



HAL
open science

Etude des régulations géniques impliquées dans le maintien de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*.

Nicolas Tissot

► To cite this version:

Nicolas Tissot. Etude des régulations géniques impliquées dans le maintien de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*.. Sciences agricoles. Montpellier SupAgro, 2016. Français. NNT : 2016NSAM0018 . tel-01824094

HAL Id: tel-01824094

<https://theses.hal.science/tel-01824094>

Submitted on 26 Jun 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **MONTPELLIER SUPAGRO**

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
et de l'unité de recherche Biochimie et Physiologie
Moléculaire des plantes

Spécialité : **Biologie Intégrative des Plantes**

Présentée par **Nicolas Tissot**

**Etude des régulations géniques impliquées
dans le maintien de l'homéostasie du fer
chez *Arabidopsis thaliana*.**

Soutenue le 6 décembre 2016 devant le jury composé de

M. Bruno TOURAINE, Professeur, Université de Montpellier	Examineur
M. Sébastien BAUD, Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
M. Sébastien THOMINE, Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
Mme Jacqueline GRIMA-PETTENATI, Directrice de Recherche, CNRS	Examinatrice
M. Nicolas ROUHIER, Professeur, Université de Lorraine	Examineur
M. Christian DUBOS, Chargé de Recherche, INRA	Directeur de thèse

Remerciements

En premier lieu, je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et à remercier tout particulièrement les personnes qui ont contribué de près ou de loin à mon travail, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant ces trois années de thèse au sein du Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à Frédéric Gaymard, responsable du groupe 'Nutrition minérale et stress oxydatif' pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je remercie également Christian Dubos, mon directeur de thèse qui a supervisé mon travail. Je le remercie pour sa présence et ses nombreux conseils tout au long de cette expérience, sans oublier sa participation à l'élaboration de cet écrit.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon comité de thèse : Antoine Martin, Sandrine Ruffel, Nicolas Arnaud, Thierry Lagrange pour leurs précieuses recommandations sur le déroulement scientifique de cette thèse

J'adresse aussi toute ma reconnaissance aux membres de mon jury : Bruno Touraine, Sébastien Baud, Sébastien Thomine, Jacqueline Grima-Pettenati et Nicolas Rouhier pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Ensuite, je tiens à remercier tous les membres de l'équipe « FeROS » : Jossia, pour ses conseils avisés, son soutien technique et les aides précieuses qu'elle m'a apporté dans mes expériences. Je lui adresse également toute ma reconnaissance pour sa participation à la réalisation de ce manuscrit. Je n'oublie pas son enseignement mycologique sur les girolles et les bons moments de détente. Sancho, pour tout le temps partagé au laboratoire et en dehors, pour nos échanges aux cafés du matin, sans oublier les temps de loisir. Tou Cheu, pour nos nombreuses et passionnantes discussions scientifiques ou non, tout le temps qu'il m'a accordé, sans oublier son expertise 'protoplastique'. Brigitte, pour son soutien et ses nombreux aides en biochimie. Pierre, pour sa disponibilité, sa gentillesse et pour ses recommandations sur « PDR9 ». Jean-François (alias Monsieur Ferritines), pour ses conseils scientifiques et pour nos échanges de marathoniens. Je tiens à remercier également les stagiaires : Laura, Amel et Romain pour leur sympathie et leur contribution à mon travail. Je remercie également tous les autres membres de l'équipe 'FeROS', qui m'ont aidé dans cette thèse.

Merci à l'équipe pédagogique de l'UM, Laurence, Fabrice, Pierre, Éric et Bruno pour votre pédagogie et pour m'avoir donné le goût de l'enseignement ou plus exactement du monitorat. Merci à Lydia et Fabien pour leur gentillesse et leurs aides en TP.

Je remercie aussi les autres membres du laboratoire : Arthur et Emilie pour leur bonne humeur, leurs nombreux conseils scientifiques, tous nos bons moments partagés sans oublier nos coinches du mardi ; Rémy (ou Inspecteur Gadget) pour son optimisme et son ingéniosité ; Gabriel et Sandrine pour leur aide dans la mise en place des microarrays et dans l'analyse des données ; Fanny B. et Antoine M. pour m'avoir appris à 'ChIPer' ; Carmen et Ron pour les bons moments passés pendant les pauses du midi.

J'adresse aussi toute ma reconnaissance aux anciens du labo : Antoine C. pour sa bonne humeur et son enseignement de l'art du brassage ; Minh, pour nos soirées manips et tous les bons moments passés ; Guilhem, pour nos discussions scientifiques et tout ce qu'il m'a transmis ; Cyril, mon ami qui m'a tant apporté scientifiquement, techniquement et personnellement. Merci de m'avoir enseigné le western façon créole. Merci d'avoir été là pour me changer les idées et de m'avoir fait prendre du recul sur mes manips.

Je remercie particulièrement les membres de ma famille, mes parents mais également ma sœur Marion et mon frère Quentin, qui ont suivi avec intérêt mon travail et qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse. Merci à eux pour m'avoir écouté et avoir cru en moi.

Je remercie aussi ma belle-famille pour leur soutien et leur présence sans faille.

Je n'oublie pas mes amis Thib, Ben, Olivier, Cec, Lolo, Bebère, Hervé, Maxence, Lucas, Maxou, Clov, Etienne, Virg, ... qui ont suivi de près ou de loin, l'avancée de ma thèse et qui ont su par moments me changer les idées.

Mes derniers remerciements et non les moindres, s'adressent à ma compagne Fanny, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible.

En conclusion, un grand MERCI à tous...

Table des matières

Introduction	1
1. Contexte socio-économique.....	2
2. Le rôle du fer dans le métabolisme.	3
2.1 Les protéines à fer.....	3
2.1.1 Les protéines à centre fer-soufre.....	3
2.1.2 Les hémoprotéines	3
2.1.3 Les autres types de protéines à fer	4
2.2 Le fer dans les organites.	4
2.3 Les conséquences de la carence en fer.....	5
2.4 Un élément pouvant générer un stress oxydatif.....	6
2.4.1 Symptômes de la toxicité en fer.....	6
2.4.2 Le fer et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	7
2.4.3 Les effets des ROS dans l'organisme.....	9
2.4.4 La détoxification des ROS.....	10
3. L'homéostasie du fer.	12
3.1 Le prélèvement du fer par les racines.....	12
3.1.1 La stratégie I.....	12
3.1.2 La stratégie II.....	13
3.2 Transport et remobilisation du fer dans la plante entière.....	14
3.2.1 De l'épiderme vers les vaisseaux conducteurs.....	14
3.2.2 Charge en fer du xylème.....	14
3.2.3 Charge en fer du phloème.....	15
3.3 La compartimentation intracellulaire du fer.....	16
3.3.1 La mitochondrie.....	16
3.3.2 La vacuole.....	16
3.3.3 Le chloroplaste.....	17
3.3.4 Le noyau.....	17
3.4 Les voies de régulation moléculaire modulant l'homéostasie du fer.....	18
3.4.1 La perception du statut en fer par le « senseur ».....	18
3.4.2 BRUTUS module les voies de réponse à la carence.....	19
4. Les ferritines.	22
4.1 Les ferritines animales.....	22
4.1.1 Structure et assemblage.....	22
4.1.2 Les régulations.....	23
4.2 Les ferritines végétales.....	24
4.2.1 Structure et assemblage.....	24
4.2.2 Le rôle des ferritines chez Arabidopsis.....	25
4.3.1 Les régulations transcriptionnelles.....	26
4.3.2 Les régulations post-transcriptionnelles.....	29
4.3.3 La régulation potentielle par un ARN non codant.....	29
5. Projet de thèse.....	31

Chapitre I : Etude fonctionnelle des promoteurs des gènes de ferritines.....33

1. Introduction.	34
2. Résultats.	35
2.1 Identification d'un modèle de travail pour le promoteur d' <i>AtFER1</i>	35
2.2 Le promoteur minimal d' <i>AtFER1</i> comme modèle d'étude pour les autres promoteurs de ferritines.	37
2.3 Les éléments <i>cis</i> impliqués dans l'expression d' <i>AtFER1</i>	37
2.4 Les éléments <i>cis</i> conservés potentiellement impliqués dans la régulation d' <i>AtFER1</i>	39
2.5 Les éléments <i>cis</i> -régulateurs identifiés sur le promoteur d' <i>AtFER1</i> ne sont pas impliqués dans le contrôle de la localisation tissulaire de son expression.....	40
2.6 Les délétions dans le promoteur minimal d' <i>AtFER1</i> confirment le rôle des éléments régulateurs.	41
2.7 L'activité du promoteur d' <i>AtFER1</i> suite à une carence en phosphate.	42
2.8 Les implications des acteurs en <i>trans</i> TIC et PHR1.	43
3. Discussion	43
3.1 Les éléments inducteurs de l'expression d' <i>AtFER1</i>	44
3.2 Les éléments répresseurs de l'expression d' <i>AtFER1</i>	46
3.3 Le promoteur minimal d' <i>AtFER1</i> intègre les signaux issus de multiples voies de signalisation.	49

Chapitre II : ILR3 est un intégrateur central de l'homéostasie du fer.51

1. Introduction.	52
2. Résultats.	53
2.1 Article soumis pour publication.....	53
Abstract.....	54
2.2 Résultats complémentaires.	69
2.2.1 Rôle de BRUTUS dans la régulation de l'expression des ferritines.....	69
2.2.2 ILR3 intègre via des régulations transcriptionnelles la répartition intracellulaire du fer.	69
2.2.3 ILR3 interagit directement avec les promoteurs de ses gènes cibles.	70
2.2.4 ILR3 et POPEYE/bHLH47 agissent-ils sous forme d'hétéro-dimères? ..	71
3. Discussion	72
3.1 L'homéostasie du fer chez <i>Arabidopsis</i> est régulée transcriptionnellement....	73
3.2 Le chloroplaste comme organite central de l'homéostasie du fer.....	74

Chapitre III : La régulation potentielle d'un long ARN non codant sur *AtFER1*.76

1. Introduction	77
2. Résultats	78
2.1 Etude de l'accumulation des transcrits d' <i>AtLncFER1</i> par rapport à <i>AtFER1</i> ...	78
2.2 Caractérisation d'un mécanisme potentiel de régulation de l'expression d' <i>AtFER1</i> impliquant <i>AtLncFER1</i>	78
2.2.1 Un rôle pour les petits ARNs ?	78

2.2.2 Un rôle pour la polymérase IV ?	78
2.3 Etude de l'accumulation des transcrits d' <i>AtLncFER1</i> en réponse à la carence en fer.	79
2.4 Caractérisation d'une lignée mutée pour <i>AtLncFER1</i>	79
2.5 Les lignées <i>pAtFER1::gLncFER1</i> ne sont pas affectées dans la quantité de messagers d' <i>AtFER1</i>	80
3. Discussion	81

Chapitre IV : Identification d'un réseau de gènes impliqués dans la réponse à l'excès de fer.82

1. Introduction.	83
2. Résultats.	84
2.1 La réponse phénotypique des plantes à l'excès de fer.	84
2.2 Cinétique d'induction de l'accumulation des transcrits d' <i>AtFER1</i> et d' <i>AtAPX1</i> en réponse à un excès de fer.	85
2.3 Analyse transcriptomique de la réponse précoce à un excès de fer.	86
2.3.1 Identification des gènes différentiellement régulés en réponse à un excès de fer.	86
2.3.2 Classification fonctionnelle des gènes différentiellement régulés en réponse à un excès de fer.	87
2.3.3 Identification de groupe de gènes (clusters) potentiellement impliqués dans le contrôle transcriptionnel de la réponse précoce à un excès de fer.	87
2.3.4 Validation des facteurs de transcription candidats par RT-PCR quantitative.	89
2.3.5 Analyse globale du jeu de données.	90
2.3.6 Le comportement des ARNm des gènes du maintien de l'homéostasie du fer en réponse à l'excès.	91
3. Discussion	91
3.1 Les facteurs de transcription clefs de la réponse précoce à l'excès de fer.	91
3.2 Les intégrateurs de la réponse transcriptionnelle à l'excès de fer.	93

