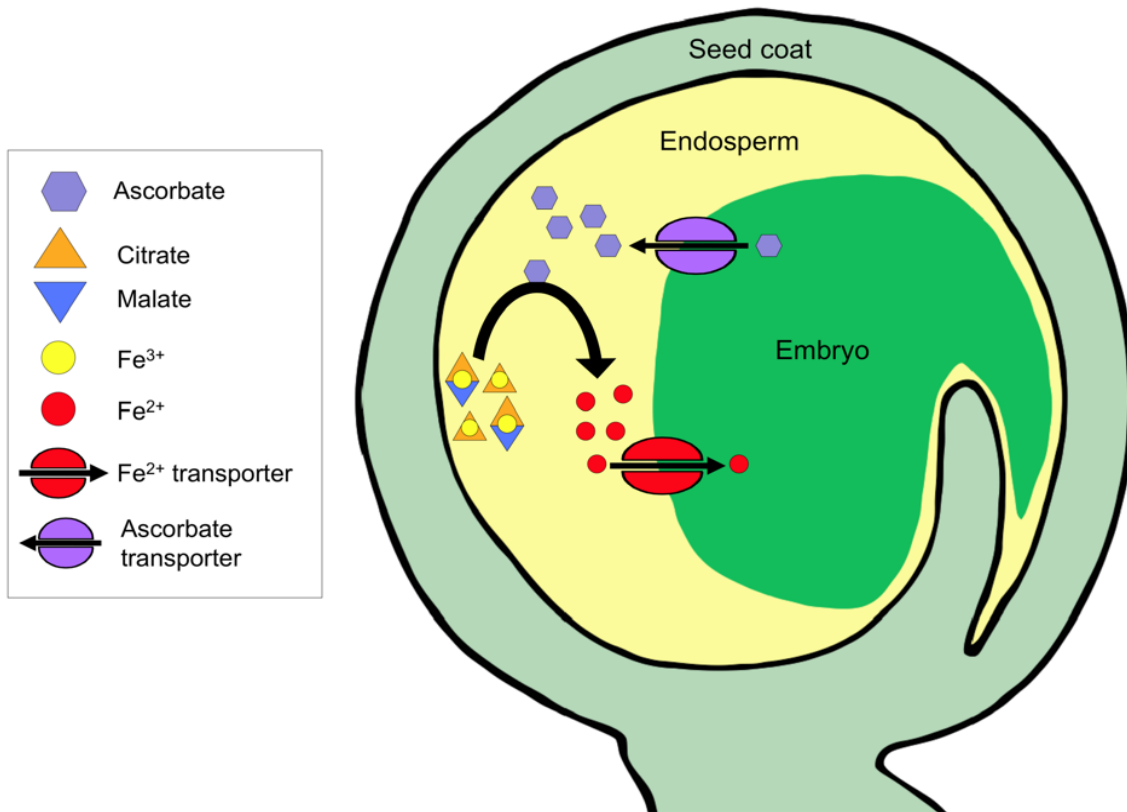
court, nous avons démontré que le prélèvement de Mn était défectueux dans le mutant *nramp1-1* en condition de faible disponibilité en Mn dans le milieu, en comparaison avec les racines de plantes sauvages ou sur-exprimant *AtNRAMP1*. Ce travail identifie donc pour la première fois l'existence d'un système de transport de Mn à haute affinité ( $K_m = 40 \text{ nM}$ ) dans la racine d'*Arabidopsis* pour prélever le Mn en condition limitante et démontre que cette activité est catalysée par le transporteur *AtNRAMP1* (Cailliatte et al., 2010).

### **Régulation du transport du fer à longue distance : caractérisation du processus de chargement de la graine (thèse Louis Grillet)**

L'étude du transport des ions métalliques à longue distance dans la plante a déjà été abordée dans le chapitre concernant les mécanismes d'hyperaccumulation du nickel et le rôle de la nicotianamine et des transporteurs TcYSL chez *Thlaspi caerulescens*. C'est sur cette base que j'ai poursuivi cette activité, en me focalisant sur le fer. Le processus de chargement de la graine peut être considéré comme la dernière étape du transport à longue distance d'un nutriment dans la plante. D'un point de vue « recherche appliqué » cet aspect du transport présente un intérêt évident et, sur un plan pratique, il est plus aisé de manipuler des graines que des tissus conducteurs du xylème ou du phloème. Pour mener ce projet, j'ai choisi d'utiliser le pois (*Pisum sativum*) comme modèle d'étude, en complément d'*Arabidopsis thaliana*. La graine de pois est particulièrement bien adaptée à des approches biochimiques et physiologiques, car (1) elle est de grande taille et (2) chez le pois, pendant les 15 premiers jours du développement de la graine, l'embryon est entouré d'un albumen liquide (appelé liquide du sac embryonnaire) qui sert de milieu nutritif pour l'embryon. Ce fluide est d'origine symplasmique (intracellulaire) et peut être considéré comme une forme de « post-phloème ». Il est très aisé de perfuser des graines et de récolter plusieurs dizaines de microlitres de ce phloème par graine d'une part et de récupérer les embryons entiers d'autre part. Ce modèle permet donc d'avoir accès à un fluide d'une grande valeur biologique puisqu'il se trouve à l'interface entre les tissus maternels (le tégument de la graine) et l'embryon, qu'il est d'une grande pureté biochimique et qu'il sert de support nourricier à l'embryon. Il s'agit pour nous du point de départ pour caractériser le processus de chargement en fer de l'embryon car il a

alors été possible d'envisager d'étudier la spéciation du fer dans le liquide du sac embryonnaire *via* la collaboration établie depuis longtemps avec le laboratoire de Ryszard Lobinski. Avoir accès à l'identité des formes chimiques qui sont délivrées par les tissus maternels pour nourrir l'embryon nous paraissait essentiel pour pouvoir ensuite décortiquer la machinerie de transport mise en place par l'embryon pour acquérir le fer.

En se basant sur les approches qui avaient été mises en place pour étudier la spéciation du nickel chez *Thlaspi caerulescens*, il a été possible d'identifier les formes chimiques du fer présentes dans le liquide du sac embryonnaire. Ces analyses ont révélé que le fer, sous la forme FeIII, était associé à du citrate et à du malate, dans des complexes ayant des stoechiométries variables. Cette découverte avait du sens, par rapport aux caractéristiques biochimiques du LSE. Nous avons en effet montré que le pH du LSE était plutôt acide (5,4) et riche en acides organiques, ces conditions étant chimiquement les plus favorables pour la formation et la stabilité des complexes ferriques avec des acides organiques. D'un point de vue du transport, cette situation n'était pas sans rappeler celle rencontrée dans la rhizosphère (pH acide, fer essentiellement sous la forme oxydée), ce qui nous a amené à postuler qu'il devait exister à la surface de l'embryon un système de transport équivalent à celui de la racine, impliquant une réductase ferrique et un transporteur de fer ferreux. Grâce à l'analyse des cinétiques d'influx de <sup>55</sup>Fe sur des embryons isolés, nous avons montré d'une part que les embryons de pois étaient effectivement capables de réduire du FeIII *in vitro* et, d'autre part que cette activité de réduction était obligatoire pour l'absorption du fer. Contrairement au système d'acquisition du fer de la racine, l'activité de réduction ferrique de l'embryon n'est pas catalysée par une réductase transmembranaire mais par l'efflux d'ascorbate qui va réduire chimiquement le fer dans le milieu (Grillet et al., 2014). Un tel mécanisme, impliquant directement l'ascorbate dans le transport du fer, n'avait jamais été mis en évidence jusque-là. Au niveau moléculaire, s'il est possible d'identifier des gènes candidats pour le transport de fer ferreux, aucun système d'efflux d'ascorbate n'a jamais été identifié, chez les végétaux ou les animaux (Fig. 4).



