



**HAL**  
open science

# Étude de la remobilisation des métaux au cours de la sénescence foliaire : évaluation de l'implication des NRAMP dans ce processus dans le cadre de la stratégie de phytoremédiation

Mathieu Pottier

► **To cite this version:**

Mathieu Pottier. Étude de la remobilisation des métaux au cours de la sénescence foliaire : évaluation de l'implication des NRAMP dans ce processus dans le cadre de la stratégie de phytoremédiation. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112038 . tel-01131599

**HAL Id: tel-01131599**

**<https://theses.hal.science/tel-01131599>**

Submitted on 14 Mar 2015

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL  
Institut des Sciences du Végétal

*DISCIPLINE : BIOLOGIE*

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance le 13/03/2014

par

Mathieu POTTIER

Étude de la remobilisation des métaux au cours  
de la sénescence foliaire : évaluation de  
l'implication des NRAMP dans ce processus dans  
le cadre de la stratégie de phytoremédiation

**Composition du jury :**

<i>Directeur de thèse :</i>	Sébastien THOMINE	Directeur de recherche (CNRS de Gif-sur-Yvette)
<i>Rapporteurs :</i>	Marc HANIKENNE	Research Associate (Université de Liège 1)
	Michel MENCH	Directeur de recherche (INRA-Université Bordeaux 1)
<i>Examineurs :</i>	Jean-Christophe AVICE	Professeur (INRA-Université de Caen-Basse Normandie)
	Michael HODGES	Directeur de recherche (CNRS-Université Paris-Sud)



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL  
Institut des Sciences du Végétal

*DISCIPLINE : BIOLOGIE*

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance le 13/03/2014

par

Mathieu POTTIER

Étude de la remobilisation des métaux au cours  
de la sénescence foliaire : évaluation de  
l'implication des NRAMP dans ce processus dans  
le cadre de la stratégie de phytoremédiation

**Composition du jury :**

<i>Directeur de thèse :</i>	Sébastien THOMINE	Directeur de recherche (CNRS de Gif-sur-Yvette)
<i>Rapporteurs :</i>	Marc HANIKENNE	Research Associate (Université de Liège 1)
	Michel MENCH	Directeur de recherche (INRA-Université Bordeaux 1)
<i>Examineurs :</i>	Jean-Christophe AVICE	Professeur (INRA-Université de Caen-Basse Normandie)
	Michael HODGES	Directeur de recherche (CNRS-Université Paris-Sud)



# REMERCIEMENTS

---

Loin de mes amis, loin de ma famille (300 km pour le Normand ultrasédentaire que je suis, c'est beaucoup), loin de ma terre natale (là j'en fais peut être un peu trop...), les membres du ST group ont été pour moi, plus que de simples collègues de travail. Ces trois ans furent un réel bonheur. Bon, je l'avoue... peut-être un peu moins au cours des derniers mois de rédaction. Pour le reste, j'ai vraiment pris plaisir à venir travailler mais également échanger et partager que ce soit sur les plans professionnel ou plus personnel. Nombreux sont ceux que je voudrais remercier.

Je remercierai tout d'abord Sébastien, mon directeur de thèse, de m'avoir offert la possibilité de travailler dans son équipe. Je n'aurais pu espérer mieux. Un grand merci à toi pour cette prise de risque !!! Merci de ta confiance, de ta disponibilité, de tes bons conseils, de ton suivi tout au long de cette thèse, au-delà de toutes tes responsabilités. Merci de m'avoir donné la possibilité, voire de m'avoir poussé à explorer le monde à travers les congrès, séminaires et manips au Portugal, en Belgique, en Italie, au Japon... à Lille ?? Il fait vraiment bon vivre au sein du ST group et tu y es clairement pour quelque chose. MERCI !

Je souhaite également remercier très chaleureusement Sylvain (le grisonnant), Mathieu le Vrai et Astrid d'avoir pris le temps, au quotidien, de répondre à toutes mes questions et ce n'est pas rien, y compris celles commençant par « C'est grave si.... ». Avec le temps, j'ai finalement appris que rien n'est vraiment grave.

**Merci à tout les « Métaleux » (à prononcer avec une grosse voix gutturale), pour leur aide permanente.**

Astrid, je te remercie de ton aide et de tes cheese-cakes. Tu as vraiment été très présente et disponible, pour les manips bien sûr mais pour le reste aussi... Je t'en suis très reconnaissant. Je garde précieusement en mémoire tes nombreux fous-rire dont la plupart qui restent encore inexplicables amènent cette question que l'on se pose tous : « Mais vous êtes combien dans ta tête ? »

Sylvain, mon coach footing, merci de tes conseils, tes idées, ton aide, ta disponibilité et tes « blagues » (enfin pas toutes !!!). Merci pour tous ces fruits ramenés du sud et pour ton initiation à la culture japonaise... Bien que je doive avouer avoir eu un peu peur de partager une chambre avec toi au Japon après avoir appris que tu connaissais plus de 4 couleurs... ☺

J'ai été ravi de travailler avec toi, Jérôme. Tu m'as montré ce qu'étaient la rigueur, l'organisation mais également la modération (« Tranquille... Tranquille... »). Malheureusement, j'ai encore beaucoup à faire avant de pouvoir mettre tout ça en application.

Merci également, Van Anh, pour les récoltes au champ bien sûr mais encore pour toutes les spécialités vietnamiennes que tu nous as rapportées à chacun de tes retours. L'avenir du peuplier est entre tes mains !!!



Merci FanFan, la maman du labo !! Pour ta gaieté, tes lasagnes et tes expressions bien à toi... C'était toujours un vrai plaisir de te voir débarquer au laboratoire avec tes gâteaux, tes chocolats et tes petites anecdotes.

Merci aussi à toi Viviane M. pour ces trois ans passés ensemble ! Pour tes cannelés et pour m'avoir rappelé, à chaque fois que j'oubliais (c'est-à-dire à peu près tout le temps en fait), les dates des réunions et des séminaires. Je te suis également reconnaissant d'avoir sacrifié tes poumons pour le bien de la terre contaminée d'Auby.

Merci également à Viviane L. pour son aide et ses anecdotes californiennes. Je dois dire que toi et Sylvain, vous m'avez presque donné envie de vivre en Californie malgré l'inévitable dévastateur BIG ONE !!!

Eiri, ma voisine de bureau, je te remercie pour ton aide, ta bonne humeur, ta gentillesse. J'espère ne pas trop t'avoir dérangée par mes grognements et jurons quand je me battais avec Excel, endnote, Word... avec mon vieil ordi quoi !

Je remercie tous les gens qui m'ont permis de développer mon anglais...et ce n'est pas rien ...on parlait de loin...je pense bien sûr à Astrid et à Sara...

Merci également à toi, Sara, de ton aide mais aussi de m'avoir appris les mots clés de la langue portugaise, les mots essentiels pour survivre dans ce territoire hostile. Je suis heureux de connaître le mot bacalhau (qui signifie morue en portugais), francesinha (une sorte de croque-monsieur pas mauvais en réalité...) ou encore Ginja (une espèce de liqueur de cerises... pas mauvaise non plus et qui devrait clairement m'être utile lors de mes prochaines escapades dans « le plus beau pays du monde »\*.

\*According to Sara Martins

### **Mais le ST group ne se limite pas au « Métaleux »**

Je n'oublie pas de remercier Tiffanie, la spécialiste de la q-RT-PCR, du GUS et de l'orthographe qui, grâce à son œil de sphinx ... Euh... de lynx, est capable de débusquer en quelques secondes la moindre petite faute de français (ça marche aussi avec l'anglais en fait). Merci à toi pour ton aide, mais aussi pour ton implication dans la vie du labo, pour tes idées cadeaux ... mais pas pour m'avoir ridiculisé à « Guitar Hero »...

Merci aussi à Chi Tam pour sa bonne humeur même durant les moments les plus difficiles ou pendant la rédaction de sa thèse. J'espère que tout se passe bien pour toi à Lausanne et que tu n'es pas « tout perdu ».

Jean Marie, ce fut un réel bonheur de discuter sciences, actualités, religions avec toi autour d'un bon vieux « pisse mémé ». Je reste impressionné par ta capacité à partir d'un sujet d'actualité pour finir, de fil en aiguille, en abordant des thématiques métaphysiques. J'ai apprécié partager ton regard sur la vie et tes réflexions du style : « N'empêche, je trouve qu'on ne considère pas suffisamment notre vie haploïde !!! » J'en profite aussi pour saluer ton inimitable humour avec cette petite blague qui continue à me faire rire : «- C'est un mec qui entre dans un bar et qui dit : C'EST MOI !!! Mais en fait c'était pas lui...» Mouais... en réalité ça ne marche que si c'est toi qui la fais... Tout est dans l'interprétation !

Je remercie Marie pour son aide et ses conseils biochimiques. Merci de m'avoir fourni quelques publications inaccessibles... Vive les abonnements CNRS !!





Je te remercie également Marie-Jo, la pro du gel d'Acrylamide pour ton aide et pour tous les Western Blots... Et c'est promis, pour mon post-doc mon cahier de labo sera complet et à jour.

Merci Sophie pour ta gentillesse, tes conseils d'avenir et aussi et surtout pour tous les TIMTAM que tu nous as rapportés d'Australie. ;)

Ce fut un grand honneur et un grand plaisir d'appartenir au FanClub de Sophie F. bien qu'on ne m'ait toujours pas dit de qui il s'agissait. Et non Tiffanie, il ne s'agit pas de Sophie Favier... Mais qui cela peut bien être ?...

Lydia, je te remercie pour ta spontanéité et pour nous avoir apporté l'horoscope pendant un an. J'aurais été ravi de dîner dans ton fast-food mexicain !!! Tiens-moi au courant si tu changes d'avis !

Merci Daniel pour tes conseils post-doc ! Avec Chi Tam, vous êtes les personnes les plus calmes, zen que j'ai rencontrées... Ça fait du bien ! Je devrais en prendre de la graine.

Marjorie, je t'ai confié une TRÈS... TRÈS...(TRÈS)... LOURDE MISSION... Après des mois et des mois de recherche (je ne parle pas de mon travail de labo), je pense que j'ai finalement trouvé (là je crois que c'est clair, je ne parle toujours pas de mon travail de labo) en toi, toutes les caractéristiques indispensables pour assurer au mieux ma succession en tant que responsable de la caisse café. Tu devras très certainement faire face à toutes sortes de difficultés (machine à café qui marche plus...pénurie de goûters... impayés, contestations du choix des gâteaux achetés) Mais je sais, ... je suis convaincu que tu as les ressources nécessaires pour mener à bien cette mission !!! Tu es l'élue, tu es CELLE qui saura faire face à tous ces problèmes ! N'oublie pas qu'en tant que haut dignitaire de la caisse café, tu détiens les rênes du pouvoir !!! (Je me suis un peu emballé sur la fin... nan ?!)

Alexis, ce fut un plaisir de partager avec toi le bureau de Sophie pendant ma rédaction de thèse. Je te remercie de m'avoir enseigné les fonctionnalités de la touche Ctrl qui m'ont permis de sauver un temps précieux !!! Je dois ajouter que tu as su être très convainquant quand il s'agissait de me motiver pour aller travailler à la BU ;).

Bien entendu, je n'oublie pas de remercier tous les récolteurs... Les BÛCHERONS quoi !!! Merci donc une fois de plus à Sylvain (le grisonnant), à Astrid, à Sylvain (le petit), à Rafaël (merci pour tes bottes aussi !!!), à Van Anh et à Sara.

Je tiens très solennellement à féliciter tous les participants du jeu Brossard présenté chaque après-midi vers 17 h par Tiffanie... Bravo à Rafaël, Aïna, Edgar et Viviane... Mais bon... À un moment donné, il faut bien se rendre à l'évidence... vous ne m'arrivez pas à la cheville !!!

Merci à tous les gens qui ont participé au voyage de la bétonneuse... bétonnière... au centre de l'ISV... Ce petit périple n'a pas été de tout repos.

Au cours de mon séjour à Gênes, j'ai également eu l'occasion de rencontrer des gens passionnants et chaleureux. Merci à Armando, à Cristiana et à Joachim pour m'avoir enseigné les bases de l'électrophysiologie et de la cuisine italienne.



Bon bah voilà...je pense n'avoir oublié personne.... Comment ça il manque quelqu'un ???

En réalité, je tiens à faire une place toute particulière à toi, Cindy, ma stagiaire qui, après une année à mes côtés, a bien voulu rempiler pour m'accompagner durant ma dernière année de thèse. J'ai été vraiment ravi de te rencontrer et je te remercie infiniment pour le travail de qualité que tu as fait pendant ces deux ans. Merci également pour ta tolérance, ta compréhension et ta joie de vivre. Je garde avec moi ta balle dé-stressante personnalisée. Bin mon tabarnak... J'espère que tu réussiras à t'exiler au pays des Caribous !!!

J'ai bien conscience de vous être encore très redevable de tout ce que vous avez fait pour moi et si par chance nos chemins se recroisent, j'espère bien vous rendre la pareille.

**D'autres personnes extérieures au laboratoire ont également apporté leur contribution à cette thèse.**

Je suis très honoré que Marc Hanikenne et Michel Mench aient accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je veux également remercier les autres membres du jury, Jean Christophe Avice et Michael Hodges pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de thèse, Céline Masclaux-Daubresse, Michel Chalot, Damien Blaudez pour m'avoir suivi et conseillé tout au long de ces trois années.

Merci à Anaïs, à Fleur et à Daniel Mary pour avoir pris le temps de relire ce mémoire.

Merci à Francis Douay pour nous avoir accordé une demi-journée afin de trouver « LA » terre contaminée la plus adaptée pour nos essais en serres. Désormais, l'histoire industrielle d'Auby, Noyelles-Godault et de Courcelles-lès-Lens, n'a plus de secret pour moi.

Merci également à Emmanuel Lesuisse pour ses conseils concernant l'Uptake de <sup>55</sup>Fe en levures.

Enfin, merci au conseil régional de l'Ile de France ainsi qu'au DIM ASTREA pour leur support financier.



# LISTE DES ABREVIATIONS

AAS	Atomic Absorption Spectrometry	JPL	Jouanneau et Péaud Lenoël
ABA	Abscisic Acide	LB	Luria Bertani ou Lysogeny Broth
ABC	ATP Binding Cassette	LCT1	Low-affinity Cation Transporter 1
ADEME	Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie	LHCII	Light Harvesting Complex II
ADN (c/g)	Acide désoxyribonucléique (complémentaire/génomique)	M	Molaire
Ah	<i>Arabidopsis halleri</i>	MCBL	Microscope confocal à balayage laser
AND-T	AND de transfert	MEDDTL	Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'énergie
ARN (i)	Acide ribonucléique (interférent)	MES	Morpholino Ethanesulfonique
ARNm	Acide ribonucléique messagé	MS	Matière Sèche
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTP	Metal Tolerance Protein
ATP	Adénosine 5'-triphosphate	MVB	Multi-Vesicular Body
BAC	Bacterial Artificial Chromosome	N	nombre d'échantillons
BET	Bromure d'ETHidium	NA(S)	Nicotianamine (Synthase)
BPDS	Bathophenanthroline-Disulfonique	Nc	<i>Noccaea caerulea</i>
CAX	Cation eXchanger	N-term	Amino-terminal
CDF	Cation Diffusion Facilitator	NRAMP	Natural Resistance Associated Macrophage Protein
CDS	Coding DNA Sequence	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anion superoxyde
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique	Os	<i>Oriza sativa</i>
Col-0	Columbia 0	pb	Paires de bases
CP	Cystein Protease	PCR	Polymerisation Chain Reaction
C <sub>t</sub>	Cycle <sup>threshold</sup>	PEG	Polyethylene Glycol
C-term	Carboxy-terminal	PS I	Photosystème I
Cv	Cultivar	PS II	Photosystème II
DIM	Domaine d'Intérêt Majeur Agrosociences,	Pt	<i>Populus trichocarpa</i>
ASTREA	Ecologie des Territoires, Alimentation	q-RT-PCR	Quantitative reverse transcription PCR
DO	Densité Optique	QSP	Quantité Suffisante Pour
dNTP	Désoxyribonucléotide Triphosphate	QTL	Quantitative Trait Locus
DTPA	diethylenetriaminopentacetic acid	RE	Réticulum Endoplasmique
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid	RFP	Red Fluorescent Protein
EGTA	Ethylene Glycol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-Tetra Acetic acid	RPM	Rotation Par Minute
EST	Expressed Sequence Tag	SOD	SuperOxyde Dismutase
ET(M)	Elément Trace (Métallique)	SD	Synthetic dextrose
YPDA	Yeast extract Peptone Dextrose medium Adenine	SDS	sodium dodecyl sulfate
FPGN	Fond Pédo-Géochimique Naturel	SIAP	Syndicat interdépartemental pour l'assainissement de l'agglomération parisienne
Fet	Fe (II) transporter	Smf	Suppressor of <i>MiF</i>
GFP	Green Fluorescent Protein	TAE	Tris, Acétate, EDTA
Gm	<i>Glycine max</i>	U5	Amorce universelle Gateway s'hybridant à l'extrémité 5'
HBED	Acide monohydrochloride N,N'-di(2-hydroxybenzoyl)-éthylènediamine-N,N'-diacétate	U3	Amorce universelle Gateway s'hybridant à l'extrémité 3'
Hg	Mercure	WS	Wassilewskija
HMA	Heavy Metal ATPase	YNB	Yeast Nitrogen Base
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène	YSL	Yellow Strip Like
IHI	Iron Harvest Index	ZIP	Zrt Irt like Protein
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique	ZNT	ZiNc Transporter
Zm	<i>Zea mays</i>	Zrt	Zinc regulated transporter
IRE	Iron Remobilization Efficiency	2YT	Yeast extract Tryptone x 2
IRT	Iron Regulated Protein		
IUE	Iron Use Efficiency		



# TABLE DES MATIERES

---

PREAMBULE.....	1
Chapitre I: Introduction bibliographique.....	3
PARTIE I : HOMEOSTASIE DES METAUX CHEZ LES VEGETAUX.....	3
I.  Le paradoxe des métaux.....	3
A)  Les rôles des métaux de transition chez les plantes.....	3
1.  Les métaux dans le chloroplaste.....	4
2.  Les métaux dans les mitochondries.....	5
3.  Les métaux dans le reste de la cellule.....	6
B)  La toxicité des métaux.....	6
1.  Toxicité des métaux sur le statut hydrique.....	7
2.  Toxicité des métaux sur la nutrition minérale.....	8
3.  Toxicité des métaux <i>via</i> le stress oxydatif.....	9
C)  Les plantes tolérantes aux fortes concentrations en métaux.....	10
II.  Des protéines de transport nécessaires à l'homéostasie des métaux.....	11
A)  Généralité sur le transport membranaire.....	11
B)  Les principales familles de transporteurs de métaux.....	12
1.  Les Heavy Metal P-type ATPase (HMA).....	13
2.  Les ZRT-IRT-like Proteins (ZIP).....	15
3.  Les Natural Resistance Associated Macrophage Protein (NRAMP).....	18
III.  Gestion des métaux au cours du développement des plantes.....	27
A)  Aperçu des principales voies de transport des micronutriments chez les plantes annuelles.....	27
B)  Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds.....	30
PARTIE II : DES VEGETAUX AU SERVICE DE L'ENVIRONNEMENT.....	39
I.  Des environnements pollués.....	39
A)  Origines naturelles des pollutions aux ETM.....	40
B)  Origines anthropiques des pollutions aux ETM.....	40
1.  L'industrie.....	41
2.  Les activités urbaines.....	42
3.  L'agriculture.....	42
C)  Le cas de la plaine de Pierrelaye-Bessancourt (95).....	43
II.  Des stratégies de réhabilitation des sols pollués.....	44
III.  Les facteurs influençant la biodisponibilité des ETM.....	46
A)  Mobilité dans le sol.....	46
B)  Les mécanismes mis en place par la plante pour améliorer la biodisponibilité des ETM.....	47
IV.  Les plantes utilisées pour la phytoextraction des métaux.....	49
A)  L'utilisation des plantes hyperaccumulatrices.....	49
B)  L'utilisation des espèces à forte biomasse.....	49
C)  Gros plan sur le peuplier.....	50
1.  Les atouts du peuplier pour la phytoextraction.....	52
2.  Les faiblesses du peuplier pour la phytoextraction.....	54
Objectifs de la thèse.....	55
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	57
I.  Matériels biologiques.....	57
A)  Dispositif expérimental de Pierrelaye.....	57
B)  Souches de levure.....	57





C)	Mutants <i>nramp</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	58
D)	Mutants et lignées ARNi d'autophagies.....	58
II.	Méthodes .....	59
A)	Conditions de culture .....	59
1.	Culture in vitro .....	59
2.	Culture pour marquage isotopique .....	59
B)	Techniques de biochimie.....	60
1.	Extraction de protéines de feuilles et de racines .....	60
2.	Extraction des protéines de levures .....	60
3.	Séparation des protéines par électrophorèse et western-blot .....	61
Chapitre III : Identification de génotypes de peupliers efficaces pour la remobilisation des métaux au cours de la sénescence foliaire et recherche des gènes associés.....		62
Article I .....		63
Chapitre IV : Caractérisation de transporteurs putativement impliqués dans la remobilisation des métaux.....		83
I.	Article II .....	85
II.	Résultats complémentaires: Caractérisation de PtNRAMP1 et PtNRAMP2.....	108
A)	Capacités de transport des protéines PtNRAMP1 et PtNRAMP2. ....	108
1.	Complémentation de croissance du double mutant <i>fet3fet4</i> .....	108
2.	Complémentation de croissance des mutants <i>smf1</i> et <i>smf2</i> .....	109
3.	Tests d'accumulation des métaux en levure.....	109
B)	Localisations subcellulaires de PtNRAMP1 et PtNRAMP2.....	110
C)	Caractérisation des PtNRAMPs par expression chez <i>Arabidopsis</i> .....	111
1.	Caractérisation de PtNRAMP1 par expression chez <i>Arabidopsis</i> .....	111
2.	Caractérisation de PtNRAMP2 par expression chez <i>Arabidopsis</i> .....	113
Chapitre V : Étude de la relation entre la structure primaire et la sélectivité chez AtNRAMP4, homologue des PtNRAMP3s .....		115
Article III.....		116
Chapitre VI : Étude de l'implication de l'autophagie dans la remobilisation des métaux.....		135
I.	Article IV.....	136
II.	Expériences complémentaires .....	149
A)	Quantification de l'efficacité de remobilisation du fer chez le mutant d'autophagie <i>atg5-1</i> par marquage isotopique .....	149
B)	Premières investigations du rôle de l'autophagie chez le peuplier .....	149
Chapitre VII : Conclusion générale et perspectives .....		151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....		156
ANNEXES .....		173
Annexe I : The iron and manganese transporter AtNRAMP5 contributes to male fertility in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....		173
Annexe II : Milieux .....		174
Annexe III : Amorces qPCR .....		175



# PREAMBULE

---

En raison des intenses activités anthropiques des deux siècles précédents, la composition élémentaire de certains sols a été modifiée. Des éléments, nommés éléments traces métalliques (ETM), constituant normalement moins de 0,1% de l'ensemble des atomes de la couche terrestre, se sont retrouvés surreprésentés. L'accumulation progressive des ETM est responsable de pollutions rendant les parcelles touchées inexploitable et provoquant la pollution de nappes phréatiques et de cours d'eau environnants. Depuis le début des années 1990, différentes stratégies de phytoremédiation ont été proposées pour permettre la réhabilitation de ces zones par l'utilisation de plantes. Parmi ces stratégies, la phytoextraction qui consiste en l'absorption et l'accumulation des métaux non-essentiels par les plantes a été très largement présentée. Parce que l'efficacité de ce mode d'action est totalement dépendante du choix de l'espèce végétale utilisée, des études ont été menées sur différentes espèces végétales, notamment sur des plantes tolérantes aux ETM qui ont développé des mécanismes permettant l'hyperaccumulation de ces métaux dans leurs parties aériennes. Cependant les plantes hyperaccumulatrices possèdent généralement de faibles biomasses, limitant le processus d'extraction et ne satisfaisant pas les intérêts des industriels. Il est donc apparu essentiel de tester le potentiel de phytoextraction d'espèces végétales alternatives.

Du fait de sa croissance rapide, de son importante biomasse et de ses débouchés dans le domaine de l'énergie, le peuplier a été testé pour la phytoextraction. Au cours d'études précédentes, le potentiel de phytoextraction de différents cultivars de peuplier ayant poussés sur des parcelles polluées a été étudié. Ces travaux ont permis d'identifier des cultivars efficaces pour la phytoextraction. Il est également apparu que, chez le peuplier, une quantité considérable de métaux se trouve accumulée dans les feuilles alors que celles-ci chutent à l'automne. L'accumulation de métaux dans cet organe peut être à l'origine d'un retour au sol d'ETM limitant le processus de phytoextraction. Cependant, certaines espèces sont capables de mettre en place des mécanismes de remobilisation d'éléments au cours de la sénescence foliaire. C'est donc dans le but de déterminer si de tels mécanismes sont présents chez le peuplier mais également dans le but d'identifier les acteurs moléculaires de la remobilisation des métaux foliaires lors de la sénescence que cette thèse a été conduite.



Ce projet de recherche a donc pour but d'identifier des géotypes de peuplier possédant une forte capacité à remobiliser les ETM des feuilles vers les parties pérennes pendant la sénescence foliaire d'automne. Il vise également à identifier et à caractériser les protéines de transports impliquées dans ce processus. Le laboratoire étant tout particulièrement spécialisé dans l'étude des protéiques NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) essentiellement impliquées dans le transport de manganèse, fer, zinc et cadmium, une approche « gène candidat » impliquant les membres de cette famille a été réalisée en parallèle de l'examen physiologique. De plus, cette thèse a eu pour but d'identifier des mécanismes généraux indispensables au bon déroulement de la remobilisation des métaux au cours de la sénescence foliaire. Ce travail réalisé sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a principalement porté sur le mécanisme d'autophagie. Enfin, une étude visant à identifier, chez les NRAMP, des déterminants structuraux permettant de discriminer les métaux essentiels des métaux non-essentiels a été menée.



# Chapitre I: Introduction bibliographique

---

## *PARTIE I : HOMEOSTASIE DES METAUX CHEZ LES VEGETAUX*

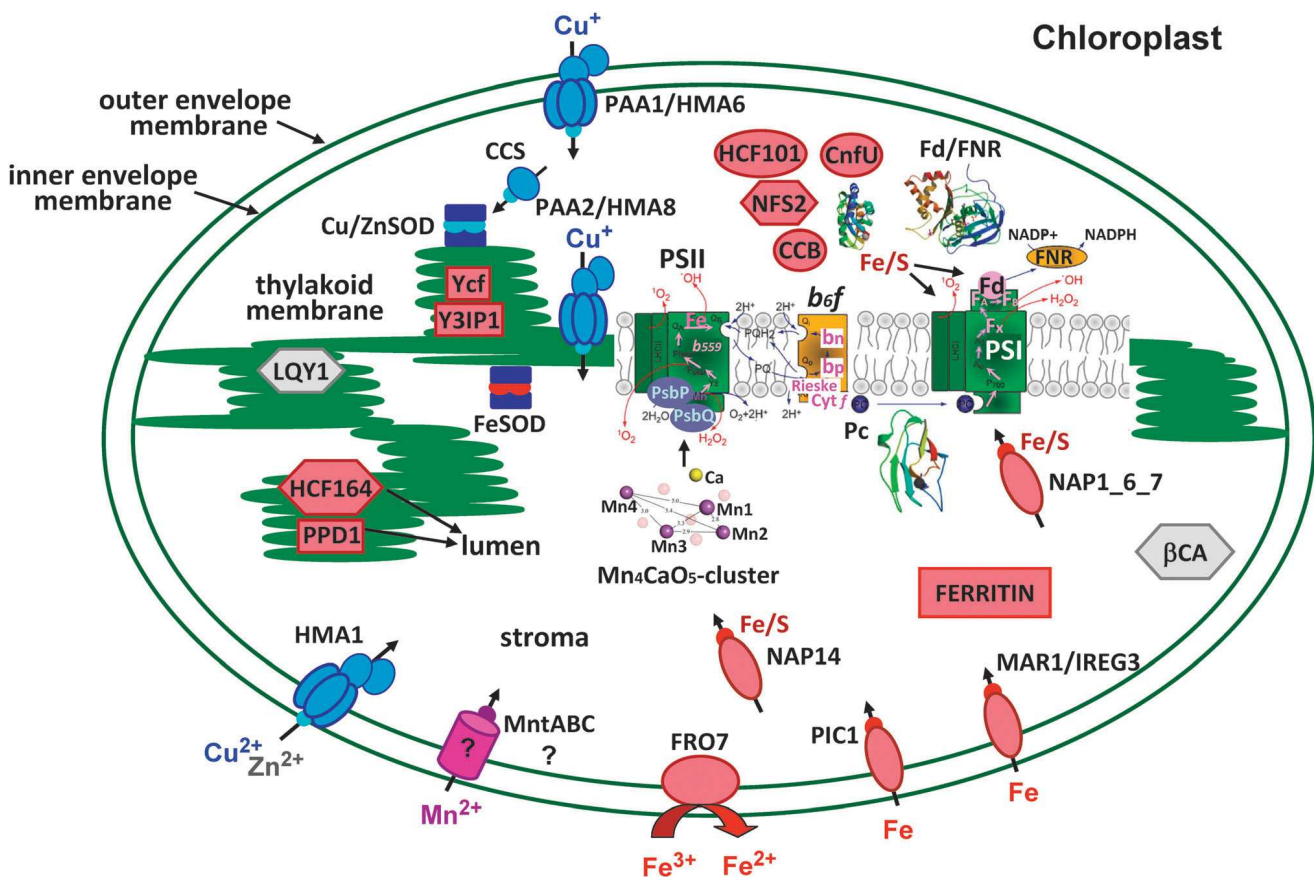
### **I. Le paradoxe des métaux**

Du fait de leur autotrophie, les végétaux chlorophylliens représentent le socle des réseaux trophiques conditionnant les écosystèmes auxquels ils appartiennent. Les végétaux sont totalement tributaires de leur environnement et des ressources minérales du sol en raison de leur incapacité à se mouvoir. Certains minéraux sont indispensables, en plus ou moins grande quantité, au développement des végétaux ; on distingue ainsi les macroéléments (azote (N), potassium (K), calcium (Ca), phosphate (P), magnésium (Mg)...), des microéléments (fer (Fe), zinc (Zn), chlore (Cl), bore (Bo), cuivre (Cu), molybdène (Mo), cobalt, (Co), nickel (Ni)...) qui regroupent essentiellement des métaux de transition. Malgré le fait que les métaux de transition possèdent des fonctions biologiques essentielles, ils peuvent également s'avérer être néfastes pour les plantes lorsqu'ils sont présents en trop fortes concentrations. D'autres métaux n'assurant, en revanche, aucune fonction vitale aux végétaux, peuvent même s'avérer être toxiques à faibles concentrations. C'est le cas de l'arsenic (As), du plomb (Pb), du mercure (Hg) et du cadmium (Cd).

#### *A) Les rôles des métaux de transition chez les plantes*

Ces éléments situés dans le bloc d du tableau périodique possèdent des propriétés physico-chimiques nécessaires à la réalisation de nombreux processus biochimiques. En effet, du fait de leur sous-couche d incomplète, le Fe, le Mn, le Cu, le Ni et le Co possèdent des électrons non appariés qui favorisent leurs implications dans des réactions d'oxydoréduction nécessaires à la réalisation de processus biologiques. Souvent associé aux métaux de transition, le Zn ne présente pourtant pas d'électron non apparié, mais ses deux charges positives et son petit rayon ionique font de cet acide de Lewis un ion métallique réactif. Le fait qu'un tiers des protéines caractérisées structurellement sont des métalloprotéines souligne l'importance des métaux dans les processus biologiques (Finney et O'Halloran, 2003). Le nombre de familles de protéines utilisant des métaux de transition varient entre 300 pour le Zn à moins de dix pour le Ni (Zhang et Gladyshev, 2009). Ces protéines sont bien souvent des enzymes chez lesquelles la fixation d'ions métalliques est essentielle pour leurs activités. Les





**Figure 1** : Schéma de l'homéostasie des métaux dans le chloroplaste présentant les principales metalloprotéines impliquées dans la photosynthèse.

Les protéines associées au Cu (bleu), au Fe (rose foncé), au Mn (violet) et Zn (gris clair) sont différenciées par des couleurs. Les flèches indiquent les directions proposées des transports de métaux. Les structures 3D des complexes Fd-FNR (pdb 1FNB), Pc (pdb 1AG6), Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> (pdb 4IL6) et CNFU (pdb 2Z51) sont affichées. Les atomes de Fe utilisés en tant que cofacteurs dans les complexes PSII, PSI et cyt b<sub>6</sub>f sont marqués en rose. Les protéines nécessitant des clusters Fe/S sont représentées par des rectangles. Les protéines d'assemblages sont représentées par des cercles. Les enzymes sont représentées par des boîtes tronquées. CA: l'anhydrase carbonique, CCB: protéine d'assemblage du cofacteur de la sous-unité B du complexe C, CCS: protéine chaperon du cuivre pour la Cu/Zn superoxyde dismutase, CNFU: NIFU-like protéine, Cyt: cytochrome, Fd: ferrédoxine, FNR: ferrédoxine NADP (H) réductase, FRO: oxydase réductase ferrique, HCF: High chlorophyll fluorescence, HMA: heavy metal P-type ATPase, MAR1/IREG3: multiple antibiotic resistance1/iron-regulated protein 3, NAP: non-intrinsic ABC protein, NFS: Nifs-like cysteine desulfurase, PAA: P-type ATPase of Arabidopsis, Pc: plastocyanin, PIC: permease in chloroplasts, PPD: PsbP-domain protein, SOD: superoxide dismutase, Ycf: Hypothetical Chloroplast Reading Frame, Y3IP: Ycf3-Interacting Protein (Yruela, 2013).

métaux sont également des composants de groupements prosthétiques et de protéines de transfert d'électrons. Chez les plantes, leurs fonctions sont généralement associées aux chloroplastes, aux mitochondries et à l'appareil de golgi. Ainsi, le Fe qui est le métal de transition le plus utilisé dans les réactions biologiques (Pierre et Fontecave, 1999) est retrouvé à 90% dans les chloroplastes (Terry et Abadia, 1986). Le Mn, quant-à lui, serait principalement localisé dans le RE et l'appareil de Golgi où il est nécessaire à l'action de nombreuses enzymes (Wu *et al.*, 2002 ; Pittman, 2005 ; Marschner and Marschner, 2011). Enfin le Zn est utile dans tout les compartiments cellulaires bien qu'il apparaisse principalement stocké dans la vacuole (Lanquar *et al.*, 2010).

### **1. Les métaux dans le chloroplaste**

Dans cet organite, les métaux remplissent de nombreuses fonctions principalement au niveau des photosystèmes et de la chaîne de transport d'électrons (Carrell *et al.*, 1997). L'implication des métaux dans cet organite et les transporteurs nécessaires à leur acheminement sont présentés dans la **Figure 1**.

Le Fe est indispensable à la biosynthèse des chlorophylles. Il est essentiellement inséré dans les protéines du photosystème I sous forme de clusters 4Fe-4S (Hoj *et al.*, 1987). Il est également présent au sein de cluster 2Fe-2S dans des protéines de type Rieske et dans des ferrédoxines impliquées dans le transfert d'électrons (Balk et Lobreaux, 2005 ; Lill et Muhlenhoff, 2006). Le Fe peut aussi former un noyau hème qui sera intégré à des cytochromes (Ponka, 1999). Certaines structures protéiques contiennent différentes formes de Fe ; le cytochrome b6f par exemple intègre un ensemble d'éléments faisant intervenir à la fois des clusters 2Fe-2S et des noyaux hèmes (Yruela, 2013). Enfin, le Fe est aussi un élément très important pour la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) étant un cofacteur de la Fe-SuperOxyde Dismutase (SOD) (Asada, 1999). Cependant, il existe également une seconde SOD chloroplastique, la Cu/Zn-SOD (Palma *et al.*, 1986 ; Kurepa *et al.*, 1997).

Le Cu est donc un métal de transition important pour le chloroplaste. En plus de son rôle de cofacteur de la Cu/ZnSOD, il remplit une fonction essentielle au niveau des plastocyanines (représentant 50% du Cu cellulaire) nécessaire au transfert d'électron du complexe b6f au photosystème I (Yruela, 2013).



En plus de jouer un rôle dans le fonctionnement de la SOD, le Zn est impliqué dans le fonctionnement de l'anhydrase carbonique située dans le stroma des chloroplastes qui permet l'inter-conversion du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub>O en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> favorisant ainsi l'accès du CO<sub>2</sub> à la RuBisCO (Badger et Price, 1994). Il est également le cofacteur des protéines à doigts de zinc, telle que la disulfite isomérase nommée « Low Quantum Yield of Photosystem II\_1 (LQY1) » localisée sur la membrane thylakoïdienne. Cette dernière est impliquée dans le cycle de réparation et de remplacement du PSII–light-harvesting complex II (LHCII) soumis à d'importantes intensités lumineuses (Lu *et al.*, 2011). D'autre part, il participe au fonctionnement de métalloprotéases impliquées dans la dégradation de protéines photosynthétiques. La protéase à Zn AtFtsH6, par exemple, permet la dégradation de l'apoprotéine Lhcb3 présente au niveau de LHC du photosystème II au moment de la sénescence des feuilles (Zelisko *et al.*, 2005).

Enfin, le Mn occupe une place toute particulière au niveau des chloroplastes. Organisé en cluster de 4 atomes de Mn<sup>2+</sup> reliés à un atome de Ca<sup>2+</sup>, il est indispensable à l'oxydation de l'eau et à la production d'O<sub>2</sub> par le photosystème II (Tommos *et al.*, 1998 ; Marschner et Marschner, 2011). Il est aussi essentiel au fonctionnement de nombreuses enzymes chloroplastiques telles que la PEP carboxykinase, l'ARN polymérase, des décarboxylases et des déshydrogénases (Ness et Woolhouse, 1980 ; Burnell, 1986 ; Aggarwal *et al.*, 2010).

## **2. Les métaux dans les mitochondries**

Comme les chloroplastes, les mitochondries nécessitent du Fe hémique (cytochromes) et des clusters Fe-S (sous unités des complexes I, II et III) pour assurer le transfert d'électrons. L'aconitase, par exemple, est une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs qui contient un centre 4Fe-4S lui permettant de catalyser la réaction d'isomérisation du citrate en isocitrate (Lill et Kispal, 2000).

Les mitochondries nécessitent aussi du cuivre, indispensable aux multicuivre-oxydases comme le cytochrome C oxydase (Bleackley et MacGillivray, 2011).

Le Mn est également essentiel pour des enzymes mitochondriales notamment celles impliquées dans des réactions de décarboxylation au niveau du cycle de Krebs (Marschner et Marschner, 2011). De plus, bien qu'également présente au niveau des peroxysomes, la Mn-SOD impliquée dans la dégradation des molécules oxydatives est majoritairement retrouvée dans les mitochondries (Horsburgh *et al.*, 2002 ; Marschner et Marschner, 2011).



### 3. Les métaux dans le reste de la cellule

Les métaux remplissent aussi des fonctions dans le reste de la cellule. Dans le cytosol et les peroxysomes, le Fe hémique est utilisé par les catalases afin de réaliser la dismutation du peroxyde d'hydrogène généralement produit après détoxification de l'anion superoxyde par la SOD (Mhamdi *et al.*, 2010). De la même façon, les peroxydases, localisées sur la membrane plasmique, le tonoplaste, la membrane des mitochondries et la paroi sont également dépendantes d'un noyau hème pour catalyser la décomposition des composés peroxydes toxiques. Enfin, les ribonucléotides nucléases (Eklund *et al.*, 2001) et la SOD dépendante du Fe également retrouvée dans le cytoplasme, nécessitent la fixation d'un atome de Fe pour leurs fonctions (Sairam et Srivastava, 2002).

D'après les données obtenues chez la levure, le Mn apparait également important dans le Golgi où il est impliqué dans le fonctionnement de glycosyltransférases telle que la Mannosyltransférase qui catalyse la réaction de N-glycosylation des invertases (Luk et Culotta, 2001).

Dans le cytosol, le Cu est aussi requis pour l'assimilation de l'azote *via* la nitrate réductase qui nécessite un centre cuivre en plus de Fe et du Mo (MacPherson et Murphy, 2007).

Enfin, au niveau du noyau, le Zn joue un rôle important au travers les protéines à doigts de zinc impliquées dans la régulation transcriptionnelle par liaison à l'ADN (Bleackley et MacGillivray, 2011).

#### B) *La toxicité des métaux*

Les études de toxicité des métaux chez les plantes ont principalement été menées sur le Cd en raison de son importante absorption par l'Homme *via* le tabagisme et l'alimentation (Thévenod, 2009) et du fait de ses nombreux effets préjudiciables pour la santé humaine (Nordberg, 2009 ; Clemens *et al.*, 2012). Ces études ont mis évidence une multitude d'effets néfastes pour le développement des végétaux, soulignant la complexité du mode d'action des éléments non essentiels.



**Figure 2** : La toxicité des ETM chez les végétaux.

**a**: Développement d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de carence en cuivre (gauche, pas de cuivre ajouté), en excès de cuivre (milieu, 1,5 $\mu$ M de Cuivre) et en conditions contrôle (droite, 0,5  $\mu$ M Cu). Image obtenue à partir du site web du laboratoire de Ute Kramer ([http://www.ruhr-uni-bochum.de/pflaphy/Seiten\\_en/PG\\_Kraemer\\_e.html#MHN](http://www.ruhr-uni-bochum.de/pflaphy/Seiten_en/PG_Kraemer_e.html#MHN)).

**b**: Nécroses observées au niveau de feuilles de moutarde poussant sur un sol enrichi avec 100 mg Cd/kg (Umar *et al.*, 2008).

Néanmoins, l'altération de la croissance et de la biomasse des plantes au niveau racinaire et foliaire a été démontrée pour différents métaux (Cd, Pb, Zn, Cr) et différentes espèces végétales (Silverberg, 1976 ; Punz et Sieghardt, 1993 ; Gussarsson *et al.*, 1996 ; Larbi *et al.*, 2002 ; Rout et Das, 2003 ; Ghnaya *et al.*, 2005 ; Vernay *et al.*, 2007 ; Zorrig *et al.*, 2010 ; **Figure 2**). Ces diminutions de croissance des plantes en présence de métaux non essentiels (Cd) ou d'excès de métaux essentiels (Zn) sont liées, d'une part à l'altération du statut hydrique (Kastori *et al.*, 1992 ; Sandalio *et al.*, 2001 ; Vernay *et al.*, 2007) et d'autre part à la perturbation de l'alimentation minérale (Das *et al.*, 1997 ; Vernay *et al.*, 2007 ; Sagardoy *et al.*, 2009). Bien souvent, ces désorganisations s'accompagnent de l'induction d'un stress oxydatif (Clemens, 2006).

### **1. Toxicité des métaux sur le statut hydrique**

En concentrations toxiques, les métaux modifient l'absorption et le transport de l'eau ainsi que la transpiration (Barcelo *et al.*, 1986 ; Schlegel *et al.*, 1987 ; Costa *et al.*, 1994 ; Vassilev et Yordanov, 1997 ; Benavides *et al.*, 2005). Ces diminutions peuvent être en partie attribuées à la diminution du nombre et du diamètre des vaisseaux du xylème observée chez le haricot exposé au Cd (Barcelo *et al.*, 1988). Elles peuvent également être liées à la fermeture des stomates qui a été observée chez le ray-grass anglais soumis au Cd, chez le haricot soumis à un excès de Zn et chez le tournesol soumis au Ni, au Cd et au Pb (Bazzaz *et al.*, 1974 ; Rauser et Dumbroff, 1981 ; Vernay *et al.*, 2007). Cette fermeture des stomates est responsable d'une diminution des échanges gazeux réduisant la fixation de carbone (Polle et Schutzenbeutel, 2004 ; Vernay *et al.*, 2007). En se basant sur le fait que la première protéine de transport de Cd identifiée était un canal calcique (Clemens *et al.*, 1998), il a été suggéré que la fermeture des stomates, essentiellement régie par des flux calciques dans des conditions normales, pourrait être due à un influx de Cd dans les cellules de garde (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002). Cependant l'augmentation des concentrations en acide abscissique (ABA), observée en présence de Cd ou d'un excès de Zn (Rauser et Dumbroff, 1981 ; Atici *et al.*, 2005), suggère que les métaux pourraient également agir de façon indirecte en produisant un stress hydrique aboutissant à la fermeture stomatique *via* la voie ABA dépendante (Polle et Schutzenbeutel, 2004).





## **2. Toxicité des métaux sur la nutrition minérale**

En concentration toxique, les métaux altèrent aussi bien l'absorption, le transport et l'assimilation du  $K^+$ , du  $Ca^{2+}$ , du  $NO_3^-$  et des microéléments ainsi que l'ensemble des métabolismes azoté et carboné (Gussarsson *et al.*, 1996 ; Polle et Schutzendubel, 2004 ; Clemens, 2006 ; Guo *et al.*, 2007 ; Vernay *et al.*, 2007 ; DalCorso *et al.*, 2008 ; Zorrig *et al.*, 2010).

Les troubles de l'homéostasie des microéléments observés chez les plantes soumises aux stress métalliques, ont pour principales causes des phénomènes de compétitions. En effet, les plantes sont adaptées à un environnement donné ; elles ont développé des systèmes d'acquisition des métaux, des transporteurs et des enzymes fonctionnant suivant des gammes de concentrations déterminées. Les transporteurs étant rarement spécifiques d'un seul métal, la modification de concentration d'un ou plusieurs éléments peut ainsi inhiber l'absorption et le transport d'un métal au profit d'un autre métal structurellement proche (Das *et al.*, 1997). Les cas extrêmes proviennent des métaux non essentiels qui ne possèdent généralement pas de système de transport spécifique. Leur déplacement s'effectue donc au travers des protéines impliquées normalement dans le transport de cations essentiels comme les canaux calciques et les transporteurs de Zn, de Fe en ce qui concerne le Cd (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002 ; Clemens, 2006 ; Thomine et Vert, 2013). Depuis la découverte chez le blé de LCT1, première protéine identifiée comme impliquée dans le transport de Cd (Clemens *et al.*, 1998), beaucoup d'autres transporteurs se sont vu également associés au transport de métaux non-essentiels comme AtIRT1 pour le Ni et le Cd (Vert *et al.*, 2002 ; Nishida *et al.*, 2011), AtHMA3 pour le Pb et le Cd (Gravot *et al.*, 2004), OsHMA3 pour le Cd (Miyadate *et al.*, 2011), les AtNRAMP1/3/4/6 pour le Cd (Thomine *et al.*, 2000 ; Cailliatte *et al.*, 2009 ; Cailliatte *et al.*, 2010), OsNRAMP5 (Sasaki *et al.*, 2012) pour le Cd et OsLCT1 pour le Cd (Uraguchi *et al.*, 2011).

Ces phénomènes de compétition peuvent également avoir lieu au niveau de métalloprotéines ou de groupements prosthétiques notamment en présence de groupements sulfhydryles qui possèdent de fortes affinités pour les métaux (Nieboer et Richardson, 1980 ; De Filippis et Pallaghy, 1994). Ainsi, il a été observé que l'activité des facteurs de transcription à doigts de zinc est altérée par la substitution de l'ion  $Zn^{2+}$  par l'ion  $Cd^{2+}$ , interférant avec le mécanisme de transcription (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999). Ces effets de compétition jouent également un rôle dans la génotoxicité engendrée par les métaux.



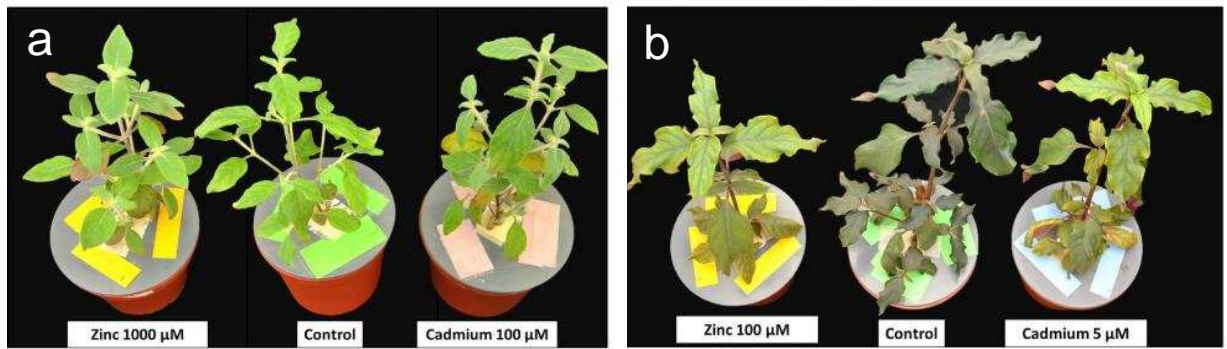
En effet, il a été montré que la condensation de la chromatine observée chez des cellules traitées au Ni était liée à une compétition avec le Mg (Lee *et al.*, 1995).

Les perturbations de la nutrition minérale liées à la toxicité des métaux altèrent également la photosynthèse. Du fait des compétitions évoquées ci-dessus, le Cd bouleverse les métabolismes associés au Fe, au Zn et au Ca indispensables au bon déroulement de la photosynthèse (Clemens, 2006). Ainsi le double mutant *nramp3nramp4* d'*Arabidopsis thaliana*, incapable de fournir correctement le chloroplaste en métaux essentiels à partir de la vacuole, apparaît hypersensible au Cd et présente une altération de l'efficacité de ses photosystèmes en présence de Cd (Molins *et al.*, 2013). Des études ont montré que le Cu et le Ni bloquent le transfert de Fe des racines vers les parties aériennes provoquant une déficience au niveau des parties aériennes de cet élément indispensable à la synthèse des chlorophylles (Foy *et al.*, 1978).

### **3. Toxicité des métaux via le stress oxydatif**

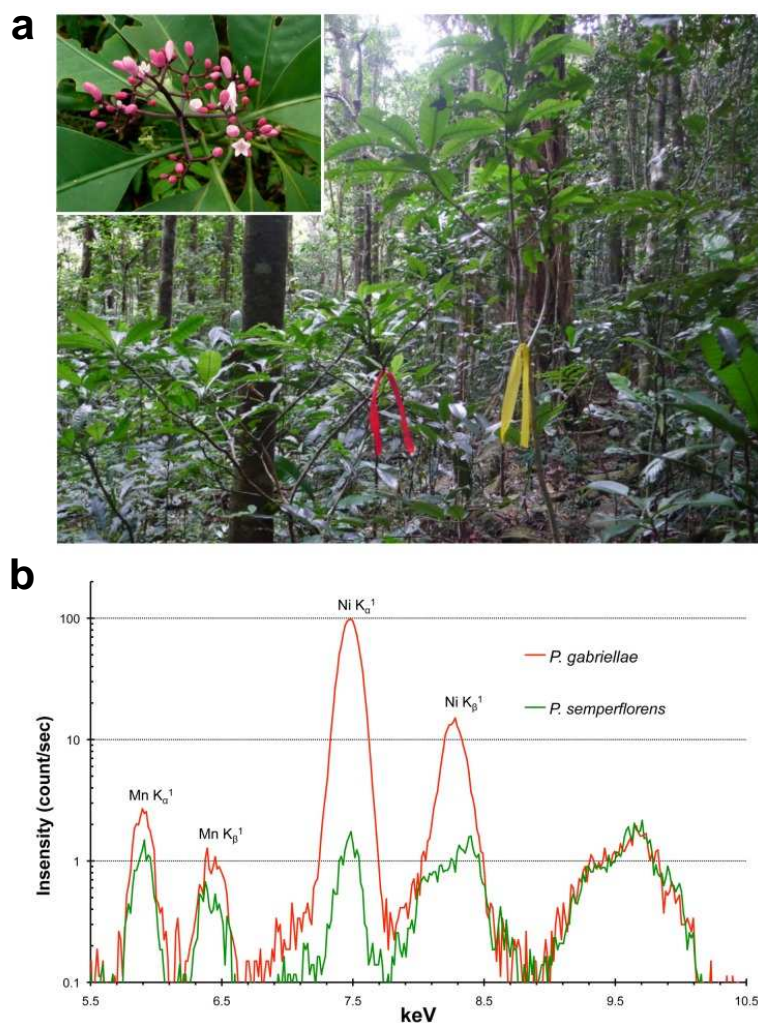
Paradoxalement, les particularités physico-chimiques qui font des métaux de transition des éléments essentiels pour la cellule, font également d'eux des éléments nuisibles responsables de dommages cellulaires *via* la production de ROS (Gallego *et al.*, 1996 ; Mazhoudi *et al.*, 1997 ; Yamamoto *et al.*, 1997).

Au niveau cellulaire, de nombreuses enzymes sont capables de réduire l' $O_2$  en anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Hell et Stephan, 2003). De plus, la dismutation spontanée ou catalysée de l' $O_2^{\cdot-}$  provoque également la production d' $H_2O_2$ . Ces deux molécules contribuent à la formation du radical  $OH^\circ$  extrêmement réactif, *via* la réaction de Haber-Weiss (Leeuwenburgh et Heinecke, 2001), qui est catalysée par les métaux de transition redox-actifs dans les conditions cellulaires (couples  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}/Cu^+$ ) (Schutzendubel et Polle, 2002). L'excès de Fe et de Cu provoque donc une augmentation des ROS associés à une diminution des enzymes anti-oxydatives (Schutzendubel et Polle, 2002). Cette observation est également valable pour le Ni, de Zn et de Cd qui ne participent pourtant pas à la production de radical  $OH^\circ$  par la réaction de Haber-Weiss mais qui pourraient provoquer une augmentation générale de ROS par diminution de l'efficacité des mécanismes de défenses (Prasad *et al.*, 1999 ; Madhava Rao et Sresty, 2000). En effet, l'exposition à des concentrations toxiques de métaux provoque une diminution de la quantité de glutathion réduit. Celle-ci pourrait être due à la liaison des métaux au groupement sulfhydryle du



**Figure 3** : tolérance et toxicité aux ETM chez Gomphrena.

*Gomphrena clausenii* hyperaccumulateur de métaux (a) et *Gomphrena elegans* non hyperaccumulateur (b) poussant en solution hydroponique contrôlée et polluée aux ETM (Carvalho et al., 2013).



**Figure 4** : *Psychotria gabriellae* et *Psychotria semperflorens*.

L'hyperaccumulateur de Ni *P. gabriellae* (marqué en rouge) et le non-accumulateur *P. semperflorens* (marqué en jaune) vivent en sympatrie sur un sol ultramafique dans une forêt de Nouvelle Calédonie (a). En condition naturelle, *P. gabriellae* accumule jusqu'à 4% de Ni dans ses feuilles alors que *P. semperflorens* accumule environ 100 fois moins de Ni. Ces différences peuvent être visualisées par leur spectre XRF (b) (Jaffré et al., 2013).

glutathion ou au fait que le glutathion est essentiel à la synthèse de phytochélatines impliquées dans la complexation et la compartimentation vacuolaire des métaux (Schutzendubel et Polle, 2002).

L'augmentation générale des concentrations en ROS aboutit fatalement à l'augmentation des quantités du radical  $\text{OH}^\circ$ , responsable de la dénaturation de protéines et de l'ADN ainsi que la peroxydation en chaîne des lipides. Le stress oxydatif associé aux métaux est donc un élément majeur de la génotoxicité et des altérations des membranes nucléaires et chloroplastiques (Rout et Das, 2003 ; Baszynski *et al.*, 1988).

### C) Les plantes tolérantes aux fortes concentrations en métaux

Les plantes tolèrent les concentrations toxiques en ETM suivant deux stratégies différentes. Pour survivre sur ces sols hostiles, les plantes dites excluantes possèdent des mécanismes permettant de limiter l'absorption des métaux, de les séquestrer au niveau du système racinaire et de les extruder dans le milieu extérieur (Baker, 1981).

Adoptant une stratégie opposée, les plantes hyperaccumulatrices accumulent au contraire les métaux dans leurs tissus aériens par stimulation de leur absorption et de leur translocation. Ces plantes ont également développé des mécanismes de détoxification des métaux par complexation et compartimentation (Baker, 1987). De ce fait, ces espèces hyperaccumulatrices sont capables de concentrer cent fois plus les ETM que les espèces non accumulatrices. Au total, environ 500 espèces de plantes hyperaccumulatrices ont été recensées à ce jour, principalement au sein des Brassicacées (Baker, 1981 ; Reeves et Baker, 2000). Cependant, une grande majorité accumule spécifiquement le Ni (Krämer, 2010), à l'image de la première espèce hypernickelophore découverte, nommée *Alyssum bertolonii* (Minguzzi et Vergnano, 1948). Néanmoins d'autres espèces sont capables d'accumuler un spectre plus large de métaux comme c'est le cas des deux plantes « modèles » de l'hyperaccumulation *Arabidopsis halleri* ou *Noccaea caerulescens*. Par exemple, *Noccaea caerulescens* peut accumuler plus de 3% de Zn, 0.5% de Pb et 0.1% de Cd dans ses parties aériennes (Baker *et al.*, 1991 ; Brown *et al.*, 1994). Dans le sud de la France, il a même été observé que l'accumulation de Cd dans les feuilles de cette espèce peut dépasser les 0,3% de matière sèche (Robinson *et al.*, 1998 ; Roosens *et al.*, 2003). D'autres espèces hyperaccumulatrices, comme *Psychotria gabriellae* (Ni) ou *Gomphrena claussenii* (Zn/Cd) encore peu étudiées pourraient posséder des capacités d'hyperaccumulation égales ou même supérieures (Jaffré *et al.*, 2013 ; T. Villafort Carvalho *et al.*, 2013 ; **Figures 3 et 4**).



## II. Des protéines de transport nécessaires à l'homéostasie des métaux

Chez les végétaux, la disponibilité des métaux est contrôlée par deux types de protéines ; les chélateurs et les protéines de transport membranaire.

Les métaux peuvent être chélatés par des petites protéines (métallothionéines), des peptides (glutathion, phytochélatines), des acides aminés (histidine, proline), des dérivés d'acides aminés (nicotianamine, phytosidérophores) ou des acides organiques (citrate, malate, oxalate) (Foy *et al.*, 1978 ; Takagi *et al.*, 1984 ; Grill *et al.*, 1985 ; Grill *et al.*, 1989 ; Von Wirén *et al.*, 1999 ; Cobbett et Goldsbrough, 2002). Ils sont capables de se complexer aux ions métalliques permettant ainsi de les mobiliser, de contrôler leur compartimentation et d'empêcher leur interaction avec les constituants biologiques. Contrairement aux protéines de transport membranaire, ces chélateurs ne seront pas étudiés au cours de cette thèse. Ils ne feront donc pas l'objet d'une analyse bibliographique détaillée.

### A) Généralité sur le transport membranaire

Les membranes biologiques représentent des barrières sélectives bloquant les flux aqueux. Bien que des « diffusions simples » puissent avoir lieu par mouvements de molécules au travers la bicouche lipidique et qu'il existe également des transports médiés par des vésicules membranaires (endocytose, exocytose, phagocytose), le transfert sélectif des molécules au travers de ces membranes est principalement assuré par des protéines. Certaines comme les canaux et les perméases peuvent assurer le transport de façon passive. D'autres au contraire, nécessitent un apport d'énergie ; ce sont les transporteurs actifs. Cet apport peut s'effectuer de deux façons. Il peut être réalisé de façon directe par hydrolyse de nucléosides triphosphates au niveau du transporteur ; on parle alors de transporteurs actifs primaires ou de pompes. Il peut également être réalisé de façon indirecte par utilisation de l'énergie issue d'une différence de potentiel électrochimique liée par exemple à un gradient de concentration de sodium ou de proton ; on parle dans ce cas de transporteurs actifs secondaires. De ce fait, le transporteur est en réalité un co-transporteur nommé symporteur si les deux substrats sont transportés dans le même sens et antiporteur s'ils sont transportés dans des directions opposées. Chez les végétaux, le principal gradient permettant le fonctionnement des transporteurs actifs secondaires correspond à une différence de concentration de protons. Des pompes à protons de types  $H^+$ -ATPase et  $H^+$ -PPase permettent ainsi d'énergiser les





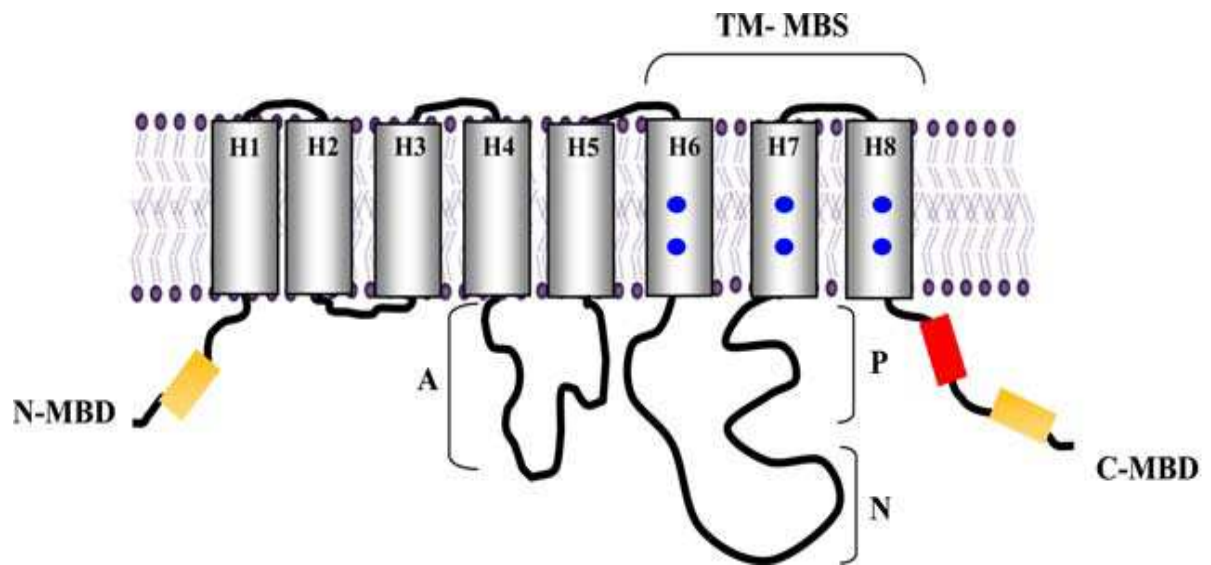
membranes des cellules (Palmgren, 2001 ; Gaxiola *et al.*, 2007). Par ailleurs, il est à noter qu'en raison de leur forte réactivité, les métaux sont le plus souvent complexés à des chélateurs et des protéines chaperonnes. La faible proportion de métaux présents à l'état libre de part et d'autre d'une membrane biologique ne permet pas, contrairement aux protons, la création de gradients susceptibles de jouer un rôle dans le fonctionnement des systèmes de transport.

### B) *Les principales familles de transporteurs de métaux*

Le transport de métaux à travers les membranes plasmiques est assuré par un grand nombre de protéines dont les principales familles sont les suivantes :

- Les ATP-Binding Cassette (ABC)\*
  - Multidrug Resistance-associated Proteins (MRP)
  - ABC Transporters of the Mitochondria (ATM)
  - Pleiotropic Drug Resistance (PDR)
- Les Heavy Metal P-type ATPase (HMA)
- Les Cation Diffusion Facilitators (CDF)
- Les ZRT IRT-like Proteins (ZIP)
- Les Natural Resistant Associated Macrophage Proteins (NRAMP)
- Les Iron-Regulated Proteins ou Ferroportins (IREG)
- Les Vacuolar Iron Transporters (VIT)
- Les COPper Transporters (COPT)
- Les Ca<sup>2+</sup> sensitive Cross Complementer 1 (CCC1)
- Les CAtion eXchangers (CAX)
- Les OligoPeptide Transporters (OPT)

Parmi ces familles, la famille des OligoPeptide Transporters (OPT) n'est retrouvée que chez les champignons, les bactéries, les archaebactéries et les plantes. Elle contient une sous-famille de protéines impliquées dans le transport à long distance des métaux chélatés aux nicotianamines : les Yellow-Stripe 1-Like (YSL) (Yen *et al.*, 2001 ; Curie *et al.*, 2009). Cependant, au cours de cette thèse, seuls les HMA, les ZIP et les NRAMP sont abordés. De ce fait seules ces deux familles feront l'objet d'une description détaillée ci-après.



**Figure 5** : Schéma illustrant la topologie et les principaux domaines présents chez les pompes P1B-ATPases.

Les segments transmembranaires H1 à H8 sont présentés sur la figure. Les localisations approximatives des domaines cytosoliques du A-domaine impliqué dans la transduction de l'énergie (A), du domaine de phosphorylation (P) et du domaine de fixation aux nucléotides (N) sont représentés sur la figure. Les acides aminés conservés au niveau des segments H6, H7 et H8 formant les sites transmembranaires de fixations aux (TM-MBS) sont symbolisés par des points bleus. Les extrémités N-term et C-term impliquées dans la fixation aux métaux (MBDs) sont représentés en jaunes et en rouge (Argüello, *et al.*, 2007).

### 1. Les Heavy Metal P-type ATPase (HMA)

Les HMA correspondent aux P1B-types P-type ATPase, une des cinq familles appartenant à la superfamille des P-Type ATPase (Axelsen et Palmgren, 2001). Ces transporteurs possèdent 6 à 8 domaines transmembranaires et présentent des extrémités N-term et C-term cytosoliques où sont localisés des domaines putatifs de liaisons aux métaux ainsi qu'une large boucle cytoplasmique où se situent les domaines de liaison à l'ATP (N) et de phosphorylation (P) (Williams et Mills, 2005 ; Argüello *et al.*, 2007 ; **Figure 5**). Ces pompes utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les métaux hors du cytoplasme. Elles possèdent également un domaine A de transduction de l'énergie ainsi que des domaines de liaisons aux métaux (MBD) (Argüello *et al.*, 2007).

Au nombre de huit chez *Arabidopsis thaliana*, les HMA sont divisés en deux groupes aux substrats différents ; les HMA 1 à 4 sont impliqués dans le transport des cations bivalents ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) et les HMA 5 à 8 sont impliqués dans le transport de cations monovalents ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ) (Williams et Mills, 2005).

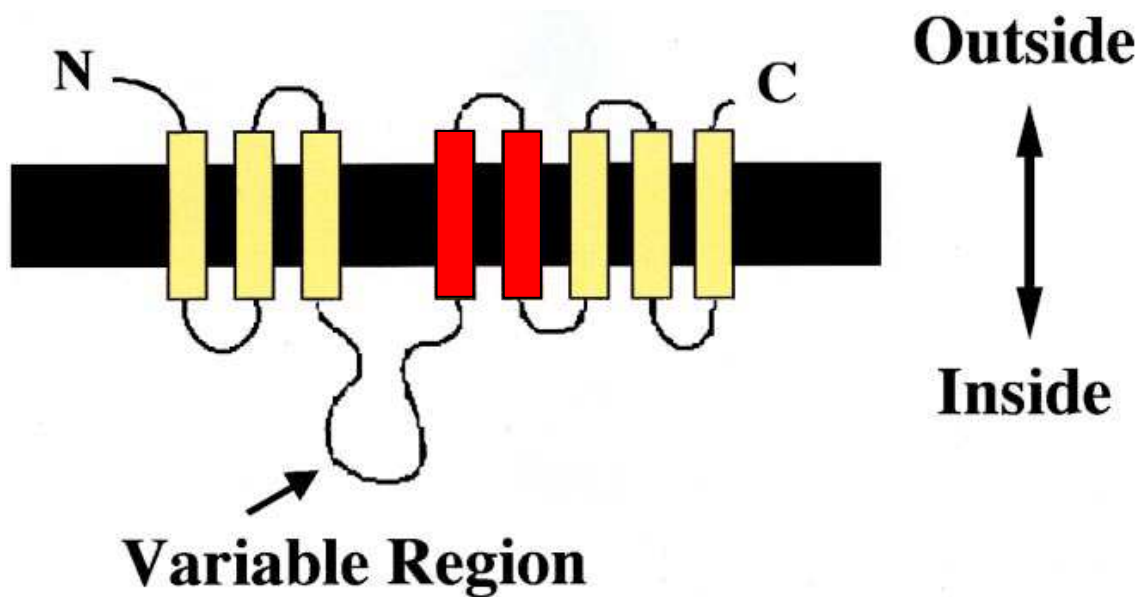
HMA1 et HMA6 (PAA1) sont tout les deux localisés au niveau de l'enveloppe des chloroplastes et permettent le transport de Cu dans cet organite (Shikanai *et al.*, 2003 ; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Cependant, HMA1 apparaît également capable de transporter le Ca, le Cd, le Zn et le Co en levure et contribue à la tolérance au Zn (Moreno *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2009). HMA8 (PAA2) est localisé sur la membrane des thylakoïdes (Abdel-Ghany *et al.*, 2005 ; Bernal *et al.*, 2007). Alors que l'acheminement du Cu à la SOD active dans le stroma des chloroplastes, apparaît dépendant à la fois de HMA1 et HMA6 (Abdel-Ghany *et al.*, 2005 ; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006), la fourniture du Cu aux plastocyanines localisées dans les thylakoïdes ne dépend pas de HMA1 mais requière HMA6 et HMA8 (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). HMA5, quant-à lui, est un transporteur de Cu principalement exprimé au niveau des racines. Il est impliqué dans la tolérance au Cu et permettrait le chargement du xylème (Andrés-Colás *et al.*, 2006). Enfin, HMA7 est nécessaire à l'apport de Cu au récepteur d'éthylène ETR1 (Hirayama *et al.*, 1999) ainsi qu'à d'autres enzymes dépendantes du Cu (Woeste et Kieber, 2000).



Les HMA impliqués dans le transport de cations divalents ont également fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. La caractérisation en levures et en plantes d'HMA3 a mis en évidence l'implication de ce transporteur dans la séquestration vacuolaire du Cd, du Pb, du Co et potentiellement du Zn chez *Arabidopsis thaliana* (Gravot *et al.*, 2004 ; Morel *et al.*, 2009). Des analyses de séquences du locus *HMA3* ont montré un polymorphisme entre des accessions d'*Arabidopsis thaliana*, se traduisant par la non fonctionnalisation de l'allèle chez l'accession Colombia 0 (Hussain *et al.*, 2004). Récemment, une approche de génétique classique a révélé qu'HMA3, essentiellement exprimé au niveau des racines est un acteur essentiel de l'accumulation du Cd chez *Arabidopsis thaliana* (Chao *et al.*, 2012). De façon similaire, son orthologue chez le riz, a d'ailleurs été identifié comme le QTL d'accumulation du Cd dans les parties aériennes (Miyadate *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données obtenues chez *Arabidopsis thaliana* et le riz montrent qu'HMA3 empêche la translocation du Cd vers les parties aériennes par séquestration vacuolaire au niveau des racines (Miyadate *et al.*, 2011 ; Chao *et al.*, 2012).

Une étude comparative d'expression de gènes a montré que chez *Arabidopsis halleri*, *HMA3* est cent fois plus exprimé que chez *Arabidopsis thaliana*, lui suggérant également un rôle dans la séquestration et la détoxification des métaux chez les hyperaccumulateurs. Néanmoins, chez *A. halleri*, *HMA3* semble impliqué dans la détoxification du Zn et non pas du Cd (Becher *et al.*, 2004).

Enfin, les études physiologiques des mutants *hma2*, *hma4* et *hma2hma4*, et du sur-expresser d'*HMA4*, ont mis en évidence l'implication des protéines correspondantes dans la tolérance au Zn, Cd et Co (Hussain *et al.*, 2004 ; Verret *et al.*, 2004). Ces deux transporteurs exprimés au niveau des tissus conducteurs du xylème et du phloème et localisés sur la membrane plasmique, se sont avérés être les contributeurs majeurs de la translocation du Zn et du Cd des racines vers les parties aériennes (Hussain *et al.*, 2004 ; Verret *et al.*, 2004 ; Wong et Cobbett, 2009). Chez la plante hyperaccumulatrice *A. halleri*, il a été montré qu'AhHMA4 joue un rôle essentiel dans l'hyperaccumulation du Zn ainsi que dans la tolérance au Zn et au Cd (Hanikenne *et al.*, 2008). En effet, le chargement du xylème en Zn au niveau des racines d'*A. halleri* se trouve stimulé par la forte expression transcriptionnelle d'*HMA4* liée aux éléments *cis* spécifiques de son promoteur et à l'augmentation du nombre de copie de sa séquence génomique (trois chez *A. halleri* contre un seul chez *A. thaliana*) (Hanikenne *et al.*, 2008). Une étude de polymorphisme de séquences, réalisée au niveau du



**Figure 6** : Schéma illustrant la topologie des transporteurs ZIP.

Les ZIP comptent six à huit segments transmembranaires suivant les prédictions. Les deux segments transmembranaires indiqués en rouge pourraient n'être présents que dans la sous famille ZIPI/II. Les ZIP possèdent également une région cytoplasmique variable, riche en histidine, entre le segment 3 et le segment 4 (Guerinot *et al.*, 2000; Mathews *et al.*, 2005).

tandem d'*HMA4* d'*A. halleri*, a récemment mis en évidence l'importante pression de sélection positive exercée sur ce locus gouvernant l'adaptation de cette espèce (Hanikenne *et al.*, 2013). *Noccaea caerulescens*, un autre hyperaccumulateur de Zn et de Cd, présente une forte expression d'*HMA4* associée à une augmentation du nombre de copies de ce gène, indiquant que la multiplication des séquences d'*HMA4* est apparue indépendamment chez deux espèces de Brassicacées (Lochlainn *et al.*, 2011). Enfin, la variabilité de tolérance et d'accumulation du Cd a récemment été étudiée au sein de différentes populations de *Noccaea caerulescens*. Au cours de cette étude, il est apparu que le nombre de gènes *HMA4* n'est, en fait, pas fixé au sein de l'espèce et que les populations qui présentent les plus importantes capacités d'absorption, de translocation, d'accumulation et de tolérance du Cd sont celles qui possèdent les quatre copies de ce gène (Craciun *et al.*, 2012). L'ensemble de ces travaux montrent l'importance d'*HMA4* dans le mécanisme d'hyperaccumulation du Zn et du Cd.

## **2. Les ZRT-IRT-like Proteins (ZIP)**

Les ZIP constituent une large famille de transporteurs de cations comprenant entre 16 et 20 membres chez les angiospermes (Migeon *et al.*, 2010 ; **Figure 6**). Cette famille comprend l'ensemble des homologues de séquences des ZRT (Zinc-Regulated Transporter) de levure et des IRT (Iron-Regulated Transporter) d'*Arabidopsis thaliana* (Guerinot, 2000) répartis en deux sous familles ; la LIV-1 et la ZIP/II (Mathews *et al.*, 2005).

Ces transporteurs conservés chez les bactéries, les levures, les plantes et les mammifères, sont impliqués dans l'influx de métaux vers le cytoplasme et se caractérisent par des extrémités N-term et C-term extracytoplasmiques ainsi que par six ou huit domaines transmembranaires suivant les prédictions (Guerinot, 2000; Mathews *et al.*, 2005). Ils contiennent une boucle cytoplasmique variable, généralement riche en résidus histidines entre les domaines transmembranaires III et IV, probablement impliquée dans la fixation des métaux. (Colangelo et Guerinot, 2006). A coté de cette boucle se situe une séquence consensus essentiellement conservée dans la sous-famille LIV-1 et qui pourrait comporter deux domaines transmembranaires notamment dans la sous-famille ZIP/II (Mathews *et al.*, 2005). La taille de ces protéines varie de 309 à 476 acides aminés en fonction de la longueur de la région variable (Migeon *et al.*, 2010).





Chez la levure, cette famille est constituée de trois membres. ZRT1 et ZRT2 sont deux transporteurs de Zn respectivement à forte et faible affinités, localisés sur la membrane plasmique et permettant ainsi l'entrée de Zn dans le cytoplasme (Zhao et Eide, 1996b ; MacDiarmid *et al.*, 2002). Le troisième membre ZRT3 est localisé sur la membrane de la vacuole où il est impliqué dans le déstockage du Zn (MacDiarmid *et al.*, 2002).

Chez *Arabidopsis thaliana*, IRT1 a été le premier ZIP à avoir été identifié et caractérisé par expression en levure déficiente pour le transport de Fe. Ce transporteur régulé transcriptionnellement par le Fe, le Zn et le Cd (Eide *et al.*, 1996 ; Connolly *et al.*, 2002) possède un large spectre de substrats incluant le Fe, le Mn, le Zn, le Cd et le Ni (Korshunova *et al.*, 1999 ; Rogers *et al.*, 2000 ; Nishida *et al.*, 2011). Il a cependant été démontré que la fonction principale de ce transporteur est l'absorption racinaire du Fe dont il est l'acteur central chez les non-graminées (Vert *et al.*, 2002). Des études pharmacologiques ont récemment montré l'existence d'un mécanisme de régulation complexe de la localisation d'AtIRT1 dépendant de monoubiquitinations, permettant de contrôler finement l'acquisition du Fe à partir de la rhizosphère (Barberon *et al.*, 2011). Chez le riz, OsIRT1 joue également un rôle dans l'absorption racinaire du Fe et du Zn, notamment en condition réductrice bien qu'il ne constitue pas l'acteur principal chez cette plante (Bughio *et al.*, 2002 ; Ishimaru *et al.*, 2006 ; Lee et An, 2009). Contrairement à AtIRT1, OsIRT1 n'est pas restreint aux seules racines mais apparaît également exprimé au niveau des cellules compagnes du phloème jouant très certainement un rôle dans la translocation des métaux (Ishimaru *et al.*, 2006).

Alors qu'IRT1 présente une large gamme de substrats, la caractérisation en système levure d'IRT2 d'*A. thaliana* et d'IRT3 d'*A. thaliana* et d'*A. halleri* a montré que ces protéines transportent le Fe et le Zn mais sont incapables de transporter le Mn et le Cd (Vert *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2009).

A l'heure actuelle, peu d'informations fonctionnelles sont disponibles concernant la sélectivité des autres ZIP d'*Arabidopsis*. Néanmoins, la caractérisation de leurs orthologues a apporté des éléments de compréhension de leurs fonctions. Ainsi, les données acquissent lors de la caractérisation en levure et/ou en plantes de transporteurs ZIP chez le riz (Ishimaru *et al.*, 2005 ; Ishimaru *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2010), *Medicago truncatula* (Lopez-Millan *et al.*, 2004), le maïs (Xu *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2013), le soja (Moreau *et al.*, 2002) et chez les espèces hyperaccumulatrices *Noccaea caerulescens* (Pence *et al.*, 2000) et *Thlaspi japonicum* (Mizuno *et al.*, 2005) suggèrent un rôle important de ces ZIP dans le transport

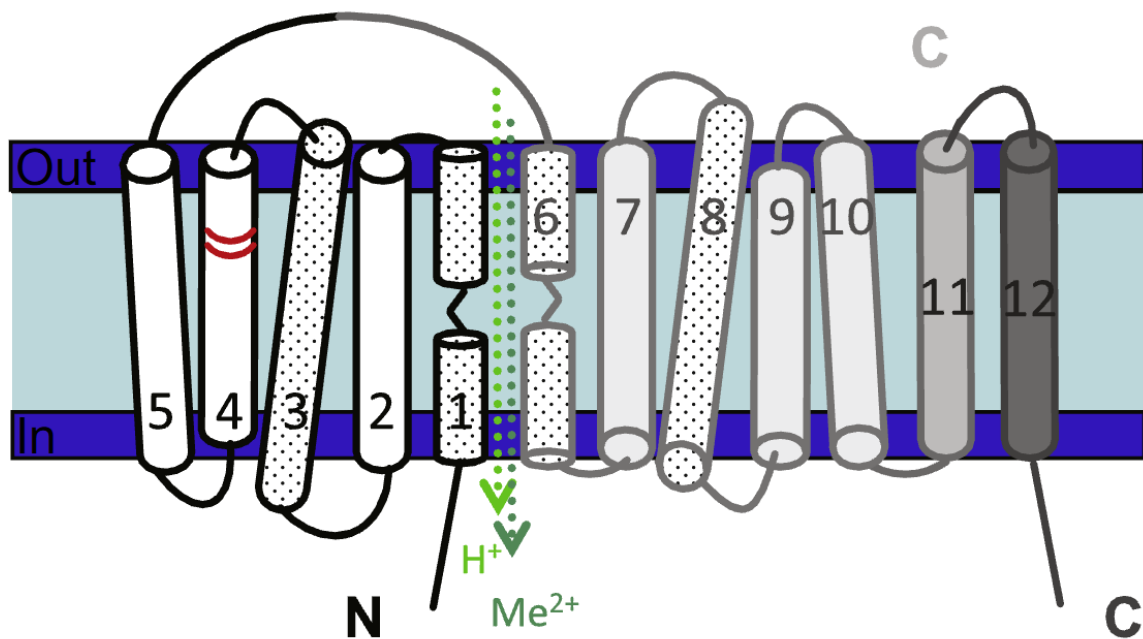


plasmalemmique de Zn, bien que certains soient capables de transporter le Fe, le Mn, le Cd ou le Ni.

Les données de régulation de l'expression de ces *ZIP* indiquent aussi leur implication dans l'acquisition et la discrimination du Zn (Krämer *et al.*, 2007). Par exemple, *OsZIP1*, *OsZIP3* et *OsZIP4* de riz et *MtZIP1*, *MtZIP4* et *MtZIP5* de *Medicago truncatula* sont induits en condition de carence en Zn, alors que *MtZIP3* est réprimé par ce métal (Lopez-Millan *et al.*, 2004) (Buglio *et al.*, 2002). Par ailleurs, les orthologues d'*AtZIP4* chez l'espèce hyperaccumulatrice *Noccaea caerulescens* (*ZNT1* et *ZNT2*) sont induits en condition de carence en Zn tout comme *AtZIP4* (Grotz *et al.*, 1998 ; Pence *et al.*, 2000 ; Assunção *et al.*, 2001), mais maintiennent un niveau d'expression racinaire élevé même pour des concentrations importantes en Zn. En accord avec les précédents résultats, une analyse transcriptomique comparative a mis en évidence que l'hyperaccumulateur de Zn *A. halleri*, exprime plus de 20 fois plus *ZIP6* qu'*A. thaliana*. L'ensemble de ces données suggère donc l'implication des *ZIP* dans l'accumulation de Zn chez les hyperaccumulateurs (Becher *et al.*, 2004).

Ainsi, les données fonctionnelles acquises pour les membres de cette famille montrent qu'ils sont majoritairement impliqués dans l'absorption, la discrimination et l'accumulation du Zn chez les plantes bien que certains d'entre eux tel que *IRT1* remplissent un rôle central dans le transport de Fe.

Chez le peuplier, l'identification des principaux transporteurs de métaux incluant les *ZIP* a récemment été publié (Migeon *et al.*, 2010). Au cours de cette étude, vingt transporteurs de la famille des *ZIP* ont été identifiés. Pour l'heure, peu d'informations sont disponibles concernant leur fonction. Néanmoins, des données EST et transcriptomiques indiquent que *PtZIP4* serait exprimé tout particulièrement au niveau des feuilles âgées suggérant un rôle au cours de la sénescence automnale (Sjödin *et al.*, 2009 ; NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>).



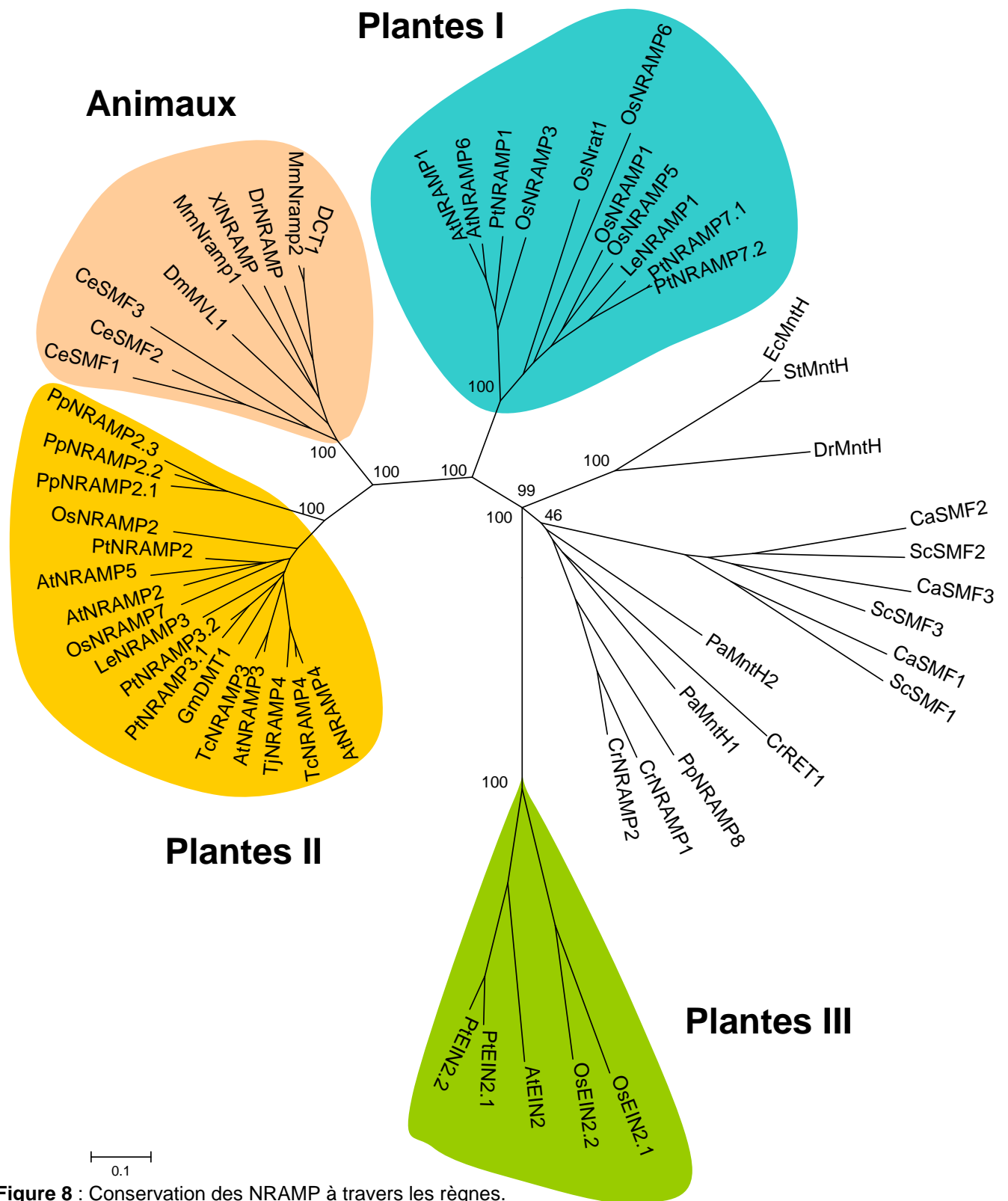
**Figure 7** : Schéma illustrant la topologie des transporteurs NRAMP.

Schéma basé sur l'analyse bioinformatique des transporteurs NRAMP2 de souris et MntH d'*Escherichia coli*. Le cœur conservé est composé de 10 segments transmembranaires et éventuellement de un (*E. coli*, MntH) ou de deux segments supplémentaires du côté C-terminal (Slc11a2). Le cœur conservé est subdivisé en deux parties répétées suivant une conformation entrelacée similaire à celle des LeuT. Cette conformation pseudo-symétrique des 5 segments répétés subit une inversion pendant le transport (Cellier, 2012).

### 3. Les Natural Resistance Associated Macrophage Protein (NRAMP)

#### a) Structure/fonction des NRAMP

Les NRAMP constituent une famille de protéines ubiquitaires généralement impliquées dans le transport de métaux cationiques divalents (Fleming *et al.*, 1997 ; Gunshin *et al.*, 1997 ; Cellier, 2012 ; **Figure 7**). Ces protéines possèdent une extrémité N-term cytoplasmique et seraient composées de 10 à 12 hélices transmembranaires (TM). Ces transporteurs sont caractérisés par un motif DPGN très conservé situé au niveau de l'hélice TM1 ainsi qu'un motif MPHN moins conservé au niveau du TM6. Plusieurs informations tentent à montrer que les NRAMP appartiendraient à la superfamille des transporteurs de cation LeuT, un homologue procaryotique d'un symporteur de sodium mammifère. Les analyses de similarités de structures secondaires montrent en effet des conservations significatives entre les NRAMP et les membres cette superfamille (Cellier, 2012). De ce fait, la conformation des NRAMP correspondrait donc globalement à celle des autres membres de cette superfamille. Les LeuT partagent une structure comprenant dix hélices TM conservées. Un premier ensemble de cinq hélices TM est lié à un deuxième ensemble similaire, suivant une rotation à 180° (Forrest *et al.*, 2010). Ce cœur structural en tandem symétriquement inversé est parfois supplémenté par des éléments communs à une famille de transporteur spécifique, correspondant chez les NRAMP, aux deux hélices TM 11 et 12. La modélisation des NRAMP suivant la conformation des LeuT, place des résidus polaires spécifiques des NRAMP dans les TM 1 et 6 de façon symétriquement opposée formant le putatif port du transporteur (Courville *et al.*, 2008 ; Cellier, 2012). Suivant le concept mécanistique de base admis depuis plus de 40 ans pour les transporteurs actifs secondaires, le transporteur expose son site de fixation au substrat d'un côté de la membrane. Après liaison du substrat, une modification de conformation de la protéine s'effectue, ce qui permet d'exposer le site de fixation au substrat de l'autre côté de la membrane provoquant ainsi le passage à travers la membrane de l'élément d'intérêt (Forrest *et al.*, 2010). Il est également admis, par analogie avec les canaux, qu'un domaine de la protéine pourrait réguler l'accessibilité du site de fixation au substrat de façon indépendante de la translocation du substrat (Forrest *et al.*, 2010).



**Figure 8** : Conservation des NRAMP à travers les règnes.

Arbre phylogénétique non enraciné de séquences de transporteurs NRAMP publiées et accessibles dans les bases de données, réalisé par la méthode "neighbor-joining" (Saitou et Nai, 1987). Cet arbre a été généré grâce à MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007) après alignement des séquences. Les valeurs de bootstrap des branches principales indiquées correspondent à 1000 répliques. La taille des branches est proportionnelle à la distance phylogénétique (échelle=0.1 mutation par résidu). Cet arbre laisse apparaître quatre principaux groupes. Les NRAMP de plantes sont séparés en deux groupes I et II ainsi qu'un groupe annexe comprenant les EIN2. Le groupe I comprend les transporteurs AtNRAMP1 et AtNRAMP6 d'*Arabidopsis thaliana* et leurs homologues chez les monocotylédones et les dicotylédones. Le groupe II contient les quatre autres NRAMP (2 à 5) d'*Arabidopsis thaliana* et leurs homologues. Enfin le troisième groupe est défini par les séquences homologues à AtEIN2 (Ethylene Insensitive 2). Les NRAMP d'animaux constituent un groupe indépendant proche du groupe II des plantes. Les NRAMP des organismes unicellulaires *C. reinhardtii* and *S. cerevisiae* forment deux groupes distincts indiquant une diversification des transporteurs NRAMP après la séparation entre les embryophytes.

## b) La découverte des NRAMP

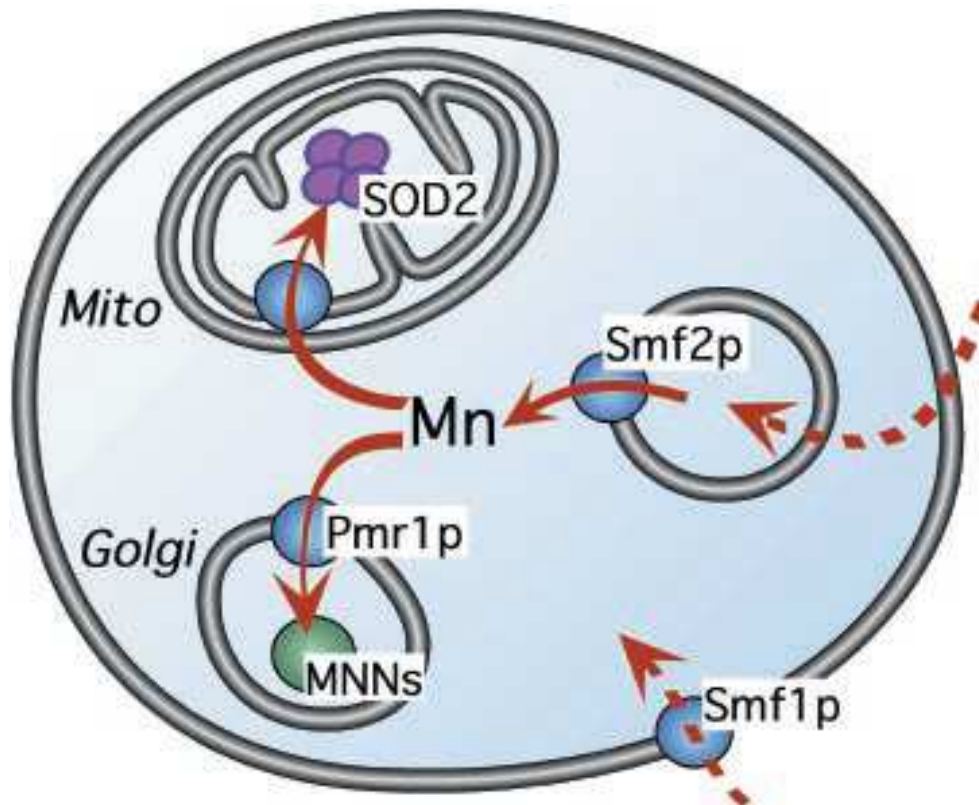
C'est en 1993 que Vidal *et al.* découvrent le premier NRAMP (NRAMP1) chez la souris suite au clonage positionnel des gènes candidats au locus *Bcg* contrôlant la résistance ou la sensibilité aux pathogènes intracellulaires (Vidal *et al.*, 1993). Les études de transcrits puis des western blots ont montré que *NRAMP1* code une protéine membranaire située dans les macrophages (Vidal *et al.*, 1993 ; Vidal *et al.*, 1996). Par immunofluorescence, il a ensuite été montré qu'au sein de macrophages au repos, NRAMP1 se trouve localisé au niveau d'endosomes tardifs alors qu'au cours de la phagocytose, cette protéine se trouve recrutée à la membrane phagosomale (Gruenheid *et al.*, 1997). Bien que l'étude de la structure secondaire du NRAMP1 de souris et de ses homologues chez la drosophile, le riz et la levure ait permis l'identification de déterminants structuraux caractéristiques de canaux et de transporteurs, la fonction de ces protéines restait inconnue (Cellier *et al.*, 1995).