Chapitre V : PDR9 module l'homéostasie du fer en régulant son acquisition.....97

1. Introduction	98
2. Résultats	100
2.1 Localisation racinaire des composés phénoliques.	100
2.2 Analyse transcriptomique des racines du mutant <i>pdr9-2</i>	101
2.2.1 Mise en place du système expérimental.	101
2.2.2 Identification de groupes de gènes (clusters) potentiellement impliqués dans la répartition racinaire des composés phénoliques.	101
2.2.3 Les transporteurs candidats pour la distribution des composés phénoliques.	103
2.3 PDR9 et IRT1/FRO2, une seule machinerie pour l'assimilation du fer.	104
3. Discussion	110

Discussion et perspectives.....	114
1. L'homéostasie du fer chez <i>Arabidopsis</i>.....	115
2. Les régulations des voies de nutrition minérale présentent des mécanismes similaires.	117
3. La nutrition ferrique des plantes est un modèle d'adaptation.....	119
Matériel et méthodes.....	121
1. Matériel végétal et conditions de culture.	122
1.1 Matériel végétal.	122
1.2 Conditions de culture.	122
1.2.1 Traitement pour l'excès de fer.	122
1.2.1 Culture en hydroponie.....	122
1.2.3 Culture in vitro.	123
2. Construction des vecteurs plasmidiques.	123
3. Transformation stable d'<i>Arabidopsis thaliana</i>.....	125
4. Le crible simple hybride en levure.	125
5. Analyse d'expression.....	127
5.1 Gène rapporteur GUS.	127
5.1.1 Révélation histochimique.....	127
5.1.2 Dosage de l'activité enzymatique.	127
5.2 Mesure de l'accumulation des transcrits.....	128
5.2.1 Extraction des transcrits.	128
5.2.2 Synthèse des ADNc.	128
5.2.3 RT-PCR quantitative.....	129
5.3 Puces à ADN (excès de fer).	129
6. Analyse de l'accumulation des protéines.	130
6.1 Extraction des protéines totales.	130
6.2 Western blot.	130
7. Quantifications physiologiques.	131
7.1 Dosages des chlorophylles et des caroténoïdes.	131
7.2 Dosage du fer.	131
7. Chromatin Immunoprecipitation.	132
Références bibliographiques	133
Annexes	154

Introduction

1. Contexte socio-économique.

Le fer (Fe) est le quatrième constituant le plus abondant de la croûte terrestre. Bien qu'il ne soit présent qu'à l'état de trace dans les organismes vivants (Theil, 1987), il est essentiel pour la mise en place de nombreuses réactions enzymatiques telles que la synthèse d'ADN ou la respiration. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la carence en fer est le trouble nutritionnel le plus répandu dans le monde, 2 milliards de personnes souffrant d'anémie ferriprive. Cette déficience ferrique touche particulièrement les femmes et les enfants des pays en voie de développement, mais elle est également la carence la plus répandue dans les pays développés. La cause principale de cette carence nutritionnelle chez ces populations reste la malnutrition. L'anémie ferriprive constitue donc une affection de santé publique ayant atteint des proportions épidémiques. Pour pallier à cela, deux actions peuvent être mises en œuvre : soit apporter le fer à l'organisme par supplémentation, notamment *via* des comprimés de fer-sulfate, soit amener des quantités suffisantes de fer avec une nutrition appropriée. La majeure partie des apports nutritionnels en fer dans le monde provient des végétaux. Ainsi, l'OMS suggère qu'il serait bénéfique d'augmenter la teneur en fer bio-disponible chez les plantes pour pallier à ce problème nutritionnel mondial. Afin d'augmenter la qualité nutritionnelle de certains aliments, il est indispensable de comprendre les mécanismes modulant l'acquisition, la distribution et le stockage du fer chez les plantes, c'est-à-dire son homéostasie.

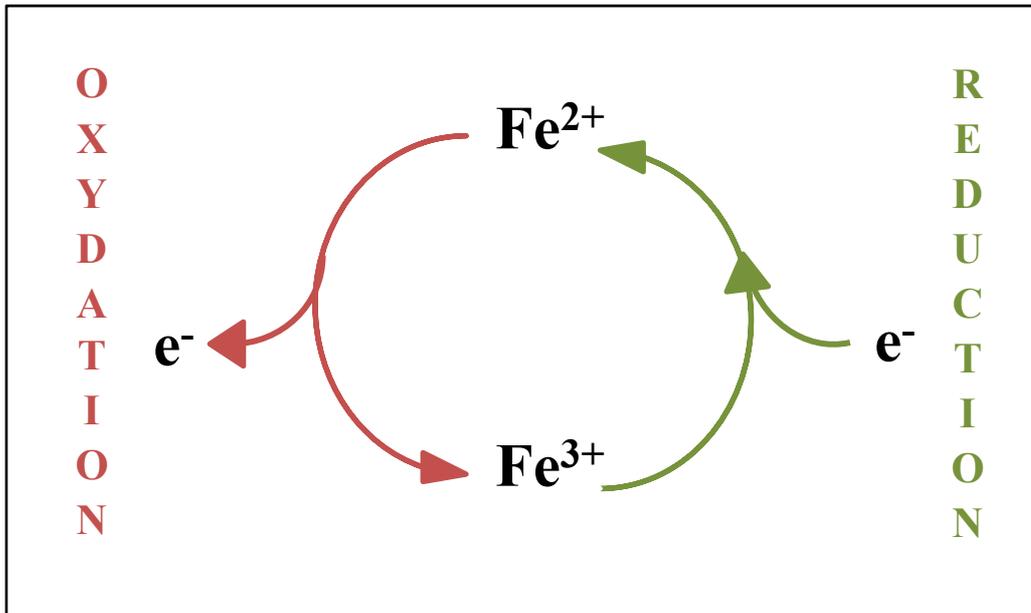


Figure 1 : Les états du fer.

Le fer ferreux (Fe^{2+}) lors de l'oxydation va devenir du fer ferrique (Fe^{3+}) en perdant un électron. La réciproque nommée la réduction va nécessiter le gain d'un électron.

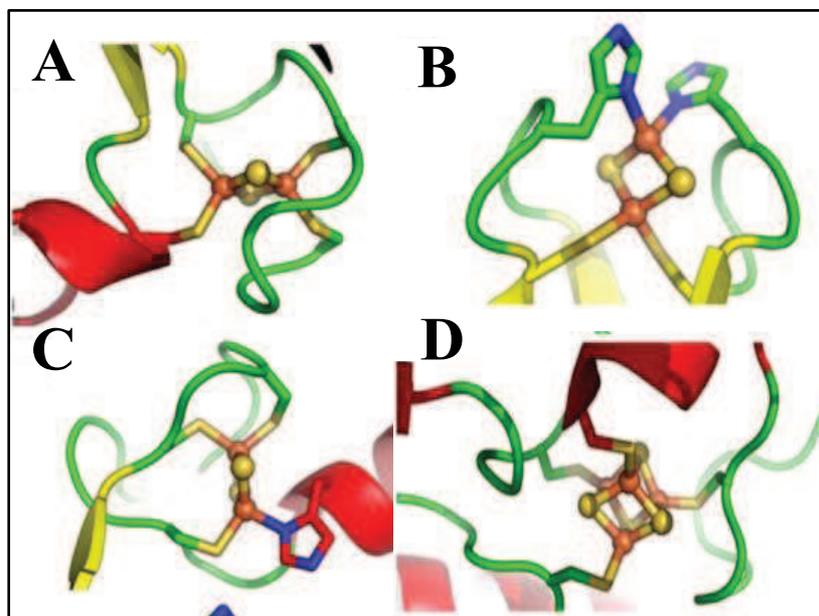


Figure 2 : Les types de coordination du fer dans les protéines à cluster.

Représentation de centre fer-soufre et de leurs ligands. Le soufre, le fer et l'azote respectivement, représentés en jaune, vert et bleu. (A) Centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ lié à quatre cystéines de la ferredoxine de *Cyanidioschyzon merolae*. (B) Centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ lié à deux cystéines et à deux histidines de la protéine Rieske de *Spinacia oleracea*. (C) Centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ lié à trois cystéines et à une histidine de la protéine NEET d'*Arabidopsis thaliana*. (D) Centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ lié à quatre cystéines de la ferredoxin-thioredoxin reductase de *Synechocystis sp.* (d'après Couturier *et al.*, 2013).

2. Le rôle du fer dans le métabolisme.

Le rôle biologique du fer est lié à sa structure chimique et notamment à ses propriétés d'oxydo-réduction. (i) Il existe sous deux formes, l'une réduite (Fe^{2+} , fer ferreux) et l'autre oxydée (Fe^{3+} , fer ferrique). La transition entre ces deux états correspond à un échange d'électrons (Fig. 1). (ii) De plus, il peut former jusqu'à six liaisons covalentes de coordination en acceptant une paire d'électrons sur chacune de ses orbitales atomiques. Le fer a donc la capacité de se lier aux atomes donneurs d'électrons comme l'oxygène, l'azote ou encore le soufre, et au travers de ces derniers, à des protéines. Cette caractéristique lui permet notamment de véhiculer l'oxygène *via* l'hémoglobine chez les animaux. Ces deux propriétés permettent au fer d'être le composant du centre actif de nombreuses protéines impliquées dans des réactions de transfert d'électrons.

2.1 Les protéines à fer.

Les protéines à fer peuvent être classées selon trois types de structure correspondant à la forme sous laquelle le fer leur est associé : les protéines à centre fer-soufre, les protéines à hème et les protéines n'appartenant pas aux deux groupes précédents et dans lesquelles le fer est lié directement à la chaîne polypeptidique.

2.1.1 Les protéines à centre fer-soufre.

Les protéines à centre fer-soufre [Fe-S] contiennent un centre constitué d'une association entre des atomes de fer et des atomes de soufre en stœchiométrie variable (Fig. 2A ; Couturier *et al.*, 2013). Ces centres [Fe-S] sont généralement associés à la protéine par l'intermédiaire de groupement thiols de certains résidus cystéine du polypeptide. Ils peuvent également être associés par l'intermédiaire de résidus histidine comme cela est rencontré chez les protéines de type NEET ou encore Rieske (une composante du complexe Cytochrome *b6f*; Fig. 2). Les formes les plus répandues de ces centres sont celles comportant deux atomes de fer et deux atomes de soufre [2Fe-2S] ainsi que celles composées de quatre atomes de fer et quatre atomes de soufre [4Fe-4S]. Au sein du centre, la valence du fer peut varier, ce qui permet à ces protéines de catalyser des réactions d'oxydo-réduction impliquées notamment dans la photosynthèse ou encore la respiration (Couturier *et al.*, 2013).

2.1.2 Les hémoprotéines.

Les protéines à hème possèdent un noyau tétrapyrolique au centre duquel est fixé un atome de fer. Ce dernier est associé à quatre atomes d'azote par des liaisons covalentes de

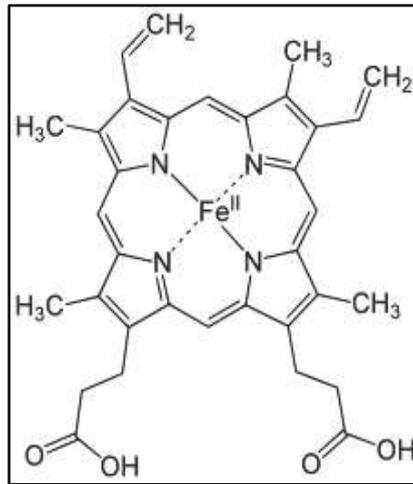


Figure 3 : Un atome de fer fixé dans un hème.

Représentation de la coordination du fer avec quatre atomes d'azote dans un noyau tétrapyrrolique.