**Figure 4 : Schéma récapitulatif du mécanisme de chargement en fer dans la graine de pois.** Le fer est délivré dans le liquide du sac embryonnaire sous forme de complexes ferriques (FeIII) avec du citrate et du malate. L'embryon n'étant pas capable d'absorber directement ces complexes, une étape de réduction est requise pour dissocier les complexes et permettre le transport de fer ferreux (FeII). Cette réduction, classiquement catalysée par des réductases transmembranaires chez les dicotylédones, est ici réalisée chimiquement par de l'ascorbate qui provient, au moins en partie, de l'embryon. Les transporteurs d'efflux d'ascorbate ainsi que d'influx de  $Fe^{2+}$  n'ont pas encore été identifiés.

**Distribution du fer dans la cellule : mise en place d'une technique de détection du fer par coloration histochimique (post-doc Hannetz Roschztardtzt) et identification d'un nouveau pool de fer dans le nucléole**

Au sein de la cellule, le fer est requis pour de nombreuses fonctions qui sont localisées dans différents compartiments subcellulaires. La répartition du fer entre ces compartiments est quasi inconnue. Il est considéré que dans une cellule photosynthétiquement active, plus de 70% du fer est localisé dans le chloroplaste. La proportion et le rôle du fer présent dans d'autres compartiments comme les

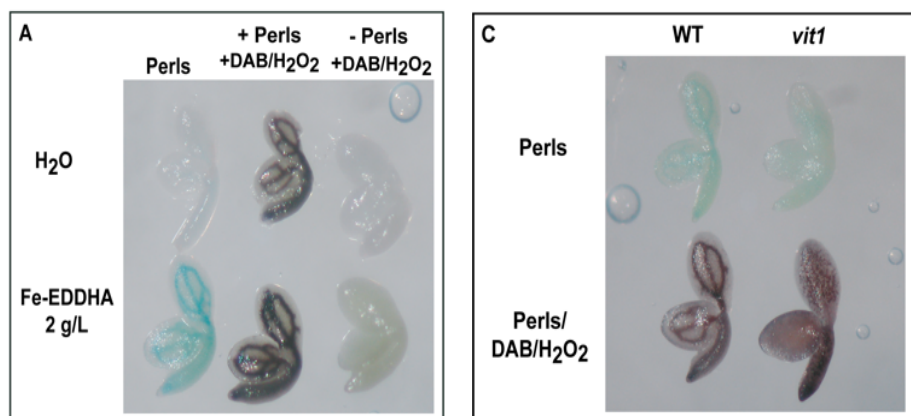
mitochondries, les vacuoles ou encore la paroi sont pratiquement inconnues. Les avancées récentes sur la fonction des transporteurs VIT1 et NRAMP3/4 dans le chargement et le déchargement en fer de la vacuole, respectivement, ont très largement reposé sur l'utilisation de techniques d'imagerie du fer sur l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* (Lanquar et al., 2005; Kim et al., 2006). Dans les deux cas de figure, la disruption des gènes n'entraînait pas de modification de la quantité totale de fer dans les graines, mais uniquement une différence de distribution au sein de certains types cellulaires. Ces deux exemples illustrent l'importance croissante de l'imagerie sur l'étude de la distribution tissulaire et cellulaire du fer. Cependant, les techniques mises en œuvre au cours des travaux cités précédemment reposent soit sur du rayonnement X issus de synchrotron ( $\mu$ XRF pour VIT1) soit sur de la microscopie électronique à transmission (avec analyse EDX ou ESI). Il apparaît donc clairement que ces techniques sont soit inaccessibles ( $\mu$ XRF) soit extrêmement lourdes à mettre en œuvre dans un laboratoire de physiologie végétale « classique ».

### **1. Mise en place d'un protocole de coloration histochimique du fer (Perls/DAB)**

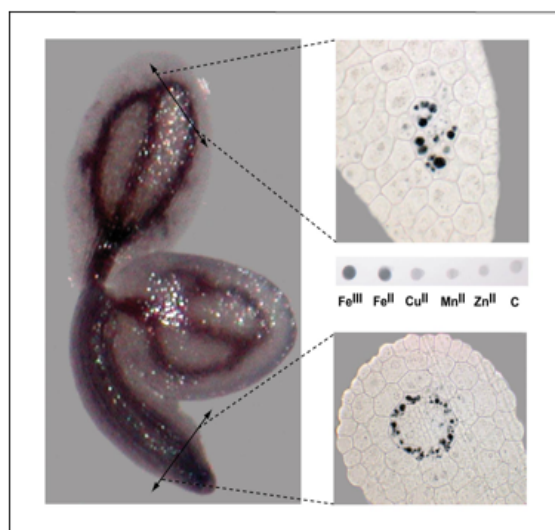
L'alternative aux techniques issues du rayonnement synchrotron, utilisée depuis longtemps dans le milieu médical, consiste à détecter le fer par coloration avec le ferrocyanure de potassium également appelé « Perls ». La réaction du Perls avec du fer provoque la formation d'une coloration bleue (le bleu de prusse). Bien que très aisé à employer et très peu onéreux, l'emploi du Perls comporte plusieurs inconvénients: ce réactif est très peu sensible, il ne réagit qu'avec le fer ferrique et sa pénétration dans les tissus est très mauvaise. Ces « propriétés » rendent le Perls quasi inutilisable sur les plantes. Il est néanmoins possible d'augmenter fortement la sensibilité du Perls par des réactions secondaires en présence de diaminobenzidine (DAB) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Nguyen-Legros et al., 1980). Lorsque le complexe FeIII-Perls est formé dans les tissus, l'ajout de DAB et d' $H_2O_2$  provoque un cycle de réactions d'oxydoréduction conduisant à la polymérisation de la DAB et l'apparition de pigments bruns. Nous avons adapté et testé cette procédure de coloration, baptisée Perls/DAB, en utilisant l'embryon d'*Arabidopsis* comme échantillon modèle car la distribution du fer avait été décrite précédemment. Alors que la coloration avec le Perls seul est pratiquement invisible sur les embryons,