Cependant en 1996, la caractérisation d'un mutant *nramp* (*smf1*) de la levure *saccharomyces cerevisiae* a mis en évidence l'implication de SMF1p dans le transport du  $Mn^{2+}$  (Supek *et al.*, 1996). Suite au clonage positionnel du gène responsable de l'anémie microcytaire chez la souris, un second NRAMP mammifère (NRAMP2/DCT1/DMT1), partageant 78% d'identité protéique avec le premier, a pu être identifié (Fleming *et al.*, 1997). En parallèle, l'homologue de NRAMP2 a été identifié comme transporteur de Fe au cours d'un crible fonctionnel réalisé en oocyte de xénope (Gunshin *et al.*, 1997). L'ensemble de ces données a démontré que NRAMP2/DCT1/DMT1 est un transporteur jouant un rôle essentiel dans l'absorption intestinale de Fe. Par la suite, il a également été montré que NRAMP1 de souris est un transporteur de  $Mn^{2+}$  et d'autres métaux divalents. (Jabado *et al.*, 2000). A ce jour, des homologues NRAMP ont été identifiés à travers tous les règnes (**Figure 8**).

c) Les NRAMP de *Saccharomyces cerevisiae*

Les premiers NRAMP de levure ont été identifiés *via* un crible suppresseur réalisé sur le mutant *mif1* affecté dans le fonctionnement d'une métalloprotéase nécessaire au clivage du peptide signal d'adressage aux mitochondries. Au cours de ce crible, la sur-expression de deux gènes partageant 49% d'homologie, nommés *SMF1* et *SMF2* pour « Suppressor of Mif », a permis de restaurer la croissance des levures (West *et al.*, 1992). Cependant, le mode d'action de ces protéines est resté inconnu jusqu'à la publication des travaux de Supek *et al.*, (1996) qui montra que Smf1p est un transporteur à fort affinité du  $Mn^{2+}$  localisé sur la





**Figure 9** : Modèle du transport de manganèse chez le levure.

Smf1p est localisé sur la membrane plasmique et permet l'entrée de Mn dans le cytosol de la levure. Smf2p est situé sur des compartiments intracellulaires et serait impliqué dans le transport de Mn vers le cytosol. L'apport de Mn au compartiment contenant Smf2p n'est pour le moment pas connu mais devrait impliquer des transporteurs localisés sur la membrane plasmique (indiqués par les flèches rouges en pointillé). Les vésicules contenant Smf2p se situent en amont de l'acheminement de Mn à la SOD2 des mitochondries (Mito) et aux mannosyltransférases (MNNs) du Golgi. Le transporteur P-type ATPase Pmr1p se situe en aval de Smf2p et permet l'acheminement de Mn directement dans lumen du Golgi. Un transporteur putatif de Mn localisé sur la membrane mitochondriale est également représenté (cercle bleu dans Mito) (Luk and Culotta, 2001).

membrane plasmique des levures. Cependant, Smf1p n'est pas spécifique du Mn. D'autres études ont prouvé que Smf1p est en fait aussi capable de transporter le  $\text{Cd}^{2+}$ , le  $\text{Co}^{2+}$  et le  $\text{Cu}^{2+}$  (Liu *et al.*, 1997 ; Liu et Culotta, 1999). Des études d'expression en système ovocyte de xénope ont montré que cette protéine permet également le transport de  $\text{Fe}^{2+}$  couplé aux  $\text{H}^+$  (Chen *et al.*, 1999 ; Sacher *et al.*, 2001). En plus de transporter ces métaux divalents, il a été montré que Smf1p est aussi impliqué dans le transport de cations monovalents ( $\text{Na}^+$   $\text{Li}^+$ , le  $\text{Rb}^+$ , le  $\text{K}^+$  et le  $\text{Ca}^{2+}$ ) de façon non couplé (Chen *et al.*, 1999 ; Sacher *et al.*, 2001). La protéine Smf1p n'est pas régulée par le  $\text{Mn}^{2+}$  au niveau transcriptionnel mais est fortement régulée post-transcriptionnellement suivant deux niveaux d'action. Premièrement, la présence de métaux, comme le  $\text{Cd}^{2+}$  ou le  $\text{Mn}^{2+}$  provoque l'endocytose de Smf1p *via* son ubiquitination par l'ubiquitine ligase Rsp5 et l'intervention de protéines arrestines qui jouent le rôle d'adaptateurs entre Rsp5p et Smf1p lorsque Smf1p est phosphorylé (Nikko *et al.*, 2008). Deuxièmement, Smf1p peut aussi être ubiquitiné lorsqu'il est localisé au niveau des endosomes, provoquant sa migration vers la vacuole et sa dégradation (Liu et Culotta, 1999). Ce mécanisme implique la formation d'un complexe incluant Smf1p, des protéines TRF-like (Tre1p et Tre2p), Bsd2p ainsi que l'ubiquitine ligase Rsp5p permettant ainsi leur transfert vers le Multi-vesicular body (MVB) puis vers la vacuole (Stimpson *et al.*, 2006 ; Sullivan *et al.*, 2007).

Comme pour la souche mutant *smf1*, la croissance de la souche mutante *smf2* est inhibée en présence d'EGTA mais peut être restaurée par l'ajout de Mn (Cohen *et al.*, 2000). Les levures mutantes *smf2*, et plus spécifiquement les mitochondries des levures mutantes *smf2*, accumulent moins de Mn que les sauvages (Luk et Culotta, 2001). A l'inverse, la sur-expression de *SMF2* en levure conduit à une augmentation du contenu en Mn, confirmant l'implication de Smf2p dans le transport de cet élément (Cohen *et al.*, 2000). En revanche Smf2p n'apparaît pas impliqué dans le transport de Fe dans les conditions physiologiques chez la levure (Chen *et al.*, 1999 ; Cohen *et al.*, 2000). Luk et Culotta (2001) ont également montré que Smf2p est localisé au niveau d'un compartiment intracellulaire et que l'activité de la SOD Mn-dépendante localisée dans les mitochondries est affectée chez *smf2* tout comme l'activité de N-glycosylation de l'invertase golgienne également dépendante du Mn. Ces résultats montrent donc que Smf2p est impliqué dans l'homéostasie intracellulaire du Mn (Luk et Culotta, 2001 ; **Figure 9**). Par ailleurs, *SMF2* apparaît régulé au niveau

**Tableau I** : Caractérisation de transporteurs NRAMP par expression en système levure.  
+ complémentation; - pas de complémentation; n.d. non déterminé

Plantes	gènes	Tests de complémentation et de sensibilité en levure					Tests d'accumulation de métaux en levures	Références
		<i>smf1</i>	<i>smf2</i>	<i>fet3fet4</i>	<i>zrt1zrt2</i>	WT / <i>ycf1</i>		
		Mn	Mn	Fe	Zn	Métaux non essentiels		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtNRAMP1</i>	+	n.d.	+	-	Cd	Cd	Curie <i>et al.</i> , 2000 ; Thomine <i>et al.</i> , 2000
	<i>AtNRAMP2</i>	-	+	-	-	n.d.	n.d.	Cailliatte, 2008
	<i>AtNRAMP3</i>	+	n.d.	+	-	Cd	Fe/Cd	Thomine <i>et al.</i> , 2000 ; Lanquar <i>et al.</i> , 2004
	<i>AtNRAMP4</i>	+	n.d.	+	+	Cd	Cd	
	<i>AtNRAMP6</i>	-	n.d.	-	-	Cd	n.d.	Cailliatte <i>et al.</i> , 2009
<i>Noccaea caerulescens</i>	<i>NcNRAMP3</i>	+	n.d.	+	-	Cd	Cd	Oomen <i>et al.</i> , 2009 ; Wei <i>et al.</i> , 2009
	<i>NcNRAMP4</i>	+	n.d.	+	+	Cd	n.d.	
<i>Noccaea cochleariforme</i>	<i>TjNRAMP4</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Ni	Ni	Mizuno <i>et al.</i> , 2005
<i>Glycine max</i>	<i>GmDMT1</i>	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	Fe	Kaiser <i>et al.</i> , 2003
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>LeNRAMP1</i>	+				n.d.		Berezky <i>et al.</i> , 2003
	<i>LeNRAMP3</i>							
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsNRAMP1</i>	n.d.	n.d.	+	n.d.	Cd	Cd	Curie <i>et al.</i> , 2000 ; Takahashi <i>et al.</i> , 2011b
	<i>OsNRAMP3</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Mn	Yamaji <i>et al.</i> , 2013
	<i>OsNRAMP5</i>	+	n.d.	+	n.d.	Cd	n.d.	Sasaki <i>et al.</i> , 2012 ; Ishimaru <i>et al.</i> , 2012 Ishikawa <i>et al.</i> , 2012
	<i>OsNRAT1</i>	-	n.d.	-	n.d.	Al	Al	Xia <i>et al.</i> , 2010 ; 2011

postranscriptionnel par le Zn, le Cu et le Mn ainsi que par l'action de Bsd2p lors que les conditions en Mn sont suffisantes (Portnoy *et al.*, 2000).

Par la suite, un troisième NRAMP de levure nommé Smf3p a été identifié par homologie de séquences avec les deux premiers (Cohen *et al.*, 2000 ; Portnoy *et al.*, 2000). SMF3p est localisé sur la membrane de la vacuole et paraît impliqué dans le déstockage du Fe vacuolaire (Portnoy *et al.*, 2000). *SMF3* est induit par la carence en Fe *via* l'intermédiaire du facteur de transcription Aft2p (Courel *et al.*, 2005). En condition normale, le mutant *smf3* exprime les réponses correspondant à une carence en Fe, indiquant la nécessité de stimuler les mécanismes impliqués dans l'absorption de Fe afin de compenser l'absence de déstockage vacuolaire.

#### d) Les NRAMP de Végétaux

Depuis l'identification et la caractérisation des premiers NRAMP de mammifères et de levures, de nombreux homologues ont été identifiés chez les plantes, notamment chez les espèces séquencées. Des études fonctionnelles des NRAMP de plantes ont également été entreprises chez des espèces séquencées et non séquencées, par expression hétérologue (**Tableau I**) ou par expression homologue (**Tableau II**).

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, la famille NRAMP est constituée de 6 membres impliqués dans le transport de Mn, de Fe, de Zn et de Cd (Curie *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2003 ; Lanquar *et al.*, 2004 ; Cailliatte *et al.*, 2009 ; Cailliatte *et al.*, 2010). Elle comporte également un septième membre particulier, nommé EIN2 (Ethylène INsensitive 2), impliqué dans la signalisation de l'éthylène (Alonso *et al.*, 1999). Chez le riz, la famille NRAMP comporte sept membres ainsi que deux EIN2 (Gross *et al.*, 2003 ; Sasaki *et al.*, 2012). Chez le peuplier *Populus trichocarpa* nisqually, six NRAMP et deux EIN2 ont récemment été identifiés (Migeon *et al.*, 2010). Alors que les NRAMP d'animaux sont regroupés au sein d'un unique cluster, les NRAMP de plantes identifiés sont distribués dans trois groupes phylogénétiques différents, illustrant une diversification des NRAMP spécifiques aux plantes (**Figure 8**).

**Tableau II** : Caractérisation de transporteurs NRAMP en plantes. n.d. non déterminé.

Plantes	Gènes	Phénotype des plantes associés au	Localisation			Régulation	Références
			Organes	tissus	Membranes		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtNRAMP1</i>	Mn	Racines>> P. aeriennes	Tissus conducteurs, poils absorbant	Membrane plasmique	Induit par les carences en Fe et Mn	Curie <i>et al.</i> , 2000 ; Cailliatte <i>et al.</i> , 2010
	<i>AtNRAMP2</i>	n.d.	Racines> P. aeriennes	Tissus conducteurs, trichomes de fleurs, funicules des siliques	Compartiment intracellulaire	n.d.	Cailliatte, 2008
	<i>AtNRAMP3</i>	Mn/Fe/Cd/Zn	Racines> P. aeriennes	Tissus conducteurs	Tonoplaste	Induit par la carence en Fe & augmentation de leur quantité de protéine en présence de Cd	Thomine <i>et al.</i> , 2000; 2003; Lanquar <i>et al.</i> , 2004; 2010 ; Molins <i>et al.</i> , 2013
	<i>AtNRAMP4</i>	Mn/Fe/Cd/Zn	Racines< P. aeriennes				
	<i>AtNRAMP5</i>	n.d.	Pollen +++	Cellule végétative	n.d.	n.d.	Becker <i>et al.</i> , 2004 ; Borges <i>et al.</i> , 2008
	<i>AtNRAMP6</i>	Cd	Racines<< P. aeriennes	Tissus conducteurs et cellules de gardes	Compartiment intracellulaire	n.d.	Cailliatte <i>et al.</i> , 2009 ; Obulareddy <i>et al.</i> , 2013
<i>Noccaea caerulea</i>	<i>NcNRAMP3</i>	Cd/Zn	Racine	n.d.	Tonoplaste	Induit par la carence en Fe & par la présence en Cd et Ni	Oomen <i>et al.</i> , 2009 ; Wei <i>et al.</i> , 2009
	<i>NcNRAMP4</i>	Cd/Zn	n.d.	n.d.	Tonoplaste	n.d.	
<i>Glycine max</i>	<i>GmDMT1</i>	n.d.	Racines	Nodules	Péribactéroïde	ARN contient des IRE	Kaiser <i>et al.</i> , 2003
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>LeNRAMP1</i>	n.d.	Racines	Parenchyme vasculaire	Compartiment intracellulaire	Induit par la carence en Fe	Berezky <i>et al.</i> , 2003
	<i>LeNRAMP3</i>	n.d.	Racines> P. aeriennes	n.d.	Tonoplaste	Induit par la carence en Fe	
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsNRAMP1</i>	Cd	Racines> P. aeriennes	n.d.	Membrane plasmique	Induit par la carence en Fe	Curie <i>et al.</i> , 2000 ; Takahashi <i>et al.</i> , 2011b
	<i>OsNRAMP2</i>	n.d.	Racines<< P. aeriennes	n.d.	n.d.	n.d.	Belouchi <i>et al.</i> , 1997
	<i>OsNRAMP3</i>	Mn	Racines = Feuilles	n.d.	Membrane plasmique	Protéines dégradées en présence de Mn	Yamaji <i>et al.</i> , 2013
	<i>OsNRAMP5</i>	Mn/Cd	Racine	Endoderme et exoderme	Face distale de la membrane plasmique	non régulé par les carences en Fe et Mn	Sasaki <i>et al.</i> , 2012 ; Ishimaru <i>et al.</i> , 2012
	<i>OsNRAT1</i>	Al	Racine	Pointe racinaire	Membrane plasmique	Induit en présence d'Al	Xia <i>et al.</i> , 2010; 2011

IRE : Iron response elements

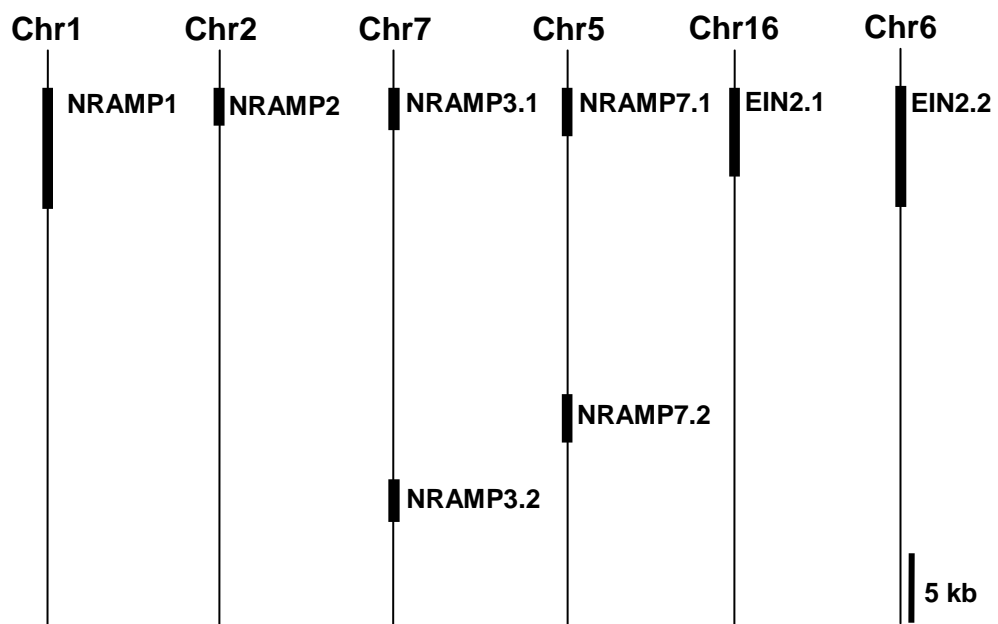
## NRAMP végétaux du groupe I

Ce cluster comprend l'ensemble des orthologues d'AtNRAMP1 et d'AtNRAMP6, deux NRAMP d'*Arabidopsis thaliana* qui partagent près de 86% d'identité protéique (**Figure 8**). Les premières caractérisations d'AtNRAMP1 en levure, ont montré qu'il est capable de transporter le Fe, le Mn et le Cd (Curie *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2000). De récentes études ont mis en évidence que le transporteur AtNRAMP1, localisé en plante sur la membrane plasmique, est principalement exprimé au niveau de la racine notamment en condition de carence en Mn et de carence en Fe (Curie *et al.*, 2000 ; Cailliatte *et al.*, 2010). L'analyse d'un mutant d'insertion a montré qu'AtNRAMP1 est l'acteur principal de l'absorption racinaire à haute affinité du Mn (Cailliatte *et al.*, 2010).

Quant au transporteur AtNRAMP6, il est localisé au niveau de compartiments intracellulaires. *AtNRAMP6* est exprimé au niveau des tissus conducteurs de la plante. Cependant, de récentes données transcriptomiques indiquent qu'il serait fortement exprimé chez les cellules de gardes (Obulareddy *et al.*, 2013). Bien que sa fonction en plante ne soit pas élucidée pour l'heure, il est apparu capable de transporter le Cd et de contribuer à sa toxicité en plantes (Cailliatte *et al.*, 2009).

L'ensemble des NRAMP de riz caractérisés à ce jour font également partie de ce groupe I. En levure, OsNRAMP1 est capable de transporter le Fe et le Cd (Curie *et al.*, 2000). En plante OsNRAMP1 est localisé sur la membrane plasmique (Takahashi *et al.*, 2011b). Chez le riz, son expression, essentiellement localisée au niveau des racines (Belouchi *et al.*, 1995), est induite lors de carences en Fe (Takahashi *et al.*, 2011a) mais aussi lors d'exposition au Cd (Zhang *et al.*, 2011). Il a également été observé qu'*OsNRAMP1* est plus fortement exprimé dans le cultivar de riz qui accumule plus fortement le Cd. Enfin la sur-expression d'*OsNRAMP1* provoque une augmentation de la concentration en Cd dans les feuilles de riz, confirmant l'implication en plante d'*OsNRAMP1* dans l'accumulation de ce métal (Takahashi *et al.*, 2011b).

La récente caractérisation en levure d'*OsNRAMP5* a mis en évidence sa capacité à transporter le Fe, le Mn, et le Cd (Ishimaru *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012). Chez le riz, *OsNRAMP5* est exprimé de façon constitutive dans les racines (Ishimaru *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012). *OsNRAMP5* est localisé de façon polaire sur la face distale de la membrane plasmique des cellules de l'endoderme et de l'exoderme ainsi qu'au niveau de la couche cellulaire extérieure du cortex et des cellules entourant le xylème (Ishimaru *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012). La caractérisation de mutants « perte de fonction » d'*OsNRAMP5* a



**Figure 10** : Répartition des gènes *PtNRAMP* sur les chromosomes du peuplier.

*PtNRAMP3.1* et *PtNRAMP3.2* qui partagent 88,2% d'identité protéique sont situés sur le chromosome 7 au niveau d'une région de moins de 32kb. *PtNRAMP7.1* et *PtNRAMP7.2* qui partagent 86,7% d'identité protéique sont situés sur le chromosome 5 au niveau d'une région de moins de 30kb.

montré que ce transporteur est impliqué dans l'acquisition du Mn et représente aussi la principale voie d'absorption du Cd chez le riz (Ishikawa *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012).

L'étude d'OsNRAMP3 a également mis en évidence son rôle dans le transport du Mn (Yamaji *et al.*, 2013 ; Yang *et al.*, 2013). OsNRAMP3 est fortement exprimé dans les entrenœuds. Cette protéine est localisée sur la membrane plasmique des cellules proches du phloème, des cellules des feuilles et des racines ainsi que des cellules de transfert du xylème qui entourent le faisceau vasculaire des nœuds I. En présence de Mn la protéine OsNRAMP3 est internalisée à partir de la membrane plasmique puis dégradée. La caractérisation du mutant *Osnramp3* par marquage au  $^{54}\text{Mn}$  a montré l'implication d'OsNRAMP3 dans la distribution du Mn dans les organes en développement (Yamaji *et al.*, 2013 ; Yang *et al.*, 2013).

OsNRAT1 ou OsNRAMP4 est un autre membre de la famille NRAMP de riz identifié comme cible du facteur de transcription OsATR1 impliqué dans la réponse à l'Al (Yamaji *et al.*, 2009). OsNRAT1 partage seulement 36 à 59% d'identité protéique avec les autres membre de sa famille (Xia *et al.*, 2010). Son expression en levure a montré que cette protéine induit par l'Al transporte l'Al trivalent (Xia *et al.*, 2010 ; Xia *et al.*, 2011). Chez le riz, le mutant *nrat1* présente une diminution de l'accumulation d'Al accompagnée d'une augmentation de la sensibilité à ce métal. OsNRAT1 est localisé sur la membrane plasmique des cellules de la pointe racinaire. Les auteurs proposent que ce transporteur intervient dans la tolérance à l'Al en le retirant de la paroi ou il exerce sa toxicité (Xia *et al.*, 2010).

Il existe pour l'heure peu d'information concernant les quatre autres membres de cette famille chez le riz. Une récente étude a cependant montré que la forme la plus courte des différentes formes d'épissage alternatif d'*OsNRAMP6* est la cible d'un micro ARN spécifique du riz. Parce que ce micro ARN est induit lors d'attaque pathogène et est impliqué dans la tolérance au champignon *M. oryzae*, il a été proposé qu'*OsNRAMP6* puisse jouer un rôle en réponse aux stress biotiques (Campo *et al.*, 2013).

Chez le peuplier, trois NRAMP ont été identifiés dans ce groupe. *PtNRAMP1* est localisé sur le chromosome 1, tandis que les gènes *PtNRAMP7.1* et *PtNRAMP7.2* sont localisés sur le chromosome 5. Ces deux derniers partagent 86,7% d'identité protéique et sont situés dans une zone de moins de 30kb suggérant une duplication liée à un phénomène local (**Figure 10**).

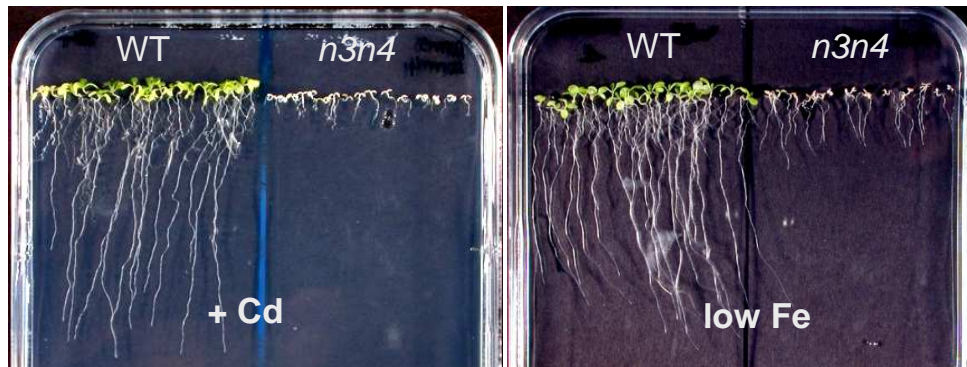




## NRAMP végétaux de groupe 2

Ce cluster regroupe les orthologues d'AtNRAMP2 et d'AtNRAMP5 qui partagent 67,7% d'identité protéique entre eux (**Figure 8**). Jusqu'à présent, peu d'études ont été menées sur AtNRAMP5. Des données transcriptomiques suggèrent qu'il serait fortement et spécifiquement exprimé au niveau du pollen mature (Becker *et al.*, 2003). Son absence d'expression dans les cellules reproductrices suggère qu'il serait exprimé au niveau de la cellule végétative du pollen (Borges *et al.*, 2008). En accord avec les données transcriptomiques, des travaux auxquels j'ai participé au sein du laboratoire (travaux non présentés dans le mémoire, résumés en **annexe I**) ont récemment permis de montrer qu'AtNRAMP5 est localisé au niveau de vésicules intracellulaires présentes dans la cellule végétative du tube pollinique. En levure, AtNRAMP5 est capable de transporter le Mn, le Fe et le Ca. Bien que pour l'heure aucune donnée n'ait permis de déterminer la fonction physiologique de ce transporteur, la caractérisation d'un mutant d'insertion a montré un rôle important d'AtNRAMP5 dans la fitness du pollen, suggérant une fonction dans la maturation ou la germination du tube pollinique ou encore dans la communication avec l'organe femelle. La caractérisation d'AtNRAMP2 a été entreprise au cours de la thèse de R. Cailliatte. Ce travail a montré qu'AtNRAMP2 permet de compléter les phénotypes du mutant *smf2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Cailliatte, 2008). Ces résultats suggèrent qu'AtNRAMP2 pourrait être impliqué, tout comme *Smf2p*, dans le transport de Mn vers la mitochondrie ou le Golgi. De plus, le mutant *nramp2* contient plus de Mn et moins de Fe que les plantes sauvages, il présente également une taille réduite ainsi qu'un phénotype chlorotique même en condition de nutrition optimale. Enfin, ce mutant présente une diminution de l'activité des photosystèmes, suggérant une implication d'AtNRAMP2 dans le transport de métaux vers les chloroplastes (Cailliatte, 2008).

Le second groupe comprend aussi AtNRAMP3 et AtNRAMP4 qui partagent près de 75% d'identité protéique. Ces deux protéines sont exprimées au niveau des tissus conducteurs des parties aériennes et des racines et sont localisées sur le tonoplaste (Thomine *et al.*, 2003 ; Lanquar *et al.*, 2004). Exprimé en levure, AtNRAMP3 est capable de transporter le Fe, le Mn et le Cd alors qu'AtNRAMP4 transporte le Fe, le Mn, le Cd mais également le Zn (Thomine *et al.*, 2000 ; Lanquar *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, la carence en Fe induit l'expression transcriptionnelle et protéique d'AtNRAMP3 et d'AtNRAMP4 (Thomine *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2003 ; Lanquar *et al.*, 2005 ; Lanquar *et al.*, 2010). L'analyse des mutants d'insertions *nramp3* et *nramp4* a montré que ces deux protéines agissent de façon



**Figure 11:** Phénotypes du double mutant *nramp3nramp4* d'*Arabidopsis thaliana* .  
Le double mutant *nramp3nramp4* d'*Arabidopsis thaliana* est sensible à la carence en Fe (droite) et à la présence de 30  $\mu$ M de Cd. Photos prises après 11 jours de culture *in vitro* sur milieu ABIS.

redondante dans la remobilisation du Fe vacuolaire des cotylédons d'*Arabidopsis* en condition de carence en Fe au cours de la germination (Lanquar *et al.*, 2005 ; **Figure 11**). Chez les plantules adultes, AtNRAMP3 et AtNRAMP4 jouent un rôle important dans la fourniture de Mn aux photosystèmes II à partir de la vacuole (Lanquar *et al.*, 2010). De plus, les travaux de l'équipe ont montré que ces transporteurs interviennent paradoxalement dans la tolérance au Zn et au Cd (Oomen *et al.*, 2009 ; Molins *et al.*, 2013 ; **Figure 11**). Un modèle impliquant une action indirecte a été proposé: en approvisionnant les chloroplastes en métaux essentiels à leur fonctionnement, AtNRAMP3 et AtNRAMP4 permettent de maintenir l'activité photosynthétique même en présence de Cd (Molins *et al.*, 2013). AtNRAMP3 et AtNRAMP4 jouent également un rôle lors de stress biotiques. En effet, il a été montré que l'expression d'AtNRAMP3 est induite par les bactéries pathogènes *Pseudomonas syringae* et *Erwinia chrysanthemi*. De plus, le double mutant *nramp3nramp4* présente une sensibilité accrue au parasite *Erwinia chrysanthemi* (Segond *et al.*, 2009). Enfin, des données transcriptomiques indiquent qu'AtNRAMP3 est induit au moment de la sénescence (Breeze *et al.*, 2011).

Chez l'espèce hyperaccumulatrice de métaux *Noccaea caerulescens*, NcNRAMP3 est principalement exprimé au niveau des racines notamment en conditions de carence en Fe, ainsi qu'en présence de Cd et de Ni dans les racines (Wei *et al.*, 2009). Les NRAMP3 et NRAMP4 de *Noccaea caerulescens* sont capables de transporter les mêmes métaux que leurs homologues chez *A. thaliana* (Oomen *et al.*, 2009). De plus, il a été découvert que l'expression de NcNRAMP3 en levures augmente leur résistance au Ni et diminue l'accumulation de cet élément (Wei *et al.*, 2009), à l'inverse de ce qui a été précédemment observé pour TjNRAMP4 de l'hyperaccumulateur de Ni, *Noccaea cochleariforme* (Mizuno *et al.*, 2005). La sur-expression de NcNRAMP3 en tabac augmente la sensibilité au Cd (Wei *et al.*, 2009). En revanche, l'expression de NcNRAMP3 ou de NcNRAMP4 restaure la croissance du double mutant *nramp3nramp4* d'*Arabidopsis thaliana* sur milieu Cd et milieu Zn. Chez *Noccaea caerulescens*, NRAMP3 et NRAMP4 sont exprimés plus fortement que chez *Arabidopsis thaliana*. Ces résultats indiquent donc que les différences entre les NRAMP3 et NRAMP4 d'*Arabidopsis thaliana* et ceux de *Noccaea caerulescens*, résident dans leur niveau d'expression plutôt que dans leur capacité de transport (Oomen *et al.*, 2009).

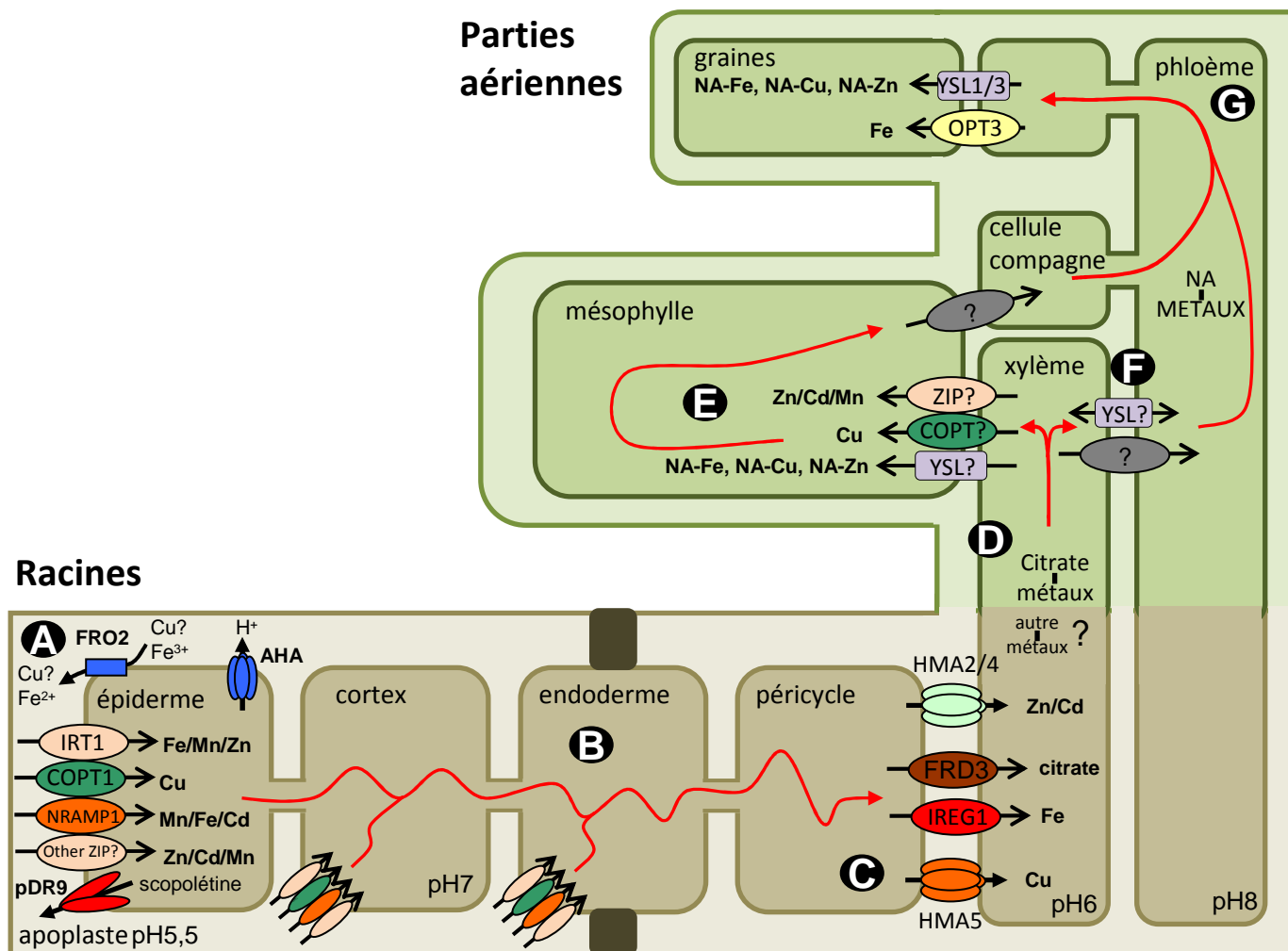
Chez le peuplier, le groupe II comprend trois NRAMP. NRAMP2 est localisé sur le chromosome 2 alors que les gènes NRAMP3.1 et NRAMP3.2 sont localisés en tandem sur le chromosome 7 dans une zone de 32 kb (**Figure 10**). Ces homologues de séquences d'AtNRAMP3 et d'AtNRAMP4 partagent 88,2% d'identité protéique entre eux. Des données



transcriptomiques suggèrent que le gène codant pour PtNRAMP3.2 serait induit au cours de la sénescence (Sjödin *et al.*, 2009) ainsi qu'en condition de stress Cd (Induri *et al.*, 2012).

### NRAMP végétaux de groupe 3

Ce dernier groupe comprend l'ensemble des orthologues d'*AtEIN2* (Éthylène INsensitive 2) (Alonso *et al.*, 1999 ; **Figure 8**). Ce gène impliqué dans la signalisation de l'éthylène, présente une forte homologie avec les autres gènes de la famille *NRAMP* au niveau de sa partie 5'. Sa partie 3' code un domaine globulaire absent chez les autres membres de la famille NRAMP (Alonso *et al.*, 1999). *AtEIN2* code une protéine localisée sur la membrane du RE. Cependant, aucune donnée fonctionnelle n'a été publiée concernant sa possible activité de transport. En revanche, il a récemment été démontré que son domaine C-term cytosolique et globulaire est clivé en réponse à l'éthylène (Qiao *et al.*, 2012 ; Wen *et al.*, 2012). Cette hydrolyse permet la migration de la partie C-term d'EIN2 vers le noyau, afin de médier la réponse transcriptomique à l'éthylène par l'intermédiaire d'EIN3/EIL1 (EIL1, ETHYLENE INSENSITIVE LIKE1) (Qiao *et al.*, 2012 ; Wen *et al.*, 2012).



**Figure 12:** Représentation du parcours réalisé par les microéléments de l'absorption à partir du sol jusqu'au stockage dans les graines chez les plantes dicotylédones annuelles.

Illustration de l'implication des principaux acteurs moléculaires jouant directement et spécifiquement un rôle dans la gestion des métaux au sein des plantes. Le trajet des différents métaux est retracé, de l'absorption à partir de la rhizosphère jusqu'au remplissage des tissus puits, en prenant soin de replacer les différents transporteurs transmembranaires identifiés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* comme impliqués dans cette migration. IRT: iron-regulated transporter, COPT: Copper transporter, NRAMP: Natural Resistance Associated Macrophage Protein, ZIP: ZRT-IRT-like protein, FRD3: Ferric Reductase Defective 3 (citrate transporter), IREG: Ferroportine (FPN), HMA: heavy-metal ATPases, AHA: Arabidopsis plasma membrane H<sup>+</sup>-pumping ATPase, FRO2: Ferric Chelate Reductase, YSL: Yellow Strip Like, NA: Nicotianamine. D'après Palmer *et al.*, 2009; Molins, 2010.

### III. Gestion des métaux au cours du développement des plantes

La gestion des métaux essentiels ou non au sein des plantes est un vaste sujet faisant intervenir différentes étapes telles que l'absorption, la translocation, la séquestration et la remobilisation. Peu d'informations sont disponibles concernant cette gestion des métaux chez les espèces pérennes telles que les arbres. En effet la majorité des études ont été réalisées chez les espèces monocotylédones d'intérêt agronomique telles que le riz ou le blé ainsi que chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. De ce fait, le travail bibliographique présenté ci-dessous regroupe principalement les données obtenues chez ces plantes annuelles.

#### A) Aperçu des principales voies de transport des micronutriments chez les plantes annuelles

La **Figure 12**, présente le trajet des microéléments de l'absorption à partir de la rhizosphère jusqu'au remplissage des tissus puits chez les plantes annuelles, en se focalisant particulièrement sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

L'absorption à partir de rhizosphère est bien caractérisée concernant le Fe (**Figure 12A**). Chez les non-graminées, la carence en fer active quatre composantes agissant en étroite relation. Les pompes à protons telles qu'AHA2, transportent les protons dans la rhizosphère de façon à solubiliser le Fe et à augmenter sa biodisponibilité (Santi et Schmidt, 2009). FRO2 réduit le Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> qui sera ainsi transporté par IRT1 dans l'épiderme de la racine (Walker et Connolly, 2008). Récemment, il a été montré que la carence en fer induisait aussi la sécrétion de composés phénoliques par le transporteur ABC PDR9 ou ABCG37 dans la rhizosphère jouant un rôle important dans la mobilisation de ce métal (Fourcroy *et al.*, 2014). Bien que l'absorption des autres métaux soit moins bien décrite, certaines études ont montré que la large gamme de substrats d'IRT1 pourrait lui permettre de prendre aussi en charge l'absorption racinaire du Mn, du Zn, du Co, du Ni et du Cd, en plus de celle du Fe (Korshunova *et al.*, 1999 ; Kobayashi et Nishizawa, 2012). De plus, d'autres transporteurs plus spécifiques jouent également un rôle dans l'absorption des autres métaux. Par exemple, COPT1 est impliqué dans l'absorption du Cu et de l'Ag (Sancenon *et al.*, 2003; Sancenon *et al.*, 2004). AtNRAMP1 tout comme son homologue OsNRAMP5 chez le riz, représente l'une des principales voies d'entrée du Mn chez ces plantes (Cailliatte *et al.*, 2010 ; Sasaki *et al.*,





2012). OsNRAMP5 est par ailleurs responsable de l'absorption du Cd chez le riz (Ishikawa *et al.*, 2012 ; Ishimaru *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012).

Une fois dans la racine, les oligo-éléments peuvent se déplacer à travers l'épiderme et le parenchyme du cortex jusqu'à l'endoderme par deux voies : l'apoplaste et le symplaste (**Figure 12B**). En raison de la bande de Caspary qui bloque la voie apoplastique au niveau de l'endoderme, les microéléments ne peuvent atteindre les vaisseaux du xylème que par voie symplastique. Par conséquent, des protéines transmembranaires, principalement localisées au niveau des cellules du péricycle et du parenchyme xylémien, prennent en charge le chargement sélectif du xylème en vue du transport à longue distance vers les parties aériennes (Clarkson, 1993 ; **Figure 12C**). Parmi ces protéines, des transporteurs d'efflux tels que FPN1 et FRD3 assurent respectivement le transport de Fe et de citrate (Durrett *et al.*, 2007 ; Morrissey *et al.*, 2009), HMA2 et HMA4 transportent le Zn et le Cd (Hussain *et al.*, 2004 ; Verret *et al.*, 2004 ; Hanikenne *et al.*, 2008 ; Wong et Cobbett, 2009 ; Grispen *et al.*, 2011 ; Siemianowski *et al.*, 2011) et HMA5 transporte sélectivement le Cu ( Birnbaum *et al.*, 2003 ; . Andrés-Colas *et al.*, 2006). Dans le xylème, les microéléments sont drainés vers les parties aériennes par le flux de transpiration (**Figure 12D**). Les métaux peuvent se déplacer librement au sein du xylème ou bien être chélatés par des petites molécules de faible poids moléculaire comme le citrate, l'histidine, l'asparagine, les phytochélatines, la nicotianamine ou les phytosidérophores (Krämer *et al.*, 2007 ; Palmgren *et al.*, 2008). Dans les feuilles, les microéléments peuvent être déchargés dans le symplaste à travers le parenchyme du xylème et les cellules du mésophylle où ils sont utilisés pour les processus cellulaires tels que la photosynthèse, la production d'énergie et la détoxification des ROS (Edward *et al.*, 2001 ; Bleackley et MacGillivray, 2011 ; Yruela, 2013 ; **Figure 12E**). Bien que les mécanismes de déchargement des microéléments du xylème soient essentiellement inconnus, il est suggéré que ce processus puisse être effectué par des transporteurs d'influx tels que les ZIPs et les COPTs (Waters et Sankaran, 2011). Les transporteurs YSL pourraient être également de bons candidats, si l'on considère que certains métaux voyagent dans le xylème complexés aux nicotianamines (Von Wirén *et al.*, 1999 ; Palmer et Guerinot, 2009).

Comme les feuilles, les siliques sont des organes photosynthétiques et transpirent. Ainsi le xylème joue certainement un rôle dans le transport des microéléments jusqu'aux fruits (Waters et Sankaran, 2011). Cependant, seuls les tissus du phloème atteignent les graines (Patrick et Offler, 2001). Par conséquent, les microéléments situés dans le xylème doivent être déchargés dans les cellules du parenchyme par des protéines transmembranaires



au niveau des nœuds, où ils suivent essentiellement un transport radial symplastique jusqu'aux vaisseaux du phloème (Van Bel, 1990). Ce pool de microéléments localisé dans le parenchyme des nœuds est chargé dans le phloème où il rejoindra les microéléments issus de la remobilisation des organes source sénescents.

Les microéléments peuvent être directement chargés dans le complexe cellules compagnes/tubes criblés à travers les plasmodesmes (Oparka et Turgeon, 1999). Cependant, dans la plupart des cas, le chargement du phloème est assuré par des transporteurs spécifiques (Sondergaard *et al.*, 2004 ; **Figure 12F**). Les échanges xylème-phloème au niveau des nœuds nécessitent des protéines transmembranaires pour le déchargement du xylème et/ou le chargement de phloème tel que NIP6 identifiée comme un canal à acide borique, exprimé dans le xylème des nœuds chez *Arabidopsis* ou encore Lsi6 qui est un transporteur de silicium exprimé au niveau du phloème des nœuds chez le riz (Tanaka *et al.*, 2008 ; Yamaji et Ma, 2009). Bien que cela ne soit pas encore bien connu chez les dicotylédones, il a été récemment décrit chez le riz, le même type d'échanges pour les métaux. Le nœud de tige du riz présente une surface d'échange directe entre le xylème et le phloème permettant de diriger les nutriments alternativement vers les feuilles photosynthétiquement actives ou les organes puits tels que les graines et les jeunes feuilles. Les transporteurs OsNRAMP3, OsYSL16 et OsLCT1 jouent des rôles dans ce processus pour le Mn le Cu et le Cd, respectivement (Uraguchi *et al.*, 2011 ; Zheng *et al.*, 2012 ; Yamaji *et al.*, 2013). Une fois dans le phloème, les microéléments suivent le flux de la sève qui est principalement dirigé par le gradient de pression hydrostatique conséquent au gradient de concentration en saccharose (Munch, 1930 ; **Figure 12G**). En raison du pH alcalin de la sève phloémienne, le Fe, le Zn, le Ni, le Mn et le Cu devraient être principalement transportés complexés à des chélateurs. Il a été suggéré que la nicotianamine pourrait être un bon candidat pour lier ces métaux en raison de ses propriétés de chélation à pH basique (Stephan *et al.*, 1996 ; Curie *et al.*, 2009). Cette hypothèse apparaît de plus en plus probable d'autant qu'il existe de plus en plus de preuves en faveur de l'intervention des YSL (OsYSL2 chez le riz, AtYSL1 et AtYSL3 chez *Arabidopsis*) dans le chargement et le déchargement des métaux au niveau du phloème (Koike *et al.*, 2004 ; Waters et Grusak, 2008 ; Curie *et al.*, 2009).



*B) Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds.*

Ce manuscrit aborde la remobilisation des microéléments à partir des organes sénescents, et sa contribution au remplissage des graines chez les plantes annuelles. Ce travail restitue les connaissances, acquises chez différentes espèces, sur les mécanismes généraux et spécifiques impliqués dans la remobilisation des métaux, en mettant tout particulièrement l'accent sur le mécanisme d'autophagie. Ce manuscrit détaille également les méthodologies nécessaires à l'étude des flux de métaux au cours de la formation des graines.

*Cette revue a été acceptée dans Frontiers in Plant Nutrition en Janvier 2014. Sa rédaction a été réalisée par Mathieu Pottier, principalement avec l'aide et les corrections de Sébastien Thomine mais également avec les interventions de Céline Masclaux-Daubresse et de Kokhi Yoshimoto.*





# Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds

Mathieu Pottier<sup>1</sup>, Céline Masclaux-Daubresse<sup>2,3</sup>, Kohki Yoshimoto<sup>2,3</sup> and Sébastien Thomine<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institut des Sciences du Végétal-UPR2355, Saclay Plant Sciences, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> Institut Jean-Pierre Bourgin-UMR1318, Saclay Plant Sciences, Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, France

<sup>3</sup> Institut Jean-Pierre Bourgin-UMR1318, Saclay Plant Sciences, AgroParisTech, Versailles, France

## Edited by:

Marta Wilton Vasconcelos,  
Universidade Católica Portuguesa,  
Portugal

## Reviewed by:

Jean-Christophe Avice, University of  
Caen Basse-Normandie, France  
Kenichi Shibuya, NARO Institute of  
Floricultural Science, Japan

## \*Correspondence:

Sébastien Thomine, Institut des  
Sciences du Végétal-UPR2355, Saclay  
Plant Sciences, CNRS, Avenue de la  
Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France  
e-mail: thomine@isv.cnrs-gif.fr

Seed formation is an important step of plant development which depends on nutrient allocation. Uptake from soil is an obvious source of nutrients which mainly occurs during vegetative stage. Because seed filling and leaf senescence are synchronized, subsequent mobilization of nutrients from vegetative organs also play an essential role in nutrient use efficiency, providing source-sink relationships. However, nutrient accumulation during the formation of seeds may be limited by their availability in source tissues. While several mechanisms contributing to make leaf macronutrients available were already described, little is known regarding micronutrients such as metals. Autophagy, which is involved in nutrient recycling, was already shown to play a critical role in nitrogen remobilization to seeds during leaf senescence. Because it is a non-specific mechanism, it could also control remobilization of metals. This article reviews actors and processes involved in metal remobilization with emphasis on autophagy and methodology to study metal fluxes inside the plant. A better understanding of metal remobilization is needed to improve metal use efficiency in the context of biofortification.

**Keywords:** transition metal, isotopic labeling, nutrient use efficiency, leaf senescence, nutrient fluxes, atg, Fe, Zn

## INTRODUCTION

Micronutrients, such as metals, are essentials for cell functions. Zinc (Zn), which exists only as divalent cation, plays an important role in protein structure and function thank to its Lewis acids properties. Transition metals such as iron (Fe), copper (Cu), or manganese (Mn), which have unpaired electrons that promote their involvement in oxido-reduction reactions, are used in a wealth of biological processes (Pierre and Fontecave, 1999). A third of the proteins characterized at the structural level are metalloproteins, highlighting the need of metals for cell functions (Finney and O'Halloran, 2003).

In plants, transition metal functions are mainly associated to energy production mechanisms, thereby about 80% of Fe in mesophyll cell is localized in chloroplasts (Nouet et al., 2011). Fe is essential for chlorophyll synthesis, nitrogen fixation, DNA replication, reactive oxygen species (ROS) detoxification, and electron transport chain in both mitochondria and chloroplasts (Nouet et al., 2011; Yruela, 2013). Mn plays a central role in the photosystem II (PS II) where it catalyzes water oxidation (Tommos et al., 1998). This element is also involved in sugar metabolism, Mn-superoxide dismutase (SOD), and chloroplastic enzymes such as decarboxylases and dehydrogenases (Luk and Culotta, 2001; Horsburgh et al., 2002; Aggarwal et al., 2012). Cu is integrated into plastocyanines involved in electron transfer of chloroplasts (Yruela, 2013). It plays also an essential role in the cytochrome oxidase of mitochondria (Bleackley and Macgillivray, 2011). Zn is required for carbon fixation through the carbonic anhydrase (Badger and Price, 1994). It is also needed for the Cu/Zn-SOD, transcriptional regulation by zinc-finger DNA binding proteins

and for the turnover of PSII in chloroplasts (Kurepa et al., 1997; Bleackley and Macgillivray, 2011; Lu et al., 2011). Therefore, plants need metals to achieve vital functions in all their organs.

Among all plant organs, seed is a special one because it has to store metals required for germination and during the first days of seedling development. Hence in annual plants, seed formation is a crucial step in which plant sacrifices itself to store nutrients for its offspring. Seed filling depends on nutrient originating from *de novo* uptake by roots or remobilization from senescent organs.

Here, we review genes and processes involved in metal remobilization during seed filling. We will discuss methodologies that can be used to study metal fluxes in plants and thereby determine the relative contribution of uptake and remobilization pathways. Autophagy is a ubiquitous process involved in cellular nutrient recycling. Because it was recently shown to play a critical role in nitrogen remobilization (Htwe et al., 2011; Guiboileau et al., 2012), this review focuses on autophagy as a potential mechanism to make metal available for subsequent remobilization during senescence.

## ORIGIN OF SEED METALS: UPTAKE FROM SOIL VS REMOBILIZATION FROM SENESCENT TISSUES

### CIRCULATION OF METALS INTO THE PLANT AND MICRONUTRIENT USE EFFICIENCY

Understanding metal seed filling requires knowledge on the general micronutrient pathways which was already summarized in several recent reviews (Pittman, 2005; Palmgren et al., 2008; Morrissey and Guerinot, 2009; Puig and Peñarrubia, 2009; Yruela,



2009; Pilon, 2011; Waters and Sankaran, 2011; Thomine and Vert, 2013).

On the whole, both uptake from soil and remobilization from senescent organs may participate in metal loading in seeds (**Figure 1**). To date, little is known about the contribution of metal remobilization from senescent organs to seed filling. In contrast, this topic is well documented regarding nitrogen. It was shown that uptake and fixation of nitrogen dramatically decrease at the onset of reproductive stage in cereals, oilseed rape and legumes (Salon et al., 2011). Accordingly, 50 to 90% of nitrogen grain of rice, wheat, or maize originate from leaf remobilization (Masclaux et al., 2001). This highlights that the importance of nitrogen remobilization for seed filling is conserved in most plants. However, some species, such as oilseed rape, have a low nitrogen remobilization capacity resulting in low nitrogen use efficiency (Schjoerring et al., 1995; Etienne et al., 2007).

As for nitrogen, it is necessary to better understand metal remobilization from senescent organs during seed filling with the aim to increase micronutrient use efficiency in the context of intensive agriculture, fertilization limitations, and biofortification. This is especially important as metal availability may become limiting

under certain environmental conditions (drought, low temperature) and soil characteristics (low metal content, high salt content, ionic unbalance, low pH, high bicarbonate concentration; Chen and Barak, 1982; Karamanos et al., 1986; Graham, 1988; Alloway, 2009).

#### METHODOLOGIES TO DETERMINE NUTRIENT FLUX

The most common way to study nutrient fluxes within the plant is to determine the “apparent remobilization” which consists in the measurement of the total amount of element of interest present in different plant organs at different times (Masclaux-Daubresse et al., 2010). However, this approach does not provide sufficient resolution and does not allow distinguishing nutrients coming from different pathways, such as nutrient uptake from soil and nutrient remobilization from senescent leaves.

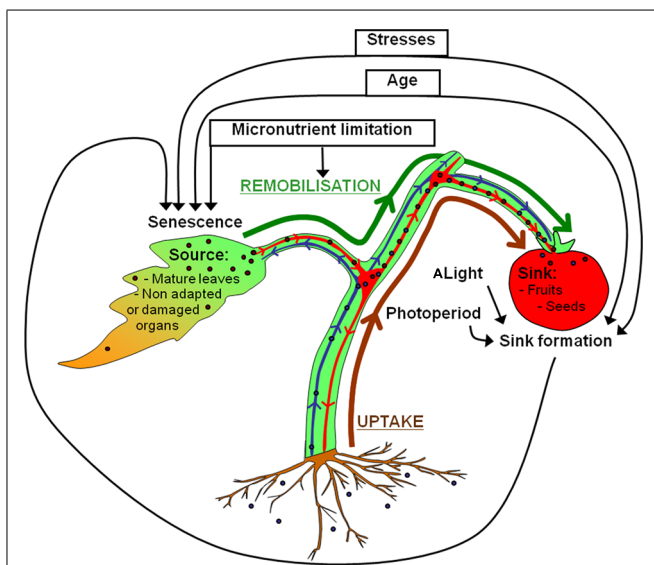
The most appropriate approach to study short-term accumulation, uptake from soil and fluxes between tissues is the use of isotopes as tracers. Isotopic labeling can be implemented with different protocols (Grusak, 1994; Wu et al., 2010; Erenoglu et al., 2011; Hegelund et al., 2012).

Metal fluxes may be monitored by pulse-chase labeling using radioactive or stable isotopes. The  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ , and  $^{68}\text{Zn}$  radioisotopes have been used for pulse labeling on specific organs followed by a chase period to facilitate the identification of source organs contributing to seed filling in peas, wheat and rice (Grusak, 1994; Wu et al., 2010; Erenoglu et al., 2011; Zheng et al., 2012). Following this approach, it was demonstrated that nutrient supply can affect Zn remobilization in wheat (Erenoglu et al., 2011). In rice, differences in Zn remobilization efficiency between genotypes were observed using isotopic pulse-chase on specific organs (Wu et al., 2010).

Recently, pulse labeling using very short life  $\beta^+$  radioisotope like  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{52}\text{Mn}$ , and  $^{62}\text{Zn}$  has been used to image metal fluxes within a plant *via* a real-time and non-destructive technique called Positron-Emitting Tracer Imaging System (Kume et al., 1997; Tsukamoto et al., 2006; Tsukamoto et al., 2009).

Non-radioactive isotope is also used for pulse labeling on specific organs. Application of  $^{65}\text{Cu}$  to one individual leaf of rice allowed to study Cu redistribution between the different leaves during vegetative stage (Zheng et al., 2012). Non-radioactive isotopes can be also added in the nutrient solution for labeling plants early during development in order to monitor nutrient movement during vegetative stages or later at reproductive stage to study remobilization and seed filling. Using Zn isotopes, this pulse-chase approach has been used to quantify the effect of nutrient limitation on Zn fluxes between organs in rice and wheat (Wu et al., 2010; Erenoglu et al., 2011). Moreover,  $^{70}\text{Zn}$  pulse-chase labeling combined with laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry has provided a spatial distribution of Zn within wheat seeds revealing zinc transport barriers during grain filling in wheat (Wang et al., 2010).

Long term labeling in nutrient solution may be performed to address the contribution of uptake from soil to organs during a specific developmental stage, with respect to the contribution of endogenous remobilization. Continuous application of  $^{68}\text{Zn}$  provided evidence that Zn uptake before anthesis contributes to



**FIGURE 1 | Uptake and remobilization pathways involved in seed filling with emphasis on source-sink relationships.** Micronutrients from the rhizosphere (brown arrow) are taken up into roots and transported to the xylem vessels (shown in blue). After xylem loading, micronutrients are translocated into shoots for subsequent unloading. Micronutrients located in the xylem can also be unloaded into the xylem parenchyma of nodes to be transferred to phloem vessels (shown in red) by specific transporters (Sondergaard et al., 2004; Tanaka et al., 2008; Yamaji and Ma, 2009). This is essential for seed filling which is only achieved by the phloem sap (Patrick and Offler, 2001). Phloem micronutrients are unloaded to fill seeds. Because seed filling is also achieved by nutrient remobilized from senescent tissues (green arrow), seed formation requires close synchronization between sink formation and source organ senescence. Age, biotic and abiotic stresses contribute to orchestrate nutrient mobilization during leaf senescence with the formation of reproductive organs and seed filling (black arrows). Light and photoperiod act indirectly on leaf senescence by stimulating the development of the reproductive organs.

more than 50% to the total Zn grain content in rice (Wu et al., 2010). Shorter continuous labeling can also be used to determine the uptake capacity by measuring isotope accumulation in roots (Hegelund et al., 2012) or isotope depletion in the nutritive solution (Erenoglu et al., 2011).

Isotopic labeling is an essential tool to study metal fluxes within the plant but require the availability of enriched isotopes and adequate analytical tools. Initially, isotopic labeling was mainly performed using radioactive isotope despite the risk for humans. Nowadays, enriched stable isotopes are more and more accessible at least for Fe, Ni, Cu, Zn, and Mo. They represent a healthier and less restrictive alternative but their analysis requires the use of mass spectrometry, such as inductively coupled plasma-mass spectrometry.

## THE COUPLING BETWEEN SENESCENCE AND MICRONUTRIENT REMOBILIZATION

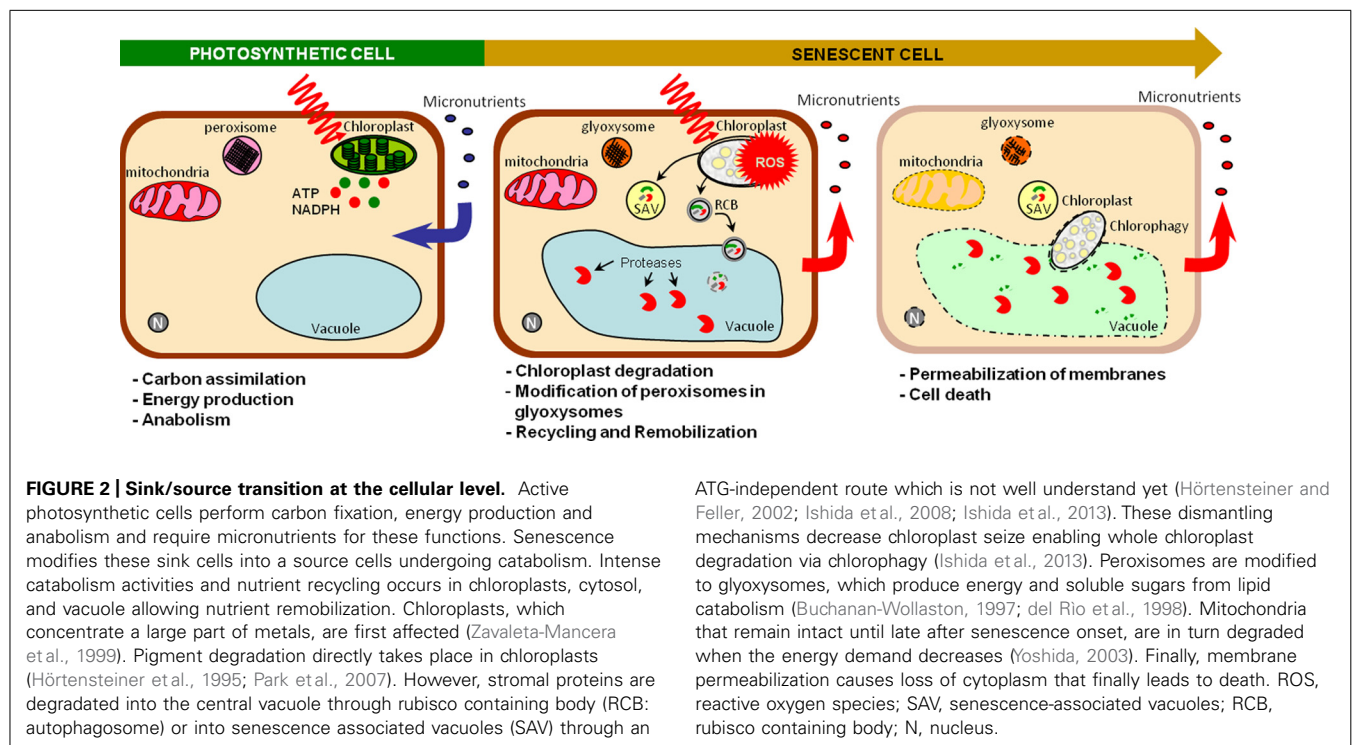
### CONTROL OF SENESCENCE AND REMOBILIZATION AT THE WHOLE PLANT LEVEL

Senescence is an active process controlled by age whereby sink tissues performing photosynthesis and anabolism become source tissues undergoing catabolism (Figure 2). Senescence makes nutrients available for further plant organs (Hörtensteiner and Feller, 2002), contributing to nutrient use efficiency. Optimal remobilization requires close synchronization between sink formation and source organ senescence (Figure 1). It was observed that the removal of sink tissues delays senescence in oilseed rape, soybean and wheat and decrease nitrogen remobilization in oilseed rape and soybean (Patterson and Brun, 1980; Crafts-Brandner and Egli, 1987; Noquet et al., 2004; Htwe et al., 2011). However, senescence and remobilization are also controlled by other

parameters such as nutrient availability (Figure 1). In *Arabidopsis*, nitrogen limitation triggers leaf senescence (Lemaître et al., 2008). In wheat, remobilization of Fe and Zn from flag leaves to seeds is increased under nutrient-limiting conditions (Waters et al., 2009; Wu et al., 2010; Sperotto et al., 2012b). Conversely continuous nutrient uptake during seed formation may account for low nutrient remobilization in some species (Masclaux-Daubresse and Chardon, 2011; Waters and Sankaran, 2011). However, an opposite behavior was observed in barley plants for which remobilization increased upon high Zn supply. This illustrates the diversity of Zn management at the whole plant level (Hegelund et al., 2012). Moreover, other abiotic and biotic stresses such as pathogen attack, high salinity, drought, low temperature, modifications of light intensity, and quality can also cause premature senescence and remobilization (Nooden et al., 1996; Buchanan-Wollaston, 1997; Gan and Amasino, 1997). Because they are sessile, plants developed high plasticity to respond to environment conditions, triggering cell death and remobilization in order to save nutrients and produce more adapted organs and tissues.

### CONTROL OF SENESCENCE AND REMOBILIZATION AT THE MOLECULAR LEVEL

Transcript analysis, comparing green and senescing leaves, led to the identification of senescence-associated genes (SAG) in different species (Hensel et al., 1993; Buchanan-Wollaston, 1994; Smart et al., 1995; Guo et al., 2004; Buchanan-Wollaston et al., 2005; van der Graaff et al., 2006; Breeze et al., 2011). Irreversibly, the expression of genes encoding cysteine proteases is strongly induced in senescent leaves (Hensel et al., 1993; Smart et al., 1995; Bhalerao et al., 2003; Andersson et al., 2004; Guo



et al., 2004; Breeze et al., 2011). As expected, these analyses confirmed induction of genes involved in hormonal pathways (Andersson et al., 2004; van der Graaff et al., 2006; Breeze et al., 2011). Indeed, senescence is regulated by the balance between senescence promoting hormones, namely jasmonic acid, abscisic acid, salicylic acid, and ethylene, and senescence repressing hormones such as cytokinins, auxins, and gibberellins (van der Graaff et al., 2006). As hormones, sugars are known to act as signaling molecules and several lines of evidence indicate that they also contribute to senescence regulation. Sugar concentrations rise in senescent leaves. Moreover, overexpression of hexokinase, a sugar sensor, accelerates senescence whereas anti-sense expression delays senescence in *Arabidopsis* (Nooden et al., 1997; Masclaux et al., 2000; Xiao et al., 2000; Watanabe et al., 2013).

Genes coding metal ion binding proteins such as metallothioneins, ferritins, zinc-finger proteins, metalloproteases (Ftsh) and metal transporters were also frequently found to be upregulated in senescent leaves (Buchanan-Wollaston, 1994; Bhalerao et al., 2003; Andersson et al., 2004; Guo et al., 2004; Zelisko et al., 2005). This may illustrate the involvement of metals in degradation mechanisms and/or the importance of their remobilization (Breeze et al., 2011). Furthermore, these transcriptomic analyses highlighted the significant induction of autophagy related genes (*ATG* genes) and genes encoding NAC and WRKY transcription factors (Andersson et al., 2004; Guo et al., 2004; van der Graaff et al., 2006; Breeze et al., 2011). Whereas NAC have already been demonstrated to be involved in micronutrient remobilization during senescence (Olmos et al., 2003; Guo and Gan, 2006; Uauy et al., 2006; Sperotto et al., 2009, 2010; Waters et al., 2009), nothing is known about the implication of *ATG* genes in this process.

## ROLE OF AUTOPHAGY IN NUTRIENT RECYCLING AND REMOBILIZATION

### INVOLVEMENT OF AUTOPHAGY IN NUTRIENT RECYCLING

Autophagy catabolizes cytoplasmic components that are no longer useful. It eliminates aberrant proteins and damaged organelles for the maintenance of essential cellular function by vacuole internalization mediated by double membrane vesicles called autophagosomes (Yoshimoto, 2012). Genes involved in autophagy (*ATG*) were first defined by a genetic screen in yeast (Matsuura et al., 1997), thereby molecular mechanisms have been well described on this organism (for reviews see Thompson and Vierstra, 2005; Bassham, 2007; Li and Vierstra, 2012; Yoshimoto, 2012). Most of these genes turned out to have conserved functions in all eukaryotic cells. They encode proteins involved in the induction of autophagy, membrane delivery for autophagosome formation, nucleation, expansion, and enclosure of autophagosomes (Thompson and Vierstra, 2005).

Autophagy can be triggered upon nutrient starvation and stress leading to intracellular remodeling, which allows plants to respond to environmental constraints (Yoshimoto, 2012). Accordingly, mutants impaired in *ATG* genes exhibit decreased growth associated with premature senescence when they develop under carbon or nitrogen starvation (Doelling et al., 2002; Hanaoka et al., 2002; Yoshimoto et al., 2004; Phillips et al., 2008; Chung et al., 2010;

Suttangkakul et al., 2011). Plants defective in autophagy are thus unable to cope with nutrient starvation suggesting that autophagy is an important mechanism for nutrient use efficiency and cellular homeostasis.

### AUTOPHAGY CONTROLS NUTRIENT REMOBILIZATION DURING SENESCENCE

During senescence, cytoplasmic components such as organelles are gradually dismantled and degraded. Autophagy is an essential degradation process for nutrient recycling and remobilization. Accordingly, up-regulation of *ATG* genes is observed during leaf senescence in *Arabidopsis* (Doelling et al., 2002; van der Graaff et al., 2006; Chung et al., 2010; Breeze et al., 2011) and the decrease of chloroplast number and chloroplast size during senescence is affected in *Arabidopsis atg4a4b-1* mutant (Wada et al., 2009).

Because of its key role in the degradation of cellular components during nutrient recycling and its up-regulation and involvement during senescence, it was hypothesized that autophagy could play a role in nutrient remobilization. During senescence, autophagy was shown to be involved in the degradation of chloroplasts and specifically of RuBisCO which is the most abundant leaf protein containing about 80% of the cellular nitrogen (Figure 2; Chiba et al., 2003; Ishida et al., 2008; Wada et al., 2009; Guiboileau et al., 2012; Ishida et al., 2013). In addition, pulse-chase experiments in which <sup>15</sup>N labeling was applied in nutrient solution during vegetative stage revealed a significant decrease of nitrogen remobilization from vegetative tissues to seeds in *atg* mutants. These results demonstrated that autophagy is required for nitrogen remobilization and seed filling (Guiboileau et al., 2012).

Chloroplast is the organelle where metals are most intensively used. Thereby about 80% of the cellular Fe is localized in chloroplasts (Nouet et al., 2011). Because autophagy is involved in the degradation of organelles, including chloroplasts, the role of autophagy in metal recycling in source tissues for remobilization to the seeds has to be considered. In plants, autophagy leads to the degradation of autophagosome cargo within the vacuole. Hence, tonoplasmic metal efflux transporters are needed to retrieve metals from the vacuole. Interestingly, transcriptomic analyses that highlight autophagy induction during senescence in *Arabidopsis* leaf also show specific up-regulation of *NRAMP3*, a gene encoding a transporter involved in metal mobilization from vacuoles (Thomine et al., 2003; Lanquar et al., 2005, 2010; Breeze et al., 2011). Availability of metals in source tissues may therefore also be dependent on autophagy and subsequent mobilization from vacuole during senescence.

### REMOBILIZATION AND AUTOPHAGY IN THE CONTEXT OF BIOFORTIFICATION

#### BIOFORTIFICATION TO IMPROVE HUMAN DIET

Key micronutrients are often not sufficiently available in human diet (Kennedy et al., 2003). Over 60% of the world population are Fe deficient and over 30% are Zn deficient (White and Broadley, 2009). Staple food crops such as cereal grains are poor sources of some mineral nutrients, including Fe and Zn. Thus, the importance of cereals in human diet accounts

in large part for micronutrients deficiencies (Gomez-Galera et al., 2010).

Biofortification aims at increasing the availability of key micronutrients such as Fe and Zn in crops (White and Broadley, 2009). For this purpose, conventional breeding and genetic engineering are performed in rice, which is the major staple crop in most countries affected by Fe-deficiency (Juliano, 1993; WHO, 2002; Sperotto et al., 2012a). Single or multiple metal homeostasis genes were already introduced in rice through genetic engineering to improve grain Fe content (Sperotto et al., 2012a). By pyramiding transgenes conferring strong sink strength in seeds, high metal translocation and enhancing phloem unloading during seed maturation, it was possible to increase Fe concentration by 4.4 in rice seeds (Masuda et al., 2012).

### ENGINEERING AUTOPHAGY AS A NEW WAY FOR BIOFORTIFICATION

Another option to increase seed micronutrient content could be to improve their availability in source tissues for remobilization during seed formation. Himelblau and Amasino (2001) showed that senescence of *Arabidopsis* leaves only leads to a decrease by 40% of leaf concentrations of metals such as Mo, Fe, Cu, and Zn. Thus, about 60% of these micronutrients are not remobilized and can therefore not participate to seed filling. Up-regulating autophagy in source tissues specifically during seed formation could improve intracellular nutrient recycling and thereby increase the nutrient pool available for reallocation. However, because autophagy is not specific, this approach may increase seed yield without increasing Zn or Fe concentrations. To improve seed quality, up-regulation of autophagy should be combined with a strategy that specifically targets a metal, such as the expression of ferritin under the control of a seed endosperm promoter in the case of Fe (Sperotto et al., 2012a).

More than thirty genes are involved in autophagy (Yoshimoto, 2012). It might therefore not be straightforward to increase autophagy by overexpressing autophagy related genes during seed formation. However, autophagy is regulated at the post-transcriptional level by the target of rapamycin (TOR) kinase complex (Noda and Ohsumi, 1998; Kamada et al., 2000). Because TOR is a negative regulator of autophagy, its specific inhibition in vegetative tissues during seed formation may be the best approach to stimulate autophagy and nutrient recycling. On the other hand, TOR kinase complex is not a specific regulator of autophagy. It controls many others aspect of metabolism (Diaz-Troya et al., 2008). Besides, autophagy itself is not only involved in nutrient recycling. It also controls the hypersensitive response (Yoshimoto et al., 2009). Therefore, further investigations are necessary to determine if TOR inactivation during senescence is efficient for biofortification and to identify more specific regulators.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Sylvain Merlot and Sara Martins for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from Région Ile-de-France. Research in the CMD and ST laboratories is supported by INRA and CNRS funding and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2011 BSV6 004 01).

### REFERENCES

- Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B. N., Munjal, A. K., Baunthiyal, M., and Sharma, V. (2012). "Metal toxicity and photosynthesis," in *Photosynthesis: Overviews on Recent Progress and Future Perspectives*, eds S. Itoh, P. Mohanty, and K. N. Guruprasad (New Delhi: IK International Publishing House (Pvt) Limited).
- Alloway, B. J. (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ. Geochem. Health* 31, 537–548. doi: 10.1007/s10653-009-9255-4
- Andersson, A., Keskitalo, J., Sjodin, A., Bhalerao, R., Sterky, F., Wissel, K., et al. (2004). A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biol.* 5, R24. doi: 10.1186/gb-2004-5-4-r24
- Badger, M. R., and Price, G. D. (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 45, 369–392. doi: 10.1146/annurev.pp.45.060194.002101
- Bassham, D. C. (2007). Plant autophagy-more than a starvation response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 587–593. doi: 10.1016/j.pbi.2007.06.006
- Bhalerao, R., Keskitalo, J., Sterky, F., Erlandsson, R., Björkbacka, H., Birve, S. J., et al. (2003). Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiol.* 131, 430–442. doi: 10.1104/pp.012732
- Bleackley, M. R., and Macgillivray, R. T. A. (2011). Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biomaterials* 24, 785–809. doi: 10.1007/s10534-011-9451-4
- Breeze, E., Harrison, E., Mchattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., et al. (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* 23, 873–894. doi: 10.1105/tpc.111.083345
- Buchanan-Wollaston, V. (1994). Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus* (identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein). *Plant Physiol.* 105, 839–846. doi: 10.1104/pp.105.3.839
- Buchanan-Wollaston, V. (1997). The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48, 181–199. doi: 10.1093/jxb/48.2.181
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., et al. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42, 567–585. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02399.x
- Chen, Y., and Barak, P. (1982). Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Adv. Agron.* 35, 217–240. doi: 10.1016/S0065-2113(08)60326-0
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N. K., Makino, A., and Mae, T. (2003). Exclusion of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 44, 914–921. doi: 10.1093/pcp/pcg118
- Chung, T., Phillips, A. R., and Vierstra, R. D. (2010). ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. *Plant J.* 62, 483–493. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04166.x
- Crafts-Brandner, S. J., and Egli, D. B. (1987). Sink removal and leaf senescence in soybean: cultivar effects. *Plant Physiol.* 85, 662–666. doi: 10.1104/pp.85.3.662
- del Rio, L. A., Pastori, G. M., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., et al. (1998). The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* 116, 1195–1200. doi: 10.1104/pp.116.4.1195
- Diaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J., and Crespo, J. L. (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4, 851–865.
- Doelling, J. H., Walker, J. M., Friedman, E. M., Thompson, A. R., and Vierstra, R. D. (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 33105–33114. doi: 10.1074/jbc.M204630200
- Erenoglu, E. B., Kutman, U. B., Ceylan, Y., Yildiz, B., and Cakmak, I. (2011). Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root-to-shoot translocation and remobilization of zinc (65Zn) in wheat. *New Phytol.* 189, 438–448. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03488.x
- Etienne, P., Desclos, M., Le Gou, L., Gombert, J., Bonnefoy, J., Maurel, K., et al. (2007). N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Funct. Plant Biol.* 34, 895–906. doi: 10.1071/FP07088

- Finney, L. A., and O'Halloran, T. V. (2003). Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Sci. Signal.* 300, 931. doi: 10.1126/science.1085049
- Gan, S., and Amasino, R. M. (1997). Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiol.* 113, 313.
- Gomez-Galera, S., Rojas, E., Sudhakar, D., Zhu, C., Pelacho, A. M., Capell, T., et al. (2010). Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Res.* 19, 165–180. doi: 10.1007/s11248-009-019311-y
- Graham R. D. (1988). "Genotypic differences in tolerance to manganese deficiency" in *Manganese in Soils and Plants*, eds R. D. Graham, R. J. Hannam, and N. C. Uren (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), 261–276.
- Grusak, M. A. (1994). Iron transport to developing ovules of *Pisum sativum* (I. Seed import characteristics and phloem iron-loading capacity of source regions). *Plant Physiol.* 104, 649–655. doi: 10.1104/pp.104.2.649
- Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M.-P., Avice, J.-C., et al. (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 194, 732–740. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04084.x
- Guo, Y., Cai, Z., and Gan, S. (2004). Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell Environ.* 27, 521–549. doi: 10.1111/j.1365-3040.2003.01158.x
- Guo, Y., and Gan, S. (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.* 46, 601–612. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02723.x
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., et al. (2002). Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiol.* 129, 1181–1193. doi: 10.1104/pp.011024
- Hegelund, J. N., Pedas, P., Husted, S., Schiller, M., and Schjoerring, J. K. (2012). Zinc fluxes into developing barley grains: use of stable Zn isotopes to separate root uptake from remobilization in plants with contrasting Zn status. *Plant Soil* 361, 241–250. doi: 10.1007/s11104-012-1272-x
- Hensel, L. L., Grbic, V., Baumgarten, D. A., and Bleeker, A. B. (1993). Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5, 553–564. doi: 10.1105/tpc.5.5.553
- Himelblau, E., and Amasino, R. M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *J. Plant Physiol.* 158, 1317–1323. doi: 10.1078/0176-1617-00608
- Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Karavolos, M., and Foster, S. J. (2002). Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends Microbiol.* 10, 496–501. doi: 10.1016/S0966-842X(02)02462-9
- Hörtensteiner, S., and Feller, U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* 53, 927–937. doi: 10.1093/jxb/53.370.927
- Hörtensteiner, S., Vicentini, F., and Matile, P. (1995). Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *Brassica napus* L: enzymatic cleavage of pheophorbide a in vitro. *New Phytol.* 129, 237–246. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb04293.x
- Htwe, N. M. P. S., Yuasa, T., Ishibashi, Y., Tanigawa, H., Okuda, M., Zheng, S.-H., et al. (2011). Leaf senescence of soybean at reproductive stage is associated with induction of autophagy-related genes, GmATG8c, GmATG8i and GmATG4. *Plant Prod. Sci.* 14, 141–147. doi: 10.1626/ppls.14.141
- Ishida, H., Izumi, M., Wada, S., and Makino, A. (2013). Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochim. Biophys. Acta* doi: 10.1016/j.bbabo.2013.11.009 [Epub ahead of print].
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., et al. (2008). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* 148, 142–155. doi: 10.1104/pp.108.122770
- Juliano, B. O. (1993). *Rice in Human Nutrition*. Rome: International Rice Research Institute & FAO.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150, 1507–1513. doi: 10.1083/jcb.150.6.1507
- Karamanos, R. E., Kruger, G. A., and Stewart, J. W. B. (1986). Copper deficiency in cereal and oilseed crops in northern Canadian prairie soils. *Agron. J.* 78, 317–323. doi: 10.2134/agronj1986.00021962007800020021x
- Kennedy, G., Nantel, G., and Shetty, P. (2003). The scourge of "hidden hunger": global dimensions of micronutrient deficiencies. *Food Nutr. Agric.* 8–16.
- Kume, T., Matsushashi, S., Shimazu, M., Ito, H., Fujimura, T., Adachi, K., et al. (1997). Uptake and transport of positron-emitting tracer (18 F) in plants. *Appl. Radiat. Isot.* 48, 1035–1043. doi: 10.1016/S0969-8043(97)00117-6
- Kurepa, J., Hérouart, D., Van Montagu, M., and Inzé, D. (1997). Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments. *Plant Cell Physiol.* 38, 463–470. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029190
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., et al. (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 24, 4041–4051. doi: 10.1038/sj.emboj.7600864
- Lanquar, V., Ramos, M. S., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszczay, A., Kramer, U., et al. (2010). Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiol.* 152, 1986–1999. doi: 10.1104/pp.109.150946
- Lemaître, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., and Masclaux-Daubresse, C. (2008). Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassilewskija accession. *Plant Cell Physiol.* 49, 1056–1065. doi: 10.1093/pcp/pcn081
- Li, F., and Vierstra, R. D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci.* 17, 526–537. doi: 10.1016/j.tplants.2012.05.006
- Lu, Y., Hall, D. A., and Last, R. L. (2011). A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1861–1875. doi: 10.1105/tpc.111.085456
- Luk, E. E. C., and Culotta, V. C. (2001). Manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nrapm metal transporter, Smf2p. *J. Biol. Chem.* 276, 47556–47562. doi: 10.1074/jbc.M108923200
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* 105, 1141–1157. doi: 10.1093/aob/mcq028
- Masclaux-Daubresse, C. L., and Chardon, F. (2011). Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62, 2131–2142. doi: 10.1093/jxb/erq405
- Masclaux, C., Quilleré, L., Gallais, A., and Hirel, B. (2001). The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Ann. Appl. Biol.* 138, 69–81. doi: 10.1111/j.1744-7348.2001.tb00086.x
- Masclaux, C., Valadier, M.-H., Brugière, N., Morot-Gaudry, J.-F., and Hirel, B. (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211, 510–518. doi: 10.1007/s004250000310
- Masuda, H., Ishimaru, Y., Aung, M. S., Kobayashi, T., Kakei, Y., Takahashi, M., et al. (2012). Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Sci. Rep.* 2, 543. doi:10.1038/srep00543
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192, 245–250. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00084-X
- Morrissey, J., and Guerinot, M. L. (2009). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem. Rev.* 109, 4553–4567. doi: 10.1021/cr900112r
- Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963–3966. doi: 10.1074/jbc.273.7.3963
- Nooden, L. D., Guaiamet, J. J., and John, I. (1997). Senescence mechanisms. *Physiol. Plant.* 101, 746–753. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01059.x
- Nooden, L. D., Hillsberg, J. W., and Schneider, M. J. (1996). Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiol. Plant.* 96, 491–495. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00463.x
- Noquet, C., Avice, J.-C., Rossato, L., Beauclair, P., Henry, M.-P., and Ourry, A. (2004). Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Sci.* 166, 1007–1018. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.12.014
- Nouet, C., Motte, P., and Hanikenne, M. (2011). Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci.* 16, 395–404. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.005
- Olmos, S., Distelfeld, A., Chicaiza, O., Schlatter, A. R., Fahima, T., Echenique, V., et al. (2003). Precise mapping of a locus affecting grain protein content in

- durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 107, 1243–1251. doi: 10.1007/s00122-003-1377-y
- Palmgren, M. G., Clemens, S., Williams, L. E., Kramer, U., Borg, S., Schjorring, J. K., et al. (2008). Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends Plant Sci.* 13, 464–473. doi: 10.1016/j.tplants.2008.06.005
- Park, S.-Y., Yu, J.-W., Park, J.-S., Li, J., Yoo, S.-C., Lee, N.-Y., et al. (2007). The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell* 19, 1649–1664. doi: 10.1105/tpc.106.044891
- Patrick, J. W., and Offler, C. E. (2001). Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *J. Exp. Bot.* 52, 551–564. doi: 10.1093/jxbot/52.356.551
- Patterson, T. G., and Brun, W. A. (1980). Influence of sink removal in the senescence pattern of wheat. *Crop Sci.* 20, 19–23. doi: 10.2135/cropsci1980.0011183X002000010006x
- Phillips, A. R., Suttangkakul, A., and Vierstra, R. D. (2008). The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 178, 1339–1353. doi: 10.1534/genetics.107.086199
- Pierre, J. L., and Fontecave, M. (1999). Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biomaterials* 12, 195–199. doi: 10.1023/A:1009252919854
- Pilon, M. (2011). Moving copper in plants. *New Phytol.* 192, 305–307. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03869.x
- Pittman, J. K. (2005). Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol.* 167, 733–742. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01453.x
- Puig, S., and Peñarrubia, L. (2009). Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 299–306. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.008
- Salon, C., Avicé, J. C., Alain, O., Prudent, M., and Voisin, A.-S. (2011). “Plant N fluxes and modulation by nitrogen, heat, and water stresses: a review based on comparison of legumes and non legume plants,” in *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*, eds A. Shanker and B. Venkateswarlu (Rijeka: InTech), 78–118.
- Schjoerring, J. K., Bock, J. G. H., Gammelvind, L., Jensen, C. R., and Mogensen, V. O. (1995). Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant Soil* 177, 255–264. doi: 10.1007/BF00010132
- Smart, C. M., Hosken, S. E., Thomas, H., Greaves, J. A., Blair, B. G., and Schuch, W. (1995). The timing of maize leaf senescence and characterisation of senescence-related cDNAs. *Physiol. Plant.* 93, 673–682. doi: 10.1111/j.1399-3054.1995.tb05116.x
- Sondergaard, T. E., Schulz, A., and Palmgren, M. G. (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 136, 2475–2482. doi: 10.1104/pp.104.048231
- Sperotto, R. A., Boff, T., Duarte, G. L., Santos, L. S., Grusak, M. A., and Fett, J. P. (2010). Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains. *J. Plant Physiol.* 167, 1500–1506. doi: 10.1016/j.jplph.2010.05.003
- Sperotto, R. A., Ricachenevsky, F. K., Duarte, G. L., Boff, T., Lopes, K. L., Sperb, E. R., et al. (2009). Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta* 230, 985–1002. doi: 10.1007/s00425-009-1000-9
- Sperotto, R. A., Ricachenevsky, F. K., Waldow, V. D. A., and Fett, J. P. (2012a). Iron biofortification in rice: it’s a long way to the top. *Plant Sci.* 190, 24–39. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.03.004
- Sperotto, R. A., Vasconcelos, M. W., Grusak, M. A., and Fett, J. P. (2012b). Effects of different Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.). *Rice* 5, 1–11. doi: 10.1186/1939-8433-5-27
- Suttangkakul, A., Li, F., Chung, T., and Vierstra, R. D. (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3761–3779. doi: 10.1105/tpc.111.090993
- Tanaka, M., Wallace, I. S., Takano, J., Roberts, D. M., and Fujiwara, T. (2008). NIP6; 1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 2860–2875. doi: 10.1105/tpc.108.058628
- Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J. I., and Barbier-Brygoo, H. (2003). AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J.* 34, 685–695. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01760.x
- Thomine, S., and Vert, G. (2013). Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 322–327. doi: 10.1016/j.pbi.2013.01.003
- Thompson, A. R., and Vierstra, R. D. (2005). Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 165–173. doi: 10.1016/j.pbi.2005.01.013
- Tommos, C., Hoganson, C. W., Di Valentin, M., Lydakis-Simantiris, N., Dorlet, P., Westphal, K., et al. (1998). Manganese and tyrosyl radical function in photosynthetic oxygen evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 244–252. doi: 10.1016/S1367-5931(98)80066-5
- Tsukamoto, T., Nakanishi, H., Kiyomiya, S., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Nishizawa, N. K., et al. (2006). 52Mn translocation in barley monitored using a positron-emitting tracer imaging system. *Soil Sci. Plant Nutr.* 52, 717–725. doi: 10.1111/j.1747-0765.2006.00096.x
- Tsukamoto, T., Nakanishi, H., Uchida, H., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Mori, S., et al. (2009). 52Fe Translocation in barley as monitored by a positron-emitting tracer imaging system (PETIS): evidence for the direct translocation of Fe from roots to young leaves via phloem. *Plant Cell Physiol.* 50, 48–57. doi: 10.1093/pcp/pcn192
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., and Dubcovsky, J. (2006). A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314, 1298–1301. doi: 10.1126/science.1133649
- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.-I., and Kunze, R. (2006). Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* 141, 776–792. doi: 10.1104/pp.106.079293
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., et al. (2009). Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.* 149, 885–893. doi: 10.1104/pp.108.130013
- Wang, Y. X., Specht, A., and Horst, W. J. (2010). Stable isotope labelling and zinc distribution in grains studied by laser ablation ICP-MS in an ear culture system reveals zinc transport barriers during grain filling in wheat. *New Phytol.* 189, 428–437. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03489.x
- Watanabe, M., Balazadeh, S., Tohge, T., Erban, A., Gialavisco, P., Kopka, J., et al. (2013). Comprehensive dissection of spatio-temporal metabolic shifts in primary, secondary and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 162, 1290–1310. doi: 10.1104/pp.113.217380
- Waters, B. M., and Sankaran, R. P. (2011). Moving micronutrients from the soil to the seeds: genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Sci.* 180, 562–574. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.12.003
- Waters, B. M., Uauy, C., Dubcovsky, J., and Grusak, M. A. (2009). Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J. Exp. Bot.* 60, 4263–4274. doi: 10.1093/jxb/erp257
- White, P. J., and Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol.* 182, 49–84. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02738.x
- WHO. (2002). *World Health Report 2002: World Health Report: Reducing Risks to Health Noncommunicable Diseases*. Geneva: World Health Organization.
- Wu, C.-Y., Lu, L.-L., Yang, X.-E., Feng, Y., Wei, Y.-Y., Hao, H.-L., et al. (2010). Uptake, translocation, and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6767–6773. doi: 10.1021/jf100017e
- Xiao, W., Sheen, J., and Jang, J.-C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* 44, 451–461. doi: 10.1023/A:1026501430422
- Yamaji, N., and Ma, J. F. (2009). A transporter at the node responsible for intervascular transfer of silicon in rice. *Plant Cell* 21, 2878–2883. doi: 10.1105/tpc.109.069831
- Yoshida, S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 79–84. doi: 10.1016/S1369526602000092

- Yoshimoto, K. (2012). Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol.* 53, 1355–1365. doi: 10.1093/pcp/pcs099
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., et al. (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16, 2967–2983. doi: 10.1105/tpc.104.025395
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., et al. (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2914–2927. doi: 10.1105/tpc.109.068635
- Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct. Plant Biol.* 36, 409–430. doi: 10.1071/FP08288
- Yruela, I. (2013). Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics* 5, 1090–1109. doi: 10.1039/C3MT00086A
- Zavaleta-Mancera, H., Franklin, K., Ougham, H., Thomas, H., and Scott, I. (1999). Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *J. Exp. Biol.* 50, 1683–1689. doi: 10.1093/jxb/50.340.1683
- Zelisko, A., Garcia-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S., and Funk, C. (2005). AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13699–13704. doi: 10.1073/pnas.0503472102
- Zheng, L., Yamaji, N., Yokosho, K., and Ma, J. F. (2012). YSL16 is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice. *Plant Cell* 24, 3767–3782. doi: 10.1105/tpc.112.103820

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 30 October 2013; accepted: 08 January 2014; published online: 24 January 2014.

Citation: Pottier M, Masclaux-Daubresse C, Yoshimoto K and Thomine S (2014) Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds. *Front. Plant Sci.* 5:11. doi: 10.3389/fpls.2014.00011

This article was submitted to *Plant Nutrition*, a section of the journal *Frontiers in Plant Science*.

Copyright © 2014 Pottier, Masclaux-Daubresse, Yoshimoto and Thomine. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## *PARTIE II : DES VEGETAUX AU SERVICE DE L'ENVIRONNEMENT*

### **I. Des environnements pollués**

Certains éléments indispensables ou non à la faune et la flore, faiblement représentés dans le sol, sont nommés éléments traces (ET) ou éléments traces métalliques lorsqu'il s'agit de métaux (ETM). Ces derniers sont définis comme des éléments représentant moins de 0,1% des atomes présents dans la croûte terrestre. Il arrive parfois que ces éléments soient ponctuellement surreprésentés provoquant des pollutions très persistantes. La surabondance des ETM peut être néfaste pour les végétaux provoquant des chloroses, altérant leur croissance et même leur viabilité. En quelques années, ces polluants peuvent engendrer une véritable modification de la pression de sélection, favorisant le développement d'espèces tolérantes par stratégie d'exclusion ou d'espèces hyperaccumulatrices (Macnair, 1987). Ces ETM en excès sont également toxiques pour les animaux. Le Cd par exemple, peut provoquer des dysfonctionnements des reins, des maladies des os (syndrome Itai-Itai au Japon) ainsi que des cancers (Nordberg, 2009 ; Clemens *et al.*, 2012). Ces pollutions affectent donc la faune soit directement soit indirectement *via* la disparition de certaines espèces végétales. Outre ces bouleversements écologiques, les pollutions aux ETM rendent inexploitable certains sols agricoles, ou en plus faible mesure, modifient les pratiques agricoles afin de satisfaire les exigences en terme de santé publique. Ces modifications profondes mais locales de l'écosystème et des pratiques agricoles ne sont pas les seules conséquences d'une pollution aux ETM. En effet, ces zones contaminées ne correspondent pas à des systèmes isolés. Il existe des échanges avec le reste de l'environnement par le biais de l'air, de l'eau, des animaux et des hommes provoquant le transfert des ETM vers des sols cultivés, des cours d'eau, ou des nappes phréatiques. Ainsi, malgré des interdictions ou des modifications des pratiques agricoles locales, ces pollutions s'avèrent peu contrôlables et peuvent s'étendre, mettant en danger d'autres écosystèmes ainsi que la santé humaine. Les origines de ces pollutions sont multiples. Elles peuvent être issues de phénomènes naturels ou/et être liées aux activités anthropiques bien que ces deux origines soient difficilement dissociables.