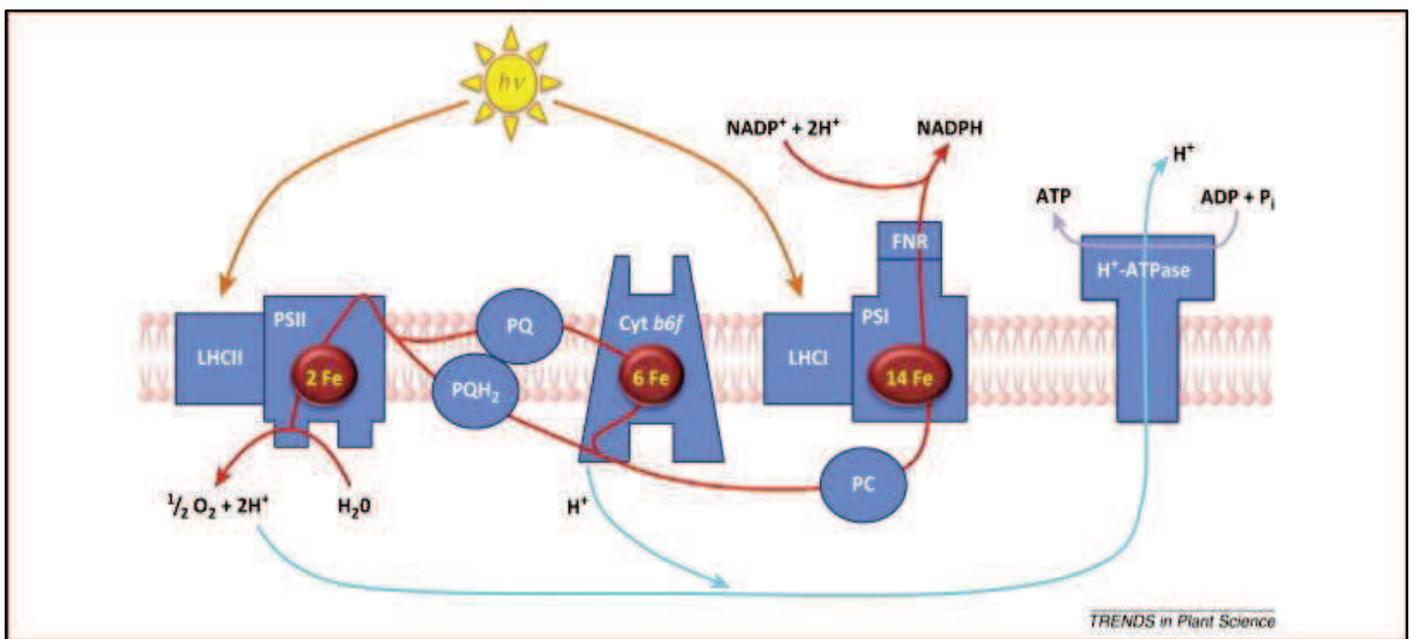


Figure 4 : Les protéines à fer dans la chaîne de transfert d'électrons des thylakoïdes des chloroplastes. De nombreuses protéines à fer sont impliquées dans le transfert des électrons dans le chloroplaste. Les trois types de protéines à fer sont représentés dans ce transfert : protéines à clusters [Fe-S] (comme dans Cyt *b6f*, PSI et FNR), à hèmes (comme dans Cyt *b6f* et PSII) et les non hémiques (comme dans PSII). Au total, 22 atomes de fer permettent de couvrir la gamme de potentiel électrochimique nécessaire à la photosynthèse. PSI, Photosystème I ; PSII, Photosystème II ; PQ, Plastoquinone Cyt, Cytochrome; PC, Plastocyanine ; FNR, Ferrédoxine NADP+ Réductase ; LHC I, Light Harvesting Complex I et LHC II, Light Harvesting Complex II (Briat *et al.*, 2015a).

coordination (Fig. 3). Cette entité est appelée hème ou hémine respectivement selon si le fer à l'intérieur est réduit ou oxydé. Les hémoprotéines ont de nombreux rôles. Les hémoglobines par exemple sont utilisées pour transporter l'oxygène, dans ce cas une des orbitales restantes permet la liaison de l'hème à la protéine et l'autre est utilisée pour fixer l'oxygène. Les hémoprotéines ont également d'autres implications comme dans les chaînes respiratoires et photosynthétiques, dans l'assimilation du nitrate (nitrate réductase) ou encore dans la protection contre le stress oxydatif (catalase, peroxydase).

2.1.3 Les autres types de protéines à fer.

Cette troisième classe regroupe les protéines dont la fixation des atomes de fer est assurée par des liaisons covalentes de coordination directement établies entre le métal et le groupement électro-négatif des protéines. Ces protéines peuvent être impliquées dans des processus biologiques majeurs comme la synthèse d'ADN avec la ribonucléotide réductase (Reichard, 1993). Dans cette catégorie, on retrouve également des protéines du transport de fer comme les transferrines, et des protéines du stockage et de la détoxification du fer comme les ferritines.

2.2 Le fer dans les organites.

Quelle que soit la forme sous laquelle le fer est associé aux protéines, son importance dans la biologie de la cellule provient de ses capacités à gagner ou à céder un électron. De part cette caractéristique, les organites tels que le chloroplaste ou la mitochondrie présentent des besoins très importants en fer. En effet, les lieux regroupant de nombreuses protéines à fer (à centre [Fe-S], à hème et non hémiques) impliquées dans les chaînes de transport d'électrons sont les mitochondries et les thylakoïdes.

Dans le plaste, la chaîne de transport d'électrons associée à la membrane des thylakoïdes ne nécessite pas moins de 22 atomes de fer (Fig. 4). Les accepteurs d'électrons du Photosystème I (PSI) sont constitués de centres [Fe-S] de type [4Fe-4S]. Le complexe Cytochrome *b6f* comprend la protéine Rieske contenant un centre [Fe-S] de type [2Fe-2S] et comprend les cytochromes b et f constitués eux, d'hèmes (Raven *et al.*, 1999). La ferrédoxine NADP⁺ Réductase (FNR) est également une protéine comprenant un centre [Fe-S] de type [2Fe-2S], elle est soluble et localisée dans le stroma des plastes (Fig. 4). Le fer chloroplastique représente donc un pool majeur de fer dans la cellule végétale. Il pourrait

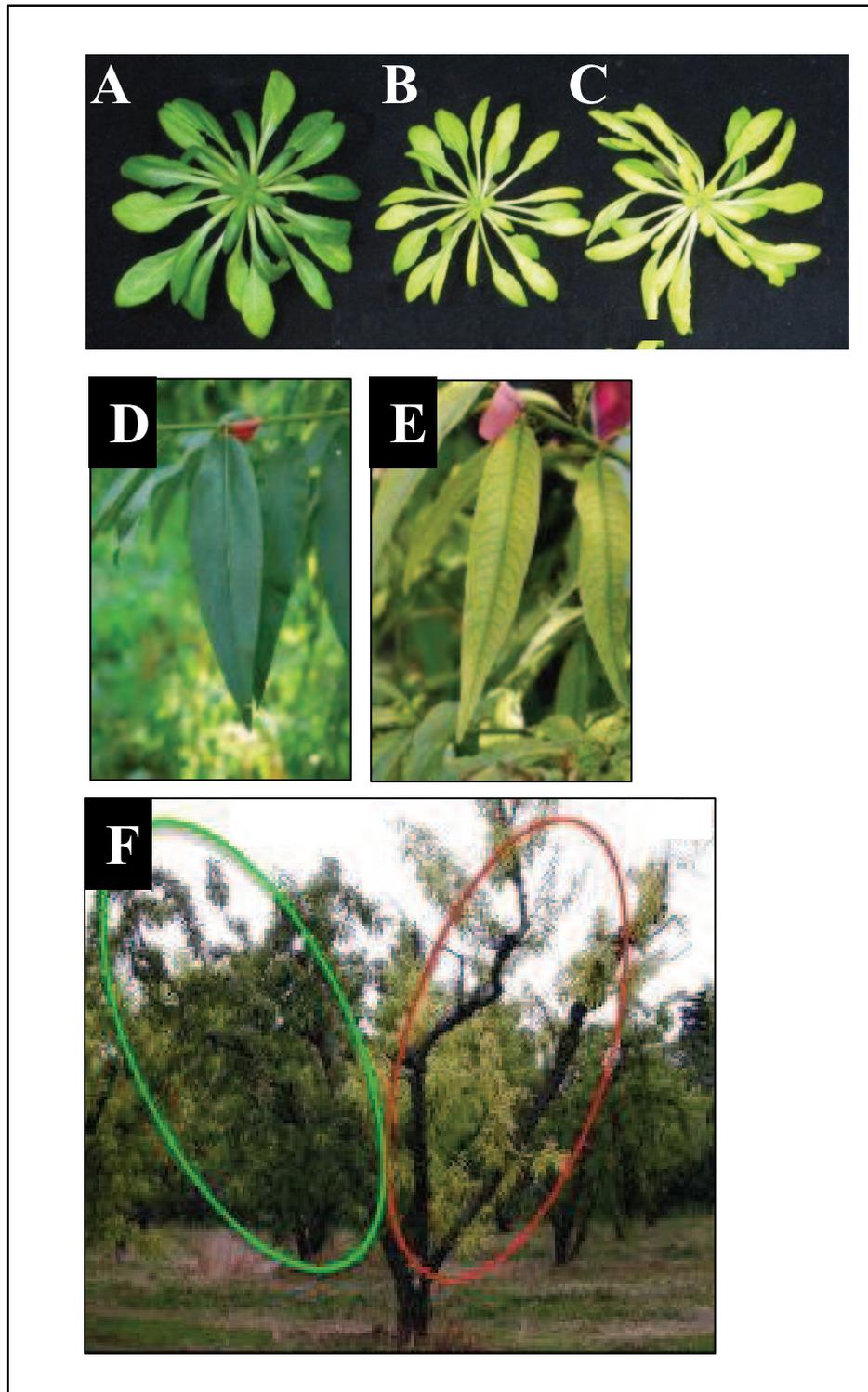


Figure 5 : Réponse phénotypique à la carence en fer chez les plantes.

Le fer est un élément indispensable pour la plante. Une carence de cet élément se manifeste par une chlorose due à la dégradation des chlorophylles et entraîne un jaunissement (**A** vs **B**). La présence de fer, peu disponible (pH basique) est difficilement absorbé et entraîne également une chlorose (**C**). Phénotypiquement la chlorose est internervaire (**D** vs **E**) et peut se compléter par ajout exogène de fer (**F**). Un pêcher se développant sur un sol calcaire (*i.e.* fer peu disponible car pH basique) est traité avec (cercle vert) ou sans fer citrate (cercle rouge) (Briat *et al.*, 2015a).

représenter à lui seul jusqu'à 80% du fer foliaire (Terry et Abadia, 1986 ; Shingles *et al.*, 2002).

Dans la mitochondrie, la chaîne respiratoire localisée dans la membrane interne, fait aussi intervenir de nombreuses protéines à fer. Les complexes I et II contiennent respectivement quatre et trois centres [Fe-S]. Les complexes III et IV en comptent chacun deux. En effet, la protéine Rieske constituant le complexe IV est comme dans le plaste, une protéine à centre [Fe-S]. Seul le cytochrome c dans l'espace inter-membranaire possède un atome de fer sous forme d'hème.

En plus de la photosynthèse et de la respiration, le fer est impliqué dans de nombreux processus tel que le cycle de Krebs (les aconitases possèdent des centres [Fe-S] de type [4Fe-4S]) ou encore dans l'assimilation de l'azote. En effet, la ferrédoxine par exemple, ne trouve pas son unique rôle dans la photosynthèse. Elle constitue un réducteur puissant qui permet la transmission des électrons à différentes enzymes comme la nitrite réductase, la glutamine synthase, ou encore la GOGAT (Glutamine α -céoglutarate aminotransférase). De plus, la nitrate et la nitrite réductase sont respectivement des protéines à hème et à centre [Fe-S].