l'ajout de DAB et d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoque l'apparition d'une forte coloration brune, localisée autour du système provasculaire. Nous avons ensuite montré que cette coloration correspondait et était spécifique au fer. Pour cela nous avons testé d'une part l'absence de réactions croisées du Perls/DAB avec d'autres ions métalliques *in vitro* et surtout, nous avons vérifié d'autre part que la distribution du fer, autour des vaisseaux de l'embryon, était perdue chez le mutant *vit1-1* comme cela avait été décrit précédemment (Kim et al., 2006). Les tests *in vitro* ont également permis d'établir que cette procédure permettait de détecter le fer ferreux, contrairement au Perls utilisé seul. Ces tests ont donc permis de montrer que la technique de coloration Perls/DAB est spécifique du fer, hautement sensible et aisée à mettre en place (Fig. 5). Nous avons ensuite précisé la localisation du pool de fer de l'embryon, en réalisant les colorations Perls/DAB directement sur des coupes histologiques, ce qui a permis de s'affranchir des problèmes de pénétration des réactifs dans les tissus végétaux et d'améliorer sensiblement la résolution, à l'échelle subcellulaire (Fig. 6). Nous avons alors pu montrer que dans l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* le fer est stocké dans les vacuoles d'un type cellulaire particulier correspondant à l'endoderme (Roschztardt et al., 2009).



**Figure 5 : Coloration histochimique du Fe avec le Perls/DAB.** (A) mise au point de la coloration Perls/DAB sur des embryons d'Arabidopsis. Le Perls, peu sensible, permet de colorer le FeIII en bleu. La coloration n'est visible que sur des embryons très chargés en fer (graines issues de plantes irriguées avec du Fe-EDDHA). L'intensification de la coloration avec le DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permet de révéler le fer (couleur brune), même sur des embryons peu riches en fer (issus de plantes irriguées à l'eau). (B) la coloration Perls/DAB est spécifique du fer. Le mutant *vit1*, qui présente une perte de la localisation vasculaire du fer (Kim et al., 2006), a été utilisé ici pour prouver que la coloration brune correspondait spécifiquement au fer.



**Figure 6 : Dans l'embryon d'Arabidopsis, le fer est localisé dans les vacuoles de l'endoderme.** La coloration Perls/DAB peut être réalisée sur des coupes histologiques, ce qui permet d'améliorer la résolution et de visualiser les pools de fer intracellulaires. Dans l'embryon d'Arabidopsis, le fer est stocké dans les vacuoles d'une assise cellulaire située autour des tissus provasculaires, qui correspond à l'endoderme.

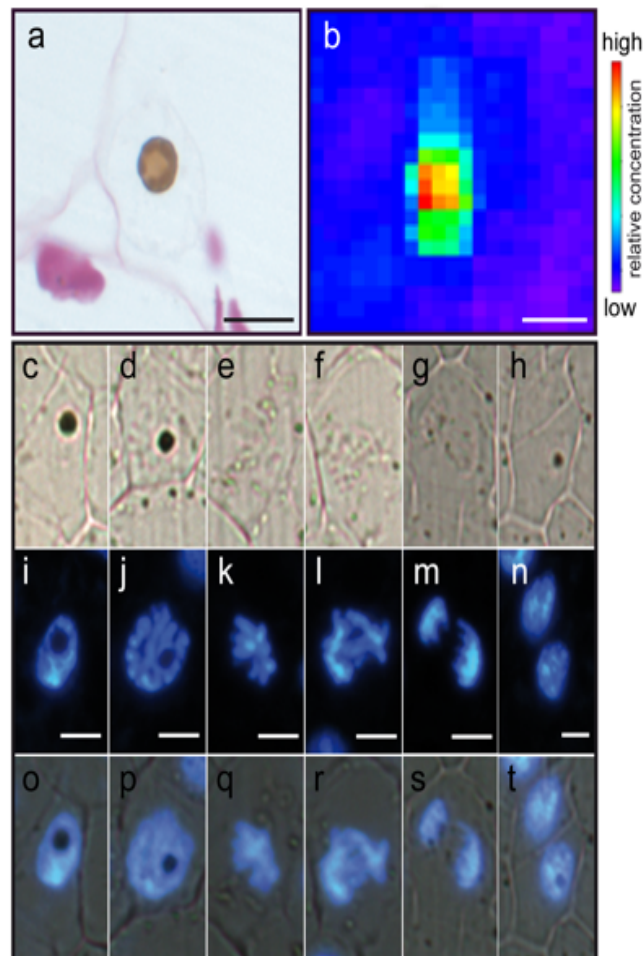
## 2. Le nucléole est un « hot spot » en fer

L'étude systématique par histochimie de la localisation du fer dans les cellules des différents organes de la plante a permis de détecter, en plus des sites attendus (chloroplastes, paroi, vacuoles), la présence de quantités importantes de fer dans les noyaux des cellules. Cette observation n'avait jamais été décrite chez les plantes et elle est d'autant plus surprenante que, chez l'humain, l'accumulation de fer dans le noyau est systématiquement associée à l'apparition de maladies neurodégénératives.

Dans le noyau, l'accumulation en fer est en fait restreinte à un sous-compartiment qui s'est avéré correspondre au nucléole. Cette observation, tout à fait inattendue et jamais décrite jusque-là, nécessitait d'être confirmée par des approches d'imagerie élémentaire pour ainsi exclure la possibilité d'un artefact lié aux réactions histochimiques. Pour cela deux techniques ont été utilisées, d'une part le PIXE (Particle Induced X-ray Emission, plateforme AIFIRA, CNRS Bordeaux) et d'autre part le SRXRF (Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence, synchrotron SOLEIL,

Saclay). Grâce à ces deux approches, nous avons pu confirmer que la coloration Perls/DAB correspondait effectivement à des atomes de fer et surtout que d'un point de vue quantitatif la concentration en fer dans le nucléole était, très localement, la plus élevée de la cellule (Fig. 7) (Roschztardt et al., 2011).

Cette observation, totalement inattendue, pose spécifiquement la question du rôle de ce pool de fer dans ce compartiment. Le fer joue-t'il un rôle structural dans la formation ou le maintien du nucléole ou plutôt un rôle catalytique en relation avec, entre autres, l'activité de biosynthèse des ARN ribosomiques ?



**Figure 7 : Le nucléole des cellules végétales accumule de fortes concentrations en fer.** (a) coloration Perls/DAB du noyau d'une cellule d'embryon de pois, montrant une structure sub-nucléaire très riche en fer. (b) cartographie élémentaire obtenue par fluorescence aux rayons X (XRF, synchrotron SOLEIL) d'une structure correspondant à un noyau de cellule d'embryon de pois. La concentration en fer, en fausses couleurs, confirme l'accumulation en fer dans un sous-compartiment du noyau. (c-t) double coloration Perls/DAB et DAPI de cellules d'embryon de pois à différentes étapes de la mitose où l'on voit la disparition du pool de fer nucléaire pendant la métaphase et la réapparition de ce pool dans les 2 cellules filles, ce qui est une caractéristique structurale du nucléole.