### *A) Origines naturelles des pollutions aux ETM*

La composante naturelle de ces pollutions est liée au Fond Pédo-Géochimique Naturel (FPGN) c'est à dire « à la concentration naturelle d'une substance dans un horizon de sol, résultant uniquement de l'évolution géologique et pédologique, à l'exclusion de tout apport d'origine anthropique » (Baize et Tercé, 2002). Ces concentrations varient d'un point à l'autre d'un territoire pouvant aller jusqu'à des seuils toxiques en fonction de différents phénomènes précisés ci-dessous (Baize, 2000).

Le FPGN dépend principalement de la nature de la roche mère ainsi que de son altération et de son érosion au cours du temps. Il est également lié aux cycles biogéochimiques au cours desquels des éléments sont adsorbés par les racines dans tous les horizons avant d'être acheminés dans les plantes puis libérés plus tard soit dans le sol (décomposition des racines) soit à la surface (débris des parties aériennes, litières forestières). Des phénomènes de transferts pédologiques verticaux d'ETM, vers les horizons profonds ou vers les nappes phréatiques peuvent également modifier les concentrations en éléments. Il existe aussi des transferts pédologiques latéraux provoqués par le lessivage des formations superficielles ou par le ruissellement de surface. Des modifications chimiques des éléments du sol liées par exemple aux cycles de réduction/oxydation peuvent également modifier leur rétention et provoquer des redistributions et des accumulations. Enfin, certaines pollutions aux ETM peuvent provenir de poussières et aérosols d'origines lointaines liées aux volcans, aux embruns et aux vents (Baize, 2000).

### *B) Origines anthropiques des pollutions aux ETM*

Les pollutions aux ETM peuvent également être d'origine anthropique (Nriagu et Pacyna, 1988). La forte activité industrielle et le développement urbain des siècles précédents ont concentré et redistribué les ETM. Les activités minières ou métallurgiques ont provoqué des apports massifs et localisés d'origine proche. Des apports diffus aériens tels que des poussières et des aérosols provenant des chauffages ou de moteurs d'automobiles peuvent également contribuer à certaines pollutions. De plus, l'intensification et la modernisation de l'agriculture se sont accompagnées d'une augmentation des apports d'engrais (notamment phosphatés), d'amendements calcaires, de fumiers, de lisiers, d'épandages divers (boues de stations d'épuration ou composts urbains) ainsi que de produits de traitements phytosanitaires.



Or, en raison de leur nature, de leur processus d'extraction, de leur production ou de leur provenance, ces substances sont bien souvent enrichies en ETM et participent de ce fait aux pollutions (Baize, 2000).

Les apports anthropiques de Cd et de Zn proviennent donc essentiellement des activités industrielles, de l'agriculture et des activités urbaines (Baize, 1997). Par exemple, il a été estimé que les émissions anthropiques mondiales de Cd étaient de l'ordre de 30000 tonnes/an à la fin du XXème siècle (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999).

### ***1. L'industrie***

Le Zn a été et est encore un élément très prisé nécessaire à la production de nombreux matériaux notamment sous forme de sulfure de zinc appelé blende ou sphalérite (ZnS). Autrefois, de nombreuses mines d'extraction de calamine étaient exploitées au sud-est de la France sur les sites de St Salvy de la Balme (81), des Malines (30), de l'Argentière (07) et de la Londe Les Maures (83) alors que le raffinage de ce minerai était principalement réalisé dans le nord-est de la France. De nos jours, le principal site industriel traitant le Zn est l'usine métallurgique Nyrstar d'Auby (59). En 2012, elle possédait une capacité de production de 160000 tonnes de Zn/année (Société\_Chimique\_de\_France, 2012).

Tous ces lieux d'extraction et de production du Zn ont subi d'importantes pollutions au Zn avant leur fermeture d'où la mise en place de législation limitant les rejets dans l'environnement. De plus, parce que la présence de Cd est souvent associée à la celle du Zn, toute la filière liée à cet élément peut être source de pollution au Cd notamment au moment du raffinage. Le Cd peut également être relargué lors de la métallurgie du Fe et de l'acier ou lors du raffinage du Pb.



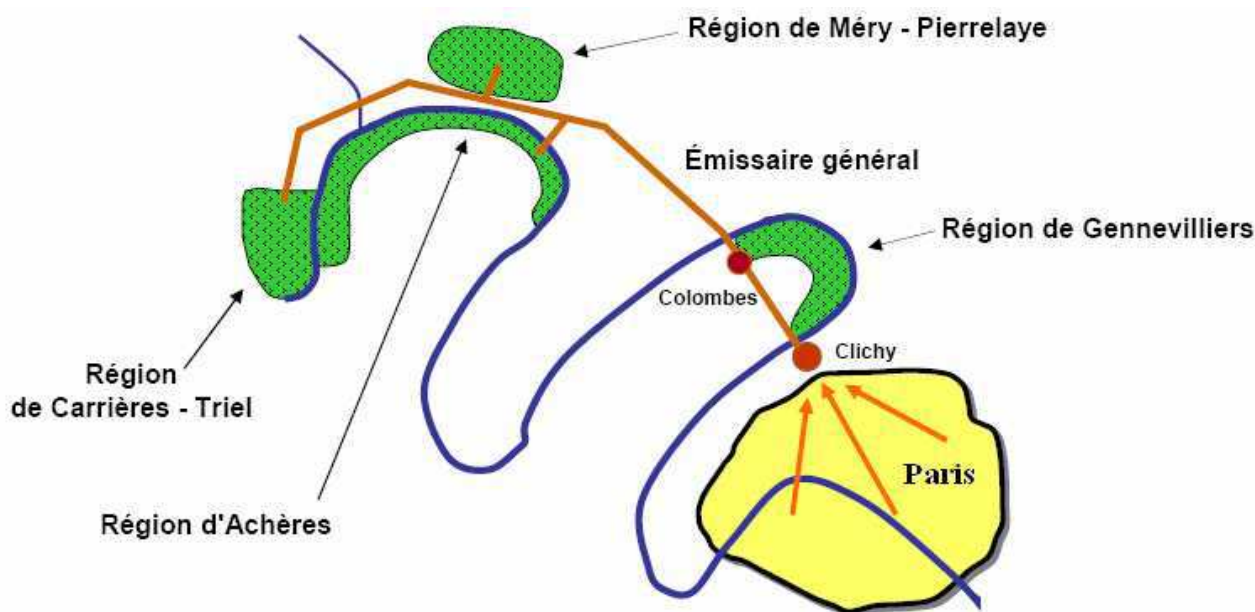
## 2. Les activités urbaines

L'utilisation importante du Zn est principalement liée à sa forme oxydée, imperméable permettant la production de matériaux résistants à l'eau. De ce fait, son usage s'est généralisé en France pour la production de gouttières, de mobiliers urbains et de toitures. Le Zn est également utilisé afin de réaliser des traitements anticorrosifs par galvanisation (techniques-ingénieur, 2013). Il présente aussi un intérêt pour la production de piles électriques, de pigments, de matières plastiques, de caoutchouc et de pneus (Migeon, 2009). Le Cd possédant des propriétés similaires au Zn est utilisé pour des applications semblables.

Ainsi, du fait de l'omniprésence de ces métaux, les effluents urbains se trouvent fréquemment enrichis en Zn et en Cd, qu'il s'agisse des eaux de villes, de boues de stations d'épuration ou des fumées issues de l'incinération de déchets ménagers. Le trafic routier libère également du Zn et du Cd dans l'environnement. L'ensemble des retombées atmosphériques provenant de l'activité industrielle et du trafic urbain représente la source principale de contamination par le Cd dans les zones urbaines (He *et al.*, 2005).

## 3. L'agriculture

Des apports aux champs de Cd ont lieu lors du chaulage et de l'application d'engrais phosphatés parfois fortement contaminés en ETM. Certains d'entre eux peuvent contenir plus de 50 mg de Cd/kg (Mortvedt et Beaton, 1995). En effet, certains ETM initialement présents dans les gisements de phosphate ne sont pas éliminés lors des traitements de concentration permettant de produire des engrais phosphatés. Ainsi, 70% à 100% du Cd initialement extrait comme impureté est retrouvé dans les engrais (Robert et Juste, 1997). Par ailleurs, dans le but d'enrichir en N, P et K les sols cultivés, des boues d'épuration et des composts de déchets urbains et industriels sont parfois épandus sur des sols. Le Zn et le Cd se trouvent aussi acheminés et concentrés dans les sols cultivés *via* l'épandage régulier de lisiers de porc principalement utilisés comme amendement azoté. En excès, ces épandages sont la cause de pollutions aux ETM de nombreux sols agricoles notamment en région parisienne où des eaux usées provenant de la ville de Paris ont été déversées pendant un siècle sur certains sols, les rendant inexploitable pour la culture maraîchère (McBride et Cherney, 2004 ; Tessier, 2009).



**Figure 13** : Système de transport et d'épandages d'eaux usées en région parisienne à la fin du XIXème siècle (Arambourou *et al.*, 2008).

Afin de recycler les eaux usées de la ville de Paris, un émissaire général alimenté depuis Clichy ainsi que deux usines de relevage à Colombes et à Pierrelaye, permettent l'acheminement par gravité des eaux usées au niveau des régions de Gennevilliers, d'Achères, de Mery-Pierrelaye et de Carrières-Triel.

**Tableau III** : Valeurs minimales-maximales des Teneurs Agricoles Habituelles Locales hors périmètre d'irrigation (TAHL) comparées aux valeurs minimales et maximales des teneurs observées dans la plaine de Pierrelaye-Bessancourt (Lamy *et al.*, 2004).

Elément	Nombre d'échantillons	Concentration en mg/km au niveau de l'horizon noir pollué	
		Pierrelaye-Bessancourt	HLTA
Cd	346	0,60-50	0,19-0,42
Cr	270	37-126	15-29
Cu	283	50-800	8-15
Hg	270	0,30-9,4	0,08-0,15
Ni	270	30-51	6-20
Pb	346	80-1500	18-43
Zn	442	150-3600	34-63

### C) *Le cas de la plaine de Pierrelaye-Bessancourt (95)*

La plaine de Pierrelaye-Bessancourt est un territoire situé à l'ouest du département du Val d'Oise. Il est constitué de 2150 hectares de luvisols sableux et a été principalement dédié à la culture maraîchère jusqu'à la fin du XXème (Dère *et al.*, 2006).

Au cours du XIXème siècle, la multiplication par quatre de la population parisienne, l'importante pollution de la Seine par les eaux usées de Paris et l'épidémie de fièvre typhoïde de 1899, amena à envisager une meilleure gestion des déchets urbains. Il fut alors proposé de recycler ces eaux usées pour fertiliser les sols de la région parisienne et augmenter les rendements agricoles (Tessier, 2009). C'est ainsi qu'en 1899, une déclaration d'utilité publique donna l'autorisation à la ville de Paris de mettre en place l'épandage de ses eaux usées brutes, c'est à dire sans traitement préalable, sur les sols agricoles de la plaine de Pierrelaye-Bessancourt (Migeon, 2009 ; Tessier, 2009).

Suite à cette autorisation, l'épandage des boues de Paris vers les zones irriguées de la plaine de Pierrelaye-Bessancourt a été réalisé *via* un émissaire général alimenté depuis Clichy (**Figure 13**). L'épandage continu, pendant un siècle, d'eaux usées même faiblement polluées a progressivement modifié la composition des sols irrigués. Mais c'est seulement en 1997 que des pollutions ETM ont été constatées dans les sols superficiels de la plaine. En 1999 et 2000, les préfets des Yvelines et du Val d'Oise prirent la décision d'interdire la mise sur le marché de cultures maraîchères produites sur ce territoire suivant l'avis du conseil supérieur d'hygiène publique (Arambourou *et al.*, 2008).

De récentes études ont mis en évidence que les cent années d'irrigation de la plaine de Pierrelaye-Bessancourt ont profondément changé la macromorphologie du sol et engendré une contamination importante de l'horizon de surface en Zn, Pb, Cu, Cd, Cr et Ni (Dère *et al.*, 2006 ; Lamy *et al.*, 2006 ; **Tableau III**). Bien que beaucoup d'ETM restent dans la couche supérieure de sol, il est apparu qu'il existe d'importantes migrations de métaux (Ni, Zn, Cu, et Cd) vers les couches inférieures. Il semble également que des quantités importantes de Ni, Cd et Cu ayant quitté l'horizon de surface ne soient pas retrouvées dans les horizons inférieurs, mettant en évidence une importante mobilité de ces éléments et leur possible fuite vers les eaux souterraines (Dère *et al.*, 2006).





## II. Des stratégies de réhabilitation des sols pollués

De nos jours, différentes stratégies sont mises en œuvre pour appréhender la contamination du site de Pierrelaye-Bessancourt et de nombreux sites pollués dans le monde. Comme dans le cas présenté ci-dessus, les pollutions sont bien souvent très complexes impliquant différents ETM mais également des composés traces organiques et des organismes pathogènes (Arambourou *et al.*, 2008). Les activités industrielles métallurgiques de métaux non-ferreux sont généralement à l'origine de pollutions polymétalliques impliquant le Zn, le Cd, le Pb, le Cu, le Ca et l'As, ce qui rend difficile la décontamination de ces sites (Baize, 1997). Pour toutes ces raisons, il apparaît essentiel d'étudier ces sites contaminés ainsi que les différentes stratégies permettant de dépolluer ces sols ou au moins de limiter les flux d'ETM vers le reste de l'environnement.

Le nombre de sites pollués par les activités industrielles, agricoles et urbaines est estimé à plus de 4000 en France et à plus de 400 rien que dans le département du Nord (ministère de l'écologie, 2013). Certains de ces sites ont dores-et-déjà fait l'objet d'interventions de réhabilitation par l'Etat. Ces opérations sont généralement chapeautées par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) en collaboration avec des acteurs privés et publics. Ainsi, depuis 20 ans, l'ADEME est intervenue sur plus de 230 sites pollués en France pour des opérations de mise en sécurité, de surveillance, de maintenance, et de dépollution.

Différentes stratégies de décontamination des sols pollués *in situ* ou par excavation ont déjà été employées. Ces dernières sont généralement regroupées en trois types : les traitements physico-chimiques, les traitements thermiques et les traitements biologiques. Les deux premiers types mettent en jeu des méthodes physiques lourdes, onéreuses et très peu écologiques aboutissant à la production d'un sol stérile non exploitable. C'est pourquoi désormais les études portent principalement sur les traitements biologiques.

Ainsi, depuis la fin des années 1980, des processus de décontamination beaucoup plus écologiques et économiques (10 à 100 fois moins chers) ont vu le jour. Des auteurs ont suggéré de développer la phytoremédiation pour permettre la réhabilitation des zones polluées par l'utilisation de plantes (Cunningham et Berti, 1993). Partant de cette idée, un éventail de stratégies permettant la dépollution des cours d'eau, des nappes phréatiques et des sols a été proposé (Salt *et al.*, 1998) :

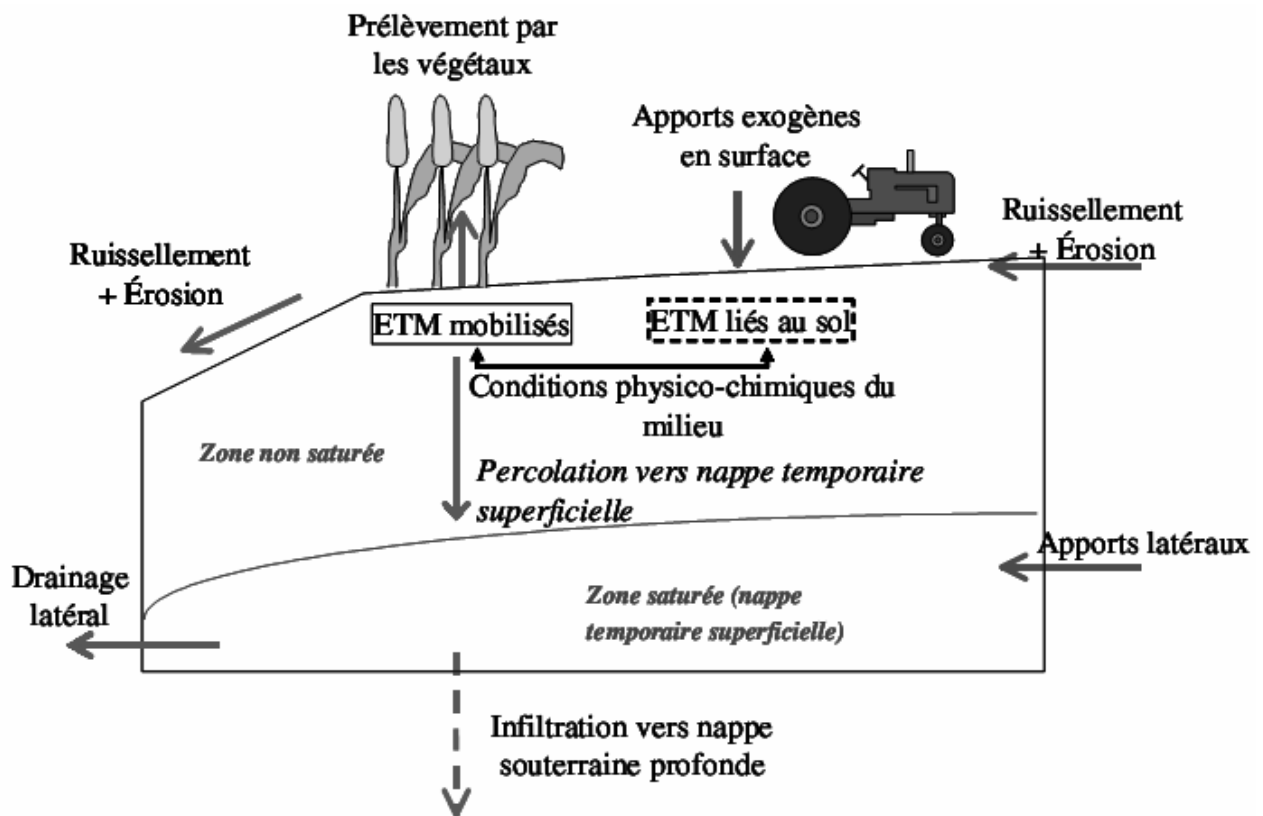
- La phytofiltration utilise les plantes pour assainir des eaux polluées (Dushenkov *et al.*, 1995)



- La phytovolatilisation utilise les plantes pour absorber des polluants au niveau des racines et les diluer dans l'air au niveau des feuilles notamment pour le Hg et le Se (Banuelos *et al.*, 1997 ; Burken et Schnoor, 1999)
- La phytodégradation utilise les plantes pour transformer des polluants du sol en produits moins nocifs *via* des réactions biologiques (Burken et Schnoor, 1997 ; Rugh *et al.*, 1998)
- La phytostabilisation utilise les plantes pour immobiliser les métaux au niveau de leurs systèmes racinaires (Smith et Bradshaw, 1972 ; Vangronsveld *et al.*, 1996). Cette stratégie n'a donc pas pour mission de véritablement dépolluer les sols mais de permettre le contrôle d'une pollution et d'empêcher sa dispersion par lessivage dans les nappes phréatiques ou les cours d'eau.
- La phytoextraction : utilise les plantes afin de prélever et d'accumuler les polluants dans ses parties aériennes (Chaney, 1983 ; Kumar *et al.*, 1995).

Cette dernière stratégie suppose l'utilisation de plantes possédant des systèmes d'absorption, de translocation et de séquestration des polluants efficaces (Salt *et al.*, 1998). L'acidification (par apports d'engrais azotés par exemple) et l'ajout d'agent de chélation peuvent permettre d'améliorer l'efficacité d'absorption des polluants en augmentant leur disponibilité pour la plante (McGrath et Zhao, 2003). Néanmoins, en plus de représenter un coût supplémentaire, l'augmentation de leur mobilité dans le sol peut avoir des conséquences négatives sur l'environnement en provoquant leurs fuites vers les couches profondes ainsi que vers les cours d'eau et les nappes phréatiques (Evangelou *et al.*, 2007). Le choix de l'espèce végétal n'est pas le seul élément à prendre en considération pour réaliser une phytoextraction efficace. La nature du sol et le choix de l'itinéraire cultural incluant la densité de semis et la fréquence de récolte sont également des composantes cruciales de la phytoextraction.

La principale interrogation suscitée par cette stratégie concerne le devenir de la biomasse contaminée. L'incinération apparaît le recourt le plus évident puisqu'il permet de concentrer par un facteur 100 la pollution facilitant ainsi la gestion de ces déchets (Kumar *et al.*, 1995). En fonction de la nature de la pollution, ces cendres enrichies en contaminants n'ont pas la même destinée. Une valorisation est parfois possible pour des cendres contenant des éléments précieux comme le Ni. En effet, au vue des conséquences néfastes sur l'environnement et du prix de l'extraction du minerai de Ni, ce mode de valorisation nommé phytomining représente une alternative rentable et écologique pouvant être appliquée pour des pollutions simples monométalliques comme celles rencontrées en Nouvelle Calédonie ou en Indonésie (Jaffré *et al.*, 2013).



**Figure 14** : Voies de transfert d'ETM dans un sol agricole ayant reçu des apports de surface (d'après Dere *et al.*, 2006).

### III. Les facteurs influençant la biodisponibilité des ETM

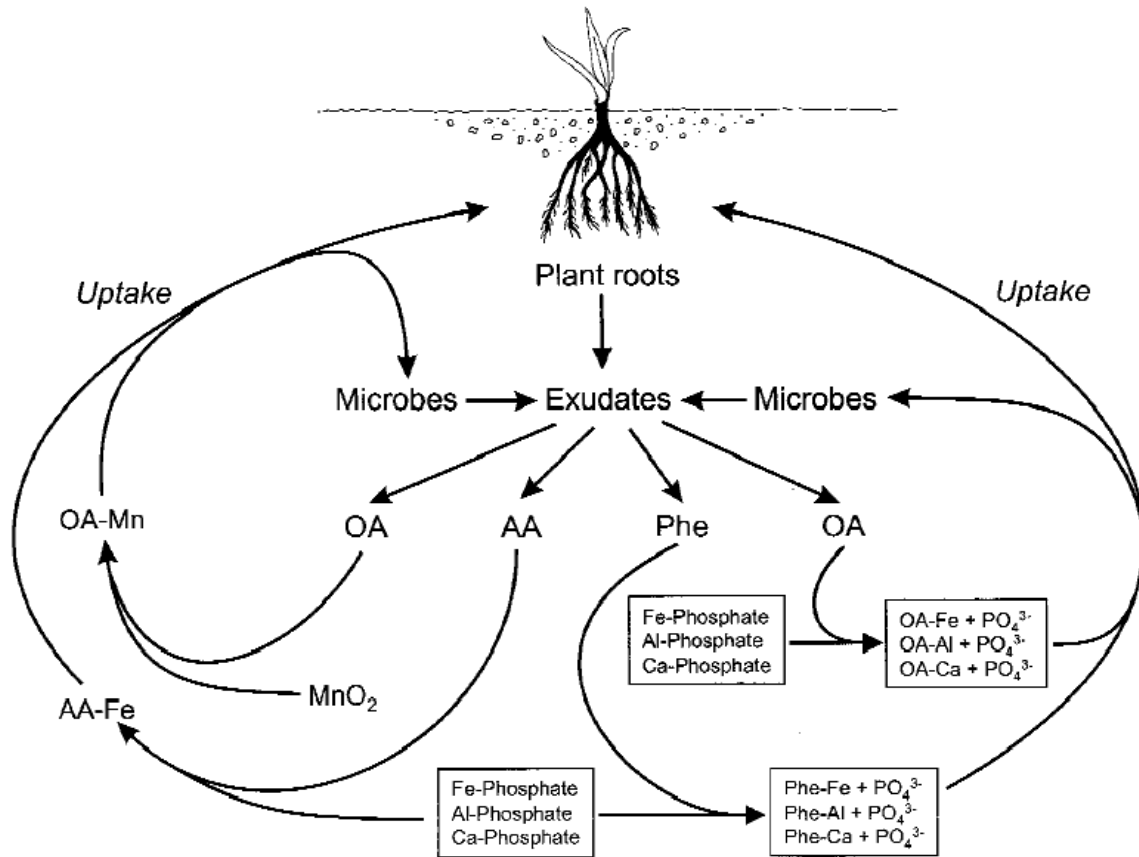
L'efficacité de ces stratégies de phytoremédiation dépend de la biodisponibilité des ETM qui est régie à la fois par des paramètres influençant la mobilité des ETM dans le sol et par des mécanismes mis en place par la plante pour faciliter leur absorption.

#### A) *Mobilité dans le sol*

Les flux d'ETM au niveau d'un sol impliquant le ruissellement, l'érosion, la percolation, l'infiltration, le drainage ainsi que l'absorption par les végétaux sont dépendants de la mobilité des ETM (**Figure 14**). La mobilité d'un ETM dans le sol, dépend de sa spéciation qui est liée en grande partie à la nature du sol et à sa composition chimique.

Un sol est constitué d'un ensemble de compartiments et d'horizons dans lesquels les ETM ne sont pas retenus de la même façon (Juste, 1995). La solution du sol correspond au compartiment de plus faible rétention. En revanche, une fraction importante des ETM se trouve piégée dans les argiles sous une forme très peu disponible, incluse dans des réseaux de silicates ou adsorbée à la périphérie des argiles. Dans les sols calcaires, les ETM peuvent également être retenus par inclusion ou simple adsorption sur les particules de carbonates de calcium (Davis *et al.*, 1987). Suivant les conditions environnementales, les ETM peuvent aussi précipiter dans le sol pour former des composés chimiques peu solubles tels que des sulfures, des phosphates, des hydroxydes, des oxydes ou des sels organiques (McGowen *et al.*, 2001). La matière organique limite aussi la mobilité des ETM, en formant des complexes (Sauve *et al.*, 2000). Cependant, certains acides organiques (acides citrique, oxalique, malique) permettent au contraire d'augmenter la mobilité des ETM et de faciliter leur passage en solution.

Les conditions physicochimiques influencent fortement la spéciation des ETM et ainsi leur mobilité dans le sol. Le pH est le principal facteur modifiant la mobilité des ETM du sol (Ernst, 1996 ; Alloway, 2005). Son abaissement permet la mise en solution des sels minéraux en empêchant leur précipitation. L'augmentation du nombre de protons renforce la compétition pour la fixation aux colloïdes. De ce fait, la concentration en ions métalliques en solution dans le sol augmente. Le potentiel d'oxydoréduction du sol est également très important pour la mobilité, bien que tous les métaux ne réagissent pas de la même manière.



**Figure 15** : Effets des exsudats racinaires sur la biodisponibilité et l'absorption des ETM par les plantes et les microorganismes.

OA: acides organiques, AA acides aminés incluant les acides muginéiques, Phe: composés phénoliques. (Dakora et Phillips, 2012).

Par exemple, le Zn et le Cd apparaissent plus mobiles à l'état oxydé alors que le Mn et le Fe le sont moins. De plus, les constituants même du sol, impliqués dans la fixation des métaux se trouvent aussi affectés par le statut redox (Förstner, 1985). Le potentiel redox étant directement lié à la présence d'oxygène, l'ensemble des phénomènes (pratiques culturales et événements climatiques) affectant l'aération du sol, modifie la mobilité des éléments.

La température agit aussi sur la solubilisation des ETM de façon directe, en déplaçant les équilibres de dissolution-précipitation des composants du sol mais aussi de façon indirecte en modifiant son pH et sa teneur en eau. La température et l'humidité agissent sur l'activité biologique du sol, stimulant la production d'acides organiques (Deneux-Mustin, 2003). Cependant, un excès hydrique peut limiter l'aération du sol et donc diminuer la biodisponibilité des éléments mobiles à l'état oxydé.

### *B) Les mécanismes mis en place par la plante pour améliorer la biodisponibilité des ETM*

Les plantes ont développé différentes stratégies permettant d'augmenter localement la mobilité des métaux du sol, et donc de faciliter leur absorption. Les espèces non graminées répondent à la carence en Fe par l'acidification de la rhizosphère *via* des pompes à protons situées sur les membranes plasmiques des racines (Thomine et Vert, 2013). Cette stratégie permet d'augmenter la mobilité du Fe ainsi que d'autres éléments. Les espèces graminées répondent à la carence en Fe par l'excrétion de chélateurs de la famille des acides muginéiques (MA) qui permettent la solubilisation du Fe, du Zn et potentiellement d'un grand nombre de métaux (Suzuki *et al.*, 2006 ; Curie *et al.*, 2009).

Plus généralement les plantes excrètent des exsudats racinaires permettant de modifier l'environnement de la rhizosphère pour faciliter la mobilité et l'absorption des métaux (Mench et Martin, 1991 ; **Figure 15**). L'excrétion de certaines molécules telles que les acides organiques provoque une diminution du pH, augmente la compétition pour les composants du sol et chélate les métaux pour les rendre plus accessibles (Dakora et Phillips, 2002). D'autres molécules, comme les composés phénoliques, permettent de modifier le statut redox de la rhizosphère (D'Arcy, 1982 ; d'Arcy-Lameta, 1986). Ainsi, chez la luzerne, l'excrétion d'isoflavonoïdes permet de dissoudre le phosphate ferrique rendant le Fe plus accessible pour les plantes (Masaoka *et al.*, 1993). Plus récemment, de nouveaux dérivés de flavines jouant un rôle dans l'acquisition du Fe en conditions limitantes, ont été identifiés chez *Medicago*





*truncatula* (Rodriguez-Celma *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Celma *et al.*, 2013). Chez *A. thaliana*, il a été démontré que l'excrétion racinaire de dérivés de coumarines (polyphénol) *via* le transporteur ABCG37 induit par la carence en Fe, permet d'améliorer l'absorption du Fe (Rodriguez-Celma *et al.*, 2013 ; Fourcroy *et al.*, 2014). Par ailleurs, certains exsudats racinaires provoquent une stimulation du développement de microorganismes modifiant la disponibilité des métaux.

Enfin, il a souvent été observé que l'excès de Zn ou de Ca permet de limiter l'entrée de Cd dans la plante (Antonovics *et al.*, 1971 ; Assunção *et al.*, 2008 ; Küpper et Kochian, 2010). De même, l'excès de Cu, Ni et Zn peut limiter l'accumulation de Fe (Foy *et al.*, 1978). Des études de compétitions ont montré que le Cu, le Fe, le Zn et le Mn sont capables de limiter l'absorption de Cd chez le soja. Ce résultat suggère l'implication de mécanisme de transport commun pour tout ces éléments (Cataldo *et al.*, 1983), bien que le phénomène de compétition peut aussi avoir lieu à d'autre niveau notamment lors de la fixation à la paroi.



## IV. Les plantes utilisées pour la phytoextraction des métaux

### A) *L'utilisation des plantes hyperaccumulatrices*

Dans le but de réaliser la phytoextraction d'ETM, il était initialement proposé d'utiliser des plantes hyperaccumulatrices, capables de concentrer 100 fois plus les ETM que les plantes ordinaires (Salt *et al.*, 1998). Cependant, leur utilisation en champs est limitée par leur faible rendement en biomasse (Ebbs et Kochian, 1997), bien que leur potentiel de croissance et d'accumulation peut être augmenté par l'application d'engrais (Pulford et Watson, 2003).

Ces contraintes font que les plantes hyperaccumulatrices ne sont pas toujours les espèces les plus adaptées au processus de phytoextraction. Il est donc apparu essentiel de tester le potentiel de phytoextraction d'espèces végétales alternatives. En revanche, les hyperaccumulateurs constituent de véritables modèles indispensables pour la compréhension des mécanismes impliqués dans l'accumulation et la tolérance aux métaux (Krämer, 2010). Les connaissances acquises par l'étude de ces espèces permettront peut-être, à terme, l'incorporation des mécanismes d'hyperaccumulation au sein d'une plante à forte biomasse (Salt *et al.*, 1998).

### B) *L'utilisation des espèces à forte biomasse*

En 1996, Punshon décrit pour la première fois le végétal idéal pour la phytoextraction des ETM. Il propose donc d'utiliser une espèce tolérante aux métaux capable de pousser rapidement, sur un sol pauvre en nutriments et possédant un système racinaire profond (Punshon *et al.*, 1996). La possibilité de valoriser la biomasse contaminée produite dans un quelconque processus économique représente également un critère d'importance (Pulford et Watson, 2003). Au vue de ces recommandations, l'utilisation d'arbres pour la phytoextraction est apparue évident. Des études de phytoextraction *in situ* ont déjà été réalisées en utilisant des arbres appartenant à la classe des Magnoliopsida tels que le bouleau (Rosselli *et al.*, 2003 ; Unterbrunner *et al.*, 2007), le saule (Landberg and Greger, 1994 ; Robinson *et al.*, 2000 ; Vyslouzilova *et al.*, 2003 ; Meers *et al.*, 2007) ou le peuplier (Robinson *et al.*, 2000 ; Pulford *et al.*, 2001 ; Di Baccio *et al.*, 2003 ; Sebastiani *et al.*, 2004 ; Laureysens *et al.*, 2005). C'est le peuplier qui a été sélectionné pour notre étude en raison des nombreux avantages qu'il offre et qui seront détaillés ci-dessous.

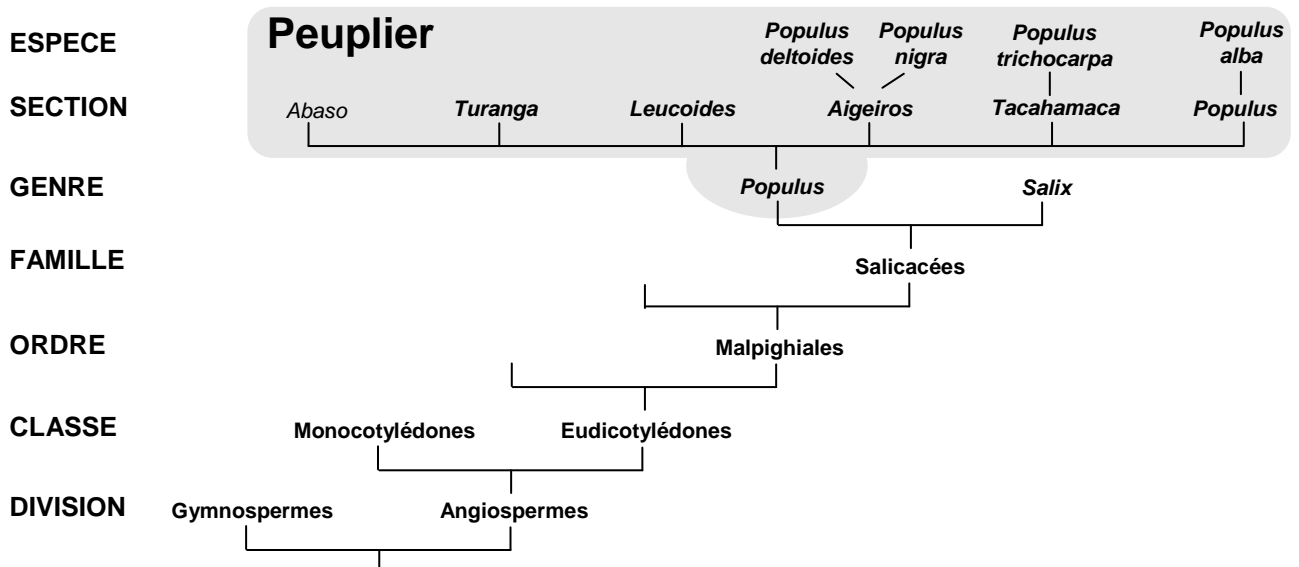


*Populus deltoides*

*Populus nigra*

*Populus trichocarpa*

*Populus alba*



**Figure 16** : La classification des peupliers.

Les peupliers (genre *Populus*) appartiennent avec le saule (genre *Salix*) à la famille des Salicacées. Les différentes espèces de peuplier se répartissent en 6 sections en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et écologiques. Les 4 espèces de peuplier les plus populaires sont représentées sur la figure (D'après Migeon, 2009).

### C) Gros plan sur le peuplier

L'aire de répartition naturelle du peuplier s'étend dans toutes les régions tempérées et froides de l'hémisphère nord, où il s'est implanté au niveau de zones humides, de vallées, de plaines alluviales temporairement inondées ou à proximité de cours d'eau. Bien qu'il ne pousse pas spontanément dans l'hémisphère sud, il a été implanté par l'Homme dans certaines régions de l'Argentine, du Chili et de l'Australie (Dickmann et Kuzovkina, 2008). Cet arbre de pleine lumière, à tronc unique et à feuilles caduques fait partie des arbres de régions tempérées possédant la croissance la plus rapide (Eckenwalder, 1996). Cette caractéristique fait du peuplier une plante pionnière jouant un rôle clé dans la reconstitution des écosystèmes perturbés (Pregitzer et Friend, 1996). *Populus trichocarpa* nisqually qui fut le premier arbre séquencé, possède un génome diploïde de 485 millions de paires de bases réparties sur 19 chromosomes (Tuskan *et al.*, 2006). Son génome a ainsi une taille semblable à celle du génome du riz, mais 4 fois plus importante que la taille du génome d'*Arabidopsis thaliana*. Ce ligneux généralement dioïque peut se multiplier au printemps par reproduction sexuée dès l'âge de 5-6 ans. Le peuplier est également connu pour sa capacité à se multiplier par régénération végétative *via* la production de rejets de souches. Ce phénomène conduit à la production de colonies clonales dont la plus connue est Pando, une colonie de peupliers faux-trembles s'étendant sur 43 hectares dans l'état d'Utah, à l'ouest des Etats-Unis (Tropico, 2013).

Le genre *Populus* regroupe une trentaine d'espèces appartenant à la famille des Salicacées. Les différentes espèces de peuplier sont distribuées en six sections biologiques en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et écologiques (Eckenwalder, 1996 ; **Figure 16**). Les sections Aigeros, Tacahamaca et *Populus* sont celles qui contiennent le plus d'espèces. La section Aigeros comprend notamment *Populus deltoides* (Peuplier deltoïde) et *Populus nigra* (peuplier noir), la section Tacahamaca contient *Populus trichocarpa* (peuplier baumier) et la section *Populus* intègre *Populus alba* (peuplier blanc) et *Populus tremula* (le tremble). Les phénomènes d'hybridation interspécifique sont communs entre espèces d'une même section botanique, mais aussi possibles entre certaines espèces de sections différentes ; notamment celles des sections Aigeiros, Tacamahaca et Leucoides (Cagelli et Lefèvre, 1995). Certains croisements sont toutefois impossibles comme *Populus alba* L. × *Populus nigra* L., d'autres sont unidirectionnels comme *Populus deltoides*. (♀) × *P. nigra* (♂) dont le



croisement à généré des hybrides fixés *P. canadensis* (anciennement *P. euramericana*), comme ‘Serotina’, ‘Robusta’ ou encore ‘I-214’(Migeon, 2009).

Les différentes espèces de peupliers et leurs hybrides associés possèdent des aires de répartition spécifiques. *P. deltoides* et *P. trichocarpa* sont, par exemple, essentiellement retrouvés en Amérique du nord alors que *P. nigra* et *P. tremula* sont principalement situés autour de la Méditerranée.

En France, le peuplier fait partie intégrante du paysage. A l’état naturel, on retrouve principalement le peuplier blanc (*P. alba*), le peuplier tremble (*Populus tremula* L.) et le peuplier noir (*P. nigra*). Le peuplier noir est parmi les trois espèces, la plus représentée en France notamment au niveau des cours d’eau. Le peuplier blanc est retrouvé principalement dans les vallées méditerranéennes mais également le long du Rhône et du Rhin. Le peuplier tremble est un peuplier de type forestier présent dans la majorité des massifs français.

Cependant, le peuplier est également cultivé dans des peupleraies qui rassemblent, dans la majorité des cas, des espèces dédiées à la production de bois. Du fait de son importante biomasse et de la nature même de son bois, le peuplier est en effet une espèce d’intérêt industriel très répandue. Son bois est utilisé dans l’industrie du sciage et du déroulage (emballages légers, contre-plaqués), ainsi que dans l’industrie des panneaux de process (fibres et agglomérés) et de la pâte à papier. La France est un acteur mondial majeur de la production de bois de peuplier avec 22 millions de m<sup>3</sup> de bois sur pied et 1,5 millions de m<sup>3</sup> de bois récolté par an (Dickmann & Kuzovkina 2008). L’importance industrielle et économique du peuplier suscite d’intenses recherches académiques et privées dans le monde entier. De nombreuses études sont menées sur la formation et la qualité du bois, sur les mécanismes d’adaptation à l’environnement et sur les mécanismes de résistance mis en place par le peuplier face aux stress biotiques et abiotiques. Ainsi, le peuplier est devenu la référence des espèces ligneuses et le modèle d’étude de nombreux laboratoires (Bradshaw *et al.*, 2000 ; Taylor, 2002). Des croisements génétiques ont également été réalisés afin de produire des cultivars hybrides satisfaisant les besoins des sylviculteurs (vigueur, résistance aux maladies) et des industriels (qualité du bois...). La plupart de ces hybrides sont issus des croisements entre deux espèces nord-américaines (*P. deltoides* × *Populus trichocarpa* Torr. & Gray ; peupliers interaméricains) ou entre une espèce nord-américaine et une espèce eurasiatique (*P. deltoides* (♀) × *P. nigra* (♂) ; peupliers euraméricains).





### **1. Les atouts du peuplier pour la phytoextraction**

Les avantages du peuplier pour le processus de phytoextraction se situent à différents niveaux. Ses caractéristiques physio-morphologiques constituent des avantages indéniables. En effet, son système racinaire développé permet de contrôler l'expansion de la pollution en limitant le phénomène de lixiviation des ETM et leurs transferts vers des cours d'eau et des nappes phréatiques environnantes. Il permet aussi l'absorption efficace des ETM pouvant se situer à une profondeur de plus de deux mètres (Baize et Tercé, 2002). Bien que ne possédant pas les capacités d'absorption des espèces hyperaccumulatrices, il fait partie des ligneux possédant les plus fortes concentrations en métaux (Migeon *et al.*, 2009). De plus, son importante biomasse et sa croissance rapide lui permettent une accumulation brute d'ETM d'autant plus conséquente. Des études ont également mis en évidence qu'une augmentation par 10 de la concentration en ETM dans le sol n'affecte généralement pas sa croissance (Projet PHYTOPOP ; Laureysens *et al.*, 2004). De plus, sa capacité à produire des rejets à partir de souches permet son exploitation intensive dans des taillis à courte ou très courte rotation qui constitue une pratique culturale déjà mise en place pour augmenter la production de biomasse à valorisation bioénergétique (Macpherson, 1995). Enfin, son aire de répartition naturelle importante à travers tout l'hémisphère nord et sa capacité d'acclimatation sont également des atouts non négligeables permettant son exploitation dans de nombreuses régions du monde.

Un autre atout du peuplier réside dans ses implications économiques et notamment l'existence d'une filière bioénergétique. Dans le contexte actuel de soutien au développement des bioénergies et à la lutte contre l'effet de serre, la production d'énergie thermique par incinération constitue un débouché pour la biomasse issue des cultures de peupliers utilisées pour la phytoremédiation. En effet, des expérimentations menées avec de la biomasse chargée en polluants métalliques démontrent que son utilisation dans des chaudières industrielles classiques est techniquement possible à condition de mettre en place une filtration efficace garantissant des émissions inférieures à 20-30 mg poussières/Nm<sup>3</sup> (Chalot *et al.*, 2013). Les cultures à vocation bioénergétiques sont souvent critiquées du fait qu'elles rentrent directement en compétition pour les sols agricoles avec les cultures d'intérêt agroalimentaire. Cultivés sur des sites pollués, ces peupliers présentent l'avantage de tirer des profits de surfaces non utilisables pour l'agriculture.



Enfin, un autre avantage de l'utilisation du peuplier pour la phytoextraction est qu'il est utilisé comme modèle de ligneux dans de nombreux laboratoires de recherche à travers le monde. Ainsi, on dispose pour cet arbre de connaissances et de nombreux outils non disponibles chez les autres espèces susceptibles d'être utilisées pour la phytoextraction. L'importante diversité génétique rencontrée au sein du genre *Populus* est accompagnée d'une variabilité dans l'accumulation et la tolérance aux métaux rendant possible des études génétiques basées sur les capacités de phytoextraction des ETM (Laureysens *et al.*, 2004 ; Zacchini *et al.*, 2009 ; Migeon *et al.*, 2012). Des cartes génétiques ont ainsi été élaborées chez différentes espèces de peuplier permettant la localisation de loci d'intérêt pour la phytoextraction (Taylor, 2002). Ainsi, Induri *et al.*, (2012) ont récemment identifié des Quantitative Trait Loci (QTL) liés à la tolérance au Cd chez le peuplier. L'identification de telles zones chromosomiques pourrait ainsi permettre l'obtention de peupliers efficaces pour la phytoextraction *via* une sélection assistée par marqueurs. De plus, il est envisageable d'améliorer les capacités de phytoextraction du peuplier par génie génétique. En effet, la transformation par *Agrobacterium* a été mise au point chez le peuplier et permet en quelques mois la production par micro-propagation de nombreux transformants stables (Fillatti *et al.*, 1987 ; Hawkins *et al.*, 2003). De plus, d'abondantes données génomiques sont disponibles chez le peuplier qui fut le premier arbre intégralement séquencé. Outre sa séquence génomique complète et annotée (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html> ; Tuskan *et al.*, 2006), une carte physique associée à une collection de BAC (Bacterial Artificial Chromosome) a été réalisée (Kelleher *et al.*, 2007). De nombreuses ESTs (Expressed Sequence Tag) accessibles à partir du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) sont disponibles pour différentes espèces de peupliers. Enfin, des mesures d'expression par microarray en fonction de l'âge des feuilles (Andersson *et al.*, 2004), en fonction des tissus, des organes et de traitements (Wilkins *et al.*, 2009), notamment par le Cd (Induri *et al.*, 2012), ont été réalisées chez le peuplier. L'ensemble de ces informations représente un atout considérable pour l'étude de la diversité génétique du peuplier et l'amélioration de ses capacités de phytoextraction.



## **2. Les faiblesses du peuplier pour la phytoextraction**

Bien que les quelques études réalisées jusqu'à maintenant aient révélé un potentiel d'accumulation de Cd et de Zn semblable à celui du saule chez le peuplier, elles ont également mis en évidence d'importantes variations entre cultivars en terme de tolérance et d'accumulation de métaux (Robinson *et al.*, 2000 ; Laureysens *et al.*, 2004 ; Mertens *et al.*, 2004 ; Sebastiani *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2005 ; Unterbrunner *et al.*, 2007 ; Dominguez *et al.*, 2008 ; Vandecasteele *et al.*, 2008 ; Castiglione *et al.*, 2009). Cette observation rend donc nécessaire une étude approfondie visant à déterminer le génotype le plus adapté pour la dépollution d'un sol donné. Par ailleurs, plusieurs études indépendantes ont montré que les ETM sont préférentiellement accumulés au niveau des feuilles du peuplier (Drew *et al.*, 1987 ; Mertens *et al.*, 2004 ; Projet PHYTOPOP ; Dominguez *et al.*, 2008). Le peuplier étant un arbre à feuille caduque, l'accumulation d'ETM dans cet organe provoque un retour au sol, limitant le processus de phytoextraction. Ceci est d'autant plus vrai que les concentrations en ETM les plus importantes sont observées au niveau des feuilles sénescentes (Dinelli et Lombini, 1996 ; Laureysens *et al.*, 2004). De plus, malgré des variations entre cultivars, il a été rapporté que le bois constitue l'un des tissus possédant les plus faibles concentrations en ETM (Laureysens *et al.*, 2004 ; Unterbrunner *et al.*, 2007). Il est vraisemblable que le drainage des métaux vers les feuilles *via* le flux de transpiration limite l'accumulation de métaux dans la biomasse pérenne récoltée. Dans un objectif de phytoremediation, il apparaît donc nécessaire d'identifier, de sélectionner ou de créer des peupliers accumulant un maximum de métaux dans les tissus pérennes, accumulant un minimum de métaux dans les feuilles ou remobilisant efficacement les métaux des feuilles vers le bois avant leur chute en automne.



## Objectifs de la thèse

---

Cette thèse a pour but d'apporter des connaissances nécessaires à l'amélioration de l'efficacité de phytoextraction des métaux par le peuplier. Ce processus est principalement régi par trois composantes que sont l'absorption racinaire, la remobilisation à partir des feuilles sénescentes et l'accumulation dans les parties pérennes. Au vue des résultats obtenus lors de précédents travaux, il est apparu essentiel d'étudier le devenir des métaux présent dans les feuilles de peuplier au cours de la sénescence automnale pour limiter le retour au sol des métaux lors de la chute des feuilles. Cette thèse a donc pour objectif l'exploration de la variabilité génétique naturelle dans l'accumulation et la remobilisation des ETM des feuilles chez le peuplier et l'analyse de mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans le contrôle et/ou la remobilisation des métaux des feuilles.

La première partie de cette thèse présente une étude réalisée au champ, visant à identifier des génotypes de peuplier chez lesquels le retour au sol des métaux lors de la chute des feuilles est limité soit par la remobilisation automnale soit par une accumulation foliaire plus faible. Cette étude tire avantage de la parcelle expérimentale mise en place à Pierrelaye en 2007 lors du projet ANR PHYTOPOP. Outre les concentrations en métaux des feuilles, l'expression de gènes potentiellement impliqués dans la remobilisation des métaux des feuilles a été mesurée chez 14 cultivars de peuplier. Au travers d'analyses biostatistiques, cette étude apporte de nouvelles informations concernant la gestion des métaux des feuilles de peupliers notamment pendant de la sénescence.

Au cours de la seconde partie de cette thèse, la caractérisation de protéines de transport supposées jouer un rôle dans le contrôle et/ou la remobilisation des métaux des feuilles de peuplier a été réalisée. Au vue des profils d'expression obtenus au cours de l'étude réalisé au champs, quatre des six membres de la famille NRAMP de peuplier dont les homologues chez *A. thaliana* sont impliqués dans le transport de Mn, Fe, Zn et Cd (Thomine *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2003 ; Lanquar *et al.*, 2004 ; Cailliatte *et al.*, 2009 ; Cailliatte *et al.*, 2010) ont été étudiés par expression en levure, en protoplastes et chez *Arabidopsis thaliana*. Cette étude a principalement porté sur le couple PtNRAMP3.1 et PtNRAMP3.2, homologues d'AtNRAMP3 et d'AtNRAMP4 qui représentent de bons candidats à la remobilisation des métaux au cours de la sénescence monocarpique chez cette *A. thaliana*. En effet des études précédentes ont mise en évidences leurs rôles dans le déstockage du Fe, du

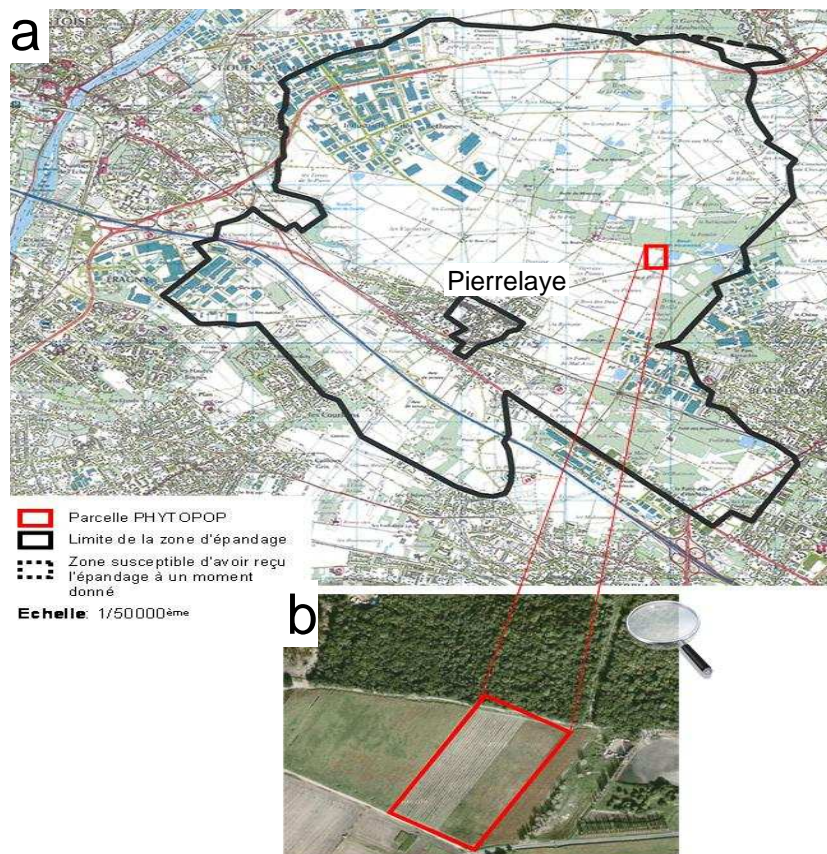




Mn, du Zn et du Cd à partir de la vacuole. Ces travaux ont ainsi permis de déterminer, les capacités de transport, la localisation subcellulaire et les rôles joués par ces protéines dans l'homéostasie des métaux.

Dans une troisième partie, une étude visant à identifier, chez les NRAMP, des déterminants structuraux permettant de discriminer les métaux essentiels des métaux non-essentiels a été entreprise. Cette étude, initiée par Ronald Oomen, a été réalisée sur la protéine tonoplastique NRAMP4 d'*Arabidopsis thaliana*. Un crible génétique de mutants d'AtNRAMP4 exprimés chez la levure a permis d'identifier des déterminants structuraux indispensables au transport du Cd et du Zn chez cette protéine. Mon travail a permis de montrer que le rôle d'un de ces déterminants est conservé chez les NRAMP de différents règnes et d'étudier l'impact de ces mutations au niveau de la plante.

Enfin, cette thèse a exploré le rôle de l'autophagie, un mécanisme cellulaire de recyclage des nutriments, dans la remobilisation des métaux foliaires lors de la sénescence chez *A. thaliana*. Un travail récent a montré que ce mécanisme contrôle la remobilisation de l'azote des feuilles vers les graines au cours de la sénescence chez *Arabidopsis* (Guiboileau *et al.*, 2012). Nous avons testé l'hypothèse que l'autophagie pourrait être impliquée plus généralement dans la remobilisation de l'ensemble des éléments et notamment des métaux. A travers des études de contenus en métaux et des marquages isotopiques réalisés sur des mutants d'*Arabidopsis* déficients pour le mécanisme d'autophagie, ce travail a permis de mettre en évidence un rôle clef de l'autophagie dans la remobilisation des métaux à partir des feuilles sénescents.



**Figure 17** : Parcelle expérimentale de Pierrelaye.

(a) Carte localisant la parcelle expérimentale de Pierrelaye au niveau de la zone ayant été soumise à un siècle d'irrigation par les eaux usées de la ville de Paris (source SIAAP). (b) Photo aérienne de la parcelle de Pierrelaye avant la mise en place du dispositif expérimental.

**Tableau IV** : Génotypes de peuplier implantés sur la parcelle expérimentale de Pierrelaye. D : *P. deltoides* ; DN : *P. deltoides* x *P. nigra* ; T : *P. trichocarpa* ; TM : *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*.

Nom du clone	Espèce	Section	Sexe	Pays
Bakan	TM	<i>Tacahamaca</i>	Mâle	Belgique
Fritzi Pauley	T	<i>Tacahamaca</i>	Femelle	Belgique
Muur	DN	<i>Aigeiros</i>	Mâle	Belgique
Skado	TM	<i>Tacahamaca</i>	Femelle	Belgique
Trichobel	T	<i>Tacahamaca</i>	Mâle	Belgique
Vesten	DN	<i>Aigeiros</i>	Femelle	Belgique
Dvina	D	<i>Aigeiros</i>	Mâle	Italie
I-214	DN	<i>Aigeiros</i>	Femelle	Italie
Lena	D	<i>Aigeiros</i>	Mâle	Italie
Soligo	DN	<i>Aigeiros</i>	Mâle	Italie
Triplo	DN	<i>Aigeiros</i>	Mâle	Italie
Dorskamp	DN	<i>Aigeiros</i>	Mâle	Pays-Bas
Flevo	DN	<i>Aigeiros</i>	Mâle	Pays-Bas
Koster	DN	<i>Aigeiros</i>	Mâle	Pays-Bas

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

Dans cette partie ne seront détaillés que les matériels et méthodes non décrits dans les quatre manuscrits présentés ci-après.

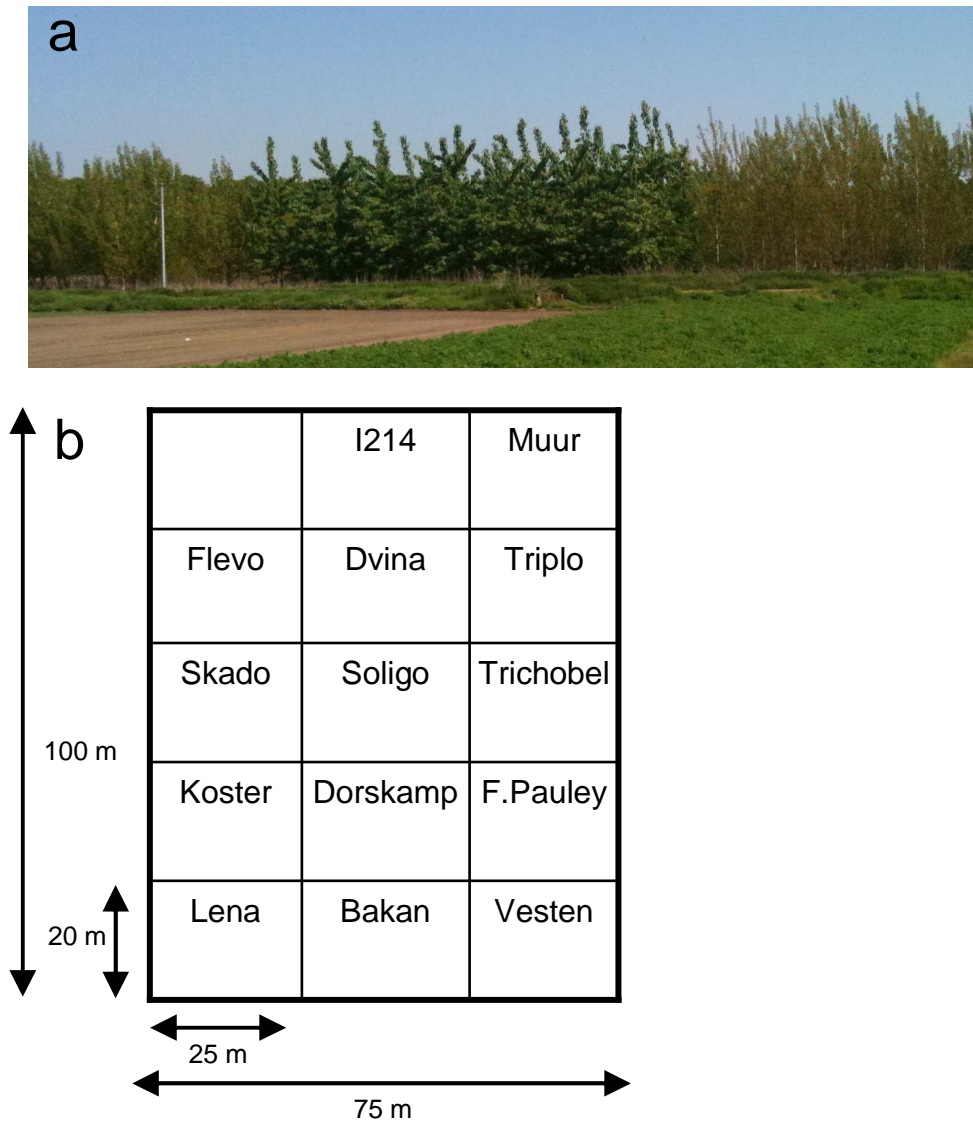
### I. Matériels biologiques

#### A) *Dispositif expérimental de Pierrelaye*

Dans le but d'étudier l'évolution du contenu en métaux foliaires et l'expression de gènes chez différents génotypes de peupliers, un dispositif expérimental implanté au cours du projet ANR PHYTOPOP au niveau de la plaine de Pierrelaye-Bessancourt a été utilisé (**Figure 17** et **Tableau IV**). Les plançons de peupliers ont été plantés en avril 2007 suivant une densité de 1000 tige.ha<sup>-1</sup> correspondant à un taillis à courte rotation. La partie du dispositif expérimental que nous avons utilisée comprend 14 génotypes de peupliers différents répartis en 14 blocs contenant chacun 49 arbres (**Figure 18** et **Tableau IV**). Les feuilles de chaque génotype ont été récoltées régulièrement du débourrement jusqu'à la chute des feuilles en 2011 et en 2012. L'échantillonnage et les méthodes de suivi d'expression de gène, de dosage de métaux et de détermination du SPAD index sont présentés dans le « material et methods » du manuscrit « Control of poplar leaf metal content with a perspective on phytoremediation : natural variations and mechanisms » présenté dans le chapitre III.

#### B) *Souches de levure*

Dans le but de procéder à la caractérisation fonctionnelle des NRAMP, différentes souches mutantes de levure ont été utilisées et sont présentées dans le **Tableau V**. La souche INVSc1 (*trp-*, *leu-*, *his-*) commercialisée par Invitrogen a également été utilisée afin d'effectuer des tests de sensibilité au cadmium.



**Figure 18** : Parcelle expérimentale de Pierrelaye et ses 14 génotypes de peuplier.

(a) Photo du site expérimental de Pierrelaye présentant les génotypes Lena, Bakan et Vesten. (b) Schéma illustrant l'organisation de la parcelle qui est constituée de 14 placettes contenant chacune 49 arbres d'un même génotype.

**Tableau V** : Souches de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) mutantes utilisées pour des tests de complémentation.

Souche	Génotype	Localisation	Métal transporté	Référence
W303-1b <i>smf1</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3 ade2 leu2 trp1 ura3 smf1::URA3 ura3::TRP1</i>	Membrane plasmique	Mn	Supek <i>et al.</i> , 1996 Cohen <i>et al.</i> , 2000
<i>smf2</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3 ade2 leu2 trp1 ura3 smf2::URA3 ura3::TRP1</i>	Compartiment intracellulaire	Mn	Cohen <i>et al.</i> , 2000
DEY1453 <i>fet3fet4</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 can1 his3 leu2 trp1 ura3 fet3-2::HIS3 fet4-1::LEU2</i>	Membrane plasmique	Fe	Eide <i>et al.</i> , 1996a;b
ZHY3 <i>zrt1zrt2</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3</i>	Membrane plasmique	Zn	Zhao et Eide, 1996

### C) Mutants *nramp* d'*Arabidopsis thaliana*

Afin de tester si certain NRAMP de peuplier peuvent se substituer à ceux d'*Arabidopsis thaliana* (Chapitre IV), les mutants *nramp1-1*, *nramp2-1* et le double mutant *nramp3nramp4* d'*Arabidopsis thaliana* Columbia 0 ont été transformés avec les NRAMP de peuplier suivant le protocole modifié de Clough (2005).

Les mutants homozygotes d'insertion d'ADN-T *nramp1-1* (SALK\_053236) et *nramp2-1* (lignée SALK, non répertoriée) *nramp3-2* (SALK\_023049) et *nramp4-2* (SALK\_085986) d'*Arabidopsis thaliana* Columbia 0 ont précédemment été isolés de la collection d'ADN-T SALK (<http://signal.salk.edu/>) (Alonso *et al.*, 1999 ; Alonso *et al.*, 2003). Les mutants *nramp1.1* et *nramp2.1*, précédemment caractérisés (Cailliatte, 2008 ; Cailliatte *et al.*, 2010), ont été fournis par Catherine Curie (BPMP, Montpellier). Le double mutant *nramp3nramp4* d'*Arabidopsis thaliana* Columbia 0 a précédemment été réalisé par croisement des simples mutants d'insertion (Molins *et al.*, 2013).

Dans le but de tester les effets de la modification de sélectivité d'AtNRAMP4 en plantes (Chapitre V), le double mutant *nramp3nramp4* d'*Arabidopsis thaliana* Wassilewskija a été transformé par les différentes versions mutées de ce transporteur suivant le protocole modifié de Clough (2005). Ce double mutant a précédemment été réalisé par croisement des simples mutants d'insertion d'ADN-T *nramp3-1* (Thomine *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2003) et *nramp4-1* (Lanquar *et al.*, 2005).

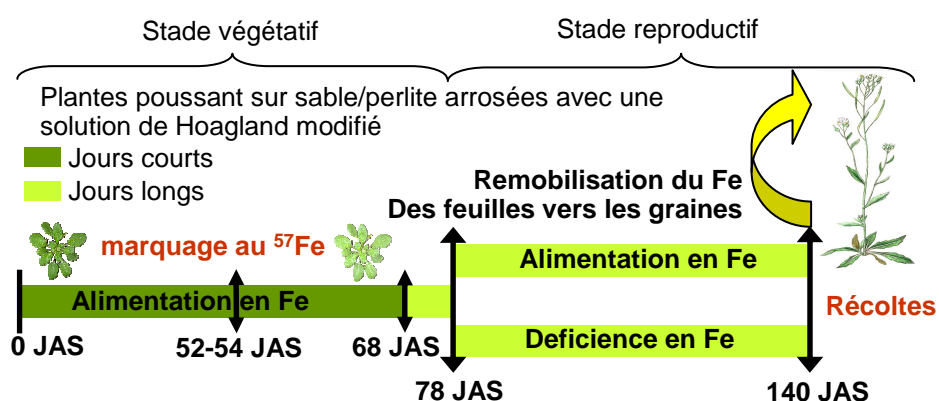
Le génotypage de ces mutants a été réalisé à l'aide des amorces présentées dans le **Tableau VI**.

### D) Mutants et lignées ARNi d'autophagies

Ces lignées gentiment fournies par Céline Masclaux-Daubresse sont présentées dans le « Material et methods » du manuscrit « Autophagy controls Iron Use Efficiency » (Chapitre VI).

**Tableau VI** : Amorces utilisées pour le génotypage des mutants *nramp* d'*Arabidopsis thaliana*

mutant concerné	Nom de l'amorce	Séquence
<i>nramp1.1</i> (Col)	NR1RP	5'-CCCATGATTAACCACCAATG-3'
	NR1LP	5'-TCTCGCACTTCAAAAATACGG -3'
<i>nramp2.1</i> (Col)	AtNR2RP	5'-CATACCTAGCCCAAGTAGGATACTC-3'
	AtNR2LP	5'-CACTAAATATTTCACTTAACTAAAAATCCTC-3'
<i>nramp3-2</i> (Col)	At2g23150_fw1	5-TGTCCCAGAAAAACAAACAAAAC-3'
	At2g23150_rev1	5-TCCTGATTCCAACAAAAGACC-3'
<i>nramp4-2</i> (Col)	At5g67330_fw1	5-AGTCGTCACTTTAGTCGCAGC-3'
	At5g67330_rev1	5-TAAAACGACTTGGCAAACACC-3'
<i>nramp3-1</i> (WS)	N3 Exon3 Fwd	5-GAAATACCGAGTCCAAGAAGC-3'
	N3 3'UTR Rev	5-TCTCGTCTCTGGGACCTAACT-3'
<i>nramp4-1</i> (WS)	NR4I2F	5-TTTGGTCAGACGAAACCCAGT-3'
	JL202	5-CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC-3'



**Figure 19** : Schéma illustrant l'expérience mise en place pour déterminer l'efficacité de remobilisation du Fe en utilisant le <sup>57</sup>Fe.

Les graines ont été semées directement en pots de sable/perlite (1/1). Les plantes se sont développées en jours courts pendant 68 jours après semi (JAS) avant d'être transférées en jours longs. Les plantes ont été arrosées trois fois par semaines pendant deux heures avec une solution de Hoagland modifiée contenant 10 µM de FeHBED. Après 4 jours sans arrosage les plantes ont été arrosées pendant 24h avec une solution marquée de Hoagland modifié contenant 10 µM de <sup>57</sup>FeHBED (enrichi à 96,28%) à 52 et 54 JAS. Suite à ces deux marquages les plantes et le substrat ont été soigneusement lavés quatre fois avec de l'eau MilliQ and une fois à l'aide d'une solution de Hoagland modifié contenant 10µM de FeHBED non marqué afin de retirer le <sup>57</sup>FeHBED non absorbé par les plantes. Les plantes ont ensuite été à nouveau arrosées régulièrement avec la solution de Hoagland modifié contenant 10UM de FeHBED non marqué. Après l'apparition des premières fleurs (78JAS) la moitié des plantes ont été placées en condition de limitation en fer (absence de FeHBED+ 20 µM of ferrozine ) alors que l'autre moitié a été maintenue en condition contrôle jusqu'à la fin de leur cycle de développement. Une fois les plantes sèches, leurs feuilles, leurs hampes florales, leur siliques vides et leurs graines ont été récoltées séparément afin de déterminer leur masse et leur concentration en <sup>57</sup>Fe.

## II. Méthodes

### A) *Conditions de culture*

#### 1. Culture in vitro

Les graines sont stérilisées à l'éthanol 75% contenant 0,5% de SDS et stratifiées pendant 3 jours (4°C, obscurité) avant d'être mises à germer sur des boîtes de Pétri contenant du milieu ABIS (voir la composition en **Annexe II**), supplémenté en Fe<sup>3+</sup>HBED ou en MnSO<sub>4</sub>, ainsi que 0,5% de phytigel (-Fe/+Cd) ou 0,5% d'Agar M lavé (-Mn). Ces boîtes sont placées verticalement en enceinte de culture (photopériode 16h de lumière, 8h d'obscurité, 21°C, 120 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). La solution mère de Fe<sup>3+</sup>HBED (10mM) est préparée en mélangeant du FeCl<sub>3</sub> et du HBED mole à mole mais avec un excès en HBED de 5%, de telle sorte que tous les ions Fe<sup>3+</sup> soient chélatés par le HBED.

Pour étudier l'effet de la carence en manganèse sur les plantules (Chapitre IV), les graines sont semées sur un milieu ABIS contenant de l'agar M lavé (lavage de l'agar M en **Annexe II**), 20 μM Fe<sup>3+</sup>HBED supplémenté avec 25 μM de MnSO<sub>4</sub> (+Mn) ou non (-Mn). L'élongation des racines a été mesurée à 16 jours après semis. Les protocoles concernant les études de carence en fer et d'ajout de cadmium sont décrits dans les « Material and methods » des chapitres IV et V.

#### 2. Culture pour marquage isotopique

Pour étudier l'implication de l'autophagie dans la remobilisation du Fe, un marquage isotopique a été réalisé (Chapitre VII). Les graines ont été stérilisées à l'éthanol 75% contenant 0,5% de SDS et stratifiées pendant 3 jours (4°C, obscurité) avant d'être semées directement en pots de sable/perlite (1/1). Les plantes se sont développées en jours courts pendant 68 jours après semi (JAS) avant d'être transférées en jours longs (**Figure 19**). Les plantes ont été arrosées trois fois par semaines pendant deux heures avec une solution de Hoagland modifiée contenant 10 μM de FeHBED (**Annexe II**). Après 4 jours sans arrosage les plantes ont été arrosées pendant 24h avec une solution marquée de Hoagland modifié contenant 10 μM de <sup>57</sup>FeHBED (enrichi à 96,28%) à 52 et 54 JAS. Suite à ces deux marquages les plantes et le substrat ont été soigneusement lavés quatre fois avec de l'eau





MilliQ et une fois à l'aide d'une solution de Hoagland modifié contenant 10  $\mu\text{M}$  de Fe-HBED non marqué afin de retirer le  $^{57}\text{FeHBED}$  non absorbé par les plantes. Les plantes ont ensuite été à nouveau arrosées régulièrement avec la solution de Hoagland modifiée contenant 10  $\mu\text{M}$  de FeHBED non marqué. Après l'apparition des premières fleurs (78 JAS) la moitié des plantes ont été placées en conditions de limitation en fer (absence de FeHBED + 20  $\mu\text{M}$  of ferrozine) alors que l'autre moitié a été maintenue en conditions contrôles jusqu'à la fin de leur cycle de développement. Une fois les plantes sèches, leurs feuilles, leurs hampes florales, leur siliques vides et leurs graines ont été récoltées séparément afin de déterminer leur masse et leur concentration en  $^{57}\text{Fe}$ .

## *B) Techniques de biochimie*

### *1. Extraction de protéines de feuilles et de racines*

100 à 200 mg de matériel végétal sont broyés à l'aide de billes d'acier inoxydable (1 de diamètre 3 mm et 1 de diamètre 5 mm) dans un vibrobroyeur (Retsch MM301) pendant 2 fois une minute à 25 Hz dans l'azote liquide. Ce broyat est repris dans 200 à 400  $\mu\text{l}$  de tampon d'extraction de protéines (**Annexe II**). Le tout est bien homogénéisé et placé sur une roue à 4°C pendant une trentaine de minutes. Après centrifugation à 10.000g, 5min, 4°C, le surnageant est repris et sa concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford (1976).

### *2. Extraction des protéines de levures*

Les levures ont été mises en culture pendant une nuit à 30°C dans 10 ml de milieu minimum sélectif SD (**Annexe II**). Après centrifugation (1800g, 2 min, 4°C), le culot est placé dans l'azote liquide puis repris dans 80  $\mu\text{L}$  de tampon d'extraction (Urée 8 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH6.8,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5% [v/v]) et incubé pendant 5 min à 65°C. Un volume égal de billes de verre de diamètre 425-600 $\mu\text{m}$  (Glass beads, acid-washed, SIGMA) est ajouté, et le tout est alternativement mélangé au vortex pendant 30 s et chauffé à 65°C pendant 5min, deux fois de suite. Après centrifugation (5 min à 10000g) les protéines du surnageant sont dosées par méthode de Bradford avant d'être reprises dans le tampon de Laemmli (**Annexe II**).



### **3. Séparation des protéines par électrophorèse et western-blot**

Les protéines reprises dans le tampon Leammli (**Annexe II**) sont dénaturées à 95°C pendant 5 min puis séparées sur gel d'acrylamide à 10% (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BIORAD). Pour chaque extrait, la même quantité de protéines est déposée sur le gel. La migration est effectuée à 30mA/gel dans une cuve contenant du tampon d'électrophorèse (**Annexe II**). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose du kit Trans-Blot Turbo Transfer Packs (BIORAD). Le transfert est fait dans une cassette (Trans-Blot turbo-transfer System, BIORAD), 3 min programme turbo. La membrane est saturée par incubation pendant 1 heure à 37°C dans du tampon TBS-T (**Annexe II**) en présence de lait écrémé 5% (w/v). La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps anti-NRAMP4 (1/1000) dilué dans du TBS-T lait 1%. Après 3 lavages de 5 min dans du TBS-T, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (1/10000). Pour finir, 3 lavages sont effectués dans du TBS-T. L'activité peroxydase est révélée par la technique de chimioluminescence (ECL) suivant le protocole fourni par ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) Le marqueur de taille moléculaire utilisé est le Precision Plus Protein Standards, All Blue (BIORAD).



### **Chapitre III : Identification de génotypes de peupliers efficaces pour la remobilisation des métaux au cours de la sénescence foliaire et recherche des gènes associés**

---

Bien que les précédentes études aient mis en évidence de nombreux avantages à l'utilisation du peuplier pour la phytoextraction, plusieurs caractéristiques méritent encore d'être améliorées chez cet arbre. Une phytoextraction efficace suppose en effet, une accumulation préférentielle des ETM dans les parties récoltables du peuplier, à savoir, le tronc et les branches. Cependant les données actuelles indiquent que le bois constitue l'un des tissus possédant les plus faibles concentrations en ETM (Laureysens *et al.*, 2004 ; Unterbrunner *et al.*, 2007), alors qu'au contraire les feuilles en accumulent d'importantes concentrations notamment au cours de la sénescence (Dinelli et Lombini, 1996 ; Laureysens *et al.*, 2004). L'amélioration de l'efficacité de phytoextraction du peuplier nécessite donc d'augmenter les concentrations d'ETM dans les parties pérennes et de diminuer leur accumulation dans les feuilles tout particulièrement avant leur chute. Pour cela les mécanismes moléculaires impliqués dans les trois composantes « Absorption à partir du sol », « remobilisation à partir des organes sénescents » et « accumulation au niveau des tissus pérennes » devront faire l'objet d'études approfondies. En effet, l'obtention du peuplier idéal que ce soit par sélection assistée par marqueurs ou par modification génétique requiert l'identification des gènes responsables du phénotype désiré.

Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude *in situ* visant à identifier parmi 14 génotypes de peupliers, des cultivars possédant soit une faible accumulation d'ETM dans les feuilles soit une capacité à remobiliser les ETM des feuilles au cours de la sénescence automnale. Outre les concentrations en métaux, l'expression de gènes potentiellement impliqués dans le contrôle ou la remobilisation des métaux des feuilles a également été mesurée. A travers des études de corrélations et des analyses en composantes principales, nous avons tenté de mieux comprendre la gestion des métaux des feuilles de peupliers.



## **Article I**

### **Control of poplar leaf metal content with a perspective on phytoremediation: natural variation and molecular mechanisms**

*Mathieu Pottier<sup>1</sup>, Vanesa S. García de la Torre<sup>2</sup>, Cindy Victor<sup>1</sup>, Laure David<sup>1†</sup>, Michel Chalot<sup>3</sup>, Sébastien Thomine<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institut des Sciences du Végétal, Saclay Plant Sciences, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France ;

<sup>2</sup>Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano 115-bis, 28006 Madrid, Spain ;

<sup>3</sup>Université de Franche-Comté UFR Sciences et techniques UMR6249 Laboratoire Chrono-environnement, 4 place Tharradin, 25 211 Montbéliard, France.

†current address : Institut Jean-Pierre Bourgin-UMR1318, Saclay Plant Sciences, INRA-AgroParisTech, Versailles, France

#### **Correspondence to:**

Mathieu Pottier

Email : [mathieu.pottier@orange.fr](mailto:mathieu.pottier@orange.fr)

*Ce travail est présenté sous forme d'un manuscrit qui sera prochainement soumis à « Environmental Pollution ». Les premiers tests de q-RT-PCR ont été effectués par Laure David. Les expérimentations ont été réalisées par Mathieu Pottier et sa stagiaire Cindy Victor. L'analyse brute des données a été effectuée par Mathieu Pottier. Les analyses de corrélations et les ACP ont été menées par Vanesa S. García de la Torre. La rédaction de ce manuscrit a été réalisée par Mathieu Pottier avec l'aide et les corrections de Sébastien Thomine.*





**ABSTRACT**

The possibility to use poplar to rehabilitate trace element polluted soils by phytoextraction has been investigated for over a decade. Previous studies have shown that poplar accumulates a significant amount of metals in its leaves, which can limit phytoextraction because of autumnal leaf abscission. In this context, experiments have been conducted in a metal contaminated field during two years. We observed large differences in senescent leaf metal concentrations among the 14 genotypes analyzed. During senescence, significant apparent remobilization of leaf Mg was observed, but no genotype robustly remobilized trace elements, except for Cu. Correlation analysis highlighted common leaf metal management between Mg and Cu, between Cu and Fe as well as between Cd, Zn and Mn suggesting the involvement of broad specificity transporters or general non-specific mechanisms. To investigate the molecular mechanisms involved in leaf metal management, the expression of genes putatively involved in leaf metal homeostasis and nutrient remobilization was monitored. Gene expression correlation and principal component analyses (PCA) highlighted strong relationships between *PtNRAMP2*, *PtHMA1* and *PtNRAMP3.1* genes on one hand and between *PtNAP*, *PtCP*, *PtHMA2* and *PtNRAMP3.2* genes, on the other hand. Genes in the same cluster may participate in common processes. Interestingly, strong positive correlation specifically between *PtNRAMP1* expression and Zn bio-concentration factor in leaves was observed suggesting an involvement of this transporter in Zn accumulation in poplar leaves. Using metal concentration and gene expression levels as parameters, PCA allowed distinguishing poplar genotypes showing distinct metal management that could account for the well documented diversity of metal concentration and tolerance in the poplar genus.

**Keywords:** remobilization, zinc, cadmium, copper, manganese, iron, *NRAMP*, *HMA*, *NAP*

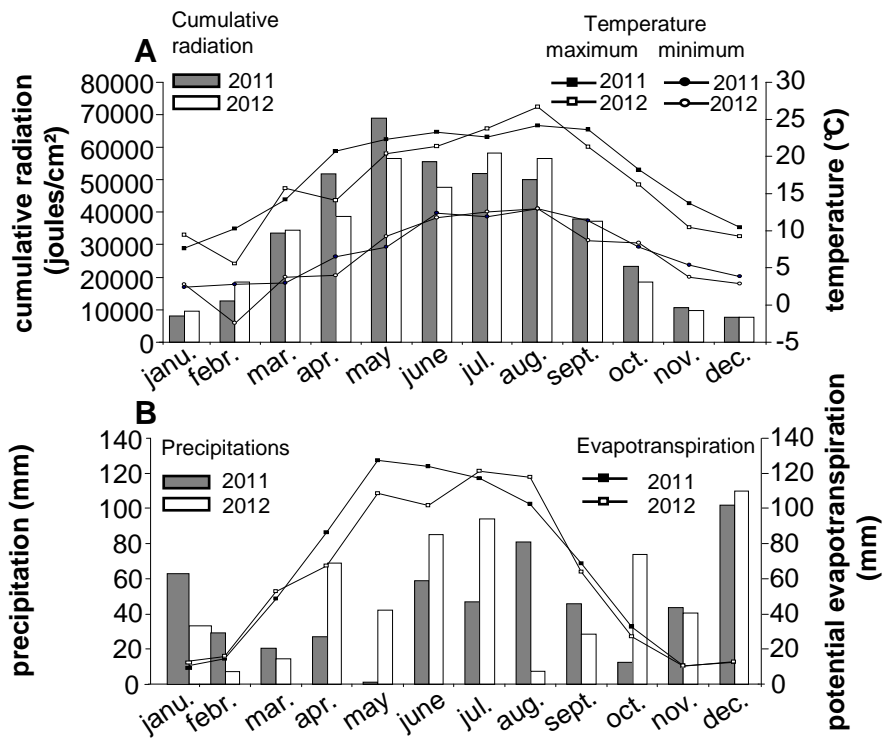


## **INTRODUCTION**

During the last century, anthropic activities through power stations, heating systems, metal-working industries, waste incinerators, urban traffic, cement factories and the use of phosphate fertilizers have released trace metals into the environment leading to persistent pollutions (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999). It has been proposed to use plants to extract metals and clean up contaminated soils (Chaney, 1983 ; Kumar *et al.*, 1995). The ideal plant for this strategy called phytoextraction was first described by Punshon (1996), who suggested to use fast growing plants with deep roots, able to grown on nutrient poor soils and having metal tolerance traits. Obviously, ideal plants should also have high biomass production and be able to accumulate significant metal concentrations in their harvestable parts ; moreover it should be possible to valorize contaminated biomass (Clemens *et al.*, 2002 ; Pulford and Watson, 2003). Although no plant that combines all these criteria has been described, the use of trees, such as poplars, appeared to be an interesting starting point, which could be improved by selection and by genetic engineering. However, the improvement of poplar phytoextraction efficiency requires extensive knowledge of metal homeostasis in this tree. What are the mechanisms for metal uptake in roots, distribution and storage in the trunk, branches and leaves? To date, little is known about the molecular mechanisms controlling metal homeostasis in poplar, while studies focus mainly on hyperaccumulators species for phytoextraction or on crop plants for biofortification.

Because poplar harvestable parts correspond to the wood which can be safely and profitably used for energy production (Chalot *et al.*, 2012), optimal poplar phytoextraction requires metal accumulation in the trunk and branches. Although, poplar displays relatively high metal bio-concentration factors and translocation efficiencies (Laureysens *et al.*, 2004 ; Dominguez *et al.*, 2008), the lowest metal concentrations are found in the wood (Laureysens *et al.*, 2004 ; Unterbrunner *et al.*, 2007). In contrast, the highest metal concentrations are usually observed in senescing leaves (Drew *et al.*, 1987 ; Mertens *et al.*, 2004 ; Dominguez *et al.*, 2008), with significant differences between genotypes (Dinelli and Lombini, 1996 ; Laureysens *et al.*, 2004 ; Zacchini *et al.*, 2009). Thus, increasing poplar phytoextraction efficiency requires not only to improve metal uptake from soil but also to limit metal accumulation in leaves and/or to enhance remobilization of metals during leaf senescence.

This study aims to better understand leaf metal homeostasis in deciduous trees and its variation across the natural diversity, with emphasis on metal fate during the autumnal leaf senescence. For this purpose metal concentrations in leaves of 14 poplar genotypes growing on a metal contaminated field were monitored during leaf development from emergence until



**Fig. 1.** Monthly climate data at a measuring station located at 10 km of the Pierrelaye experimental field during 2011 (black diagram and closed square) and 2012 (white diagram and open square). Average cumulative radiation and minimum and maximum daily mean temperature are shown in **A**. Average precipitation and potential evapotranspiration are shown in **B**.

abscission. The involvement of candidate genes in the control of leaf metal concentrations was also investigated by monitoring their expression and correlating it to metal concentrations. Several putative metal transporter genes were selected based on poplar transcriptomic data and functional knowledge acquired in others species. In addition, we analyzed the expression of a NAC transcription factor, whose homologues in other species are involved in leaf senescence and nutrient remobilization. Knowledge of metal fate during leaf senescence should allow a better estimation of the limitation of poplar phytoextraction efficiency related to leaf abscission. The understanding of the molecular mechanisms in metal homeostasis network will allow improvement of poplar phytoextraction efficiency using natural variation or/and genetic engineering.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Experimental field and poplar genotypes*

Poplars grew on an experimental field located in Pierrelaye, in the northwest suburban area of Paris (France) where raw wastewaters containing minerals and organic matter have been spread from 1899 to 2002. This irrigated sandy soil, which was used for vegetable production until 1970, accumulated significant amounts of noxious elements: its analysis reveal a strong enrichment in organic matter, secondary carbonates and trace elements in the surface horizons (Dère *et al.*, 2006 ; Lamy *et al.*, 2006). Poplars were planted in April 2007 at a density of 1000 stems.ha<sup>-1</sup>, typical for a short rotation coppice. Poplar genotypes were chosen for the PHYTOPOP project according to their bio-concentration factors and to cover poplar genetic diversity within the limits imposed by French regulation for poplar culture. Each of the 14 genotypes is growing on an independent plot, containing 49 trees. Details on genotypes are given on **SI Table I**. Radiation, temperature, precipitation and evapo-transpiration data were provided by Météo-France at a point located at Achères, which is situated 10km south-west of the experimental field of Pierrelaye (**Fig. 1**).

### *Sampling*

Leaf blades of 14 different genotypes were harvested regularly during leaf development from April to October (2011) or November (2012), i.e. until leaf abscission. For each genotype, four trees were randomly selected. For each of these clones, 8 leaves located between 1.5 to 2.5 meters from the ground were collected. A portion of each of these 8 leaf blades was directly frozen together for subsequent RNA extractions. The rest of leaves were washed in milliQ water, wiped and dried at 60°C for 3 days. Before metal measurement, equal



leaf blade area was collected for each leaf using a punch. As for gene expression, metal concentration measurements were performed on pools of the eight samples coming from the same tree.

#### *Chlorophyll content/SPAD Index*

Leaf chlorophyll content was monitored using a SPAD chlorophyll meter (SPAD-502 Plus model, Konica Minolta, Japan), which measures leaf transmittance in two wavelength regions (650 and 940 nm) of maximum light absorbance by chlorophyll a and b (Konica Minolta Sensing Inc. 2003).

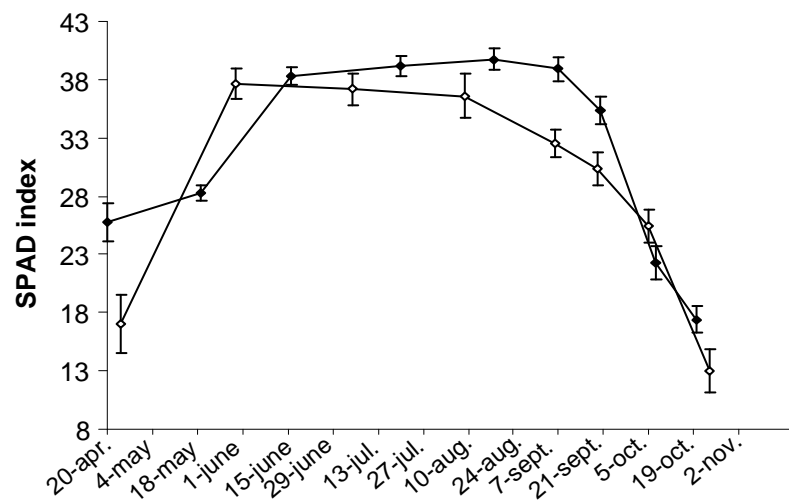
#### *Metal concentration analysis*

After weight measurement, dried samples were digested in 2 ml of 70 % nitric acid in a DigiBlock ED36 (LabTech, Italy) at 100°C for 1 hr, 120°C for 6 hr and 80°C for 1 hr. After dilution in trace metal-free water, the metal content of the samples was determined by atomic absorption spectrometry using an AA240FS flame spectrometer (Agilent, USA).

#### *Gene expression*

Total RNA was extracted using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Buffer RLC was supplemented with 10 mg/mL of PEG 6000 to scavenge secondary compounds. Genomic DNA contaminations were eliminated directly on spin column using the RNase-Free DNase Set (Qiagen). RNA quality and quantity was checked using nanodrop and agarose gel separation following denaturation during 10min at 80°C. 5µg DNA-free RNA was used for reverse transcription by the SuperScript III First-Strand synthesis kit (Invitrogen). Because specific primers were designed on non conserved areas including 5'UTR and 3'UTR, reverse transcriptions were performed using random hexamers, allowing comparison of expression between different genes despite different amplicon localizations on cDNAs. Gene-specific PCR primers were designed according to the transcript sequences (size, about 200 bp ; melting temperature, 60°C) using OligoPerfect™ Designer (<http://tools.lifetechnologies.com>). All q-RT-PCR primers are listed in **SI Table II**. One-sixth of the cDNAs was used as template in 10µl q-PCR reactions performed on a Roche LightCycler480 using Roche reagents, according to the manufacturer's instructions (<http://www.roche.com>). For each poplar cultivar, primer specificity was confirmed by analysis of the melting curves and sequencing of the PCR products. Relative transcript levels were calculated relative to *EF-1A*, *PP2A* and *UBC10* previously selected for poplar growing





**Fig. 2.** Evolution of leaf chlorophyll content monitored by SPAD chlorophyll meter averaged from 14 poplar genotypes growing on Pierrelaye contaminated field in 2011 (closed symbol) and 2012 (open symbol). Error bars represent SE (n=56).

under Cd-stress (Basa *et al.*, 2009). For each poplar cultivar, primer amplification efficiencies were determined using five standards from serial dilutions of a pool including the 4 biological repetitions used for gene expression (x2 technical repetitions). Primer combinations had at least 85% efficiency. Genes encoding NRAMP and HMA transporters and PtCP were previously identified (Couturier *et al.*, 2010 ; Migeon *et al.*, 2010). PtNAP (XP\_0023150) was identified based on protein sequence homology with AtNAP/ANAC092 (CAA10955) from *Arabidopsis thaliana*.

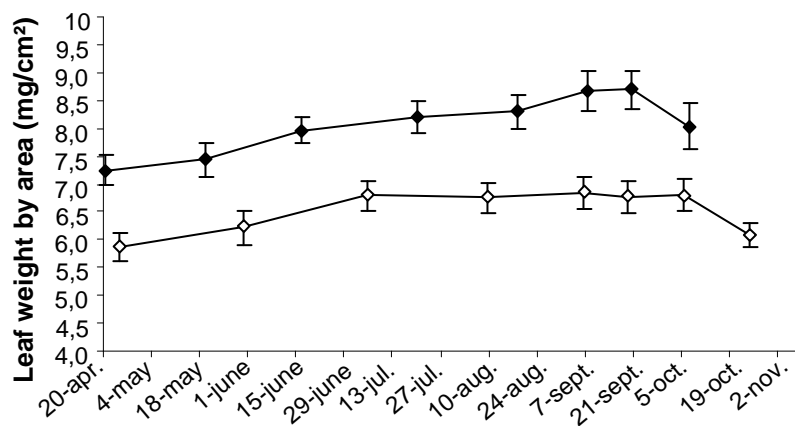
### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Metal evolution (ME) during senescence in poplar leaves was calculated for each metal using the following equation:  $ME = [(metal\ concentration_{last\ harvest} / metal\ concentration_{harvest\ with\ max\ SPAD\ index}) \times 100] - 100$ . Pearson correlation analyses were performed, considering significant correlation at 0.01 for metal correlation analysis and both 0.01 and 0.05 for gene expression correlation analysis. A factorial analysis using the principal component analysis method (PCA) was carried out for each season in order to classify the different genotypes according to the major components of variability and the different parameters. The components identified were represented in a 3D-scatter plot to visualize associations.