Toutes ces implications mettent en évidence le caractère essentiel de cet élément pour le fonctionnement de l'organisme.

2.3 Les conséquences de la carence en fer.

Bien que le fer soit très présent dans la croûte terrestre, il est souvent limitant pour la croissance des plantes. En effet, sa disponibilité est faible car il est peu présent dans la solution du sol, là où les plantes prélèvent leurs nutriments. Dans la nature, le fer est essentiellement présent sous forme d'hydroxydes ferriques $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Ces composés sont très stables et peu solubles à pH neutre. Dans une solution aqueuse en aérobie la concentration en fer ferrique (Fe^{3+}) libre est limitée à 10^{-17} M alors qu'une concentration optimale serait de 10^{-9} M (Guerinot et Yi, 1994). La biodisponibilité du fer va être déterminée, indépendamment de sa concentration, par les caractéristiques physico-chimiques du milieu tel que le pH, ou encore sa concentration en oxygène. Dans les sols calcaires, possédant un pH basique, la disponibilité en fer est très limitée. Ce type de sol est largement exploité en agriculture puisqu'il représente 30% de la surface terrestre (Mori, 1999).

Les conséquences de la carence en fer sur la physiologie de la plante sont multiples (Briat *et al.*, 2015a). Le symptôme caractéristique d'une carence en fer est la chlorose. On l'observe chez des plantes poussant sur des milieux pauvres en fer ou dont le fer n'est pas disponible (Fig. 5A, B, C). Plus spécifiquement, c'est souvent une chlorose internervaire qui

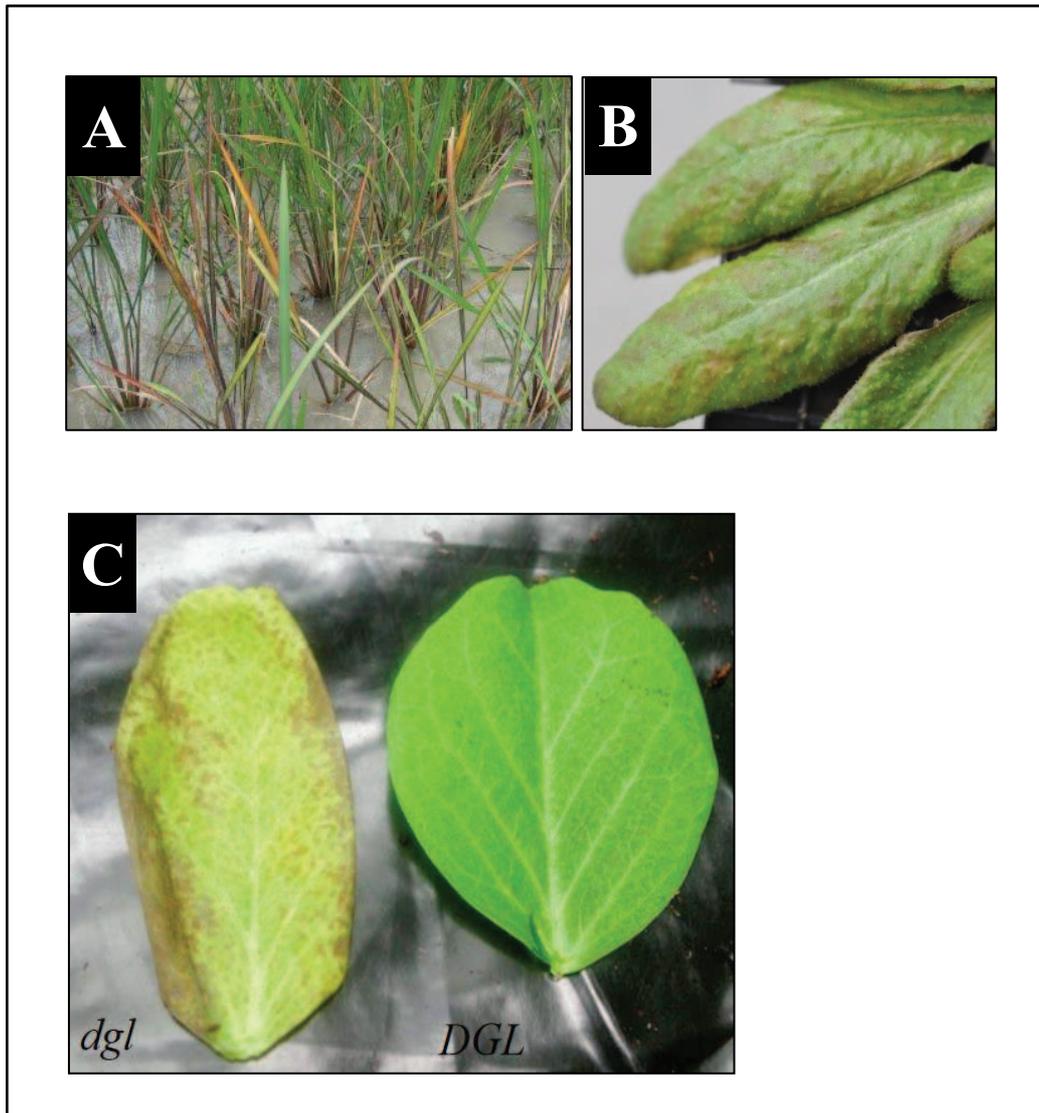


Figure 6 : Réponse phénotypique des plantes en réponse à un excès de fer.

L'excès de fer génère le bronzage du riz observé en culture sur la photographie (A). Ce brunissement qui engendre un jaunissement des tissus est dû à l'accumulation de polyphénols oxydés. Avant d'atteindre ce stade, l'excès se caractérise phénotypiquement par l'apparition de tâches brunes (B). Ces ponctuations brunes peuvent également être observées chez le pois (*Pisum sativum*) mutant *dgl* (*degenerated leaves*) qui accumule beaucoup plus de fer que la plante sauvage, DGL (C).

est observée. Ce phénotype est dû à une diminution de la quantité de chlorophylles dans les parties aériennes de la plante (Fig. 5D, E). Une diminution de la densité de la membrane des thylakoïdes et des granas a été observée dans le cas d'une carence. Cette diminution est notamment due à la baisse des galactolipides et en acide linoléinique (Nishio *et al.*, 1985). De plus, la quantité de protéines impliquées dans le transfert d'électrons des thylakoïdes est réduite lors d'une carence en fer (Andaluz *et al.*, 2006). Enfin l'activité de certaines enzymes du stroma des plastides, responsables de la fixation du CO₂ comme la RUBISCO est affectée par la carence (Terry, 1980). De la même manière, il a été montré qu'en carence en fer, la fixation du CO₂ par le phytoplancton est limitée (Greene *et al.*, 1992). Cependant, une réversion de la carence est possible par ajout de fer exogène (Fig. 5F).

La carence en fer est donc un facteur limitant du développement des plantes. Elle affecte quantitativement mais également qualitativement la production végétale, et donc la valeur nutritionnelle des aliments dérivant de ces productions.

2.4 Un élément pouvant générer un stress oxydatif.

2.4.1 Symptômes de la toxicité en fer.

Comme nous l'avons vu précédemment, le fer est un élément indispensable à la vie car il est impliqué dans de nombreux processus biologiques. Sa capacité à perdre ou à gagner un électron le rend très important mais en fait un élément potentiellement toxique pour la cellule. Le fer peut lorsqu'il est suraccumulé, avoir des effets délétères pour la cellule en générant un stress oxydatif lié à sa capacité à réagir avec les formes réduites de l'oxygène. L'excès de fer dans le sol est relativement rare puisque cet élément est très peu disponible. Cependant dans certains cas particuliers, les plantes peuvent subir un stress dû à une forte concentration de fer ferreux (Fe²⁺) dans la solution du sol. Cette toxicité ferreuse se rencontre essentiellement sur des sols acides ou sujets à l'anoxie. C'est le cas par exemple pour certaines cultures de riz (*Oryza sativa*) au Sri Lanka et en Afrique de l'ouest (Ponnamperuma *et al.*, 1967). Le symptôme le plus visible est le « bronzing » (Fig. 6A ; Ponnamperuma *et al.*, 1955) et provient de la faible mobilité du fer dans les parties aériennes de la plante qui précipite sous forme de Fe(OH)₃ (Morel et Machado, 1981). Ces précipités, liés à l'accumulation des polyphénols oxydés, forment dans un premier temps des ponctuations nécrotiques brunes qui se propagent ensuite à toute la feuille (Fig. 6B ; Peng et Yamauchi, 1993). En fonction du stade de développement de la plante, d'autres symptômes sont associés à l'excès de fer. En effet, une toxicité intervenant au stade plantule va entraîner l'arrêt de croissance du riz couplé à une baisse importante du tallage. Lorsqu'elle arrive plus

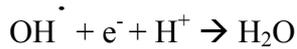
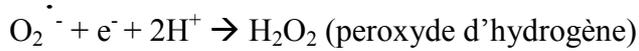
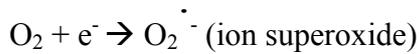
tardivement comme en fin de phase végétative ou en début de floraison, le nombre de panicules chute, la stérilité des épis augmente et les étapes de floraison sont retardées (Singh 1992; Virmani, 1977). Une toxicité ferreuse peut engendrer une perte totale des récoltes lorsqu'elle arrive à des stades précoces et une perte d'environ 40% de rendement lorsqu'elle arrive plus tardivement (Audebert et Sahrawat, 2000). Ce problème est notamment rencontré chez la production de blé (*Triticum aestivum*) en Australie (pour 1/3 des surfaces dédiées à cette culture) et au Brésil (en association avec d'autres stress minéraux) (Khabaz-Saberi et Rengel, 2010; Becker et Asch, 2005). Par ailleurs, l'hétérogénéité des sols en nutriments peut localement générer de fortes concentrations en fer avec lesquelles les racines des plantes peuvent être en contact.

En plus des symptômes environnementaux, des facteurs génétiques peuvent également menés à des réponses phénotypiques d'excès de fer chez les plantes. Par exemple chez le pois (*Pisum sativum*), les mutants *dgl* (*degenerated leaves*) et *brz* (*bronze*) accumulent près de cinquante fois plus de fer dans les parties aériennes que les plantes sauvages (Fig. 6C). Cette suraccumulation provoque un stress oxydatif très important entraînant l'apparition de punctuations nécrotiques comme celles observées chez le riz en excès de fer (Becker et Asch, 2005). Les gènes correspondants à ces mutations n'ont pour le moment pas été identifiés mais des études physiologiques montrent qu'ils seraient impliqués dans la signalisation longue distance du statut nutritionnel en fer de la plante (Grusak et Pezeshgi 1996).

2.4.2 Le fer et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

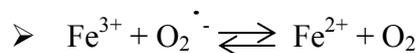
La toxicité du fer est due à sa capacité à réagir avec l'oxygène. L'oxygène est une molécule indispensable à la vie. Elle est notamment impliquée dans la respiration afin de produire l'énergie nécessaire au métabolisme. Paradoxalement, l'oxygène est indispensable et nocif pour les organismes aérobies. La molécule d'oxygène est en elle-même inerte et ne peut pas créer de dommage, ce sont ses formes réduites qui sont très réactives et qui peuvent nuire au bon fonctionnement de la cellule. Ces formes sont appelées radicaux libres, ou espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS). Un radical libre est très instable car il possède un électron libre non apparié capable de déstabiliser d'autres molécules de manière irréversible. Ces molécules endommagées sont à leur tour capable de transmettre un radical libre à d'autres molécules entraînant ainsi une réaction en chaîne déstabilisant l'équilibre cellulaire.

Les ROS sont produits par la réduction de l'oxygène au cours des réactions résumées ci-dessous :

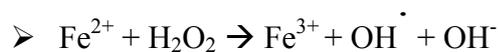


La réduction de l'oxygène est réalisée en présence d'un donneur d'électrons (Cadenas, 1989) qui peut-être : (i) une chaîne de transfert d'électrons dans les mitochondries et les chloroplastes des cellules végétales, (ii) une enzyme auto-oxydable comme la glycolate oxydase, (iii) un ion de type métal de transition comme le fer, le cuivre, le manganèse...