## PROJET DE RECHERCHE

Les résultats récemment obtenus, notamment grâce à la technique de coloration du fer (Perls/DAB), mettent l'accent sur la distribution intracellulaire du fer. Selon les organes, les conditions de culture et les génotypes, la distribution du fer peut être profondément modifiée. Nous avons montré par exemple que dans les racines du mutant *frd3* le fer s'accumule dans la paroi des cellules du cylindre central, illustrant le rôle du citrate dans le mouvement du fer vers le xylème. La disruption des gènes de ferritine induit, dans les cellules du mésophylle, une forte accumulation du fer dans l'apoplaste, ce qui peut être considéré comme une manière de limiter la toxicité du fer dans les chloroplastes, dépourvus de ferritines (Roschztardt et al., 2013). Bien qu'il soit possible, en théorie, de prédire la présence de fer dans un compartiment (chloroplaste pour la photosynthèse, mitochondrie pour la respiration, vacuole pour le stockage) nous avons vu que la possibilité de visualiser le fer nous a réservé quelques surprises, comme la présence de fer dans le noyau ou, dans une moindre mesure, l'importance des amyloplastes dans le stockage du fer lors de la microsporogénèse (Roschztardt et al., 2013). Nous n'avons donc qu'une vision fragmentée de la distribution du fer à l'échelle cellulaire et certaines données de la littérature ont montré le caractère dynamique de cette distribution. Dans l'embryon d'*Arabidopsis*, les pools de fer vacuolaire et plastidial sont inter-connectés : si le chargement ou le déchargement de la vacuole sont affectés (sur-expresser *VIT1* ou double mutant *nramp3nramp4*, respectivement) alors l'accumulation de ferritines dans les plastes diminue fortement (Ravet et al., 2009). De même, à la germination la mutation des transporteurs chloroplastiques d'efflux YSL4 et YSL6 provoque une diminution de l'expression de NRAMP3 et NRAMP4, suggérant l'existence d'une sorte de rétrocontrôle entre le chloroplaste et la vacuole pour l'approvisionnement en fer du plaste (Divol et al., 2013). C'est dans ce contexte de la dynamique de la répartition du fer intracellulaire que se situe le projet que je propose donc de porter. Ce projet va s'articuler sur deux axes, qui découlent des résultats récents obtenus sur le transport du fer dans l'embryon d'une part et sur la présence de fer dans le nucléole d'autre part.

## **I - Transport du fer et dynamique des pools intracellulaires – rôle des systèmes de réduction ferrique ascorbate-dépendants**

Chez les dicotylédones, le transport du fer est quasi-exclusivement assuré par des systèmes de transport de fer ionique sous la forme  $Fe^{2+}$ . La demi-vie des ions ferreux en milieu biologique étant de l'ordre de la seconde, il est clair que le transport du fer, à tous les niveaux de la plante, doit être étroitement lié à une activité de réduction. La famille des FRO (pour Ferric Reductase Oxidase), qui comprend huit membres chez *Arabidopsis thaliana*, code pour des protéines transmembranaires utilisant les électrons fournis par du NAD(P)H d'un côté de la membrane pour réduire le  $Fe^{3+}$ . Jusqu'à présent, deux réductases ont été directement associées au transport du fer chez *Arabidopsis thaliana* : FRO2 sur l'épiderme des racines (Robinson et al., 1999) et FRO7 sur l'enveloppe du chloroplaste (Jeong et al., 2008). Les protéines FRO4 et FRO5 sont des réductases spécifiques du cuivre et elles jouent un rôle majeur dans l'acquisition du Cu au niveau de la racine, en conditions de carence. Il apparaît donc clairement que nos connaissances sur le rôle des réductases dans l'homéostasie du fer sont très limitées, que ce soit au niveau des organes (parties aériennes photosynthétiques, organes reproducteurs, graines) ou à l'échelle des organites (mitochondrie et vacuole par exemple). L'étude des mécanismes d'acquisition du fer par l'embryon a permis de mettre en évidence un nouveau système de transport du fer, basé sur la réduction ferrique et le transport de  $Fe^{2+}$ , impliquant l'efflux d'ascorbate par l'embryon pour réduire le fer délivré par les tissus maternels sous forme de complexes FeIII-citrate. Ces activités ont été caractérisées d'un point de vue biochimique, le défi actuel est donc d'identifier les gènes correspondants (efflux d'ascorbate, transporteur de FeII).

### **Caractérisation moléculaire du système d'efflux d'ascorbate**

Jusqu'à présent, aucun transporteur d'efflux d'ascorbate n'a été identifié au niveau moléculaire, dans le règne végétal comme dans le règne animal. Plusieurs travaux ont décrit une telle activité d'efflux chez les animaux et il a été suggéré qu'elle pouvait être attribuée à des canaux anioniques, des échangeurs  $H^+$ /ascorbate ou encore à un système d'exocytose de vésicules chargées en ascorbate (Lane et al., 2010).

Deux stratégies vont être mises en place pour identifier ce système d'efflux : une approche « gène candidat », basée sur la caractérisation biochimique de l'activité d'efflux et l'analyse *in silico* des profils d'expressions (recherche de transporteurs fortement exprimés dans les embryons) pour ensuite choisir des candidats et une approche basée sur un criblage en système hétérologue par expression d'ADNc chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Il sera nécessaire, dans un premier temps, de discriminer parmi ces différents type de transporteurs pour restreindre le nombre de gènes « candidats » à une famille de protéines. Pour cela, l'activité d'efflux d'ascorbate sera caractérisée plus en détail, sur des embryons de pois, en utilisant notamment une approche pharmacologique. L'utilisation de découpleurs du gradient de pH, d'inhibiteurs de canaux anioniques et d'ATPases devrait ainsi permettre d'éliminer certains systèmes de transport et ainsi se focaliser sur une ou deux grandes familles de protéines. Des résultats préliminaires semblent indiquer que l'activité de transport est dépendante d'un gradient de protons, ce qui indique que le système de transport correspond peut être à un antiport  $H^+$ /ascorbate. La fonction des gènes identifiés comme candidats potentiels sera testée par expression hétérologue (oocyte de xenope, levure) pour valider l'activité d'efflux d'ascorbate et par génétique inverse.

En parallèle, une approche non ciblée sera développée, par complémentation fonctionnelle chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le mutant *fre1*, disrupté pour la principale réductase ferrique du plasmalemme, sera utilisé pour cette approche. Ce mutant a une croissance très réduite en conditions limitantes en fer dans le milieu (Dancis et al., 1990; Dancis et al., 1992). L'expression d'un système capable de catalyser l'efflux d'ascorbate au niveau du plasmalemme devrait permettre de reconstituer l'activité de réduction du FeIII du milieu et ainsi restaurer, au moins partiellement, la croissance des levures. Plusieurs banques d'ADNc (disponibles au laboratoire ou dans la communauté) seront testées pour maximiser nos chances de succès.

La mise en place de ce système de test fonctionnel a le double avantage de servir de crible sans a priori (et ainsi identifier de nouvelles fonctions) et de pouvoir être utilisé dans l'approche « gènes candidats » pour tester individuellement la fonction de gènes isolés sur d'autres critères.