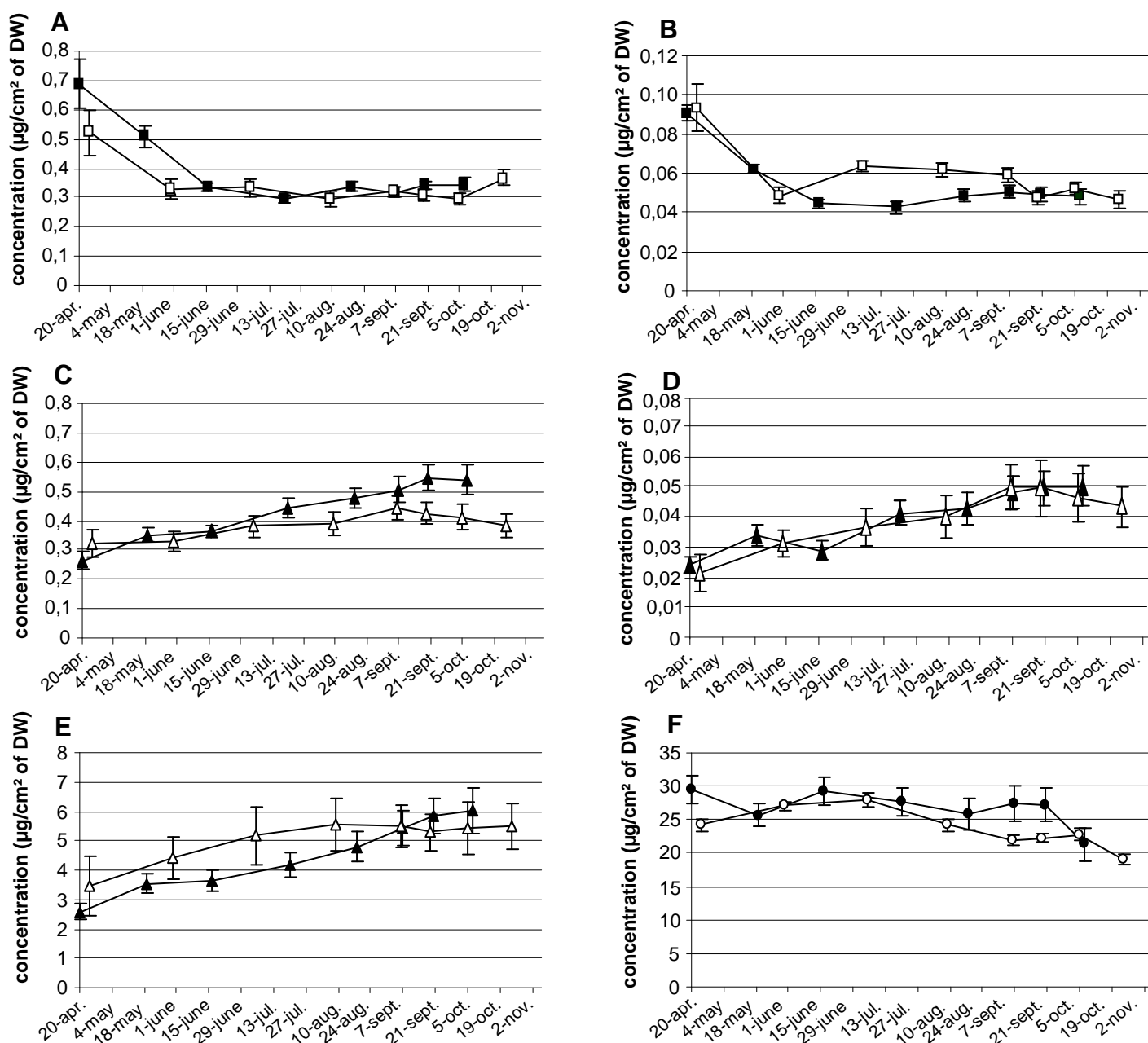
## **RESULTS**

### *Poplar field experimentation yields reproducible results*

The study was conducted on 14 poplar genotypes growing on the metal contaminated field of Pierrelaye located in the north-west of Paris during two consecutive years (2011 and 2012). In a first step, data from the different genotypes was averaged in order to focus on general patterns for each parameter. To monitor leaf development, the SPAD index, which correlates with chlorophyll concentration, was measured monthly (**Fig. 2**). SPAD index values followed a bell-shaped curve during both years. The rising phase (April-June) corresponds to the first step of leaf development during which small pale green leaves grow and become dark green. After reaching a plateau, SPAD index decrease as a consequence of chlorophyll degradation (August-November). Because chlorophyll degradation is combined with anthocyanin accumulation, the leaf color changes from dark green to yellow, red, or orange (Hoch *et al.*, 2001). Bell-shaped curves were observed for both years with some difference at the beginning of leaf development and at the end of summer. The lower



**Fig. 3.** Evolution of the weight by leaf area ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) averaged from 14 poplar genotypes growing on Pierrelaye contaminated field in 2011 (closed symbol) and 2012 (open symbol). Error bars represent SE ( $n=56$ ).

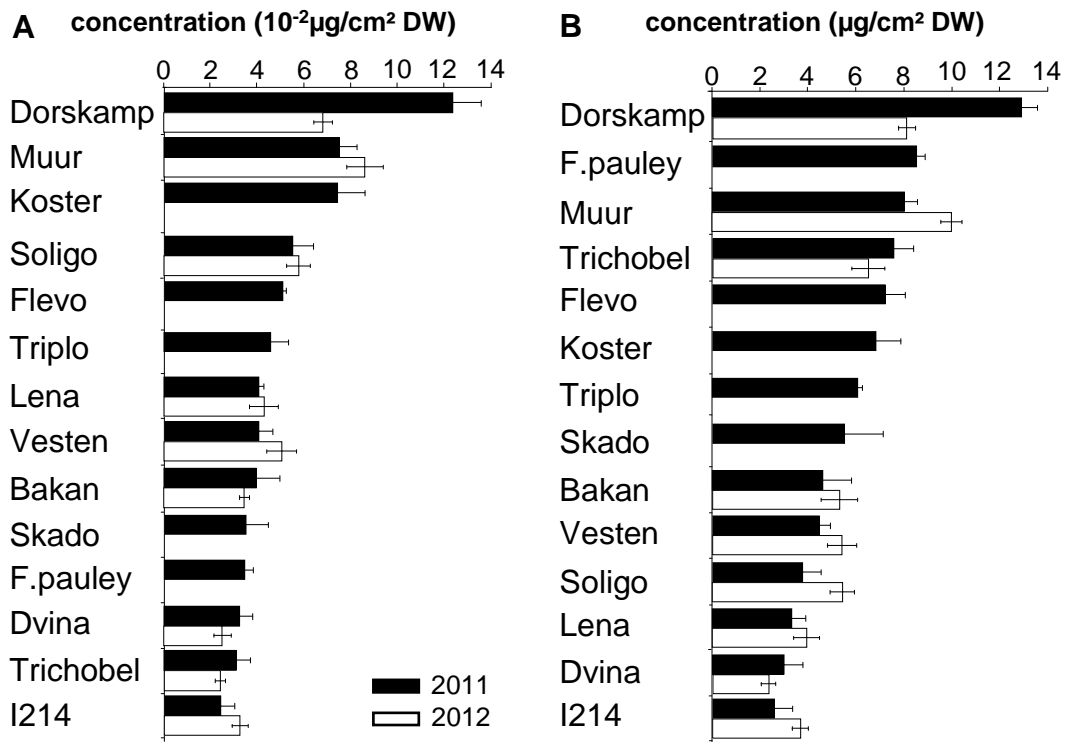


**Fig. 4.** Evolution of average concentration of iron (A), copper (B), manganese (C), cadmium (D), zinc (E) and magnesium (F) in leaves of 14 poplar genotypes in 2011 (closed symbol) and 2012 (open symbol). Metals exhibiting same pattern are represented with same symbol. Metal concentrations are expressed relative to leaf area ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Error bars represent SE ( $n=56$ ).

chlorophyll concentration observed during the first step of leaf development in 2012 could be due to the lower precipitations and temperatures during winter and the beginning of spring (**Fig. 1**). In addition, compared to values obtained in 2011, SPAD index also decreased earlier in 2012, indicating an earlier entry into senescence which is difficult to explain based on available environmental data.

The variation of dry weigh per unit area was also monitored during leaf development (**Fig. 3**). For both years, the dry weight per unit area continuously increases with leaf development and a small decrease is observed just before leaf abscission. This decrease likely reflects macro-nutrient remobilization during senescence (Pregitzer *et al.*, 1990 ; Scherzer *et al.*, 1998 ; Couturier *et al.*, 2010). Although both years exhibit the same profile, a surprising difference of almost 1.5mg/cm<sup>2</sup> in dry weigh per unit area is observed between the two years. This indicates that, leaf weight by area may change depending on the year and the environmental conditions. To allow comparison between two years, it is therefore preferable to calculate metal concentrations relative to area rather than to weight. This way of expressing metal concentrations also corrects for the general increase and decrease of dry weight per unit area during leaf growth and senescence, respectively.

Despite the differences in leaf development, all studied metals exhibit similar pattern between the two years of the study. This indicates that the results obtained are reproducible and of general relevance (**Fig. 4**). Mean metal concentrations in leaves ranked in the same order Mg>Zn>Mn=Fe>Cu>Cd as previously described (Laureysens *et al.*, 2004 ; Dominguez *et al.*, 2008 ; Lettens *et al.*, 2011). Interestingly, similar patterns are observed for several metals. For instance, iron (Fe) and copper (Cu) mean concentrations decrease at the beginning of leaf development and then, remain constant until the leaf abscission (**Fig. 4A** and **4B**). Previous studies already report that the highest Cu concentrations are observed in young leaves of poplar (Laureysens *et al.*, 2004 ; Lettens *et al.*, 2011) and willow (Mertens *et al.*, 2006). The decrease in Fe and Cu concentrations may correspond to the dilution of an initial pool of metal during leaf expansion (Dinelli and Lombini, 1996). This could indicate that most of Fe and Cu required for leaf throughout their development cycle is initially present at the onset of leaf emergence. In contrast, manganese (Mn), cadmium (Cd) and zinc (Zn) concentrations regularly increase from leaf emergence until the end of the summer. This increase damps just before leaf abscission (**Fig. 4C 4D** and **4E**). These patterns were already observed in previous work on poplar and willow leaves (Laureysens *et al.*, 2004 ; Mertens *et al.*, 2006 ; Lettens *et al.*, 2011). Finally, magnesium (Mg) concentrations exhibit a unique profile, characterized by a significant decrease just before leaf abscission after the beginning



**Fig.5.** Cd (A) and Zn (B) concentrations in senescent leaves from 14 poplar genotypes growing on the Pierrelaye experimental field just before leaf abscission in 2011 (white) and in 2012 (black). Error bars represent SD (n=4).

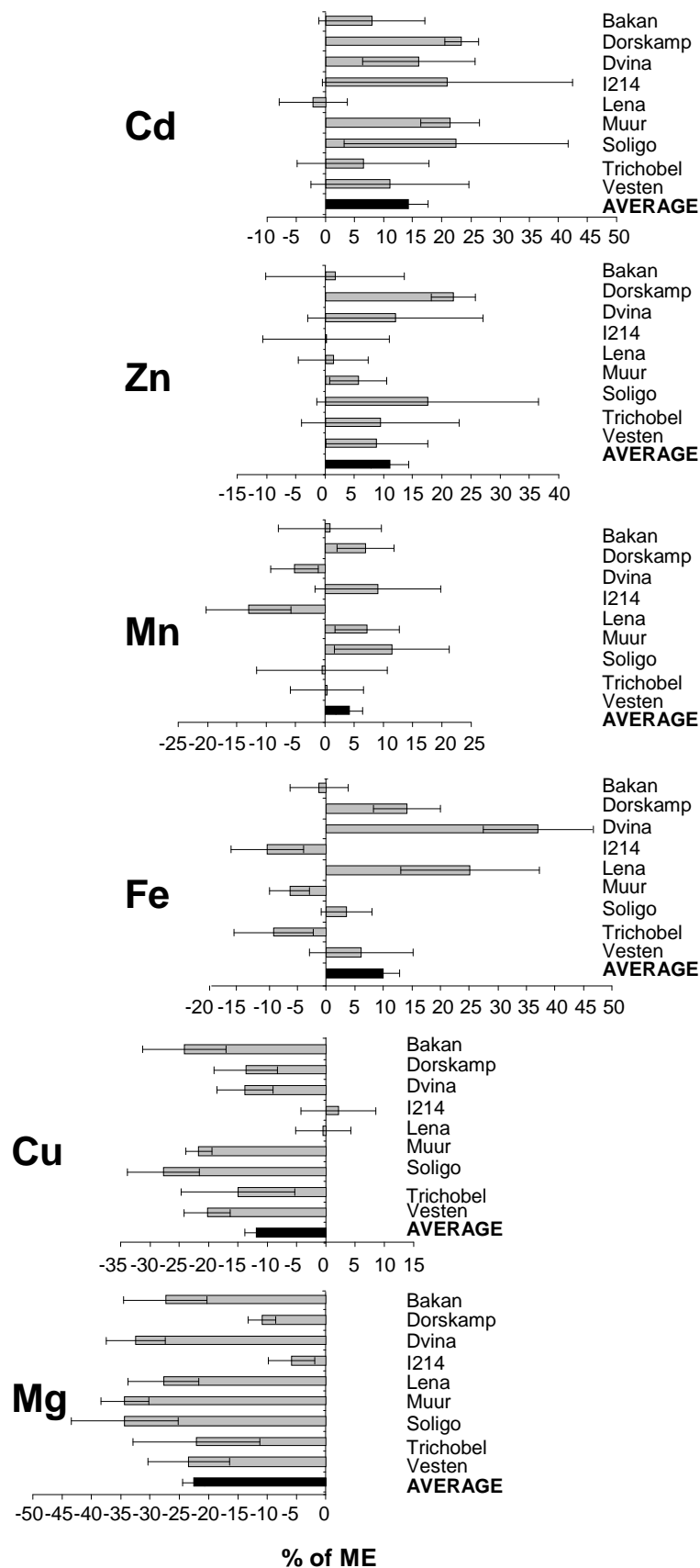
of the decline in the SPAD index (**Fig. 4F** and **4Y**). Taken together, these results suggest Mg remobilization during leaf senescence but do not show remobilization of ETM.

*Poplar genotypes exhibit different metal concentrations in senescing leaves*

To investigate natural variation of metal concentrations in senescing leaves, Cd and Zn concentrations in the last leaf harvest before abscission were compared among poplar genotypes (**Fig. 5**). Large variations in both Cd and Zn concentrations are observed between genotypes. For example, taking into account the two years, Cd and Zn concentrations are about two times higher in Dorskamp compared to I214. Thus, compared to Dorskamp, accumulation of ETM in senescing leaves is limited in I214. This may be due to reduced metal import in leaf during leaf development or to ETM remobilization during autumnal senescence. Interestingly, the rankings of genotypes according to their Cd concentrations or to their Zn concentrations are very similar. Moreover, figures **4D** and **4E** show that Cd and Zn concentration in poplar leaves exhibit the same pattern. Together, these data are in agreement with previous studies showing positive correlations between Cd and Zn foliar concentrations, suggesting common mechanisms of uptake and storage in plants (Migeon *et al.*, 2009 ; Lettens *et al.*, 2011).

*Leaf metals have different fates after autumnal senescence*

The variability in metal concentration in senescing leaves between genotypes (**Fig. 5**), could be a consequence of variability in metal accumulation during leaf development or a consequence of variability in metal remobilization during autumnal leaf senescence among genotypes. To discriminate between these two possibilities, we determined the relative variation in leaf metal concentration during leaf senescence, or metal evolution (ME), according to the following equation  $ME = [(metal\ concentration_{last\ harvest} / metal\ concentration_{harvest\ with\ max\ SPAD\ index}) \times 100] - 100$ . ME was calculated for all metals and all genotypes (**Fig. 6** and **Supplemental Figure 1**). Despite considerable variations between years and biological repetitions, three different patterns are clearly distinguishable. Mg consistently displays negative ME values in all genotypes, meaning that leaf Mg concentration decreases during senescence in all studied genotypes. This is in agreement with the results shown in **figure 4F** indicating Mg remobilization before leaf abscission. A similar pattern is observed for Cu concentrations (**Fig. 6, Supplemental figure 1**). However, Cu remobilization is not consistently observed in all genotypes. In contrast with Mg, ME values for Mn and Fe are highly variable depending of the year and the genotype. Finally, Cd and Zn consistently



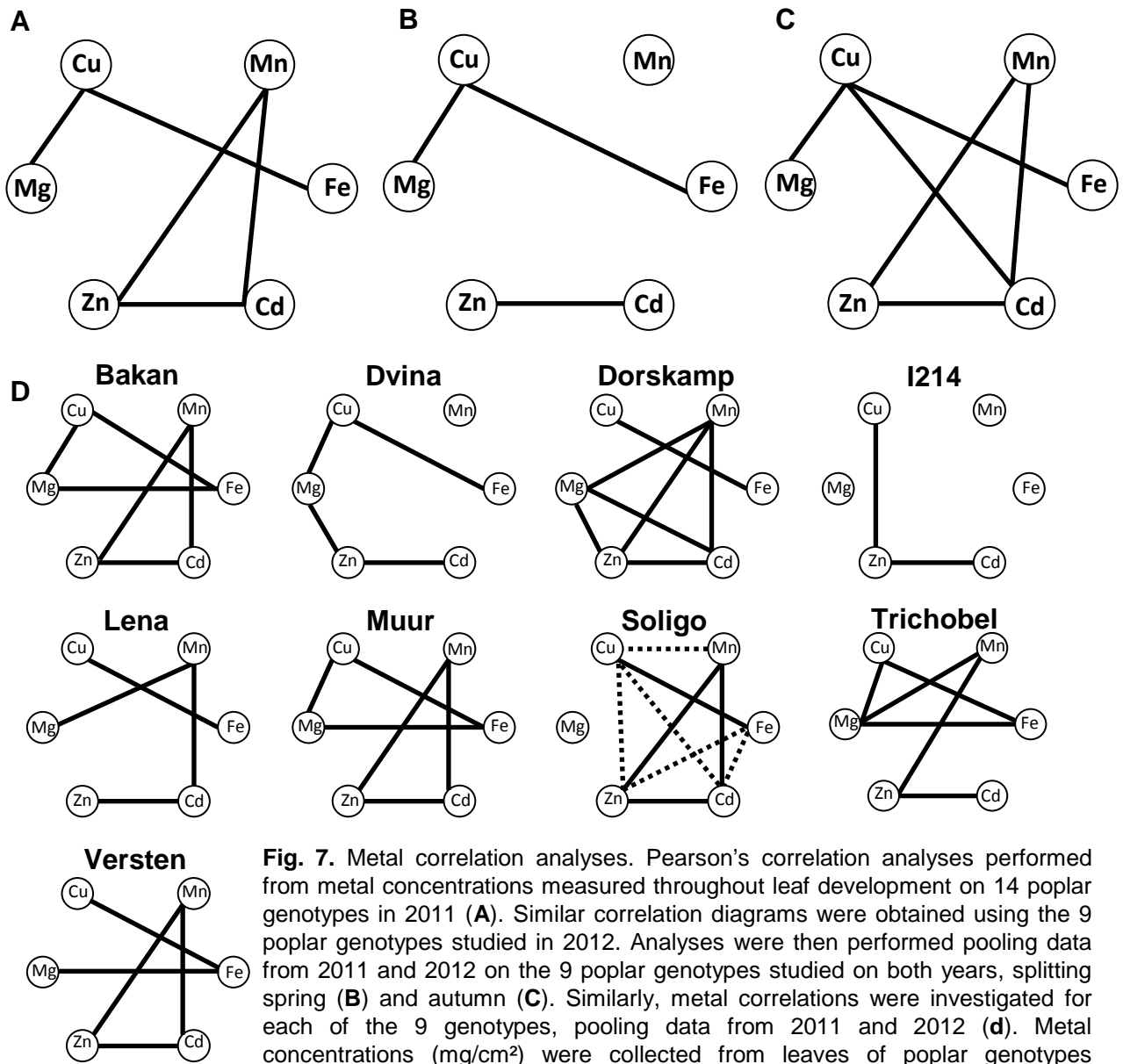
**Fig. 6.** Metal Evolution (ME) during senescence in poplar leaves. Average of two independent repeats containing at least 4 biological repetitions performed on 2011 and 2012 on 9 poplar genotypes growing on the Pierrelaye experimental field. ME was determined according the following equation  $ME = [(metal\ concentration_{last\ harvest} / metal\ concentration_{harvest\ with\ max\ SPAD\ index}) \times 100] - 100$ . Error bars represent the SD (n=4).

display positive ME values, meaning that their concentrations continue to increase until leaf abscission in almost all genotypes. Thus, whereas leaf Mg is robustly remobilized during autumnal senescence, ETM accumulation in leaves continues until abscission (Ernst and W.H.O., 1993). In addition to Mg, previous studies showed that poplar also remobilizes about 80% of leaf nitrogen (Scherzer *et al.*, 1998 ; Couturier *et al.*, 2010). Besides, previous work performed in *Arabidopsis thaliana*, showed that about 50 % of Zn is remobilized from leaves during the monocarpic senescence (Himmelblau and Amasino, 2001). Thus, depending on the nutrient and the species considered and therefore the senescence type, different mechanisms may be involved which would account for the differences in nutrient management.

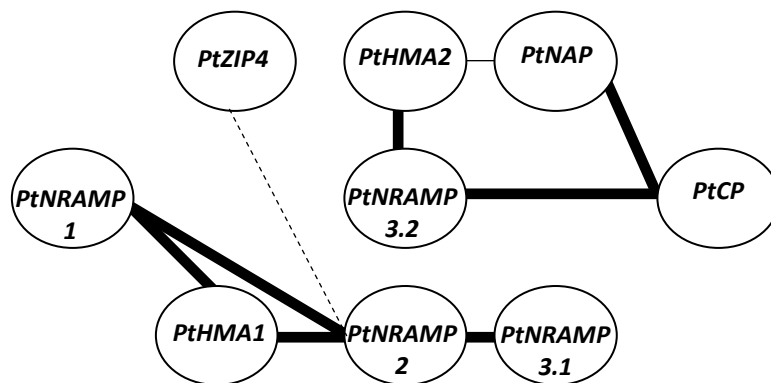
*Pearson's correlation highlights relationships between metals and specificities among genotypes*

To further explore the relationships between metals, correlations between leaf metal concentrations measured during all leaf development on 14 poplar genotypes in 2011 and in 9 poplar genotypes in 2012 were determined by calculating Pearson's correlation factors (**Fig. 7**). Pooling all genotypes together, the same correlation diagrams were obtained from samples harvested in 2011 and in 2012 supporting the robustness of the results (**Fig. 7A**). Significant ( $p < 0.01$ ) correlations were found between Zn and Cd ( $R^2_{p2011} = 0,679$ ,  $R^2_{p2012} = 0,731$ ), Cd and Mn ( $R^2_{p2011} = 0,457$ ,  $R^2_{p2012} = 0,591$ ), Mn and Zn ( $R^2_{p2011} = 0,486$ ,  $R^2_{p2012} = 0,425$ ), Mg and Cu ( $R^2_{p2011} = 0,453$ ,  $R^2_{p2012} = 0,467$ ) and Cu and Fe ( $R^2_{p2011} = 0,606$ ,  $R^2_{p2012} = 0,517$ ) (**Fig 7A**). Pooling together all metal concentrations obtained in 2011 and 2012 from 9 poplar genotypes previously selected, some differences in correlations were observed between seasons: whereas Mn is not correlated to any other metal in the spring, it becomes connected to Zn and Cd in autumn. These results indicate changes in metal management during leaf development (**Fig 7B**). Metal correlations were then investigated separately for each genotype (**Fig 7C**). Specific correlation diagrams were obtained for each genotypes. The correlation between Cd and Zn was consistent across genotypes, whereas the correlations between Mn and other elements exhibit high variability. These results suggest specificities in metal management between different genotypes.





**Fig. 7.** Metal correlation analyses. Pearson's correlation analyses performed from metal concentrations measured throughout leaf development on 14 poplar genotypes in 2011 (A). Similar correlation diagrams were obtained using the 9 poplar genotypes studied in 2012. Analyses were then performed pooling data from 2011 and 2012 on the 9 poplar genotypes studied on both years, splitting spring (B) and autumn (C). Similarly, metal correlations were investigated for each of the 9 genotypes, pooling data from 2011 and 2012 (d). Metal concentrations (mg/cm<sup>2</sup>) were collected from leaves of poplar genotypes growing on the experimental field of Pierrelaye. Only Pearson's correlation coefficient greater than 0.4 are represented. Full and dashed lines represent positive and negative correlations significant at the 0.01 level, respectively.

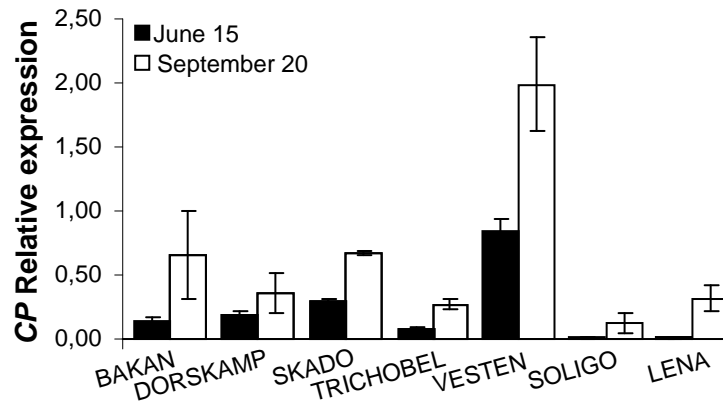


**Fig. 8.** Gene expression correlation analyses. Pearson's correlation analysis of gene expression measured in spring and autumn on 7 poplar genotypes (except *PtCP* which was performed on 5 poplar genotypes). Solid lines represent significant positive correlations and dashed lines represent significant negative correlations. Thinner lines indicate significance at the 0.05 level and thicker lines indicate significance at the 0.01 level.

*Pearson's correlation between genes highlights two clusters with correlated expression levels*

To investigate the involvement of molecular players in leaf metal homeostasis, we measured the expression levels of selected genes in poplar leaves (**Supplemental figure 2**). The genes used for this analysis were selected based on functional knowledge acquired from others species and on poplar transcriptomic data. We included genes encoding putative Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> transporters highly expressed or up-regulated in senescing leaves. Among the Heavy Metal P-type ATPase (HMA) family, we focused on *PtHMA1* and *PtHMA2*, the only poplar members in HMA family clusters I and II, which are generally involved in Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup>/Pb<sup>2+</sup> extrusion from the cytosol (Migeon *et al.*, 2010). *PtZIP4*, one member of the ZRT-IRT-like Protein (ZIP) family involved in influx to the cytosol of a broad range of divalent metal cations (including Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>) was selected based on its strong up-regulation during leaf senescence, according to microarray data (Guerinot, 2000 ; Migeon *et al.*, 2010). *PtNRAMP1*, *PtNRAMP2*, *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* genes from the Natural Resistance Associated Macrophage Protein (NRAMP) family, which also transports a broad range of divalent metal cations (including Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>), were included in the analysis. More specifically, *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* were selected as the closest poplar homologues of *Arabidopsis thaliana* *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* that mediate metal efflux from vacuoles, the major site for metal storage and sequestration in plant cells (Lanquar *et al.*, 2005 ; Lanquar *et al.*, 2010 ; Migeon *et al.*, 2010 ; Molins *et al.*, 2013). In addition, we monitored the expression of *PtNAP*, the closest homologue of NAC genes that were previously described to play an essential role in monocarpic senescence in dicots (Guo and Gan, 2006 ; Balazadeh *et al.*, 2010 ; Breeze *et al.*, 2011 ; Kou *et al.*, 2012 ; Zhang and Gan, 2012) and in nutrient remobilization during senescence in monocots (Uauy *et al.*, 2006 ; Distelfeld *et al.*, 2007 ; Sperotto *et al.*, 2009 ; Waters *et al.*, 2009 ; Sperotto *et al.*, 2010). *PtCP* was included in the analysis as a marker of leaf senescence. Besides *PtCP*, poplar transcriptomic analysis showed up regulation of *PtNRAMP3*, *PtHMA2*, and *PtZIP4* in senescing leaves (Sjödén *et al.*, 2009).

In order to highlight possible relationships between these genes, Pearson correlations were performed (**Fig. 8**). Two correlated gene clusters are observed. With Pearson's correlation factors (R<sup>2</sup>p) of 0.915 (p<0.01) between *PtHMA1* and *PtNRAMP2* and 0.743 (p<0.01) between *PtHMA1* and *PtNRAMP3.1*, *PtHMA1*, *PtNRAMP2* and *PtNRAMP3.1* constitute a highly correlated gene cluster (**Fig. 8**). Moreover, the analysis of correlations also underscores a possible link between *PtNRAMP1* and *PtNRAMP2* (R<sup>2</sup>p=0.507, p<0.01). Finally a second correlated gene cluster containing *PtCP*, *PtNAP*, *PtHMA2* and *PtNRAMP3.2* was identified (R<sup>2</sup>p≈ 0.350, p<0,01).



**Fig. 9.** Expression of cysteine protease gene, a marker of the senescent state (Bhalerao *et al.*, 2003) in poplar leaves before and during senescence. Analyses were performed by q-RT-PCR on four biological replicates. Signal intensities were normalized to the constitutively expressed poplar *EF-1A*, *PP2A* and *UBC10* genes previously selected for poplar growing under Cd-stress (Basa *et al.*, 2009). Error bars represent the SD (n=4).

**Table I :** Rotated component matrix extracted by principal component analysis (PCA method) showing the different eigenvalues for each component.

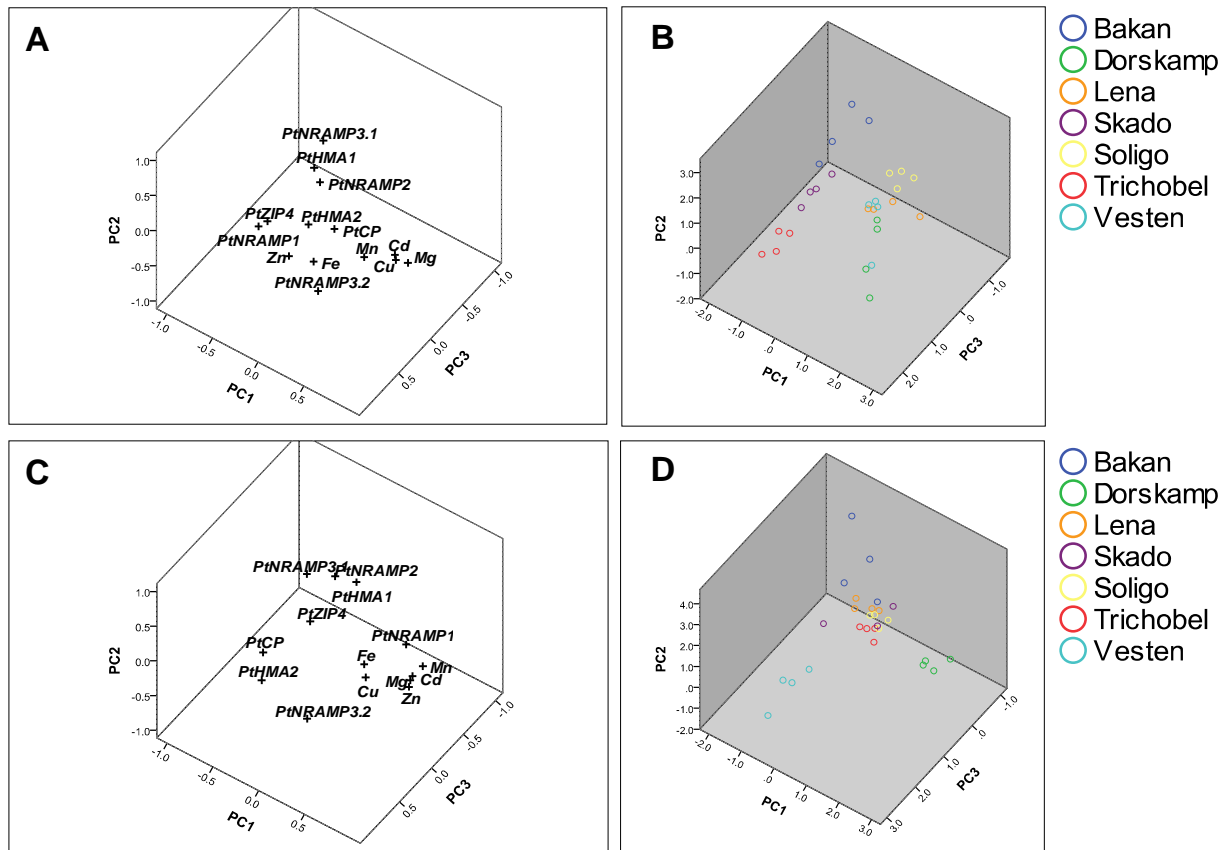
	Components SPRING				Components AUTUMN			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>PtNRAMP1</i>	-0,198	0,399	0,82	-0,006	0,782	0,372	-0,074	0,023
<i>PtNRAMP2</i>	0,175	0,866	0,392	0,139	0,079	0,975	0,029	-0,030
<i>PtNRAMP3.1</i>	-0,085	0,869	-0,032	-0,011	-0,176	0,909	0,106	-0,025
<i>PtNRAMP3.2</i>	0,329	-0,333	0,642	0,304	0,340	-,106	0,840	0,072
<i>PtHMA1</i>	0,055	0,911	0,311	-0,002	0,255	0,934	-0,051	-0,037
<i>PtHMA2</i>	-0,028	0,019	0,281	0,848	-0,204	0,007	0,771	-0,139
<i>PtCP</i>	0,116	-0,142	0,083	0,877	-0,270	0,249	0,654	0,282
<i>PtZIP4</i>	-0,489	-0,27	0,265	-0,503	-0,417	-,326	-0,290	0,656
Cu	0,885	0,072	0,216	0,1	0,551	0,035	0,228	0,711
Mn	0,432	-0,341	0,066	-0,666	0,828	-,101	-0,271	0,101
Fe	0,345	0,187	0,734	0,035	0,445	0,025	0,097	0,815
Cd	0,838	0,063	0,167	0,062	0,914	0,095	0,014	0,135
Zn	0,133	0,201	0,816	0,1	0,896	-0,044	0,045	-0,012
Mg	0,895	-0,129	0,045	-0,2	0,884	0,007	0,009	0,383

*Principal Component Analysis highlights distinct metal management strategies among poplar genotypes*

A factorial analysis using the principal component analysis method (PCA) was performed combining metal concentrations and expression levels of genes selected for their putative involvement in leaf metal homeostasis. Analysis was performed on two different harvests ; the first one on “mature leaves” stage (spring) and the second one on “senescing leaves” stage (autumn). **Figure 9** shows that the expression of *Cysteine Protease (PtCP)*, a marker of leaf senescence (Bhalerao *et al.*, 2003 ; Couturier *et al.*, 2010), was increased between the two harvests in all genotypes. This result confirms that, in all 7 genotypes analyzed, leaves harvested in autumn had entered senescence.

Factorial analyses (PCA method) were applied to the different relative parameters (metal concentrations and gene expression) to identify those that accounted for the major components of variability in mature (spring) and senescing leaves (autumn) (**Table I, Fig. 10**). PCA revealed 4 components that accounted for 79.3% and 82.6% of the total variance in spring and autumn, respectively. For each component, the coefficients of each parameter on the variance explanation are listed in **Table I**. During spring, PC1, which accounts for 21.8% of the total explained variance, is mainly described by Cu, Cd and Mg concentrations. PC2, which accounts for 22.8% of the total explained variance, is mainly led by *PtNRAMP2*, *PtNRAMP3.1* and *PtHMA1*. In PC3, which accounts for 19.8 % of the total explained variance, *PtNRAMP1* and Zn are the most important parameters. PC4, which accounts for 16.9% of the total explained variance, is mainly described by *PtHMA2* and *PtCP*. During autumn, PC1 records 33.7% of the total explained variance and Mn, Cd, Zn and Mg concentrations appear director parameters in this component. PC2, which accounts for 21.3% of the total explained variance, is mainly led by *PtNRAMP2*, *PtNRAMP3.1* and *PtHMA1*. In PC3 which accounts for 14.1 % of the total explained variance, *PtNRAMP3.1* and *PtHMA2* are the main responsible of the explained variance. PC4 which accounts for 13.4% of the total explained variance is mainly led by *PtZIP4* and *Fe*. Hence, PC1 and PC2 are described by similar parameters in spring and autumn consistent with Pearson’s correlation analyses, while in contrast, PC3 and PC4 combine distinct parameters in the two harvests.

From the data obtained during spring, three groups of relative parameters can be identified according to the eigenvalues by plotting all components together (**Fig. 10A**). The first cluster includes Mn, Cd, Cu and Mg concentrations which correspond to the main parameters of PC1. The second cluster includes *PtNRAMP3.1*, *PtHMA1* and *PtNRAMP2*, i.e. the mains parameters of PC2. Finally, the third cluster includes *PtNRAMP1*, *PtZIP4*,



**Fig. 10.** Scatter plot of the three principal components obtained from PCA for each season. Leaf metal concentrations and gene expression levels from 7 poplar genotypes in spring and autumn harvests were used for PCA. Spring parameters according to the eigenvalues and classification of the different genotypes with the explained variance percent for each component : 21.8% for PC1, 20.8 % for PC2 and 19.8% for PC3 (**A** and **B**) . Autumn parameters according to the eigenvalues obtained and classification for the different genotypes with the corresponding explained variance percent : 33.7% for PC1, 21.35 % for PC2 and 14.06% for PC3 (**C** and **D**). The parameter coefficients of components involved in variance explanation are listed in **Table I**.

*PtHMA2*, *PtNRAMP3.2*, *PtCP*, Zn and Fe, corresponding to the main parameters of PC3 and PC4 (**Fig. 10A**). Although it appears difficult to associate genotypes to each cluster of relative parameters, the spring scatter plot reveals two different groups (**Fig. 10B**). The first one contains all genotypes belonging to the *Tacahamaca* section (Bakan ; Skado ; Trichobel), the second one contains all genotypes belonging to the *Aigeiros* section (Lena ; Dorskamp ; Vesten ; Soligo). This suggests that poplar genotypes from distinct sections use distinct metal management strategies during leaf development. Interestingly, this organization is lost with data obtained during autumn (**Fig. 10C and 10D**). While Bakan is still associated to *PtNRAMP2* *PtNRAMP3.1*, *PtHMA1*, Vesten is now associated to *PtCP* and *PtHMA2*, DORSKAMP to *PtNRAMP1.1* and metals. However, the other genotypes including Lena, Soligo, Trichobel and Skado agglomerate at the center of the diagram, meaning that studied parameters can not distinguish them in autumn.

## **DISCUSSION**

Efficient phytoextraction by woody species requires Zn and Cd accumulation in trunk and branches. However, in the case of poplar, previous studies have shown that metals, instead, are mainly accumulated in senescing leaves, even though significant differences were observed between genotypes (Dinelli and Lombini, 1996 ; Laureysens *et al.*, 2004). Metal accumulation in leaves could lead to limitation of poplar phytoextraction due to metal return to soil following autumnal leaf abscission. In this work we investigated the fate of some elements in leaves across several poplar genotypes focusing mainly on Zn and Cd. Through gene expression analysis, we also tried to gain new insights into leaf metal homeostasis in order to explain the observed variability in metal management.

### *Metal accumulation and remobilization in poplar leaves*

Similar leaf metal profiles were observed during the two years of the study. This indicates that, even though experiments were performed under poorly controlled conditions in the field, the results obtained were robust and reproducible (**Fig. 4**). Average metal concentrations in all genotypes show highest Mn, Zn and Cd concentrations at the end of leaf development. This results is in agreement with previous reports showing that senescing leaves accumulate more metals than mature and young leaves (Dinelli and Lombini, 1996 ; Laureysens *et al.*, 2004). However, large variations in leaf metal concentrations were observed between genotypes just before leaf abscission (**Fig. 5**). Such variability was already uncovered for Cd translocation, Cd tolerance and Cd concentrations in roots and leaves in a

**SI Table I** : Poplar genotypes growing on the experimental field of Pierrelaye

Name	Species	Section	Gender	Country
Bakan	TM	<i>Tacahamaca</i>	Male	Belgium
Fritzi Pauley	T	<i>Tacahamaca</i>	Female	Belgium
Muur	DN	<i>Aigeiros</i>	Male	Belgium
Skado	TM	<i>Tacahamaca</i>	Female	Belgium
Trichobel	T	<i>Tacahamaca</i>	Male	Belgium
Vesten	DN	<i>Aigeiros</i>	Female	Belgium
Dvina	D	<i>Aigeiros</i>	Male	Italy
I-214	DN	<i>Aigeiros</i>	Female	Italy
Lena	D	<i>Aigeiros</i>	Male	Italy
Soligo	DN	<i>Aigeiros</i>	Male	Italy
Triplo	DN	<i>Aigeiros</i>	Male	Italy
Dorskamp	DN	<i>Aigeiros</i>	Male	Netherlands
Flevo	DN	<i>Aigeiros</i>	Male	Netherlands
Koster	DN	<i>Aigeiros</i>	Male	Netherlands

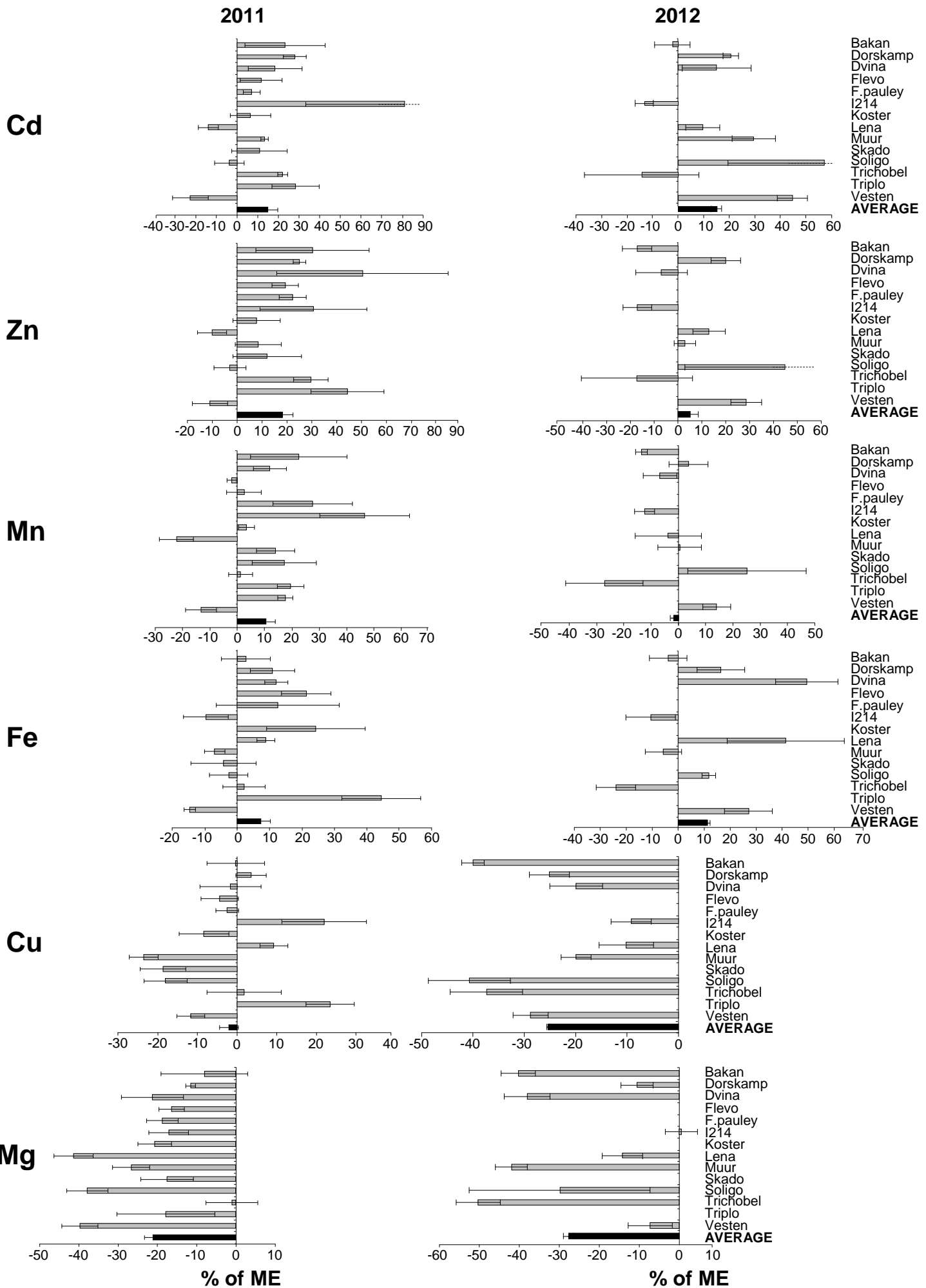
D : *P. deltoides* ; DN : *P. deltoides* x *P. nigra* ; T :  
*P. trichocarpa* ; TM : *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*.

**SI Table II** : Primers used for q-RT-PCR

	Forward primers	Reverse primers
qUBC10	CCATATCCAAGGTATTGCTCTCC	CGTCTCATACTTGTTCTGTGG
qPP2A	TTCCTGATGTGCGACTGAAC	CTCCAATGCCTATCCTCTGC
qEF1- $\alpha$	CACACCTGTCACATTGCTG	ACCAGCATCACCGTTCTTCAG
qPtNRAMP1	GCCAGCACTGGAAATAGGAG	TTGTATTGCGCTCCTGACTG
qPtNRAMP2	ATGCAGATTCCTTTTCGCACT	CCGATCAGAAAGCCAAAGAG
qPtNRAMP3.1	TTGTAGCTGCCTTGGTGATG	GATCGCTGGCAACAGAACT
qPtNRAMP3.2	CAGACACCAGCCATCTTGAA	CCCAGGACCAGTAAACAACC
qPtHMA1	AAACCACCACTCTCCGTAC	GTGGATCTGGGAGGATGAGA
qPtHMA2	ATCCTGTCTACACCGTTGC	CCGCCATAGGATGACTTGAT
qPtZIP4	GGTGAAATGATAACGCAGCA	GGTGAAATGATAACGCAGCA
qPtNAP	TTCGTAACCAAGCCACATCC	GCCTTCCAGTACCCTGACAC
qPtCP	AGTCACTGAGAAAGGCTGTGG	CCAAATGGATTGTTCTTGCTC

previous report (Zacchini *et al.*, 2009). In our study, Dvina and I214 genotypes display the lowest metal concentrations in senescing leaves. However, from these results, it was not possible to know if these lower concentrations result from a limitation in leaf metal concentrations throughout leaf development or if they are due metal remobilization during autumnal senescence. Thus, metal remobilization was then, monitored for each genotype using SPAD index as an indicator of leaf developmental stage. While Mg and to a lesser extend Cu were robustly remobilized in almost all genotypes, concentrations of other metals did not decrease significantly during leaf senescence. Actually, for Cd and Zn which would need to be remobilized in the context of phytoextraction, further accumulation was most frequently observed during leaf senescence. In the case of poplar growing on a metal contaminated soil, the continuous accumulation of trace elements in senescing leaves could be a strategy to exclude toxic metals from the tree through leaf abscission. Thus, despite variability among poplar genotypes, we found that Fe, Mn, Zn and Cd are not remobilized during the autumnal leaf senescence in agreement with Laureysens *et al.* (2004). Similarly, recent works performed on *Prunus*, *Vitis* and *Carpinus* showed that there is no remobilization of micronutrients before leaf abscission in any of these species (Shi *et al.*, 2011). In contrast, poplar remobilizes nitrogen extremely efficiently, since 80% of the whole tree nitrogen content is conserved during dormancy (Pregitzer *et al.*, 1990). In aspen, Keskitalo *et al.* also report that 80% of total leaf nitrogen was remobilized during autumnal senescence (2005). Indeed, during autumnal leaf senescence, there is a functional shift in leaf metabolism from resource assimilation to resource remobilization and export. Nitrogen-rich amino acids and other mobile nutrients are transported *via* the phloem from senescing leaves to perennial tissues where they are used to synthesize proteins (Hörtensteiner and Feller, 2002 ; Couturier *et al.*, 2010). Mg is mainly localized in chloroplasts being part of chlorophylls. During senescence, chlorophylls degradation release Mg which could be remobilized before leaf abscission (Zavaleta-mancera *et al.*, 1999). Thus, leaf macronutrients such as nitrogen and Mg could have a different fate compared to micronutrients because of the establishment of specific remobilization process in senescent leaves coordinated with the formation of sink strength in perennial tissues. It is likely that the lack of metal remobilization is in part due to low metal sink strength in perennial tissues.

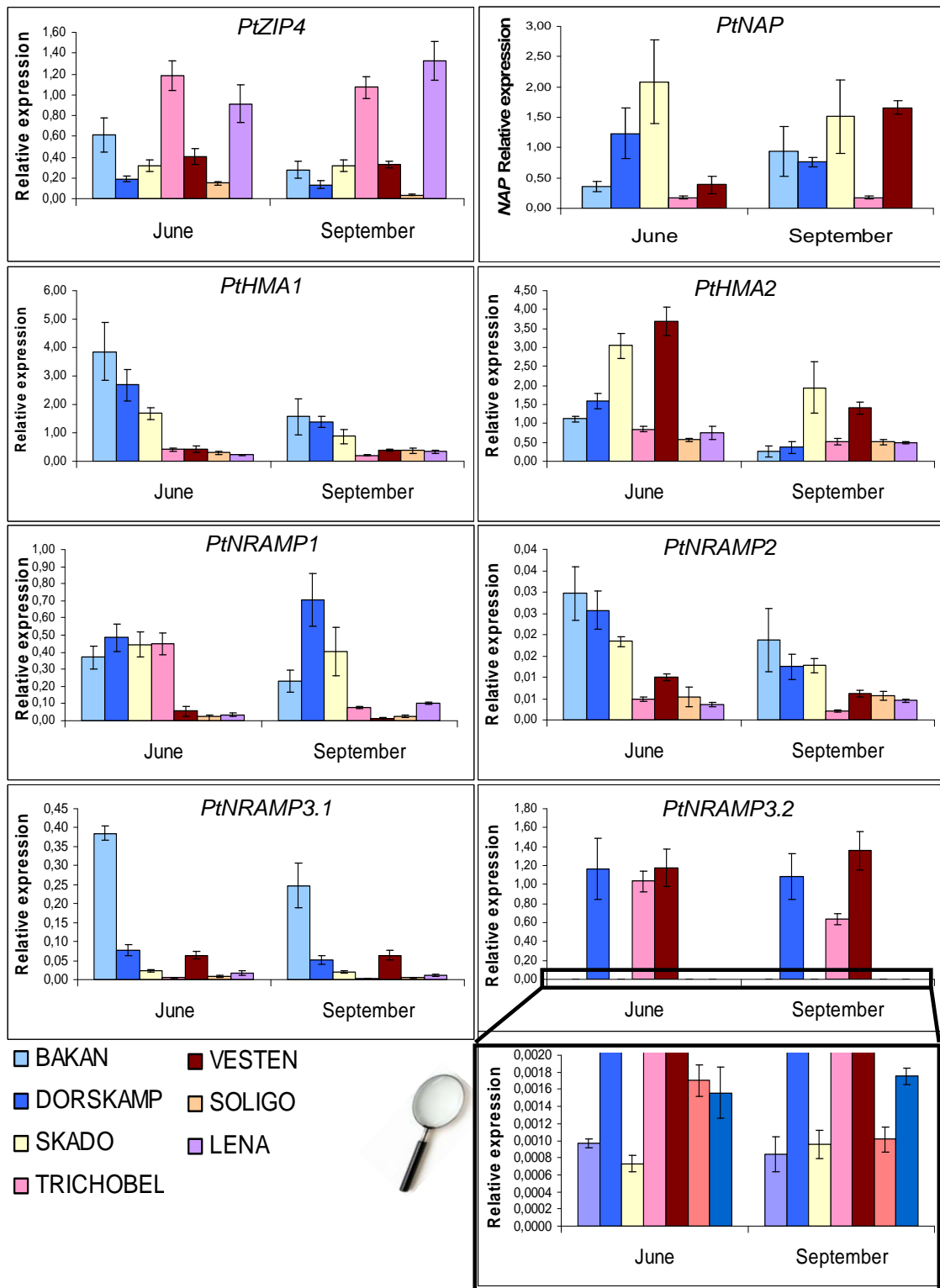




**Supplemental Figure 1.** Metal Evolution (ME) during senescence in poplar leaves. Average of at least 4 biological repetitions performed on 2011 (left) and 2012 (right) on poplars growing in the Pierrelaye experimental field. ME was determined according the following equation  $ME = [(metal\ concentration\ last\ harvest / metal\ concentration\ harvest\ with\ max\ SPAD\ index) \times 100] - 100$ . Error bars represent the SD (n=4).

*Correlations between metal concentrations*

Interestingly, similar patterns of leaf metal concentrations were observed between Zn, Mn and Cd concentrations and also between Cu and Fe concentrations. These observations were then confirmed by Pearson correlation analyses (**Fig. 7**). Positive correlations between Cd and Zn foliar concentrations in poplar were previously reported (Migeon *et al.*, 2009 ; Lettens *et al.*, 2011), indicating similar mechanisms of uptake and/or storage in plants for these two metals. As Cd and Zn share similar chemical properties, the non essential element Cd may use Zn uptake and distribution pathways to accumulate inside the plant. Several reports already showed that some Zn transporters are able to transport Cd. For instance, *AtHMA2* and *AtHMA4* are expressed in vascular tissues where they load Zn but also Cd into the xylem (Hussain *et al.*, 2004 ; Verret *et al.*, 2004 ; Wong and Cobbett, 2009). These two metal pumping ATPases, which are necessary for Zn supply to shoots, provide a major contribution to Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. Moreover, it was shown that the capacity of Cd and Zn accumulation of the hyperaccumulator *Nocca caerulea*, is strongly associated to *HMA4* expression (Lochlainn *et al.*, 2011 ; Craciun *et al.*, 2012). Besides, OsNRAMP5 is essential for Mn uptake from soil in rice, but also provides the major pathway for Cd accumulation in this crop (Cailliatte *et al.*, 2010 ; Ishikawa *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012). In the same line, some transporters involved in Fe uptake and homeostasis allow Zn and Cd transport. This is the case for *Arabidopsis thaliana* AtIRT1 and AtNRAMP4, which mediate Fe uptake from soil and Fe mobilization from the vacuole, respectively (Vert *et al.*, 2002 ; Lanquar *et al.*, 2004). The broad substrate range of some transporters may thus account for correlations observed between Cd and Mn, Zn and Mn and Cd and Zn. Other correlations may be explained by binding of different metals to the same chelator molecules, such as citrate or nicotianamine (NA) (Krämer *et al.*, 2007). For instance, according to log stability constants and mutant analyses NA should be mainly associated to Fe and Cu (Von Wirén *et al.*, 1999 ; Takahashi *et al.*, 2003), which can contribute to the correlation observed between Fe and Cu. Finally, Mg and Cu display low chemical similarity and no protein were reported to be able transport both elements, yet their concentrations are strongly correlated. In this case, the critical roles of Cu and Mg in chloroplasts, Cu being essential for plastocyanin activity and Mg for chlorophyll function (Yruela, 2013), may account for their correlated behaviors.



**Supplemental Figure 2.** Transcription levels of studied genes normalized by *EF-1 $\alpha$* , *PP2A* and *UBC10* in leaves of 4 year old poplars from 7 genotypes. Samples were harvested during summer 2011 from poplar growing in the field. Error bars represent SD (n=4).

*Correlations between gene expression levels*

Both PCA and gene correlations revealed strong relationships between *PtHMA1*, *PtPtNRAMP2* and *PtNRAMP3.1* genes. Although, nothing is known about *PtHMA1* in poplar, previous studies performed on *Arabidopsis thaliana* showed that its homologue is localized in the chloroplast envelope and plays a major role in Cu transport into this organelle (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). It was reported that *AtHMA1* could also participate in Zn tolerance (Kim *et al.*, 2009) and yeast expression showed it is in fact able to transport a wide range of metals including Ca, Cd, Zn and Cu (Moreno *et al.*, 2008). As *HMA1*, *NRAMP2* is conserved between species (Migeon *et al.*, 2010). Both *AtNRAMP2* as *PtNRAMP2* are able to complement the yeast *smf2* mutant which is impaired in Mn transport to mitochondria and Golgi apparatus (Luk and Culotta, 2001 ; Catherine Curie, *com. pers*). This suggests a function in metal distribution to intracellular organelles for *PtNRAMP2*. Similarly, *Arabidopsis thaliana* homologues of *PtNRAMP3.1*, *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* were shown to play a role in the transfer of essential metals from the vacuole to the chloroplasts (Lanquar *et al.*, 2010 ; Molins *et al.*, 2013). Thus, *PtHMA1*, *PtNRAMP2* and *PtNRAMP3.1* functions revolve around essential metal transfer (Mn, Cu) to intracellular organelles, including chloroplasts, which could account for their correlated expression levels. Accordingly, these genes are mainly expressed in mature leaves where photosynthesis takes place and are not induced during poplar autumnal senescence (Sjödén *et al.*, 2009).

Gene correlations also highlighted relationships between *PtHMA2*, *PtNRAMP3.2*, *PtNAP* and *PtCP*. PCA further supported relationships between *PtHMA2*, *PtNRAMP3.2* and *PtCP*. *PtNAP* was not included in the PCA analysis because its expression level was not determined in Soligo and Lena genotypes. This second cluster, therefore includes both the senescence marker *PtCP* in poplar (Bhalerao *et al.*, 2003 ; Couturier *et al.*, 2010) and *PtNAP* the closest poplar homologue of *AtNAP* (*ANAC092*), which encodes a key regulator of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* (Guo and Gan, 2006 ; Balazadeh *et al.*, 2010 ; Breeze *et al.*, 2011 ; Kou *et al.*, 2012 ; Zhang and Gan, 2012). Thus, the two other genes *PtHMA2* and *PtNRAMP3.2* present in this cluster may also be associated with leaf senescence. In agreement, microarray analysis showed induction of these genes, especially *PtHMA2* during senescence (Sjödén *et al.*, 2009). *PtNRAMP3.2* is homologous to *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4*, which were shown to mediate metal release from vacuoles in *Arabidopsis thaliana* (Lanquar *et al.*, 2005 ; Oomen *et al.*, 2009 ; Lanquar *et al.*, 2010). Interestingly, previous transcriptomic analyses also showed induction of *AtNRAMP3* in leaves during monocarpic senescence (Breeze *et al.*, 2011). *PtHMA2* is homologous to *AtHMA2* and *AtHMA4*, which are involved



in Cd and Zn extrusion from the cytosol to the apoplast in *Arabidopsis thaliana* (Hussain *et al.*, 2004 ; Verret *et al.*, 2004 ; Migeon *et al.*, 2010). Based on the functions of their homologues, it is tempting to speculate that PtNRAMP3.2 and PtHMA2 act in concert to release Zn and Cd from leaf cells during senescence. However, Zn and Cd accumulation in leaves continues until leaf abscission. Alternatively, *PtHMA2*, which clusters with *PtCP* in autumn (**Fig 10**), could favor continuous translocation of Zn and Cd during senescence (Hussain *et al.*, 2004 ; Wong and Cobbett, 2009). Accordingly, *PtHMA2* is highly expressed in root and trunk tissues (data not shown).

Although transcriptomic data showed strong up-regulation of *PtZIP4* expression during leaf senescence (Sjödin *et al.*, 2009 ; NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>), our work does not show any correlation with *PtCP* or with other genes of the same cluster. This discrepancy could be a consequence of differences in experimental conditions. Our work was performed on a metal contaminated field with high Zn concentration. However, *PtZIP4* homologues in *Arabidopsis thaliana* and the metal accumulator species *Noccaea caerulescens* are mainly expressed during Zn limitation (Grotz *et al.*, 1998 ; Pence *et al.*, 2000 ; Assunção *et al.*, 2001). It is possible that *PtZIP4* could play a role in Zn transport during senescence under Zn deficient conditions, whereas it would be repressed under our contaminated field conditions.

#### *PCA discriminates poplar genotypes and associate them with specific gene clusters*

The PCA of spring harvest data discriminated poplar genotypes according to poplar sections. This suggests that in the course of evolution, poplar have adopted distinct modes of metal management in leaves. Depending on the season considered, it was also possible to associate some poplar genotypes with specific clusters of genes: Bakan was associated to *PtNRAMP2*, *PtHMA1* and *PtNRAMP3.1* and Vesten to *PtCP* and *PtHMA2* in both autumn and spring and Dorskamp was associated to *PtNRAMP1* in autumn. These associations highlight differences in metal management, which could account for the variability in metal tolerance and accumulation previously reported in the poplar genus. Comparison of the parameters associated to principal components between seasons also highlighted modifications of the general metal management in poplar leaves during senescence. However, these modifications do not appear to favor metal remobilization during autumn senescence.

Interestingly, in the PCA of autumn harvest data, *PtNRAMP1* clusters with all metals and with Dorskamp, the genotype which accumulates the highest metal concentrations (**Fig. 5 and Fig. 10**). Moreover, a significant correlation was observed between *PtNRAMP1*



expression levels and Zn bio-concentration factors ( $R^2p=0,728$  ;  $P<0.01$ ), which correspond to Zn concentration in leaves reported to Zn concentration on soil. These correlations suggest that PtNRAMP1 could be a major pathway for the steady metal accumulation in leaves during senescence. *PtNRAMP1* may therefore represent an interesting target for genetic engineering of poplar leaf trace metal content.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Dr Sylvain Merlot, Dr Astrid Agorio, Van Anh Le Thi, Sara Martins, Rafael Costa and Sylvain Dépré for contribution to leaf harvest. This work was supported by a grant from Région Ile-de-France to MP and CNRS funding the ST laboratory.

## **REFERENCES**

- Assunção, A.G.L., Martins, P.D.C., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. and Aarts, M.G.M. (2001) Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment*, **24**, 217-226.
- Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A.D., Matallana-Ramirez, L.P., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanon, M.-I., Köhler, B. and Mueller-Roeber, B. (2010) A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *The Plant Journal*, **62**, 250-264.
- Basa, B., Solti, A., Sarvari, S. and Tamas, L. (2009) Housekeeping gene selection in poplar plants under Cd-stress: comparative study for real-time PCR normalisation. *Functional Plant Biology*, **36**, 1079-1087.
- Bhalerao, R., Keskitalo, J., Sterky, F., Erlandsson, R., Björkbacka, H., Birve, S.J., Karlsson, J., Gardeström, P., Gustafsson, P., Lundeberg, J. and Jansson, S. (2003) Gene Expression in Autumn Leaves. *Plant Physiology*, **131**, 430-442.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.-s., Penfold, C.A. and Jenkins, D. (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell Online*, **23**, 873-894.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J.-F., Mari, S. and Curie, C. (2010) High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *The Plant Cell Online*, **22**, 904-917.
- Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S. and Pascual, C. (2012) Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. *Environmental Science & Technology*, **46**, 13361-13369.
- Chaney, R. (1983) Land Treatment of Hazardous Wastes constituents. In *Plant uptake of inorganic waste* (J.E. Parr, P.B. Marsh, J.M. Kla and Ridge, P., eds). Washington DC: Noyes Data Corp.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. and Kramer, U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, **7**, 309-315.
- Couturier, J., Doidy, J., Guinet, F., Wipf, D., Blaudez, D. and Chalot, M. (2010) Glutamine, arginine and the amino acid transporter Pt-CAT11 play important roles during senescence in poplar. *Annals of Botany*, **105**, 1159-1169.
- Craciun, A.R., Meyer, C.-L., Chen, J., Roosens, N., De Groodt, R., Hilson, P. and Verbruggen, N. (2012) Variation in HMA4 gene copy number and expression among *Noccaea caerulescens* populations presenting different levels of Cd tolerance and accumulation. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 4179-4189.
- Dère, C., Lamy, I., van Oort, F., Baize, D. and Cornu, S. (2006) Reconstitution des apports en éléments traces métalliques et bilan de leur migration dans un Luvisol sableux soumis à 100 ans d'irrigation massive par des eaux usées brutes. *Comptes Rendus Geoscience*, **338**, 565-573.





- Dinelli, E. and Lombini, A.** (1996) Metal distributions in plants growing on copper mine spoils in Northern Apennines, Italy: the evaluation of seasonal variations. *Applied Geochemistry*, **11**, 375-385.
- Distelfeld, A., Cakmak, I., Peleg, Z., Ozturk, L., Yazici, A.M., Budak, H., Saranga, Y. and Fahima, T.** (2007) Multiple QTL-effects of wheat *Gpc-B1* locus on grain protein and micronutrient concentrations. *Physiologia Plantarum*, **129**, 635-643.
- Dominguez, M.T., Maranon, T., Murillo, J.M., Schulin, R. and Robinson, B.H.** (2008) Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain: a large-scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution*, **152**, 50-59.
- Drew, A.P., Guth, R.L. and Greatbatch, W.** (1987) *Variation in heavy metal accumulation by hybrid poplar clones on sludge amended soil*. Poplar Culture to the Year 2000. Proceedings of the Poplar Councils of the USA and Canada Joint Meeting. Ecological Society of China, Beijing.
- Ernst and W.H.O.** (1993) Geobotanical and biogeochemical prospecting for heavy metal deposits in Europe and Africa. In *Plants as Biomonitors: Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. (Markert, B., ed. Weinheim): VCH, pp. 107-126.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. and Eide, D.** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 7220-7224.
- Guerinot, M.L.** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1465**, 190-198.
- Guo, Y. and Gan, S.** (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, **46**, 601-612.
- Himmelblau, E. and Amasino, R.M.** (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of plant physiology*, **158**, 1317-1323.
- Hörtensteiner, S. and Feller, U.** (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 927-937.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakarlis, J., Harper, J.F. and Cobbett, C.S.** (2004) P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with Roles in Essential Zinc Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, **16**, 1327-1339.
- Ishikawa, S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arai, T., Nishizawa, N.K. and Nakanishi, H.** (2012) Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 19166-19171.
- Keskitalo, J., Bergquist, G., Gardestrom, P. and Jansson, S.** (2005) A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology*, **139**, 1635-1648.
- Kim, Y.Y., Choi, H., Segami, S., Cho, H.T., Martinoia, E., Maeshima, M. and Lee, Y.** (2009) AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn (II) in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **58**, 737-753.
- Kou, X., Watkins, C.B. and Gan, S.-S.** (2012) *Arabidopsis* AtNAP regulates fruit senescence. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 6139-6147.
- Krämer, U., Talke, I.N. and Hanikenne, M.** (2007) Transition metal transport. *FEBS Letters*, **581**, 2263-2272.
- Kumar, P.B.A.N., Dushenkoy, V., Motto, H. and Raskin, I.** (1995) Phytoextraction: The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Soils. *Environmental Science & Technology*, **29**, 1232-1238.
- Lamy, I., Van Oort, F., Dère, C. and Baize, D.** (2006) Use of major-and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *European journal of soil science*, **57**, 731-740.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S.** (2004) Regulation and Function of AtNRAMP4 Metal Transporter Protein. *Soil science and plant nutrition*, **50**, 1141-1150.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S.** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J*, **24**, 4041-4051.
- Lanquar, V., Ramos, M.S., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Kramer, U. and Thomine, S.** (2010) Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency. *Plant Physiology*, **152**, 1986-1999.



- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C. and Ceulemans, R.** (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution*, **131**, 485-494.
- Letens, S., Vandecasteele, B., De Vos, B., Vansteenkiste, D. and Verschelde, P.** (2011) Intra- and inter-annual variation of Cd, Zn, Mn and Cu in foliage of poplars on contaminated soil. *Science of The Total Environment*, **409**, 2306-2316.
- Lochlainn, S.O., Bowen, H.C., Fray, R.G., Hammond, J.P., King, G.J., White, P.J., Graham, N.S. and Broadley, M.R.** (2011) Tandem quadruplication of *HMA4* in the zinc (Zn) and cadmium (Cd) hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *PLoS One*, **6**, e17814.
- Luk, E. and Culotta, V.** (2001) Manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 47556-47562.
- Mertens, J., Vervaeke, P., Schrijver, A.D. and Luysaert, S.** (2004) Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of The Total Environment*, **326**, 209-215.
- Mertens, J., Vervaeke, P., Meers, E. and Tack, F.M.G.** (2006) Seasonal changes of metals in willow (*Salix* sp.) stands for phytoremediation on dredged sediment. *Environmental Science & Technology*, **40**, 1962-1968.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F.d.r., Chalot, M. and Blaudez, D.** (2009) Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water, Air, and Soil Pollution*, **204**, 89-101.
- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M., Richaud, P., Thomine, S. and Chalot, M.** (2010) Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 3763-3784.
- Molins, H., Michelet, L., Lanquar, V., Agorio, A., Giraudat, J., Roach, T., Krieger-Liszkay, A. and Thomine, S.** (2013) Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplasts as a target for cadmium hypersensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 804-817.
- Moreno, I., Norambuena, L., Maturana, D., Toro, M., Vergara, C., Orellana, A., Zurita-Silva, A. and Ordenes, V.R.** (2008) AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive  $Ca^{2+}$ /heavy metal pump. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 9633-9641.
- Oomen, R.J.F.J., Wu, J., Lelièvre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H., Aarts, M.G.M. and Thomine, S.** (2009) Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, **181**, 637-650.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. and Kochian, L.V.** (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 4956-4960.
- Pregitzer, K.S., Dickmann, D.I., Hendrick, R. and Nguyen, P.V.** (1990) Whole-tree carbon and nitrogen partitioning in young hybrid poplars. *Tree Physiology*, **7**, 79-93.
- Pulford, I.D. and Watson, C.** (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees a review. *Environment International*, **29**, 529-540.
- Punshon, T., Dickinson, N. and Lepp, N.** (1996) The potential of *Salix* clones for bioremediating metal polluted soil. In *Heavy metals and trees, Meeting, Heavy metals and trees* (Institute of Chartered Foresters, Great Britain, Borders Regional Group, British Ecological Society and Forest Ecology Group, eds). Edinburgh, pp. 93-104.
- Sanita di Toppi, L. and Gabbrielli, R.** (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, **41**, 105-130.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K. and Ma, J.F.** (2012) NRAMP5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *The Plant Cell Online*, **24**, 2155-2167.
- Scherzer, A.J., Rebbeck, J. and Boerner, R.E.J.** (1998) Foliar nitrogen dynamics and decomposition of yellow-poplar and eastern white pine during four seasons of exposure to elevated ozone and carbon dioxide. *Forest Ecology and Management*, **109**, 355-366.
- Seigneurin-Berny, D., Gravot, A., Auroy, P., Mazard, C., Kraut, A., Finazzi, G., Grunwald, D., Rappaport, F., Vavasseur, A., Joyard, J., Richaud, P. and Rolland, N.** (2006) HMA1, a new Cu-ATPase of



the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 2882-2892.

**Shi, R., Bassler, R., Zou, C. and Römheld, V.** (2011) Is iron phloem mobile during senescence in trees? A reinvestigation of Rissmüller's finding of 1874. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 489-493.

**Sjödin, A., Street, N.R., Sandberg, G., Gustafsson, P. and Jansson, S.** (2009) The Populus Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the Populus genome. *New Phytologist*, **182**, 1013-1025.

**Sperotto, R.A., Ricachenevsky, F.K., Duarte, G.L., Boff, T., Lopes, K.L., Sperb, E.R., Grusak, M.A. and Fett, J.P.** (2009) Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*, **230**, 985-1002.

**Sperotto, R.A., Boff, T., Duarte, G.L., Santos, L.S., Grusak, M.A. and Fett, J.P.** (2010) Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains. *Journal of plant physiology*, **167**, 1500-1506.

**Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S. and Nishizawa, N.K.** (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *The Plant Cell Online*, **15**, 1263-1280.

**Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A. and Dubcovsky, J.** (2006) A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. *Science*, **314**, 1298-1301.

**Unterbrunner, R., Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Tlustos, P., Zupan, M. and Wenzel, W.W.** (2007) Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environmental Pollution*, **148**, 107-114.

**Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. and Richaud, P.** (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters*, **576**, 306-312.

**Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.-F. and Curie, C.** (2002) IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell*, **14**, 1223-1233.

**Von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.-F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A. and Hider, R.C.** (1999) Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology*, **119**, 1107-1114.

**Waters, B.M., Uauy, C., Dubcovsky, J. and Grusak, M.A.** (2009) Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 4263-4274.

**Wong, C.K.E. and Cobbett, C.S.** (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, **181**, 71-78.

**Yruela, I.** (2013) Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*, **5**, 1090-1109.

**Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G.S., Iori, V., Pietrosanti, L. and Massacci, A.** (2009) Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water, Air, and Soil Pollution*, **197**, 23-34.

**Zavaleta-mancera, H., Franklin, K., Ougham, H., Thomas, H. and Scott, I.** (1999) Regreening of senescent Nicotiana leaves. II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Biology*, **50**, 1683-1689.

**Zhang, K. and Gan, S.-S.** (2012) An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiology*, **158**, 961-969.



## Chapitre IV : Caractérisation de transporteurs putativement impliqués dans la remobilisation des métaux

---

Les résultats du chapitre précédent ont montré que chez le peuplier une faible proportion des métaux des feuilles est remobilisée au cours de la sénescence d'automne. Parallèlement, l'expression des gènes candidats à ce processus diminue au cours de la sénescence foliaire. L'absence de remobilisation pourrait donc être directement liée à la faible expression de ces gènes. De ce fait, l'obtention par transformation de peupliers exprimant fortement ces gènes spécifiquement au niveau des feuilles sénescentes pourrait peut-être permettre d'augmenter la proportion de métaux remobilisés. Pour cela, il apparaît essentiel d'identifier, parmi le pool de gènes candidats, le ou les gènes clé(s) permettant de « vider » les métaux des feuilles.

Parce que la vacuole est un lieu privilégié de stockage des métaux, et qu'elle constitue un compartiment important dans le recyclage des nutriments au cours de la sénescence, les gènes codant pour des protéines tonoplastiques impliquées dans le transport de métaux vers le cytosol représentent des cibles intéressantes pour cette approche. Dans ce cadre, la famille *NRAMP* (**N**atural **R**esistance-**A**ssociated **M**acrophage **P**rotein) dont certains membres (*AtNRAMP3* & *AtNRAMP4* ; voir introduction) codent pour des protéines permettant l'export des métaux vacuolaires pourrait contenir des gènes d'intérêt. Récemment, une étude phylogénétique a permis d'identifier six *NRAMP* dans le génome de *Populus trichocarpa* nisqually (Migeon *et al.*, 2010).

Parmi ces six *PtNRAMP*, *PtNRAMP1* localisé sur le chromosome 1 et *PtNRAMP2* localisé sur le chromosome 2, sont les homologues d'*AtNRAMP1* et *AtNRAMP2* d'*Arabidopsis thaliana*. Les quatre autres membres de cette famille sont organisés en deux paires de gènes fortement homologues et localisés en tandem sur le génome (*PtNRAMP3.1/3.2* et *PtNRAMP7.1/7.2*) suggérant une duplication récente (Migeon *et al.*, 2010). Les gènes *PtNRAMP3.1* et *PtNRAMP3.2* localisés sur le chromosome 7 sont les homologues d'*AtNRAMP3* et d'*AtNRAMP4*. En revanche, les gènes *PtNRAMP7.1* et *PtNRAMP7.2* localisés sur le chromosome 5 ne présentent aucun homologue évident chez d'autres espèces. Les tentatives de mesure d'expression et de clonage de *PtNRAMP7.1* et *PtNRAMP7.2* n'ont pas abouti, suggérant un niveau d'expression extrêmement faible dans nos conditions. En accord avec cette hypothèse, seule une EST de *PtNRAMP7s* (accession: AJ644943) est disponible dans les bases de données. De ce fait ces deux gènes n'ont pas été étudiés.





Dans le cadre de ma thèse, les CDS codant pour PtNRAMP1, PtNRAMP2, PtNRAMP3.1 et PtNRAMP3.2 ont été clonés et une caractérisation en systèmes hétérologues (levure, ovocyte de xénope) ainsi que chez *Arabidopsis* a été entreprise.

Du fait de leur homologie de séquence avec AtNRAMP3 et AtNRAMP4, les protéines PtNRAMP3.1 et PtNRAMP3.2 ont fait l'objet d'une attention particulière. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, *AtNRAMP3* et *d'AtNRAMP4* sont impliqués dans le déstockage vacuolaire de cations divalents incluant le Cd et le Zn (Thomine *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2003 ; Lanquar *et al.*, 2004 ; Lanquar *et al.*, 2005 ; Lanquar *et al.*, 2010). Des données transcriptomiques indiquent qu'*AtNRAMP4* et *PtNRAMP3.2* pourraient être induits au moment de la sénescence, suggérant un rôle de ces gènes dans la remobilisation des métaux (Sjödin *et al.*, 2009 ; Breeze *et al.*, 2011). Enfin, de récents travaux indiquent que *PtNRAMP3.2* est particulièrement induit en condition de stress Cd (Induri *et al.*, 2012).



## **I. Article II**

### **Duplication of poplar NRAMP3 gene generated two highly conserved transporters with distinct functions**

*Mathieu Pottier<sup>1</sup>, Van Anh Le Thi<sup>1</sup>, Cindy Victor<sup>1</sup>, Sandrine Blanchet<sup>2</sup>, Sébastien Thomine<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institut des Sciences du Végétal, Saclay Plant Sciences, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France ;

<sup>2</sup>Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Physiologie Cellulaire & Végétale, Équipe Plante-Stress-Métaux 17 rue des Martyrs 38 054 Grenoble cedex 9, France

#### **Correspondence to:**

Sébastien Thomine,  
Institut des Sciences du Végétal,  
1, Avenue de la Terrasse,  
91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.  
Tel. +33 1 69 82 36 87.  
Email: [thomine@isv.cnrs-gif.fr](mailto:thomine@isv.cnrs-gif.fr)

*Le travail concernant PtNRAMP3.1 et PtNRAMP3.2 est présenté sous forme d'un manuscrit qui sera soumis, après intégration des résultats obtenus par Van Anh Le Thi. Le clonage de PtNRAMP3.1 a été effectué par Sandrine Blanchet et Mathieu Pottier. Le clonage de PtNRAMP3.2, les constructions moléculaires, les expérimentations en levure et chez Arabidopsis, les analyses de résultats ont été réalisées par Mathieu Pottier et sa stagiaire Cindy Victor. Les analyses in silico ont été effectuées par Mathieu Pottier. La rédaction de ce manuscrit a été réalisée par Mathieu Pottier avec l'aide et les corrections de Sébastien Thomine.*



## ABSTRACT

Efficient phytoextraction by poplar requires metal accumulation in wood tissues. However, previous studies have shown that poplar accumulates a significant amount of metals in senescent leaves, causing metal return to soil upon leaf abscission. As the vacuole is a major metal storage site in plant cells, we investigated the role of poplar NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) transporter PtNRAMP3.1 and PtNRAMP3.2 homologous to the vacuolar NRAMP3 and NRAMP4 of *Arabidopsis thaliana* in leaf metal homeostasis. *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* genes are located in a 32kb area of the chromosome 7 and share 88,2% protein identity. Although they are most highly expressed in leaves, they display dramatic variations of expression levels among the poplar cultivars. Expression in yeast showed that both PtNRAMP3.1 and PtNRAMP3.2 transport iron and manganese while only PtNRAMP3.1 transports zinc. Strikingly, PtNRAMP3.1 and PtNRAMP3.2 exhibit different subcellular localizations: PtNRAMP3.1 is localized in intracellular compartments and PtNRAMP3.2 is targeted to the tonoplast as its homologues AtNRAMP3 and AtNRAMP4. Accordingly, *PtNRAMP3.2* expression rescues the phenotypes of *nramp3nramp4* double mutant on both iron starvation and cadmium exposure and restores metal contents to wild-type level whereas *PtNRAMP3.1* expression has no effect in the *nramp3nramp4* double mutant of *A. thaliana*. Metal concentration analyses in transgenic poplar suggest that the cellular compartment labeled by PtNRAMP3.1 could play an important role in manganese and zinc homeostasis in poplar leaves. A duplication of an ancestral *PtNRAMP3* generated two paralogues with distinct localizations, regulations and functions through neofunctionalization.

**Keywords:** phytoextraction, metal, zinc, manganese, remobilization, recombination



## **INTRODUCTION**

Most metals are essential for protein structure, protein function and energy production in living cells (Kurepa *et al.*, 1997 ; Tommos *et al.*, 1998 ; Ponka, 1999 ; Balk and Lobreaux, 2005 ; Bleackley and MacGillivray, 2011 ; Yruela, 2013). For instance, over 3200 putative zinc-binding proteins distributed in 300 protein families need Zn for their functions (Andreini *et al.*, 2006 ; Zhang and Gladyshev, 2009). However, high metal concentrations in soils caused by natural phenomena and human activities can also be noxious for plants, animals, Humans and the environment (Alloway, 2013). Plants growing in metal contaminated areas generally display a decreased biomass, alteration of metabolic functions and modification of the Fe and Mn homeostasis (Nagajyoti *et al.*, 2010). Moreover, some metals such as Cd have no biological function and are harmless even at low concentrations. For instance, plants exposed to Cd exhibit altered mineral uptake, transpiration, and photosynthesis (Benavides *et al.*, 2005). In Human, Cd exposure through food and cigarette leads to kidney dysfunction and bone diseases, as in the so called Itai-Itai syndrome in Japan (Nordberg, 2009 ; Thévenod, 2009 ; Clemens *et al.*, 2012). For these reasons, metal polluted environments cannot be used for agriculture and need to be rehabilitated. It was proposed to grow non-crop metal tolerant plants on these contaminated fields in the way to extract metal from soil according to a process called “Phytoextraction”. For this purpose, the use of woody species belonging to *Populus* genus has been investigated for over a decade. Indeed these trees have a developed root system and a fast growth rate that should allow them to efficiently extract metals from soil. Moreover, *Populus* trees produce a high biomass even under metal contamination conditions (Laureysens *et al.*, 2004). Besides, contaminated wood can safely and profitably be used for energy production (Chalot *et al.*, 2012). Although poplars show high metal bioconcentration factors with significant clonal differences, highest metal concentrations were mostly observed in senescing leaves (Laureysens *et al.*, 2004 ; Zacchini *et al.*, 2009). Autumnal leaf abscission leads to significant metal return to the soil thereby limiting phytoextraction efficiency.

In this context, we investigated the role of transport proteins from the ubiquitous NRAMP family (**N**atural **R**esistance-**A**ssociated **M**acrophage **P**rotein) in metal accumulation in senescing leaves (Nevo and Nelson, 2006). *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* were already shown to be expressed in leaves and to play an essential role in metal homeostasis controlling Fe, Mn, Zn and Cd mobilization from the vacuole (Thomine *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2003 ; Lanquar *et al.*, 2005 ; Lanquar *et al.*, 2010 ; Molins *et al.*, 2013). These proteins are involved in metal supply for seed germination and photosynthesis (Lanquar *et al.*, 2005 ;





Lanquar *et al.*, 2010 ; Molins *et al.*, 2013). In addition, they limit metal accumulation and Cd toxicity symptoms (Oomen *et al.*, 2009 ; Molins *et al.*, 2013). The vacuole is a major site for metal storage and sequestration ; transporters involved in metal release from this organelle are therefore good candidates to limit metal accumulation in leaves. Interestingly, transcriptomic analyses highlighted induction of *AtNRAMP3* during leaf senescence, indicating that this transporter could play a role in metal remobilization during leaf senescence (Breeze *et al.*, 2011). *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2*, their putative homologous in *Populus trichocarpa*, share 75% and 78% of protein identity with *AtNRAMP3* (Migeon *et al.*, 2010). They are localized in tandem on chromosome 7 and share also high protein identity together. Microarray data performed on *Populus* indicated that *PtNRAMP3.2* is induced during leaf senescence as *AtNRAMP3*, and appears to be also induced during Cd exposure (Sjödin *et al.*, 2009 ; Induri *et al.*, 2012). In this work, characterization at both genomic and functional levels of *PtNRAMP3* paralogues suggests their emergence *via* gene duplication and highlights the subsequent divergence of their functions. The decrease of selective pressure caused by gene duplication allowed neo-functionalization of *PtNRAMP3.1*.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Phylogenetic tree construction*

Full-length amino acid sequences were aligned by CLUSTALW and imported into the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package version 4 (Tamura *et al.*, 2007). Phylogenetic analyses were conducted using the neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA, (Saitou and Nei, 1987) with the pairwise deletion option for handling alignment gaps, and with the equal input correction model with heterogeneous pattern among lineages for distance computation. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method (Zuckerandl and Pauling, 1965) and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. The phylogenetic trees were drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances. The bootstrap consensus tree inferred from 1,000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed (Felsenstein, 1985). Accession numbers and organisms corresponding to sequences used for this tree are listed in **SI Table I**.



### *Genomic sequence analysis*

Poplar genome sequences (Tuskan *et al.*, 2006), were obtained from Phytozome V9.1 (Goodstein *et al.*, 2012). Poplar genomic DNA homologies were investigated by Dot-plot analyses performed on Gepard software (Krumsiek *et al.*, 2007).

### *Gene expression*

Total RNA was extracted using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Buffer RLC was supplemented with 10mg/mL of PEG 6000 to scavenge secondary compounds. Genomic DNA contaminations were eliminated by applying the RNase-Free DNase Set (Qiagen) on spin columns. RNA quality and quantity was evaluated on nanodrop and agarose gel following denaturation (10 min, 80°C).

5µg DNA-free RNA was used for reverse transcription by the SuperScript III First-Strand kit (Invitrogen). Because specific primers were designed on non conserved areas including 5'UTR and 3'UTR, reverse transcriptions were performed using random hexamers, allowing comparison of gene expression levels despite the different position of the amplicons on the cDNA. Gene-specific PCR primers were designed based on transcript sequences (size, about 200 bp ; melting temperature, 60°C) using OligoPerfect™ Designer (<http://tools.lifetechnologies.com>). All primers used for q-RT-PCR are listed in **SI Table II**. One-sixth of the cDNAs was used as a template in 10-µl q-PCR reactions performed on a Roche LightCycler480 using Roche reagents, according to the manufacturer's instructions (<http://www.roche.com>). For each poplar cultivar, primer specificity was confirmed by analysis of the melting curves and sequencing of the PCR products. Relative transcript levels were calculated by normalization to the transcript amount to three constitutively expressed genes. *ACTIN*, *UBQ*, and *TUB* were used for the analysis of *NRAMP* expression in poplar organs. *EF-1A*, *PP2A* and *UBC10* were used for the analysis of *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* expression in leaves of different poplar genotypes (Basa *et al.*, 2009). For each poplar cultivar, primer amplification efficiencies were determined using five standards from serial dilutions of a pool including the 4 biological repetitions used for gene expression. Primer combinations had at least 85% efficiency.

### *Construction of expression vectors*

*PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* CDSs were amplified by PCR from cDNA synthesized from leaf RNA of *Populus trichocarpa* cv nisqually. Primer PtNramp3aLgtw encompassing the ATG initiation codon was used with PtNramp3aRgtwstp encompassing the



TAA stop codon or with PtNramp3aRgtwnostp designed before the TAA stop codon to amplify *PtNRAMP3.1* with and without TAA stop codon, respectively. Primer PtNramp3bLlonggtw encompassing the ATG initiation codon was used with PtNramp3bRlonggtwstp encompassing the TAA stop codon or with PtNramp3bRlonggtwnostp designed before the TAA stop codon in the aim to amplified *PtNRAMP3.2* with and without TAA stop codon, respectively. Forward and reverse primers used for *NRAMP* cloning are shown in **SI Table III**. PCRs were performed with the Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo-Scientific). For *PtNRAMP3.1*, after denaturation at 98°C for 1 min, 10 cycles were performed at 98°C for 30 sec, 52°C for 30 sec and 72°C for 1 min and 30 sec, using specific primers described in **SI Table III**. The resulting products were directly used as a templates for a second amplification of 25 cycles at 98°C for 1 min, followed 98°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 1 min and 30 sec, and completed by an extension at 72°C for 5 min using the generic U5 and U3 primers. For *PtNRAMP3.2*, after denaturation at 98°C for 1 min, 35 cycles were performed 98°C for 30sec, 62°C for 30 sec, 72°C for 1 min and 30 sec, and completed by an extension at 72°C for 5 min using the specific primers described in **SI Table III**.

The gel-purified PCR products were recombined into pDONOR207 (Invitrogen) for *PtNRAMP3.1* and into pDONOR201 (Invitrogen) for *PtNRAMP3.2* in a 10- $\mu$ l BP Clonase (Invitrogen) reaction following the manufacturer's instruction.

For the generation of yeast expression vectors, LR reactions were performed using the pDR195gtw vector (pDR195 adapted to Gateway cloning, Rentsch *et al.*, 1995 ; Oomen *et al.*, 2009) and the pDONOR (Invitrogen) containing *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* with stop codon.

For the generation of plant expression vectors, LR reactions, were performed to transfer *PtNRAMP3s* fragments with or without stop codon from pDONOR vectors to the Gateway binary over-expression vectors pB7WGF2 and pB7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) that contain the 35S CaMV promoter and *GFP* sequence allowing to generate *GFP::PtPRAMP3* and *PtNRAMP3::GFP* fusion proteins, respectively. *PtNRAMP3s* fragments with stop codon were also transferred in the pUB-DEST vector to drive their expression under control of Ubiquitin 10 promoter (Grefen *et al.*, 2010).

#### *Yeast strains, transformations and mediums*

DEY1453 (*fet3fet4*, Eide *et al.*, 1996), ZHY3 (*zrt1zrt2*, Zhao and Eide, 1996a ; b), *smf1* (Supek *et al.*, 1996 ; Thomine *et al.*, 2000), *smf2* (Cohen *et al.*, 2000) and INVSc1 (a



“wild type” strain, Invitrogen) yeast strains were grown at 30°C on Yeast extract/Peptone/Dextrose (before transformation) or synthetic Dextrose -ura (after transformation). For DEY1453 and the ZHY3 strains media were supplemented with 0.2 mM FeCl<sub>3</sub> and 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, respectively. Yeast cells were transformed according to standard procedures (Invitrogen).

#### *Yeast growth assays*

Transformed *fet3fet4*, *smf1*, *smf2*, INVSc1 were grown overnight in liquid synthetic dextrose -ura (pH 6) supplemented with 0.2 mM FeCl<sub>3</sub> for *fet3fet4*. The cultures were diluted to ODs of 1 to 10<sup>-3</sup> and spotted on synthetic dextrose-ura plates (pH 6). Transformed *fet3fet4* strains were grown in medium supplemented with 100µM of BathoPhenanthroline-Di-Sulfonic acid (BPDS) and 0.2 mM FeCl<sub>3</sub> (+ Fe) or with 100 µM BPDS and 40 µM FeCl<sub>3</sub> (- Fe). Transformed *smf1* strains were grown in medium supplemented with 5 mM ethylene glycolbis(beta-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) and 100 µM MnSO<sub>4</sub> (+Mn) or with 5 mM EGTA without MnSO<sub>4</sub> (-Mn). Transformed *smf2* strains were grown in medium supplemented with 10 mM EGTA and 100 µM MnSO<sub>4</sub> (+Mn), with 10 mM EGTA and without MnSO<sub>4</sub> (-Mn) or with 10 mM MnSO<sub>4</sub> (++)Mn). Transformed INVSc1 strains were grown on control medium (-Cd) or medium supplemented with 30 µM Cd (+Cd). Transformed *zrt1zrt2* strains were grown on plates containing synthetic dextrose-ura without ZnCl<sub>2</sub> for two days. Then, white young growing cells were diluted to ODs of 1 to 10<sup>-3</sup> and spotted on synthetic dextrose -ura plates supplemented with 1mM Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) and 50 µM ZnCl<sub>2</sub> (+Zn) or with 1 mM EDTA without ZnCl<sub>2</sub> (-Zn).

#### *Protoplast transformation*

cDNA encoding translational fusions between *PtNRAMP3.1* or *PtNRAMP3.2* and *GFP* were transiently expressed in *A. thaliana* protoplasts through polyethylene glycol (PEG) mediated transformation. Free DsRed2 or peroxysomal marker::mCherry (Nelson *et al.*, 2007), were co-transformed in the same cells. The walls of *A. thaliana* suspension cells were digested in Gamborg's B5 medium supplemented with 0,17 M glucose, 0,17 M mannitol, 1% cellulase and 0.2% macerozyme. Protoplasts were purified by floatation in Gamborg's B5 medium supplemented with 0.28 M sucrose. For transformation, 0.2 x 10<sup>6</sup> cells were mixed with 5 µg of plasmid DNA in a solution containing 25% PEG 6000, 0.45 M mannitol, 0.1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> pH 9 and incubated in the dark for 20 min. The PEG was then washed twice with 0.275 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and the protoplasts were resuspended in Gamborg's B5 medium





supplemented with 0.17 M glucose and 0.17 M mannitol until microscopic observation. After 48 h (21°C, Dark), fluorescent cells were imaged.