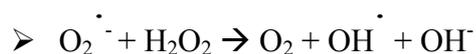
L'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont produits dans toutes les cellules possédant un métabolisme aérobie et ont une réactivité limitée. En revanche, en présence de métaux, ils réagissent pour former le radical hydroxyle qui est le ROS le plus réactif. Cette réaction dont le fer est le principal catalyseur est appelée réaction d'Haber-Weiss et s'effectue de la manière suivante (Gutteridge et Halliwell, 2000):



Le fer ferrique et l'ion superoxyde réagissent dans une réaction réversible produisant de l'oxygène et du fer ferreux.



Le fer ferreux produit précédemment peut ainsi réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former du fer ferrique, un radical hydroxyle et de l'hydroxyde. Cette réaction est nommée réaction de Fenton.



C'est la somme des deux réactions précédentes qui forme la réaction d'Haber-Weiss et qui peut, lorsque le fer est catalyseur être résumée ainsi. La toxicité du fer est donc liée à sa capacité à réagir avec l'oxygène. Ainsi la production de ROS va être à l'origine de l'altération de nombreux composés nécessaires à la vie de la cellule.

2.4.3 Les effets des ROS dans l'organisme.

L'accumulation des ROS impacte l'organisme à de nombreux niveaux. Elle peut notamment avoir un effet négatif sur le maintien de l'intégrité du génome. Les ROS peuvent à la fois activer des endonucléases (Ramana *et al.*, 1998) mais également directement altérer la molécule d'ADN. En effet, le radical hydroxyle peut causer directement des dommages aux acides nucléiques (Pryor, 1988). Les ROS peuvent également oxyder des protéines qui peuvent ensuite être clivées par des endopeptidases spécifiques, comme celle liées à la membrane des thylakoïdes (Casano *et al.*, 1994). Le protéasome 26S peut également reconnaître spécifiquement ces protéines oxydées et les dégrader (Van Nocker *et al.*, 1996).

Les lipides membranaires sont également des cibles importantes des ROS. Leur richesse en acide gras polyinsaturés les rend particulièrement sensibles aux peroxydations liées aux cascades de réaction radicalaire. Le radical hydroxyle peut arracher un hydrogène et former ainsi un radical alkyle qui va initier la peroxydation lipidique. Le second mécanisme est la formation d'oxygène singulet capable de réagir directement avec les chaînes d'acides gras pour former des radicaux peroxydes (ROO \cdot). Le troisième mécanisme est constitué de réactions en chaîne dans lesquelles les radicaux hydroperoxydes (ROOH) réagissent avec d'autres acides gras polyinsaturés ce qui conduit à la formation d'hydroperoxydes lipidiques et d'autres radicaux alkyles (R \cdot). Le fer est à l'origine de cette propagation par réaction avec les hydroperoxydes (Halliwell et Gutteridge, 1984).

Les ROS n'ont pas seulement un effet néfaste sur l'équilibre cellulaire, ils peuvent également servir de molécules de signalisation permettant de moduler le développement et certaines réactions physiologiques (Pitzschke *et al.*, 2006). Par exemple, la fermeture des stomates présents sur les feuilles des plantes (pores permettant les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère : O $_2$ vs CO $_2$) en réponse à un stress hydrique est régulée par les ROS et l'acide abscissique (ABA, hormone de stress). La synthèse d'ABA déclenchée par le déficit hydrique conduit à une production de peroxyde d'hydrogène qui active les canaux calciques membranaires permettant la fermeture des stomates (Pei *et al.*, 2000). Les ROS sont également produits en grande quantité par les végétaux en réponse à une attaque de pathogènes afin, entre autre, de déclencher la mort cellulaire programmée des cellules végétales présentes au site d'infection, ce qui empêche la progression du pathogène (O'Brien *et al.*, 2012). Enfin, les ROS jouent un rôle fondamental dans l'organisation et la croissance des racines (Tsukagoshi *et al.*, 2010). Plus récemment, il a été démontré que cette implication

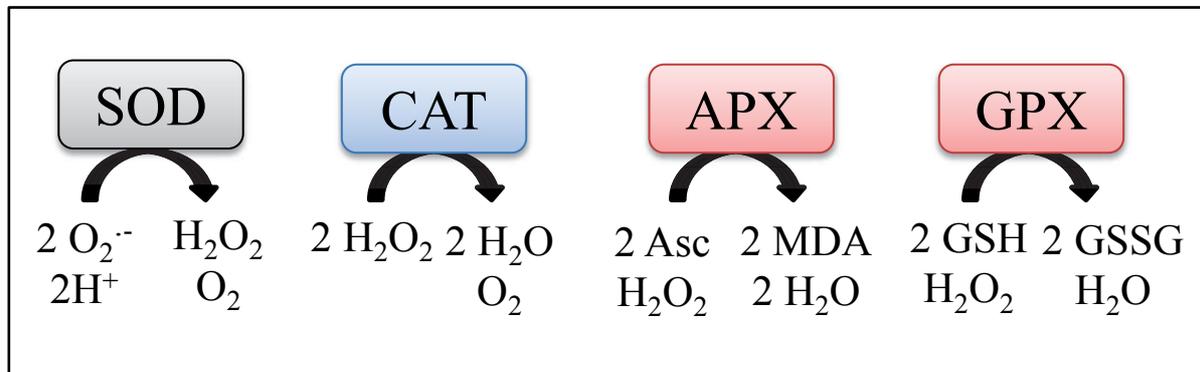


Figure 7 : Mécanismes enzymatiques de détoxification des ROS.

Différentes enzymes permettant la détoxification des ROS. Les SOD permettent la dégradation de l'ion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$), elles constituent la première défense. Les Catalases agissent contre l'accumulation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les APX et les GPX utilisent respectivement l'ascorbate et le glutathion pour dégrader le peroxyde d'hydrogène.

Abbréviations : SOD, superoxyde dismutase ; CAT, catalase ; APX, ascorbate peroxydase ; GPX, glutathion peroxydase; Asc, ascorbate ; MDA, Monodéhydroascorbate ; GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion oxydé.

des ROS dans l'organogénèse racinaire était dépendante du fer dans le milieu (Reyt *et al.*, 2015).

2.4.4 La détoxification des ROS.

Lors de condition de croissance optimale, la production de ROS dans la cellule est relativement faible mais elle peut augmenter drastiquement lors d'un stress (jusqu'à trois fois pour l' O_2^- et trente fois pour H_2O_2 ; Polle, 2001). De par la dualité des ROS, leurs concentrations cellulaires doivent être strictement régulées pour éviter une toxicité excessive et maintenir un niveau suffisant pour leurs fonctions dans certains réseaux de signalisation.

La voie majeure de détoxification des ROS est enzymatique. Ces enzymes sont les superoxydes dismutase (SOD), les catalases (CAT) et les peroxydases (Fig.7). Les SOD sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes. Leur classification est basée sur leur cofacteur métallique. Chez *Arabidopsis thaliana* il existe trois SOD à fer chloroplastiques, une SOD à manganèse mitochondriale, et trois SOD à cuivre-zinc qui sont respectivement localisées dans les plastes, les mitochondries et le cytoplasme (Mittler *et al.*, 2004). Les CAT sont des hémoprotéines localisées dans le proxysome. Elles sont codées par trois gènes et elles catalysent la dégradation du peroxyde d'hydrogène. Les peroxydases catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène et peuvent être divisées en trois catégories selon le substrat qu'elles utilisent : les ascorbate peroxydases (APX), les glutathion peroxydases (GPX), et les peroxydases de classe III (Fig. 7). Elles sont respectivement au nombre de neuf, huit, et soixante-treize chez *Arabidopsis*, et leurs activités sont toutes dépendantes de la production de leur substrat qui est produit par d'autres enzymes. De manière intéressante, *APX1* code pour une APX dont l'expression est spécifiquement induite en réponse à un excès de fer (Fourcroy *et al.*, 2004).

Un des autres mécanismes permettant d'éviter la toxicité des ROS est de limiter leur production (Mittler, 2002). Par exemple, il a été montré qu'une forte intensité lumineuse augmente la production de ROS dans le chloroplaste. Dans ce cas, et afin de limiter cette production, les plantes se sont adaptées en développant divers mécanismes qui se situent à différents niveaux : (i) au niveau de l'organe comme par exemple le repliement des feuilles pour capter moins de lumière, (ii) au niveau physiologique avec les métabolismes de type C4 ou CAM, et également (iii) au niveau moléculaire avec la réorganisation de l'appareil photosynthétique et de ses antennes collectrices de lumière. Comme énoncé précédemment, les métaux peuvent être à l'origine de la production de ROS, il est donc indispensable de les maintenir sous forme non toxique dans la cellule. Par exemple, le cuivre et le cadmium

peuvent être chélatés par des phytochélatines (Vazquez *et al.*, 2009). Ce sont des petits peptides riches en cystéine pouvant former des complexes avec des métaux afin de prévenir leur effet toxique. Le fer quant à lui, peut être stocké dans les vacuoles sous forme de complexe phosphate-fer (Lanquar *et al.*, 2005), ou contenu dans la mitochondrie grâce à la frataxine afin d'éviter la production de radicaux libres. Enfin, ce métal peut être contenu sous forme non toxique au centre des ferritines qui sont des protéines chloroplastiques de stockage transitoire du fer chez les plantes.

Comme il a été abordé précédemment, le fer est un élément dual indispensable à la vie mais également toxique. Les plantes doivent donc strictement réguler leur homéostasie en fer. L'homéostasie du fer se définit par la capacité d'un organisme à maintenir un état stable en fer malgré les variations environnementales (Winge *et al.*, 1998 ; Briat *et al.*, 2007). Elle doit être finement régulée afin d'éviter toute carence préjudiciable pour le métabolisme ou tout excès toxique pour la cellule. L'homéostasie ferrique au sein de la plante est un processus très dynamique qui dépend de différents facteurs tels que le prélèvement du fer dans le sol, son utilisation, sa distribution entre différents organes, sa compartimentation cellulaire et son stockage.

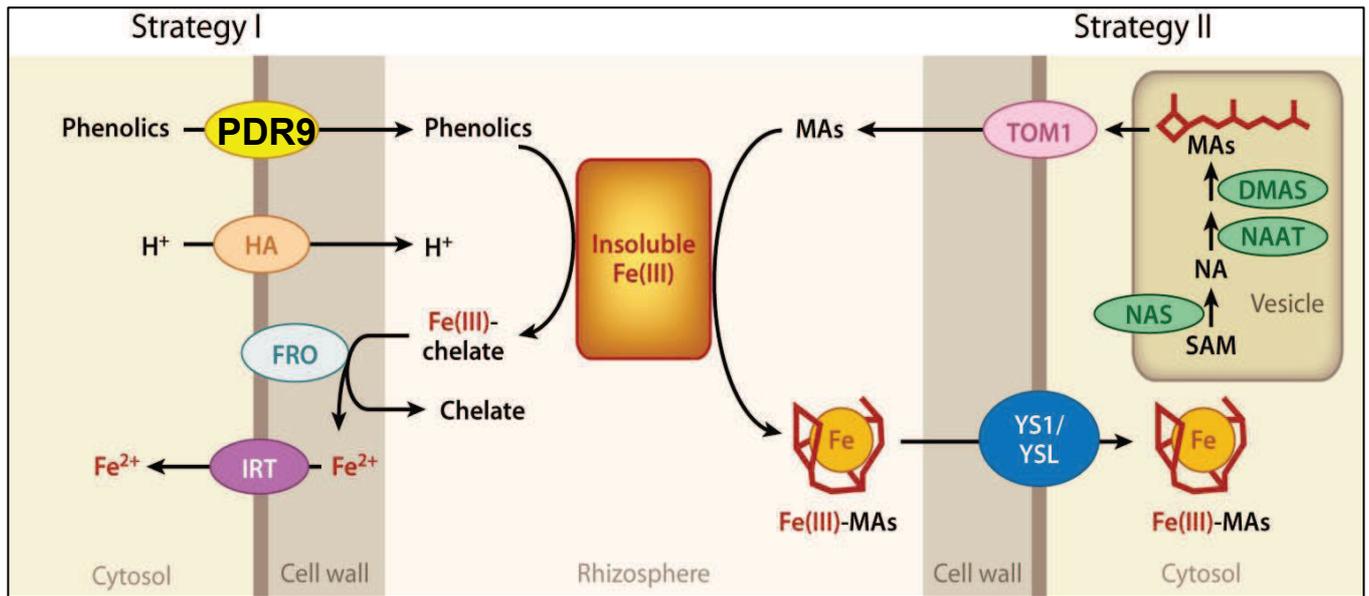


Figure 8 : Les stratégies d'assimilation du fer chez les plantes supérieures.