Dans tous les cas, j'attends de cette approche qu'elle conduise à identifier le premier système d'efflux d'ascorbate, ce qui aura une forte répercussion, au-delà de la

communauté végétaliste. A minima, cette démarche peut conduire à l'identification d'autres types de réductases membranaires, équivalentes fonctionnelles des FRO, mais dont la fonction n'aurait jusque-là pas été établie.

### **Les cytochromes b561, des réductases tonoplastiques à fonction inconnue**

Les cytochromes b561 sont un exemple de réductases transmembranaires dont le rôle physiologique n'a pas encore été clairement établi. Ces protéines, localisées sur le tonoplaste chez les plantes (Griesen et al., 2004; Preger et al., 2005), sont les homologues du cytochrome b561 de la membrane plasmique des cellules duodénales (Dcytb). Les cytochromes b561 sont capables, *in vitro*, de réduire du  $Fe^{3+}$  en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électrons (Preger et al., 2005; Berczi et al., 2007). Malgré ce lien biochimique, le rôle physiologique des cytochromes b561 dans l'homéostasie du fer n'a pas encore été établi.

Dans l'embryon d'*Arabidopsis*, le fer est principalement stocké dans les vacuoles des cellules de l'endoderme (Lanquar et al., 2005; Roschztardt et al., 2009). Bien que la forme chimique du fer vacuolaire soit inconnue, la co-localisation du fer avec du phosphore dans les vacuoles (Lanquar et al., 2005) suggère fortement une association fer-phosphate, vraisemblablement sous la forme de phytates. Nous avons montré que ce pool de fer peut réagir avec du ferrocyanure de potassium (colorant Perls), réactif spécifique du  $Fe^{3+}$  (Roschztardt et al., 2009). Ces données indiquent donc que, comme chez la levure (Raguzzi et al., 1988), le fer stocké dans les vacuoles se trouve principalement à l'état redox de FeIII. Étant donné que les protéines tonoplastiques d'influx (VIT1) et d'efflux (NRAMP3, NRAMP4) sont des transporteurs de cations divalents ( $Fe^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  principalement), il est raisonnable de penser que le transport du fer nécessite une étape préalable de réduction, en particulier pour l'efflux par NRAMP3 et NRAMP4 lors de la germination.

L'hypothèse avancée ici est que les cytochromes b561 pourraient jouer ce rôle de réductases tonoplastiques, utilisant l'ascorbate cytosolique comme donneur d'électrons pour réduire le  $Fe^{3+}$  vacuolaire, au cours de la germination.

Comment tester cette hypothèse ? Par une approche fonctionnelle d'une part, pour montrer que ces protéines sont bien capables de réaliser la fonction supposée, et par

une approche de physiologie moléculaire, en analysant la fonction des gènes correspondants chez *Arabidopsis thaliana*.

La caractérisation fonctionnelle sera abordée par expression hétérologue chez la levure *S. cerevisiae*. La levure exprime une réductase tonoplastique, FRE6 (même famille que les FRO) qui participe à la remobilisation du pool de fer vacuolaire avec deux autres protéines membranaires, FET5 (ferroxydase) et Fth (perméase de FeIII) (Singh et al., 2007). La mutation de *FRE6* induit une diminution de la capacité de remobilisation du fer vacuolaire, ce qui provoque *in fine* une forte accumulation de fer dans les vacuoles du mutant  $\Delta fre6$  (Singh et al., 2007). L'expression d'une protéine adressée au tonoplaste et capable de réduire le fer vacuolaire devrait compléter ce mutant et donc restaurer la concentration en fer vacuolaire des levures sauvages. Cette approche sera donc réalisée pour les ADNc des cytochromes b561 d'*Arabidopsis*. Cette famille compte quatre membres, dont deux seulement semblent être exprimés, *CYB1* (At5g38630) et *CYB2* (At4g25570). Ces deux ADNc seront clonés et exprimés dans la levure  $\Delta fre6$ , puis le contenu en fer des vacuoles sera dosé. Par cette approche, on pourra donc montrer si, comme proposé, les cytochromes b561 codent pour des réductases ferriques du tonoplaste.

L'analyse du rôle de *CYB1* et *CYB2* dans l'homéostasie du fer dans la plante sera réalisée en se focalisant, au moins dans un premier temps, sur le processus de germination. Pendant les premiers jours de germination, le pool de fer vacuolaire de l'embryon est remobilisé pour alimenter la plantule en croissance. Cette activité de remobilisation est particulièrement importante en conditions limitantes en fer. En effet, la disruption des deux transporteurs tonoplastiques d'efflux, *NRAMP3* et *NRAMP4*, limite fortement la mobilisation du fer vacuolaire, entraînant l'arrêt de la croissance post-germinative des plantules si elles sont cultivées en carence de fer (Lanquar et al., 2005). Ce phénotype démontre l'importance du pool de fer vacuolaire de l'embryon d'*Arabidopsis* pour la croissance de la future plantule et permet de mettre en évidence la fonction de gènes impliqués dans la mise en place (*VIT1* par exemple) et la mobilisation de ce stock de fer (*NRAMP3* et *NRAMP4*).

C'est dans ce contexte que le rôle de *CYB1* et *CYB2* sera testé. Les mutants « knock out » pour ces gènes seront isolés, un double mutant sera également généré, en vue de tester si la disruption de ces gènes affecte l'efflux de fer vacuolaire. Si c'est le cas, alors la disruption de ces gènes devrait conduire à phénocopier la double mutation *nramp3nramp4*, c'est-à-dire l'arrêt de la croissance juste après germination,



en conditions de carence en fer. Ce phénotype sera donc systématiquement recherché. A l'échelle subcellulaire, l'évolution du pool de fer vacuolaire sera suivie au cours des premiers jours de germination sur tous ces génotypes, grâce à la technique du Perls/DAB. Ceci permettra d'avoir une image claire de la dynamique de mobilisation des réserves de fer de la vacuole et ainsi affiner les phénotypes des différents mutants.

Dans le cas où cette approche ne serait pas concluante, il sera de toute façon possible d'étendre l'analyse à d'autres gènes de la famille des cytochromes b561. J'envisage également d'évaluer le rôle de l'ascorbate, indépendamment des systèmes de réductases membranaires, en analysant le phénotype de mutants de synthèse d'ascorbate (*vtc2*, *vtc5*, double mutant *vtc2vtc5*), sur les mêmes critères de capacité de remobilisation du fer vacuolaire et de germination en carence de fer.