#### *Confocal imaging*

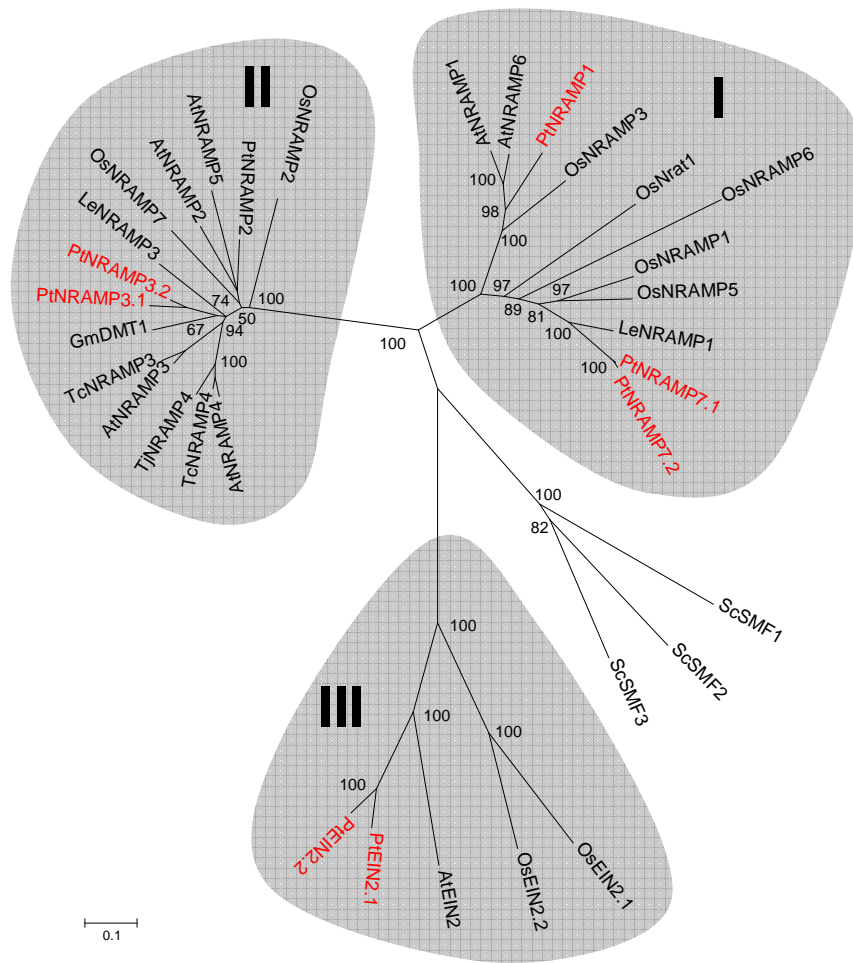
Transformed protoplasts and root of T2 transgenic *nramp3nramp4* (Col0) over-expressing *PtNRAMP3.1::GFP* and *PtNRAMP3.2::GFP* grown vertically during 8 days *in vitro* on modified low iron ABIS plates (21°C, 16h light) were imaged by confocal microscopy (Leica TCS SP2 and SP8X). GFP was excited at 488 nm and the fluorescence emission signal was recovered between 495 nm and 535 nm. MitoTracker® Red CMXRos and peroxysomal marker::mCherry (Nelson *et al.*, 2007) were excited at 543 nm and the fluorescence emission signal was recovered between 578 nm and 707 nm.

#### *Plant material and plant transformation*

The generation of the *nramp3nramp4* double mutant of *Arabidopsis thaliana* Colombia 0 (Col 0) was described previously (Molins *et al.*, 2013). *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* constructs were introduced in *nramp3nramp4* mutants (Col 0 background) through *A. tumefaciens* (strain AGL0) mediated transformation using the flower dip method (Clough, 2005). Independent homozygous *A. thaliana* Col 0 *nramp3nramp4* transformants with a single insertion locus were obtained by plant selection based on Basta resistance and complementation of the *nramp3nramp4* phenotype on low Fe medium.

#### *Plant growth conditions*

*Arabidopsis* seedlings were grown on ABIS medium plates containing 2.5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Murashige and Skoog microelements, 1% sucrose, 1% Phytigel, 1 mM MES adjusted with KOH to pH 6.1 and FeHBED (N,N'-di(2-hydroxybenzyl) ethylenediamine-N,N'-diacetic acid monochloride hydrate ; Strem Chemicals, Newburyport, MA, USA) as indicated in figure legends. FeHBED was prepared as described by Lanquar *et al.* (Lanquar *et al.*, 2005). For low iron sensitivity growth assays, plants were grown for 8 days on plates where Fe was omitted. For Cd sensitivity growth assays, plants were grown for 14 days on plates containing 50µM FeHBED and 30µM CdCl<sub>2</sub> (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA). For Metal content analyzes, plants were grown for 14 days on plates containing 100µM FeHBED (control) or 100µM FeHBED and 10µM CdCl<sub>2</sub>. Plates were placed vertically in environmental growth chambers (Sanyo MLR- 350, Morigushi, Japan) at 21 °C with a 16 h photoperiod under 120 µmol photon·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.



**Fig. 1.** The NRAMP family.

An unrooted, neighbor-joining-based tree (Saitou *and* Nei, 1987) of the NRAMP transporter family in *Saccharomyces cerevisiae* and selected plants. The analysis was performed as described in the “Materials and methods” section and the tree was generated using MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) after sequence alignment. Bootstrap values are indicated (1,000 replicates). Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed and their lengths are proportional to phylogenetic distances. Corresponding gene loci are given in a supplemental file (**SI table I**). Names of the species are abbreviated with a two-letter code (At, *Arabidopsis thaliana*; Gm, *Glycine max*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Nc, *Nocceaea caerulescens*; Pt, *Populus trichocarpa*; Os, *Oryza sativa*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Tj, *Nocceaea cochleariforme*).

### *Root Length Measurements*

Plants grown vertically on plates were photographed at the indicated times and root length was determined using the ImageJ 1.45s program and a digitizer tablet (WACOM Europe GMBH, Krefeld, Germany, Intuos 4M). Values are the average of measurements on 10–12 roots.

### *Metal concentration analysis*

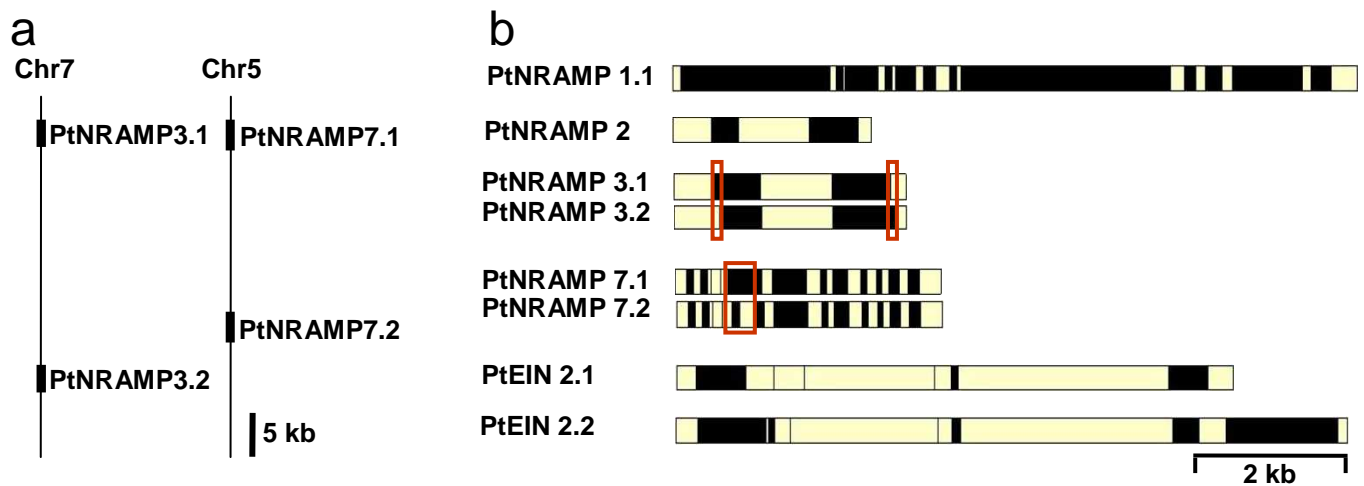
For metal analyses in yeast, liquid SD-ura medium containing transformed *zrt1zrt2* strains growing overnight were diluted to OD 0.3 in liquid SD-ura supplemented with 5  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$  and 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ . After 30 hrs of incubation at 30°C under agitation, yeast cells were recovered by centrifugation (3340g, 5 min, 4°C) and washed twice in 50 ml ice cold YNB supplemented with EDTA 20 mM and MES 50 mM pH6, pelleted and then washed in ice cold ultrapure water.

For metal analyses in plants, shoots and roots were harvested separately and washed. Roots were desorbed by incubation in ice-cold buffer containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 1 mM MES-KOH, pH 5.7, for 10 min.

The dry weight (DW) of the samples (yeast or plants) was measured after drying at 60°C for 3 days. The dried samples were digested in 2 ml of 70 % nitric acid in a DigiBlock ED36 (LabTech, Italy) at 80°C for 1 hr, 100°C for 1 hr and 120°C for 2 hr . After dilution in trace-metal-free water, the metal content of the samples was determined by atomic absorption spectrometry using an AA240FS flame spectrometer (Agilent, USA).

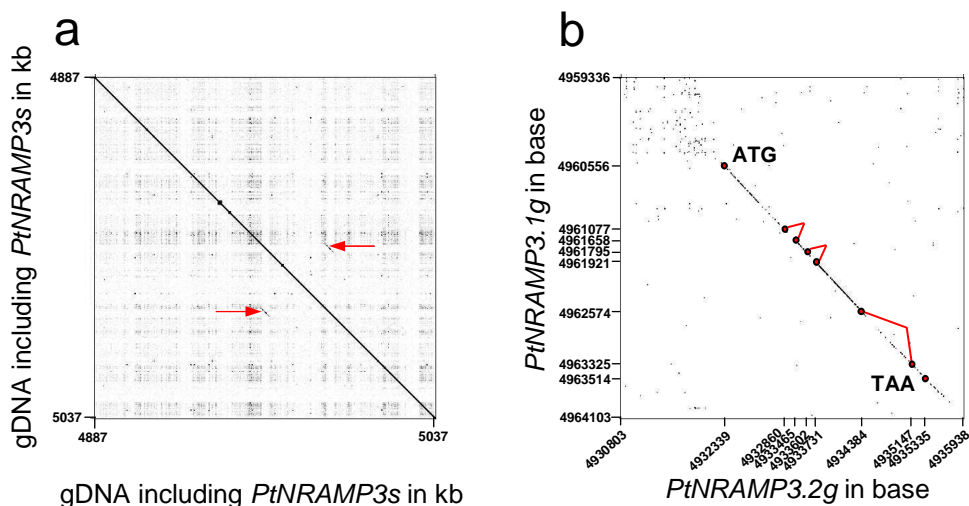
### *Statistical analysis*

Data were analyzed with kruskal-Wallis and Mann-Whitney non parametric tests for multiple comparisons and pair comparisons, respectively. For multiple comparisons, a Tukey post hoc test was performed when significant differences were detected ( $p < 0.05$ ). Different letters indicate significant differences between samples. Both tests were performed using the R software package.



**Fig. 2.** Genomic structure of the NRAMP family in poplar.

(a) localization of the gene pairs *PtNRAMP3.1/PtNRAMP3.2* and *PtNRAMP7.1/PtNRAMP7.2* in close vicinity (lower than 32kb) on chromosome 7 and 5, respectively. (b) Representation of the intron (black) -exon (white) structure of *PtNRAMP* genes. Red rectangles show main differences of the intron/exon structure.



**Fig. 3.** Genomic duplication involved only *PtNRAMP*s.

Dot-plots performed on Gepard software (Krumstiek *et al.*, 2007), between (a) 1,5 Mb of genomic DNA including *PtNRAMP3.1/PtNRAMP3.2* and itself, between (b) *PtNRAMP3.1* genomic DNA and *PtNRAMP3.2* genomic DNA. The duplication of *PtNRAMP3* generates two lines parallel to the diagonal (red arrows). Red dots delimit the 3 introns and the 4 exons.

## **RESULTS**

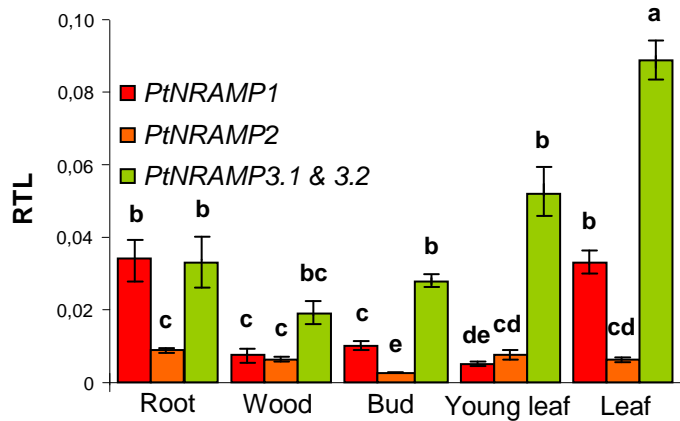
### ***PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* a tandem localized gene pair encoding homologous proteins**

Plant NRAMPs are distributed into three different groups according to their protein sequence identities (**Fig.1**). NRAMPs from poplar follow the same distribution. *PtNRAMP1*, *PtNRAMP7.1* and *PtNRAMP7.2* are found in group I including *AtNRAMP1* and *AtNRAMP6*. *PtNRAMP2*, *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* are in the group II which includes *AtNRAMP2*, *AtNRAMP5*, *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4*. *PtEIN2.1* and *PtEIN2.2* are located in the group III as *AtEIN2*.

Interestingly, *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* genes, the closest homologues of *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* of *Arabidopsis thaliana*, are localized in close vicinity in the poplar genome (**Fig. 1**, **Fig.2a** and **SI Fig 1**). They located in a 32kb area of chromosome 7, and share 88.2% of protein identity. Similarly, *PtNRAMP7.1* and *PtNRAMP7.2* are also organized in tandem in a 28kb area of chromosome 5 and share 86,7% of protein identity. Moreover, intron/exon structures of both gene pairs are similar (**Fig 2b**). Dot plot analyses performed on genomic DNA encompassing *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* show specific sequence homologies between both coding sequences and 3'UTR (**Fig. 3a** and **3b**). Extended analyses identified eight other genomic DNA duplication zones in the 2.5 Mbp surrounding *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* (data not show). However, among them, only one leads to gene duplication (Red chlorophyll catabolite reductase ; Potri.007G043500, Potri.007G043600, Potri.007G043700). Dot plot analysis of the *PtNRAMP7.1* and *PtNRAMP7.2* genomic area revealed sequence duplication of the full length gene including introns and promoter (**SI Fig. 2**). However, the sequence of the 5' and 3'UTR was not conserved. Unlike *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2*, it is expected that *PtNRAMP7.1* and *PtNRAMP7.2* exhibit the same expression pattern because sequence homologies include the promoter.

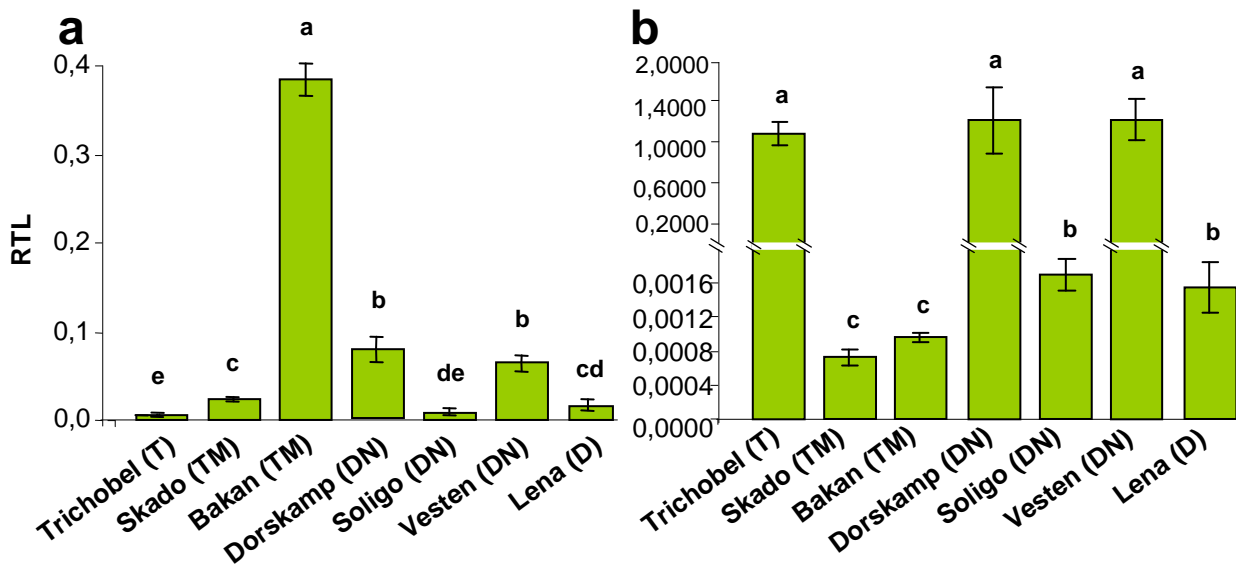
### ***PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* are differentially expressed in leaves**

The expression patterns of *NRAMP* genes were determined using q-RT-PCR, on roots, wood, buds and leaves of *Populus trichocarpa* cv. trichobel, which is phylogenetically close to *Populus trichocarpa* cv. nisqually (Tuskan *et al.*, 2006). The experiment was performed on 2 year old trees growing in a mildly metal contaminated field located at the North-West of Paris ; the sandy soil of this field underwent raw wastewaters spreading from 1899 to 2002



**Fig. 4.** *PtNRAMP* expression level between organs.

Transcription levels of *PtNRAMP1*, *PtNRAMP2* and *PtNRAMP3s* normalized by *ACT*, *UBQ* and *TUB* in root, wood, bud, young leaf and leaf of 2 year old *Populus trichocarpa* Trichobel. Samples were harvested during summer 2009 from poplar growing in the field. Error bars represent SD. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ,  $n > 3$ ) followed by a Tukey *post hoc* test.



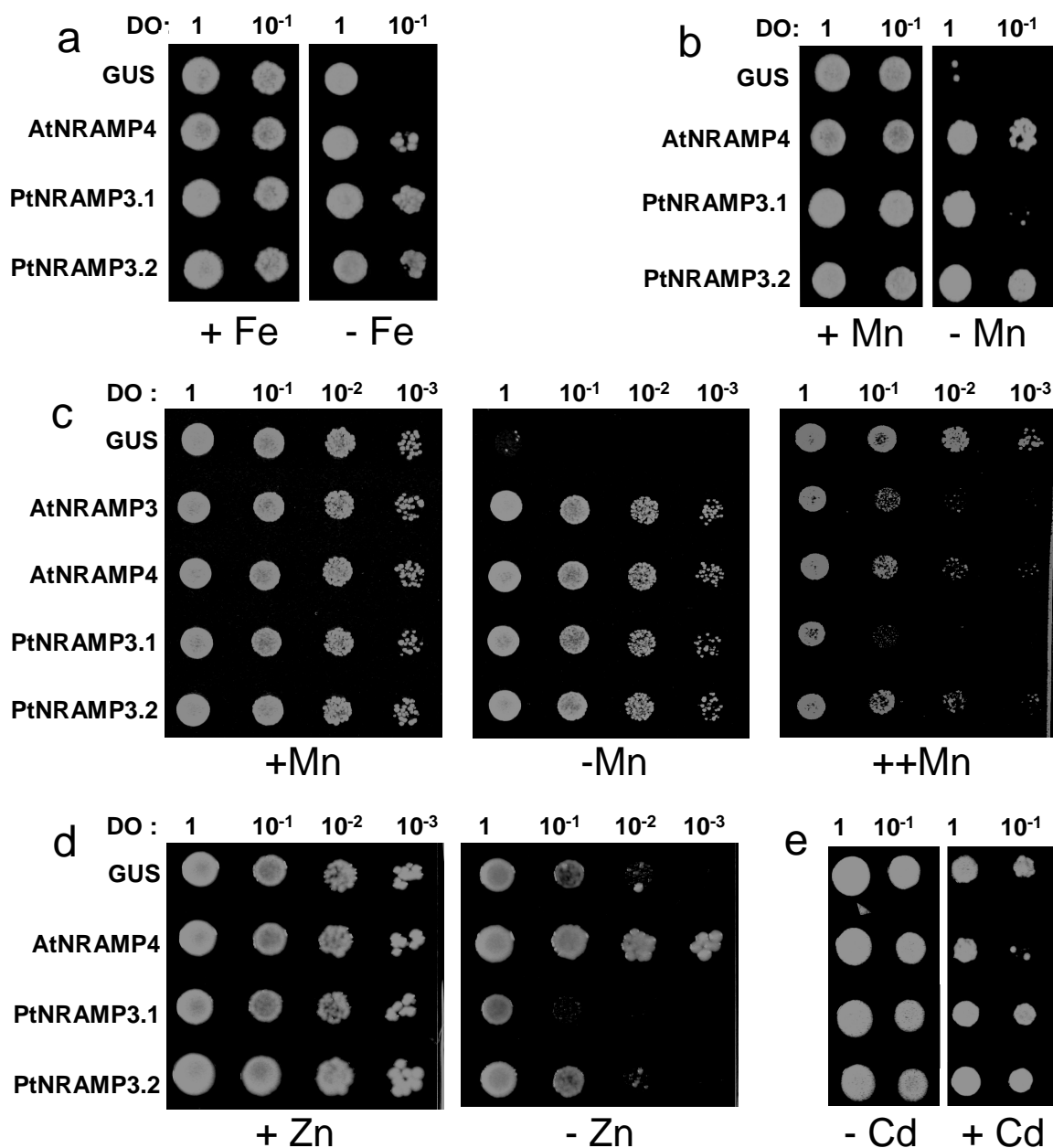
**Fig. 5.** *PtNRAMP3s* expression level in leaves of several poplar genotypes.

Transcription levels of (a) *PtNRAMP3.1* and (b) *PtNRAMP3.2* normalized by *EF-1 $\alpha$* , *PP2A* and *UBC10* in leaves of different 4 year old poplar from 7 genotypes (T, *P. trichocarpa*; TM, *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*; DN, *P. deltoides* x *P. nigra*; D, *P. deltoides*). Samples were harvested during summer 2011 from poplar growing in the field. Error bars represent SD. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ) followed by a Tukey *post hoc* test.

(Dère *et al.*, 2006 ; Lamy *et al.*, 2006). Poplars growing on this field do not display toxicity symptoms. Moreover, the expression analysis was performed on the least contaminated plot. In these conditions, we observed that *PtNRAMP2* is constitutively lowly expressed in all studied tissues whereas *PtNRAMP1* appears mainly expressed in roots and mature leaves (**Fig. 4**) as previously suggested by microarray analyses (Sjödin *et al.*, 2009). Because of the high homology between *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* as well as between *PtNRAMP7.1* and *PtNRAMP7.2* and the difficulty to design primers in the same gene area, we initially used primers able to amplify both members of each gene pair. Intriguingly, it was not possible to detect *PtNRAMP7* expression in any studied tissues indicating that these genes are not expressed in the conditions or organs represented in this study. Accordingly, only one EST (accession: AJ644943, **SI Fig. 3**) for *PtNRAMP7* is available in the database. This EST was obtained from a library of *Populus tremula* x *P. tremuloides* colonized by the arbuscular ectomycorrhiza *Amanita muscaria* suggesting that *PtNRAMP7s* could be expressed specifically in the context of plant-microbe interactions as already observed for other plant *NRAMPs*. In *Arabidopsis thaliana*, *AtNRAMP3* is upregulated in leaves infected by the bacterial pathogens *Pseudomonas syringae* and *Erwinia chrysanthemi* (Segond *et al.*, 2009). Furthermore, *GmDmt1*, a *NRAMP* from soybean is expressed specifically in nodules (Kaiser *et al.*, 2003). On the other hand, transcript profiling of *Populus* metal transporter genes by microarray analysis reveals *PtNRAMP7s* expression in root, differentiating xylem and male catkins (Wilkins *et al.*, 2009 ; Migeon *et al.*, 2010).

Unlike *PtNRAMP7s*, *PtNRAMP3s* are expressed in all studied tissues with the highest level in leaves. This is consistent with *PtNRAMP3s* EST mainly originating from vascular tissues and leaves (**Fig. 4, SI fig. 2**). To go further, leaf *NRAMP3s* expression was, then, monitored across seven different poplar genotypes (**Fig. 5**). We used 4 year old poplars growing in the same metal contaminated field as poplar used to determine *NRAMP3s* expression pattern. To quantify specifically the expression of *PtNRAMP3.1* or *PtNRAMP3.2*, specific primers were designed in 3'UTR and 5'UTR. We observed strong differences in expression levels between genotypes. For instance, *PtNRAMP3.1* expression level is 80 times lower in Trichobel leaves than in Bakan leaves (**Fig. 5a**). Although *PtNRAMP3.2* is highly expressed in Trichobel, Dorskamp and Vesten, its expression appears about 1000 lower in Bakan, Soligo, Skado (**Fig. 5b**). *PtNRAMP3.1* maximal expression level (Bakan) is about 3 times lower than the maximal level for *PtNRAMP3.2* (Trichobel) (**Fig. 5a**). Thus, these genes exhibit dramatically different expression levels across natural variation, which does not correlate with the species or even the section.





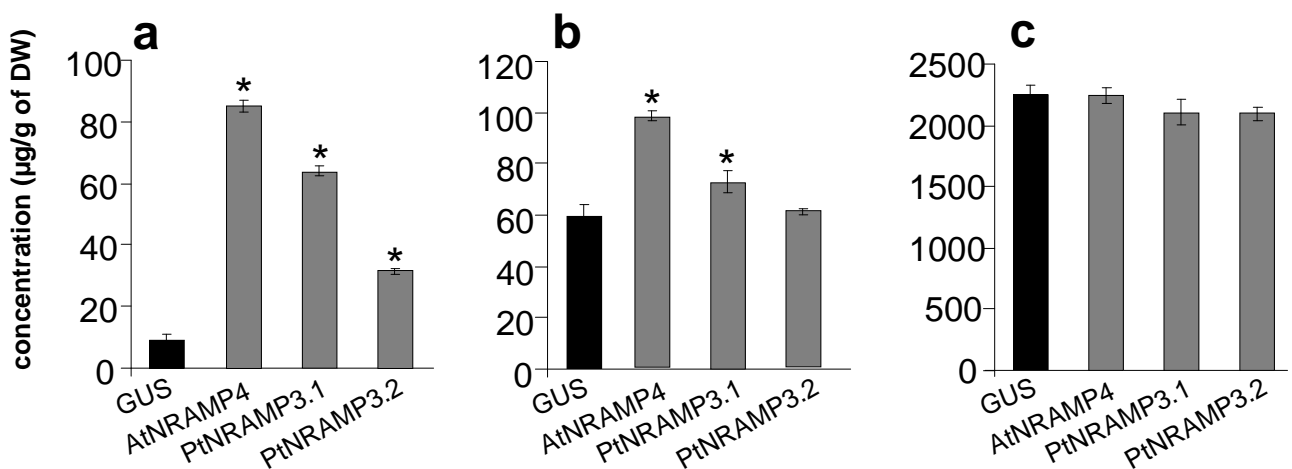
**Fig. 6.** *PtNRAMP3.1* and *AtNRAMP3.2* complement *fet3fet4* (Fe uptake) but also *smf1* (Mn uptake) and *smf2* (Mn homeostasis) yeast strain mutants.

Yeast Cells were transformed with pDR195wtg vector containing the cDNA of *GUS*, *AtNRAMP4*, *PtNRAMP3.1* and *AtNRAMP3.2*. Transformed *fet3fet4* (a), *smf1* (b), *smf2* (c), *zrt1zrt2* (d) INSVc1 (e) were tested as indicated in Materials and Methods. Transformed *fet3fet4* (a) strains were spotted on SD supplemented with 100  $\mu$ M of BPDS and 0.2 mM  $\text{FeCl}_3$  (right, +Fe) or with 100  $\mu$ M BPDS and 40  $\mu$ M  $\text{FeCl}_3$  (left, -Fe). Transformed *smf1* (b) strains were grown in medium supplemented with 5 mM EGTA and 100  $\mu$ M  $\text{MnSO}_4$  (right, +Mn) or with 5 mM EGTA without  $\text{MnSO}_4$  (left, -Mn). Transformed *smf2* (c) strains were grown in medium supplemented with 10 mM EGTA and 100  $\mu$ M  $\text{MnSO}_4$  (right, ++Mn), with 5 mM EGTA and without  $\text{MnSO}_4$  (mid, -Mn) or with 10 mM  $\text{MnSO}_4$  (left, +Mn). Transformed INSVc1 (e) strains were spotted on control SD without Cd (right) or SD supplemented with 30  $\mu$ M Cd (left). Transformed *zrt1zrt2* (d) strain were spotted on SD supplemented with 1 mM EDTA and 50  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_2$  (right, +Zn) or with 1 mM EDTA without  $\text{ZnCl}_2$  (left, -Zn). The plates were incubated at 30°C for 4 (*fet3fet4* and *zrt1zrt2*), 5 (*smf1*) or 2 (*smf2* and INSVc1) days before photography.

### **PtNRAMP3.1 and PtNRAMP3.2 transport different ranges of metals**

To determine NRAMP3.1 and NRAMP3.2 transport abilities, we expressed the corresponding genes in yeast. Because most NRAMP have been implicated in Fe and Mn homeostasis, complementation assays were first performed with *fet3fet4* and *smf1* yeast mutants deficient for Fe and Mn uptake, respectively (Eide *et al.*, 1996 ; Supek *et al.*, 1996 ; Cohen *et al.*, 2000). The *fet3fet4* strain, deficient for both low- and high-affinity Fe uptake systems, requires a high Fe concentration for growth. Expression of *AtNRAMP4* was previously shown to restore *fet3fet4* growth on a low Fe medium (Thomine *et al.*, 2000). Here, we show that expression of *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* rescues *fet3fet4* growth under Fe limitation, indicating that they are able to transport Fe (**Fig. 6a**). To investigate whether PtNRAMP3s are also involved in Mn transport, we tested their ability to complement the *smf1* strain, which is deficient in Mn uptake (Supek *et al.*, 1996). The *smf1* yeast strain fails to grow on synthetic medium containing high concentrations of the divalent cation chelator EGTA unless it is supplemented with Mn (Supek *et al.*, 1996 ; Cohen *et al.*, 2000). Expression of *PtNRAMP3.2* restores the ability of *smf1* to grow on EGTA to the same extent as the positive control *AtNRAMP4* (Thomine *et al.*, 2000). In contrast, *PtNRAMP3.1* complements *smf1* phenotype with lower efficiency (**Fig. 6b**). This result may be due to lower expression of *PtNRAMP3.1* compared to *PtNRAMP3.2* in yeast, a different subcellular localization or a lower efficiency for Mn transport. To test the hypothesis that a different localization accounts for the poor complementation of *smf1* by *PtNRAMP3.1*, we tried to complement *smf2*, a yeast strain lacking an intracellular NRAMP involved in Mn supply to mitochondria and Golgi (Cohen *et al.*, 2000 ; Luk and Culotta, 2001). As *smf1*, this strain is unable to grow on high EGTA unless Mn is supplemented. We found that *AtNRAMP3*, *AtNRAMP4*, *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* are all able to fully complement the *smf2* phenotype (**Fig. 6c**). Moreover, exposure to toxic Mn concentration in the absence of EGTA, decreases growth of the *smf2* strains transformed by *AtNRAMP3*, *AtNRAMP4*, *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* whereas it does not strongly affect the growth of *smf2* transformed by *GUS* (**Fig. 6c**). This increase of sensitivity to Mn is more pronounced for *PtNRAMP3.1*. It confirms that all these NRAMP are involved in Mn transport.

Some NRAMPs, such as *AtNRAMP4* and *NcNRAMP4* were already shown to transport Zn (Lanquar *et al.*, 2004 ; Oomen *et al.*, 2009). To test the ability of *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* to transport Zn was, we expressed them in the *zrt1zrt2* double mutant yeast strain, deficient in high- (*ZRT1*) and low- affinity (*ZRT2*) Zn transport systems (Zhao and



**Fig. 7.** Yeasts accumulate Mn when transformed by *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* and accumulate Zn when transformed by *PtNRAMP3.1*.

Yeast Cells of *zrt1zrt2* strain transformed with pDR195wtg vector containing the cDNA of *GUS*, *AtNRAMP4*, *PtNRAMP3.1* and *AtNRAMP3.2* were growing in liquid SD-ura supplemented with 5 µM FeCl<sub>3</sub>, 10 µM MnSO<sub>4</sub> and 50 µM ZnSO<sub>4</sub> for 30 hrs before metal concentrations were determined by AAS. Concentration of Mn (a), Zn (b) and Mg (c) are presented. Data are the mean from two independent repeats with three different clones each. Error bars represent the SD. \*: Significant difference between yeast expressing GUS and yeast expressing NRAMP based on Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

Eide, 1996a ; b). The *zrt1zrt2* strain cannot grow on synthetic media containing high concentrations of the divalent cation chelator EDTA without high Zn supplementation. *AtNRAMP4* expression efficiently complements *zrt1zrt2* growth defect on low Zn (Lanquar *et al.*, 2004). However, *PtNRAMP3s* expression could not restore *zrt1zrt2* growth on EDTA. Interestingly, expression of *PtNRAMP3.1* reproducibly decreases the ability of the strain to grow in presence of EDTA. This indicates that PtNRAMP3.1 could be involved in Zn transport even though it cannot restore Zn uptake in *zrt1zrt2* mutant.

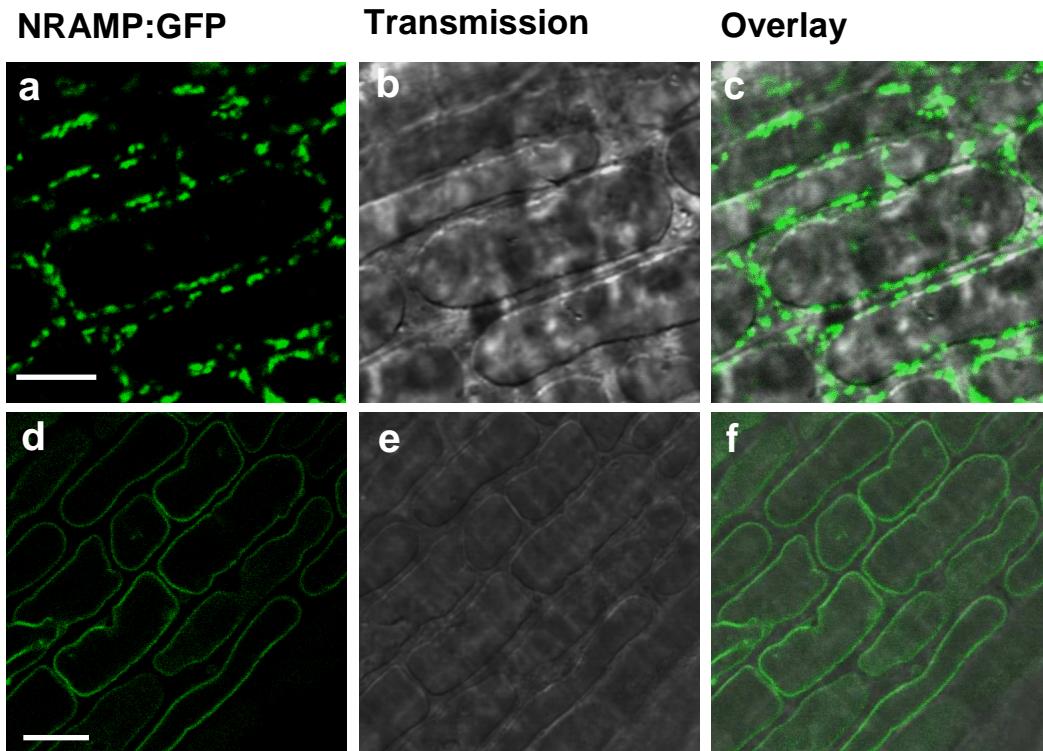
To investigate Cd transport capacity, sensitivity assays were performed in a wild type strain (INVSc1). As previously shown, *AtNRAMP4* expression increases yeast sensitivity to Cd (Thomine *et al.*, 2000), In contrast, neither *PtNRAMP3.1* nor *PtNRAMP3.2* expression affects yeast Cd sensitivity. These results suggest that PtNRAMP3.1 and PtNRAMP3.2 are not able to transport Cd in these conditions.

To further analyze their transport abilities, metal accumulation in yeast expressing *PtNRAMP3s* was measured after 30 h. Consistent with their ability to complement yeast Mn transport mutants, Mn concentration was higher in yeast expressing *AtNRAMP4*, *AtNRAMP3.1* and *AtNRAMP3.2* compared to yeast expressing *GUS*. This result confirms that PtNRAMP3.1 and 3.2 proteins are involved in Mn transport (**Fig. 7a**).

As expected, a significant increase in Zn concentration was observed for yeast expressing *AtNRAMP4* compared to yeast expressing *GUS* (**Fig. 7b**). In agreement with its ability to alter yeast growth under low Zn, expression of *PtNRAMP3.1* leads to increase Zn concentration whereas *PtNRAMP3.2* expression did not. No difference in Mg concentration was observed between transformed and control (**Fig. 7c**). Thus, both growth assays and Zn accumulation indicated that PtNRAMP3.1 is able to transport Zn while PtNRAMP3.2 is not. Taken together, expression in yeast shows that both copies have retained metal transport ability but suggest distinct selectivities and subcellular localizations for PtNRAMP3.1 and PtNRAMP3.2.

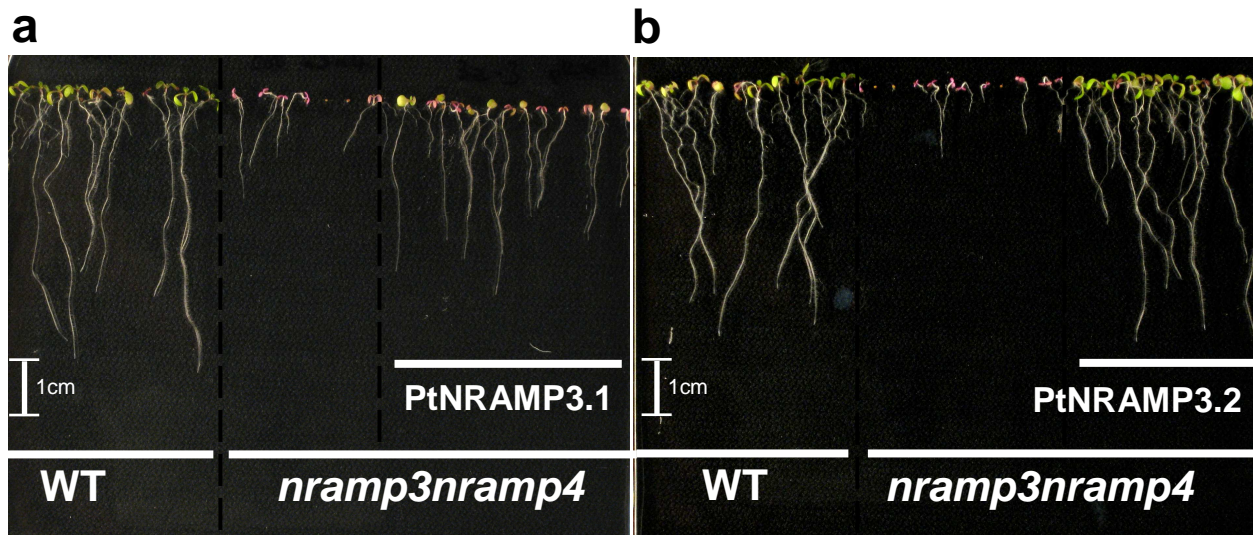
### **PtNRAMP3.1 and PtNRAMP3.2 have distinct subcellular localizations in plant cells**

Subcellular localizations of PtNRAMP3s were determined by observation of plant cells expressing C-terminal GFP fusion proteins of these two transporters. Previous studies showed that tagging with GFP at the C-terminal end does not modify NRAMP targeting and function in plants (Thomine *et al.*, 2003 ; Lanquar *et al.*, 2005 ; Cailliatte *et al.*, 2010). The *Arabidopsis thaliana nramp3nramp4* double mutant (Col0) was stably transformed with *35S::PtNRAMP3.1::GFP* and *35S::PtNRAMP3.2::GFP*. Roots of T2 plants were then observed



**Fig. 8.** PtNRAMP3.1::GFP and PtNRAMP3.2::GFP are targeting to intracellular compartments and to the vacuolar membrane, respectively.

Subcellular localization of PtNRAMP::GFP in the root cells of *Arabidopsis thaliana nramp3nramp4* T2 plants (Col-0) transformed by *p35S:PtNRAMP3.1::GFP* (top, **a, b, c**) et *p35S:PtNRAMP3.2::GFP* (bottom, **d, e, f**). Confocal cross sections show green fluorescent protein (GFP) fluorescence (**a** and **d**), transmission (**b** and **e**) and the overlay (**c** and **f**). Excitation : 488nm, emission: 495-535nm. scale bar = 10 $\mu$ m.



**Fig. 9.** Unlike *PtNRAMP3.1*(**a**), *PtNRAMP3.2* expression (**b**) fully complements *Arabidopsis thaliana nramp3nramp4* double mutant (Col-0) phenotype under low iron supply.

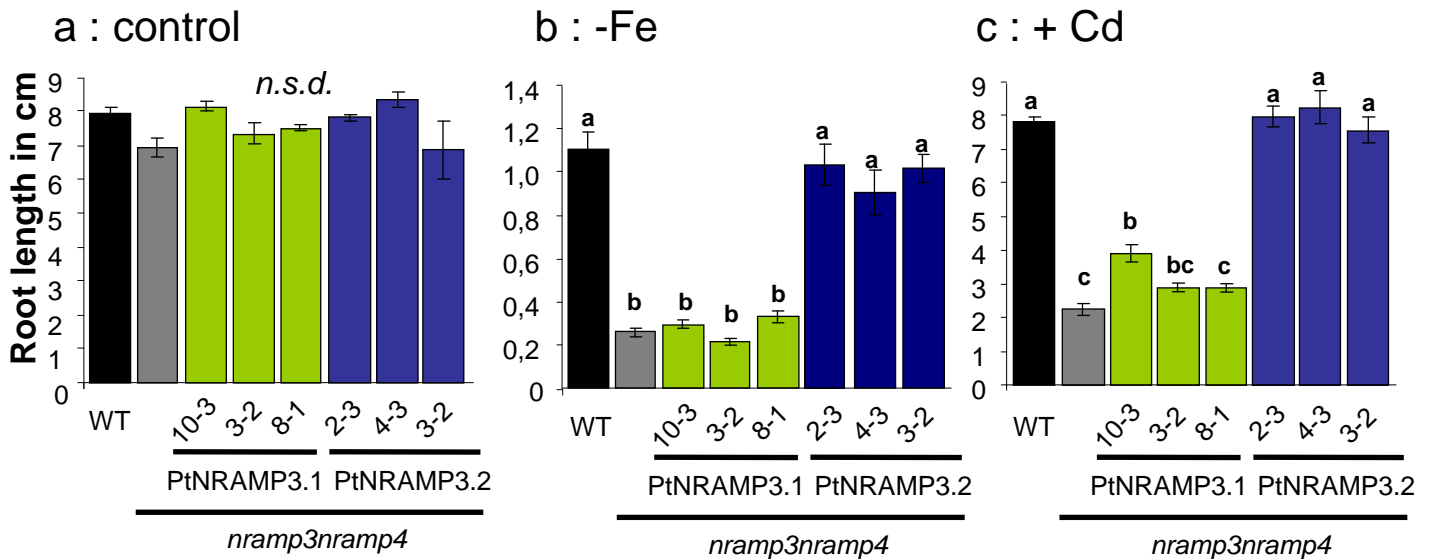
Wild-type (Col-0, left), *nramp3nramp4* double mutant (middle) and T2 plants (right) transformed by *35S::PtNRAMP3.1::GFP* (**a**) or *35S::PtNRAMP3.2::GFP* (**b**) were grown on ABIS medium lacking iron for 8 days.

by confocal microscopy. Interestingly, PtNRAMP3.1::GFP and PtNRAMP3.2::GFP exhibited distinct subcellular localizations. While PtNRAMP3.2::GFP is targeted to the vacuolar membrane, as its homologues in *Arabidopsis thaliana* and in *Noccaea caerulescens* (Thomine *et al.*, 2003 ; Lanquar *et al.*, 2005 ; Oomen *et al.*, 2009), PtNRAMP3.1 is localized in intracellular punctuate structures (**Fig. 8**).

Expression of PtNRAMP3.1::GFP and PtNRAMP3.2::GFP in protoplasts confirmed their distinct localizations in punctuate structures and tonoplast, respectively (**SI Fig. 3**). To determine the nature of the intracellular compartments decorated by PtNRAMP3.1::GFP, protoplast co-transformations and staining were performed with different markers. However, no colocalization was observed between PtNRAMP3.1::GFP and MitoTracker® Red CMXRos or the peroxisomal marker mCherry::PTS1 (Nelson *et al.*, 2007) (**SI Fig. 3**). Thus, this transporter is neither localized in mitochondria nor in peroxisomes. Furthermore, the shape of the structures does not match that of plastids. Their size and their speed could correspond to Golgi or endosomes vesicles. Cotransformations with other markers still have to be tested to evaluate these hypotheses.

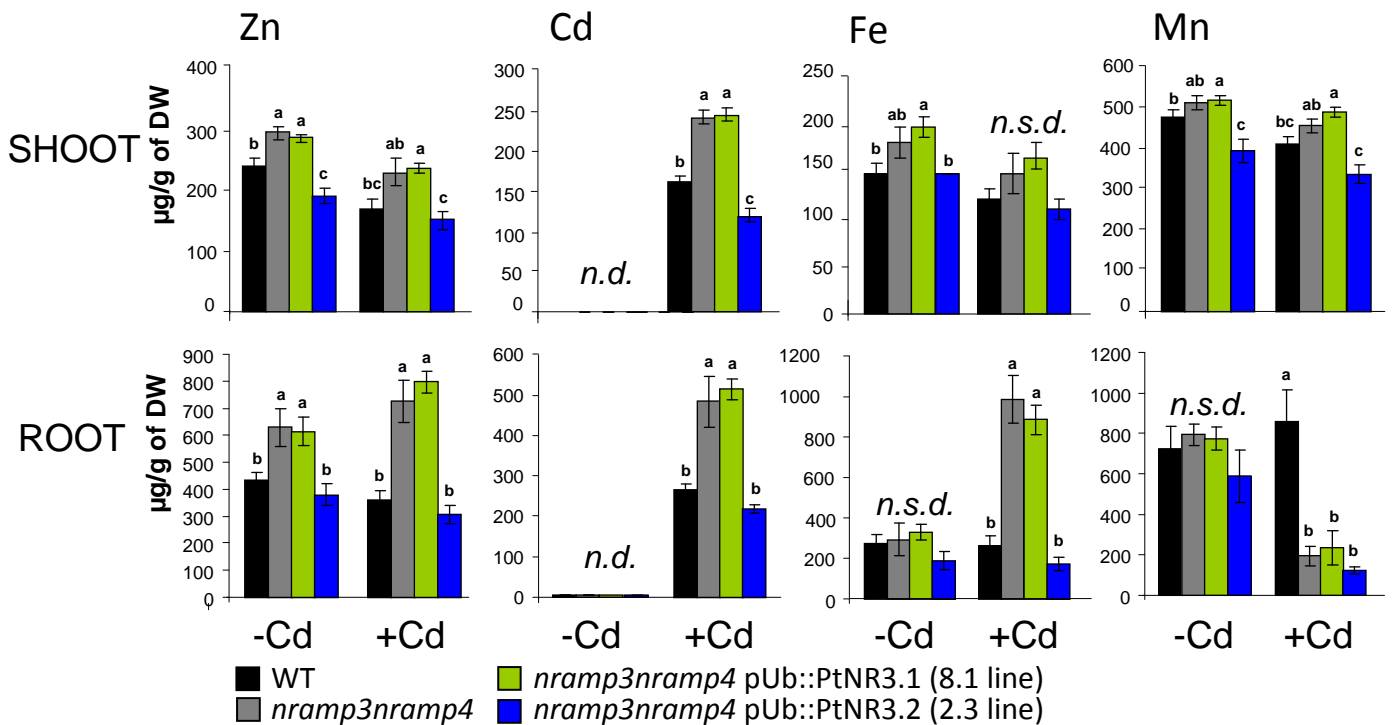
### **PtNRAMP3.2, but not PtNRAMP3.1, complements the *nramp3nramp4* double mutant of *Arabidopsis thaliana***

Because PtNRAMP3s share high protein identities with AtNRAMP3 and AtNRAMP4, we tested whether they could perform the same function in plant. AtNRAMP3 and AtNRAMP4 are essential for iron remobilization from vacuoles during seed germination. As a consequence, *Arabidopsis thaliana nramp3nramp4* double mutants are sensitive to iron starvation during their early development (Lanquar *et al.*, 2005). After eight days of growth under Fe starvation, double mutant plants transformed by *35S:PtNRAMP3.2::GFP* exhibited full complementation of the double mutant phenotype in terms of root length and cotyledon greening. In contrast, the expression of *PtNRAMP3.1::GFP* only led to a marginal improvement of the *nramp3nramp4* growth under Fe deficient conditions (**Fig. 9**). Even though PtNRAMP3.1 is able to transport Fe, it is not able to restore Fe remobilization during seed germination as efficiently as PtNRAMP3.2, most likely due to its distinct subcellular localization. To test whether the presence of GFP tag or the strong over-expression triggered by 35S could alter PtNRAMP3s function, new transgenic plants expressing native *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* under the ubiquitin 10 promoter were generated (Grefen *et al.*, 2010). Analysis of three independent lines of T3 plants confirmed that *PtNRAMP3.2* expression fully rescues the double mutant phenotype under Fe deficiency while



**Fig. 10.** Unlike expression of *PtNRAMP3.1*, expression of *PtNRAMP3.2* complements iron starvation and cadmium hypersensitivities of the *nramp3nramp4* double mutant.

Root lengths of independent *nramp3nramp4* *Ub10::PtNRAMP3.1* (green bars) and *Ub10::PtNRAMP3.2* (blue bars) T3 lines together with wild type (Col-0, black bars) as positive control and *nramp3nramp4* as negative control (grey bars) were grown vertically in ABIS supplemented with 50  $\mu$ M FeHBED for 14 days, (a), or without iron for 8 days (b), or with 50  $\mu$ M FeHBED and 30  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> for 14 days (c). Values are the average of measurements on 10–12 roots and error bars represent SE. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ,  $n > 8$ ) followed by a Tukey *post hoc* test. *n.s.d.* indicates no significant difference.



**Fig. 11.** Unlike expression of *PtNRAMP3.1*, expression of *PtNRAMP3.2* restores metal concentrations in the *nramp3nramp4* double mutant in control conditions and Cd exposure.

Metal concentrations in shoots (top) and roots (bottom) of wild type (Col-0, black bars), *nramp3nramp4* (grey bars), *nramp3nramp4* *Ub10::PtNRAMP3.1* (green bars) and *Ub10::PtNRAMP3.2* (blue bars) T3 lines grown on control ABIS medium containing 100  $\mu$ M FeHBED (-Cd) or ABIS supplemented with 100  $\mu$ M FeHBED and 10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> (+Cd). Error bars represent SD. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) followed by a Tukey *post hoc* test; *n.d.* and *n.s.d.* indicate *no detectable* and *no significant difference*, respectively.

*PtNRAMP3.1* expression has no detectable effect (**Fig. 10a** and **10b**). The partial complementation observed with 35S could be due either to the strong over expression or to tagging itself.

Besides, the double mutant *nramp3nramp4* is hypersensitive to Cd exposure (Oomen *et al.*, 2009 ; Molins *et al.*, 2013). Several lines of evidences indicated that the Cd hypersensitivity of the double mutant is an indirect effect due to an alteration of essential metal supply rather than to the defect in Cd transport by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 itself (Molins *et al.*, 2013). Therefore, even though *PtNRAMP3s* do not seem to be able to transport Cd in yeast, their ability to complement the Cd sensitivity phenotype of the *Arabidopsis thaliana nramp3nramp4* double mutant was tested. As observed for the sensitivity to Fe deficiency, *PtNRAMP3.2* over-expression restores the root growth of the double mutant under Cd stress to wild type level whereas *PtNRAMP3.1* over-expression does not. Together with results obtained in yeast, these data further support the hypothesis that AtNRAMP3, AtNRAMP4 and *PtNRAMP3.2* effect on Cd sensitivity is not associated to their ability to transport Cd (**Fig. 10a** and **10c**).

To test whether *PtNRAMP3.1* or *PtNRAMP3.2* expression in *Arabidopsis* modulates metal accumulation, root and shoot metal contents were investigated in control conditions and under Cd exposure (**Fig. 11** and **SI Fig. 6**). Compared to WT, the *nramp3nramp4* mutant tends to accumulate higher levels of Fe, Cd, Mn and Zn in roots and shoots, likely due to the increased sequestration of these metals in vacuoles. Surprisingly, Cd supply strongly and specifically decreases Mn concentration in the double mutant roots. Expression of *PtNRAMP3.2* restores wild-type concentrations of Fe, Cd, Mn and Zn while expression of *PtNRAMP3.1* has no effect on metal concentrations in the *Arabidopsis nramp3nramp4* double mutant. These results confirm that unlike *PtNRAMP3.1*, *PtNRAMP3.2* complements the double mutant phenotypes. This further supports AtNRAMP3.2 functional homology with AtNRAMP3 and AtNRAMP4.

Note that *PtNRAMP3.2* expression could not rescue the intriguing decrease in Mn concentration observed in *nramp3nramp4* roots growing under Cd exposure (**Fig. 11** and **SI Fig. 6**). This indicates some subtle difference between the function of AtNRAMP3 & 4 and *PtNRAMP3.2*.



```

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
PtNRAMP3.1 MPEEDPQPLK---DQEEFAYDSGKYL SFGIDYIYI---SGGSITVPSFSURKMLFTGPGFLMCIHF LDPGNLEGLDQRGRIAGSYSLMLLMLRTNAGLLVQLSARLGVRTGRHMLBELCREEYPTM
PtNRAMP3.2 HPLV-EENYQPLQ---EERKRYDSEKVLITIGVDSIE---SGGSITVLPFSURKMLFTGPGFLMSHF LDPGNLEGLDQRGRIAGSYSLMLLMLRTNAGLLVQLSARLGVRTGRHMLBELCREEYPTM
LUNRAMP3 HQDRRQPLPSTSSDDREEFAYDSEKIHVAGVDSIAD---DRVSDPFPFSURKMLFTGPGFLMSHF LDPGNLEGLDQRGRIAGSYSLMLLMLRTNAGLLVQLSARLGVRTGRHMLBELCREEYPTM
PtNRAMP3 HPLQENMEPLIMEEELRAYDELEKVIHVRNEEDDLLENHVGCGGGPPFSURKMLFTGPGFLMSHF LDPGNLEGLDQRGRIAGSYSLMLLMLRTNAGLLVQLSARLGVRTGRHMLBELCREEYPTM
PtNRAMP3 NSQLENMEPLIMEEEL-TRAYDELEKVIHVRNEEDDLLENHVGCGGGPPFSURKMLFTGPGFLMSHF LDPGNLEGLDQRGRIAGSYSLMLLMLRTNAGLLVQLSARLGVRTGRHMLBELCREEYPTM
PtNRAMP4 HSETDRERPLINSEER---AYEELKVLIVGIDEEEDADYDDPPGMSPKFSURKMLFTGPGFLMSHF LDPGNLEGLDQRGRIAGSYSLMLLMLRTNAGLLVQLSARLGVRTGRHMLBELCREEYPTM
PtNRAMP4 KETDRERPLLESDR---AYEELKVLIVGIDEEEDADYDDPPGMSPKFSURKMLFTGPGFLMSHF LDPGNLEGLDQRGRIAGSYSLMLLMLRTNAGLLVQLSARLGVRTGRHMLBELCREEYPTM
Consensus H...e.....pl.....eeetAY#s.eKili.g.#.#.d.....gs...PpFSURKMLFTGPGFLMSHF LDPGNLEGLDQRGRIAGSYSLMLLMLRTNAGLLVQLSARLGVRTGRHMLBELCREEYPTM

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
PtNRAMP3.1 RRVLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRSDCFITFLFNWGVKLENAFGILIGITHVTFAMFHADAKPSAPELFGILIPKLSKTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ
PtNRAMP3.2 RSVLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRSDCFITFLFNWGVKLENAFVFLIGITHVTFAMFHADAKPSHSELFGILIPKLSKTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ
LUNRAMP3 RRLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRDCDFITFLFNWGVKLENAFVFLIRVMTSFAHMFGDARPSGKELLVGLIPKLSRRTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ
PtNRAMP3 RRVLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRDCDFITFLFNWGVKLENAFVFLIRVMTSFAHMFGDARPSGKELLVGLIPKLSRRTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ
PtNRAMP3 RRVLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRDCDFITFLFNWGVKLENAFVFLIRVMTSFAHMFGDARPSGKELLVGLIPKLSRRTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ
PtNRAMP3 RRVLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRDCDFITFLFNWGVKLENAFVFLIRVMTSFAHMFGDARPSGKELLVGLIPKLSRRTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ
PtNRAMP4 RRVLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRDCDFITFLFNWGVKLENAFVFLIRVMTSFAHMFGDARPSGKELLVGLIPKLSRRTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ
PtNRAMP4 RRVLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRDCDFITFLFNWGVKLENAFVFLIRVMTSFAHMFGDARPSGKELLVGLIPKLSRRTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ
Consensus RRVLLIMMELALIGADIDEVIGSHAIKILSNGLVPLMAGVITTRDCDFITFLFNWGVKLENAFVFLIRVMTSFAHMFGDARPSGKELLVGLIPKLSRRTIKQAVGVGCTIMPHNVFLHSALVQ

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
PtNRAMP3.1 SREIDHMKGGVGEALRYYSIESTIRALRISMINLFTVTIFRKGFGHGLAMSIGLVANMGQYLDDKYGGGFPPILYIAGTGLLAAEGSSITIGTYRGGFIMGGFLMLGLKALRALITRSCAIITPIIIVR
PtNRAMP3.2 SREIDHMKDRVGEALRYYSIESTIRALVSVINLFTVTIFRKGFGYGLAMSIGLVANMGQYLDDKYGGGFPPILYIAGTGLLAAEGSSITIGTYRGGFIMGGFLMLRLKALRALITRSCAIITPIIIVR
LUNRAMP3 SRVYDRSKKGRVHEALRYVGIESTIRALVSVLINCITVTIFRKAFFYGLVANSISGLVANAGQLDDEKYGGSSFPILYIAGTGLLAAEGSSITIGTYRGGFIMGGFLMLRLKAVRMRITRSCAIITPIIIVR
PtNRAMP3 SREVDKRRKYRVEALNVTIESTIRALFISLINTLFTVTIFRKGFGVNDLANSISGLVANAGQYLDEKYGGGFPPILYIAGTGLLAAEGSSITIGTYRGGFIMGGFLMLFKKALRALITRSCAIITPIIIVR
PtNRAMP3 SREVDKRRKYRVEALNVTIESTIRALFVSIMINLFTVTIFRKGFGVNDLANSISGLVANAGQYLDEKYGGGFPPILYIAGTGLLAAEGSSITIGTYRGGFIMGGFLMLFKKALRALITRSCAIITPIIIVR
PtNRAMP4 SREVDPKRFRVKEALKYYSIESTIRALRVSEFINVFTVTIFRKSFFYGLIADITIGLAAAGQYLDDKYGGGFPPILYIAGTGLLAAEGSSITIGTYRGGFIMGGFLMLKAKKAVRALITRSCAIITPIIIVR
PtNRAMP4 SREVDPKRFRVKEALKYYSIESTIRALRVSEFINVFTVTIFRKSFFYGLIADITIGLAAAGQYLDDKYGGGFPPILYIAGTGLLAAEGSSITIGTYRGGFIMGGFLMLKAKKAVRALITRSCAIITPIIIVR
Consensus SR#ID..kk.r'vdeRLr'yySIESt.rL.isf.inlFVtTIFRkgfYgT.lA#sIGLVANMGQYLQ#kYggGFPPILYIAGTGLLAAEGSSITIGTYRGGFIMGGFLML.#KKALIRR#ITRSCAIITPIIIVR

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 516
PtNRAMP3.1 LFVDISEDSLQVLMELNMLQSIQIPFALIPLLCLYSKEQINGITVGPILKVSVALVAAQVHLINGYLLDFFSNVEVTGVYFTVYCAF TGAAYVTITILSREYITSIAYCPT
PtNRAMP3.2 LFVDISEDSLQVLMELNMLQSIQIPFALIPLLCLYSKEQINGITVGPILKVSVALVAAQVHLINGYLLDFFSNVEVTGVYFTVYCG TGAAYVTITILSREYITSIAYCPT
LUNRAMP3 LFVDSSSEDSLQKLMELNMLQSVQIPFALIPLLCLYSKEQINGITVGPILKVSVALVAAQVHLINGYLLDFFSNVYVNGVRIARVYVCTVGYVSEFYLVSRLITGRQPKQTDLM
PtNRAMP3 LFVDSSSEHTLDVLMELNMLQSVQIPFALIPLLCLYSKEQINGITVGPILKVSVALVAAQVHLINGYLLDFFSNVEVSGIVYTGVTFLRHSYGHFLYLNRGITFTPAPEKRESSH
PtNRAMP3 LFVDSSSEATLDVLMELNMLQSVQIPFALIPLLCLYSKEQINGITVGPILKVSVALVAAQVHLINGYLLDFFSNVEVSGIVYTGVTFTVTRSYGHFLYLNRGITFTHARFKRESSH
PtNRAMP4 LFVDSSDSMLDELNMLNMLQSVQIPFARVLPCLVSNMEQINGITVGPILVQITISALVAAQVHLINGYLLVDFESGHRTMLLLVPYIIFALIRVYFVLYLSRGLITTPAQLYVHSSHKPEQRUDE
PtNRAMP4 LFVDSSDSMLDELNMLNMLQSVQIPFARVLPCLVSNMEQINGITVGPILVQITISALVAAQVHLINGYLLVDFESGHRTSYLLVVPYIIFALIRVYFVLYLSRGLITTPAQLYVHSSHKPEQRUDE
Consensus LFVDSS#dsLDVLMELNMLQSIQIPFALIPLLCLYSKEQINGITVGPILK.#Lk.isHLVaaLV.i.INGYL$!#FFsnevtgvv.t.v'c.F.a'v'.F.i.YLISRG.T...u.....


```

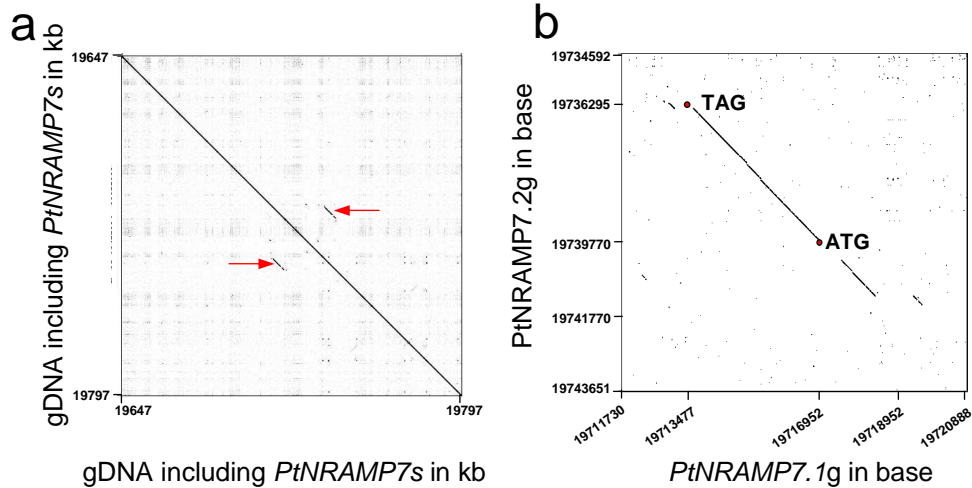
**SI Fig. 1.** Protein sequence alignment between AtNRAMP3, AtNRAMP4, PtNRAMP3.1, PtNRAMP3.2 and the closest sequenced orthologues.

Protein sequences of NRAMP were aligned using the Multalin software (Corpet, 1989). Names of the species are abbreviated with a two-letter code :  
 Pt: *Populus trichocarpa*, Lu: *Linum usitatissimum* At: *Arabidopsis thaliana*, Al: *Arabidopsis lyrata*

## **DISCUSSION**

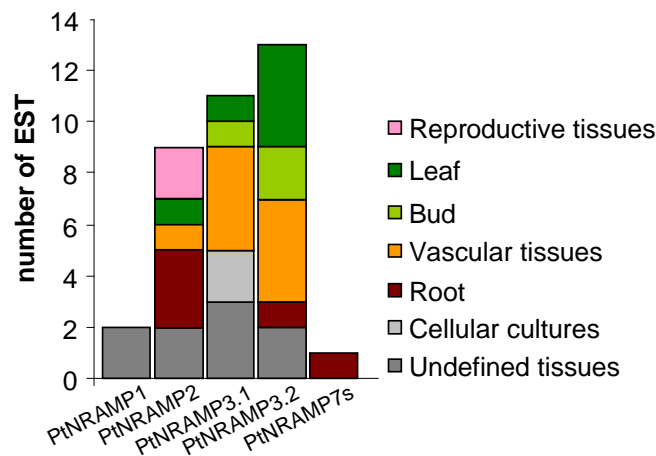
### **Distinct mechanisms for the formation of *NRAMP* gene pairs in *Arabidopsis* and poplar**

Duplication events are a driving force in evolution, facilitating adaptation to changing environments. Although gene duplication maybe followed by accumulation of deleterious mutations and gene elimination, it may also lead to diversification of gene function and sub- and neo-functionalization. (Yang and Tuskan, 2006). The ancestral angiosperm genome contained only 14000 genes or less (Proost *et al.*, 2011). About 120 millions years ago (Ma), whole genome triplications, significantly increased the size of the eudicotyledon genome from 7 to 21 chromosomes. Poplar genome has also undergone one whole genome duplication before *Populus* and *Salix* lineages, which diverged 60-65 Ma (Tuskan *et al.*, 2006). However, whole genome duplication cannot account for the tandem arrangement of *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* that rather implies a local duplication process (**Fig. 3**). Furthermore, comparing gene order around *NRAMP3* in *Vitis vinifera* and of *Populus trichocarpa* showed genomic colinearity upstream and downstream of *NRAMP3* in these species, except that *Vitis vinifera* has only one copy of *NRAMP3* (data not show). Similarly, *NRAMP3* tandem arrangement was not observed in other sequenced species close to poplar such as *Linum usitatissimum* and *Ricinus communis*. However, the two copies were found in all poplar cultivars studied in this work. These observations together with the low level of intron and promoters sequence conservation between *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* indicate that these genes result from a local gene duplication that occurred after the *Ricinus communis* divergence, 81Ma (Forest and Chase, 2009). The sequence surrounding *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* shows many remains of Class I long terminal repeats (LTR) retrotransposon elements (Gypsy) mainly located between the two genes (data not show). Retrotransposons can mediate gene duplication. During transposition event, it happens that the LTR border is not recognized by the retrotranscriptase leading to the transcription of neighbor genes (Flagel and Wendel, 2009). However, such duplications usually create a typical intron-free copy which can be integrated throughout the genome and not specifically close to the initial copy (Freeling, 2009). Thus, the conservation of intron/exon structure and the tandem arrangement of *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* are not indicative of retrotransposon mediated duplication. On the other hand, repeated sequences of retrotransposons stimulate intrachromosomal recombination events or unequal crossing over, leading to gene duplication (White *et al.*, 1994 ; Flagel and Wendel, 2009). Such a mechanism most likely accounts for the tandem duplication of *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2*. Poplar genome which contains significantly



**SI Fig. 2.** Genomic duplication involved only *PtNRAMPs*.

Dot-blots performed on Gepard software (Krumstiek *et al.*, 2007), between 2,5 Mb of genomic DNA including *PtNRAMP7.1* and *PtNRAMP7.2*, and itself **(a)**, between *PtNRAMP7.1* genomic DNA and *PtNRAMP7.2* genomic DNA **(b)**. The duplication of *PtNRAMP7* generates two lines parallel to the diagonal (red arrows).



**SI Fig. 3.** EST-based expression analysis for *Populus NRAMP* genes.

BLAST search was performed using the cDNA sequences of poplar transporter genes against the EST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) available at NCBI. Colors denote the tissues from which the EST originate.

more gene tandems than *Arabidopsis thaliana* (Proost *et al.*, 2011), contains also three time more transposons (Ming *et al.*, 2008).

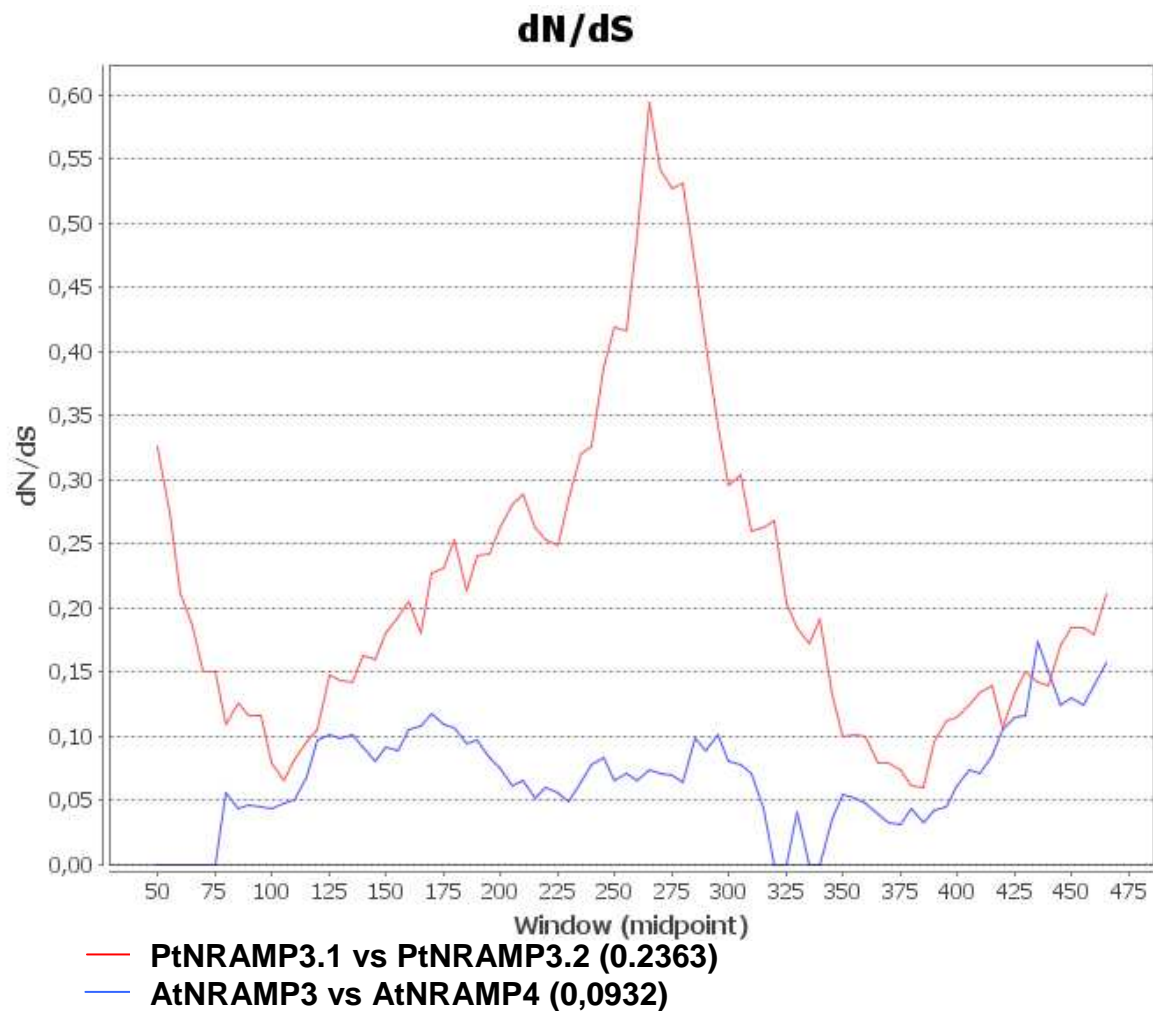
In the *Arabidopsis* lineage, two whole genome duplications occurred since the *Carica papaya* divergence 72 Ma (Ming *et al.*, 2008 ; Proost *et al.*, 2011). *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* encode functionally redundant metal transporters (Lanquar *et al.*, 2005). Because this gene pair is present in *Arabidopsis thaliana*, *A. lyrata* and *Noccaea caerulescens* (Oomen *et al.*, 2009), but not in *Carica papaya* and *ricinus communis* genomes, duplication of the corresponding ancestral *NRAMP* should have taken place after the *Carica papaya* divergence. In *Arabidopsis thaliana* *AtNRAMP3* (At2g23150) and *AtNRAMP4* (At5g67330) loci are located on the duplicated block 0204146800380, suggesting that they originated from one of the two whole genome duplications that took place between 70 and 23 Ma (Lanquar *et al.*, 2005 ; Proost *et al.*, 2011). Thus, distinct mechanisms of gene duplication lead to *NRAMP* gene pair formation with different evolutionary fates in poplar and *Arabidopsis thaliana*.

### ***PtNRAMP3* genes have different evolutionary fates**

Most gene duplications are thought to be rapidly followed by the loss of function of one of the copies (Freeling, 2009). While one daughter gene retains the preduplication function, selective constraints generally relax on the second copy which, therefore, accumulates deleterious mutations leading to loss of function (Ohno, 1970). However, pseudogene formation is not the only fate of duplicated genes. In few cases, both copies can retain function after a duplication event for different reasons. First, environmental conditions may maintain selective pressure for both genes to retain preduplication function, increasing fitness through dose effect. For example, multiple tandem copies of *HMA4* are maintained in the metal hyperaccumulator species *Arabidopsis halleri* and *Noccaea caerulescens* leading to a high expression level essential for Zn and Cd translocation and metal tolerance (Hanikenne *et al.*, 2008 ; Lochlainn *et al.*, 2011 ; Craciun *et al.*, 2012 ; Hanikenne *et al.*, 2013).

Alternatively, relaxation of purifying selection caused by gene duplication can also adduce new non deleterious mutations. The preduplication function of the ancestral gene can be partitioned among the two daughter genes (subfunctionalization). Moreover, new advantageous mutations, optionally followed by positive selection, can also confer a new function to one of the gene copies (neo-functionalization) (Zhang, 2003).

The tandem pair of homologous genes formed by *HMA2* and *HMA3* on chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* illustrates the possible fates of gene copies resulting from duplication (Cobbett *et al.*, 2003). Duplication of the ancestral *HMA* likely generated two genes with



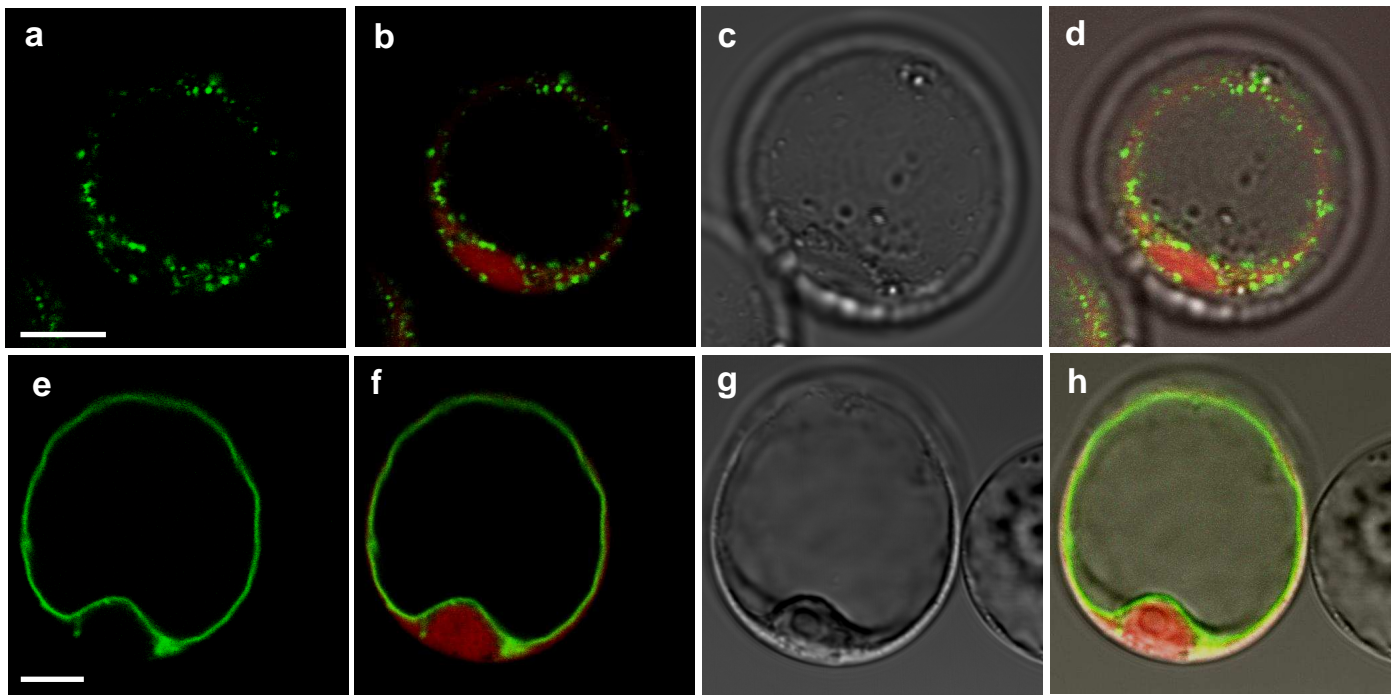
**Fig. 12.** Specific relaxation of purifying selection observed on *PtNRAMP3.1* vs *PtNRAMP3.2*

Evidence of specific relaxation of purifying selection on *PtNRAMP3s* genes as identified by ratios of nonsynonymous to synonymous amino acid substitutions (dN/dS). Sliding window analysis (window =100, jump size=5) was performed using the software package JCoDA (Steinway et al., 2010).

different functions. HMA2 which localized on the plasma membrane, participates in Zn and Cd translocation from root to shoot working in synergy with HMA4 (Hussain *et al.*, 2004 ; Verret *et al.*, 2004 ; Wong and Cobbett, 2009). In contrast, HMA3 is localized in the vacuolar membrane and controls Cd accumulation in shoot by sequestration of this metal in root vacuoles in *Arabidopsis thaliana* (Miyadate *et al.*, 2011 ; Chao *et al.*, 2012). However, in some *Arabidopsis thaliana* accessions, such as Col0, HMA3 does not encode a functional protein. The presence of a functional vs non functional HMA3 alleles accounts for the natural variation in Cd content across *Arabidopsis* ecotypes (Hussain *et al.*, 2004).

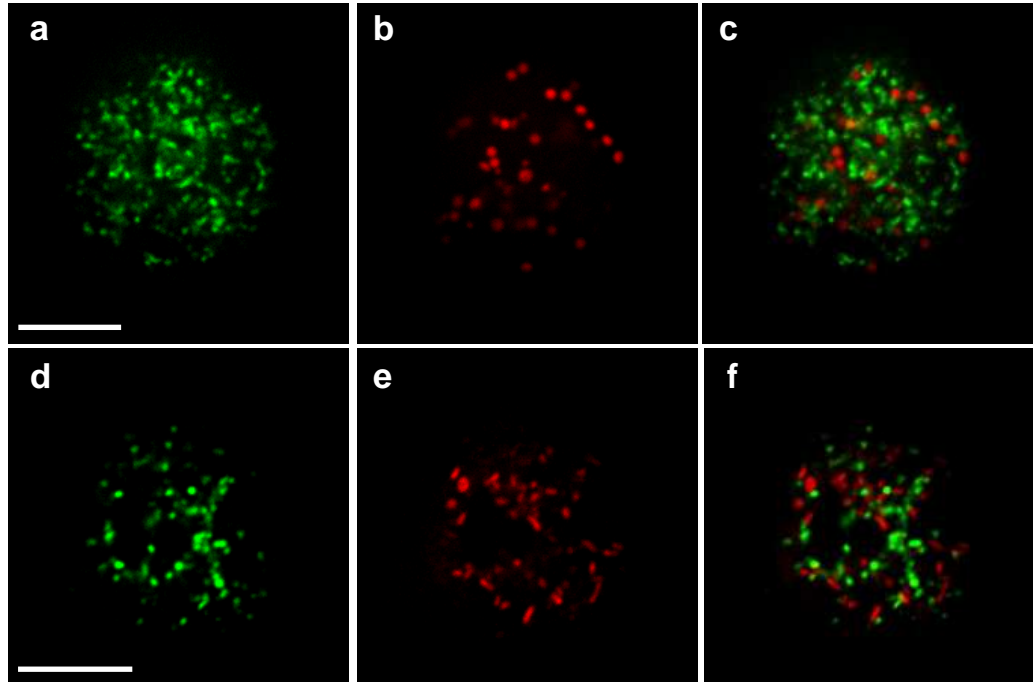
In the present study, dN/dS analysis highlights that *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* exhibit a clear relaxation of purifying selection (**Fig. 12**). The vacuolar membrane localization of *PtNRAMP3.2*, its transport capacities and its ability to complement *Arabidopsis thaliana nramp3nramp4* double mutant phenotypes indicate that *PtNRAMP3.2* is the functional homologue of *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* (**Fig. 6, 7, 8, 9, 10, 11**). The distinct intracellular localization of *PtNRAMP3.1* and its inability to complement the *nramp3nramp4* double mutant phenotypes, suggest that this gene is undergoing non- or neo-functionalization (**Fig. 8, 9, 10, 11**). Besides, analysis of *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* expression revealed marked differences in leaf expression levels between genotypes (**Fig. 4 and 5**) and *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* promoter sequences are not conserved between the two copies (**Fig. 3**). The large variability in expression levels is likely a direct consequence of the relaxation of selection (Zhang, 2003 ; Freeling, 2009). Although *PtNRAMP3.1* expression has no clear effect in *Arabidopsis thaliana*, it is clearly able to transport, Fe, Mn, and Zn in yeast (**Fig. 6 and 7**) supporting the hypothesis that *PtNRAMP3.1* undergoes neo-functionalization. In this context, the absence of phenotypes associated to the expression of *PtNRAMP3.1* in *nramp3nramp4* could be explained if the function of *PtNRAMP3.1* requires a partner missing in *Arabidopsis* or if the effect of *PtNRAMP3.1* can only be detected at a developmental stage that was not tested in our experiments. Analyses of leaf metal content of transgenic *Arabidopsis thaliana* growing on short day, on soil conditions for months may allow the observation of changes in metal homeostasis in leaves of plant expressing *PtNRAMP3.1*.

Following my work, Van Anh Le Thi generated transgenic poplars over-expressing *PtNRAMP3.1::GFP* and *PtNRAMP3.2::GFP* in our team (data not show). *PtNRAMP3.1* and *PtNRAMP3.2* subcellular localizations were similar to those observed in *Arabidopsis thaliana*. Preliminary analysis of leaf metal concentration of poplar grown on normal soil during 4 months showed specific decreases in Zn and Mn concentrations in poplar leaves



**SI Fig. 4.** PtNRAMP3.1::GFP and PtNRAMP3.2::GFP are targeting to intracellular compartments and to the vacuolar membrane, respectively.

Subcellular localization of PtNRAMP::GFP in protoplasts from *Arabidopsis thaliana* cell culture transformed and incubated 48h at 20°C in the dark. Confocal cross sections show PtNRAMP3.1::GFP (a) and PtNRAMP3.2::GFP (e) fluorescence, overlay between GFP and mCherry (b and f), transmission (c and g) and total overlay (d and h). Excitation wavelength :  $\lambda_{\text{GFP}}= 488\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{mCherry}}= 558\text{nm}$ ; emission wavelengths:  $\lambda_{\text{GFP}}= 495\text{-}535\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{mCherry}}= 578\text{-}707\text{nm}$ . scale bar = 10 $\mu\text{m}$ .



**SI Fig. 5.** PtNRAMP3.1::GFP is not localized in peroxisomes and mitochondria.

Subcellular localization of PtNRAMP::GFP in protoplasts of *Arabidopsis thaliana* cell culture transformed and incubated 48h at 20°C in the dark. Confocal cross sections show PtNRAMP3.1::GFP fluorescence (a and d), mCherry::PTS1 peroxysomal marker (Nelson, *et al.*, 2007) (b) , MitoTracker® Red CMXRos (e) overlay between GFP and peroxysomal marker::mCherry or MitoTracker® Red CMXRos (c and f). Excitation wavelength :  $\lambda_{\text{GFP}}= 488\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{mCherry}}$  or MitoTracker® Red CMXRos = 558nm. emission wavelengths:  $\lambda_{\text{GFP}}= 495\text{-}535\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{mCherry}}$  or MitoTracker® = 578-707nm scale bar = 10 $\mu\text{m}$ .

from one line over-expressing *PtNRAMP3.2::GFP*. Interestingly, even stronger decreases in Zn and Mn concentrations associated with interveinal chlorosis were observed in poplar leaves from two lines over-expressing *PtNRAMP3.1::GFP*. This indicates that the relaxation of the purifying selection may have allowed the emergence of a new function for *PtNRAMP3.1* corresponding to the remobilization of metal from intracellular compartments, which remain to be identified. The mobilization of Mn and Zn from these intracellular compartments appears to be an efficient way to limit metal accumulation in poplar leaves. The identification of these intracellular compartments appears to be a critical perspective to better understand Mn and Zn homeostasis in poplar leaves. It will also be important to measure metal concentrations in other poplar organs such as stems and roots. While previous work underscored that phytoextraction efficiency is affected by the high metal content in senescing leaves (Laureysens *et al.*, 2004 ; Zacchini *et al.*, 2009), these new results suggest that over-expression of *PtNRAMP3.1* could be an efficient way to cope with this problem.

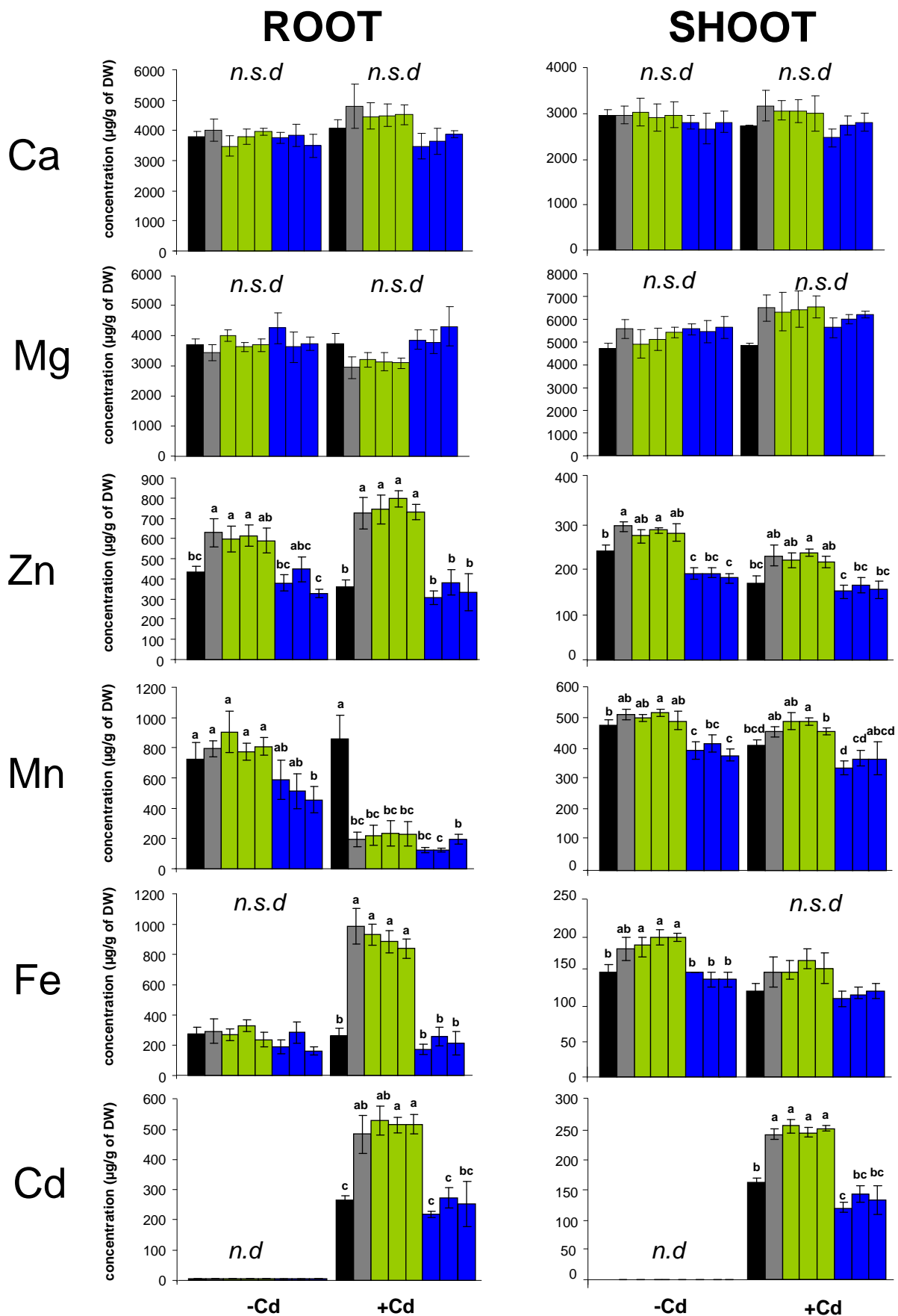
## **ACKNOWLEDGMENTS**

MP work was supported by grants from Région Ile-de-France. VL work was supported by Vietnamese Government through the PhD training program in France for future lecturers-researchers of University of Science and Technology of Hanoi (USTH). Work in the Sébastien Thomine lab is supported by CNRS.

## **REFERENCES**

- Alloway, B.J.** (2013) Introduction. In *Heavy Metals in Soils*, Vol. 22: Springer Netherlands, pp. 3-9.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. and Rosato, A.** (2006) Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. *Journal Proteome Res*, **5**, 196-201.
- Balk, J. and Lobreaux, S.** (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends in Plant Science*, **10**, 324-331.
- Basa, B., Solti, A., Sarvari, S. and Tamas, L.** (2009) Housekeeping gene selection in poplar plants under Cd-stress: comparative study for real-time PCR normalisation. *Functional Plant Biology*, **36**, 1079-1087.
- Benavides, M.a.P., Gallego, S.M. and Tomaro, M.a.L.** (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**, 21-34.
- Bleackley, M.R. and MacGillivray, R.T.A.** (2011) Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals*, **24**, 785-809.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.-s., Penfold, C.A. and Jenkins, D.** (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell Online*, **23**, 873-894.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J.-F., Mari, S. and Curie, C.** (2010) High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *The Plant Cell Online*, **22**, 904-917.





**SI Fig. 6.** Metal concentrations in shoots and roots of wild type (Col-0), *nramp3nramp4* and *nramp3nramp4 Ub10:PtNRAMP3.1* and *Ub10:PtNRAMP3.2* T3 lines grown on control ABIS medium containing 100 µM FeHBED (-Cd) and ABIS supplemented with 100 µM FeHBED and 10 µM CdCl<sub>2</sub> (+Cd).

*PtNRAMP3.1* expressed lines (from left to right: 10.3, 3.2 and 8.1) are represented in green and *PtNRAMP3.2* expressed lines are represented in blue (from left to right: 2.3, 4.3, and 3.2). Error bars represent the SD. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ ) followed by a Tukey *post hoc* test. *n.d.* and *n.s.d.* indicate no detectable and no significant difference, respectively.

- Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S. and Pascual, C.** (2012) Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. *Environmental Science & Technology*, **46**, 13361-13369.
- Chao, D.-Y., Silva, A., Baxter, I., Huang, Y.S., Nordborg, M., Danku, J., Lahner, B., Yakubova, E. and Salt, D.E.** (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**, e1002923.
- Clemens, S., Aarts, M.G.M., Thomine, S. and Verbruggen, N.** (2012) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, **18**, 92-99.
- Clough, S.J.** (2005) Floral dip: agrobacterium-mediated germ line transformation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **286**, 91-102.
- Cobbett, C.S., Hussain, D. and Haydon, M.J.** (2003) Structural and functional relationships between type 1B heavy metal-transporting P-type ATPases in Arabidopsis. *New Phytologist*, **159**, 315-321.
- Cohen, A., Nelson, H. and Nelson, N.** (2000) The Family of SMF Metal Ion Transporters in Yeast Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 33388-33394.
- Craciun, A.R., Meyer, C.-L., Chen, J., Roosens, N., De Groodt, R., Hilson, P. and Verbruggen, N.** (2012) Variation in HMA4 gene copy number and expression among *Noccaea caerulescens* populations presenting different levels of Cd tolerance and accumulation. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 4179-4189.
- Dère, C., Lamy, I., van Oort, F., Baize, D. and Cornu, S.** (2006) Reconstitution des apports en éléments traces métalliques et bilan de leur migration dans un Luvisol sableux soumis à 100 ans d'irrigation massive par des eaux usées brutes. *Comptes Rendus Geoscience*, **338**, 565-573.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M.L.** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 5624-5628.
- Felsenstein, J.** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Flagel, L.E. and Wendel, J.F.** (2009) Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytologist*, **183**, 557-564.
- Forest, F.I. and Chase, M.W.** (2009) Eurosid i. *The timetree of life*. Oxford University Press, New York, 188-196.
- Freeling, M.** (2009) Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome, segmental, or by transposition. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 433-453.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U. and Putnam, N.** (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, **40**, D1178-D1186.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K. and Blatt, M.R.** (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal*, **64**, 355-365.
- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D. and Kramer, U.** (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, **453**, 391-395.
- Hanikenne, M., Kroymann, J., Trampczynska, A., Bernal, M., Motte, P., Clemens, S. and Kramer, U.** (2013) Hard selective sweep and ectopic gene conversion in a gene cluster affording environmental adaptation. *PLoS Genetics*, **9**, e1003707.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F. and Cobbett, C.S.** (2004) P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with Roles in Essential Zinc Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **16**, 1327-1339.
- Induri, B.R., Ellis, D.R., Slavov, G.T., Yin, T., Zhang, X., Muchero, W., Tuskan, G.A. and DiFazio, S.P.** (2012) Identification of quantitative trait loci and candidate genes for cadmium tolerance in Populus. *Tree Physiology*, **32**, 626-638.
- Kaiser, B.N., Moreau, S., Castelli, J., Thomson, R., Lambert, A., Bogliolo, S., Puppo, A. and Day, D.A.** (2003) The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *The Plant Journal*, **35**, 295-304.

**SI Table I** : accession numbers of protein sequences used in **Figure I**.

Name	accession #	Organism
AtNRAMP4	Q9FN18	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtNRAMP3	Q9SNV9	<i>Arabidopsis thaliana</i>
GmDMT1	NP_001236727	<i>Glycine max</i>
LeNRAMP3	NP_001233770	<i>Lycopersicon esculentum</i>
PtNRAMP3.1	XP_002332229	<i>Populus trichocarpa</i>
PtNRAMP3.2	XP_002332228	<i>Populus trichocarpa</i>
AtNRAMP2	Q9C6B2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
PtNRAMP2	XP_002302424	<i>Populus trichocarpa</i>
AtNRAMP5	Q9SN36	<i>Arabidopsis thaliana</i>
OsNRAMP2	Q10Q65	<i>Oryza sativa</i>
OsNRAMP7	NP_001067135	<i>Oryza sativa</i>
AtNRAMP1	Q9SAH8	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtNRAMP6	Q9S9N8	<i>Arabidopsis thaliana</i>
PtNRAMP1	XP_002332060	<i>Populus trichocarpa</i>
OsNRAMP3	Q653V6	<i>Oryza sativa</i>
PtNRAMP7.1	XP_002307454	<i>Populus trichocarpa</i>
PtNRAMP7.2	XP_002307453	<i>Populus trichocarpa</i>
OsNRAMP1	AAB36424	<i>Oryza sativa</i>
OsNRAMP5	BAM45315	<i>Oryza sativa</i>
LeNRAMP1	NP_001234318	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Nrat1	Q6ZG85	<i>Oryza sativa</i>
OsNRAMP6	NP_001043139	<i>Oryza sativa</i>
ScSMF1	CAA64547	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScSMF2	P38778	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScSMF3	Q12078	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NcNRAMP3	ABR27746	<i>Noccaea caerulescens</i>
NcNRAMP4	ABR27747	<i>Noccaea caerulescens</i>
TjNRAMP4	BAC80141	<i>Noccaea cochleariforme</i>
AtEIN2	Q9S814	<i>Arabidopsis thaliana</i>
PtEIN2.1	XP_002322882	<i>Populus trichocarpa</i>
PtEIN2.2	XP_002326185	<i>Populus trichocarpa</i>
OsEIN2.1	NP_001050996	<i>Oryza sativa</i>
OsEIN2.2	NP_001058920	<i>Oryza sativa</i>

- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002) Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation *Trends in Plant Science* **7**, 193–195.
- Krumsiek, J., Arnold, R. and Rattei, T.** (2007) Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics*, **23**, 1026-1028.
- Kurepa, J., Hérouart, D., Van Montagu, M. and Inzé, D.** (1997) Differential expression of CuZn-and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments. *Plant and Cell Physiology*, **38**, 463-470.
- Lamy, I., Van Oort, F., Dère, C. and Baize, D.** (2006) Use of major-and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *European journal of soil science*, **57**, 731-740.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S.** (2004) Regulation and Function of AtNRAMP4 Metal Transporter Protein. *Soil science and plant nutrition*, **50**, 1141-1150.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S.** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J*, **24**, 4041-4051.
- Lanquar, V., Ramos, M.S., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Kramer, U. and Thomine, S.** (2010) Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency. *Plant Physiology*, **152**, 1986-1999.
- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C. and Ceulemans, R.** (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution*, **131**, 485-494.
- Lochlainn, S.O., Bowen, H.C., Fray, R.G., Hammond, J.P., King, G.J., White, P.J., Graham, N.S. and Broadley, M.R.** (2011) Tandem quadruplication of *HMA4* in the zinc (Zn) and cadmium (Cd) hyperaccumulator *Noccaea caerulea*. *PLoS One*, **6**, e17814.
- Luk, E.E.C. and Culotta, V.C.** (2001) Manganese Superoxide Dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* Acquires Its Metal Co-factor through a Pathway Involving the Nramp Metal Transporter, Smf2p. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 47556-47562.
- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M., Richaud, P., Thomine, S. and Chalot, M.** (2010) Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 3763-3784.
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J.H., Senin, P., Wang, W., Ly, B.V. and Lewis, K.L.T.** (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, **452**, 991-996.
- Miyadate, H., Adachi, S., Hiraizumi, A., Tezuka, K., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Katou, K., Kodama, I., Sakurai, K. and Takahashi, H.** (2011) OsHMA3, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytologist*, **189**, 190-199.
- Molins, H., Michelet, L., Lanquar, V., Agorio, A., Giraudat, J., Roach, T., Krieger-Liszkay, A. and Thomine, S.** (2013) Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplasts as a target for cadmium hypersensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 804-817.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. and Sreekanth, T.V.M.** (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **8**, 199-216.
- Nelson, B.K., Cai, X. and Nebenfuhr, A.** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for colocalization studies in *Arabidopsis* and other plants. *The Plant Journal*, **51**, 1126-1136.
- Nevo, Y. and Nelson, N.** (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1763**, 609-620.
- Nordberg, G.F.** (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **238**, 192-200.
- Ohno, S.** (1970) *Evolution by gene duplication*: London: George Alien & Unwin Ltd. Berlin, Heidelberg and New York: Springer-Verlag.
- Oomen, R.J.F.J., Wu, J., Lelièvre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H., Aarts, M.G.M. and Thomine, S.** (2009) Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, **181**, 637-650.

**SI Table II** : Primers used for q-RT-PCR.

	Forward primers	Reverse primers
qUBC10	CCATATCCAAGGTATTGCTCTCC	CGTCTCATACTTGTTCCCTGTGG
qPP2A	TTCCTGATGTGCGACTGAAC	CTCCAATGCCTATCCTCTGC
qEF1- $\alpha$	CACACCTGTCACATTGCTG	ACCAGCATCACCGTTCTTCAG
Qact	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
Qubq	GTTGATTTTTGCTGGGAAGC	GATCTTGGCCTTCACGTTGT
Qtub	GCACCAACTTGTTGAGAATGC	TTTCAACTGACCAGGGAACC
qPtNRAMP1	GCCAGCACTGGAAATAGGAG	TTGTATTGCGCTCCTGACTG
qPtNRAMP2	ATGCAGATTCCTTTCGCACT	CCGATCAGAAAGCCAAAGAG
qPtNRAMP3s	TGACATTTGCGTGGATGTTT	ATTGTGGTTCGATCTCCCTTG
qPtNRAMP3.1	TTGTAGCTGCCTTGGTGATG	GATCGCTGGCAACAGAAACT
qPtNRAMP3.2	CAGACACCAGCCATCTTGAA	CCCAGGACCAGTAAACAACC
qPtNRAMP7s	GTGCTGGGAAAATCAAGCTC	GATGATTAGTCGGCCTGCTC

**SI Table III** : Primers used for *NRAMP* cloning.

PtNramp3aLgtw	5'- <u>TACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGCCTTCACCAGAAGAAGAC-3'
PtNramp3aRgtwstp	5'-CAAGAAAGCTGGGTCCTGTTTAGGTGGGACAGTACCA-3'
PtNramp3aRgtwnostp	5'- <u>CAAGAAAGCTGGGTC</u> GGTGGGACAGTACCAAGTGG-3'
PtNramp3bLlonggtw	5'- <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGCCTGTAGAAGAAAAC-3'
PtNramp3bRlonggtwstp	5'- <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC</u> TTATGTAAAGCCCCTAG-3'
PtNramp3bRlonggtwnostp	5'- <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC</u> TGTAAAGCCCCTAGAATG-3'

Forward and reverse primers contain sequences of attB1 and attB2 sequences (underlined) allowing gateway recombination.

- Ponka, P.** (1999) Cell biology of heme. *The American journal of the medical sciences*, **318**, 241.
- Proost, S., Pattyn, P., Gerats, T. and Van de Peer, Y.** (2011) Journey through the past: 150 million years of plant genome evolution. *The Plant Journal*, **66**, 58-65.
- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. and Frommer, W.B.** (1995) NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in Arabidopsis. *FEBS Letters*, **370**, 264-268.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S. and Expert, D.** (2009) NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal*, **58**, 195-207.
- Sjödin, A., Street, N.R., Sandberg, G., Gustafsson, P. and Jansson, S.** (2009) The Populus Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. *New Phytologist*, **182**, 1013-1025.
- Steinway, S., Dannenfelser, R., Laucius, C., Hayes, J. and Nayak, S.** (2010) JCoDA: a tool for detecting evolutionary selection. *BMC bioinformatics*, **11**, 284.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. and Nelson, N.** (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 5105-5110.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Thévenod, F.** (2009) Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology*, **238**, 221-239.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. and Schroeder, J.I.** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* **97**, 4991-4996
- Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I. and Barbier-Brygoo, H.** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal*, **34**, 685-695.
- Tommos, C., Hoganson, C.W., Di Valentin, M., Lydakis-Simantiris, N., Dorlet, P., Westphal, K., Chu, H.-A., McCracken, J. and Babcock, G.T.** (1998) Manganese and tyrosyl radical function in photosynthetic oxygen evolution. *Current opinion in chemical biology*, **2**, 244-252.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S. and Salamov, A.** (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, **313**, 1596-1604.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. and Richaud, P.** (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters*, **576**, 306-312.
- White, S.E., Habera, L.F. and Wessler, S.R.** (1994) Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for copia-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 11792-11796.
- Wilkins, O., Nahal, H., Foong, J., Provart, N.J. and Campbell, M.M.** (2009) Expansion and Diversification of the Populus R2R3-MYB Family of Transcription Factors. *Plant Physiology*, **149**, 981-993.
- Wong, C.K.E. and Cobbett, C.S.** (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, **181**, 71-78.
- Yang, X. and Tuskan, G.A.** (2006) Divergence of the Dof gene families in poplar, Arabidopsis, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication. *Plant Physiology*, **142**, 820-830.
- Yruela, I.** (2013) Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*, **5**, 1090-1109.
- Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G.S., Iori, V., Pietrosanti, L. and Massacci, A.** (2009) Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water, Air, and Soil Pollution*, **197**, 23-34.



**Zhang, J.** (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends in ecology & evolution*, **18**, 292-298.

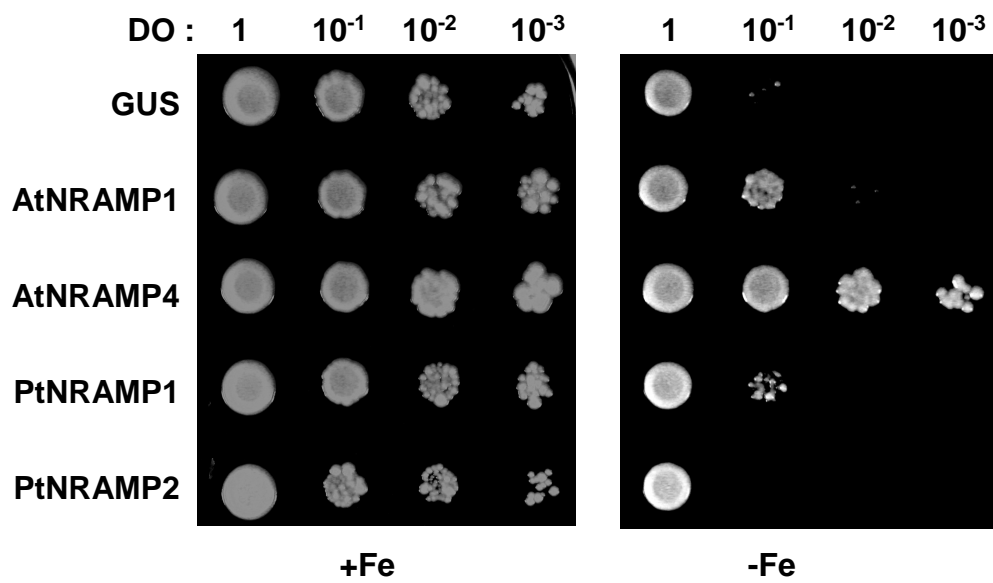
**Zhang, Y. and Gladyshev, V.N.** (2009) Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chemical reviews*, **109**, 4828-4861.

**Zhao, H. and Eide, D.** (1996a) The ZRT2 Gene Encodes the Low Affinity Zinc Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 23203-23210.

**Zhao, H. and Eide, D.** (1996b) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 2454-2458.

**Zuckerkindl, E. and Pauling, L.** (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving genes and proteins*, **97**, 97-166.





**Figure 20** : Test de complémentation de la souche de levure *fet3fet4* déficiente pour l'entrée de Fe dans la cellule après 2 jours de croissance à 30°C.

Test en goutte réalisé sur milieu SD contrôle + Fe (200µM de FeSO<sub>4</sub> en présence de 100 µM de BPDS) et sur milieu SD - Fe (40 µM de FeSO<sub>4</sub> en présence de 100 µM de BPDS). GUS correspond au témoin négatif et AtNRAMP4 et AtNRAMP1 aux témoins positifs.

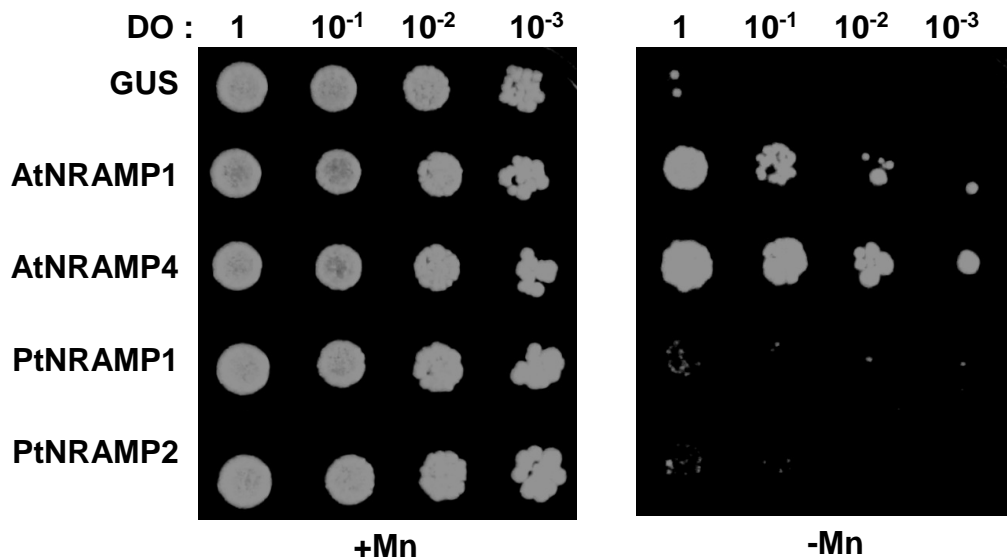
## **II. Résultats complémentaires: Caractérisation de PtNRAMP1 et PtNRAMP2**

### *A) Capacités de transport des protéines PtNRAMP1 et PtNRAMP2.*

Dans le but de déterminer les capacités de transport des protéines PtNRAMP1 et PtNRAMP2, des tests de complémentation de levures déficientes pour des différents systèmes de transport de métaux ont été réalisés à l'aide des souches présentées dans le **Tableau VI** du « matériels et méthodes ». Suite à la transformation des levures avec le vecteur pDR195 contenant les gènes d'intérêts, des tests en gouttes ont été conduits sur des milieux carencés ou supplémentés avec des concentrations toxiques en métaux. Afin de déterminer les conditions les plus adaptées pour les PtNRAMP, pour chaque souche, des tests préliminaires ont été réalisés avec différentes concentrations en métaux et en chélateurs, en se basant sur des données précédemment publiées (Thomine *et al.*, 2000 ; Lanquar *et al.*, 2004 ; Cailliatte, 2008). Des mesures d'accumulation de métaux ont également été réalisées chez le double mutant *zrt1zrt2*. Des levures exprimant *GUS* ainsi que des levures exprimant *AtNRAMP1*, *AtNRAMP4*, *AtNRAMP2* ou *PtNRAMP3.1* ont été utilisées respectivement comme contrôle négatif et contrôles positifs. Les résultats sont présentés sur les **figures 20 à 23**.

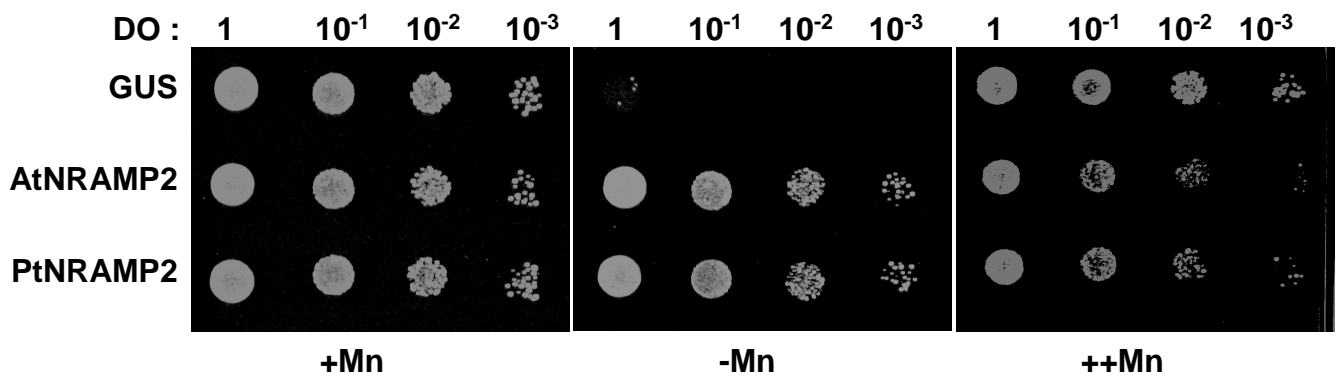
#### **1. Complémentation de croissance du double mutant *fet3fet4***

Pour tester la capacité de transport du fer, le double mutant *fet3fet4*, incapable de pousser sur le milieu pauvre en fer a été utilisé (-Fe : **Figure 20**) (Eide *et al.*, 1996). L'expression d'*AtNRAMP1* et d'*AtNRAMP4* permet de restaurer la croissance de ces levures même sur un milieu carencé en fer. La **figure 20** montre que l'expression de *PtNRAMP1* augmente légèrement la croissance des levures *fet3fet4* sur milieu carencé en Fe. Cependant, cet effet est faible et n'a pu être reproduit que trois fois sur les six essais réalisés. Ces résultats ne permettent donc pas d'affirmer que cette protéine complémente *fet3fet4* et qu'elle soit impliquée dans le transport de Fe. Aucune complémentation de ce double mutant n'a été observée chez les levures transformées par *PtNRAMP2*.



**Figure 21** : Test de complémentation de croissance de la souche de levure *smf1* déficiente pour l'entrée de manganèse dans la cellule après 4 jours de croissance à 30°C .

Test en goutte réalisé sur milieu SD contrôle +Mn (100 µM de manganèse + 5 mM d'EGTA) et sur milieu SD -Mn (5 mM d'EGTA). GUS correspond au témoin négatif et AtNRAMP1 et AtNRAMP4 correspondent aux témoins positifs.



**Figure 22** : Test de complémentation et de sensibilité de la souche *smf2* déficiente pour le transport de Mn au niveau de compartiments intracellulaires après 2 jours de croissance.

Test en goutte réalisé sur milieu SD contrôle +Mn (10 mM EGTA + 100 µM Mn), sur milieu SD -Mn (10 mM d'EGTA) et sur milieu SD ++Mn (10 mM MnSO<sub>4</sub>). GUS correspond au témoin négatif et AtNRAMP2 au témoin positif.

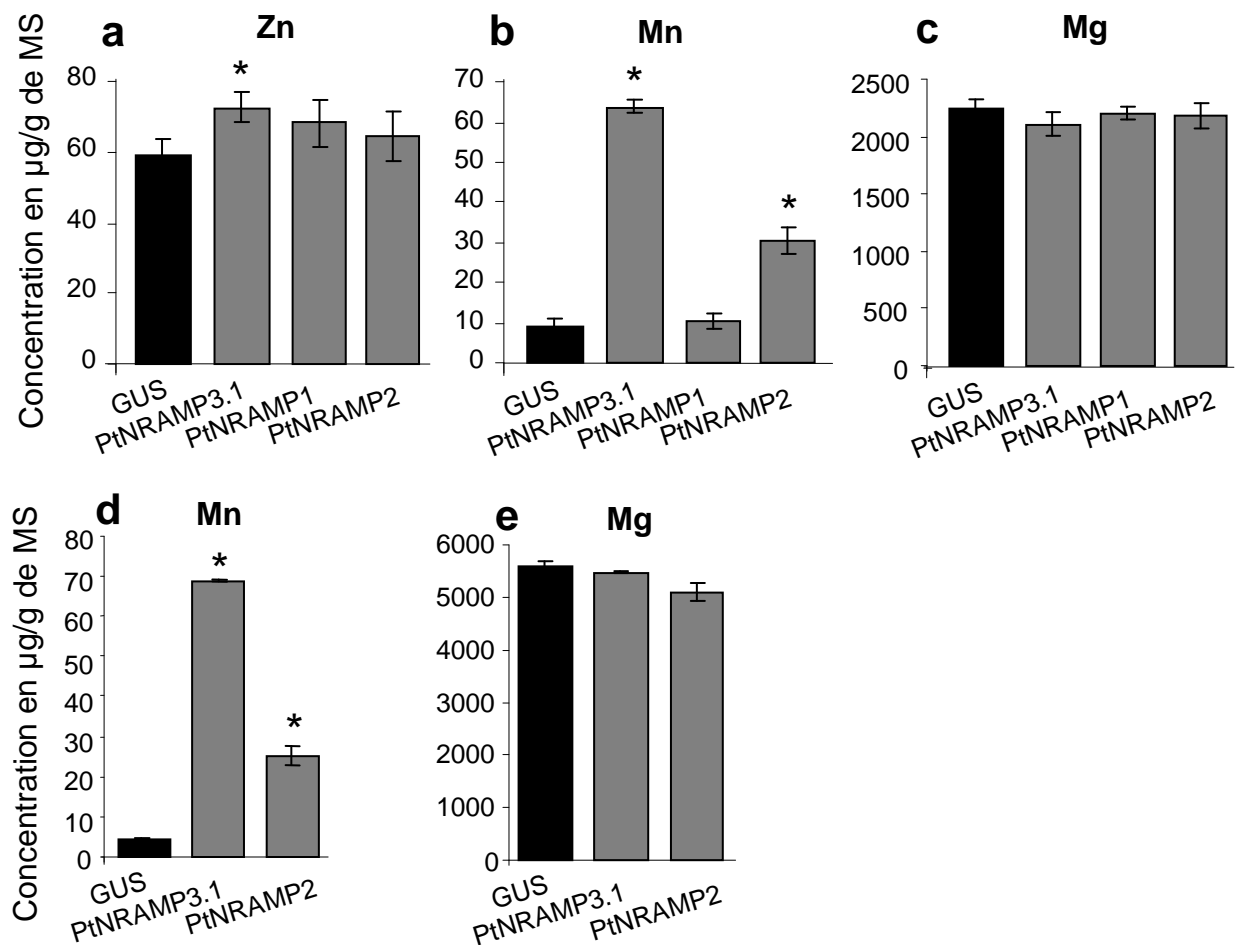
## **2. Complémentation de croissance des mutants *smf1* et *smf2***

Dans le but de tester la capacité de transport de Mn de ces protéines, les souches *smf1* et *smf2* déficientes pour des transporteurs de Mn respectivement localisés sur la membrane plasmique et au niveau de compartiments intracellulaires ont été utilisées. Ces souches sont incapables de croître en présence d'EGTA (un chélateur de cation divalent). Dans ces conditions, seul un apport exogène de Mn permet de restaurer leur croissance. Bien que la transformation par *AtNRAMP1* et *AtNRAMP4* permettent aux levures *smf1* de pousser sur milieux carencés en Mn, aucun des deux *PtNRAMP* testé n'a permis de compléter ce phénotype (**Figure 21**). Précédemment, il a été mis en évidence qu'*AtNRAMP2*, homologue de séquence de *PtNRAMP2* est capable de compléter les phénotypes de *smf2* à la fois en condition de carence et d'excès de Mn (Cailliatte, 2008). De nouveaux tests en gouttes ont donc été conduits à l'aide de ce mutant (**Figure 22**). Comme attendu, la souche *smf2* transformée par *GUS* est sensible à l'ajout d'EGTA mais pousse normalement sur un milieu supplémenté en Mn. L'expression d'*AtNRAMP2* ou celle de *PtNRAMP2* permet de compléter ce phénotype. Ce résultat a ensuite été confirmé par des tests de sensibilité au Mn (**Figure 22**). En effet, comparé à la souche *smf2* transformée par *GUS*, il apparaît que l'expression d'*AtNRAMP2* et de *PtNRAMP2* rendent les levures légèrement sensibles aux fortes concentrations en Mn. Ces résultats indiquent donc qu'*AtNRAMP2* et *PtNRAMP2* sont capables de transporter le Mn, quand ils sont exprimés chez la levure.

## **3. Tests d'accumulation des métaux en levure**

Afin de confirmer les résultats précédents et d'obtenir d'avantage de données concernant la sélectivité des transporteurs *PtNRAMP1* et *PtNRAMP2*, nous avons étudié leur effet sur l'accumulation de métaux chez la levure. Des tests précédemment entrepris au laboratoire, ont montré que la souche *zrt1zrt2* représente un fond génétique intéressant pour ce type d'approche, permettant l'étude de l'accumulation de différents métaux.

Ainsi, les levures *zrt1zrt2* ont été transformées et incubées pendant 30h à 30°C avant d'être lavées. Le contenu en métaux des levures a ensuite été mesuré par spectrométrie d'absorption atomique (**Figures 23 a-c**). Une augmentation significative de concentration en Zn a été observée chez les levures exprimant *PtNRAMP3.1* par rapport aux levures exprimant *GUS*. En revanche, aucune différence de contenu en Zn n'a été observée avec les levures exprimant *PtNRAMP1* et *PtNRAMP2*. Néanmoins, une augmentation suivant un facteur 3, de



**Figure 23** : Accumulation des métaux chez des levures exprimant différents *PtNRAMP*.

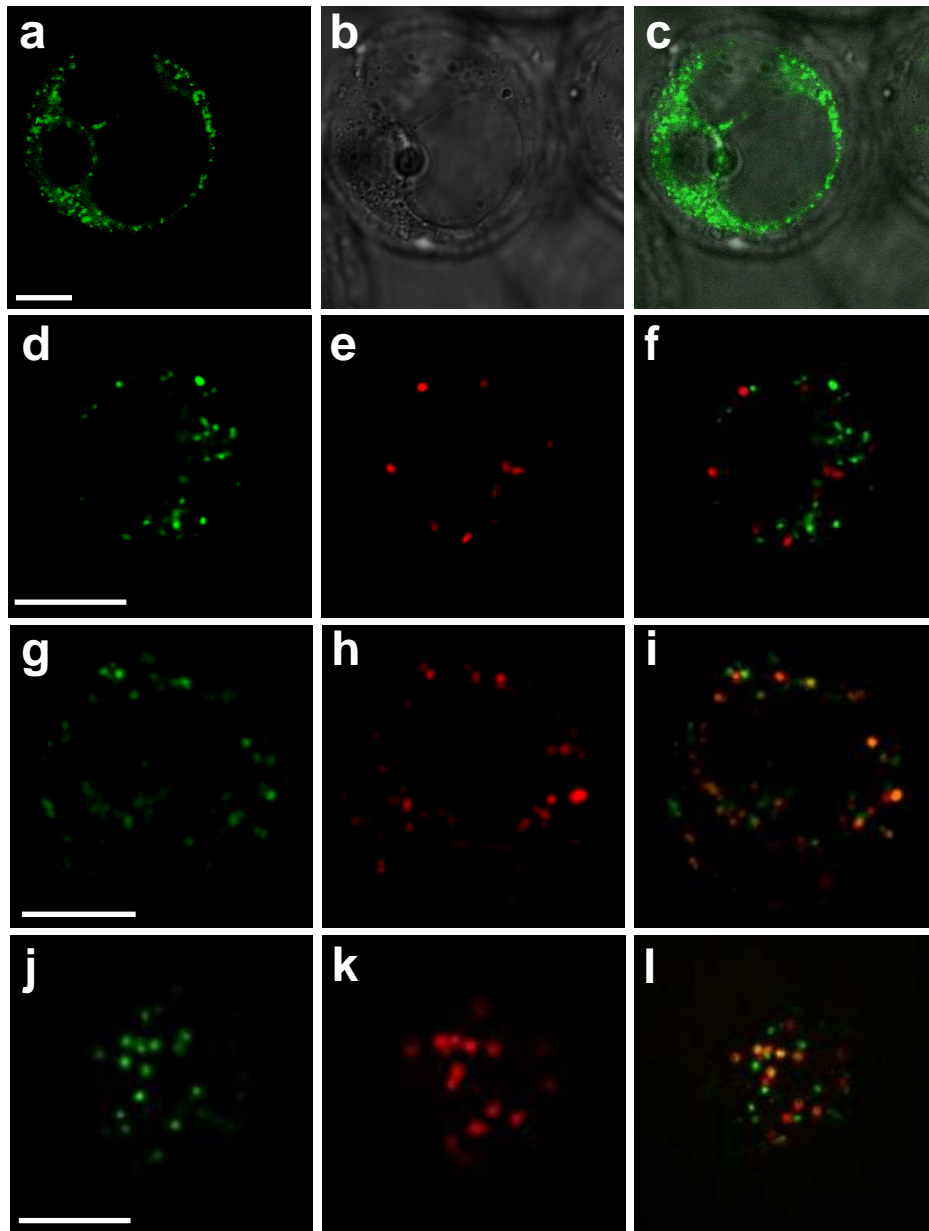
Après 30 heures de croissances à 30°C, les levures ont été lavées deux fois dans du YNB 50 mM MES, 20 mM EDTA puis rincées à l'eau avant d'être séchées. Le contenu en métaux a été déterminé par spectrométrie d'absorption atomique. GUS correspond au témoin négatif et PtNRAMP3.1 correspond au témoin positif. Les concentrations en Zn, Mn et Mg mesurées dans la souche *zrt1zrt2* sont présentées respectivement dans les figures **a**, **b**, **c**. Les concentrations en Mn et Mg mesurées dans la souche *smf2* sont présentées respectivement dans les figures **d** et **e**. Les données représentent les moyennes obtenues à partir d'une (*smf2*), deux expériences indépendantes comprenant 3 clones différents pour chaque (*zrt1zrt2*). \* : différence significative entre les levures transformées par GUS et celles transformées par NRAMP selon le test de Mann-Whitney (*zrt1zrt2*,  $p < 0.05$ ,  $n=6$  ; *smf2*,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

la concentration en Mn a été observée chez les levures exprimant *PtNRAMP2* par rapport à celles exprimant *GUS*. Ces résultats confirment donc que *PtNRAMP2* est un transporteur de Mn. L'absence d'accumulation d'autres métaux (Fe, Ca et Mg) chez les levures exprimant *PtNRAMP2* indique qu'il s'agit d'un transporteur spécifique du Mn à l'image de *Smf2p* de levure (Luk et Culotta, 2001). En revanche cette approche n'apporte pas d'information concernant les capacités de transport de *PtNRAMP1*. Dans le but de confirmer les résultats d'accumulation de Mn observés chez les levures *zrt1zrt2* exprimant *PtNRAMP2*, un nouveau test d'accumulation a été réalisé dans la souche *smf2*, précédemment utilisé pour des tests de croissance. De façon similaire, une augmentation importante de l'accumulation de manganèse est obtenue chez les levures *smf2* exprimant *PtNRAMP2* par rapport aux levures exprimant *GUS*, alors que le niveau d'accumulation de Mg est similaire (**Figures 23d et 23e**). Ainsi, par différentes approches nous avons apporté les preuves que *PtNRAMP2* code un transporteur spécifique du Mn.

### *B) Localisations subcellulaires de *PtNRAMP1* et *PtNRAMP2*.*

Dans le but de déterminer la localisation subcellulaire de *PtNRAMP1* et *PtNRAMP2* des constructions permettant la production de protéines de fusion avec la GFP ont été réalisées.

Une première approche a consisté à exprimer de façon transitoire ces *PtNRAMP* fusionnées à la GFP (en N-term et C-term) dans des protoplastes issus de cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana*. Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas pu déterminer la localisation de *PtNRAMP1*. En revanche, *PtNRAMP2* a été observé de façon claire et reproductible au niveau de compartiments intracellulaires indépendamment du sens de la fusion (**Figures 24 a-c**). Dans le but d'identifier ces compartiments, des co-transformations ainsi que des colorations ont été réalisées avec différents marqueurs (**Figures 24 d-l**). Aucune co-localisation n'a été obtenue entre *PtNRAMP2::GFP* et le marqueur du peroxysome *mCherry::PTS1* (Nelson *et al.*, 2007) . De la même façon le mitotracker, qui colore spécifiquement les mitochondries, n'a jamais été observé au niveau des vésicules contenant *PtNRAMP2::GFP*. Ce dernier résultat est en accord avec l'absence de co-localisation précédemment observée entre *AtNRAMP2::GFP* et le mitotracker (Cailliatte, 2008). Par contre, *PtNRAMP2::GFP* co-localise de façon partielle avec *ST::mCherry* et *Man 49::mCherry*, spécifiques de l'appareil de Golgi (**Figures 24g-l**). Un résultat similaire a également été observé lors de l'unique test de co-localisation entre *PtNRAMP2::GFP* et



**Figure 24** : Localisation subcellulaire de PtNRAMP2.

Observations réalisées au microscope confocal inversé Leica SP2 (**a à c**) et spinning disk (**d à l**), après transformation de protoplastes de culture cellulaire d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 et incubation 48h à 20°C et à l'obscurité.  $\lambda$ excitation GFP= 485nm,  $\lambda$ émission mesurée= [495-535] nm et  $\lambda$ excitation mCherry= 558nm,  $\lambda$ émission mesurée= [578-707]. Barre d'échelle =10 $\mu$ m

Les images **a**, **d**, **g** et **j** présentent la localisation subcellulaire de PtNRAMP2::GFP. Les images, **b** et **c** représentent respectivement la transmission et la superposition des images **a** et **b**. PtNRAMP2::GFP apparaît localisé au niveau de compartiments intracellulaires. Le même type de résultat a été obtenu pour la construction GFP::PtNRAMP2

Les images **e**, **h**, **k** présentent respectivement les localisations subcellulaires du marqueur peroxysomal mCherry::PTS1 (Nelson, *et al.*, 2007) et des marqueurs de l'appareil de golgi ST::mCherry (Sialyl transferase) et Man49::mCherry. Les images **f**, **i** et **j** représentent respectivement les superpositions des images **d** et **e**, **g** et **h**, **j** et **k**.

ARA7::mCherry, localisé au niveau des endosomes tardifs. Ces résultats suggèrent donc que PtNRAMP2::GFP serait localisé au niveau de compartiments impliqués dans le trafic entre l'appareil de Golgi et les endosomes tardifs. De nouveaux tests de co-localisation sont toutefois nécessaire pour confirmer ces résultats et pour déterminer si PtNRAMP2::GFP est également présent au niveau des endosomes précoces (Rab-A2/A3) ou des endosomes de recyclages (GNOM). Cependant, avant de poursuivre ces efforts, il nous a paru essentiel de mettre en évidence que la protéine chimère PtNRAMP2::GFP est fonctionnelle. Pour cela, nous avons testé sa capacité à compléter les phénotypes du mutant *nramp2* d'*Arabidopsis thaliana*.

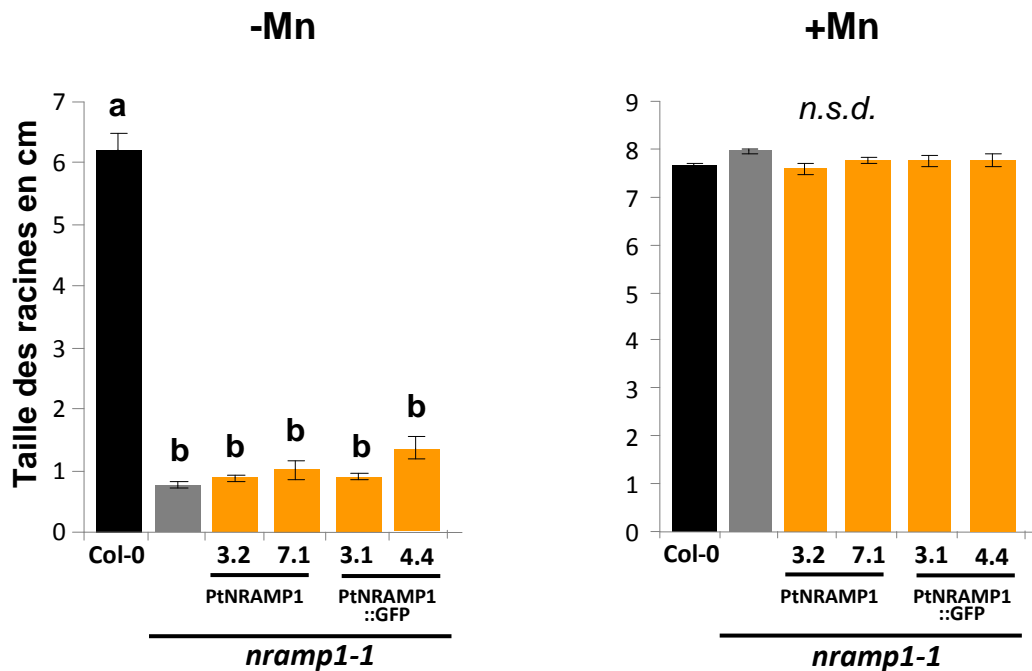
### C) *Caractérisation des PtNRAMPs par expression chez Arabidopsis*

Dans le but de déterminer les fonctions en plantes des protéines PtNRAMP1 et PtNRAMP2, des transformants stables impliquant l'expression de *PtNRAMP1* et de *PtNRAMP2* sous le contrôle du promoteur UBQ10 (ubiquitine 10) (Grefen *et al.*, 2010) ainsi que l'expression de *PtNRAMP1::GFP* et de *PtNRAMP2::GFP* sous le contrôle du promoteur 35S ont été générés chez *Arabidopsis thaliana*.

#### 1. *Caractérisation de PtNRAMP1 par expression chez Arabidopsis*

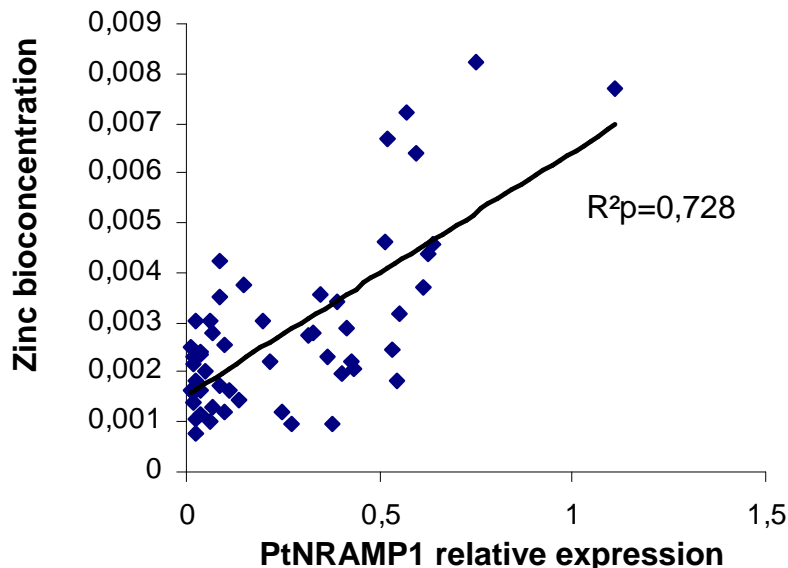
En raison de la forte homologie entre les séquences d'AtNRAMP1 et de PtNRAMP1, *PtNRAMP1* et *PtNRAMP1::GFP* ont été exprimés chez le mutant *nramp1* (Cailliatte *et al.*, 2010), afin de tester sa complémentation. AtNRAMP1 est un transporteur localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules racinaires, impliqué dans l'absorption de Mn à partir du sol (Cailliatte *et al.*, 2010). Lors d'une carence en Mn, *nramp1-1* présente une diminution drastique de la production de biomasse racinaire et aérienne ainsi qu'une diminution de ses concentrations en Mn au niveau des parties aériennes. Dans le but de tester l'hypothèse selon laquelle PtNRAMP1 est capable de remplir les mêmes fonctions qu'AtNRAMP1, des plantes sauvages, mutantes et mutantes transformées par PtNRAMP1 ont été semées sur un milieu carencé ou non en Mn. Après 16 jours de culture *in vitro*, les racines du mutant *nramp1-1* ont montré une diminution par huit de la taille de ses racines par rapport à celles de plantes sauvages soumises à une carence en Mn, alors qu'aucune différence n'a été observée entre génotypes en condition non carencée (**Figure 25**). Cependant aucune des deux lignées T3 indépendantes exprimant *PtNRAMP1* sous le promoteur UBQ10, et des deux lignées T3





**Figure 25** : Test de complémentation de *nramp1.1* par *PtNRAMP1*.

Taille des racines de lignées indépendantes T3 *nramp1-1* (Col-0) d'*Arabidopsis thaliana* *Ub:PtNRAMP1*, de plantes sauvages (Col-0) et mutant *nramp1-1* (Col-0). Les plantes se sont développées verticalement pendant 16 jours sur un milieu solide Hoagland modifié dépourvu de manganèse. L'agar M (Sigma) utilisé pour cette expérience a été préalablement lavé à l'EGTA de façon à retirer un maximum de contaminants métalliques. Les valeurs présentées correspondent à une moyenne de 10 à 12 racines principales. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les génotypes suivant un test Kruskal-Wallis ( $p < 0.01$ ) suivi par un test *post hoc* Tukey. nsd: no significant difference.



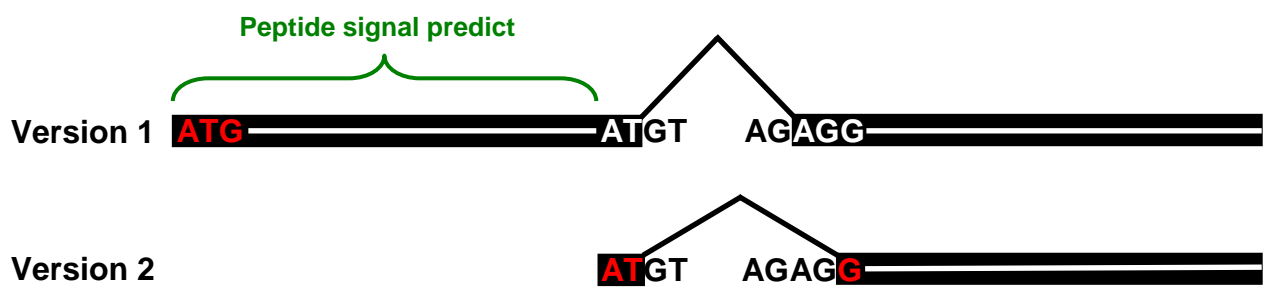
**Figure 26** : Corrélation entre la bioconcentration en Zinc et l'expression de *PtNRAMP1*.

Etude de corrélation de Pearson à partir des feuilles de peuplier récoltées aux mois de Juin et Septembre 2011 chez des génotypes Bakan, Vesten, Dorskamp, Soligo, Lena, Skado et Trichobel poussant sur la parcelle expérimentale de Pierrelaye.

indépendantes exprimant *PtNRAMP1::GFP* sous le promoteur 35S n'a montré de complémentation de ce phénotype. Par ailleurs, des mesures de contenu en métaux ont été réalisées sur ces mêmes lignées après deux semaines de croissance sur milieu Hoagland. Mais une fois de plus, aucune différence n'a pu être observée entre le mutant et les lignées transformées. Il est important de noter que l'observation des racines des plantes exprimant *PtNRAMP1::GFP* n'a pas permis de déceler le moindre signal GFP. Ceci suggère que les résultats négatifs obtenus pourraient être liés à l'absence de la protéine *PtNRAMP1*.

L'absence de signal GFP chez les plantes transformées par *PtNRAMP1::GFP* semble indiquer l'existence d'un problème d'expression. Une faible stabilité de l'ARN ou de la protéine pourrait en être une raison. Par extension, il est possible que l'absence de production de protéine *NRAMP1* rende compte de l'ensemble des résultats négatifs obtenus lors de l'expression en levure, lors de la localisation et chez les autres plantes transgéniques. Le clonage de la séquence génomique de *PtNRAMP1* suivi de son expression chez *Arabidopsis thaliana* ou chez le peuplier sont des alternatives possibles qui permettront peut-être d'identifier le rôle joué par cette protéine. Alternativement, l'absence de résultats positifs pourrait également être liée au fait que *PtNRAMP1* possède une fonction propre non étudiée en levure et non retrouvée chez les *NRAMP* d'*Arabidopsis*, à l'image d'*OsNRAT1* impliqué dans l'absorption de l'Al trivalent à partir du sol chez le riz (Xia *et al.*, 2011). Pour tester cette hypothèse, il sera nécessaire de tester l'effet de l'expression de *PtNRAMP1* sur la tolérance et l'accumulation d'autres métaux, sans *a priori*. Par ailleurs, au cours des expérimentations réalisées en champs, une corrélation significative à 99% ( $R^2p=0,728$ ) entre l'expression de *PtNRAMP1* et le facteur de bioconcentration en Zn (ratio de la concentration dans les feuilles sur la concentration dans le sol) a été observé, suggérant que ce transporteur pourrait être impliqué dans le transport de Zn dans les feuilles de peuplier (**Figure 26**). Bien qu'aucune donnée ne soit disponible concernant les concentrations en Fe dans le sol, une corrélation significative à 99% ( $R^2p=0,57$ ) a également été observée entre l'expression de *PtNRAMP1* et la concentration en Fe des feuilles (non présenté). Ainsi, *PtNRAMP1*, principalement exprimé au niveau des entre nœud (Sjödén *et al.*, 2009), pourrait être un acteur important de l'accumulation du Zn et jouer un rôle dans l'accumulation du Fe dans les feuilles du peuplier.

Enfin, les prédictions de séquences codantes indiquent qu'une autre isoforme de *PtNRAMP1* pourrait exister : un épissage alternatif permettrait l'utilisation d'un second codon d'initiation localisé au niveau du premier intron (**Figure 27**). Bien que plus courte de 38 acides aminés, cette isoforme posséderait l'ensemble des motifs conservés, notamment le motif DPGN, caractéristique des *NRAMP*. Seule l'extrémité N-term cytosolique retrouvée



**Figure 27:** Représentation schématique des deux possibles isoformes de *PtNRAMP1*.

L'épissage alternatif de *PtNRAMP1* au niveau du premier intron de la version 1 provoquerait un décalage de deux nucléotides, aboutissant à la formation d'une séquence codante homologue mais plus courte de 113 nucléotides. Le codon d'initiation est représenté en rouge.

essentiellement chez AtNRAMP1 et AtNRAMP6 serait absente. Les analyses *in silico* réalisées *via* Target P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) indiquent que ce motif correspondrait à un peptide d'adressage chloroplastique à la fois chez AtNRAMP1 et PtNRAMP1. Néanmoins, contrairement aux prédictions, AtNRAMP1 est localisée sur la membrane plasmique (Cailliatte *et al.*, 2010), le rôle de l'extrémité N-term reste donc à élucider. Finalement, alors que ces données EST ont permis de montrer l'existence *in vivo* de la forme longue de PtNRAMP1, aucune donnée EST ne confirme l'existence de la forme courte. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour démontrer son existence.

## **2. Caractérisation de PtNRAMP2 par expression chez Arabidopsis**

En raison des homologies de séquences et similitudes entre AtNRAMP2 et PtNRAMP2 en termes de complémentation de levures et de localisation subcellulaire, l'expression stable de *PtNRAMP2*, et de *PtNRAMP2::GFP* a été réalisée chez le mutant *nramp2-1* d'*Arabidopsis thaliana* (Cailliatte, 2008). Ce mutant présente une chlorose et une floraison précoce en absence de stress lors de culture sur sol. Ainsi, nous avons testé la capacité des constructions *Ub:PtNRAMP2* et *35S:PtNRAMP2::GFP* à compléter ses deux phénotypes. Néanmoins, ni la transformation par *PtNRAMP2*, ni la transformation par *PtNRAMP2::GFP* n'ont permis de compléter le mutant *nramp2-1* d'*Arabidopsis*. Ce résultat pourrait être la conséquence d'une absence d'expression du transgène, puisque ni l'expression de la GFP, ni l'expression de NRAMP2 n'ont été vérifiées. Cette absence de complémentation pourrait aussi, être liée au fait que PtNRAMP2 ne remplisse pas les mêmes fonctions qu'AtNRAMP2. Cependant, la tentative de complémentation du mutant *nramp2-1* d'*Arabidopsis thaliana* par la construction *35S:AtNRAMP2::GFP* avait également échoué (Cailliatte, 2008). Dans le cas où ces deux protéines possèdent les mêmes fonctions, le test de complémentation réalisé avec protéine native, permet d'affirmer, cette fois, que ce résultat négatif n'est pas lié à un mauvais adressage ou à une mauvaise conformation engendrée par la fusion à la GFP. Il reste possible que la complémentation du mutant *nramp2-1* requiert une régulation fine de l'expression de NRAMP2, nécessitant son promoteur endogène. Enfin, les phénotypes du mutant *nramp2-1* ne sont peut-être pas liés à l'insertion de l'ADN-T dans NRAMP2, mais à une autre mutation car ils n'ont été pour le moment observés que chez un seul allèle mutant d'*AtNRAMP2*.



Ainsi si l'on s'en tient aux données acquises chez la levure et aux études de co-localisation réalisées en protoplastes, les NRAMP2 d'*Arabidopsis thaliana* et de peuplier seraient les homologues fonctionnels de Smf2p de levure. De ce fait, ils pourraient être impliqués tout comme Smf2p, dans l'approvisionnement en Mn des organites et de l'appareil de Golgi (Luk et Culotta, 2001). En effet, chez le mutant *smf2*, il a été observé une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase Mn dépendante (MnSOD) et de la Mannosyltransférase (MNN) (Luk et Culotta, 2001). Chez les plantes, le Mn occupe une place centrale au niveau des chloroplastes : il est indispensable à l'oxydation de l'eau et à la production d'O<sub>2</sub> par le photosystème II (Tommos *et al.*, 1998 ; Marschner et Marschner, 2011). Dans les mitochondries, la MnSOD et certaines enzymes impliquées dans des réactions de décarboxylation niveau du cycle de Krebs requièrent du Mn pour leur activité (Marschner et Marschner, 2011). Dans l'appareil de Golgi, la MNN est nécessaire pour la glycosylation des invertases golgiennes.



## Chapitre V : Étude de la relation entre la structure primaire et la sélectivité chez AtNRAMP4, homologue des PtNRAMP3s

---

Les métaux non essentiels empruntent, le plus souvent, les systèmes de transport des métaux essentiels. L'amélioration de l'efficacité de phytoextraction, nécessite d'optimiser les capacités de transport d'ETM de ces systèmes. Pour cela, il apparaît indispensable d'identifier, au niveau des protéines de transport, les déterminants structuraux permettant la discrimination des métaux essentiels des métaux non essentiels.

En fait, l'identification de ces déterminants structuraux présente un double intérêt. D'une part, ce travail contribuera à l'amélioration l'efficacité de phytoextraction. En effet, l'insertion de ces déterminants structuraux dans des protéines NRAMP transportant peu ou pas le Cd, permettra peut-être d'augmenter leurs capacités de transport vis-à-vis de ce métal non essentiel. D'autre part, l'insertion de mutations au niveau de ces déterminants structuraux, permettra au contraire de limiter l'accumulation des métaux non essentiels dans les espèces végétales destinées à la nutrition.

La caractérisation des PtNRAMP3s, décrite dans le chapitre précédent, semble indiquer que ces protéines transportent les métaux essentiels (Fe, Mn, voire Zn) mais ne permettent pas le transport de Cd contrairement à leurs plus proches homologues AtNRAMP3 et AtNRAMP4 chez *A. thaliana*. L'étude de la relation entre la structure primaire des NRAMP et leur sélectivité a donc été réalisée sur la protéine AtNRAMP4, d'autant que l'on possède de nombreux outils facilitant le travail chez *Arabidopsis thaliana*.

Suite à une mutagenèse aléatoire du CDS codant la protéine AtNRAMP4, un crible en levure a été réalisé en présence de Cd et en condition de carence en Fe. La sélectivité des différents AtNRAMP4 mutés a été testée par expression chez des levures déficientes pour différent systèmes d'influx de métaux. Les conséquences physiologiques de ces mutations ont ensuite été étudiées en plante chez le double mutant *nramp3nramp4* d'*Arabidopsis thaliana*. Enfin la conservation du rôle de ces résidus a été validée par introduction de ces mutations au sein d'un NRAMP de mammifère, RnDMT1 suivi de son expression en ovocyte de xénope.





## Article III

### Mutations in a novel domain allow Natural Resistance Associated Macrophage Proteins (NRAMP) to discriminate between iron and cadmium

Mathieu Pottier<sup>1\*</sup>, Ronald Oomen<sup>1,†\*</sup>, Cristiana Picco<sup>2</sup>, Jérôme Giraudat<sup>1</sup>, Joachim Scholz-Starke<sup>2</sup>, Hélène Molins<sup>1</sup>, Pierre Richaud<sup>3,4,5</sup>, Armando Carpaneto<sup>2</sup>, Sébastien Thomine<sup>1</sup>

\* co-first authors.

<sup>1</sup> Institut des Sciences du Végétal, Saclay Plant Sciences, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> Istituto di Biofisica, CNR, Genova, Italy

<sup>3</sup>CEA, DSV, IBEB, Lab. Bioenerget. Biotechnol. Bacteries & Microalgues, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France.

<sup>4</sup>CNRS, UMR Biol Veget & Microbiol Environ, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France

<sup>5</sup>Aix-Marseille Université, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France.

† current address : Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Institut de Biologie Intégrative des Plantes, UMR 5004 CNRS/UMR 0386 INRA/Montpellier SupAgro/Université Montpellier 2, Montpellier, France.

**Running title:** *Cadmium discrimination by NRAMP metal transporters*

#### Correspondence to:

Sébastien Thomine,  
Institut des Sciences du Végétal,  
1, Avenue de la Terrasse,  
91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.  
Tel. +33 1 69 82 36 87.  
Email: [thomine@isv.cnrs-gif.fr](mailto:thomine@isv.cnrs-gif.fr)

*Ce travail est présenté sous forme d'un manuscrit qui a été soumis le 27 Janvier à « The Plant Journal ». Le crible en levure a été pensé et réalisé par Ronald Oomen et Sébastien Thomine. La caractérisation en levure a été réalisée par Jérôme Giraudat et Ronald Oomen. Les premières plantes transgéniques (promoteur 35S) ont été générées par Jérôme Giraudat et Ronald Oomen. Leur caractérisation a été effectuée par Jérôme Giraudat et Mathieu Pottier. Les secondes plantes transgéniques (promoteur ubiquitine) ont été générées par Mathieu Pottier. Leur caractérisation a été réalisée par Mathieu Pottier et sa stagiaire Cindy Victor. Les études de localisations subcellulaires ont été effectuées par Mathieu Pottier. Les études en ovocyte en xénope ont été réalisées par Armando Carpaneto, Mathieu Pottier et Cristiana Picco. Les analyses de résultats et les études de structure 3D ont été réalisées par Sébastien Thomine et Mathieu Pottier. La rédaction de ce manuscrit a été réalisée par Sébastien Thomine avec l'aide de Mathieu Pottier.*



## ABSTRACT

Each essential transition metal plays specific roles in metabolic processes and has to be selectively transported. Moreover, living organisms need to discriminate between essential and non-essential metals such as cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ), which is highly toxic. However, metal transporters of the NRAMP family, which are involved in controlling the level of metal concentrations in plant cells and intracellular compartments, display poor selectivity towards divalent metal cations. In the present study, we identified mutations that allow an NRAMP transporter to discriminate between  $\text{Cd}^{2+}$  and its essential metal substrate  $\text{Fe}^{2+}$ . We took advantage of the increased  $\text{Cd}^{2+}$  sensitivity of yeast expressing *AtNRAMP4* to screen a population of randomly mutagenized *AtNRAMP4* cDNAs. The screen recurrently identified mutations in 4 residues that decrease  $\text{Cd}^{2+}$  sensitivity while maintaining the ability of *AtNRAMP4* to transport  $\text{Fe}^{2+}$ . All mutations also affect  $\text{Zn}^{2+}$  transport, whereas only one of them, E401K, impairs  $\text{Mn}^{2+}$  transport by *AtNRAMP4*. Introduction of the mutation F413I, located in a highly conserved domain, into the mammalian DMT1 transporter indicates that the importance of this residue in metal selectivity is conserved among NRAMP transporters from plant and animal kingdoms. Analysis of metal concentrations in plants expressing native or mutant *AtNRAMP4* showed that *AtNRAMP4* controls metal accumulation in roots and that the identified mutations selectively reduce  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  transport mediated by NRAMP4 *in planta*. This knowledge may be applicable to control  $\text{Cd}^{2+}$  transport by other NRAMP transporters from animals or plants.

**Keywords:** transition metals, transport, *Arabidopsis*, vacuole



## **INTRODUCTION**

Transporters and ion channels mediate the selective transport of solutes and ions across the membrane of living cells. The mechanisms that allow transporters and channels to discriminate between substrates with very similar chemical properties while preserving a high rate of transport has been the topic of intense research (Roux *et al.*, 2011). The criteria involved in selectivity include substrate size or steric hindrance, charge, hydration-dehydration energy or affinity for specific amino-acid residues. Essential transition metals have to be selectively transported since they play specific roles in metabolic processes. In addition, transition metal transporters need to discriminate between essential metals that are required by the cell and non-essential metals that may be harmful. Metal transporters display however diverse levels of selectivity according to the family to which they belong. Members of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family or of the Heavy Metal P-type ATPase (HMA) family display sharp selectivity. Some HMA family members specifically transport  $\text{Cu}^+$  and  $\text{Ag}^+$  ions, whereas others transport specifically  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  ions (Arguello *et al.*, 2007). Similarly, depending on the phylogenetic group to which they belong, CDF/MTP proteins transport specifically  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{2+}$  (Montanini *et al.*, 2007) and recent studies have identified residues involved in CDF/MTP selectivity (Lin *et al.*, 2008 ; Podar *et al.*, 2012).

In contrast, ZRT1-IRT1 like Protein (ZIP) and Natural Resistance Associated Macrophage Protein (NRAMP) metal transporters display poor selectivity towards divalent metal cations. Iron Regulated Transporter 1 (IRT1), one of the founding members of the ZIP family, as well as human ZIP4 are able to transport a broad range of metals (Korshunova *et al.*, 1999 ; Antala and Dempksi, 2012). Nevertheless, the range of substrates transported by individual ZIP transporters is variable: OsZIP1, but not OsZIP3, is able to transport  $\text{Cd}^{2+}$  (Ramesh *et al.*, 2003). Using site-directed mutagenesis, conserved residues involved in IRT1 metal selectivity could be identified (Rogers *et al.*, 2000). Similarly, metal transporters of the NRAMP family, such as mammalian NRAMP2/DCT1/DMT1 or yeast SMF1, transport a wide range of divalent metal cations (Liu *et al.*, 1997 ; Illing *et al.*, 2012). In *Arabidopsis thaliana*, *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* transport  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  as well as the toxic metal  $\text{Cd}^{2+}$  (Thomine *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2003). They function redundantly to release metals from the vacuole. *nramp3nramp4* double knockout mutants display a growth arrest during germination under iron deficient conditions, due to their inability to retrieve iron from seed stores, and also show hypersensitivity to  $\text{Cd}^{2+}$  stress (Lanquar *et al.*, 2005 ; Molins *et al.*,



2013). Despite the strong homology between the two proteins, only AtNRAMP4 can transport  $Zn^{2+}$  suggesting that differences in few residues in their primary sequence modulate their substrate range (Lanquar *et al.*, 2004).

Several studies have investigated the structure-function relationships in proteins of the NRAMP family, with a focus on mammalian NRAMP2/DCT1/DMT1, yeast SMF1 and *E. coli* MntH. These studies addressed the function of residues associated to polymorphisms in humans and mutated in model animals (Vidal *et al.*, 1996 ; Beaumont *et al.*, 2006 ; Lam-Yuk-Tseung *et al.*, 2006) or relied on site-directed mutagenesis of conserved residues (Cohen *et al.*, 2003 ; Haemig and Brooker, 2004 ; Courville *et al.*, 2008). They provided some insights in the transport mechanisms used by NRAMPs (Lam-Yuk-Tseung *et al.*, 2003 ; Nevo and Nelson, 2004 ; Courville *et al.*, 2008). Interestingly, analysis of the G185R mutation in the fourth transmembrane domain of NRAMP2/DCT1/DMT1, which leads to microcytic anemia in rat and mouse, demonstrated that this mutation not only impairs iron transport but converts the transporter into a calcium-permeable channel (Xu *et al.*, 2004). Mutational analysis of the second transmembrane domain of NRAMP2/DCT1/DMT1 identified residues involved in metal selectivity (Cohen *et al.*, 2003). However, mutations in these residues strongly reduced the metal transport capacity of the protein.

The ability to transport  $Cd^{2+}$  of many metal transporters and specifically of NRAMP makes them potential pathways for the uptake and accumulation of this toxic metal in living organisms (Clemens *et al.*, 2012). In mammals, DMT1 provides a pathway for intestinal  $Cd^{2+}$  absorption, especially under iron deficiency (Park *et al.*, 2002). Recently, several studies demonstrated that the plasma membrane transporter OsNRAMP5 is the main pathway for  $Cd^{2+}$  influx in rice (Ishikawa *et al.*, 2012 ; Ishimaru *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012). Intracellular NRAMP transporters, such AtNRAMP3, AtNRAMP4 and AtNRAMP6 are also involved in controlling  $Cd^{2+}$  concentration in intracellular compartments and  $Cd^{2+}$  availability in plant cells (Thomine *et al.*, 2000 ; Cailliatte *et al.*, 2009 ; Oomen *et al.*, 2009 ; Molins *et al.*, 2013).

In this work, we identified mutations that allow AtNRAMP4 to discriminate between  $Cd^{2+}$ , which is toxic, and its essential metal substrate  $Fe^{2+}$  (Thomine *et al.*, 2000 ; Lanquar *et al.*, 2004). We took advantage of the increased  $Cd^{2+}$  sensitivity of AtNRAMP4-expressing yeast cells to screen a population of randomly mutagenized AtNRAMP4 cDNAs. The screen recurrently identified 5 mutations in 4 residues that decrease  $Cd^{2+}$  sensitivity while maintaining the ability of AtNRAMP4 to transport  $Fe^{2+}$ . One of the identified mutations was





introduced into the rat NRAMP transporter DMT1. Expression in *Xenopus* oocytes showed that the effect of the corresponding mutation on selectivity is conserved among plant and mammalian NRAMP. The 5 mutants of AtNRAMP4 were introduced into the *nramp3nramp4 Arabidopsis thaliana* mutant background (Lanquar *et al.*, 2005). Expression of four of them complemented the growth defects of *nramp3nramp4* double knockout mutants on low iron and under cadmium stress. Moreover, differences in metal concentrations in roots of plants expressing native or mutant AtNRAMP4 reflected their differences in metal selectivity.

## **MATERIAL AND METHODS**

*Yeast strains* - DEY1453 (*fet3fet4*) (Eide *et al.*, 1996), ZHY3 (*zrt1zrt2*) (Zhao and Eide, 1996) and *smf1* (Supek *et al.*, 1996 ; Thomine *et al.*, 2000) yeast strains were grown at 30°C on yeast extract/peptone/dextrose supplemented with 0.2 mM FeCl<sub>3</sub>, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub> or 0.1 mM MnCl<sub>2</sub>, respectively. Yeast cells were transformed according to standard procedures (Invitrogen).

### *Mutagenesis and yeast screening*

AtNRAMP4 cDNA was mutagenized by error prone PCR using the GeneMorph II Kit (Stratagene) and pDR195 GTW AtNRAMP4 as template. The gene of interest was amplified under conditions that introduce 1-4 mutations / kb using primers (pDR195F and pDR195R) that overlap by more than 50 bp with the vector to allow recombination with the linearized yeast vector. The yeast vector pDR195 GTW AtNRAMP4 was digested with *XhoI* and *SpeI* which cut in the vector close to ATG and to the stop codon, respectively, to remove the *AtNRAMP4* coding sequence. Subsequently, 0.45 µg of linearized vector and 0.9 µg of mutagenized PCR product were transformed into *fet3fet4* yeast cells. After transformation, yeast cells were plated on SD -URA medium pH 6 containing 10 µM CdCl<sub>2</sub>. Selection for uracyl autotrophy allowed to recover cells in which pDR195 GTW recombined. Yeast colonies expressing mutated AtNRAMP4 that retained the ability to transport Fe<sup>2+</sup> were selected on SD pH 6, as *fet3fet4* was not able to grow under these conditions. Finally, growth in the presence of 10 µM CdCl<sub>2</sub> selected AtNRAMP4 mutants with impaired ability to transport Cd<sup>2+</sup>, as *fet3fet4* transformed with native pDR195 GTW AtNRAMP4 did not form colonies under these conditions. To estimate the total number of mutated cDNA screened, the same experiment was performed without subjecting AtNRAMP4 to mutagenesis and plating on SD -URA medium pH 6 in the absence of Cd<sup>2+</sup>.



Several selected *AtNRAMP4* cDNAs carried more than one mutation (see Supplemental table 1). To obtain cDNAs carrying only one of the mutations recurrently identified by the screen, single mutations were introduced in native *AtNRAMP4* by directed mutagenesis using QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies).

#### *Yeast growth assays*

Yeast strains *fet3fet4*, *smf1* or *zrt1zrt2* were transformed with pDR195 GTW -GUS control vector or pDR195 GTW -*AtNRAMP4* or -*AtNRAMP4* point mutants (Oomen *et al.*, 2009). Yeast mutant complementation was tested by drop spotting assays. Diluted cultures of individual transformants were spotted on synthetic dextrose -URA buffered by 50 mM MES, pH 6 agar plates for *fet3fet4*, plates with 10 mM EGTA with (+Mn) or without (-Mn) 0.1 mM MnCl<sub>2</sub> for *smf1* and plates containing 100 μM EDTA with (+Zn) or without (-Zn) 80 μM ZnSO<sub>4</sub> for *zrt1zrt2*. For yeast protein extraction, cells were grown overnight in 10 mL minimal medium. They were harvested by centrifugation (2000 g, 2 min). Protein extraction and immunoblot analysis were performed following the procedures described by Lanquar *et al.* (2004).

#### *Oocyte expression*

pSPORT-DMT1 was kindly provided by Mathias A. Hediger, (Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, BERN, Switzerland) (Gunshin *et al.*, 1997). The DMT1<sup>F452I</sup> mutant (corresponding to *AtNRAMP4*<sup>F413I</sup>) was obtained by directed mutagenesis using QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies) with DMT1F413IV2F (5'-CTACAGCTCCCCATTGCCCTCATCCCTATC-3') and DMT1F413IKV2R primers (5'-GATAGGGATGAGGGCAATGGGGAGCTGTAG-3'). Plasmids were linearized with Hind III and used for *in vitro* transcription with T7 mMessage mMachine (Ambion Inc.) aiming to obtain about 40 μg of mRNA. Capped mRNA was recovered by lithium chloride precipitation, ethanol precipitated and finally resuspended in DEPC-treated distilled H<sub>2</sub>O. Oocytes were isolated from *Xenopus laevis* females and injected with cRNA (1.1 mg/ml) encoding either DMT1 or DMT1<sup>F452I</sup> using a Drummond "Nanoject" microinjector (50 nl/oocyte). Oocytes were incubated in a solution containing 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM HEPES, pH 7.5, supplemented with 0.1 mg/ml gentamycin. Oocytes were incubated at 18°C for at least 24 h before voltage-clamp experiments.



### *Electrophysiology*

Whole-cell membrane currents were measured at room temperature using a home-made two-electrode voltage-clamp amplifier and 0.2-0.4 M $\Omega$  glass electrodes filled with 3 M KCl. The following standard bath solution was used: 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM MES, pH 5.5. MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> and FeSO<sub>4</sub> were prepared as 10 mM stock solutions and diluted appropriately in bath solution, except for ferrous sulphate which was diluted in a modified bath solution containing 1 mM ascorbate. The modified bath solution with 1 mM ascorbate was used as control for FeSO<sub>4</sub> measurements. Data from 5 to 8 different oocytes are reported as mean  $\pm$  standard error.

### *Plant material*

The *nramp3nramp4* double mutant obtained by Lanquar *et al.* (2005) was transformed via *Agrobacterium tumefaciens* floral dipping with pUB-DEST *AtNRAMP4*<sup>E401K</sup>, pUB-DEST *AtNRAMP4*<sup>F413I</sup>, pUB-DEST *AtNRAMP4*<sup>L67I</sup>, pUB-DEST *AtNRAMP4*<sup>L67V</sup>, pUB-DEST *AtNRAMP4*<sup>A463V</sup> allowing the expression of *AtNRAMP4* under the control of a Ubiquitin 10 promoter and pNB96 *AtNRAMP4*, pNB96 *AtNRAMP4*<sup>E401K</sup> and pNB96 *AtNRAMP4*<sup>F413I</sup> allowing the expression of *AtNRAMP4* under the control of a 2x35S promoter (Oomen *et al.*, 2009 ; Grefen *et al.*, 2010). For cloning into the pUB-DEST vector, native and mutated *AtNRAMP4* cDNA were excised from pDR195 and inserted into pDON207 vector (Invitrogen) through BP reaction. Native and mutated *AtNRAMP4* were, then, insert into pUB-DEST vector through LR reaction according to manufacturer instructions. For cloning into the pNB96 vector, native *AtNRAMP4* cDNA was excised from pDR195 *AtNRAMP4* (Thomine *et al.*, 2000) using flanking *EcoRI* restriction sites and cloned at the *EcoRI* site in pNB96. Mutated *AtNRAMP4* cDNAs were excised from the corresponding pDR195 yeast expression vectors using primers *NotI* and *SpeI* and ligated in pNB96 *AtNRAMP4* digested with the same enzymes. Independent homozygous *A. thaliana* WS-*nramp3nramp4* transformants with a single insertion locus were selected based on BASTA resistance and on complementation of the *nramp3nramp4* phenotype on low iron medium.

### *Plant growth conditions*

*Arabidopsis* seedlings were grown on plates containing ABIS medium: 2.5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Murashige and Skoog microelements, 1 % sucrose, 1 % Phytagel, 1 mM MES adjusted with KOH to pH 6.1 and 50  $\mu$ M FeHBED



(N,N' di(2-hydroxybenzyl)ethylene diamine-N,N'diacetic acid monochloride hydrate, Strem Chemicals, Newburyport, MA) or as indicated in the legends of figures. To deplete the medium with Fe, FeHBED was omitted (-Fe). CdCl<sub>2</sub> (Sigma chemicals, St Louis, MO) was added to the growth medium at the indicated concentrations (+Cd). Plates were placed vertically in environmental growth chambers (Sanyo MLR-350, Japan) at 21°C with a 16 hrs photoperiod under 120 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### *Plant protein isolation and immunoblot analysis*

*A. thaliana*, ecotype WS, wild-type or *nramp3nramp4* double mutant were grown vertically for 14 days on ABIS medium containing 50 mM FeHBED. Total proteins from shoot or root tissues were extracted and separated as described (Lanquar *et al.*, 2004). The proteins were detected by anti-NRAMP4 antibodies and then revealed by goat anti-rabbit, conjugated to horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) and visualized using the enhanced chemiluminescence ECL kit (Amersham Biosciences).

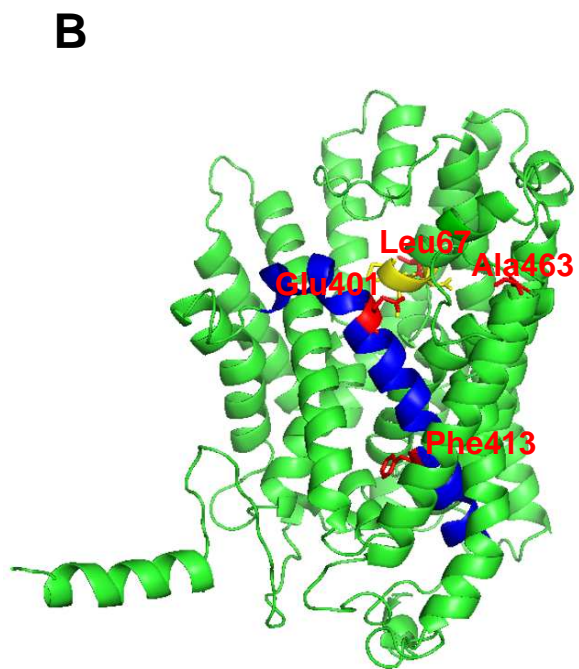
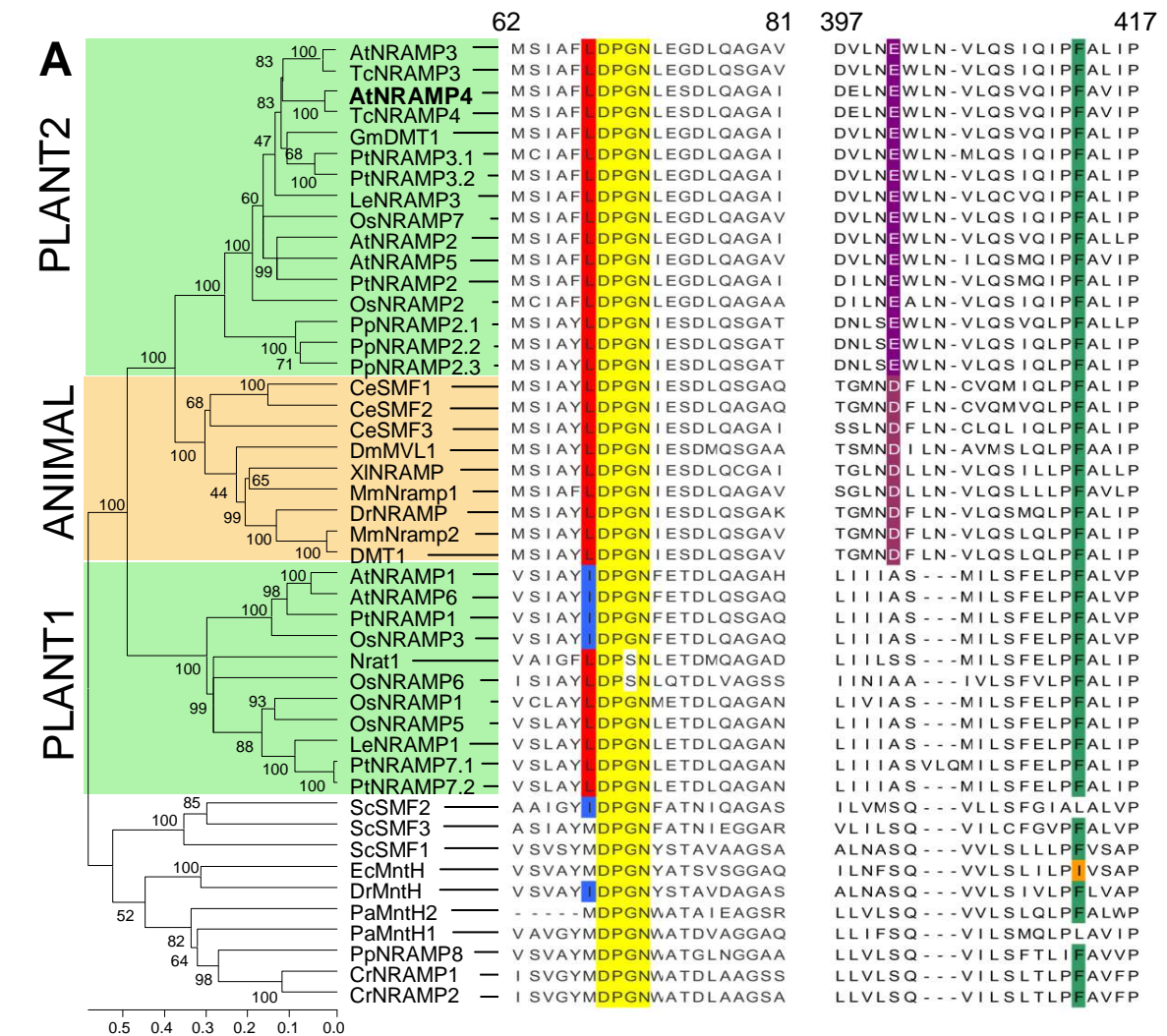
#### *Elemental content analysis*

Roots and shoots from seedlings grown *in vitro* for 2 weeks were harvested separately. The shoots were rinsed briefly in ultrapure water. The roots were desorbed for 10 min in ice cold buffer containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MES pH 5.7 and then briefly rinsed with ultrapure water. The dry weight (DW) of the samples was measured after drying at 60°C for 3 d. The dried samples were digested in 2 mL of 70 % nitric acid in a DigiBlock ED36 (LabTech, Italy) at 80°C for 1 h, 100°C for 1 h and 120°C for 2 h. After dilution in ultrapure water, the metal content of the samples was determined using an AA240FS flame spectrometer (Agilent, USA).

#### *Statistical analysis*

For current measurements in *Xenopus* oocytes, Student's t-test were performed. Asterisks represent different significance levels (\* indicates  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ). Plant growth data and element concentrations were analyzed with Kruskal-Wallis non-parametric test for multiple comparisons. When significant differences were detected ( $p < 0.01$ ), a Tukey post-hoc test was performed. Different letters indicate significant differences between samples. Both tests were performed using the R software package.





**Fig. 1.** Conservation and localization of L67, E401 and F413. **A.** Conservation of residues involved in AtNRAMP4 metal selectivity across the phylogenetic tree of NRAMP proteins. The tree was constructed using the MEGA 4 phylogenetic analysis package as described (Tamura *et al.*, 2007; Migeon *et al.*, 2010). Protein sequences of representative members of the NRAMP family were aligned using the Multalin software (Corpet, 1988). Alignments from M62 to I81 and from D397 to P417, based on AtNRAMP4 sequence, are shown. **A.** list of accession numbers and organisms is shown in Supplemental Table 3. **B.** AtNRAMP4 homology model based on MHP1 structure (2JLN). Side view from the plane of the membrane. The structural model was generated by I-TASSER (Roy *et al.*, 2010) and visualized with the PyMOL program. Yellow: the highly conserved DPGN motif; blue: TM 10; red: L67, E401, F413 and A463.

## **RESULTS**

### *Screen for mutations affecting *AtNRAMP4* selectivity*

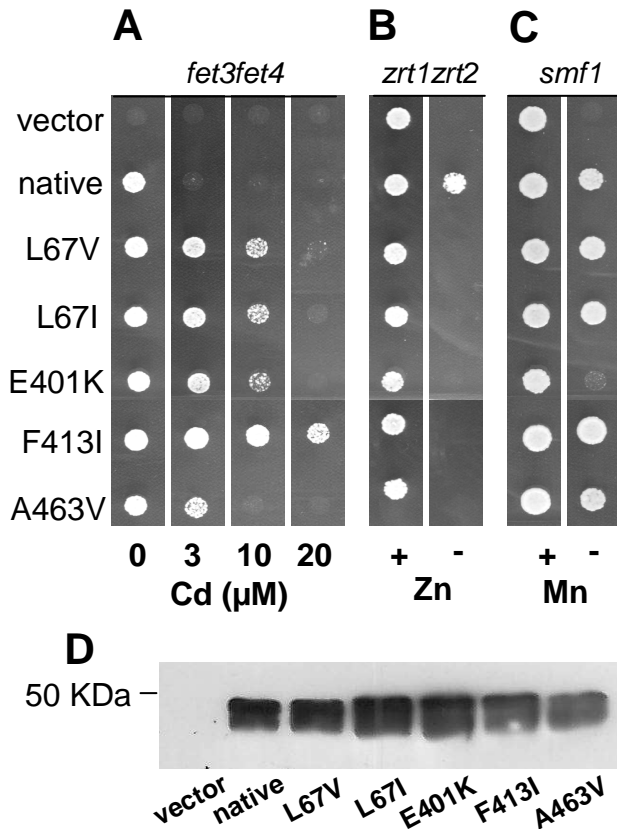
To identify residues involved in  $\text{Cd}^{2+}$  transport by *AtNRAMP4*, we performed a screen for mutations in the *AtNRAMP4* coding sequence that rescue growth of the yeast mutant *fet3fet4* impaired in  $\text{Fe}^{2+}$  uptake but suppress the hypersensitivity to  $\text{Cd}^{2+}$  induced by *AtNRAMP4* expression in yeast. *AtNRAMP4* cDNA was randomly mutagenized by error-prone PCR. Screening of about 50 000 mutants allowed the recovery of 12 independent mutant *AtNRAMP4* cDNAs that allow growth on SD medium supplemented with 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  when reintroduced in *fet3fet4* (Supplemental table 1). The screen recurrently selected mutations at four positions: L67, E401, F413 and A463.

At position 67, the screen identified L to V (once) and L to I (twice) mutations (Supplemental table 1). L67 is conserved in most plant and animal NRAMPs but not in NRAMP homologues in bacteria and fungi (**Fig. 1A, Supplemental Fig. 1**). Intriguingly, isoleucine replaces leucine at this position in a group of plant NRAMP transporters including *AtNRAMP1*, *AtNRAMP6* and *OsNRAMP3*. The position of the mutations was visualized on a 3D model of *AtNRAMP4* (**Fig. 1B**). Leucine 67 lies next to the highly conserved DPGN motif found in all functional NRAMP divalent metal transporters characterized so far (**Fig. 1**). It has been shown previously that an amino acid close to this motif, D124 in mammalian DMT1 (corresponding to D75 in *AtNRAMP4*), is involved in NRAMP selectivity (Cohen *et al.*, 2003).

The mutation E401K, converting the negatively charged glutamate into a positively charged lysine, was identified four times (**Supplemental table 1**). This glutamate is conserved among plant NRAMP transporters of group 2 (**Fig. 1A, Supplemental Fig. 1**) while in NRAMP transporters from animals it is substituted by an aspartate residue (**Fig. 1A, Supplemental Figure 1**). In contrast, no homologous motif is found in plant group 1 NRAMPs or in NRAMP homologues from bacteria and fungi. The F413I mutation was picked up twice (**Supplemental table 1**). F413 is highly conserved among plant and animal NRAMP proteins, as well as in many bacterial and fungal homologues (**Fig. 1A**). The finding of these two mutations reveals an unexpected involvement of transmembrane domain 10 (TM 10) in NRAMP metal selectivity (**Fig. 1B**).

Finally, A463V was identified twice in the screen. A463 is not conserved in NRAMPs, not even in *AtNRAMP3*, the closest homologue of *AtNRAMP4* (not shown).

### *Metal transport properties of mutant *AtNRAMP4* in yeast*

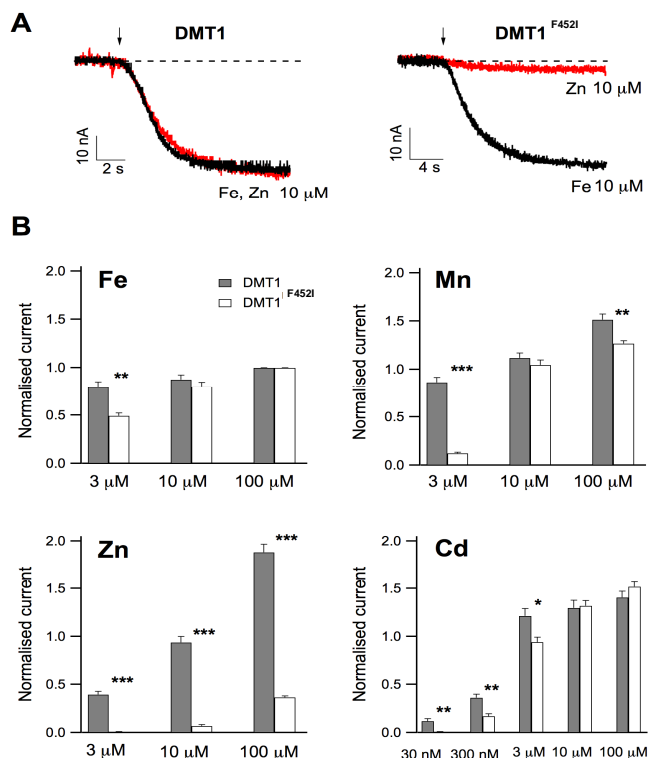


**Fig 2.** Functional characterization of AtNRAMP4 selectivity mutants in yeast. **A.** All AtNRAMP4 constructs complement *fet3fet4* growth on low iron but only strains expressing the selectivity mutants are able to grow in the presence of Cd<sup>2+</sup>. Yeast cultures were spotted at OD600 0.1 on SD-URA pH 5.5 and grown for 2 days in the absence (left column) or in the presence of 3, 10 or 20 μM CdCl<sub>2</sub>, as indicated. **B.** None of the mutants is able to rescue *zrt1zrt2* growth on low Zn<sup>2+</sup>. Yeast cultures were spotted at OD600 0.01 on SD-URA pH 6 containing 0.1 mM EDTA and supplemented with 1 mM (left column) or 80 μM ZnSO<sub>4</sub> (right column) and grown for 3 days. **C.** E401K, but not the other mutants, has lost the ability to rescue the growth of the *smf1* yeast strain on low Mn<sup>2+</sup>. Yeast cultures were spotted at OD600 0.1 on SD-URA pH 6 containing 5 mM EGTA and supplemented with 0.1 mM MnSO<sub>4</sub> (left column) or not (right column) and grown for 4 days. **D.** Western blot showing similar expression levels of native and mutated AtNRAMP4 in *fet3fet4* yeast cells. Purified anti-NRAMP4 antibodies were previously characterized (Lanquar *et al.*, 2004). Twenty micrograms of total proteins isolated from *fet3fet4* transformed with pDR195gtw-GUS or pDR195gtw-AtNRAMP4 were loaded. Anti-NRAMP4 recognized a protein close to 50 kDa in the extract from *fet3fet4* cells transformed with pDR195gtw-AtNRAMP4 but failed to recognize specific proteins in the extract from *fet3fet4* cells transformed with pDR195gtw-GUS.

**Fig 3.** Alteration of heavy metal selectivity of rat DMT1 carrying the F452I mutation.

**A.** Membrane current recordings in *Xenopus* oocytes injected with *DMT1* cRNA (left traces) or with *DMT1F452I* cRNA (right traces), in response to bath application (arrow) of 10 μM Fe<sup>2+</sup> (black traces) and 10 μM Zn<sup>2+</sup> (red traces). Control current levels are indicated by dashed lines. Holding potential at -50 mV.

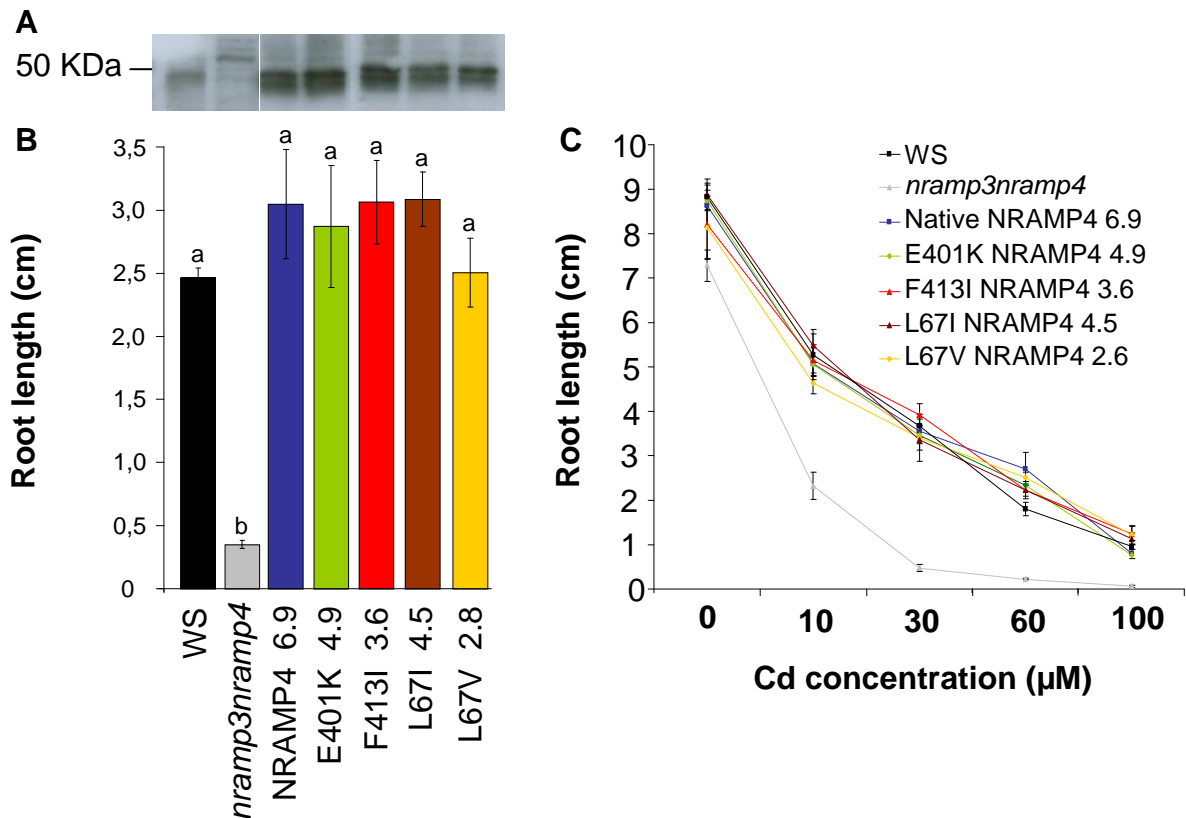
**B.-E.** Current amplitudes recorded in response to bath application of Fe<sup>2+</sup> (**B**), Mn<sup>2+</sup> (**C**), Zn<sup>2+</sup> (**D**) and Cd<sup>2+</sup> (**E**) at the indicated concentrations, in *DMT1*-expressing oocytes (grey bars) or *DMT1F413I*-expressing oocytes (white bars). For each oocyte, current amplitudes were normalized to the value recorded at 100 μM Fe<sup>2+</sup>. Data points represent mean values (± sem) of 5-8 oocytes. Asterisks indicate statistically significant differences, determined using Student's t-test (\* indicates p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001).



To further characterize the function of the *AtNRAMP4* mutants identified in the screen, we transformed yeast with *AtNRAMP4* cDNAs carrying the individual mutations L67I, L67V, E401K, F413I and A463V and tested their function. As imposed by the screen, expression of each mutant rescues the growth phenotype of the iron uptake defective yeast strain *fet3fet4* (**Fig. 2A**, first column, **Supplemental Fig. 1**). The growth of *fet3fet4* expressing native *AtNRAMP4* is completely abolished in the presence of 3  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , indicating high-affinity  $\text{Cd}^{2+}$  uptake by this transporter. In contrast, *fet3fet4* strains expressing the *AtNRAMP4* mutants still grow in the presence of 3  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  (all mutants), 10  $\mu\text{M}$  (all mutants except for A463V) or even 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  in the case of the F413I mutant (**Fig. 2A**). These different  $\text{Cd}^{2+}$  sensitivities cannot be explained by differences in expression levels, as native and mutant *AtNRAMP4* are expressed at comparable levels in yeast (**Fig. 2B**).