La stratégie I (à gauche), retrouvée chez l'ensemble des dicotylédones et des monocotylédones non-graminées consiste à prélever le fer dans le sol en acidifiant le milieu extérieur et ainsi solubiliser le fer afin qu'il puisse être transporté dans la cellule. Cette étape implique l'excrétion de protons H^+ par le biais de pompes ATPases (HA). La sécrétion de composés phénoliques par le transporteur PDR9 facilite l'étape de solubilisation du fer. Le fer ferrique (Fe^{III}) est ensuite réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par la réductase (FRO). Le Fe^{2+} est transporté dans les racines par le transporteur IRT1. La stratégie II (à droite), repose sur l'excrétion d'acides mugéniques (MA) synthétisés à partir de S-adénosine-méthionine (SAM). Cette synthèse fait intervenir trois enzymes : la nicotianamine synthase, NAS; la nicotianamine amino transferase, NAAT; et l'acide 2-2-déoxymugynéique synthase, DMAS. La sécrétion de MA dépend du transporteur TOM1. L'importation de fer ferrique couplé aux MAs se fait par le transporteur YS1/YSL. D'après Kobayashi et Nishizawa, 2012.

3. L'homéostasie du fer.

3.1 Le prélèvement du fer par les racines.

L'absorption du fer chez les plantes se déroule au niveau de l'épiderme et du cortex racinaire qui sont des surfaces d'échange entre le milieu extérieur et la plante. Dans le sol, le fer se trouve essentiellement sous forme d'hydroxydes de fer ferrique insolubles $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Les plantes doivent donc avant toute chose, solubiliser ce fer afin de pouvoir l'assimiler. Au cours de l'évolution, deux stratégies de prélèvement du fer ont émergé (Römheld et Marschner, 1986). Chez l'ensemble des dicotylédones et des monocotylédones non-graminées (mais également chez la levure) le fer ferrique est solubilisé, puis réduit en fer ferreux, avant d'être transporté à travers la membrane plasmique. Ceci constitue la stratégie I (Fig. 8). Chez les autres organismes tels que les graminées, bactéries et champignons, le fer ferrique est solubilisé par liaison avec des chélateurs de haute affinité nommés sidérophores. Le complexe Fe^{3+} -sidérophores entre alors dans l'organisme grâce à des transporteurs. Ceci représente la stratégie II (Fig.8).

3.1.1 La stratégie I.

La stratégie I (particulièrement bien décrite chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*) consiste à prélever le fer dans le sol en acidifiant le milieu extérieur et ainsi solubiliser le fer afin qu'il puisse être transporté dans la cellule. La diminution d'une unité de pH dans le sol permet d'augmenter d'un facteur mille la solubilité du fer (Guerinot et Yi, 1994). Cette étape d'acidification implique l'excrétion de protons H^+ par le biais de pompes de type AHA, H^+ -ATPases, plus précisément codées par les gènes *AHA1*, *AHA2*, et *AHA7* chez *Arabidopsis* (Santi et Schmidt, 2009). En plus de ce système d'acidification ancré dans les cellules de l'épiderme de la racine, des études ont montré que la solubilisation du fer était facilitée par la synthèse et la sécrétion de composés phénoliques (Jin *et al.*, 2007) qui appartiennent à la sous-famille des coumarines caractérisées récemment. Chez *Arabidopsis*, la F6'H1 (fêruloyl-CoA 6'-hydroxylase 1) a été montrée comme étant une enzyme clé pour la synthèse de ces composés phénoliques en réponse à une carence en fer. Par ailleurs, le transporteur PDR9 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9 ou ABCG37) est responsable de leur sécrétion dans le milieu extérieur (Fourcroy *et al.*, 2014). Le fer ferrique (Fe^{3+}) est par la suite réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par la réductase FRO2 (FERRIC REDUCTASE-OXIDASE 2 ; Robinson *et al.*, 1999). Enfin, le Fe^{2+} est transporté dans les racines par la protéine membranaire à haute affinité pour le fer localisée sur la membrane plasmique de l'épiderme

racinaire, IRT1 (IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 ; Robinson *et al.*, 1999 ; Vert *et al.*, 2002). IRT1 ne transporte pas uniquement du fer mais également d'autres métaux divalents comme le manganèse et le zinc (Korshunova *et al.*, 1999). L'adressage à la membrane d'IRT1 est dépendant de l'endocytose et de son ubiquitination (Barberon *et al.*, 2011) par la protéine IDF1, une E3 ligase de type RING (Shin *et al.*, 2013).

3.1.2 La stratégie II.

Les graminées comme le riz ou le maïs (*Zea mays*), utilisent une stratégie ne nécessitant pas la réduction du fer. En réponse à une carence en fer, ces plantes sécrètent des phythosidérophores (PS) qui sont des molécules de faible poids moléculaire ayant une forte affinité pour le fer ferrique (Fig.8). Les PS impliqués dans l'assimilation du fer sont les acides mugéniques (MA). Chaque graminée produit un MA qui lui est propre. La famille des MA comprend le DMA (acide 2-2-déoxymugynéique) l'épi-HMA (acide 3-épihydroxymuginéique) et l'épi-HDMA (acide 3-épihydroxy-2-2-déoxymugynéique). Le blé le riz et le maïs sécrètent uniquement du DMA alors que l'orge (*Hordeum vulgare*) est lui capable de sécréter les trois types de MA (Bashir *et al.*, 2006). La voie de synthèse des MA a été particulièrement étudiée chez l'orge (Fig. 8). Le MA est synthétisé à partir de S- adénosine-méthionine (SAM) dans les vésicules. Cette synthèse fait intervenir successivement trois enzymes. La première impliquée est la nicotianamine synthase (NAS) qui va former la nicotianamine (NA). Cette première réaction est conservée chez toutes les plantes y compris celles de stratégie I. La NA est un fort chélateur de métaux. Par la suite la NA est désaminée par la nicotianamine aminotransferase (NAAT) en 3-2-kéto-DMA qui est réduit en DMA par la troisième enzyme : l'acide 2-2-déoxymugynéique synthase (DMAS ; Bashir *et al.*, 2006). La sécrétion de MA dans le milieu dépend du transporteur TOM1 (TRANSPORTER OF MUGINEIC ACID FAMILY PHYTOSIDEROPHORES 1) (Nozoye *et al.*, 2011). Le fer ferrique est alors chélaté dans le milieu et les complexes sont assimilés *via* le transporteur haute affinité YS1/YSL (YELLOW STRIPE 1/YELLOW STRIPE 1 LIKE) (Curie *et al.*, 2001). De façon intéressante, les messagers d'*YSI* sont suraccumulés en réponse à la carence en fer dans les racines et les parties aériennes chez le maïs, ce qui suggère un potentiel transport des complexes Fe^{3+} -PS dans la plante entière.

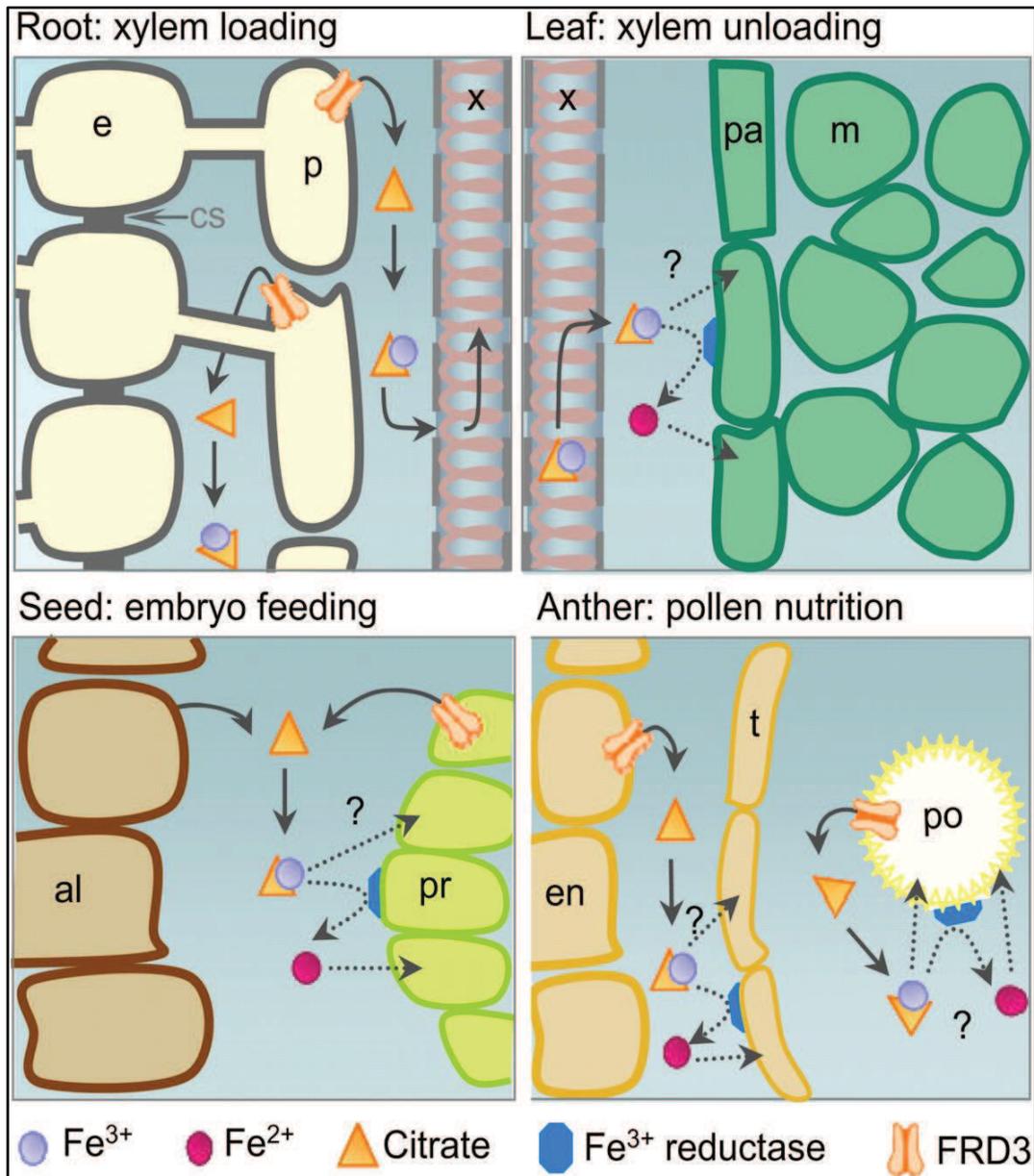


Figure 9 : Les multiples rôles de FRD3 dans différents organes et à différents stades de développement.

Le fer une fois prélevé au niveau de l'épiderme racinaire est complexé à la NA sous forme de Fe-NA afin d'être diffusé jusqu'aux vaisseaux conducteurs (xylème). Le pH du xylème étant trop acide, ces complexes ne peuvent pas y transiter. Le fer se chélate pour cela au citrate. Il est ensuite chargé par un transporteur actif FRD3. Ce transport est également présent pour le déchargement du xylème dans le parenchyme des feuilles, pour la nutrition de l'embryon par l'albumen et celle du grain de pollen par le tapetum.