### **Les ferroxidases, le contre-poids des systèmes de réduction ?**

Chez les plantes, l'étude de l'homéostasie du fer a principalement été abordée sous le prisme du prélèvement depuis le sol, là où le fer, majoritairement sous la forme ferrique, est le plus limitant. Ceci explique l'importance qui a été donnée à la régulation des systèmes de réduction ferrique, au détriment des systèmes d'oxydation. Le fer impose aux cellules, animales ou végétales, un vrai « casse-tête » : le FeIII est chimiquement presque inerte, peu soluble et peu réactif, alors que le FeII est très soluble, métaboliquement actif, mais également très pro-oxydant. Le casse-tête est résolu, chez les cellules animales, par un cycle redox impliquant des activités réductase ferrique et ferroxidase. Chez les mammifères, la ferroxidase (hephaestine, Hp) est associée au plasmalemme, avec un site catalytique situé du côté extracellulaire. L'hephaestine participe à l'activité d'efflux du fer, notamment au niveau des cellules épithéliales, en oxydant le FeII transporté par la ferroportine. Cette oxydation permet ensuite au FeIII d'être incorporé à la transferrine, qui va circuler dans le corps et délivrer le fer aux différents organes. Chez la levure, l'activité ferroxidase, codée par *Fet3*, fait partie de la machinerie d'absorption du fer à haute affinité, qui est composée d'une réductase, *Fre1*, qui va mobiliser le fer du milieu en générant du FeII plus mobile, de *Fet3* qui ré-oxyde le fer pour le délivrer à la perméase ferrique *Ftr1*. Les protéines *Fet3* et *Hp* ont des caractéristiques structurales communes : un domaine d'encrage à la membrane et un domaine

multicopper oxidase (MCO), constitué lui même de 3 sites, un site « blue copper » ou de type 1, un site « normal » (type 2) et un site à cluster de cuivre binucléaire (type 3). Chez *Arabidopsis thaliana*, il est possible d'identifier, au sein de la grande famille des laccases, une sous-famille de trois protéines annotées comme multi copper oxidases (MCO). Ces protéines ont une structure prédite comparable à la protéine Fet3 de levure, avec un domaine transmembranaire en N-terminal et un domaine multicopper oxidase (avec les 3 sites caractéristiques), vraisemblablement exposé du côté extra-cellulaire. Ces trois protéines sont également annotées comme des ascorbate oxydases. Parmi ces peptides, MCO1 (At4g39830) est celle qui présente le plus d'identité, tant dans la structure qu'au niveau de la séquence, avec Fet3. Je propose ici d'étudier la fonction de ce groupe de protéines, en relation avec l'homéostasie du fer. Pour cela, une approche classique de physiologie moléculaire sera développée, où l'on étudiera la fonction ferroxidase de ces protéines par complémentation du mutant *fet3* de levure, le profil d'expression de ces gènes, l'éventuelle régulation de l'expression par le statut nutritionnel en fer, la localisation cellulaire des protéines, le phénotype des mutants knock-out en conditions de carence et d'excès de fer ainsi que la localisation du fer dans les tissus avec la technique du Perls/DAB.

Chez la levure, l'implication des MCO dans le cycle redox du fer a mis en évidence la connexion étroite entre l'homéostasie du fer et celle du cuivre : pour être active, la protéine FET3 nécessite des atomes de cuivre. Le Cu est incorporé à FET3 dans des vésicules intracellulaires par un système de transport complexe impliquant les transporteurs plasmalemmiques CTR1 et CTR3, puis la chaperone Atx1 qui délivre le Cu à l'ATPase Ccc2 qui charge ces vésicules en Cu pour l'incorporation finale à FET3 (Askwith and Kaplan, 1998). Toute mutation de cette machinerie entraîne, *in fine*, une sensibilité à la carence en fer. Lors de la caractérisation phénotypique des mutants *mco* chez *Arabidopsis*, les interactions entre Cu et Fe seront donc testées (combinaisons carence/excès).

### **Recherche de nouveaux acteurs moléculaires par génétique d'association (GWAS)**

Ces dernières années, les approches de génétique d'association (Genome Wide Association Studies, GWAS) ont connu une forte expansion avec *Arabidopsis*. La

principale limitation pratique de ce genre d'approches résidait dans la capacité de phénotypage à haut débit pour analyser très finement le comportement de plusieurs centaines d'individus pour une réponse donnée. Plusieurs exemples récents ont illustré la puissance de cette approche pour l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la réponse à des stress abiotiques ou nutritionnels (Chao et al., 2012; Verbruggen et al., 2013; Verslues et al., 2014).

La possibilité de détecter le fer à l'échelle tissulaire avec le Perls/DAB permet maintenant d'envisager un nouveau type de phénotypage, axé sur le contrôle de la distribution et le suivi des pools de fer, en utilisant en l'occurrence un « matériel » particulièrement adapté, l'embryon.

Des expériences pilotes réalisées sur une core-collection de 48 écotypes ont montré qu'à la germination il existait une variabilité dans la dynamique de remobilisation du fer et dans la croissance en carence de Fe. En effet, parmi les écotypes, on peut distinguer plusieurs types de comportements. La majorité des plantules remobilisent uniformément le fer des cotylédons et de l'hypocotyle alors que chez certains écotypes la remobilisation est soit plus rapide soit non homogène, les cotylédons se vidant plus rapidement que l'hypocotyle, avec une accumulation de fer dans la racine émergente.

Je propose de tester l'approche GWAS sur différents critères:

- la distribution du fer dans l'embryon mature (graine sèche)
- la dynamique de remobilisation du fer au cours des premiers jours de germination (en condition de carence)
- enfin, sur un pas de temps plus long, la croissance des plantules en milieu carencé en utilisant du terreau alcalinisé

## **II - Quelle est la fonction du fer accumulé dans le nucléole ?**

Cette question de recherche, qui démarre virtuellement de zéro, est très exploratoire et nécessairement pluridisciplinaire (approches d'imagerie, de physico-chimie, de biochimie du nucléole...). Ce projet va donc s'appuyer sur une collaboration avec plusieurs partenaires, spécialisés dans l'imagerie élémentaire, l'analyse de la spéciation et le métabolisme du nucléole (collaboration officialisée *via* le projet ANR « subcelif »). La découverte d'une accumulation importante de fer dans le nucléole

des cellules végétales pose plusieurs questions, qui peuvent être réparties en deux catégories (selon que l'on s'intéresse au fer ou au nucléole) : (i) à quelle(s) famille(s) de molécules le fer est-il associé dans le nucléole, pour remplir quelle(s) fonction(s) ? (ii) de l'autre côté, quel est l'impact de l'homeostasie du fer sur l'activité du nucléole ?

### **Vers l'identification de l'environnement chimique du fer nucléolaire**

Une des manières de caractériser le rôle du fer est d'essayer d'obtenir des informations sur sa (ou ses) forme chimique au sein du nucléole. Pour cela, une batterie d'approches de chimie analytique sera mise en place, en collaboration avec Marie-Pierre Isaure et Laurent Ouerdane (IPREM, Pau). Ces approches seront basées soit sur du rayonnement synchrotron (spectroscopie d'absorption de rayons X et infrarouges), soit sur une méthodologie plus classique d'analyse de la spéciation par des techniques de séparation des complexes métalliques et d'identification des ligands par spectrométrie de masse à très haute résolution. La première information qui devrait être obtenue par ces approches concerne le statut redox du fer. L'analyse des seuils des spectres d'absorption des rayons X (XANES, pour X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy) permet en effet de déterminer le niveau redox du fer *in situ*. Cette information est assez importante car c'est une première piste pour mieux comprendre la fonction du fer : si le fer est majoritairement sous la forme FeIII, chimiquement peu actif, alors on peut envisager un rôle plutôt « structural » (par exemple, le fer du cœur minéral des complexes de ferritines est sous la forme FeIII), alors que la présence de fer ferreux serait une indication d'un rôle catalytique, très vraisemblablement sous la forme de cofacteur pour des protéines particulièrement abondantes dans le nucléole.