In addition, we tested their ability to transport  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ . In agreement with published results (Thomine *et al.*, 2000 ; Oomen *et al.*, 2009), expression of native *AtNRAMP4* rescues growth of the  $\text{Zn}^{2+}$  uptake deficient strain *zrt1zrt2* (**Fig. 2B**). In contrast, all mutations abolish the complementation of this strain indicating that they impair the ability of *AtNRAMP4* to transport  $\text{Zn}^{2+}$ . This result indicates that common residues control the transport of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . We also tested whether the selectivity mutants could transport  $\text{Mn}^{2+}$ . **Fig. 2C** shows that all the mutants, except for E401K, retain the ability to rescue the growth of the  $\text{Mn}^{2+}$  uptake deficient strain *smf1* on low  $\text{Mn}^{2+}$  as efficiently as native *AtNRAMP4*.

Residue F413 lies in a protein domain showing high conservation among plant and animal NRAMP (**Fig. 1A**). We tested whether this residue also controls NRAMP selectivity in the well-characterized NRAMP transporter DMT1 from *Rattus norvegicus* (Gunshin *et al.*, 1997). We therefore generated the F452I mutation in DMT1 (corresponding to F413I in *AtNRAMP4*) using site-directed mutagenesis. Ion currents elicited by  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  in DMT1- or DMT1<sup>F452I</sup>-expressing *Xenopus* oocytes were monitored using two-electrode voltage-clamp. When 10  $\mu\text{M}$  of  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  were superfused, oocytes expressing DMT1 exhibited large inward currents (**Fig. 3A**), as shown previously (Gunshin *et al.*, 1997). Although oocytes expressing DMT1<sup>F452I</sup> displayed a similar inward currents in response to 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ , currents were almost abolished in the presence of 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  showing that F452I affects DMT1  $\text{Zn}^{2+}$  transport. Testing a range of metal concentrations, we confirmed that current amplitudes elicited by  $\text{Zn}^{2+}$  in DMT1<sup>F452I</sup> are strongly decreased at all concentrations (**Fig. 3B**). Currents elicited by  $\text{Cd}^{2+}$  are also decreased at in the low micromolar to nanomolar



**Fig 4.** Expression of native and mutated AtNRAMP4 complements *nramp3nramp4* growth defects on low  $\text{Fe}^{2+}$  or under  $\text{Cd}^{2+}$  stress. **A.** Western blot showing similar expression levels of native and mutated AtNRAMP4 in *nramp3nramp4* double knock-out plants. Purified anti-NRAMP4 antibodies were previously characterized (Lanquar *et al.*, 2004). Twenty micrograms of total proteins extracted from *nramp3nramp4* plants transformed with pUb-DEST-AtNRAMP4 were loaded (Grefen *et al.*, 2010). Anti-NRAMP4 recognized a protein close to 50 kDa in the extract from WS wild-type plants and *nramp3nramp4* double mutant transformed by pUb-DEST-AtNRAMP4, but failed to recognize specific proteins in the extract from non-transformed *nramp3nramp4* plants.

**B.-C.** Seedlings of WS wild-type, *nramp3nramp4* and *nramp3nramp4* expressing either native AtNRAMP4 or mutated AtNRAMP4 were germinated and grown vertically on ABIS without added Fe (**B**) or ABIS supplemented with 10  $\mu\text{M}$  FeHBED and  $\text{CdCl}_2$  ranging from 0 to 100  $\mu\text{M}$  (**C**). Data points represent the mean length of the primary root after 8 days and 12 days of growth for Fe starvation (**B**) and Cd exposure (**C**), respectively. One representative line out of 3 is presented for each construct. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ,  $n < 10$ ) followed by a Tukey *post hoc* test.

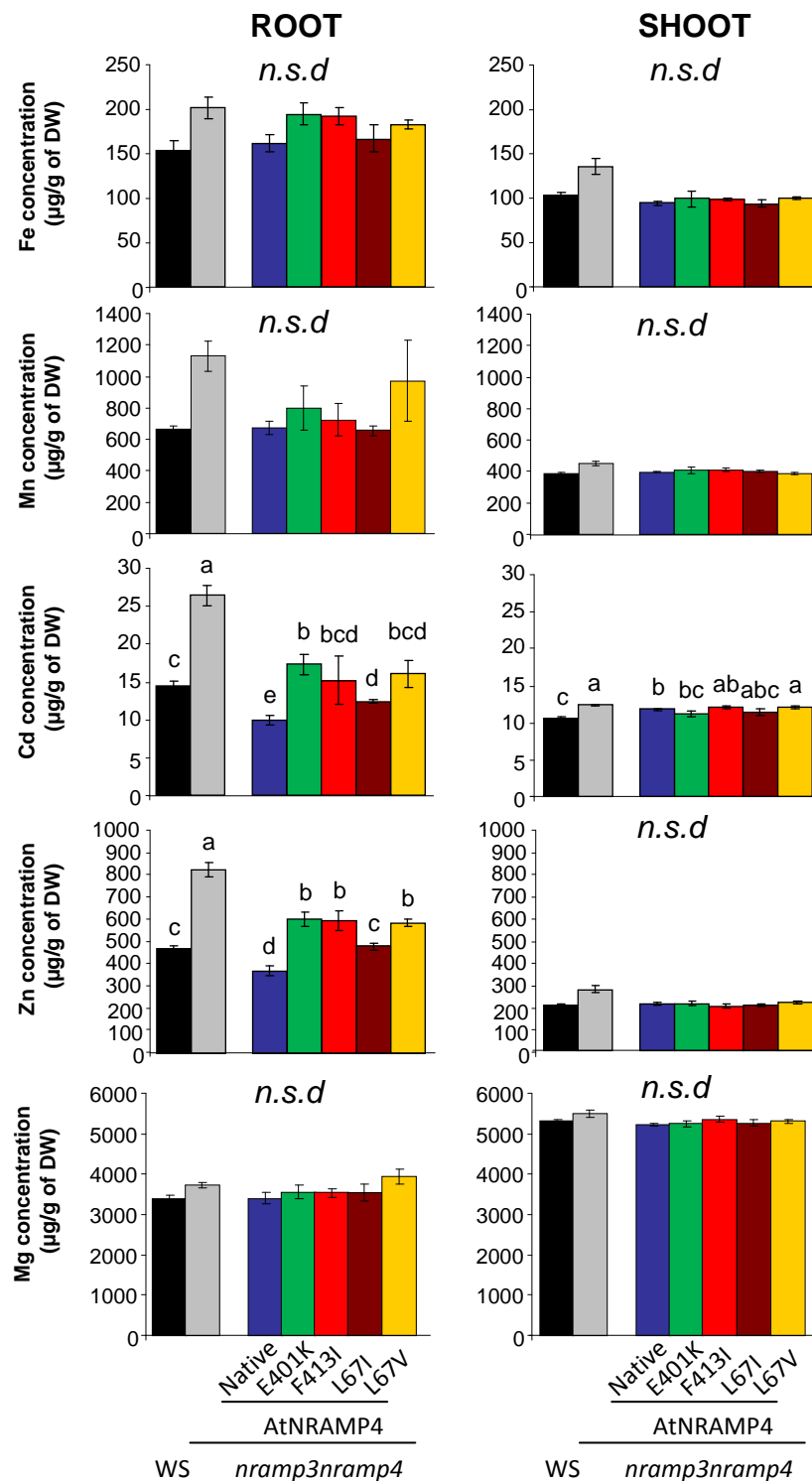
range indicating a shift towards lower affinity for this metal in DMT1<sup>F452I</sup>. Finally, currents elicited by 3  $\mu\text{M}$  Fe<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> are also lower than in DMT1 suggesting that the F452I mutation causes a non-specific detrimental effect at low metal concentrations. These data establish that at least one of the residues identified in our screen, F413, has an importance for metal selectivity which is conserved among NRAMP proteins from different kingdoms. This result highlights a new function in metal selectivity for the NRAMP C-terminal domain, which was not expected from previous studies.

*The expression of an AtNRAMP4 selectivity mutant rescues Arabidopsis nramp3nramp4 double mutant phenotypes on low iron and under cadmium stress*

To test the effect of NRAMP4 mutations in plants, we expressed AtNRAMP4, AtNRAMP4<sup>E401K</sup>, AtNRAMP4<sup>F413I</sup>, AtNRAMP4<sup>L67V</sup>, AtNRAMP4<sup>L67I</sup> and AtNRAMP4<sup>A463V</sup> in the *nramp3nramp4* background under the control of a double ubiquitin 10 promoter (Grefen *et al.*, 2010). We first checked that the selected mutations do not alter AtNRAMP4 targeting to the vacuolar membrane in plant cells using transient expression of mutated AtNRAMP4::GFP constructs in *Arabidopsis* protoplasts (**Supplemental Fig. 2**). At least three independent stably transformed homozygous lines carrying T-DNA insertions at a single locus were obtained and AtNRAMP4 protein levels were monitored by immunoblot. One line expressing similar levels of native or mutant versions of AtNRAMP4 was selected for further analysis (**Fig. 4A**). The only exception was the AtNRAMP4<sup>A463V</sup> mutant, since none of the lines transformed with the AtNRAMP4<sup>A463V</sup> construct expressed the protein at a detectable level. Expression of either native or mutant AtNRAMP4 complements the growth defect of *nramp3nramp4* mutant under iron deficiency or Cd<sup>2+</sup> stress (**Fig. 4B** and **4C**). Additional experiments on plants expressing AtNRAMP4 and AtNRAMP4<sup>E401K</sup> under control of the strong CaMV 35S promoter confirmed the ability of both proteins to complement the *nramp3nramp4* phenotypes (**Supplemental Fig. 3** and **4**). In these experiments, the lines over-expressing AtNRAMP4<sup>E401K</sup> even grow slightly better than the wild-type.

*Ectopic over-expression of native and mutant AtNRAMP4 selectively modulates metal accumulation in roots*

To test the impact of the selectivity mutations on metal accumulation in plants, we measured metal concentrations in roots and shoots of wild-type, *nramp3nramp4* and *nramp3nramp4* over-expressing either native or mutant AtNRAMP4 were grown in the



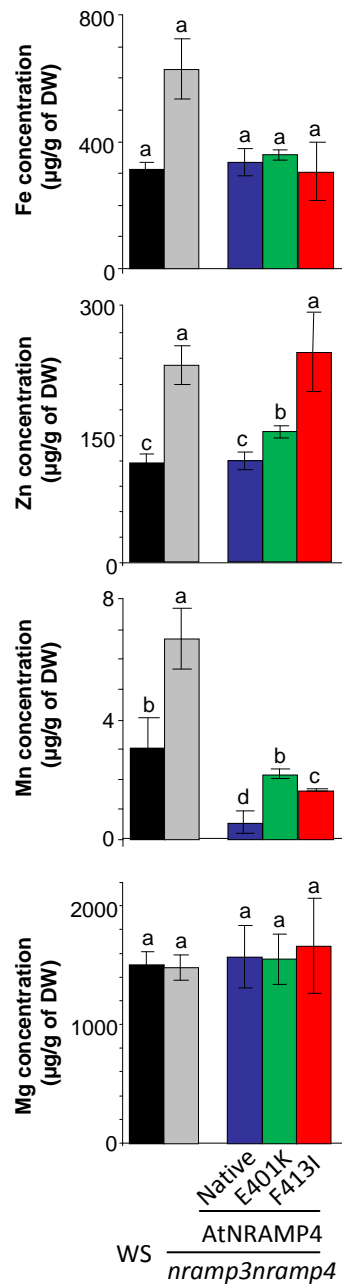
**Fig 5.** Expression of mutated AtNRAMP4 selectively modifies root  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations in *Arabidopsis thaliana*.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations in roots and shoots of WS wild-type, *nramp3nramp4* and *nramp3nramp4* expressing either native AtNRAMP4 or mutated AtNRAMP4 are shown. Seedlings were germinated and grown vertically on ABIS supplemented with 500 nM  $\text{CdCl}_2$  for 14 days. One representative line out of 3 is presented for each construct. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) followed by a Tukey *post hoc* test; *n.s.d.* indicates no significant difference.

presence of 500 nM  $\text{Cd}^{2+}$  (**Fig. 5**). Under these conditions, the *nramp3nramp4* mutant tends to accumulate higher levels of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  than wild-type in roots and shoots, likely due to decreased release of each of these metals from root vacuoles. Strikingly, compared to wild-type, over-expression of native *AtNRAMP4* leads to a significant decrease of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations in roots of more than 30% and 20%, respectively (**Fig. 5**). Moreover, when *AtNRAMP4* expression is driven by the CaMV 35S promoter, the decrease in root metal concentrations are even stronger, reaching 40-50% for  $\text{Cd}^{2+}$  and 60-70% for  $\text{Zn}^{2+}$ , and also affects  $\text{Mn}^{2+}$  (**Supplemental Fig. 5**). In contrast, ectopic *AtNRAMP4* expression has almost no effect on shoot metal concentrations (**Fig. 5** and **Supplemental Fig. 5**). These results are consistent with a function in  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  efflux from root cell vacuoles.

Mutations in *AtNRAMP4* mitigate the effect of *AtNRAMP4* over-expression on  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  levels in roots. Indeed, root  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations are increased by about 40% in *AtNRAMP4*<sup>E401K</sup>, *AtNRAMP4*<sup>F413I</sup> and *AtNRAMP4*<sup>L67V</sup>, and by about 20% in *AtNRAMP4*<sup>L67I</sup> compared to plant expressing native *AtNRAMP4* under control of the UBI10 promoter (**Fig. 5**). Similar results are obtained in three independent lines expressing *AtNRAMP4*<sup>E401K</sup> under the control of the CaMV 35S promoter (**Supplemental Fig. 4** and **5**).

However, the conditions used for this experiment do not reveal any variation in  $\text{Mn}^{2+}$  concentration. We hypothesized that this could be due to the high  $\text{Mn}^{2+}$  concentration provided in the *Arabidopsis in vitro* growth medium. We thus performed further experiments in which plants were grown on sand without  $\text{Mn}^{2+}$  supply (**Fig. 6**). Under these conditions plants do not display symptoms of manganese deficiency (not shown). The data obtained in this independent experimental set-up corroborate results obtained with seedlings grown *in vitro*: root  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations are higher in plants expressing *AtNRAMP4*<sup>E401K</sup> and *AtNRAMP4*<sup>F413I</sup> compared to those expressing native *AtNRAMP4* (**Fig. 6**). Moreover, under limited  $\text{Mn}^{2+}$  supply, ectopic expression of native *AtNRAMP4* leads to a strong decrease in root  $\text{Mn}^{2+}$  concentration. In agreement with the results obtained in yeast, the decrease in root  $\text{Mn}^{2+}$  concentration is strongly attenuated in plants expressing *AtNRAMP4*<sup>E401K</sup> (**Fig. 6**). Even though *AtNRAMP4*<sup>F413I</sup> fully complements yeast *smf1* growth on low  $\text{Mn}^{2+}$ , it has an intermediate effect on root  $\text{Mn}^{2+}$  concentration. It is however noteworthy that mutation of the corresponding Phe (F452) in DMT1 affects  $\text{Mn}^{2+}$  dependent currents at low concentrations (**Fig. 3B**).





**Fig 6.** Low manganese conditions highlight the effect of AtNRAMP4 mutations on root  $Mn^{2+}$  concentration.  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  concentrations in roots of WS wild-type, *nramp3nramp4* and *nramp3nramp4* expressing either native AtNRAMP4, AtNRAMP4<sup>E401K</sup> or AtNRAMP4<sup>F413I</sup> are shown. Plants were germinated and grown on sand/perlite (1/1) substrate, watered with modified Hoagland solution without  $Mn^{2+}$  during the complete life cycle. One representative line out of 3 is presented for each construct. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.01$ ,  $n = 3-4$ ) followed by a Tukey *post hoc* test; *n.s.d.* indicates no significant difference.

## **DISCUSSION**

### *Random mutagenesis identifies novel residues involved in NRAMP metal selectivity*

In this work, we have identified AtNRAMP4 selectivity mutants in which Fe<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> transport functions are uncoupled. Screening randomly mutagenized AtNRAMP4 cDNAs expressed in yeast recurrently identified mutations affecting 4 residues. Two of the residues (E401 and F413) lie in TM 10 (**Fig. 1B**), a domain that was previously not suspected to participate in NRAMP metal transporter selectivity. The fact that the same positions were recurrently identified in the screen of about 50 000 independent mutant cDNAs containing 1 to 6 mutations suggests that the screen was saturated. However, it cannot be excluded that further important residues were missed because the required transition involves more than one DNA base change in the same codon. Such mutants would be identified at a much lower frequency (about 10<sup>-6</sup>). All selected mutations abolished the complementation of the *zrt1zrt2* yeast mutant by AtNRAMP4. The mutations thus strongly impair the ability of AtNRAMP4 to transport Zn<sup>2+</sup> (**Fig. 2**). Overall, these results indicate that Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport of by AtNRAMP4 involves the same selectivity determinants. This is in agreement with the highly similar atomic *radii* and electron configurations of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. In contrast, only one mutation out of five strongly affected Mn<sup>2+</sup> transport (**Fig. 2**), suggesting few common selectivity determinants for Cd<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, which have similar radii but distinct electron configurations. The clear impact on Cd<sup>2+</sup> accumulation in plant roots of E401K, F413I, L67I and L67V mutations points to the importance of these residues for Cd<sup>2+</sup> transport *in planta* (**Fig. 5** and **Supplemental Fig. 6**).

### *The importance of residue F413 in AtNRAMP4 metal selectivity is conserved across plant and animal kingdoms*

Our yeast screen identified F413I as a mutation affecting the ability of AtNRAMP4 to transport Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> while retaining Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> transport (**Fig. 2**). Interestingly, the motif containing F413 is highly conserved among plant and animal NRAMP homologues, which lead us to the hypothesis that this residue could also control selectivity in NRAMPs from others kingdoms. In fact, two-electrode voltage-clamp experiments in *Xenopus* oocytes showed that the corresponding mutation (F452I) altered metal selectivity in DMT1 (**Fig. 3**). Moreover, this approach provided quantitative information on the DMT1 transport activity at different metal concentrations. Whereas F452I virtually abolishes Zn<sup>2+</sup> transport at all concentrations tested, the mutation affects Cd<sup>2+</sup> transport activity only at low cadmium

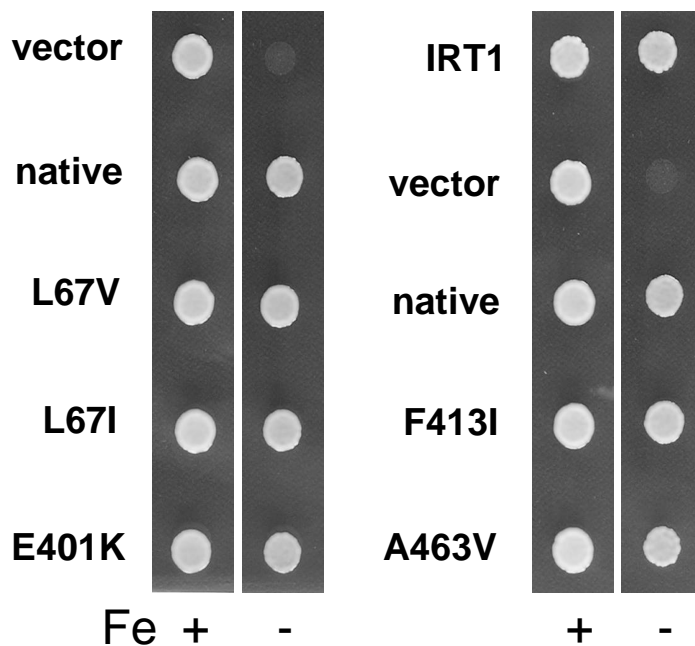
**SI Table 1:** non-silent mutations in vectors recovered from the screen

Clone #	changes in protein sequence
3	<b>L67V</b> , V130M, D393V
4	<b>E401K</b>
6	<b>E401K</b>
9	A80V, F178V, V369A, <b>A463V</b>
10	L103I, <b>E401K</b>
11	<b>E401K</b>
13	<b>L67I</b> , K263N, A414S
14	<b>L67I</b> , A138V
15	Q77L*, S158T, T294I, K364R
16	E217K, F266L, <b>F413I</b>
18	<b>F413I</b>
19	E117G, <b>A463V</b>

Screening of about 50,000 mutated cDNAs lead to the isolation of 26 colonies. Plasmids could be recovered from 19 colonies. Upon retransformation and secondary screening, 12 plasmids were shown to enhance tolerance to Cd with respect to yeast expressing native AtNRAMP4. Mutations found in several clones are marked in bold characters. \*the equivalent mutation in MmNRAMP2 was investigated previously.

**SI Table 2:** primers

primer name	sequence (5'-3')
pDR195F	TTTCTATCAACCTCGTTGATAAATTT
pDR195R	CAACGATTTGACCCTTTTCCA
pro35S	CACTATCCTTCGCAAGACCC
NR4-4R	CATCCCTCTGTGGTTCTTTATGTG



**SI Fig. 1.** Complementation of *fet3fet4* by AtNRAMP4 selectivity mutants. Yeast liquid cultures were spotted at OD600 0.1 on synthetic dextrose -URA buffered by 50 mM MES, pH 6 agar plates with 80  $\mu$ M BPS and 30  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> (-Fe) or 200  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> (+Fe) and grown for 2 days.

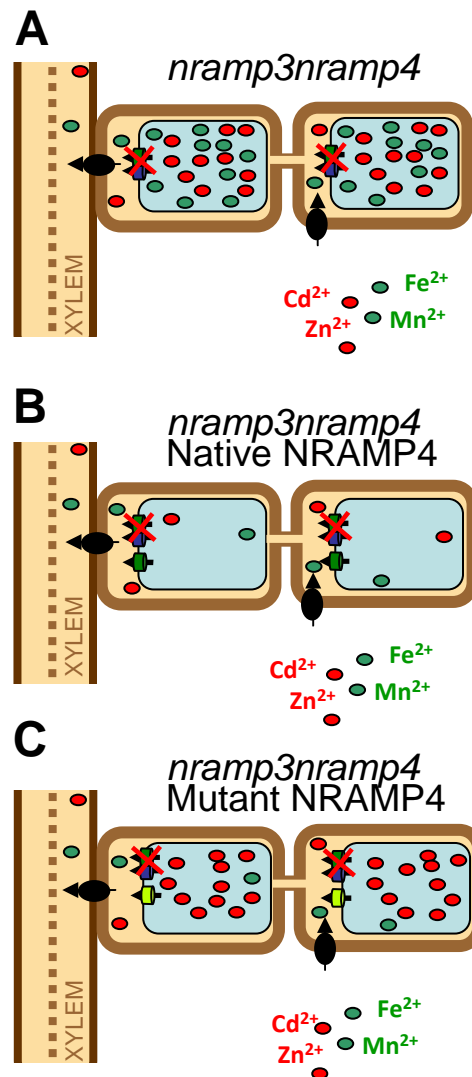
concentration suggesting that this mutation decreases the affinity of the transporter for  $\text{Cd}^{2+}$ . Unfortunately, we have been unable to functionally express *AtNRAMP4* in *Xenopus* oocytes, in order to directly compare the effect of the mutation in this system. In any case, our results indicate that the role of Phe413 is conserved among NRAMP transporters from distant eukaryotic species.

#### *E401K and F413I identify a novel domain involved in NRAMP selectivity*

Whereas L67 lies in a domain previously recognized as important for NRAMP metal transport (Cohen *et al.*, 2003 ; Courville *et al.*, 2008), E401 and F413 define a novel conserved domain involved in the control of metal selectivity in NRAMP proteins. To obtain insights in the molecular mechanism by which these residues could affect selectivity, we used a structural homology model based on MHP1, a prokaryotic member of the nucleobase cation symport 1 family (Roy *et al.*, 2010 ; Shimamura *et al.*, 2010). The bacterial NRAMP homologue MntH has previously been modeled on the basis of the LeuT structure, which shares the same fold with MHP1 (Courville *et al.*, 2008 ; Shimamura *et al.*, 2010). The models of both MntH and *AtNRAMP4* place the highly conserved DPGN motif in transmembrane domain 1 (TM1) at the core of the transporter along the putative cation permeation pathway (**Fig. 1B**). Leucine 67 in *AtNRAMP4* is adjacent to DPGN (**Fig. 1A**). Glutamate 401 and phenylalanine 413 both lie in TM10 with E401 facing the external side where metal substrate binding occurs whereas F413 is closer to the intracellular side. Interestingly, in the transport mechanism proposed for MHP1 (Shimamura *et al.*, 2010), TM10 plays a role in the conformational changes defining the transport cycle.

#### *AtNRAMP4 controls $\text{Zn}^{2+}$ and $\text{Cd}^{2+}$ accumulation in roots*

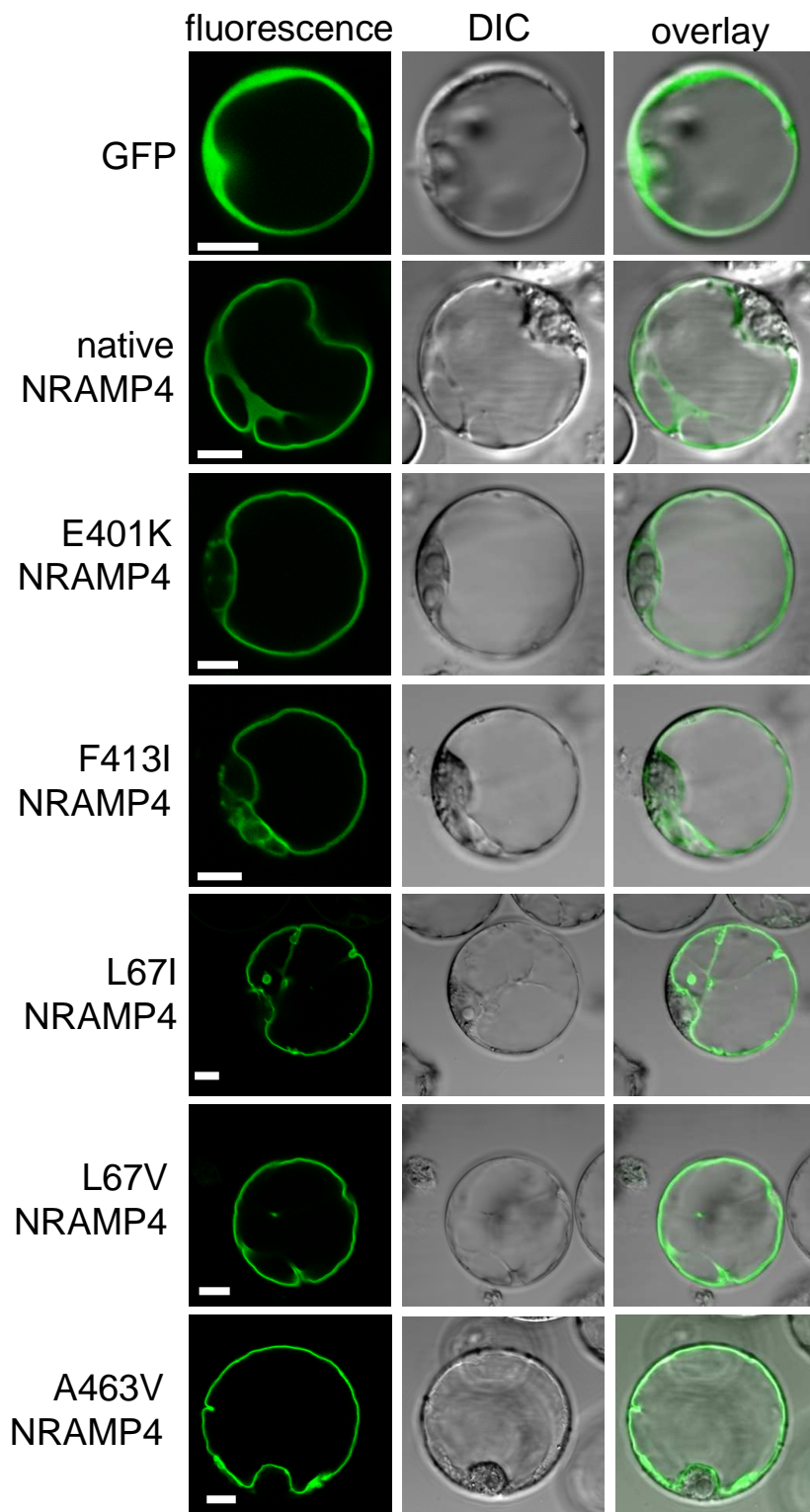
*AtNRAMP4* over-expression complemented *nramp3nramp4* defects on low iron, in agreement with previous studies (Lanquar *et al.*, 2005), as well as under  $\text{Cd}^{2+}$  stress. Except for *AtNRAMP4*<sup>A463V</sup>, for which no expression was observed, all *AtNRAMP4* mutants also complemented both defects on low iron and under  $\text{Cd}^{2+}$  exposure (**Fig. 2**). At first sight, it is surprising that mutant versions of *AtNRAMP4* are able to rescue *nramp3nramp4* hypersensitivity to  $\text{Cd}^{2+}$ , even though their ability to transport  $\text{Cd}^{2+}$  is affected. Several lines of evidence have already indicated that the link between *nramp3nramp4* ablation and  $\text{Cd}^{2+}$  hypersensitivity is indirect, i.e. that it originates from the inability to mobilize essential metals



**Fig 7.** Schematic representation of the effects of modulating AtNRAMP4 expression and selectivity on metal concentrations in roots of *nramp3nramp4* plants. **A.** The disruption of *NRAMP3* and *NRAMP4* restricts Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> mobilization from the root vacuole leading to high metal accumulation in roots. **B.** Over-expression of native AtNRAMP4 restores metal mobilization from vacuoles leading to a decrease of the root metal content at least to wild-type levels (Figures 5, 6 and supplemental figure 5). **C.** mutated AtNRAMP4 impaired in Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> transport can only mobilize Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> (except for AtNRAMP4E401K) leading only to the restoration of Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> concentration levels but elevated Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> concentrations compared to native AtNRAMP4.

from the vacuole rather than from a defect in Cd<sup>2+</sup> transport itself (Oomen *et al.*, 2009 ; Molins *et al.*, 2013).

We examined metal accumulation under low Cd<sup>2+</sup> exposure. In agreement with previous work, the *nramp3nramp4* mutant tended to accumulate more iron, manganese and zinc than wild-type plants (Lanquar *et al.*, 2005 ; Lanquar *et al.*, 2010 ; Molins *et al.*, 2013 ; **Fig 7**). This accumulation likely results from increased sequestration in root cell vacuoles, when metal cannot be retrieved by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 (**Fig. 7**). In this background, over-expression of AtNRAMP4 merely restored wild-type metal concentration in shoots, but led to a decrease of Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> accumulation in roots (**Fig. 5, Fig. 6, Supplemental Fig. 5**). Redundancy with ZIP1, which has recently been implicated in Mn efflux from root vacuoles, likely masks the effect of AtNRAMP4 overexpression on root Mn<sup>2+</sup> levels in the experiments performed *in vitro*. In metal-excluding plants such as *Arabidopsis thaliana*, the roots are believed to act as a buffer allowing the storage or sequestration of metals and preventing excessive accumulation in shoots. In rice and in *Arabidopsis thaliana*, the root-expressed vacuolar metal pumping ATPase HMA3 has a well-documented role in limiting Cd<sup>2+</sup> concentration in aerial parts by sequestering this metal in root cells (Morel *et al.*, 2009 ; Ueno *et al.*, 2010 ; Miyadate *et al.*, 2011 ; Chao *et al.*, 2012). Over-expression of AtNRAMP4 limits the build-up of high Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> concentrations in roots by favoring efflux of these metals from root vacuoles (**Fig. 7**). In contrast, AtNRAMP4 expression level may not be the factor limiting vacuolar Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> efflux in shoots. In Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> hyperaccumulating plants such as *Arabidopsis halleri* and *Nocca caerulescens*, Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> accumulation in roots is strongly decreased and the root/shoot metal accumulation ratio is very low (Krämer, 2010). Interestingly, both *A. halleri* and *N. caerulescens* express NRAMP3, a functional homologue of AtNRAMP4, at high levels in roots (Weber *et al.*, 2004 ; Oomen *et al.*, 2009). It is tempting to speculate that, together with HMA4 and NAS2, which mediate efficient translocation to shoots, high NRAMP3 expression in metal hyperaccumulator roots contributes to their low root/shoot accumulation ratio (Hanikenne *et al.*, 2008 ; Deinlein *et al.*, 2012). Expression of AtNRAMP4 mutants in the *nramp3nramp4* background did not cause a pronounced decrease of Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> accumulation in roots as observed with native AtNRAMP4 (**Fig. 5, Fig. 6, Supplemental Fig. 5**). This is in agreement with the characterization in yeast showing that these mutations impair Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport function in AtNRAMP4. Hence, the mutations that we have identified selectively alter AtNRAMP4-mediated metal efflux from root vacuoles *in planta* (**Fig.7**).



**SI Fig. 2.** Intracellular targeting of AtNRAMP4<sup>E401K</sup>, AtNRAMP4<sup>F413I</sup>, AtNRAMP4<sup>L67I</sup>, AtNRAMP4<sup>L67V</sup> and AtNRAMP4<sup>A463V</sup>. Free GFP, native and mutated AtNRAMP4-GFP (as indicated) cloned in the CD3-327 plasmid were transiently expressed in protoplasts isolated from an Arabidopsis cell culture using PEG mediated transformation and protoplasts were imaged by confocal microscopy after 2 days as described previously (Thomine *et al.*, 2003, Lanquar *et al.*, 2005). Scale bar = 10  $\mu$ m.

Moreover, 3 out of the 4 residues identified in the screen are conserved among NRAMP transporters (**Fig. 1A**). We provide evidence that the involvement of F413 in metal selectivity is conserved in the mammalian transporter DMT1. This knowledge may thus be applicable to prevent Cd<sup>2+</sup> transport by other NRAMP transporters from animals or plants. A prime target for such a modification would be OsNRAMP5, which is the major pathway for Cd<sup>2+</sup> uptake in rice, but also plays an essential role in Mn<sup>2+</sup> nutrition in this species (Ishikawa *et al.*, 2012 ; Ishimaru *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012).

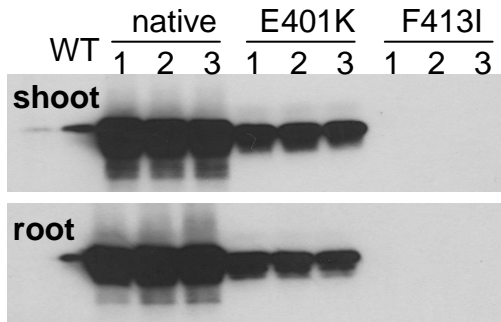
### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Cindy Victor and Sara Martins for western blots and contribution to plant selection, respectively. The authors also thank A. Agorio and S. Merlot for critical reading of the manuscript. This work was supported by ANR-07-BLAN-0110 and ANR-2011-BSV6-00401 grants to S. T., a postdoctoral fellowship from EU contract HPRN-CT-2002-00243 to R.O. and a grant from Région Ile-de-France to M.P. This work has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus ([www.imagif.cnrs.fr](http://www.imagif.cnrs.fr)) which is supported by the Conseil Général de l'Essonne.

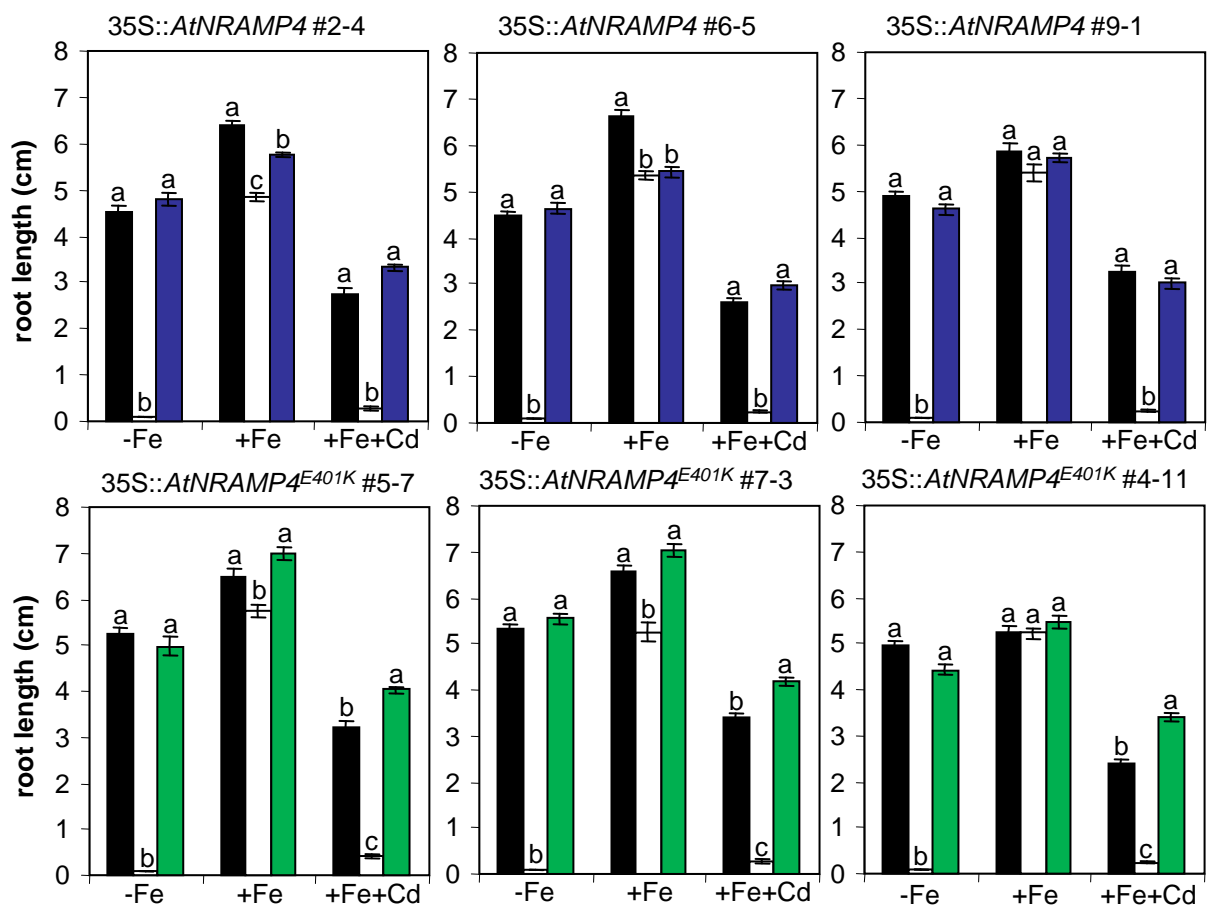
### **REFERENCES**

- Antala, S. and Dempsey, R.E.** (2012) The human ZIP4 transporter has two distinct binding affinities and mediates transport of multiple transition metals. *Biochemistry*, **51**, 963-973.
- Arguello, J.M., Eren, E. and Gonzalez-Guerrero, M.** (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals*, **20**, 233-248.
- Beaumont, C., Delaunay, J., Hetet, G., Grandchamp, B., de Montalembert, M. and Tchernia, G.** (2006) Two new human DMT1 gene mutations in a patient with microcytic anemia, low ferritinemia, and liver iron overload. *Blood*, **107**, 4168-4170.
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.-F., Mari, S. and Curie, C.** (2009) The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal* **422**, 217-228.
- Chao, D.Y., Silva, A., Baxter, I., Huang, Y.S., Nordborg, M., Danku, J., Lahner, B., Yakubova, E. and Salt, D.E.** (2012) Genome-wide association studies identify heavy metal ATPase3 as the primary determinant of natural variation in leaf cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetic*, **8**, e1002923.
- Clemens, S., Aarts, M.G., Thomine, S. and Verbruggen, N.** (2012) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Science*.
- Cohen, A., Nevo, Y. and Nelson, N.** (2003) The first external loop of the metal ion transporter DCT1 is involved in metal ion binding and specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 10694-10699.
- Corpet, F.** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, **16**, 10881-10890.



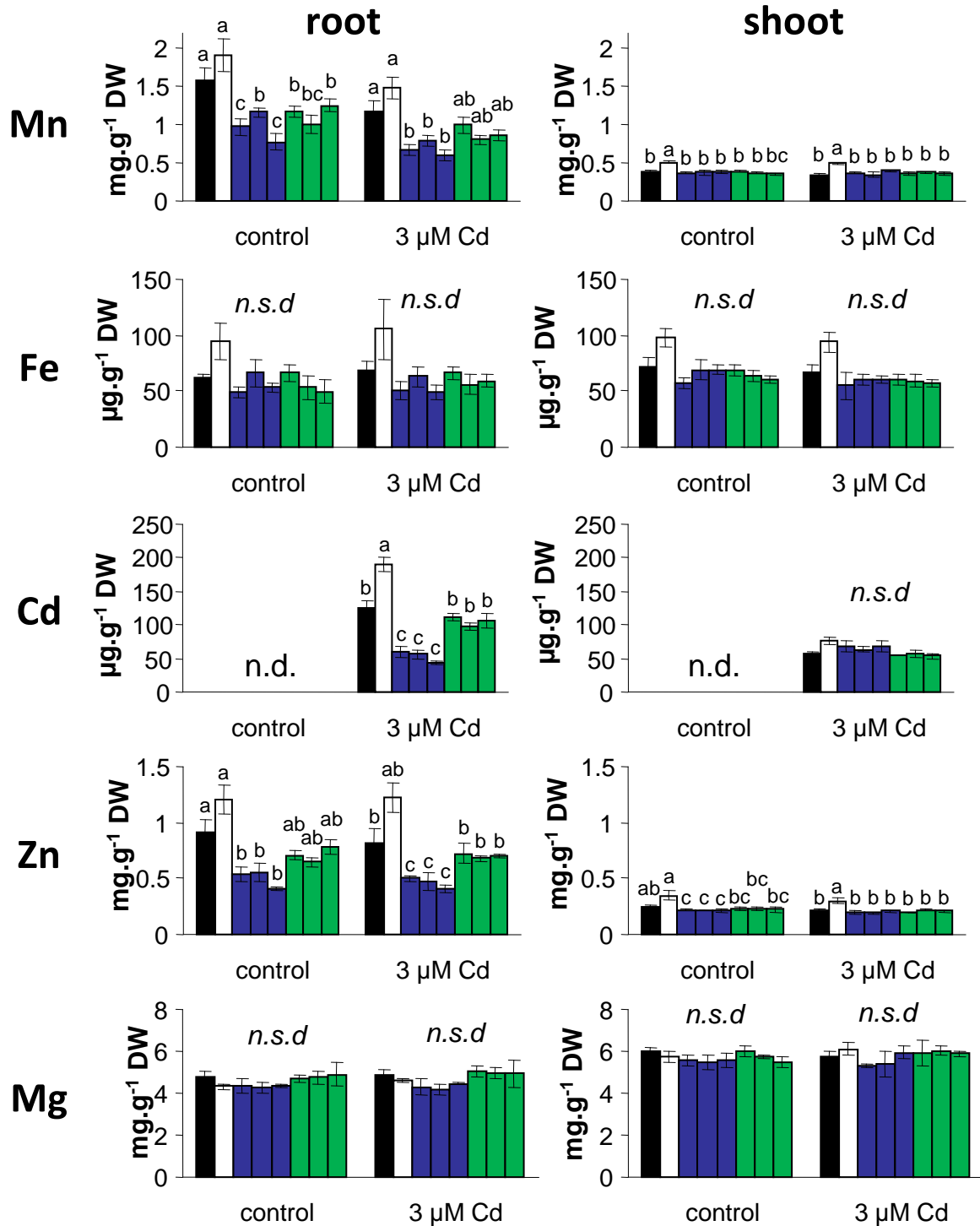


**SI Fig 3.** AtNRAMP4 protein levels in *Arabidopsis thaliana* WS wild type, *nramp3nramp4* and *nramp3nramp4* transformed lines expressing native AtNRAMP4, AtNRAMP4E401K or AtNRAMP4F413I under 35S promoter. Twenty micrograms of total proteins from shoots (top panel) or roots (lower panel) were separated by SDS PAGE (10% acrylamide) and immunoblot analysis was performed as described previously using AtNRAMP4 antiserum at a 1/2000 dilution (Lanquar *et al.*, 2004; Lanquar *et al.*, 2005).



**SI Fig 4.** Expression of AtNRAMP4E401K under 35S promoter complements *nramp3nramp4* growth defects on low Fe or under Cd stress. Seedlings of wild type WS (black columns), *nramp3nramp4* (white columns) and *nramp3nramp4* expressing either native AtNRAMP4 (blue columns, A) or AtNRAMP4<sup>E401K</sup> (green columns, B) were germinated and grown vertically side by side on ABIS without added Fe (-Fe) or control ABIS (+Fe) or ABIS supplemented with 30  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> (+Fe+Cd). Bars represent the mean length of the primary root after 12 days. Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ,  $n = 20$ ) followed by a Tukey post hoc test.

- Courville, P., Urbankova, E., Rensing, C., Chaloupka, R., Quick, M. and Cellier, M.F.** (2008) Solute carrier 11 cation symport requires distinct residues in transmembrane helices 1 and 6. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 9651-9658.
- Deinlein, U., Weber, M., Schmidt, H., Rensch, S., Trampczynska, A., Hansen, T.H., Husted, S., Schjoerring, J.K., Talke, I.N., Kramer, U. and Clemens, S.** (2012) Elevated nicotianamine levels in *Arabidopsis halleri* roots play a key role in zinc hyperaccumulation. *Plant Cell*, **24**, 708-723.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M.L.** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 5624-5628.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K. and Blatt, M.R.** (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal*, **64**, 355-365.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L. and Hediger, M.A.** (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**, 482-488.
- Haemig, H.A. and Brooker, R.J.** (2004) Importance of conserved acidic residues in mntH, the Nramp homolog of *Escherichia coli*. *The Journal of Membrane Biology*, **201**, 97-107.
- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D. and Kramer, U.** (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, **453**, 391-395.
- Illing, A.C., Shawki, A., Cunningham, C.L. and Mackenzie, B.** (2012) Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 30485-30496.
- Ishikawa, S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arao, T., Nishizawa, N.K. and Nakanishi, H.** (2012) Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T., Sugimoto, K., Ono, K., Yano, M., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K.** (2012) Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport. *Scientific Reports*, **2**, 286.
- Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Guerinot, M.L. and Pakrasi, H.B.** (1999) The *IRT1* protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology*, **40**, 37-44.
- Krämer, U.** (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 517-534.
- Lam-Yuk-Tseung, S., Govoni, G., Forbes, J. and Gros, P.** (2003) Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6. *Blood*, **101**, 3699-3707.
- Lam-Yuk-Tseung, S., Camaschella, C., Iolascon, A. and Gros, P.** (2006) A novel R416C mutation in human DMT1 (SLC11A2) displays pleiotropic effects on function and causes microcytic anemia and hepatic iron overload. *Blood Cells Molecules and Diseases*, **36**, 347-354.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S.** (2004) Regulation and Function of AtNRAMP4 Metal Transporter Protein. *Soil science and plant nutrition*, **50**, 1141-1150.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S.** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO Journal*, **24**, 4041-4051.
- Lanquar, V., Ramos, M.S., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Kramer, U. and Thomine, S.** (2010) Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency. *Plant Physiology*, **152**, 1986-1999.
- Lin, H., Kumanovics, A., Nelson, J.M., Warner, D.E., Ward, D.M. and Kaplan, J.** (2008) A single amino acid change in the yeast vacuolar metal transporters ZRC1 and COT1 alters their substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 33865-33873.
- Liu, X.F., Supek, F., Nelson, N. and Culotta, V.C.** (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 11763-11769.



**SI Fig. 5.** Expression of AtNRAMP4<sup>E401K</sup> under 35S promoter selectively modifies root Cd, Zn and Mn concentration in *Arabidopsis thaliana*. Mn, Fe, Cd, Zn and Mg concentrations in roots or shoots (as indicated) of wild type WS (black columns), *nramp3nramp4* (white columns) and *nramp3nramp4* expressing either native AtNRAMP4 (blue columns) or AtNRAMP4<sup>E401K</sup> (green columns). Seedlings were germinated and grown vertically on control ABIS with 30μM of FeHBED (left) or ABIS with 30 μM of FeHBED supplemented with 3 μM CdCl<sub>2</sub> (right) for 12 days (n.d. not detectable). Different letters indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ,  $n = 3-4$ ) followed by a Tukey post hoc test, whereas *n.s.d.* indicates no significant difference.

- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M.M., Richaud, P., Thomine, S. and Chalot, M. (2010) Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 3763-3784.
- Miyadate, H., Adachi, S., Hiraizumi, A., Tezuka, K., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Katou, K., Kodama, I., Sakurai, K., Takahashi, H., Satoh-Nagasawa, N., Watanabe, A., Fujimura, T. and Akagi, H. (2011) OsHMA3, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytologist*, **189**, 190-199.
- Molins, H., Michelet, L., Lanquar, V., Agorio, A., Giraudat, J., Roach, T., Krieger-Liszkay, A. and Thomine, S. (2013) Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplasts as a target for cadmium hypersensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 804-817.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D. and Chalot, M. (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*, **8**, 107.
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A. and Richaud, P. (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **149**, 894-904.
- Nevo, Y. and Nelson, N. (2004) The mutation F227I increases the coupling of metal ion transport in DCT1. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 53056-53061.
- Oomen, R.J.F.J., Wu, J., Lelièvre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H., Aarts, M.G.M. and Thomine, S. (2009) Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, **181**, 637-650.
- Park, J.D., Cherrington, N.J. and Klaassen, C.D. (2002) Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicological Sciences*, **68**, 288-294.
- Podar, D., Scherer, J., Noordally, Z., Herzyk, P., Nies, D. and Sanders, D. (2012) Metal Selectivity Determinants in a Family of Transition Metal Transporters. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 3185-3196.
- Ramesh, S.A., Shin, R., Eide, D.J. and Schachtman, D.P. (2003) Differential Metal Selectivity and Gene Expression of Two Zinc Transporters from Rice. *Plant Physiology*, **133**, 126-134.
- Rogers, E.E., Eide, D.J. and Guerinot, M.L. (2000) Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 12356-12360.
- Roux, B., Bernèche, S., Egwolf, B., Lev, B., Noskov, S.Y., Rowley, C.N. and Yu, H. (2011) Ion selectivity in channels and transporters. *The Journal of general physiology*, **137**, 415-426.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction *Nature Protocols*, **5**, 725 - 738.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K. and Ma, J.F. (2012) Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell*, **24**, 2155-2167.
- Shimamura, T., Weyand, S., Beckstein, O., Rutherford, N.G., Hadden, J.M., Sharples, D., Sansom, M.S., Iwata, S., Henderson, P.J. and Cameron, A.D. (2010) Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *Science*, **328**, 470-473.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. and Nelson, N. (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 5105-5110.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. and Schroeder, J.I. (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* **97**, 4991-4996
- Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I. and Barbier-Brygoo, H. (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal*, **34**, 685-695.

**SI Table 3:** accession numbers of protein sequences used in **Fig. 1A**.

Name	accession #	Organism
AtNRAMP4	Q9FN18	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtNRAMP3	Q9SNV9	<i>Arabidopsis thaliana</i>
GmDMT1	NP_001236727	<i>Glycine max</i>
LeNRAMP3	NP_001233770	<i>Lycopersicon esculentum</i>
PtNRAMP3.1	XP_002332229.1	<i>Populus trichocarpa</i>
PtNRAMP3.2	XP_002332228.1	<i>Populus trichocarpa</i>
AtNRAMP2	Q9C6B2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
PtNRAMP2	XP_002302424.1	<i>Populus trichocarpa</i>
AtNRAMP5	Q9SN36	<i>Arabidopsis thaliana</i>
OsNRAMP2	Q10Q65	<i>Oryza sativa</i>
OsNRAMP7	NP_001067135.1	<i>Oryza sativa</i>
PpNRAMP2.1	XP_001751446.1	<i>Physcomitrella patens</i>
PpNRAMP2.2	XP_001771598.1	<i>Physcomitrella patens</i>
PpNRAMP2.3	XP_001751755.1	<i>Physcomitrella patens</i>
MmNramp1	NP_038640	<i>Mus musculus</i>
XINRAMP	NP_001088008	<i>Xenopus laevis</i>
MmNramp2	NP_001139633	<i>Mus musculus</i>
DMT1	O54902	<i>Rattus norvegicus</i>
DrNRAMP	NP_001035460.1	<i>Danio rerio</i>
DmMVL1	AAA82593	<i>Drosophila melanogaster</i>
CeSMF1	NP_001024792.2	<i>Caenorbitis elegans</i>
CeSMF2	NP_509131.2	<i>Caenorbitis elegans</i>
CeSMF3	NP_500235.4	<i>Caenorbitis elegans</i>
AtNRAMP1	Q9SAH8	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtNRAMP6	Q9S9N8	<i>Arabidopsis thaliana</i>
PtNRAMP1	XP_002332060.1	<i>Populus trichocarpa</i>
OsNRAMP3	Q653V6	<i>Oryza sativa</i>
PtNRAMP7.1	XP_002307454.1	<i>Populus trichocarpa</i>
PtNRAMP7.2	XP_002307453.1	<i>Populus trichocarpa</i>
OsNRAMP1	AAB36424	<i>Oryza sativa</i>
OsNRAMP5	BAM45315	<i>Oryza sativa</i>
LeNRAMP1	NP_001234318	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Nrat1	Q6ZG85	<i>Oryza sativa</i>
OsNRAMP6	NP_001043139.1	<i>Oryza sativa</i>
CrNRAMP1	EDP04810	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CrNRAMP2	EDP07304	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
PpNRAMP8	XP_001759361.1	<i>Physcomitrella patens</i>
PaMntH2	AAD46619	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PaMntH1	ABJ13604	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EcMntH	ZP_03035309	<i>Escherichia coli</i>
StMntH	ZP_07129777	<i>Staphylococcus aureus</i>
DrMntH	Q9RTP8	<i>Deinococcus radiodurans</i>
ScSMF1	CAA64547	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CaSMF1	XP_714860.1	<i>Candida albicans</i>
ScSMF2	P38778	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScSMF3	Q12078	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CaSMF3	XP_719640.1	<i>Candida albicans</i>
CaSMF2	XP_722339.1	<i>Candida albicans</i>
TcNRAMP3	AAW47269	<i>Noccaea caerulescens</i>
TcNRAMP4	ABD76399	<i>Noccaea caerulescens</i>

**Ueno, D., Yamaji, N., Kono, I., Huang, C.F., Ando, T., Yano, M. and Ma, J.F.** (2010) Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 16500-16505.

**Vidal, S.M., Pinner, E., Lepage, P., Gauthier, S. and Gros, P.** (1996) Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *The Journal of Immunology*, **157**, 3559-3568.

**Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. and 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. *The Plant Journal*, **37**, 269-281.

**Xu, H., Jin, J., DeFelice, L.J., Andrews, N.C. and Clapham, D.E.** (2004) A Spontaneous, Recurrent Mutation in Divalent Metal Transporter-1 Exposes a Calcium Entry Pathway. *PLoS Biology*, **2**, e50.

**Zhao, H. and Eide, D.** (1996) The ZRT2 Gene Encodes the Low Affinity Zinc Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 23203-23210.



## Chapitre VI : Étude de l'implication de l'autophagie dans la remobilisation des métaux

---

La remobilisation des métaux des feuilles sénescentes implique un grand nombre d'acteurs moléculaires spécifiques comme les transporteurs de métaux, mais également non spécifiques, agissant sans discrimination sur l'ensemble des éléments. L'autophagie est un mécanisme ubiquitaire de recyclage intracellulaire de molécules et d'organites par acheminement puis dégradation de ces éléments dans la vacuole chez les végétaux et les levures ou dans les lysosomes chez les animaux. De récents travaux réalisés chez *Arabidopsis thaliana* ont mis en évidence que la quantité d'azote transloquée des feuilles vers les graines se trouve fortement diminuée chez le mutant d'autophagie *atg5* par rapport au sauvage (Guiboileau *et al.*, 2012). De plus, il a été montré que durant la sénescence, l'autophagie joue un rôle majeur dans la dégradation du chloroplaste qui contient 80% du N et du Fe des cellules chlorophylliennes (Wada *et al.*, 2009 ; Lanquar *et al.*, 2010 ; Nouet *et al.*, 2011). L'autophagie contrôle donc la remobilisation de l'azote des feuilles vers les graines au cours de la sénescence et pourrait représenter plus généralement un processus clé d'accompagnement de la remobilisation de l'ensemble des éléments dont les métaux.

Ainsi, dans un premier temps, des travaux ont été menés afin d'étudier l'implication de l'autophagie dans la remobilisation des métaux chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour laquelle de nombreux outils sont disponibles tels que des mutants et des lignées ARNi affectant les gènes impliqués dans l'autophagie. Au cours de ces travaux, le contenu en métaux des graines et des feuilles a été mesuré en fin de cycle chez plusieurs lignées d'*Arabidopsis thaliana* déficientes pour différents acteurs du mécanisme d'autophagie. Suite à cette première expérimentation, le mutant *atg5* a été sélectionné afin d'analyser plus finement le rôle de l'autophagie dans la remobilisation du Fe.

Dans un second temps, des travaux préliminaires ont été réalisés chez le peuplier. Bien que pour l'heure le rôle de l'autophagie dans la remobilisation n'ait été démontré que pour des plantes annuelles lors de la sénescence monocarpique, il n'y pas de raison de penser que ce mécanisme ne puisse pas également intervenir lors de la sénescence automnale chez les arbres à feuilles caduques. Ainsi l'expression de *PtATG5* homologue d'*AtATG5*, a été suivie au niveau de feuilles matures et sénescences chez sept génotypes de peupliers. En comparant ces données d'expression avec les concentrations en métaux obtenues sur les mêmes échantillons, ce travail apporte les premiers éléments de compréhension du rôle joué par l'autophagie au cours de la sénescence automnale du peuplier.





## I. Article IV

### **Autophagy controls iron use efficiency in *Arabidopsis***

*Mathieu Pottier*<sup>1</sup>, *Céline Masclaux-Daubresse*<sup>2-3</sup>, *Michel Chalot*<sup>4</sup>, *Sébastien Thomine*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut des Sciences du Végétal, Saclay Plant Sciences, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France ;

<sup>2</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin-UMR1318, Saclay Plant Sciences, INRA, Versailles, France ;

<sup>3</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin-UMR1318, Saclay Plant Sciences, AgroParisTech, Versailles, France.;

<sup>4</sup>Université de Franche-Comté UFR Sciences et techniques UMR6249 Laboratoire Chrono-environnement, 4 place Tharradin, 25 211 Montbéliard, France.

#### **Correspondence to:**

Sébastien Thomine,  
Institut des Sciences du Végétal,  
1, Avenue de la Terrasse,  
91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.  
Tel. +33 1 69 82 36 87.  
Email: [thomine@isv.cnrs-gif.fr](mailto:thomine@isv.cnrs-gif.fr)

*Ce travail est présenté sous forme d'un manuscrit qui sera prochainement soumis, une fois l'analyse de la dernière expérimentation réalisée. La première culture de plantes a été réalisée par Céline Masclaux-Daubresse. Les deux suivantes et le reste des expérimentations ont été réalisées par Mathieu Pottier. La rédaction de ce manuscrit a été réalisée par Mathieu Pottier avec l'aide et les corrections de Sébastien Thomine.*



## ABSTRACT

Autophagy is a conserved mechanism involved in cytoplasmic component degradation and nutrient recycling. In higher plants, it plays a critical role in N remobilization to seeds during leaf senescence. Autophagy is considered as a non specific mechanism and thereby could also control remobilization of other elements. With the aim to investigate the involvement of autophagy in micronutrient remobilization, we studied metal content in several *atg* mutants and RNAi lines. Our results show that iron, manganese and zinc concentrations are increased (up to 2.5 higher) in leaves of autophagy deficient plants compared to WT plants, indicating that autophagy is important for metal remobilization. We then focused on iron. Under iron starvation during the reproductive stage, *atg5-1* mutant seeds exhibit a dramatic decrease in iron concentration compared to WT seeds, translating to an Iron Harvest Index (IHI) five times lower than WT. Iron supply during reproductive stage allows increasing seed iron concentration by two in *atg5-1* mutant plant. However, this is still only about 20% of the WT seed iron content in the same conditions. Even though the total Harvest Index (HI) of *atg5-1* is affected in both conditions, estimation of the Iron Use efficiency through IHI/HI demonstrated that the effect on iron translocation to seeds in *atg5-1* mutant is mechanism direct consequence of the defect in autophagy.

This data suggests that autophagy is a critical process for metal remobilization from leaves to seeds. Moreover, root iron uptake cannot compensate a defect in autophagy-dependent iron mobilization.

**Keywords:** Metal, microelement, remobilization, <sup>57</sup>Fe, leaf senescence, iron loading, iron recycling



## **INTRODUCTION**

Over 60% and 30% of the human world population are iron and zinc deficient, respectively (White and Broadley, 2009). Anemia cause about 0.8 millions deaths per year over the world ranking iron deficiency sixth among the risk factors for death and disability in developing countries (WHO, 2002). The limited availability of these elements is likely due to the major place taken by staple food crops in human diet, although they are poor sources of some micronutrients (Gomez-Galera *et al.*, 2010). Thus, the improvement of the use efficiency of key micronutrients namely iron and zinc in crop species is an important issue (Kennedy *et al.*, 2003). The need of micronutrients for human, animal as well as for plant cell life is due to their oxidative and/or Lewis acid properties. For instance, iron play a major role in oxido-reduction reactions that take place in mitochondria and chloroplasts for energy production (Pottier *et al.*, 2014). Besides, zinc is essential for the structure and function of many proteins (Andreini *et al.*, 2006 ; Zhang and Gladyshev, 2009).

During the last decade, different biofortification strategies such as fertilization, conventional breeding and genetic engineering, were investigated in an attempt to increase key micronutrient levels in seeds of crop species (Sperotto *et al.*, 2012). However, fertilization is no longer considered due to its inefficiency, cost and environmental issues (Rengel *et al.*, 1999). The improvement of the micronutrient loading in seeds, through both marker assisted breeding and genetic engineering, requires knowledge of the general micronutrient pathways within the plant including uptake from soil and remobilization from senescing organs (Pottier *et al.*, 2014). Most studies on micronutrient management have so far focused on uptake in root cells, intracellular partitioning and long-distance transport (Pittman, 2005 ; Puig and Peñarrubia, 2009 ; Yruela, 2009 ; Pilon, 2011 ; Thomine and Vert, 2013). Mobilization of components from vegetative organs during senescence has received much less attention. The availability of micronutrients in source tissues during seed loading could also be an important parameter (Pottier *et al.*, 2014). Senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves is associated to decreases by greater than 40% of leaf micronutrients such as molybdenum, iron, copper and zinc that could participate in seed filling (Himmelblau and Amasino, 2001). This result also means that 60% of micronutrients present in senescent leaves are not remobilized. Thus, micronutrient loading in seeds may be limited by their availability in source tissue. To increase micronutrient use efficiency (MUE) in the context of biofortification, it is therefore necessary to better understand micronutrient remobilization from senescent organs during seed filling. For this purpose, it was previously suggested to



consider the contribution of autophagy in micronutrient availability in senescing tissues (Pottier *et al.*, 2014).

Autophagy is conserved from yeast to animals and plants. It allows degradation of cytoplasmic components by non selective lysosomal (animals) or vacuolar (plants) internalization mediated by double membrane vesicles called autophagosomes (Reumann *et al.*, 2010). It promotes energy production, toxic components elimination and nutriment recycling (Yoshimoto, 2012). Unlike the proteasome, which is mainly involved in degradation of short-lived proteins, autophagy allows degradation of a much larger spectrum of bulkier substrates that tend to have a longer lifetime (Korolchuk *et al.*, 2010). It catabolizes aberrant proteins, damaged organelles as well as normal cytoplasmic components when they are no longer-useful (Yoshimoto, 2012). Autophagy related genes (*ATG*) involved in autophagosome formation were first identified in yeast (Matsuura *et al.*, 1997 ; Thompson and Vierstra, 2005 ; Bassham, 2007 ; Li and Vierstra, 2012 ; Yoshimoto, 2012). Subsequently, orthologues of *ATG* genes were identified in plants and autophagy deficient plants were characterized. All autophagy deficient plants exhibit hypersensitivity to carbon and nitrogen starvation highlighting that plants require autophagy for nutrient recycling to cope with nutrient scarcity (Liu and Bassham, 2012 ; Guiboileau *et al.*, 2013).

Autophagy deficient plants display early senescence symptoms while WT exhibit up-regulation of *ATG* genes during leaf senescence in *Arabidopsis* (Doelling *et al.*, 2002 ; van der Graaff *et al.*, 2006 ; Chung *et al.*, 2010 ; Breeze *et al.*, 2011 ; Liu and Bassham, 2012). This suggests a role for autophagy in nutrient recycling during leaf senescence. Chloroplast proteins account for 80% of the total leaf nitrogen and 70 to 90% of iron in mesophyll cell is localized in chloroplasts (Nouet *et al.*, 2011). Chloroplasts should therefore represent the main source for nitrogen and iron for remobilization during senescence (Makino and Osmond, 1991 ; Masclaux *et al.*, 2000). Chloroplast degradation during leaf senescence involves “Rubisco Containing Body” (RCB) mediating stroma protein mobilization from chloroplasts to vacuole under nutrient limitation (Chiba *et al.*, 2003 ; Ishida *et al.*, 2008). RCB were identified as autophagosomes in *Arabidopsis thaliana* (Ishida *et al.*, 2008 ; Wada *et al.*, 2009). Similar small vesicles containing stromal proteins, named SAVs or RVBs, were also observed in soybean and tobacco (Otegui *et al.*, 2005 ; Prins *et al.*, 2008). In addition, small chloroplasts retaining chlorophyll fluorescence are also directly internalized in vacuoles through autophagy, named autophagy in this specific case (Wittenbach *et al.*, 1982 ; Minamikawa *et al.*, 2001 ; Weaver and Amasino, 2001 ; Keech *et al.*, 2007). It was proposed





that these two autophagy related pathways act sequentially to facilitate the complete degradation of chloroplasts (Ishida *et al.*, 2013). Thus, autophagy is an essential pathway for chloroplastic component recycling during leaf senescence at the cellular level and could increase the nutrient pool available for reallocation to sink tissues. In agreement with the observations at the cellular level, it was shown using  $^{15}\text{N}$  labeling that Nitrogen Remobilization Efficiency (NRE) is lower in autophagy deficient plants compared to wild-type plants (Guiboileau *et al.*, 2012). Following the same reasoning, autophagy could also contribute to micronutrient remobilization, especially iron, to seeds.

In this work, we investigated the role of autophagy in micronutrient recycling from senescent leaves to seeds in *Arabidopsis thaliana*. For this purpose, we first, studied leaf micronutrient concentrations in different autophagy deficient plants. As *ATG5* is part of the core machinery of autophagy, essential for the autophagosome formation (Kirisako *et al.*, 2000), we then focused on *atg5* mutant and conducted experiments under iron deficiency and control conditions. Our results indicate that autophagy is required for full metal remobilization from leaves to seeds and control iron use efficiency.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Plant material and growth conditions*

Autophagy deficient plants from *Arabidopsis thaliana* (L.) ecotype Colombia 0 (Col-0) [*atg5-1* (SALK\_020601), *atg9-2* (SALK\_130796), AtATG18a RNAi (RNAi18)] and ecotype Wassilewskija (WS) [*atg4* (*atg4a4b-1*), *atg9-1*] have been described previously (Hanaoka *et al.*, 2002 ; Yoshimoto *et al.*, 2004 ; Xiong *et al.*, 2005 ; Inoue *et al.*, 2006 ; Yoshimoto *et al.*, 2009).

The first experiment including all autophagy deficient plants presented in this study, was conducted on sand (**Fig. 1**). Plants were watered three times per week for 2 hours with nutritive high nitrogen nutrition as described in Chardon *et al.* (2010). Seeds were sown on sand and plants were grown under the following conditions: 8/16-h 21/17°C light/dark until 56 days after sowing (DAS) and then transferred to long days (16-h light), maintaining similar day/night temperatures. When plants were dry, seeds and dry remains of vegetative tissues and siliques were separated to determine their dry weight and their metal content.

In the second experiment (**Fig. 2, 3, 4**) performed with the *atg5-1* mutant and Col-0 to determine the involvement of autophagy in iron remobilization, plants were cultivated on a 1/1 mix of sand and perlite, watered three times per week for 2 hours with modified Hoagland



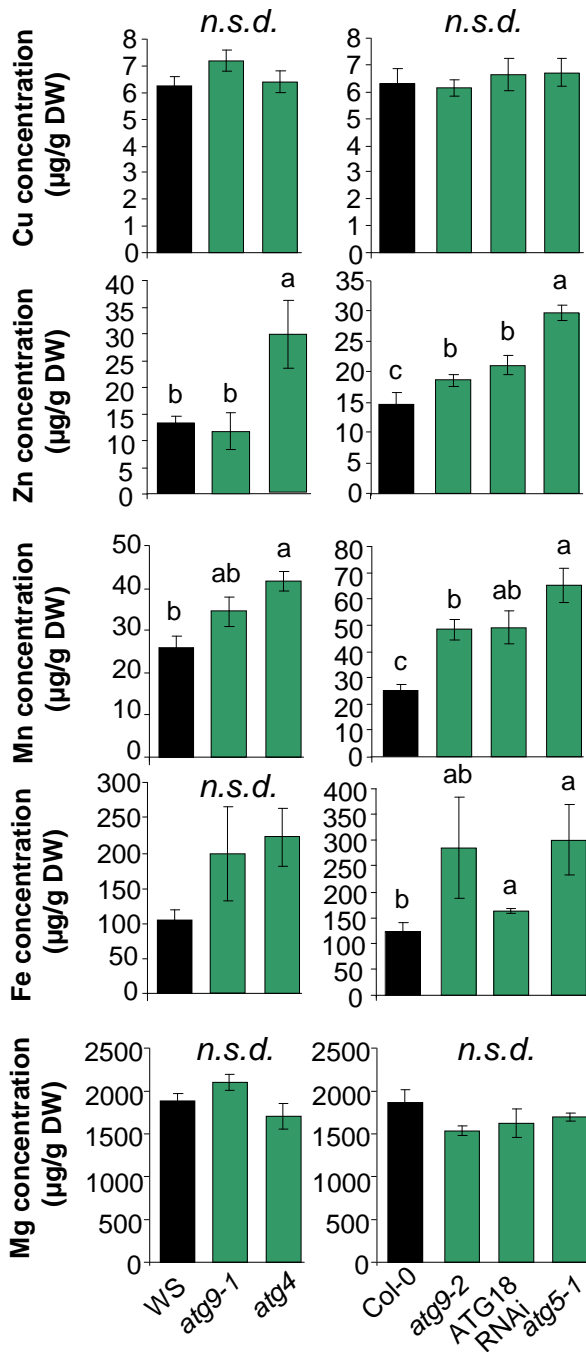
solution [0,28 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25 mM KNO<sub>3</sub>, 0,75 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,5 mM Ca(NO<sub>3</sub>), 25 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 50 μM KCl, 1 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0,1 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,5 μM CuSO<sub>4</sub>, 10 μM Fe-HBED, and 3 mM MES-KOH, pH 5.7]. Iron was provided as Fe<sup>3+</sup> chelated to HBED [N,N'-di(2-hydroxybenzyl) ethylene diamine-N,N'-diacetic acid monochloride hydrate ; Strem Chemicals] prepared as described by Lanquar *et al.* (2005). Plants were grown in a climate chamber under the following conditions: 9/15-h 21/19°C light/dark ; light intensity 150 μmol.photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> ; 75% relative humidity until 60 days after sowing. Then, plants were transferred to long days (16-h light), maintaining similar conditions. At the onset of flowering (70DAS) half of plants were maintained in control condition (+ Fe, solution containing 10 μM Fe-HBED) and the other half were transferred to iron limiting conditions (- Fe, solution containing 20 μM of ferrozine) until the end of plant cycle. When plants were dry, whole plants were harvested and separated in three independents compartments (leaves ; seeds ; floral stem and empty siliques) to determine their dry weight and their metal content.

#### *Metal concentration analysis*

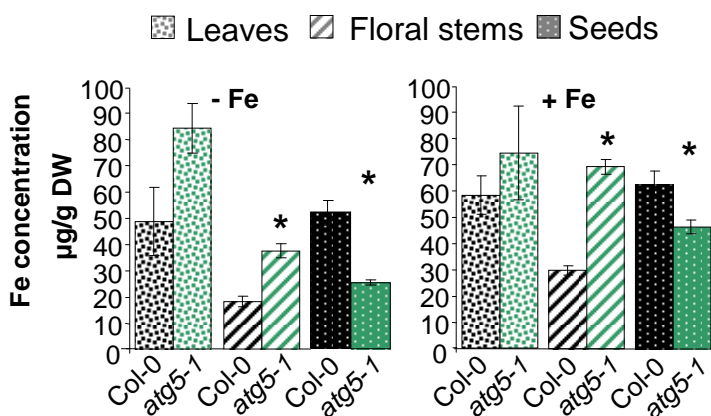
After weight measurement, dried samples were digested in 2 mL of 70 % nitric acid in a DigiBlock ED36 (LabTech, Italy) at 100°C for 1 hr, 120°C for 6 hr and 80°C for 1 hr. After dilution in trace-metal-free water, the metal content of the samples was determined by atomic absorption spectrometry using an AA240FS flame spectrometer (Agilent, USA).

#### *Statistical analysis*

Experiments were carried out in three to four independent biological repeats. Data were analyzed with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney non parametric tests for multiple comparisons and pair comparisons, respectively. For multiple comparisons, a Tukey post hoc test was performed when significant differences were detected ( $p < 0.05$ ). Different letters indicate significant differences between samples. All tests were performed using the R software package.



**Fig. 1.** Zn, Mn, and Fe concentrations are increased in dry remains of vegetative tissues and siliques of autophagy deficient plants. Metal concentrations in dry remains of Wild-type (black bars) and autophagy deficient (green bars) plants grown on sand under high nitrogen nutrition as described in Chardon *et al.* (2010). Results are shown as mean  $\pm$  SE of four biological repeats. Different letters indicate significant differences between genotypes according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) followed by a Tukey *post hoc* test; *n.s.d.* indicates no significant difference.



**Fig. 2.** The increase in Fe concentration in leaves and floral stems of the *atg5-1* mutant is associated to a decrease in seed Fe concentration. Metal concentrations in leaves, floral stems and seeds of Wild-type (Col-0, black bars) and *atg5-1* mutant (green bars) grown on sand/perlite (1/1) substrate watered with modified Hoagland medium. Iron was supplied (+Fe) or not (-Fe) during the reproductive stage. Results are shown as mean  $\pm$  SE of three to four biological repeats. \* indicate significant differences between genotypes in a given condition according to a Mann-whitney test ( $p < 0.05$ ,  $n = 3-4$ ).

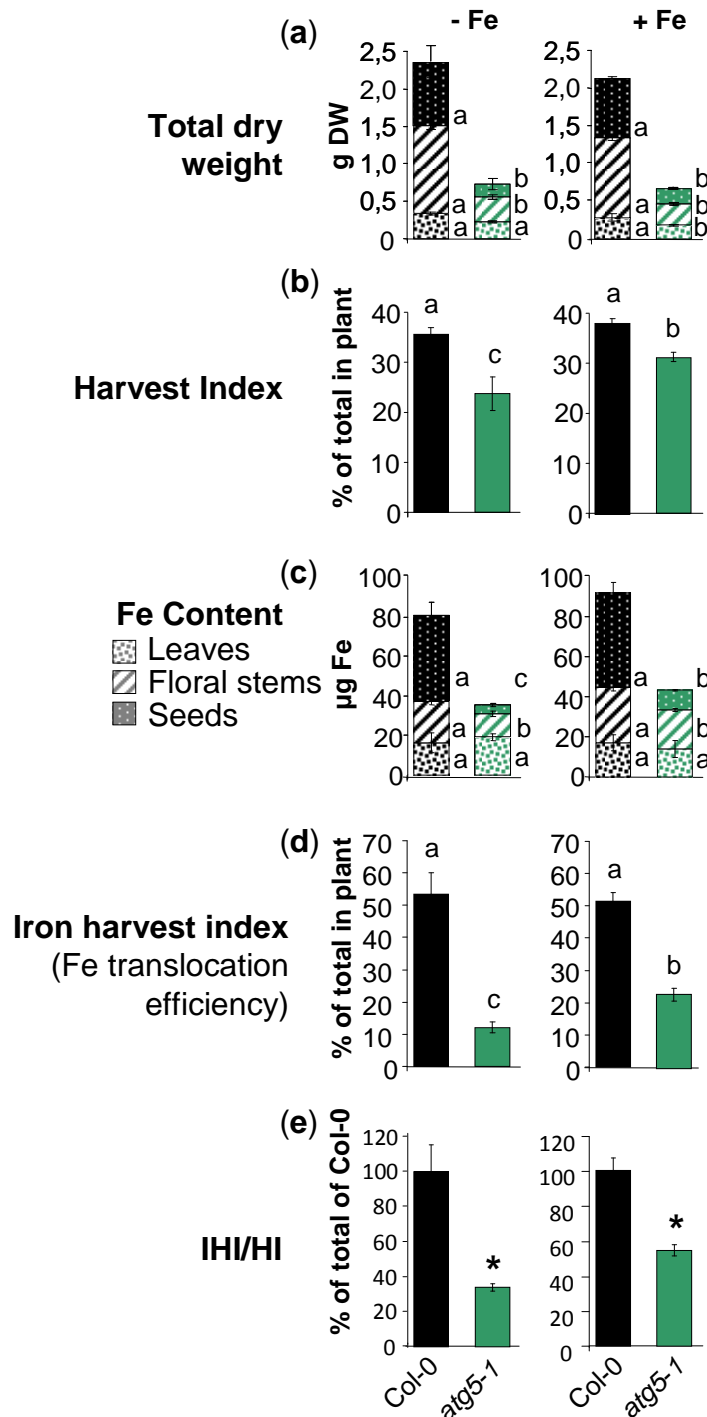
## **RESULTS**

### *Autophagy deficient plants exhibit increase of manganese, iron and zinc concentrations in vegetative tissues*

Autophagy is a complex mechanism involving more than thirty genes (Yoshimoto, 2012). To investigate the involvement of autophagy in metal remobilization from vegetative tissues during senescence, our first approach was to compare metal concentrations in vegetative tissues of wild-type and several autophagy deficient plants previously characterized (Hanaoka *et al.*, 2002 ; Yoshimoto *et al.*, 2004 ; Thompson *et al.*, 2005 ; Xiong *et al.*, 2005 ; Guiboileau *et al.*, 2012). Although no change in copper and magnesium concentrations were observed in this experiment, manganese, iron and zinc concentrations were increased by up to 2,5 in vegetative tissues of autophagy deficient plants compared to wild-type plants (**Fig. 1**). The highest increases in metal concentration were consistently observed in *atg5-1* and *atg4* mutants, which are fully defective in autophagosome formation (Yoshimoto *et al.*, 2004 ; Guiboileau *et al.*, 2012). In leaves of *atg9.1*, *atg9.2* and ATG18 RNAi, increases in manganese, iron and zinc concentrations were smaller and in some cases no significant differences were observed with wild-type plants. However, some autophagic bodies have been detected in these autophagy deficient plants, indicating that autophagy mechanism is not completely impaired (Yoshimoto *et al.*, 2004 ; Guiboileau *et al.*, 2012). Because *atg5-1* was used with success to determine the involvement of autophagy in nitrogen remobilization, we chose to focus on *atg5-1*, which also exhibit robust increase in metal concentration, for further analysis (Guiboileau *et al.*, 2012 ; Guiboileau *et al.*, 2013).

### *Autophagy is essential for iron translocation to seeds*

Because iron is the most important micronutrient for human nutrition and is often not sufficiently available in seeds of crop plants, we then put emphasis on this element. In order to determine if autophagy is required for iron remobilization and subsequent seed loading, experiments were conducted in two conditions: iron was supplied either during all plant life cycle (+Fe) or only during vegetative stage (-Fe). Iron concentration was measured in leaves, floral stems and seeds of *atg5-1* mutant and Col-0 (**Fig. 2**). In both conditions, no significant differences in leaf iron concentrations were observed between genotypes. Moreover, continuous iron supply does not significantly modify iron concentration in leaves, irrespective of the genotypes. Interestingly, floral stem iron concentration is significantly higher in *atg5-1* mutant compared to wild-type plants in both +Fe and -Fe conditions. In contrast, seed iron



**Fig. 3.** Total seed production and Iron Use Efficiency (IUE) are dramatically affected in *atg5-1* mutant of *Arabidopsis thaliana* even under Fe sufficient conditions. Repartition of the DW between leaves (closed squares), floral stems, including empty siliques, (diagonal stripes) and seeds (white dots) of plants growing under Fe deprivation (-Fe) or control (+Fe) conditions are represented for the Wild-type (Col-0, black bars) and the autophagy mutant (*atg5-1*, green bars) (a). Proportion of DW in seeds was calculated as the harvest index (HI) following the equation  $HI = DW \text{ seeds} / (DW \text{ seeds} + DW \text{ leaves} + DW \text{ floral stem})$  (b). Repartition of the Fe content in leaves, floral stems, including empty siliques, and seeds are represented (c). The proportion of Fe in seeds was calculated as the Iron harvest index (IHI)) (d). Estimation of the IUE was determined through the NHI/Hi ration which was expressed as a percentage of the Col-0 value, as in Masclaux-Daubresse & Chardon (2011) (e). Wild-type (Col-0) and *atg5-1* mutant were grown on sand/perlite (1/1) substrate watered with modified Hoagland medium. Results are shown as mean  $\pm$  SE of 3 to 4 biological repeats. Different letters indicate significant differences between genotypes and conditions in a given organ according to a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ,  $n = 3-4$ ) followed by a Tukey *post hoc* test. \* indicate significant differences between *wild-type* and *atg5-1* plants in a given condition according to a Mann-whitney test ( $p < 0.05$ ,  $n = 3-4$ ).

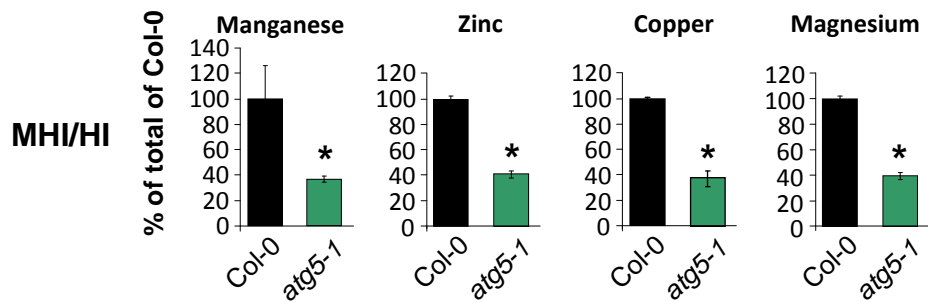
concentration is significantly lower in *atg5-1* mutant compared to wild-type plants in both conditions. Iron supply during the reproductive stage did not modify iron concentration in wild-type seeds. However, it led to increased iron concentration in seeds of *atg5-1* mutant albeit not sufficient to reach the wild-type level. Thus, iron uptake during the reproductive stage rescues only partially iron concentration in *atg5-1* seeds.

*Autophagy is essential for vegetative biomass and seed production, harvest index and Iron Use Efficiency (IUE)*

Total dry weight of leaves, floral stems and seeds were measured in order to determine iron distribution between these three compartments. As previously shown, dry weights of all organs are significantly lower in *atg5-1* mutant compared to wild-type plants (**Fig. 3a** ; Guiboileau *et al.*, 2012). It was also previously described that a generous nitrate supply leads to a three fold increase in dry weight of vegetative organs and seeds compared to nitrate limiting condition (Guiboileau *et al.*, 2012). In contrast, we show here, that iron supply during reproductive stage has not effect on biomass production in either *atg5-1* mutant or wild-type plants (**Fig. 3a**). However, significant differences in harvest index (HI) between *atg5-1* and wild-type were observed in both + Fe and -Fe conditions (**Fig. 3b**). In contrast, a difference was previously only observed in nitrate-limiting condition (Guiboileau *et al.*, 2012).

Taking biomass into account, iron content was determined for each organ. Although in both conditions iron concentration was higher in vegetative organs of *atg5-1* mutant compared to wild-type (**Fig. 2**), *atg5-1* total iron content is decreased by more than two fold due to its much lower biomass (**Fig. 3c**). However, the different organs contribute to various extents to the decrease in total iron content in *atg5-1*: seeds iron content is most affected by the defect in autophagy, exhibiting decreases of iron content by 10 and 5 under iron starvation (-Fe) and control conditions (+Fe), respectively. Iron content in floral stems is clearly decreased in *atg5-1* mutant compared to wild-type plants and leaf iron content is not affected (**Fig. 3c**). In both conditions, the defect in autophagy has a strong impact on the Iron Harvest Index (IHI), which corresponds to the efficiency of iron translocation to seeds (**Fig. 3d**). Iron supply during seed formation improves the IHI (**Fig. 3d**) but does not fully restore seed iron content to wild-type level. Thus, exogenous iron supply does not compensate the defect in autophagy for iron supply to seeds. Because IHI may be strongly biased by the HI, we also calculated the ratio between HI and NHI in order to determine Iron Use Efficiency (IUE) of





**Fig. 4.** Use Efficiencies of manganese, zinc copper and magnesium are also affected in *Arabidopsis thaliana atg5-1* mutant. Estimations of micronutrient use efficiencies were calculated as the (Micronutrient-HI)/HI ratio expressed as percentage of the Col-0 value, as in Masclaux-Daubresse & Chardon (2011). Wild-type (Col-0) and *atg5-1* mutant grown on sand/perlite (1/1) substrate watered with modified Hoagland medium. Results are shown as mean  $\pm$  SE of three to four biological replicates. \* indicate significant differences between *wild-type* and *atg5-1* plants according to a Mann-whitney test ( $p < 0.05$ ,  $n = 3-4$ ).

*atg5-1* mutant and wild-type plants (**Fig. 3e**). Dramatic decreases of the IHI/HI by 65% and 45% were observed under iron starvation and control conditions, respectively. Thus, even relative to HI, iron translocation to seed is strongly affected in autophagy mutant plants showing that the decrease of IHI is not only a consequence of the low HI but that autophagy specifically affects IUE. Besides, use efficiencies of others micronutrients were also estimated in plant growing under control condition following the same approach. Compared to wild-type plants, *atg5-1* mutant plants showed decreases by 64%, 59%, 62%, 61% in use efficiency of manganese, zinc, copper and magnesium, respectively. As expected, a defect in autophagy not only affects iron use efficiency but also use efficiency of other micronutrients (**Fig. 4**).

## **DISCUSSION**

In this present work, we investigated the involvement of autophagy in micronutrient recycling for seed filling. Through the determination of apparent remobilization in autophagy deficient and wild-type plants, we provide evidence for the essential role of autophagy in IUE as well as in the use efficiency of several other micronutrients. Indeed, a defect in autophagy decreased the IHI/HI by more than 65% and 45% under iron starvation and control conditions, respectively. A previous study showed that the same autophagy mutant exhibited decreases by 40% and 15% of NHI/HI under nitrate-limiting and nitrate-rich conditions, respectively (Guiboileau *et al.*, 2012). Thus, our data suggest that autophagy defects could affect even more severely IUE than NUE. However, these experiments were not performed in the same conditions. IHI/HI was 20% higher in autophagy deficient plants supplied with iron during reproductive stage than in plants of the same genotype subjected to iron starvation. This could indicate that exogenous iron uptake at the reproductive stage partially compensates the defect in iron remobilization from leaves to fill *atg5-1* mutant seeds, as it was also reported for nitrogen (Guiboileau *et al.*, 2012). However, it is important to note that the major part of autophagy-dependent iron remobilization cannot be compensated by exogenous iron uptake. Indeed, under control conditions, the IUE of *atg5-1* mutant plants is still over 45% lower than IUE of wild-type plants. According to this work, about 45% of the IUE of wild-type plant should be associated to iron remobilization. Nevertheless, remobilization could be overestimated if iron starvation stimulates remobilization. Thus, a confirmation of these results is required. A more direct and accurate demonstration of the role of autophagy in iron remobilization from vegetative organs should be obtained using  $^{57}\text{Fe}$  allowing to specifically monitor fluxes between senescing tissues and seeds independently of putative uptake from



soil. Using this approach the real Iron Remobilization Efficiency (IRE) may be calculated. If iron starvation does not stimulate iron remobilization, IRE of plants growing under control conditions should be close to the IUE of plants subjected to iron starvation during reproductive stage. Although, isotopic labeling is well documented regarding macronutrients and some micronutrients such as zinc and copper (Wang *et al.*, 2010 ; Wu *et al.*, 2010 ; Erenoglu *et al.*, 2011 ; Hegelund *et al.*, 2012 ; Zheng *et al.*, 2012), only few works report its use regarding iron (Alvarez-Fernandez, 2006 ; Rodriguez-Castrillon *et al.*, 2008).

As described previously, autophagy deficient plants exhibit an early senescence phenotype which was attributed to the accumulation of salicylic acid (Yoshimoto *et al.*, 2009). Indeed, autophagy operates as a negative feedback loop modulating SA signaling to negatively regulate senescence (Guiboileau *et al.*, 2012). Therefore, it would be important to investigate whether the defect in iron use efficiency in autophagy deficient plants is directly related to autophagy or whether it is related to premature leaf cell death due to SA overaccumulation. For this purpose, it was previously proposed to use the stay-green *atg5.sid2* and *atg5.NahG* mutants which allow monitoring the effect of autophagy deficiency in the absence of early senescence (Yoshimoto *et al.*, 2009 ; Guiboileau *et al.*, 2012). Further investigations are thus needed to determine accurately the IRE and to check that iron remobilization is not a result of premature senescence. Altogether, this set of data identify autophagy as a mechanism involved in metal management at the whole plant level and as a key component of metal seed loading, which may be engineered in the context of biofortification. Stimulation of autophagy in senescing leaves together with the creation of strong and specific sink strength could allow increasing concentration of desired micronutrients in seeds.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Cindy Victor and Sara Martins for contribution to harvests. MP work was supported by grants from Région Ile-de-France. Work in the Sébastien Thomine lab is supported by CNRS and ANR plant Man.

## **REFERENCES**

- Alvarez-Fernandez, A.** (2006) Application of stable isotopes in plant iron research. In *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*: Springer, pp. 437-448.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. and Rosato, A.** (2006) Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. *Journal Proteome Res*, **5**, 196-201.



- Bassham, D.C.** (2007) Plant autophagy-more than a starvation response. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 587-593.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.-s., Penfold, C.A. and Jenkins, D.** (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell Online*, **23**, 873-894.
- Chardon, F., Barthélémy, J., Daniel-Vedele, F. and Masclaux-Daubresse, C.** (2010) Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. *Journal of experimental botany*, **61**, 2293-2302.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A. and Mae, T.** (2003) Exclusion of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 914-921.
- Chung, T., Phillips, A.R. and Vierstra, R.D.** (2010) ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. *The Plant Journal*, **62**, 483-493.
- Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R. and Vierstra, R.D.** (2002) The APG8/12-activating Enzyme APG7 Is Required for Proper Nutrient Recycling and Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 33105-33114.
- Erenoglu, E.B., Kutman, U.B., Ceylan, Y., Yildiz, B. and Cakmak, I.** (2011) Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root-to-shoot translocation and remobilization of zinc (<sup>65</sup>Zn) in wheat. *New Phytologist*, **189**, 438-448.
- Gomez-Galera, S., Rojas, E., Sudhakar, D., Zhu, C., Pelacho, A.M., Capell, T. and Christou, P.** (2010) Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic research*, **19**, 165-180.
- Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M.-P., Avice, J.-C. and Masclaux-Daubresse, C.** (2012) Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, **194**, 732-740.
- Guiboileau, A., Avila-Ospina, L., Yoshimoto, K., Soulay, F., Azzopardi, M., Marmagne, A., Lothier, J. and Masclaux-Daubresse, C.** (2013) Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in *Arabidopsis* leaves depending on nitrate availability. *New Phytologist*.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S. and Ohsumi, Y.** (2002) Leaf Senescence and Starvation-Induced Chlorosis Are Accelerated by the Disruption of an *Arabidopsis* Autophagy Gene. *Plant Physiology*, **129**, 1181-1193.
- Hegelund, J.N., Pedas, P., Husted, S., Schiller, M. and Schjoerring, J.K.** (2012) Zinc fluxes into developing barley grains: use of stable Zn isotopes to separate root uptake from remobilization in plants with contrasting Zn status. *Plant and Soil*, **361**, 241-250.
- Himmelblau, E. and Amasino, R.M.** (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of plant physiology*, **158**, 1317-1323.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y. and Moriyasu, Y.** (2006) AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells. *Plant and Cell Physiology*, **47**, 1641-1652.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R. and Mae, T.** (2008) Mobilization of Rubisco and Stroma-Localized Fluorescent Proteins of Chloroplasts to the Vacuole by an ATG Gene-Dependent Autophagic Process. *Plant Physiology*, **148**, 142-155.
- Ishida, H., Izumi, M., Wada, S. and Makino, A.** (2013) Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
- Keech, O., Pesquet, E., Ahad, A., Askne, A., Nordvall, D.A.G., Vodnala, S.M., Tuominen, H., Hurry, V., Dizengremel, P. and Gardestroem, P.** (2007) The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment*, **30**, 1523-1534.
- Kennedy, G., Nantel, G. and Shetty, P.** (2003) The scourge of "hidden hunger": global dimensions of micronutrient deficiencies. *Food Nutrition and Agriculture*, 8-16.



- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. and Ohsumi, Y.** (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of cell biology*, **151**, 263-276.
- Korolchuk, V.I., Menzies, F.M. and Rubinsztein, D.C.** (2010) Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters*, **584**, 1393-1398.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S.** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J*, **24**, 4041-4051.
- Li, F. and Vierstra, R.D.** (2012) Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science*, **17**, 526-537.
- Liu, Y. and Bassham, D.C.** (2012) Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 215-237.
- Makino, A. and Osmond, B.** (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiology*, **96**, 355-362.
- Masclaux-Daubresse, C.I. and Chardon, F.** (2011) Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2131-2142.
- Masclaux, C., Valadier, M.-H., Brugière, N., Morot-Gaudry, J.-F. and Hirel, B.** (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, **211**, 510-518.
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. and Ohsumi, Y.** (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **192**, 245-250.
- Minamikawa, T., Toyooka, K., Okamoto, T., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M.** (2001) Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma*, **218**, 144-153.
- Nouet, C., Motte, P. and Hanikenne, M.** (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends in Plant Science*, **16**, 395-404.
- Otegui, M.S., Noh, Y.-S., Martinez, D.E., Vila Petroff, M.G., Andrew Staehelin, L., Amasino, R.M. and Guiamet, J.J.** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal*, **41**, 831-844.
- Pilon, M.** (2011) Moving copper in plants. *New Phytologist*, **192**, 305-307.
- Pittman, J.K.** (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytologist*, **167**, 733-742.
- Pottier, M., Masclaux Daubresse, C., Yoshimoto, K. and Thomine, S.** (2014) Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds. *Frontiers in plant science*, **5**, 11.
- Prins, A., Van Heerden, P.D.R., Olmos, E., Kunert, K.J. and Foyer, C.H.** (2008) Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1935-1950.
- Puig, S. and Peñarrubia, L.** (2009) Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 299-306.
- Rengel, Z., Batten, G.D. and Crowley, D.E.** (1999) Agronomic approaches for improving the micronutrient density in edible portions of field crops. *Field Crops Research*, **60**, 27-40.
- Reumann, S., Voitsekhovskaja, O. and Lillo, C.** (2010) From signal transduction to autophagy of plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma*, **247**, 233-256.
- Rodriguez-Castrillon, J.A., Moldovan, M., Alonso, J.I.G., Lucena, J.J., Garcia-Tomé, M.L. and Hernandez-Apaolaza, L.** (2008) Isotope pattern deconvolution as a tool to study iron metabolism in plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **390**, 579-590.





- Sperotto, R.A., Ricachenevsky, F.K., Waldow, V.d.A. and Fett, J.P.** (2012) Iron biofortification in rice: It's a long way to the top. *Plant Science*, **190**, 24-39.
- Thomine, S. and Vert, G.** (2013) Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**, 322-327.
- Thompson, A.R., Doelling, J.H., Suttangkakul, A. and Vierstra, R.D.** (2005) Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiology*, **138**, 2097-2110.
- Thompson, A.R. and Vierstra, R.D.** (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 165-173.
- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.-I. and Kunze, R.** (2006) Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, **141**, 776-792.
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T. and Makino, A.** (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology*, **149**, 885-893.
- Wang, Y.X., Specht, A. and Horst, W.J.** (2010) Stable isotope labelling and zinc distribution in grains studied by laser ablation ICP-MS in an ear culture system reveals zinc transport barriers during grain filling in wheat. *New Phytologist*, **189**, 428-437.
- Weaver, L.M. and Amasino, R.M.** (2001) Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology*, **127**, 876-886.
- White, P.J. and Broadley, M.R.** (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, **182**, 49-84.
- WHO** (2002) *World Health Report 2002: World Health Report: Reducing Risks to Health Noncommunicable Diseases*. Geneva: World Health Organization.
- Wittenbach, V.A., Lin, W. and Hebert, R.R.** (1982) Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiology*, **69**, 98-102.
- Wu, C.-y., Lu, L.-l., Yang, X.-e., Feng, Y., Wei, Y.-y., Hao, H.-l., Stoffella, P.J. and He, Z.-l.** (2010) Uptake, translocation, and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. *Journal of agricultural and food chemistry*, **58**, 6767-6773.
- Xiong, Y., Contento, A.L. and Bassham, D.C.** (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **42**, 535-546.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T. and Ohsumi, Y.** (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *The Plant Cell Online*, **16**, 2967-2983.
- Yoshimoto, K., Jikumar, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y. and Shirasu, K.** (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **21**, 2914-2927.
- Yoshimoto, K.** (2012) Beginning to Understand Autophagy, an Intracellular Self-Degradation System in Plants. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 1355-1365.
- Yruela, I.** (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, **36**, 409-430.
- Zhang, Y. and Gladyshev, V.N.** (2009) Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chemical reviews*, **109**, 4828-4861.
- Zheng, L., Yamaji, N., Yokosho, K. and Ma, J.F.** (2012) YSL16 is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice. *The Plant Cell Online*, **24**, 3767-3782.



## II. Expériences complémentaires

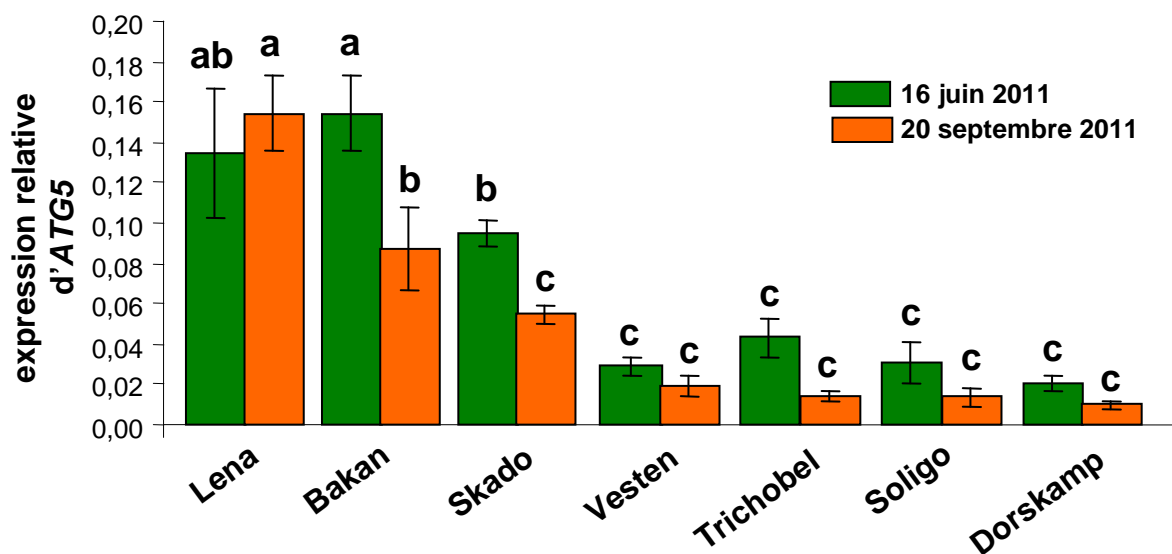
### A) Quantification de l'efficacité de remobilisation du fer chez le mutant d'autophagie *atg5-1* par marquage isotopique

L'étude présentée dans le manuscrit précédent, a mis en évidence le rôle de l'autophagie dans l'efficacité d'utilisation des métaux. Actuellement, une expérience est menée afin de quantifier l'efficacité de remobilisation du fer par marquage isotopique au  $^{57}\text{Fe}$  chez le mutant d'autophagie *atg5-1*. Ce travail permettra également de déterminer si la faible efficacité d'utilisation du fer de ce mutant d'autophagie précédemment observée est le résultat d'une faible efficacité de remobilisation de cet élément et si cette probable faible remobilisation de fer n'est pas le résultat d'une sénescence précoce liée à l'accumulation d'acide salicylique. Pour cela une culture de plantes incluant des plantes sauvages, le mutant *atg5-1*, le double mutant *atg5-1sid2* ainsi que le mutant *sid2* a été entreprise suivant le schéma expérimental présenté en **Figure 19**. Les échantillons ont doré-et-déjà été collectés et seront prochainement broyés puis analysés par ICP-MS.

Les données acquises permettront de mettre en lumière le rôle joué par l'autophagie dans la remobilisation des métaux lors de la formation des graines chez les plantes annuelles dans le cadre de la biofortification.

### B) Premières investigations du rôle de l'autophagie chez le peuplier

Les travaux réalisés sur la plante annuelle *Arabidopsis thaliana* ont montré l'implication du mécanisme d'autophagie dans l'efficacité d'utilisation des métaux et probablement dans la remobilisation des métaux au cours de la sénescence monocarpique. De nouvelles études sont cependant nécessaires pour vérifier s'il en est de même au cours de la sénescence automnale des feuilles du peuplier. Il a précédemment été décrit que l'azote est remobilisé à partir de feuilles sénescentes chez le peuplier (Pregitzer *et al.*, 1990 ; Scherzer *et al.*, 1998 ; Couturier *et al.*, 2010). De plus, nous avons montré, au cours des travaux entrepris dans le manuscrit « Control of poplar leaf metal content with a perspective on phytoremediation: natural variation and molecular mechanisms », qu'il en était de même pour le Mg. Dans ce contexte, nous avons voulu voir si la remobilisation de ces éléments était associée à l'induction du mécanisme d'autophagie au cours de la sénescence, comme c'est le



**Figure 28** : *ATG5* n'est pas induit au cours de la sénescence automnale du peuplier.

Niveau de transcrit d'*ATG5* normalisé par *EF-1 $\alpha$* , *PP2A* et *UBC10* au niveau des feuilles de 7 géotypes de peupliers de 4 ans poussant sur le sol contaminé de la parcelle expérimentale de Pierrelaye. Les résultats sont présentés comme la moyenne obtenue à partir quatre clones indépendants. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les géotypes suivant un test Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ ) suivi par un test *post hoc* Tukey.

cas chez *Arabidopsis thaliana* (Doelling *et al.*, 2002 ; van der Graaff *et al.*, 2006 ; Chung *et al.*, 2010 ; Breeze *et al.*, 2011). L'expression de *PtATG5* ([XM\\_002327533](#)), homologue d'*AtATG5* (AT5G17290), a donc été étudiée au niveau des feuilles matures et des feuilles sénescentes de sept génotypes de peupliers (**Figure 28**). Cette étude a été réalisée à partir des échantillons présentés dans le manuscrit « Control of poplar leaf metal content with a perspective on phytoremediation: natural variation and molecular mechanisms », suivant le matériel and méthode de ce même manuscrit et à l'aide des amorces présentées en **annexe III** de cette thèse. Afin de s'assurer de l'entrée en sénescence des feuilles étudiées, l'expression du marqueur de sénescence *PtCP* (Bhalerao *et al.*, 2003 ; Couturier *et al.*, 2010) a été mesurée. Bien qu'il existe d'importantes variations d'expression de *PtATG5* entre les génotypes, aucune augmentation n'est observée entre le stade mature et le stade sénescence chez les sept génotypes étudiés (**Figure 28**). Ainsi, contrairement à la sénescence monocarpique d'*Arabidopsis thaliana*, la sénescence automnale des feuilles du peuplier ne semble donc pas s'accompagner de l'induction des gènes *ATG*. De futurs travaux devront être réalisés afin de tester si l'induction du mécanisme d'autophagie au niveau des feuilles sénescentes du peuplier permet d'améliorer la remobilisation des métaux et ainsi de limiter le retour au sol des ETM.



## Chapitre VII : Conclusion générale et perspectives

---

Afin de réhabiliter les sols pollués par les ETM par phytoextraction, il a été proposé d'utiliser des espèces végétales capables d'accumuler rapidement une importante quantité de métaux. Du fait de sa biomasse élevée, de sa croissance rapide et de son système racinaire développé, le peuplier est très vite apparu comme un bon candidat pour ce processus. Néanmoins, la forte accumulation de métaux observée au niveau des feuilles de cet arbre (Drew *et al.*, 1987 ; Mertens *et al.*, 2004 ; Projet PHYTOPOP ; Dominguez *et al.*, 2008) est susceptible de limiter sa capacité de phytoextraction par retour au sol des métaux lors de la sénescence automnale.

Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude au champ en vue d'identifier des génotypes de peuplier capables de remobiliser les métaux des feuilles pendant la sénescence automnale. Cependant, au cours de ces travaux, aucun des 14 génotypes de peuplier étudiés n'est apparu capable de remobiliser le Zn ou le Cd, alors que la remobilisation de l'azote est bien documentée et que nous avons observé une remobilisation du Mg. Des études d'expression de gènes et des analyses corrélatives ont été entreprises afin de mieux comprendre l'homéostasie des métaux des feuilles et de trouver de nouvelles orientations de recherches. Ces analyses suggèrent que parallèlement à l'absence d'induction des mécanismes d'efflux cellulaires, les mécanismes d'influx cellulaire de métaux sont maintenus voire induits chez certains génotypes au cours de la sénescence. Ainsi, le gène *PtNRAMP1*, potentiellement impliqué dans l'influx cellulaire des ETM apparaît candidat à l'accumulation continue de Zn et de Cd dans les feuilles pendant la sénescence. De plus, l'induction de l'expression du gène d'autophagie *PtATG5* n'a été observée chez aucun des génotypes de peupliers étudiés au cours de la sénescence alors que, chez *Arabidopsis*, son induction et son rôle dans la remobilisation des nutriments ont été prouvés (Guiboileau *et al.*, 2012 ; Pottier *et al.*, 2014, ce travail de thèse). La remobilisation des ETM accumulés dans les feuilles de peuplier avant l'abscission ne paraît donc favorisée ni par des mécanismes spécifiques de l'homéostasie des métaux (transporteurs), ni par des mécanismes généraux de recyclage des nutriments comme l'autophagie. Vu la bonne efficacité de remobilisation de l'azote et du magnésium foliaire, il serait intéressant de vérifier au niveau cellulaire si l'autophagie est induite dans les feuilles, en quantifiant les autophagosomes, même si l'expression du gène *ATG5* n'augmente pas lors de la sénescence. Finalement, ce travail indique que la décontamination par phytoextraction de sols pollués sera retardée par le retour au sol des métaux contenus dans les feuilles, même si





l'on utilise le géotype Dvina, qui est l'un des peupliers possédant les plus faibles concentrations en Zn et en Cd dans ses feuilles, et qui a été identifié lors du projet ANR PHYTOPOP comme étant le peuplier le plus efficace pour la phytoextraction.

Afin d'identifier des géotypes capables de limiter d'avantage l'accumulation foliaire de métaux ou de mettre en place des processus de remobilisation, il est possible d'étudier un plus large éventail de géotypes, prenant en compte des espèces appartenant à des sections non-représentées au cours de cette étude (sections Abaso, Turanga, Leucoides et *Populus*). En effet, nos analyses corrélatives suggèrent l'existence de modes de gestion des métaux foliaires distincts entre les sections Tacahamaca et Aigeiros. Par ailleurs, il est également envisageable de limiter les concentrations en métaux des feuilles ou de stimuler leur remobilisation par génie génétique en induisant des mécanismes d'efflux cellulaire de métaux (transporteurs tonoplastique, plasmalemmique...) ou des mécanismes impliqués dans le recyclage des nutriments.

Pour aborder l'étude des mécanismes agissant spécifiquement sur la remobilisation des métaux, une caractérisation fonctionnelle a été entreprise sur des transporteurs impliqués dans l'efflux de métaux à partir de la vacuole, le compartiment où sont majoritairement stockés les ETM en excès (Clemens *et al.*, 2002). Chez *Arabidopsis thaliana*, ce sont les transporteurs AtNRAMP3 et d'AtNRAMP4 qui sont impliqués dans l'efflux de métaux. Chez le peuplier PtNRAMP3.1 et PtNRAMP3.2 sont les plus proches homologues d'AtNRAMP3 et d'AtNRAMP4. Ainsi ce travail a principalement porté sur ces deux transporteurs. Il est ainsi apparu que PtNRAMP3.2 permet, comme AtNRAMP3 et AtNRAMP4, le transport de Fe et de Mn à partir la vacuole, alors que PtNRAMP3.1 permet le transport de Fe, de Mn et de Zn à partir de compartiments intracellulaires non-identifiés. Bien que nous n'ayons observé aucun effet de l'expression de *PtNRAMP3.1* chez *Arabidopsis thaliana*, des données préliminaires récemment obtenues dans l'équipe par Van Anh Le Thi ont montré des diminutions importantes des concentrations de Zn et de Mn au niveau des feuilles de peuplier sur-exprimant *PtNRAMP3.1*. D'un point de vue fondamental, la localisation de PtNRAMP3.1 sur un compartiment intracellulaire distinct de la vacuole a été confirmée chez le peuplier. Ces données indiquent donc que PtNRAMP3.1 est un transporteur de métaux fonctionnel chez la plante et identifient un nouveau compartiment important pour l'homéostasie des métaux mais dont la nature reste à déterminer. D'un point de vue appliqué, *PtNRAMP3.1* pourrait représenter un candidat intéressant pour une approche biotechnologique visant à limiter l'accumulation des ETM dans les feuilles du peuplier. Cependant, d'autres expériences seront



nécessaires pour (1) confirmer ces résultats, (2) tester si la sur-expression de *PtNRAMP3.1* permet aussi de limiter l'accumulation foliaire du Cd et (3) analyser l'impact de la sur-expression de *PtNRAMP3.1* sur les concentrations en métaux des autres organes. Cependant, la sur-expression de *PtNRAMP3.1* est associée à un phénotype chlorotique indiquant une carence en Mn et/ou en Fe. Afin de limiter l'accumulation foliaire des métaux d'intérêt, dans le cadre de la phytoextraction, sans affecter l'homéostasie des métaux essentiels pour l'activité des cellules, il est appa  t nécessaire d'identifier les moyens de moduler la sélectivité des transporteurs vis-à-vis des métaux.

Dans ce but, nous avons aussi entrepris l'identification des déterminants structuraux impliqués dans la sélection des métaux chez les NRAMP. Pour cela, un crible réalisé chez la levure, nous a permis d'identifier 4 résidus impliqués dans le transport de Zn et de Cd chez *AtNRAMP4*. De façon intéressante, 3 de ces résidus sont conservés chez de nombreux membres de la famille NRAMP. Nous avons montré que le rôle dans la sélectivité d'un des résidus identifiés est conservé chez le transporteur NRAMP de mammifère DMT1. Cependant, bien que les résidus identifiés soient conservés chez *PtNRAMP3.1* et *PtNRAMP3.2*, nos données d'expression en levure suggèrent qu'aucune de ces deux protéines n'est capable de transporter le Cd et que seul *AtNRAMP3.1* peut transporter le Zn. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la présence de ces résidus soit nécessaire mais pas suffisante pour conférer la capacité à transporter le Cd et le Zn. Indépendamment de la phyto-rémédiation, l'introduction de mutations dans les résidus nécessaires au transport du Zn et du Cd pourrait permettre de limiter l'entrée de Cd chez des espèces d'intérêt agronomique. Chez le riz, *OsNRAMP5* permet l'absorption racinaire de Mn et est donc essentiel à la bonne croissance de cette plante. Cependant *OsNRAMP5* est aussi la principale voie d'entrée du Cd chez le riz (Ishikawa *et al.*, 2012 ; Ishimaru *et al.*, 2012 ; Sasaki *et al.*, 2012). L'introduction des mutations que nous avons identifiées chez *OsNRAMP5*, pourrait permettre de limiter l'activité de transport de Cd d'*OsNRAMP5* tout en maintenant son activité de transport de Mn. Par contre, dans le cadre de la stratégie de phytoextraction, il serait plus intéressant d'identifier, à l'inverse, des mutations augmentant la sélectivité en faveur du Cd et du Zn. Ces mutations pourraient être identifiées en suivant une approche similaire, par exemple en criblant des levures transformées par une banque de *PtNRAMP3.2* mutag  nis  s au hasard sur la base de leur incapacité à pousser en présence de Cd.

Enfin, pour aborder le rôle des mécanismes généraux de recyclage des nutriments dans la remobilisation des métaux, nous avons décidé de nous focaliser sur l'autophagie. Dans la



mesure où aucune donnée sur l'implication de l'autophagie dans le recyclage des métaux n'était disponible, des travaux ont été réalisés dans un premier temps chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ils ont permis de montrer que les mutants d'autophagie sont affectés dans leur gestion des métaux probablement en raison d'une faible efficacité de leur remobilisation. L'analyse des échantillons issus de l'expérience de marquage isotopique devrait permettre de confirmer clairement l'implication de l'autophagie dans l'efficacité de remobilisation des métaux. L'induction de l'autophagie au cours de la sénescence pourrait donc contribuer à améliorer la phytoextraction des métaux par le peuplier en limitant le retour au sol des ETM. Chez les plantes annuelles d'intérêt agronomique, l'induction de l'autophagie au cours de la sénescence monocarpique pourrait également contribuer à l'amélioration des rendements en grains ou à l'amélioration de leur qualité nutritive en métaux essentiels. Ces travaux ouvrent le champ, encore très peu exploré, de la recherche de facteurs génétiques contrôlant l'efficacité d'utilisation des métaux par les plantes (Metal Use Efficiency : MUE).

Ainsi, ce travail a permis d'explorer différentes stratégies pour limiter le retour au sol des métaux lors de la chute des feuilles chez le peuplier. L'efficacité de remobilisation des métaux au cours de la sénescence automnale pourrait être améliorée par induction, spécifiquement avant la chute des feuilles, des gènes codant pour PtNRAMP3.1 et PtNRAMP3.2 ainsi que des gènes permettant d'induire l'autophagie. L'induction spécifique au cours de la sénescence automnale pourrait être réalisée en plaçant les gènes d'intérêt sous contrôle d'un promoteur de protéase à cystéine (Bhalerao *et al.*, 2003 ; Couturier *et al.*, 2010). L'autophagie faisant intervenir plus de trente gènes (Yoshimoto, 2012), la voie la plus efficace pour son induction serait de moduler le processus en amont, par exemple en inhibant le complexe TOR qui réprime post-transcriptionnellement l'autophagie (Noda et Ohsumi, 1998 ; Kamada *et al.*, 2000).

Cependant, la remobilisation des métaux à partir des tissus sources ne dépend pas uniquement de la disponibilité des métaux dans ces tissus mais peut également nécessiter la création d'une force de puits. En effet, chez les plantes annuelles pour lesquelles des remobilisations de métaux ont été observées (Grusak, 1994 ; Wu *et al.*, 2010 ; Erenoglu *et al.*, 2011 ; Zheng *et al.*, 2012), la sénescence s'accompagne de la formation de nouveaux organes drainant les nutriments disponibles, les graines. Ainsi, la génération d'une force de puits au niveau des organes pérennes pourrait constituer un moteur puissant pour la remobilisation des ETM foliaires. Ceci pourrait être réalisée par expression spécifique, au niveau du parenchyme



du xylème, de transporteurs plasmalemmiques et tonoplastiques permettant le stockage des métaux dans ces tissus pérennes.

Finalement, l'amélioration de la phytoextraction du peuplier ne passe pas uniquement par l'augmentation de la remobilisation des métaux à partir des organes sénescents et l'amélioration de la force de puits des tissus récoltables. Il apparaît également essentiel, d'étudier aussi les moyens permettant d'augmenter les capacités d'absorption des ETM à partir du sol.

Ainsi, en cherchant à comprendre les mécanismes contrôlant le stockage et la remobilisation des métaux des feuilles, dans le cadre de l'amélioration de la phytoextraction du peuplier, ce travail de thèse a fait progresser les connaissances fondamentales sur l'homéostasie des métaux à travers l'identification d'un nouveau compartiment important pour leur stockage, l'identification de résidus conservés contrôlant la sélectivité des transporteurs NRAMP vis-à-vis des métaux et la mise en évidence du rôle de l'autophagie dans la remobilisation des métaux.





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abdel-Ghany, S.E., Muler-Moulé, P., Niyogi, K.K., Pilon, M. et Shikanai, T. (2005) Two P-Type ATPases Are Required for Copper Delivery in *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts. *The Plant Cell Online*, **17**, 1233-1251.
- Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B.N., Munjal, A.K., Baunthiyal, M. et Sharma, V. (2010) Metal Toxicity and Photosynthesis. *Photosynthesis: Overviews on recent progress and future perspectives* (Eds S Itoh, P Mohanty and KN Guruprasad) IK International Publishing House (Pvt) Limited, New Delhi.
- Alloway, B.J. (2005) Bioavailability of elements in soil. dans *Essentials of Medical Geology*: Springer, pp. 351-373.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. et Ecker, J.R. (1999) EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in Arabidopsis. *Science*, **284**, 2148-2152.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. et Ecker, J.R. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Andersson, A., Keskitalo, J., Sjodin, A., Bhalerao, R., Sterky, F., Wissel, K., Tandre, K., Aspeborg, H., Moyle, R. et Ohmiya, Y. (2004) A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome biology*, **5**, R24.
- Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D.J., Ecker, J.R., Puig, S. et Peñarrubia, L. (2006) The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal*, **45**, 225-236.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D. et Turner, R.G. (1971) Heavy metal tolerance in plants. *Advances in ecological research*, **7**, 1-85.
- Arambourou, H., Frasca, B., Haddad, A., Berkani, C.H., Mascher, N. et Van De Voorde, A. (2008) Possibilité de cultures sur les sols pollués d'Achères: Prise en compte du potentiel de dépollution de la culture.
- Argüello, J.M., Eren, E. et González-Guerrero, M. (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biomaterials*, **20**, 233-248.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, **50**, 601-639.
- Assunção, A.G.L., Martins, P.D.C., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. et Aarts, M.G.M. (2001) Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment*, **24**, 217-226.
- Assunção, A.G.L., Bleeker, P., Wilma, M., Vooijs, R. et Schat, H. (2008) Intraspecific variation of metal preference patterns for hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*: evidence from binary metal exposures. *Plant and Soil*, **303**, 289-299.
- Atici, Ö., Agar, G. et Battal, P. (2005) Changes in phytohormone contents in chickpea seeds germinating under lead or zinc stress. *Biologia Plantarum*, **49**, 215-222.
- Axelsen, K.B. et Palmgren, M.G. (2001) Inventory of the superfamily of P-Type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**, 696-706.
- Badger, M.R. et Price, G.D. (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, **45**, 369-392.
- Baize, D. (1997) *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols: France*: Editions Quae.
- Baize, D. (2000) Teneurs totales en «métaux lourds» dans les sols français. *Résultats généraux du programme Aspitet. Le Courrier de l'Environnement de l'Inra*, **39**, 39-54.
- Baize, D. et Tercé, M. (2002) *Les éléments traces métalliques dans les sols: approches fonctionnelles et spatiales*: Editions Quae.



- Baker, A.J.M.** (1981) Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, **3**, 643-654.
- Baker, A.J.M.** (1987) METAL TOLERANCE. *New Phytologist*, **106**, 93-111.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D. et McGrath, S.P.** (1991) *In situ* decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal-accumulating plants-a feasibility study. *In situ bioreclamation*. Boston, Butterworth-Heinemann, 600-605.
- Balk, J. et Lobreaux, S.** (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends in Plant Science*, **10**, 324-331.
- Banuelos, G.S., Ajwa, H.A., Mackey, B., Wu, L., Cook, C., Akohoue, S. et Zambruzuski, S.** (1997) Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. *Journal of Environmental Quality*, **26**, 639-646.
- Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conéjéro, G., Curie, C., Friml, J. et Vert, G.** (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, E450-E458.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C., Andreu, I. et Gunse, B.** (1986) Cadmium-Induced Decrease of Water Stress Resistance in Bush Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) I. Effects of Cd on Water Potential, Relative Water Content, and Cell Wall Elasticity. *Journal of plant physiology*, **125**, 17-25.
- Barcelo, J., Vazquez, M.D. et Poschenrieder, C.H.** (1988) Cadmium-induced structural and ultrastructural changes in the vascular system of bush bean stems. *Botanica acta*, **101**, 254-261.
- Baszynski, T., Tukendorf, A., Ruskowska, M., Skorzynska, E. et Maksymieci, W.** (1988) Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *Journal of plant physiology*, **132**, 708-713.
- Becher, M., Talke, I.N., Krall, L. et Krämer, U.** (2004) Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *The Plant Journal*, **37**, 251-268.
- Becker, J.D., Boavida, L.C., Carneiro, J., Haury, M. et Feijo, J.A.** (2003) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiology*, **133**, 713-725.
- Belouchi, A., Cellier, M., Kwan, T., Saini, H.S., Leroux, G. et Gros, P.** (1995) The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. *Plant Molecular Biology*, **29**, 1181-1196.
- Belouchi, A., Kwan, T. et Gros, P.** (1997) Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology*, **33**, 1085-1092.
- Benavides, M.a.P., Gallego, S.M. et Tomaro, M.a.L.** (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**, 21-34.
- Berezky, Z., Wang, H.-Y., Schubert, V., Ganai, M. et Bauer, P.** (2003) Differential regulation of NRAMP and IRT metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 24697-24704.
- Bernal, M., Testillano, P.S., Alfonso, M., Carmen Risueno, M.d., Picorel, R. et Yruela, I.** (2007) Identification and subcellular localization of the soybean copper P1B-ATPase GmHMA8 transporter. *Journal of Structural Biology*, **158**, 46-58.
- Bhalerao, R., Keskitalo, J., Sterky, F., Erlandsson, R., Björkbacka, H., Birve, S.J., Karlsson, J., Gardeström, P., Gustafsson, P., Lundeberg, J. et Jansson, S.** (2003) Gene Expression in Autumn Leaves. *Plant Physiology*, **131**, 430-442.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W. et Benfey, P.N.** (2003) A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science*, **302**, 1956-1960.
- Bleackley, M.R. et MacGillivray, R.T.A.** (2011) Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals*, **24**, 785-809.



- Borges, F., Gomes, G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijo, J.A. et Becker, J.D.** (2008) Comparative transcriptomics of Arabidopsis sperm cells. *Plant Physiology*, **148**, 1168-1181.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254.
- Bradshaw, H.D., Ceulemans, R., Davis, J. et Stettler, R.** (2000) Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation*, **19**, 306-313.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.-s., Penfold, C.A. et Jenkins, D.** (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell Online*, **23**, 873-894.
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S. et Baker, A.J.M.** (1994) Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc-and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, **23**, 1151-1157.
- Bughio, N., Yamaguchi, H., Nishizawa, N.K., Nakanishi, H. et Mori, S.** (2002) Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1677-1682.
- Burken, J.G. et Schnoor, J.L.** (1997) Uptake and Metabolism of Atrazine by Poplar Trees. *Environmental Science & Technology*, **31**, 1399-1406.
- Burken, J.G. et Schnoor, J.L.** (1999) Distribution and volatilization of organic compounds following uptake by hybrid poplar trees. *International Journal of Phytoremediation*, **1**, 139-151.
- Burnell, J.N.** (1986) Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase from C4 plants. *Functional Plant Biology*, **13**, 577-587.
- Cagelli, L. et Lefèvre, F.** (1995) The conservation of *Populus nigra* L. and gene flow with cultivated poplars in Europe. *Forest Genetics*, **2**, 135-144.
- Cailliatte, R.** (2008) Caractérisation physiologique et moléculaire de la famille de transporteurs de métaux NRAMP chez *Arabidopsis thaliana*. UMR 5004 Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes Supagro/CNRS/INRA/UM2-, Montpellier: Supagro. **Doctorat**, 138.
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.-F., Mari, S. et Curie, C.** (2009) The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal* **422**, 217-228.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J.-F., Mari, S. et Curie, C.** (2010) High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *The Plant Cell Online*, **22**, 904-917.
- Campo, S., Peris-Peris, C., Siré, C., Moreno, A.B., Donaire, L., Zytnicki, M., Notredame, C., Llave, C. et San Segundo, B.** (2013) Identification of a novel microRNA (miRNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the Nramp6 (Natural resistance-associated macrophage protein 6) gene involved in pathogen resistance. *New Phytologist*, **199**, 212-227.
- Carrell, C.J., Zhang, H., Cramer, W.A. et Smith, J.L.** (1997) Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure*, **5**, 1613-1625.
- Castiglione, S., Todeschini, V., Franchin, C., Torrigiani, P., Gastaldi, D., Cicatelli, A., Rinaudo, C., Berta, G., Biondi, S. et Lingua, G.** (2009) Clonal differences in survival capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: a large-scale field trial on heavily polluted soil. *Environmental Pollution*, **157**, 2108-2117.
- Cataldo, D.A., Garland, T.R. et Wildung, R.E.** (1983) Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant Physiology*, **73**, 844-848.
- Cellier, M., Privé, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W. et Gros, P.** (1995) Nramp defines a family of membrane proteins. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, **92**, 10089-10093.
- Cellier, M.F.** (2012) Nramp: From sequence to structure and mechanism of divalent metal import. dans *Metal Transporters*, Vol. 69, p. 249.
- Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S. et Pascual, C.** (2013) Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. *Environmental Science & Technology*, **46**, 13361-13369.



- Chaney, R.** (1983) Land Treatment of Hazardous Wastes constituents. dans *Plant uptake of inorganic waste* (J.E. Parr, P.B. Marsh, J.M. Kla et Ridge, P., eds). Washington DC: Noyes Data Corp.
- Chang, P., Kim, J.-Y. et Kim, K.-W.** (2005) Concentrations of arsenic and heavy metals in vegetation at two abandoned mine tailings in South Korea. *Environmental Geochemistry and Health*, **27**, 109-119.
- Chao, D.-Y., Silva, A., Baxter, I., Huang, Y.S., Nordborg, M., Danku, J., Lahner, B., Yakubova, E. et Salt, D.E.** (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**, e1002923.
- Chen, X.-Z., Peng, J.-B., Cohen, A., Nelson, H., Nelson, N. et Hediger, M.A.** (1999) Yeast SMF1 mediates H<sup>+</sup>-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 35089-35094.
- Chung, T., Phillips, A.R. et Vierstra, R.D.** (2010) ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. *The Plant Journal*, **62**, 483-493.
- Clarkson, D.T.** (1993) Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **341**, 5-17.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P. et Schroeder, J.I.** (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 12043-12048.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. et Kramer, U.** (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, **7**, 309-315.
- Clemens, S.** (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, **88**, 1707-1719.
- Clemens, S., Aarts, M.G.M., Thomine, S. et Verbruggen, N.** (2012) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, **18**, 92-99.
- Clough, S.J.** (2005) Floral dip: agrobacterium-mediated germ line transformation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **286**, 91-102.
- Cobbett, C. et Goldsbrough, P.** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, **53**, 159-182.
- Cohen, A., Nelson, H. et Nelson, N.** (2000) The Family of SMF Metal Ion Transporters in Yeast Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 33388-33394.
- Colangelo, E.P. et Guerinot, M.L.** (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 322-330.
- Connolly, E.L., Fett, J.P. et Guerinot, M.L.** (2002) Expression of the IRT1 Metal Transporter Is Controlled by Metals at the Levels of Transcript and Protein Accumulation. *The Plant Cell Online*, **14**, 1347-1357.
- Costa, G., Michaut, J.C. et Morel, J.L.** (1994) Influence of cadmium on water relations and gas exchanges, in phosphorus deficient *Lupinus albus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **32**, 105-114.
- Courel, M.t., Lallet, S., Camadro, J.-M. et Blaiseau, P.-L.** (2005) Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Molecular and cellular biology*, **25**, 6760-6771.
- Courville, P., Urbankova, E., Rensing, C., Chaloupka, R., Quick, M. et Cellier, M.F.M.** (2008) Solute carrier 11 cation symport requires distinct residues in transmembrane helices 1 and 6. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 9651-9658.
- Couturier, J., Doidy, J., Guinet, F., Wipf, D., Blaudez, D. et Chalot, M.** (2010) Glutamine, arginine and the amino acid transporter Pt-CAT11 play important roles during senescence in poplar. *Annals of Botany*, **105**, 1159-1169.
- Craciun, A.R., Meyer, C.-L., Chen, J., Roosens, N., De Groodt, R., Hilson, P. et Verbruggen, N.** (2012) Variation in HMA4 gene copy number and expression among *Noccaea caerulescens* populations presenting different levels of Cd tolerance and accumulation. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 4179-4189.
- Cunningham, S.D. et Berti, W.R.** (1993) Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **29**, 207-212.





- Curie, C., Alonso, J., Le Jean, M., Ecker, J. et Briat, J. (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.*, **347**, 749-755.
- Curie, C., Cassin, G.I., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P. et Mari, S.p. (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*, **103**, 1-11.
- d'Arcy-Lameta, A.s. (1986) Study of soybean and lentil root exudates. *Plant and Soil*, **92**, 113-123.
- D'Arcy, A.L. (1982) Study of soja and lentil exudates I. Kinetics of exudation of phenolic compounds, amino acids and sugars in the first days of plant growth. *Plant Soil*, **68**, 399-403.
- Dakora, F.D. et Phillips, D.A. (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, **245**, 35-47.
- Das, P., Samantaray, S. et Rout, G.R. (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, **98**, 29-36.
- Davis, J.A., Fuller, C.C. et Cook, A.D. (1987) A model for trace metal sorption processes at the calcite surface: Adsorption of  $Cd^{2+}$  and subsequent solid solution formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **51**, 1477-1490.
- De Filippis, L.F. et Pallaghy, C.K. (1994) Heavy metals: Sources and biological effects. *Algae and Water Pollution*, 31-77.
- Deneux-Mustin, S. (2003) Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces. *Influence des microorganismes du sol*. Paris: Tec & Doc-Lavoisier.
- Dère, C., Lamy, I., van Oort, F., Baize, D. et Cornu, S. (2006) Reconstitution des apports en éléments traces métalliques et bilan de leur migration dans un Luvisol sableux soumis à 100 ans d'irrigation massive par des eaux usées brutes. *Comptes Rendus Geoscience*, **338**, 565-573.
- Dickmann, D.I. et Kuzovkina, J. (2008) Poplars and willow of the world, with emphasis on silviculturally important species. dans *Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment* (Isebrands JG et J. R., eds). Rome: FAO/IPC, p. 135.
- Dinelli, E. et Lombini, A. (1996) Metal distributions in plants growing on copper mine spoils in Northern Apennines, Italy: the evaluation of seasonal variations. *Applied Geochemistry*, **11**, 375-385.
- Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R. et Vierstra, R.D. (2002) The APG8/12-activating Enzyme APG7 Is Required for Proper Nutrient Recycling and Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 33105-33114.
- Dominguez, M.T., Maranon, T., Murillo, J.M., Schulin, R. et Robinson, B.H. (2008) Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain: a large-scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution*, **152**, 50-59.
- Drew, A.P., Guth, R.L. et Greatbatch, W. (1987) *Variation in heavy metal accumulation by hybrid poplar clones on sludge amended soil*. Poplar Culture to the Year 2000. Proceedings of the Poplar Councils of the USA and Canada Joint Meeting. Ecological Society of China, Beijing.
- Durrett, T.P., Gassmann, W. et Rogers, E.E. (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiology*, **144**, 197-205.
- Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H. et Raskin, I. (1995) Rhizofiltration: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Aqueous Streams. *Environmental Science & Technology*, **29**, 1239-1245.
- Ebbs, S.D. et Kochian, L.V. (1997) Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, **26**, 776-781.
- Eckenwalder, J.E. (1996) Systematics and evolution of *Populus*. dans *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, Vol. 7, p. 32.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. et Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 5624-5628.
- Eklund, H., Uhlin, U., Farnegardh, M., Logan, D.T. et Nordlund, P. (2001) Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Progress in biophysics and molecular biology*, **77**, 177-268.



- Erenoglu, E.B., Kutman, U.B., Ceylan, Y., Yildiz, B. et Cakmak, I.** (2011) Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root-to-shoot translocation and remobilization of zinc ( $^{65}\text{Zn}$ ) in wheat. *New Phytologist*, **189**, 438-448.
- Ernst, W.H.O.** (1996) Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry*, **11**, 163-167.
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M. et Schaeffer, A.** (2007) Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, **68**, 989-1003.
- Fillatti, J.J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. et Comai, L.** (1987) Agrobacterium mediated transformation and regeneration of Populus. *Molecular and General Genetics MGG*, **206**, 192-199.
- Finney, L.A. et O'Halloran, T.V.** (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science Signaling*, **300**, 931-936.
- Fleming, M.D., Trenor, C.C., Su, M.A., Foernzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F. et Andrews, N.C.** (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature genetics*, **16**, 383-386.
- Forrest, L.R., Kramer, R. et Ziegler, C.** (2010) The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1807**, 167-188.
- Förstner, U.** (1985) Chemicals forms and reactivities of metals in sediments in "chemical methods for assessing bio-available metals in sludges and soil". *Leschber R., Davis R.D., L'Hermite P., CEC, Elsevier Applied Science publishers*, **1**, 30.
- Fourcroy, P., Siso-Terraza, P., Sudre, D., Saviron, M., Reyt, G., Gaymard, F., Abadia, A., Abadia, J., Alvarez-Fernandez, A. et Briat, J.-F.** (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency. *New Phytologist*, **201**, 155-167.
- Foy, C.D., Chaney, R.L. et White, M.C.** (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **29**, 511-566.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. et Tomaro, M.L.** (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, **121**, 151-159.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G. et Schumacher, K.** (2007) Plant proton pumps. *FEBS Letters*, **581**, 2204-2214.
- Ghnaya, T., Nouairi, I., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Abdelly, C. et Ghorbel, M.H.** (2005) Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of plant physiology*, **162**, 1133-1140.
- Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A. et Richaud, P.** (2004) AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Letters*, **561**, 22-28.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K. et Blatt, M.R.** (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal*, **64**, 355-365.
- Grill, E., Winnacker, E.-L. et Zenk, M.H.** (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, **230**, 674-676.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L. et Zenk, M.H.** (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, 6838-6842.
- Grispen, V.M.J., Hakvoort, H.W.J., Blik, T., Verkleij, J.A.C. et Schat, H.** (2011) Combined expression of the Arabidopsis metallothionein MT2b and the heavy metal transporting ATPase HMA4 enhances cadmium tolerance and the root to shoot translocation of cadmium and zinc in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, **72**, 71-76.
- Gross, J., Stein, R.J., Fett-Neto, A.G. et Fett, J.P.** (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*, **26**, 477-497.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. et Eide, D.** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 7220-7224.



- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M. et Gros, P.** (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *The Journal of experimental medicine*, **185**, 717-730.
- Grusak, M.A.** (1994) Iron transport to developing ovules of *Pisum sativum* (L. Seed import characteristics and phloem iron-loading capacity of source regions). *Plant Physiology*, **104**, 649-655.
- Guerinot, M.L.** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1465**, 190-198.
- Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M.-P., Avice, J.-C. et Masclaux-Daubresse, C.** (2012) Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. *New Phytologist*, **194**, 732-740.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L. et Hediger, M.A.** (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**, 482-488.
- Gussarsson, M., Asp, H., Adalsteinsson, S. et Jensen, P.** (1996) Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch [*Betula pendula*] by buthionine sulphoximine (BSO). *Journal of Experimental Botany* **47**, 211-215.
- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D. et Kramer, U.** (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, **453**, 391-395.
- Hanikenne, M., Kroymann, J., Trampczynska, A., Bernal, M., Motte, P., Clemens, S. et Kramer, U.** (2013) Hard selective sweep and ectopic gene conversion in a gene cluster affording environmental adaptation. *PLoS Genetics*, **9**, e1003707.
- Hawkins, S., Leplé, J.-C., Cornu, D., Jouanin, L. et Pilate, G.** (2003) Stability of transgene expression in poplar: a model forest tree species. *Annals of forest science*, **60**, 427-438.
- He, Z.L., Yang, X.E. et Stoffella, P.J.** (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **19**, 125-140.
- Hell, R.d. et Stephan, U.W.** (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, **216**, 541-551.
- Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A. et Ecker, J.R.** (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson Disease Related Copper Transporter, Is Required for Ethylene Signaling in Arabidopsis. *Cell*, **97**, 383-394.
- Hoj, P.B., Svendsen, I., Scheller, H.V. et Moller, B.L.** (1987) Identification of a chloroplast-encoded 9-kDa polypeptide as a 2 [4Fe-4S] protein carrying centers A and B of photosystem I. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 12676-12684.
- Horsburgh, M.J., Wharton, S.J., Karavolos, M. et Foster, S.J.** (2002) Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends in Microbiology*, **10**, 496-501.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F. et Cobbett, C.S.** (2004) P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with Roles in Essential Zinc Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **16**, 1327-1339.
- iDealMag** (2013). Plantes miraculeuses qui recyclent du poison. de [http://www.idealmag.org/Plantes-miraculeuses-qui-recyclent-du-poison\\_a618.html](http://www.idealmag.org/Plantes-miraculeuses-qui-recyclent-du-poison_a618.html).
- Induri, B.R., Ellis, D.R., Slavov, G.T., Yin, T., Zhang, X., Muchero, W., Tuskan, G.A. et DiFazio, S.P.** (2012) Identification of quantitative trait loci and candidate genes for cadmium tolerance in Populus. *Tree Physiology*, **32**, 626-638.
- Ishikawa, S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arai, T., Nishizawa, N.K. et Nakanishi, H.** (2012) Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 19166-19171.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsushashi, S. et Takahashi, M.** (2006) Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup>-phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *The Plant Journal*, **45**, 335-346.



- Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T., Sugimoto, K., Ono, K., Yano, M., Ishikawa, S. et Arao, T.** (2012) Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Scientific reports*, **2**, 286.
- Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S. et Gros, P.** (2000) Natural Resistance to Intracellular Infections Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 (Nramp1) Functions as a Ph-Dependent Manganese Transporter at the Phagosomal Membrane. *The Journal of experimental medicine*, **192**, 1237-1248.
- Jaffré, T., Pillon, Y., Thomine, S. et Merlot, S.** (2013) The metal hyperaccumulators from New Caledonia can broaden our understanding of nickel accumulation in plants. *Frontiers in plant science*, **4**, 279.
- Juste, C.** (1995) Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. *Convention ADEME-INRA*. ADEME.
- Kaiser, B.N., Moreau, S., Castelli, J., Thomson, R., Lambert, A., Bogliolo, S., Puppo, A. et Day, D.A.** (2003) The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *The Plant Journal*, **35**, 295-304.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. et Ohsumi, Y.** (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology*, **150**, 1507-1513.
- Kastori, R., Petrovic, M. et Petrovic, N.** (1992) Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition*, **15**, 2427-2439.
- Kelleher, C.T., Chiu, R., Shin, H., Bosdet, I.E., Krzywinski, M.I., Fjell, C.D., Wilkin, J., Yin, T., DiFazio, S.P., Ali, J., Asano, J.K., Chan, S., Cloutier, A., Girn, N., Leach, S., Lee, D., Mathewson, C.A., Olson, T., O'Connor, K., Prabhu, A.-L., Smailus, D.E., Stott, J.M., Tsai, M., Wye, N.H., Yang, G.S., Zhuang, J., Holt, R.A., Putnam, N.H., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J., Grimwood, J., Schmutz, J., Rokhsar, D., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Tuskan, G.A., Bohlmann, J., Ellis, B.E., Ritland, K., Douglas, C.J. et Schein, J.E.** (2007) A physical map of the highly heterozygous *Populus* genome: integration with the genome sequence and genetic map and analysis of haplotype variation. *The Plant Journal*, **50**, 1063-1078.
- Kim, Y.Y., Choi, H., Segami, S., Cho, H.T., Martinoia, E., Maeshima, M. et Lee, Y.** (2009) AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn (II) in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **58**, 737-753.
- Kobayashi, T. et Nishizawa, N.K.** (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 131-152.
- Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. et Nishizawa, N.K.** (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal*, **39**, 415-424.
- Korshunova, Y., Eide, D., Gregg Clark, W., Lou Guerinot, M. et Pakrasi, H.** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology*, **40**, 37-44.
- Kramer, U.** (2014). Kramer laboratory Web Site. Retrieved 25 January, 2014, de [http://www.ruhr-uni-bochum.de/pflaphy/Seiten\\_en/PG\\_Kraemer\\_e.html#MHN](http://www.ruhr-uni-bochum.de/pflaphy/Seiten_en/PG_Kraemer_e.html#MHN).
- Krämer, U., Talke, I.N. et Hanikenne, M.** (2007) Transition metal transport. *FEBS Letters*, **581**, 2263-2272.
- Krämer, U.** (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 517-534.
- Krumsiek, J., Arnold, R. et Rattei, T.** (2007) Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics*, **23**, 1026-1028.
- Küpper, H. et Kochian, L.V.** (2010) Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). *New Phytologist*, **185**, 114-129.
- Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Motto, H. et Raskin, I.** (1995) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science & Technology*, **29**, 1232-1238.
- Lamy, I.** (2004) Projet Epandagri, étude d'un secteur agricole pollué par des épandages d'eaux usées : bilan environnemental et possibilités de synthèse, Versailles: INRA, Unité de Science du Sol, 33.
- Lamy, I., Van Oort, F., Dère, C. et Baize, D.** (2006) Use of major-and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *European journal of soil science*, **57**, 731-740.





- Lanquar, V., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H. et Thomine, S. (2004) Regulation and Function of AtNRAMP4 Metal Transporter Protein. *Soil science and plant nutrition*, **50**, 1141-1150.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H. et Thomine, S. (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J*, **24**, 4041-4051.
- Lanquar, V., Ramos, M.S., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Kramer, U. et Thomine, S. (2010) Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency. *Plant Physiology*, **152**, 1986-1999.
- Larbi, A., Morales, F., Abadia, A., Gogorcena, Y., Lucena, J.J. et Abadia, J. (2002) Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. *Functional Plant Biology*, **29**, 1453-1464.
- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C. et Ceulemans, R. (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution*, **131**, 485-494.
- Lee, S. et An, G. (2009) Over-expression of *OsIRT1* leads to increased iron and zinc accumulations in rice. *Plant, Cell & Environment*, **32**, 408-416.
- Lee, Y.W., Klein, C.B., Kargacin, B., Salmikow, K., Kitahara, J., Dowjat, K., Zhitkovich, A., Christie, N.T. et Costa, M. (1995) Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Molecular and cellular biology*, **15**, 2547-2557.
- Leeuwenburgh, C. et Heinecke, J.W. (2001) Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medicinal chemistry*, **8**, 829-838.
- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., Guo, J., Chen, J. et Chen, R. (2013) Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (*ZIP*) gene family in maize. *BMC Plant Biology*, **13**, 114.
- Lill, R. et Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 352-356.
- Lill, R. et Muhlenhoff, U. (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **22**, 457-486.
- Liu, X.F., Supek, F., Nelson, N. et Culotta, V.C. (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* *BSD2* gene. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 11763-11769.
- Liu, X.F. et Culotta, V.C. (1999) Post-translation Control of Nramp Metal Transport in Yeast ROLE OF METAL IONS AND THE *BSD2* GENE. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 4863-4868.
- Lochlainn, S.O., Bowen, H.C., Fray, R.G., Hammond, J.P., King, G.J., White, P.J., Graham, N.S. et Broadley, M.R. (2011) Tandem quadruplication of *HMA4* in the zinc (Zn) and cadmium (Cd) hyperaccumulator *Noccaea caerulea*. *PLoS One*, **6**, e17814.
- Lopez-Millan, A.-F., Ellis, D.R. et Grusak, M.A. (2004) Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology*, **54**, 583-596.
- Lu, Y., Hall, D.A. et Last, R.L. (2011) A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, **23**, 1861-1875.
- Luk, E. et Culotta, V. (2001) Manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 47556-47562.
- MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A. et Eide, D.J. (2002) Biochemical Properties of Vacuolar Zinc Transport Systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 39187-39194.
- Macnair, M.R. (1987) Heavy metal tolerance in plants: A model evolutionary system. *Trends in ecology & evolution*, **2**, 354-359.
- Macpherson, G. (1995) *Home-grown energy from short-rotation coppice*: Farming Press Books and Videos.
- MacPherson, I.S. et Murphy, M.E.P. (2007) Type-2 copper-containing enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 2887-2899.



- Madhava Rao, K.V. et Sresty, T.V.S.** (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, **157**, 113-128.
- Marschner, H. et Marschner, P.** (2011) *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press.
- Masaoka, Y., Kojima, M., Sugihara, S., Yoshihara, T., Koshino, M. et Ichihara, A.** (1993) Dissolution of ferric phosphate by alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates. *Plant and Soil*, **155**, 75-78.
- Mathews, W.R., Wang, F., Eide, D.J. et Van Doren, M.** (2005) Drosophila fear of intimacy encodes a Zrt/IRT-like protein (ZIP) family zinc transporter functionally related to mammalian ZIP proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 787-795.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Habib Ghorbal, M. et El Ferjani, E.** (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science*, **127**, 129-137.
- McBride, M.B. et Cherney, J.** (2004) Molybdenum, sulfur, and other trace elements in farm soils and forages after sewage sludge application. *Communications in soil science and plant analysis*, **35**, 517-535.
- McGowen, S.L., Basta, N.T. et Brown, G.O.** (2001) Use of diammonium phosphate to reduce heavy metal solubility and transport in smelter-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, **30**, 493-500.
- McGrath, S.P. et Zhao, F.-J.** (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 277-282.
- Mench, M. et Martin, E.** (1991) Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. *Plant and Soil*, **132**, 187-196.
- Mertens, J., Vervaeke, P., Schrijver, A.D. et Luysaert, S.** (2004) Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of The Total Environment*, **326**, 209-215.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. et Noctor, G.** (2010) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 4197-4220.
- Migeon, A.** (2009) Etude de la variabilité naturelle dans la réponse du peuplier aux métaux : bases physiologiques et exploitation en phytoremédiation. *U.F.R Sciences et Techniques Biologiques*, Nancy: Université Henri Poincaré. **Doctorat**, 358.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M. et Blaudez, D.** (2009) Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water, Air, and Soil Pollution*, **204**, 89-101.
- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M., Richaud, P., Thomine, S. et Chalot, M.** (2010) Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 3763-3784.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Blaudez, D. et Chalot, M.** (2012) Hydroponic screening of poplar for trace element tolerance and accumulation. *International Journal of Phytoremediation*, **14**, 350-361.
- Minguzzi, C. et Vergnano, O.** (1948) Il contenuto del nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii* Desv. *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat.*, **Ser. A** 49-77.
- ministère de l'écologie, d.d.d.e.d.l.é.** (2013). Carte des sites pollués en France par commune. de <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/cartographie/ar/cartographie-interactive-geoidd-france.html>.
- Miyadate, H., Adachi, S., Hiraizumi, A., Tezuka, K., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Katou, K., Kodama, I., Sakurai, K. et Takahashi, H.** (2011) OsHMA3, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytologist*, **189**, 190-199.
- Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N. et Obata, H.** (2005) Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni<sup>2+</sup>-transport abilities. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**, 793-801.
- Molins, H.** (2010) analyse des mécanismes de sensibilité au Cd chez *Arabidopsis thaliana*: caractérisation de mutants hypersensibles. *U.F.R Scientifique d'Orsay*, Orsay: Université Paris-Sud. **Doctorat**, 74.



- Molins, H., Michelet, L., Lanquar, V., Agorio, A., Giraudat, J., Roach, T., Krieger-Liszkay, A. et Thomine, S.** (2013) Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplasts as a target for cadmium hypersensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 804-817.
- Moreau, S., Thomson, R.M., Kaiser, B.N., Trevaskis, B., Guerinot, M.L., Udvardi, M.K., Puppo, A. et Day, D.A.** (2002) GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 4738-4746.
- Morel, M.L., Crouzet, J.r.m., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A. et Richaud, P.** (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **149**, 894-904.
- Moreno, I., Norambuena, L., Maturana, D., Toro, M., Vergara, C., Orellana, A., Zurita-Silva, A. et Ordenes, V.R.** (2008) AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive  $Ca^{2+}$ /heavy metal pump. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 9633-9641.
- Morrissey, J., Baxter, I.R., Lee, J., Li, L., Lahner, B., Grotz, N., Kaplan, J., Salt, D.E. et Guerinot, M.L.** (2009) The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **21**, 3326-3338.
- Mortvedt, J.J. et Beaton, J.D.** (1995) Heavy metal and radionuclide contaminants in phosphate fertilizers. *Scope-scientific Committee on Problems of the Environment International Council of Scientific Unions*, **54**, 93-106.
- Munch, E.** (1930) Die Stoffbewegung in der Pflanze. *Gustav Fischer, Jena, Germany*.
- Nelson, B.K., Cai, X. et Nebenfuhr, A.** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal*, **51**, 1126-1136.
- Ness, P.J. et Woolhouse, H.W.** (1980) RNA Synthesis in *Phaseolus* Chloroplasts I. RIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS IN CHLOROPLAST PREPARATIONS FROM PHASEOLUS VULGARIS L. LEAVES AND SOLUBILIZATION OF THE RNA POLYMERASE. *Journal of Experimental Botany*, **31**, 223-233.
- Nieboer, E. et Richardson, D.H.S.** (1980) The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, **1**, 3-26.
- Nikko, E., Sullivan, J.A. et Pelham, H.R.B.** (2008) Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO reports*, **9**, 1216-1221.
- Nishida, S., Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J. et Mizuno, T.** (2011) AtIRT1, the Primary Iron Uptake Transporter in the Root, Mediates Excess Nickel Accumulation in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 1433-1442.
- Noda, T. et Ohsumi, Y.** (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 3963-3966.
- Nordberg, G.F.** (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **238**, 192-200.
- Nouet, C., Motte, P. et Hanikenne, M.** (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends in Plant Science*, **16**, 395-404.
- Nriagu, J.O. et Pacyna, J.M.** (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, **333**, 134-139.
- Obulareddy, N., Panchal, S. et Melotto, M.** (2013) Guard Cell Purification and RNA Isolation Suitable for High Throughput Transcriptional Analysis of Cell-Type Responses to Biotic Stresses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Oomen, R.J.F.J., Wu, J., Lelièvre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H., Aarts, M.G.M. et Thomine, S.** (2009) Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, **181**, 637-650.
- Oparka, K.J. et Turgeon, R.** (1999) Sieve Elements and Companion Cells—Traffic Control Centers of the Phloem. *Plant Cell*, **11**, 739-750.
- Palmer, C.M. et Guerinot, M.L.** (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature chemical biology*, **5**, 333-340.



- Palmgren, M.G.** (2001) Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Biology*, **52**, 817-845.
- Palmgren, M.G., Clemens, S., Williams, L.E., Kramer, U., Borg, S., Schjorring, J.K. et Sanders, D.** (2008) Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in Plant Science*, **13**, 464-473.
- Patrick, J.W. et Offler, C.E.** (2001) Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 551-564.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. et Kochian, L.V.** (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 4956-4960.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A. et Forestier, C.** (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal*, **32**, 539-548.
- Pierre, J.L. et Fontecave, M.** (1999) Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biometals*, **12**, 195-199.
- Polle, A. et Schutzendubel, A.** (2004) Heavy metal signalling in plants: linking cellular and organismic responses. dans *Plant responses to abiotic stress*: Springer, pp. 187-215.
- Ponka, P.** (1999) Cell biology of heme. *The American journal of the medical sciences*, **318**, 241.
- Portnoy, M.E., Liu, X.F. et Culotta, V.C.** (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Molecular and cellular biology*, **20**, 7893-7902.
- Pottier, M., Masclaux Daubresse, C., Yoshimoto, K. et Thomine, S.** (2014) Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds. *Frontiers in plant science*, **5**, 11.
- Prasad, K., Paradha Saradhi, P. et Sharmila, P.** (1999) Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, **42**, 1-10.
- Pregitzer, K.S., Dickmann, D.I., Hendrick, R. et Nguyen, P.V.** (1990) Whole-tree carbon and nitrogen partitioning in young hybrid poplars. *Tree Physiology*, **7**, 79-93.
- Pregitzer, K.S. et Friend, A.L.** (1996) The structure and function of Populus root systems. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. NRC Research Press, Ottawa, 331-354.
- Pulford, I.D. et Watson, C.** (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees a review. *Environment International*, **29**, 529-540.
- Punshon, T., Dickinson, N. et Lepp, N.** (1996) The potential of Salix clones for bioremediating metal polluted soil. dans *Heavy metals and trees, Meeting, Heavy metals and trees* (Institute of Chartered Foresters, Great Britain, Borders Regional Group, British Ecological Society et Forest Ecology Group, eds). Edinburgh, pp. 93-104.
- Punz, W.F. et Sieghardt, H.** (1993) The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany*, **33**, 85-98.
- Qiao, H., Shen, Z., Huang, S.-s.C., Schmitz, R.J., Urich, M.A., Briggs, S.P. et Ecker, J.R.** (2012) Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, **338**, 390-393.
- Rausser, W.E. et Dumbroff, E.B.** (1981) Effects of excess cobalt, nickel and zinc on the water relations of *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany*, **21**, 249-255.
- Reeves, R.D. et Baker, A.J.M.** (2000) Metal-accumulating plants. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Wiley, New York, 193-229.
- Robert, M. et Juste, C.** (1997) Stocks et flux d'éléments traces dans les sols du territoire. *Aspects sanitaires et environnementaux de l'épandage agricole des boues d'épuration urbaines ADEME Journées techniques des 5 et 6 juin 1997*. ADEME, 320.
- Robinson, B.H., Mills, T.M., Petit, D., Fung, L.E., Green, S.R. et Clothier, B.E.** (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil*, **227**, 301-306.
- Rodriguez-Celma, J., Vazquez-Reina, S., Orduna, J., Abadia, A., Abadia, J., Alvarez-Fernandez, A. et Lopez-Millan, A.-F.** (2011) Characterization of flavins in roots of Fe-deficient strategy I plants, with a focus on *Medicago truncatula*. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 2173-2189.





- Rodriguez-Celma, J., Lin, W.-D., Fu, G.-M., Abadia, J., Lopez-Millan, A.-F. et Schmidt, W. (2013) Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*.
- Rogers, E.E., Eide, D.J. et Guerinot, M.L. (2000) Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 12356-12360.
- Rosselli, W., Keller, C. et Boschi, K. (2003) Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil*, **256**, 265-272.
- Rout, G.R. et Das, P. (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, **23**, 3-11.
- Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B. et Merkle, S.A. (1998) Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology*, **16**, 925-928.
- Sacher, A., Cohen, A. et Nelson, N. (2001) Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1p expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Experimental Biology*, **204**, 1053-1061.
- Sairam, R.K. et Srivastava, G.C. (2002) Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, **162**, 897-904.
- Saitou, N. et Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Salt, D.E., Smith, R.D. et Raskin, I. (1998) PHYTOREMEDIATION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 643-668.
- Sanconon, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D.J. et Penarrubia, L. (2003) Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **51**, 577-587.
- Sanconon, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D.J. et Penarrubia, L. (2004) The Arabidopsis Copper Transporter COPT1 Functions in Root Elongation and Pollen Development. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 15348-15355.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C. et del Rio, L.A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 2115-2126.
- Sanita di Toppi, L. et Gabbrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, **41**, 105-130.
- Santi, S. et Schmidt, W. (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*, **183**, 1072-1084.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K. et Ma, J.F. (2012) NRAMP5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *The Plant Cell Online*, **24**, 2155-2167.
- Sauve, S., Hendershot, W. et Allen, H.E. (2000) Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environmental Science & Technology*, **34**, 1125-1131.
- Scherzer, A.J., Rebbeck, J. et Boerner, R.E.J. (1998) Foliar nitrogen dynamics and decomposition of yellow-poplar and eastern white pine during four seasons of exposure to elevated ozone and carbon dioxide. *Forest Ecology and Management*, **109**, 355-366.
- Schlegel, H., Godbold, D.L. et Huttermann, A. (1987) Whole plant aspects of heavy metal induced changes in CO<sub>2</sub> uptake and water relations of spruce (*Picea abies*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, **69**, 265-270.
- Schutzendubel, A. et Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1351-1365.
- Sebastiani, L., Scebba, F. et Tognetti, R. (2004) Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* x *maximowiczii*) and I-214 (*P. x euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany*, **52**, 79-88.
- Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S. et Expert, D. (2009) NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal*, **58**, 195-207.



- Seigneurin-Berny, D., Grivot, A., Auroy, P., Mazard, C., Kraut, A., Finazzi, G., Grunwald, D., Rappaport, F., Vavasseur, A., Joyard, J., Richaud, P. et Rolland, N. (2006) HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 2882-2892.
- Shikanai, T., Muler-Moulé, P., Munekage, Y., Niyogi, K.K. et Pilon, M. (2003) PAA1, a P-Type ATPase of Arabidopsis, Functions in Copper Transport in Chloroplasts. *The Plant Cell Online*, **15**, 1333-1346.
- Siemianowski, O., Mills, R.F., Williams, L.E. et Antosiewicz, D.M. (2011) Expression of the P1B-type ATPase AtHMA4 in tobacco modifies Zn and Cd root to shoot partitioning and metal tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, **9**, 64-74.
- Silverberg, B.A. (1976) Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia*, **15**, 155-159.
- Sjödin, A., Street, N.R., Sandberg, G., Gustafsson, P. et Jansson, S. (2009) The Populus Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. *New Phytologist*, **182**, 1013-1025.
- Smith, R. et Bradshaw, A. (1972) Stabilization of toxic mine wastes by the use of tolerant plant populations. *Transactions of The Institution of Mining and Metallurgy*, **81**, 230-237.
- Société Chimique de France (2012). Société Chimique de France. Retrieved 23 August, 2013, de <http://www.societechimiquedefrance.fr/extras/Donnees/metaux/zn/texzn.htm>.
- Sondergaard, T.E., Schulz, A. et Palmgren, M.G. (2004) Energization of Transport Processes in Plants. Roles of the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiology*, **136**, 2475-2482.
- Stacey, M.G., Patel, A., McClain, W.E., Mathieu, M., Remley, M., Rogers, E.E., Gassmann, W., Blevins, D.G. et Stacey, G. (2008) The Arabidopsis AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiology*, **146**, 589-601.
- Stephan, U.W., Schmidke, I., Stephan, V.W. et Scholz, G. (1996) The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *Biometals*, **9**, 84-90.
- Stimpson, H.E.M., Lewis, M.J. et Pelham, H.R.B. (2006) Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *The EMBO Journal*, **25**, 662-672.
- Sullivan, J.A., Lewis, M.J., Nikko, E. et Pelham, H.R.B. (2007) Multiple interactions drive adaptor-mediated recruitment of the ubiquitin ligase rsp5 to membrane proteins in vivo and in vitro. *Molecular biology of the cell*, **18**, 2429-2440.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. et Nelson, N. (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 5105-5110.
- Suzuki, M., Takahashi, M., Tsukamoto, T., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Yazaki, J., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Nakanishi, H. et Mori, S. (2006) Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley. *The Plant Journal*, **48**, 85-97.
- T. Villafort Carvalho, M., Carvalho Amaral, D., Guimarães Guilherme, L.R. et Aarts, M.G.M. (2013) *Gomphrena claussenii*, the first South American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. *Frontiers in plant science*, **4**.
- Takagi, S.i., Nomoto, K. et Takemoto, T. (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *Journal of Plant Nutrition*, **7**, 469-477.
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Nakanishi, H. et Nishizawa, N.K. (2011a) Role of the iron transporter OsNRAMP1 in cadmium uptake and accumulation in rice. *Plant signaling & behavior*, **6**, 1813-1816.
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Senoura, T., Shimo, H., Ishikawa, S., Arai, T., Nakanishi, H. et Nishizawa, N.K. (2011b) The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 4843-4850.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. et Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Tanaka, M., Wallace, I.S., Takano, J., Roberts, D.M. et Fujiwara, T. (2008) NIP6; 1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **20**, 2860-2875.



- Taylor, G.** (2002) *Populus: Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany*, **90**, 681-689.
- techniques-ingénieur** (2013). Techniques de l'Ingénieur. Retrieved 22 August, 2013, de [www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/metallurgie-extractive-et-recyclage-des-metaux-de-transition-42369210/metallurgie-du-zinc-m2270/metallurgie-du-zinc-introduction-m2270v2avprop0001.html](http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/metallurgie-extractive-et-recyclage-des-metaux-de-transition-42369210/metallurgie-du-zinc-m2270/metallurgie-du-zinc-introduction-m2270v2avprop0001.html).
- Terry, N. et Abadia, J.** (1986) Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition*, **9**, 609-646.
- Tessier, D.** (2009) POLLUTION DES SOLS APRES 100 ANS D'IRRIGATION AVEC DES EAUX USEES: CAS DES SOLS AGRICOLES DE LA PLAINE DE PIERRELAIE-BESSANCOURT (95). *Comptes rendus de l'Académie d'agriculture de France*, **95**, 33-34.
- Thévenod, F.** (2009) Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology*, **238**, 221-239.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. et Schroeder, J.I.** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* **97**, 4991-4996
- Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I. et Barbier-Brygoo, H.** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal*, **34**, 685-695.
- Thomine, S. et Vert, G.** (2013) Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**, 322-327.
- Tommos, C., Hoganson, C.W., Di Valentin, M., Lydak-Simantiris, N., Dorlet, P., Westphal, K., Chu, H.-A., McCracken, J. et Babcock, G.T.** (1998) Manganese and tyrosyl radical function in photosynthetic oxygen evolution. *Current opinion in chemical biology*, **2**, 244-252.
- Tropico** (2013). Tropico, la vie du coté top. Retrieved 26 August, 2013, de <http://www.topito.com/top-arbres-plus-remarquables-monde>.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S. et Salamov, A.** (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, **313**, 1596-1604.
- Umar, S., Diva, I., Anjum, N.A. et Iqbal, M.** (2008) Potassium nutrition reduces cadmium accumulation and oxidative burst in mustard (*Brassica campestris* L.). *Electronic International Fertilizer Correspondent*, **16**, 6-10.
- Unterbrunner, R., Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Tlustos, P., Zupan, M. et Wenzel, W.W.** (2007) Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environmental Pollution*, **148**, 107-114.
- Uraguchi, S., Kamiya, T., Sakamoto, T., Kasai, K., Sato, Y., Nagamura, Y., Yoshida, A., Kyojuka, J., Ishikawa, S. et Fujiwara, T.** (2011) Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 20959-20964.
- Van Bel, A.J.E.** (1990) Xylem-Phloem Exchange Via the Rays: The Undervalued Route of Transport. *Journal of Experimental Botany*, **41**, 631-644.
- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.-I. et Kunze, R.** (2006) Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, **141**, 776-792.
- Vandecasteele, B., Samyn, J.r., De Vos, B. et Muys, B.** (2008) Effect of tree species choice and mineral capping in a woodland phytostabilisation system: A case-study for calcareous dredged sediment landfills with an oxidised topsoil. *ecological engineering*, **32**, 263-273.
- Vangronsveld, J., Colpaert, J.V. et Van Tichelen, K.K.** (1996) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: Physico-chemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. *Environmental Pollution*, **94**, 131-140.
- Vassilev, A. et Yordanov, I.** (1997) Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium-treated plants: a review. *Bulg. J. Plant Physiol*, **23**, 114-133.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C. et Hitmi, A.** (2007) Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere*, **68**, 1563-1575.



- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. et Richaud, P.** (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters*, **576**, 306-312.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.-F. et Curie, C.** (2002) IRT1, an arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, **14**, 1223-1233.
- Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E. et Gros, P.** (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, **73**, 469-485.
- Vidal, S.M., Pinner, E., Lepage, P., Gauthier, S. et Gros, P.** (1996) Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *The Journal of Immunology*, **157**, 3559-3568.
- Von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.-F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A. et Hider, R.C.** (1999) Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology*, **119**, 1107-1114.
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T. et Makino, A.** (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology*, **149**, 885-893.
- Walker, E.L. et Connolly, E.L.** (2008) Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 530-535.
- Waters, B.M. et Grusak, M.A.** (2008) Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line ysl1yls3. *New Phytologist*, **177**, 389-405.
- Waters, B.M. et Sankaran, R.P.** (2011) Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science*, **180**, 562-574.
- Wei, W., Chai, T., Zhang, Y., Han, L., Xu, J. et Guan, Z.** (2009) The *Thlaspi caerulescens* NRAMP Homologue TcNRAMP3 is Capable of Divalent Cation Transport. *Molecular Biotechnology*, **41**, 15-21.
- Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., Jiang, L. et Guo, H.** (2012) Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell research*, **22**, 1613-1616.
- West, A.H., Clark, D.J., Martin, J., Neupert, W., Hartl, F.-U. et Horwich, A.L.** (1992) Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 24625-24633.
- Wilkins, O., Nahal, H., Foong, J., Provart, N.J. et Campbell, M.M.** (2009) Expansion and Diversification of the Populus R2R3-MYB Family of Transcription Factors. *Plant Physiology*, **149**, 981-993.
- Williams, L.E. et Mills, R.F.** (2005) P1B-ATPases an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends in Plant Science*, **10**, 491-502.
- Woeste, K.E. et Kieber, J.J.** (2000) A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *The Plant Cell Online*, **12**, 443-455.
- Wong, C.K.E. et Cobbett, C.S.** (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, **181**, 71-78.
- Wu, C.-y., Lu, L.-l., Yang, X.-e., Feng, Y., Wei, Y.-y., Hao, H.-l., Stoffella, P.J. et He, Z.-l.** (2010) Uptake, translocation, and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. *Journal of agricultural and food chemistry*, **58**, 6767-6773.
- Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T. et Ma, J.F.** (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 18381-18385.
- Xia, J., Yamaji, N. et Ma, J.F.** (2011) Further characterization of an aluminum influx transporter in rice. *Plant signaling & behavior*, **6**, 160-163.
- Xu, Y.-G., Wang, B.-S., Yu, J.-J., Ao, G.-M. et Zhao, Q.** (2010) Cloning and characterisation of ZmZLP1, a gene encoding an endoplasmic reticulum-localised zinc transporter in *Zea mays*. *Functional Plant Biology*, **37**, 194-205.





- Yamaji, N., Huang, C.F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y. et Ma, J.F.** (2009) A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *The Plant Cell Online*, **21**, 3339-3349.
- Yamaji, N. et Ma, J.F.** (2009) A transporter at the node responsible for intervascular transfer of silicon in rice. *The Plant Cell Online*, **21**, 2878-2883.
- Yamaji, N., Sasaki, A., Xia, J.X., Yokosho, K. et Ma, J.F.** (2013) A node-based switch for preferential distribution of manganese in rice. *Nature communications*, **4**.
- Yamamoto, Y., Hachiya, A. et Matsumoto, H.** (1997) Oxidative Damage to Membranes by a Combination of Aluminum and Iron in Suspension-Cultured Tobacco Cells. *Plant and Cell Physiology*, **38**, 1333-1339.
- Yang, M., Zhang, W., Dong, H., Zhang, Y., Lv, K., Wang, D. et Lian, X.** (2013) OsNRAMP3 is a vascular bundles-specific manganese transporter that is responsible for manganese distribution in rice. *PLoS One*, **8**, e83990.
- Yen, M.R., Tseng, Y.H. et Saier, M.H.** (2001) Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiology*, **147**, 2881-2883.
- Yoshimoto, K.** (2012) Beginning to Understand Autophagy, an Intracellular Self-Degradation System in Plants. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 1355-1365.
- Yruela, I.** (2013) Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*, **5**, 1090-1109.
- Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G.S., Iori, V., Pietrosanti, L. et Massacci, A.** (2009) Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water, Air, and Soil Pollution*, **197**, 23-34.
- Zelisko, A., Garcia-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S. et Funk, C.** (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, **102**, 13699-13704.
- Zhang, M., Liu, X., Yuan, L., Wu, K., Duan, J., Wang, X. et Yang, L.** (2011) Transcriptional profiling in cadmium-treated rice seedling roots using suppressive subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry*, **50**, 79-86.
- Zhang, Y. et Gladyshev, V.N.** (2009) Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chemical reviews*, **109**, 4828-4861.
- Zhao, H. et Eide, D.** (1996a) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 2454-2458.
- Zhao, H. et Eide, D.** (1996b) The ZRT2 Gene Encodes the Low Affinity Zinc Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 23203-23210.
- Zheng, L., Yamaji, N., Yokosho, K. et Ma, J.F.** (2012) YSL16 is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice. *The Plant Cell Online*, **24**, 3767-3782.
- Zorrig, W., Rouached, A.d., Shahzad, Z., Abdelly, C., Davidian, J.-C. et Berthomieu, P.** (2010) Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *Journal of plant physiology*, **167**, 1239-1247.



## ANNEXES

---

### **Annexe I : The iron and manganese transporter AtNRAMP5 contributes to male fertility in *Arabidopsis thaliana***

Mathieu Pottier<sup>1</sup>, Camille Roux<sup>1,4</sup>, Hannetz Roschztardt<sup>2,3</sup>, Viviane Lanquar<sup>1,5</sup>, Ronald Oomen<sup>1,2</sup>, Jérôme Giraudat<sup>1</sup>, Catherine Curie<sup>2</sup>, Sébastien Thomine<sup>1</sup>

1 Institut des Sciences du Végétal, Saclay Plant Sciences, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, FRANCE

2 Biochimie et physiologie Moléculaire des Plantes, Institut de Biologie Intégrative des Plantes, UMR 5004 CNRS/UMR 0386 INRA/Montpellier SupAgro/Université Montpellier 2, 34060 Montpellier Cedex 2, FRANCE

3 Department of Botany, University of Wisconsin-Madison, 430 Lincoln Drive, Madison, WI 53706, USA

4 current address : Institut des Sciences de l'Evolution, UMR 5554, CNRS/Université Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 05, FRANCE

5 current address: Department of Plant Biology, Carnegie Institution for Science, 260 Panama Street, Stanford, CA 94305, USA

One of the currently best-established relationships between male fertility and resources at the plant scale highlights the importance of transition metals. The *NRAMP* gene family encodes proteins mediating the transport of a wide range of transition metals in prokaryotic and eukaryotic cells. Here, we identified AtNRAMP5 as a major contributor to male fertility.

Expression in yeast shows that AtNRAMP5 complements the growth defect of *smf2* mutant, which is impaired in intracellular Mn<sup>2+</sup> trafficking. AtNRAMP5 expression also leads to a strong increase in yeast manganese and iron concentrations.

AtNRAMP5 is highly and specifically expressed in pollen and AtNRAMP5 ectopic expression in *Arabidopsis thaliana* vegetative tissues is deleterious. During the last stages of pollen development, AtNRAMP5 is suddenly activated and becomes one of the ≈3% highest expressed loci. *In vivo* competition between a wild-type and a disrupted allele of AtNRAMP5 shows a significant segregation bias towards the wild type allele. Expression of AtNRAMP5 fused to GFP under its own promoter restores normal transmission. Microscopic observation shows that AtNRAMP5-GFP is localized in intracellular compartments of mature pollen and pollen tubes. Perls/DAB staining reveals that iron is concentrated in intracellular compartments in wild-type mature pollen, whereas this pattern of iron staining is disrupted in *nramp5* mutant. All together, our results provide insights into the role of transition metals during an important step of the life cycle through the action of a highly expressed transporter.

Keywords : metal, pollen tube, fitness, mitochondria



## Annexe II : Milieux

### Milieu ABIS solide

Macroéléments :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,5mM,  $\text{KNO}_3$  5mM,  $\text{MgSO}_4$  2mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2mM.

Microéléments :  $\text{H}_3\text{BO}_3$  100 $\mu\text{M}$ , KI 5 $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  30 $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  1 $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0,1 $\mu\text{M}$ ,  $\text{CoCl}_2$  0,1 $\mu\text{M}$

MES 1mM, Saccharose 1% [m/v], Phytigel/agar M lavé\* 0,5% [m/v]

Ajustement du pH à 6,1 par KOH.

Suivant les conditions, 25 $\mu\text{M}$  de  $\text{MnSO}_4$ , 50 à 100 $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{3+}$ HBED et/ou 10 à 30 $\mu\text{M}$  de CdCl filtrés sont ajoutés après autoclavage des milieux.

\*Agar M lavé : 20g d'Agar M (Sigma A4800) est lavé dans une éprouvette de 2L (précédemment lavée à l'EDTA et rincée à l'eau milliQ). L'agar resuspendu dans 2L d'EDTA à 25 mM est mis à agiter pendant 6h. Après décantation (1h), le surnageant est éliminé *via* une pompe à vide. Suivant la même procédure deux nouveaux lavages (16h/ 6h) sont réalisés. L'agar est ensuite rincé 4 fois (4h/16h/4h/4h) avec de l'eau milliQ de la même façon que lors du lavage à l'EDTA

### Milieu Hoagland liquide

Macroéléments :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.28mM,  $\text{KNO}_3$  1.25mM,  $\text{MgSO}_4$  0.75mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1.5mM.

Microéléments :  $\text{H}_3\text{BO}_3$  25 $\mu\text{M}$ , KCl 50 $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  1 $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.1 $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0,5 $\mu\text{M}$ , 3mM, 5 $\mu\text{M}$  de  $\text{MnSO}_4$ MES-KOH, pH 5.7.

Suivant les milieux 10 $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{3+}$ HBED (+Fe) ou 20 $\mu\text{M}$  de ferrozine (-Fe) sont ajoutés aux milieux.

### Tampon d'extraction des protéines:

Hepes 50 mM ajusté à pH7.2 avec NaOH,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, Glycérol, 10%, Triton 1%, PMSF 2 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM et 1X cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche, Germany)

**Laemmli (1X):** SDS 2.5% [m/v], Tris-HCl 62,5 mM pH6,8, glycérol 10% [m/v], bleu de bromophénol 0,004% [m/v], DTT 130mM.

**Tampon d'électrophorèse :** Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% [m/v]

**TBS-T :** Tris 10 mM, pH7,5, NaCl 154 mM, Tween 0,1 à 0,3 % [v/v]

### Milieu YPD (A) (Yeast extract/Peptone/Dextrose) :

Bacto-yeast extract 1% (DIFCO), bacto-peptone 2% (DIFCO), D-glucose 2% (ajouté après l'autoclavage), (d'Adénine 40mg/L), pH 5.8 avec du KOH et bacto agar 2% (DIFCO) pour les milieux solides.

### Milieu SD (synthetic dextrose)

Yeast nitrogen base 0,67% (SIGMA), Glucose 2% [m/v], MES 50 mM pH6 avec du KOH et bacto agar 2 % (DIFCO) pour les milieux solides.



**Annexe III : Amorces qPCR**

chapitre	Nom	Amorce sens	Amorce anti-sens
III \ IV	QUBC10	CCATATCCAAGGTATTGCTCTCC	CGTCTCATACTTGTTCTGTGG
III \ IV	QPP2A	TTCCTGATGTGCGACTGAAC	CTCCAATGCCTATCCTCTGC
III \ IV	QEF1-A	CACACCTGTCACATTGCTG	ACCAGCATCACCGTTCTTCAG
IV	QACT	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
IV	QUBQ	GTTGATTTTTGCTGGGAAGC	GATCTTGGCCTTCACGTTGT
IV	QTUB	GCACCAACTTGTTGAGAATGC	TTTCAACTGACCAGGGAACC
III \ IV	QPTNRAMP1	GCCAGCACTGGAAATAGGAG	TTGTATTGCGCTCCTGACTG
III \ IV	QPTNRAMP2	ATGCAGATTCCTTTCGCACT	CCGATCAGAAAGCCAAAGAG
IV	QPTNRAMP3S	TGACATTTGCGTGGATGTTT	ATTGTGGTTCGATCTCCCTTG
III \ IV	QPTNRAMP3.1	TTGTAGCTGCCTTGGTGATG	GATCGCTGGCAACAGAACT
III \ IV	QPTNRAMP3.2	CAGACACCAGCCATCTTGAA	CCCAGGACCAGTAAACAACC
IV	QPTNRAMP7S	GTGCTGGGAAAATCAAGCTC	GATGATTAGTCGGCCTGCTC
III	QPTHMA1	AAACCACCACTCTCCGTAC	GTGGATCTGGGAGGATGAGA
III	QPTHMA2	ATCCTGTCTACACCGGTTGC	CCGCCATAGGATGACTTGAT
III	QPTZIP4	GGTGAAATGATAACGCAGCA	GGTGAAATGATAACGCAGCA
III	QPTNAP	TTCGTAACCAAGCCACATCC	GCCTTCCAGTACCCTGACAC
III	QPTCP	AGTCACTGAGAAAGGCTGTGG	CCAAATGGATTGTTCTTGCTC
VI	QATG5	GAAGATCTGGAAGATGCACCA	TCACCTTCTTCTATGCATGGTT





## **Résumé :**

Depuis le début des années 1990, différentes stratégies de phytoremédiation ont été proposées pour réhabiliter les zones polluées par des éléments traces métalliques (ETM). Parmi ces stratégies, la phytoextraction consiste en l'absorption et l'accumulation par les plantes des ETM présents dans les sols. Afin de mettre en place cette stratégie, il a été proposé d'utiliser le peuplier en raison de sa croissance rapide, de son importante biomasse et de ses débouchés énergétiques. Cependant une proportion considérable des métaux absorbés par cet arbre est accumulée dans les feuilles alors que celles-ci chutent à l'automne. Ainsi, l'efficacité de phytoextraction du peuplier peut se trouver limitée si aucun mécanisme de remobilisation des ETM n'est mis en place au cours de la sénescence automnale. Dans ce contexte, une partie des travaux de cette thèse a été réalisée sur la parcelle expérimentale de Pierrelaye polluée suite à l'épandage d'eaux usées de la ville de Paris. Nous avons recherché parmi les 14 génotypes de peuplier présents sur le site, ceux qui sont le plus efficaces pour remobiliser les métaux des feuilles vers les parties pérennes. Des mesures de contenu en métaux, d'expression de gènes et des analyses corrélatives ont ouvert de nouvelles pistes concernant la gestion des métaux foliaires. Parce que la vacuole constitue le principal lieu de stockage des métaux de la cellule, les protéines d'efflux vacuolaire NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) précédemment identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, représentent de bons candidats pour stimuler la remobilisation des métaux foliaires. La caractérisation de leurs homologues chez le peuplier a donc été entreprise par expression chez la levure et chez *A. thaliana*. Afin de contrôler indépendamment le transport des métaux essentiels et non-essentiels chez les NRAMP, une étude visant à identifier les déterminants structuraux impliqués dans leur sélectivité a été réalisée. La caractérisation des mutants NRAMP affectés dans leur sélectivité par expression chez *A. thaliana* a mis en lumière leur impact sur l'accumulation et la tolérance aux métaux. Dans le but d'étudier l'implication de mécanismes plus généraux de recyclage des nutriments dans la remobilisation des métaux au cours de la sénescence foliaire, le rôle de l'autophagie a été testé chez *A. thaliana*. L'étude de plantes déficientes pour l'autophagie a montré l'implication de ce mécanisme dans l'efficacité d'utilisation des métaux et probablement dans leur remobilisation au cours de la sénescence. En combinant des études en champ sur le peuplier et de génétique moléculaire chez *Arabidopsis*, ce travail permet de proposer différentes pistes pour diminuer spécifiquement l'accumulation des ETM dans les feuilles de peuplier.

**Mots-clés :** phytoextraction, *Populus*, transporteur, élément trace métallique, autophagie, sélectivité

---

## **Abstract:**

Since the early 1990s, various strategies have been proposed to rehabilitate trace element (TE) polluted areas by phytoremediation. Among these strategies, phytoextraction consists in TE uptake from soil and accumulation by plants. To implement this strategy, it has been proposed to use poplar due to its fast growth, its large biomass and its use in energy production. However, a substantial proportion of absorbed metals is accumulated in poplar leaves which fall in autumn. Thus, poplar phytoextraction efficiency may be limited if TE are not remobilized during autumn senescence. In this context, part of this thesis work has been carried out on the experimental field of Pierrelaye which was polluted by the spreading of sewage water from Paris. Among the 14 poplar genotypes growing on the field, we tried to identify those that efficiently remobilize leaf metals to perennial organs. Metal content, gene expression and correlative analyses have been undertaken, providing new insight in the management of metals in leaves. Because the vacuole is the main metal storage compartment in the cell, NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) vacuolar efflux proteins previously identified in *Arabidopsis thaliana* are good candidates to enhance leaf metal remobilization. Characterization of their homologues in poplar was therefore undertaken by expression in yeast and in *A. thaliana*. In order to independently control the transport of essential and non-essential metals by NRAMP, a study aiming to identify the structural determinants involved in selectivity was undertaken. Expression of NRAMP mutants affected in their selectivity in *A. thaliana* highlighted their impact on metal accumulation and tolerance. To study the involvement of more general nutrient recycling mechanisms in metal remobilization during leaf senescence, the involvement of autophagy was tested in *A. thaliana*. Physiological characterization of autophagy deficient plants indicated that this mechanism plays a role in metal use efficiency and probably in metal remobilization during senescence. By combining a field approach on poplar and molecular genetics in *Arabidopsis*, this work opens multiple perspectives to specifically reduce the accumulation of TE in poplar leaves.

**Keywords:** phytoextraction, *Populus*, transporter, heavy metal, autophagy, selectivity





## **Résumé :**

Depuis le début des années 1990, différentes stratégies de phytoremédiation ont été proposées pour réhabiliter les zones polluées par des éléments traces métalliques (ETM). Parmi ces stratégies, la phytoextraction consiste en l'absorption et l'accumulation par les plantes des ETM présents dans les sols. Afin de mettre en place cette stratégie, il a été proposé d'utiliser le peuplier en raison de sa croissance rapide, de son importante biomasse et de ses débouchés énergétiques. Cependant une proportion considérable des métaux absorbés par cet arbre est accumulée dans les feuilles alors que celles-ci chutent à l'automne. Ainsi, l'efficacité de phytoextraction du peuplier peut se trouver limitée si aucun mécanisme de remobilisation des ETM n'est mis en place au cours de la sénescence automnale. Dans ce contexte, une partie des travaux de cette thèse a été réalisée sur la parcelle expérimentale de Pierrelaye polluée suite à l'épandage d'eaux usées de la ville de Paris. Nous avons recherché parmi les 14 génotypes de peuplier présents sur le site, ceux qui sont le plus efficaces pour remobiliser les métaux des feuilles vers les parties pérennes. Des mesures de contenu en métaux, d'expression de gènes et des analyses corrélatives ont ouvert de nouvelles pistes concernant la gestion des métaux foliaires. Parce que la vacuole constitue le principal lieu de stockage des métaux de la cellule, les protéines d'efflux vacuolaire NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) précédemment identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, représentent de bons candidats pour stimuler la remobilisation des métaux foliaires. La caractérisation de leurs homologues chez le peuplier a donc été entreprise par expression chez la levure et chez *A. thaliana*. Afin de contrôler indépendamment le transport des métaux essentiels et non-essentiels chez les NRAMP, une étude visant à identifier les déterminants structuraux impliqués dans leur sélectivité a été réalisée. La caractérisation des mutants NRAMP affectés dans leur sélectivité par expression chez *A. thaliana* a mis en lumière leur impact sur l'accumulation et la tolérance aux métaux. Dans le but d'étudier l'implication de mécanismes plus généraux de recyclage des nutriments dans la remobilisation des métaux au cours de la sénescence foliaire, le rôle de l'autophagie a été testé chez *A. thaliana*. L'étude de plantes déficientes pour l'autophagie a montré l'implication de ce mécanisme dans l'efficacité d'utilisation des métaux et probablement dans leur remobilisation au cours de la sénescence. En combinant des études en champ sur le peuplier et de génétique moléculaire chez *Arabidopsis*, ce travail permet de proposer différentes pistes pour diminuer spécifiquement l'accumulation des ETM dans les feuilles de peuplier.

**Mots-clés :** phytoextraction, *Populus*, transporteur, élément trace métallique, autophagie, sélectivité

---

## **Abstract:**

Since the early 1990s, various strategies have been proposed to rehabilitate trace element (TE) polluted areas by phytoremediation. Among these strategies, phytoextraction consists in TE uptake from soil and accumulation by plants. To implement this strategy, it has been proposed to use poplar due to its fast growth, its large biomass and its use in energy production. However, a substantial proportion of absorbed metals is accumulated in poplar leaves which fall in autumn. Thus, poplar phytoextraction efficiency may be limited if TE are not remobilized during autumn senescence. In this context, part of this thesis work has been carried out on the experimental field of Pierrelaye which was polluted by the spreading of sewage water from Paris. Among the 14 poplar genotypes growing on the field, we tried to identify those that efficiently remobilize leaf metals to perennial organs. Metal content, gene expression and correlative analyses have been undertaken, providing new insight in the management of metals in leaves. Because the vacuole is the main metal storage compartment in the cell, NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) vacuolar efflux proteins previously identified in *Arabidopsis thaliana* are good candidates to enhance leaf metal remobilization. Characterization of their homologues in poplar was therefore undertaken by expression in yeast and in *A. thaliana*. In order to independently control the transport of essential and non-essential metals by NRAMP, a study aiming to identify the structural determinants involved in selectivity was undertaken. Expression of NRAMP mutants affected in their selectivity in *A. thaliana* highlighted their impact on metal accumulation and tolerance. To study the involvement of more general nutrient recycling mechanisms in metal remobilization during leaf senescence, the involvement of autophagy was tested in *A. thaliana*. Physiological characterization of autophagy deficient plants indicated that this mechanism plays a role in metal use efficiency and probably in metal remobilization during senescence. By combining a field approach on poplar and molecular genetics in *Arabidopsis*, this work opens multiple perspectives to specifically reduce the accumulation of TE in poplar leaves.

**Keywords:** phytoextraction, *Populus*, transporter, heavy metal, autophagy, selectivity