Abbreviations : al, aleurone; e, endoderme; en, endothecium; m, cellule du mésophylle ; p, péricycle; pa, parenchyme ; po, grain de pollen ; pr, protoderme ; t, tapetum; x, xylème.

D'après Roschttardt et al., 2011.

3.2 Transport et remobilisation du fer dans la plante entière.

3.2.1 De l'épiderme vers les vaisseaux conducteurs.

Une fois dans l'épiderme, les ions doivent atteindre les vaisseaux conducteurs. Dans ce but, ils peuvent utiliser la voie symplastique et/ou la voie apoplasmique (Clarkson, 1993). Une fois que le fer a été importé dans la racine, il est capable, sous une forme complexée, de diffuser depuis l'épiderme jusqu'à l'endoderme, en transitant par le cortex à travers la paroi cellulaire et dans l'apoplasme. La diffusion apoplasmique du fer est ensuite bloquée par le cadre de Caspary qui constitue une barrière imperméable au niveau de l'endoderme. Le fer doit donc à partir de cette localisation, être transporté de façon active à travers la membrane plasmique dans le symplasme (impliquant une certaine sélectivité au niveau des ions ainsi transportés). Après cette étape, le fer diffuse alors par les plasmodesmes jusqu'aux couches cellulaires internes de la racine et leurs vaisseaux conducteurs. Étant donné la faible solubilité du fer ferreux et la toxicité du fer ferrique (Cf. §2.4.2), ce métal est toujours transporté associé à des chélateurs. Il est majoritairement complexé à la NA sous forme Fe^{2+} -NA à la plupart des pH physiologiques (Von Wiren *et al.*, 1999). Le passage de l'endoderme vers le péricycle ferait intervenir la famille de transporteurs YSL chez *Arabidopsis*. Ces protéines sont codées par une famille multigénique de huit gènes et sont homologues du transporteur YS1 chez le maïs. Leur rôle n'est pas clairement établi chez *Arabidopsis*. Toutefois, chez *Thlaspi caerulescens*, le transport des complexes Fe-NA dans le parenchyme par TcYSL3 est démontré (Gendre *et al.*, 2007). De plus, les messagers d'*AtYSL1* et d'*AtYSL2* sont majoritairement accumulés dans les tissus qui entourent le xylème (Waters *et al.*, 2006), ce qui suggère qu'ils pourraient être impliqués dans le transport du fer vers les vaisseaux conducteurs.

3.2.2 Charge en fer du xylème.

Lorsque le fer atteint le xylème, il est préférentiellement chélaté à des acides organiques comme le citrate sous forme de Fe^{3+} -Citrate (Hell et Stephan, 2003). En effet, à un pH acide comme celui du xylème (environs 6), la NA est majoritairement associée à d'autres métaux (Von Wiren *et al.*, 1999). Le transporteur FRD3 (FERRIC CHELATE REDUCTASE DEFECTIVE 3), de type MATE (MULTI DRUG AND TOXIN EFFLUX) dont le gène est exprimé dans le péricycle racinaire et le cylindre central (Durrett *et al.*, 2007) permet au xylème d'être chargé en citrate (Fig. 9). Il a été montré que l'activité de FRD3 est essentielle à l'approvisionnement en fer dans les parties aériennes (Roschzttardtz *et al.*, 2011). Le transport

de citrate par FRD3 est démontré en ovocyte de xénope (Green et Roger, 2004). De plus, *in planta*, chez le riz, OsFRDL1 (FRD3-LIKE 1) est nécessaire à la translocation du fer dans les parties aériennes (Yokosho *et al.*, 2009). Le rôle de FRD3 n'est pas seulement identifié dans le chargement du xylème. En effet, ce transporteur contribue dans les feuilles au déchargement du xylème dans le parenchyme, à la nutrition de l'embryon par l'albumen, et à celle du grain de pollen par le tapetum (Fig. 9 ; Roschztardt *et al.*, 2013).

3.2.3 Charge en fer du phloème.

Tout comme le xylème, le phloème est emprunté par le fer pour contribuer au bon développement de la plante. Il va particulièrement servir pour acheminer ce métal dans les organes qui en ont besoin, comme les apices ou les graines chez qui le transport xylémien est insuffisant. Le pH du phloème est plus basique que celui du xylème. Il est compris entre 7 et 8 ce qui permet au fer ferreux de se chélater de nouveau à la NA sous forme Fe^{2+} -NA. L'importance de ces complexes a été démontrée par l'étude du mutant *chloronerva* (*chln*) de tomate (*Solanum lycopersicum*). Ce mutant est altéré dans un gène *NAS* (*NICOTIANAMINE SYNTHASE* ; Becker *et al.*, 1998) et présente un phénotype fort de chlorose internervaire (sur les jeunes feuilles), alors que son absorption racinaire est constitutivement activée, et que ce dernier accumule fortement du fer dans les racines et les feuilles. L'importance de la NA dans la distribution longue distance a également été mise en évidence à travers l'étude de tabacs transgéniques surexprimant la NAAT (Cf. §3.1.2). Chez ces plantes, la surexpression de NAAT a pour conséquence l'appauvrissement en NA endogène (Takahashi *et al.*, 2003). Ainsi, ces plantes présentent le même phénotype que *chln*, c'est-à-dire une chlorose internervaire dans les jeunes feuilles. La NA semble donc être un élément prépondérant dans l'allocation du fer vers les organes qui l'utilisent. Un second chélateur du fer dans le phloème a été identifié chez le ricin (*Ricinus communis*) (Kruger *et al.*, 2001). Il se nomme ITP (IRON TRANSPORT PROTEIN) et chélate le fer ferrique sous forme Fe^{3+} -ITP. La faible présence de fer ferreux dans le phloème (probablement chélaté à la NA) démontre l'importance de ce ligand et suggère une complémentarité de la NA et de l'ITP pour l'apport du fer vers les organes puits.

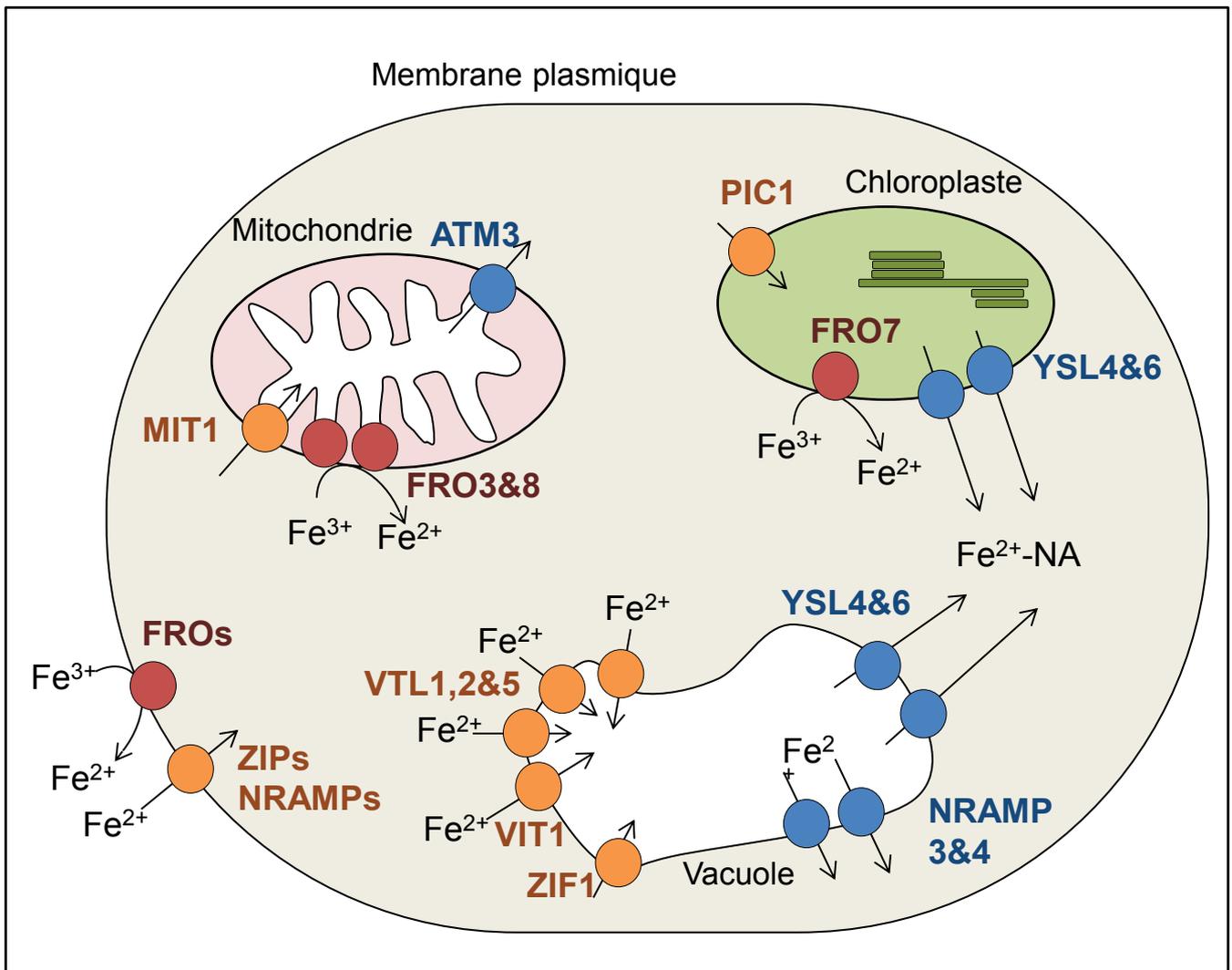


Figure 10 : Les acteurs moléculaires de la compartimentation cellulaire du fer.

L'entrée du fer dans la cellule implique à la fois des réductases ferriques membranaires de la famille des FROs, mais également des transporteurs appartenant aux familles des ZIPs et des NRAMPs. Les trois types de compartiments ayant un rôle majeur dans l'homéostasie du fer cellulaire sont la mitochondrie, le chloroplastes et la vacuole. L'import de fer dans la mitochondrie serait modulé par MIT1 et les réductases FRO3 et FRO8. L'export de la mitochondrie se ferait par ATM3 et serait dépendant du glutathion conjugué (GSSG con). Le fer pénètre dans le chloroplaste grâce aux réductases FRO7 et PIC1. Les transporteurs YSL4 et YSL6 assurent la sortie du fer couplé à la NA. Dans la vacuole, le fer importé par les transporteurs VIT1 ou VTL 1, 2, 5 est exporté par NRAMP3 et NRAMP4. Le fer peut également sortir de la vacuole chélaté à la NA *via* YSL4 et YSL6. Le rôle de ZIF1 n'est pas clairement établi mais il semblerait qu'il importe des complexes Fe-NA. Les réductases ferriques vacuolaires ne sont pas identifiées.

Schéma inspiré de Jeong et Guerinot, 2009 ; Bashir *et al.*, 2016.

3.3 La compartimentation intracellulaire du fer.

Lorsque le fer a atteint son tissu cible, il doit être dirigé vers la voie métabolique dans laquelle il intervient, ou être acheminé dans un compartiment pour être stocké. L'apoplasme est un lieu important de stockage du fer puisqu'il peut contenir jusqu'à 90% du fer dans la racine et 25% dans les feuilles (Nikolic et Römheld, 2003). On le retrouve alors sous la forme (i) de complexe Fe-Phosphate, (ii) d'hydroxydes ferriques, ou (iii) lié directement à des groupements carbonate et hydroxyle présents dans la paroi cellulaire. Lorsque le fer n'est pas dans l'apoplasme, il est importé dans la cellule, puis plus spécifiquement dans quatre types de compartiments subcellulaires (Fig.10).