Nous disposons d'un outil de choix pour mener à bien ces approches de spéciation : l'équipe de Julio Saez a généré des lignées d'*Arabidopsis* qui expriment la fibrillarine (protéine nucléolaire) fusionnée à la YFP, sous le contrôle du promoteur 35S. Ces plantes permettent de purifier des noyaux ainsi que des nucléoles très rapidement par tri cellulaire grâce à la technologie FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorting). Cette technique permettra de produire de grandes quantités de matériel de grande pureté qui pourra être directement utilisé pour les analyses de spectroscopie d'absorption de rayons X ainsi que pour les approches « classiques » de chimie analytique.

Jusqu'à présent, nous avons pu détecter la présence de fer dans les nucléoles de nombreux types cellulaires, chez plusieurs espèces (Roschztardt et al., 2011). Cependant, nous ignorons la dynamique de ce pool de fer : la concentration en fer nucléolaire est-elle maintenue à un niveau stable ou peut-elle évoluer selon les conditions ? Plus simplement, le fer est-il toujours accumulé dans le nucléole ou existe-t-il des nucléoles n'accumulant pas de fer ? Cette question revient à considérer que le fer pourrait jouer un rôle structural pour le nucléole (il faut du fer pour structurer ou maintenir la structure du nucléole). Nous avons déjà un élément de réponse car il existe au moins deux situations où le nucléole est dépourvu de ce pool de fer : les cellules de l'embryon mature d'*Arabidopsis thaliana* (Roschztardt et al., 2009) et le noyau végétatif du grain de pollen, au stade binucléé (Roschztardt et al., 2013). Dans ce cas-ci, le fer s'accumule autour du noyau végétatif, dans des organites qui correspondent aux amyloplast. Ces données indiquent donc que le fer ne joue vraisemblablement pas un rôle structural majeur pour le nucléole, puisqu'il est possible d'observer des nucléoles, parfois particulièrement développés (pollen) sans accumulation détectable de fer. Ces observations sont plutôt en faveur d'un rôle catalytique, ce qui nous conduit à poser les questions suivantes : les nucléoles « pauvres en fer » sont très actifs ? Est-il possible de lier activité nucléolaire et accumulation de fer ?

### **Quel est l'impact de l'homéostasie du fer sur l'activité du nucléole ?**

L'objectif est d'évaluer dans quelle mesure l'homéostasie du fer, au sens large, a un impact sur l'activité du nucléole. Cette partie du projet sera réalisée en étroite collaboration avec Frédéric Pontvianne et Julio Saez (LGDP, Perpignan). L'expertise du groupe de Julio Saez (ainsi que les outils qu'ils ont développés) sera mise à profit pour étudier les différentes facettes de l'activité du nucléole (production des différents variants de précurseur d'ARN ribosomiques, aspect du nucléole par ARN et ADN-FISH, etc...), dans des situations où, de notre côté, nous pouvons prédire que l'homéostasie du fer sera perturbée. En pratique, plusieurs situations seront étudiées. Dans un premier temps, l'activité du nucléole sera suivie en fonction du statut nutritionnel des plantes, à partir de plantules cultivées *in vitro* en conditions standard, carence et excès de fer. Cette première série de tests sera un bon

indicateur de l'effet de la nutrition ferrique sur l'activité nucléolaire. Dans une deuxième série d'expériences, nous nous focaliserons sur les premiers stades de la germination. Ce processus physiologique est un bon système pour étudier les liens éventuels entre Fe et activité nucléolaire, pour deux raisons : (i) nous avons montré que dans l'embryon mature d'*Arabidopsis* les nucléoles n'accumulent pas de Fe et, (ii) au cours de la germination, nous avons des éléments qui indiquent que l'activité métabolique du nucléole (synthèse d'ARNr) n'est détectable qu'à partir du 4<sup>ème</sup> jour post-imbibition (Saez, communication personnelle). Nous avons donc un système avec des nucléoles pauvres en Fe et peu actifs, mais qui entrent en activité sur un pas de temps assez précis. Il sera donc très intéressant d'analyser, par coloration Perls/DAB, le contenu en Fe des nucléoles des plantules au cours de la germination, pour observer si les cinétiques de reprise de l'activité nucléolaire et de chargement en Fe se superposent. Si c'était effectivement le cas, alors nous aurions un argument assez fort pour proposer que le Fe joue un rôle « catalytique » dans le nucléole. Enfin, nous proposons une troisième série d'expériences dans laquelle l'activité nucléolaire sera suivie chez des mutants où la distribution cellulaire du fer est perturbée. Nous disposons de plusieurs combinaisons de mutants potentiellement affectés dans le trafic intracellulaire du fer : le double mutant *ys1/4ys16* qui sur-accumule du Fe dans les chloroplastes (Divol et al., 2013), le triple mutant *fer1,3,4*, dépourvu de ferritines et qui accumule d'importantes quantités de fer dans l'apoplaste (Roschztardt et al., 2013) et le quadruple mutant de nicotianamine synthases, *nas4x*, qui ne synthétise virtuellement plus de nicotianamine. Réciproquement, nous caractériserons la régulation de l'homéostasie du fer chez les mutants de nucléoline, *atnuc1* et *atnuc2*, à travers l'analyse (i) de la distribution du fer avec le Perls/DAB (notamment dans le nucléole) et (ii) de la réponse à la carence et à l'excès de fer dans le milieu de culture.

## Références bibliographiques

- Askwith C, Kaplan J** (1998) Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem Sci* **23**: 135-138
- Becher M, Talke IN, Krall L, Kramer U** (2004) Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J* **37**: 251-268

- Berczi A, Su D, Asard H** (2007) An Arabidopsis cytochrome b561 with trans-membrane ferrereductase capability. *Febs Letters* **581**: 1505-1508
- Cailliatte R, Lapeyre B, Briat JF, Mari S, Curie C** (2009) The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal* **422**: 217-228
- Chao DY, Silva A, Baxter I, Huang YS, Nordborg M, Danku J, Lahner B, Yakubova E, Salt DE** (2012) Genome-Wide Association Studies Identify Heavy Metal ATPase3 as the Primary Determinant of Natural Variation in Leaf Cadmium in Arabidopsis thaliana. *Plos Genetics* **8**: 14
- Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat JF** (2000) Involvement of NRAMP1 from Arabidopsis thaliana in iron transport. *Biochem. J.* **347**: 749-755
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S** (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot (Lond)* **103**: 1-11
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL** (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**: 346-349.
- Dancis A, Klausner RD, Hinnebusch AG, Barriocanal JG** (1990) Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular & Cellular Biology* **10**: 2294-2301
- Dancis A, Roman DG, Anderson GJ, Hinnebusch AG, Klausner RD** (1992) Ferric reductase of Saccharomyces cerevisiae: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 3869-3873
- Divol F, Couch D, Conejero G, Roschzttardtz H, Mari S, Curie C** (2013) The Arabidopsis YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 Transporters Control Iron Release from the Chloroplast. *Plant Cell* **25**: 1040-1055
- Divol F, Couch D, Conéjéro G, Roschzttardtz H, Mari S, Curie C** (2013) The Arabidopsis YELLOW STRIPE4 and 6 Transporters Control Iron Release from the Chloroplast. *Plant Cell* **25**: 1040-1055
- Drager DB, Desbrosses-Fonrouge AG, Krach C, Chardonnens AN, Meyer RC, Saumitou-Laprade P, Kramer U** (2004) Two genes encoding Arabidopsis halleri MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *Plant Journal* **39**: 425-439
- Dreyfus C, Lemaire D, Mari S, Pignol D, Arnoux P** (2009) Crystallographic snapshots of iterative substrate translocations during nicotianamine synthesis in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 16180-16184
- Gendre D, Czernic P, Conejero G, Pianelli K, Briat JF, Lebrun M, Mari S** (2006) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator Thlaspi caerulescens, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *Plant J* **49**: 1-15
- Griesen D, Su D, Berczi A, Asard H** (2004) Localization of an ascorbate-reducible cytochrome b561 in the plant tonoplast. *Plant Physiology* **134**: 726-734
- Grill E, Loffler S, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Phytochelatins, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, Are Synthesized from Glutathione by a Specific Gamma-Glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatin Synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 6838-6842
- Grillet L, Ouerdane L, Flis P, Hoang MTT, Isaure M-P, Lobinski R, Curie C, Mari S** (2014) Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants. *The Journal of biological chemistry* **289**: 2515-2525
- Jeong J, Cochu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML** (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10619-10624

- Kim SA, Punshon T, Lanzirrotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML** (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* **314**: 1295-1298
- Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK** (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal* **39**: 415-424
- Krämer U, Cotter-Howells J, Charnock J, Baker AJM, Smith JAC.** (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**: 635-638
- Lane DJR, Robinson SR, Czerwinska H, Bishop GM, Lawen A** (2010) Two routes of iron accumulation in astrocytes: ascorbate-dependent ferrous iron uptake via the divalent metal transporter (DMT1) plus an independent route for ferric iron. *Biochemical Journal* **432**: 123-132
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *Embo J* **24**: 4041-4051
- Le Jean M, Schikora A, Mari S, Briat JF, Curie C** (2005) A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J* **44**: 769-782
- Luk EE, Culotta VC** (2001) Manganese Superoxide Dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* Acquires Its Metal Co-factor through a Pathway Involving the Nramp Metal Transporter, Smf2p. *J Biol Chem* **276**: 47556-47562.
- Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat JF, Lebrun M, Czernic P** (2006) Root-to-shoot long distance circulation of nicotianamine and nicotianamine–nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 4111-4122
- Mari S, Lebrun M** (2006) Metal immobilization: where and how? *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification: from Microbes to Man* **14**: 273-298
- Nguyen-Legros J, Bizot J, Bolesse M, Pulicani JP** (1980) ["Diaminobenzidine black" as a new histochemical demonstration of exogenous iron (author's transl)]. *Histochemistry* **66**: 239-244
- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW** (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo J* **11**: 3491-3499
- Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW** (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270**: 4721-4728
- Ouerdane L, Mari S, Czernic P, Lebrun M, Lobinski R** (2006) Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOF MS/MS after their isolation by 2D Size-Exclusion – Hydrophilic Interaction LC (SEC – HILIC) monitored by ICP MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **21**: 676-683
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DL, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV** (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4956-4960
- Preger V, Scagliarini S, Pupillo P, Trost P** (2005) Identification of an ascorbate-dependent cytochrome b of the tonoplast membrane sharing biochemical features with members of the cytochrome b561 family. *Planta* **220**: 365-375
- Raguzzi F, Lesuisse E, Crichton RR** (1988) Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **231**: 253-258
- Ravet K, Touraine B, Kim SA, Cellier F, Thomine S, Guerinot ML, Briat JF, Gaymard F** (2009) Post-Translational Regulation of AtFER2 Ferritin in Response to Intracellular Iron Trafficking during Fruit Development in Arabidopsis. *Molecular Plant* **2**: 1095-1106
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697



- Roosens NH, Bernard C, Leplae R, Verbruggen N** (2004) Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett* **577**: 9-16
- Roschzttardtz H, Conejero G, Curie C, Mari S** (2009) Identification of the Endodermal Vacuole as the Iron Storage Compartment in the Arabidopsis Embryo. *Plant Physiology* **151**: 1329-1338
- Roschzttardtz H, Conejero G, Divol F, Alcon C, Verdeil J-L, Curie C, Mari S** (2013) New insights into Fe localization in plant tissues. *Frontiers in Plant Science* **4**: 11
- Roschzttardtz H, Grillet L, Isaure MP, Conejero G, Ortega R, Curie C, Mari S** (2011) Plant Cell Nucleolus as a Hot Spot for Iron. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 27863-27866
- Salt DE, Rauser WE** (1995) MgATP-Dependent Transport of Phytochelatin Across the Tonoplast of Oat Roots. *Plant Physiol* **107**: 1293-1301
- Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, von Wiren N** (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem* **279**: 9091-9096
- Schaaf G, Schikora A, Häberle J, Vert GA, Ludewig U, Briat JF, Curie C, von Wirén N** (2005) A putative function of the Arabidopsis Fe-Phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant Cell Physiol.* **46**: 762-774
- Singh A, Kaur N, Kosman DJ** (2007) The metalloredoxase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J Biol Chem* **282**: 28619-28626
- Spizzo T, Byersdorfer C, Duesterhoeft S, Eide D** (1997) The yeast FET5 gene encodes a FET3-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol Gen Genet* **256**: 547-556
- Talke IN, Hanikenne M, Kramer U** (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* **142**: 148-167
- Vacchina V, Mari S, Czernic P, Marques L, Pianelli K, Schaumloffel D, Lebrun M, Lobinski R** (2003) Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. *Anal Chem* **75**: 2740-2745
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA** (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis - Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of Arabidopsis thaliana PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 22449-22460
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7110-7115
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase - Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 31451-31459
- Verbruggen N, Hanikenne M, Clemens S** (2013) A more complete picture of metal hyperaccumulation through next-generation sequencing technologies. *Frontiers in Plant Science* **4**: 7
- Verslues PE, Lasky JR, Juenger TE, Liu TW, Kumar MN** (2014) Genome-Wide Association Mapping Combined with Reverse Genetics Identifies New Effectors of Low Water Potential-Induced Proline Accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **164**: 144-159
- Weber M, Harada E, Vess C, Roepenack-Lahaye E, Clemens S** (2004) Comparative microarray analysis of Arabidopsis thaliana and Arabidopsis halleri roots identifies

nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* **37**: 269-281