3.3.1 La mitochondrie.

La mitochondrie est un organite dont le fonctionnement est particulièrement dépendant du fer. En effet, la biogénèse des centres fer-soufre et la chaîne de transport d'électrons assurant la respiration ont une demande importante en fer (Cf. §2.2). L'import de fer dans la mitochondrie est dépendant du transporteur MIT1 (MITOCHONDRIAL IRON TRANSPORT 1 ; Fig. 10) qui appartient à la famille des MSC (MITOCHONDRIAL SOLUTE CARRIER FAMILY ; Bashir *et al.*, 2011). Ce transport est dépendant des réductases FRO3 et FRO8 (FERRIC REDUCTASE-OXIDASE 3 & 8). Récemment STA1/ATM3 (STARICK 1/ ABC TRANSPORTER OF MITOCHONDRION 3) a été identifié comme impliqué dans l'export de fer de la mitochondrie. Les plantes mutantes *atm3-3* présentent une déficience dans l'activité d'enzymes à centre [Fe-S] cytosolique, et un phénotype de chlorose (Kushnir *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2009). Un des acteurs majeurs de l'homéostasie du fer dans la mitochondrie est la frataxine (AFTH). Cette protéine est très conservée entre différents organismes et peut chélater le fer (Cf. §2.4.4). Chez les plantes, la perte de fonction dans le gène *AFTH* est embryon létal (Busi *et al.*, 2006 ; Vazzola *et al.*, 2007), ce qui démontre l'importance de cette protéine.

3.3.2 La vacuole.

La vacuole est un organite largement publié comme compartiment de stockage. La vacuole emmagasine le fer particulièrement au cours du remplissage de la graine et chez les jeunes plantules. Le fer est stocké dans la vacuole sous forme de précipité Fer-Phosphate (Otegui *et al.*, 2002). Dans la graine ou dans des plantules très jeunes, la protéine VIT1 (VACUOLAR IRON TRANSPORTEUR 1) assure l'influx de fer dans la vacuole, alors que d'autres protéines de la famille des NRAMP (NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED

MACROPHAGE PROTEINS 3 et 4 : NRAMP3 et NRAMP4), assurent l'efflux (Kim *et al.*, 2006 ; Lanquar *et al.*, 2005). Ces protéines sont synthétisées lorsque la plante subit une carence en fer afin de maintenir au mieux l'homéostasie de cet élément dans les cellules (Thomine *et al.*, 2000). Bien que cela soit encore discuté par la communauté scientifique, certaines données suggèrent que la sortie du fer de la vacuole pourrait également être assurée par YSL4 et YSL6 (YELLOW STRIPE 1 LIKE 4 et 6 ; Conte *et al.*, 2013) qui sont localisés sur le tonoplaste. Récemment, une étude a permis de mettre en évidence l'existence d'autres transporteurs vacuolaires nommés VTL (VIT LIKE : VTL 1, 2 et 5 ; Gollhofer *et al.*, 2014). La surexpression des *VTL* dans des fonds mutants *vit1* ou *nramp3/4* complète le phénotype de sensibilité à la carence. De façon intéressante, les transcrits des gènes codant ces trois transporteurs sont suraccumulés en réponse à un excès de fer exogène. Cette découverte permet de placer la vacuole comme organe de stockage dynamique impliqué dans l'homéostasie cellulaire du fer.

3.3.3 Le chloroplaste.

Les chloroplastes sont les organites les plus demandeurs en fer, plus de 90% du fer non apoplasmique pouvant être localisé dans les chloroplastes (Terry et Abadia, 1986). Comme observé précédemment, le fer présent dans le chloroplaste est essentiellement utilisé par les protéines impliquées dans la chaîne de transport d'électrons permettant la photosynthèse et dans la biogénèse des centres [Fe-S] (Cf. §2.2). L'import du fer, qui est assuré par le transporteur PIC1 (PERMEASE IN CHLOROPLASTS 1 ; Duy *et al.*, 2007), nécessite une étape de réduction catalysée par la réductase FRO7 (FERRIC REDUCTASE-OXYDASE7 ; Jeong *et al.*, 2008). Le mutant *pic1* présente un phénotype de chlorose, avec une importante désorganisation des chloroplastes. La sortie du fer des chloroplastes est assurée par YSL4 et YSL6 (YELLOW STRIPE 1 LIKE4 et 6 ; Divol *et al.*, 2013), les mêmes transporteurs qui moduleraient l'efflux ferrique vacuolaire (Cf. §3.3.2). Dans cette étude, le double mutant *ysl4/6* présente une suraccumulation de fer dans les chloroplastes, une forte sensibilité à l'excès de fer, et une suraccumulation des ferritines. L'ensemble de ces protéines permet le stockage transitoire du fer ferrique sous forme non toxique et bio-utilisable, évitant ainsi la présence de fer libre dans cet organite.

3.3.4 Le noyau.

Récemment, des analyses de spectrométrie de fluorescence à rayons X, ont permis de mettre en évidence la présence de fer dans le noyau de cellule animale (Matsuyama *et al.*,

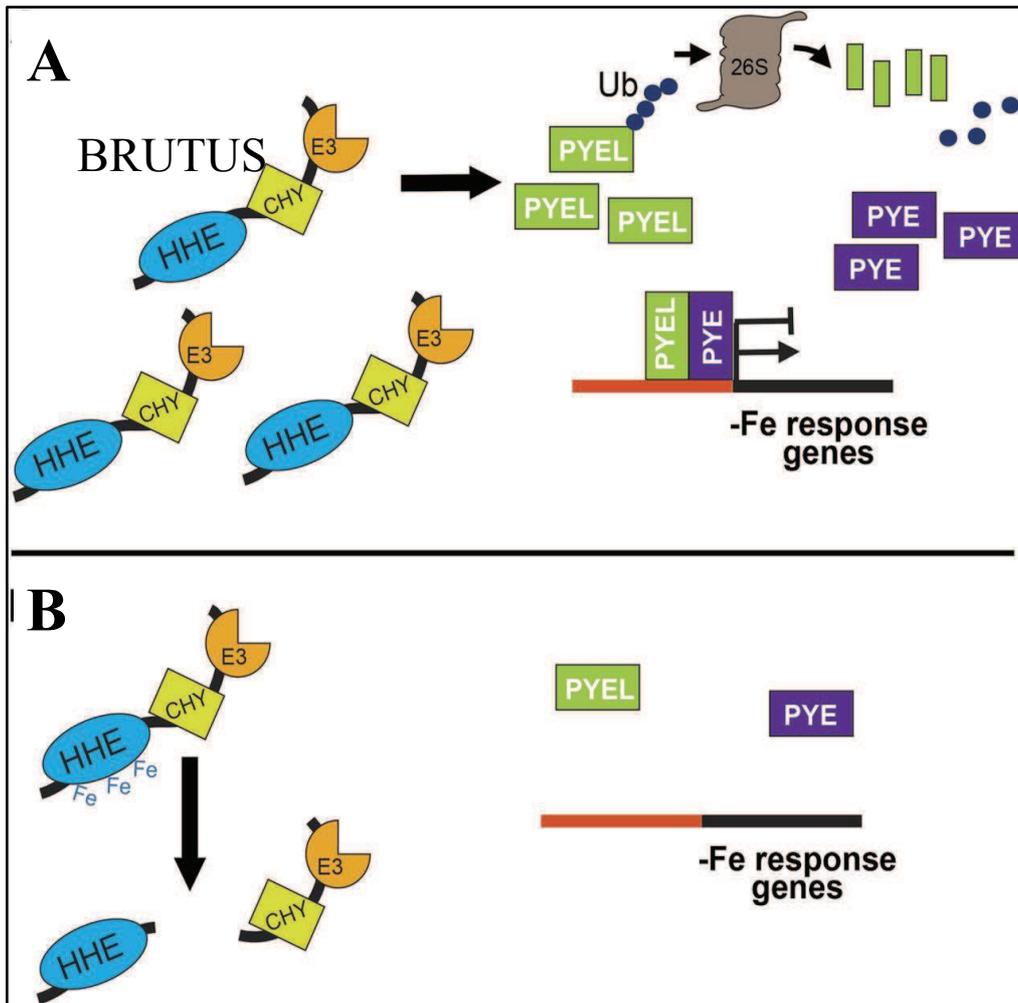


Figure 11 : Modèle de la stabilité et de la fonction de BRUTUS.

BRUTUS est composé de trois parties principales: un domaine HHE composé de trois répétitions Hémyerythrine, un domaine CHY-type Zn-finger et un domaine RING E3 ligase. Le gène *BRUTUS* est induit par la carence en fer, tout comme *PYEL* et les gènes constituant les *PYEL*. En carence en fer, BRUTUS est capable d'interagir avec ses cibles afin d'induire leur dégradation de part sa fonction d'E3 ligase, via la poly-ubiquitination et le protéasome 26S (A). Toujours en carence en fer, les gènes du groupe des *PYEL* et *PYE* vont induire transcriptionnellement les gènes de réponse à la carence en fer. En présence de fer, il est reconnu par le domaine HHE de BRUTUS qui va induire la dégradation des protéines cibles (B). La stabilité de BRUTUS suit ce mécanisme avec du fer ferreux ou ferrique.

D'après Selote *et al.*, 2015.

2010). Chez les plantes, une concentration importante de fer a été identifiée dans le nucléole des cellules d'embryon de pois et de mésophile d'*Arabidopsis* (Roschztardt et al., 2011). La fonction de telles quantités de fer dans ce compartiment reste à déterminer. En effet, il est difficile de concevoir que le fer, avec les concentrations observées dans le noyau, serve seulement de co-facteur pour des réactions enzymatiques spécifiques. Il a été montré que le fer pouvait être impliqué dans la synthèse des ARNs ribosomiques. En effet, il peut s'accrocher *in vivo* à ces ARNs (Honda et al., 2005) ce qui pourrait expliquer sa présence dans le noyau à forte concentration.

3.4 Les voies de régulation moléculaire modulant l'homéostasie du fer.

Les voies de régulation modulant l'homéostasie du fer sont nombreuses, complexes et comprennent un grand nombre d'acteurs. Elles sont notamment impliquées dans les modulations des acteurs précédemment cités, ce qui les place au niveau de la perception du fer.

3.4.1 La perception du statut en fer par le « senseur ».

La plante va mettre en place une sensibilité, plus particulièrement elle va percevoir des *stimuli* et adapter sa réponse en modulant l'accumulation de certains acteurs moléculaires. Ce type de perception est intégré par un « senseur » ou un « capteur ». Dans notre système biologique, nous pourrions définir ce senseur comme une entité qui (i) se lie de manière directe ou indirecte au fer (initiation de la perception proportionnelle à la présence du fer), (ii) qui modifie sa structure et/ou sa fonction (assimilation du signal), et (iii) qui génère des réponses pour réguler l'homéostasie du fer (conséquence de la perception). Les réponses peuvent être alors cellulaires ou à l'échelle de la plante entière. Les senseurs du fer chez les plantes sont les protéines BTS ou HRZ (BRUTUS ou HEMERYTHRIN MOTIF-CONTAINING REALLY INTERESTING NEW GENE (RING)- AND ZINC-FINGER PROTEINS) respectivement chez *Arabidopsis* et chez le riz, qui ont un rôle central pour percevoir le statut en fer (Long et al., 2010 ; Kobayashi et al., 2013). Les gènes codant ces deux protéines sont induits en réponse à la carence en fer (Kobayashi et al., 2013 ; Selote et al., 2015). Ces protéines sont composées de trois domaines majeurs (Fig. 11) : Hémerythrine (HHE), CHY-Type Zn-finger et RING E3 ligase. Le domaine Hémerythrine interagit avec le fer chez les animaux et les bactéries et est présent chez FBXL5, le senseur humain du fer (Salahudeen et al., 2009). BTS et HRZ ont la capacité grâce à leurs domaines HHE d'accrocher du fer (ferreux et ferrique) mais également du zinc *in vitro* (Kobayashi et al.,

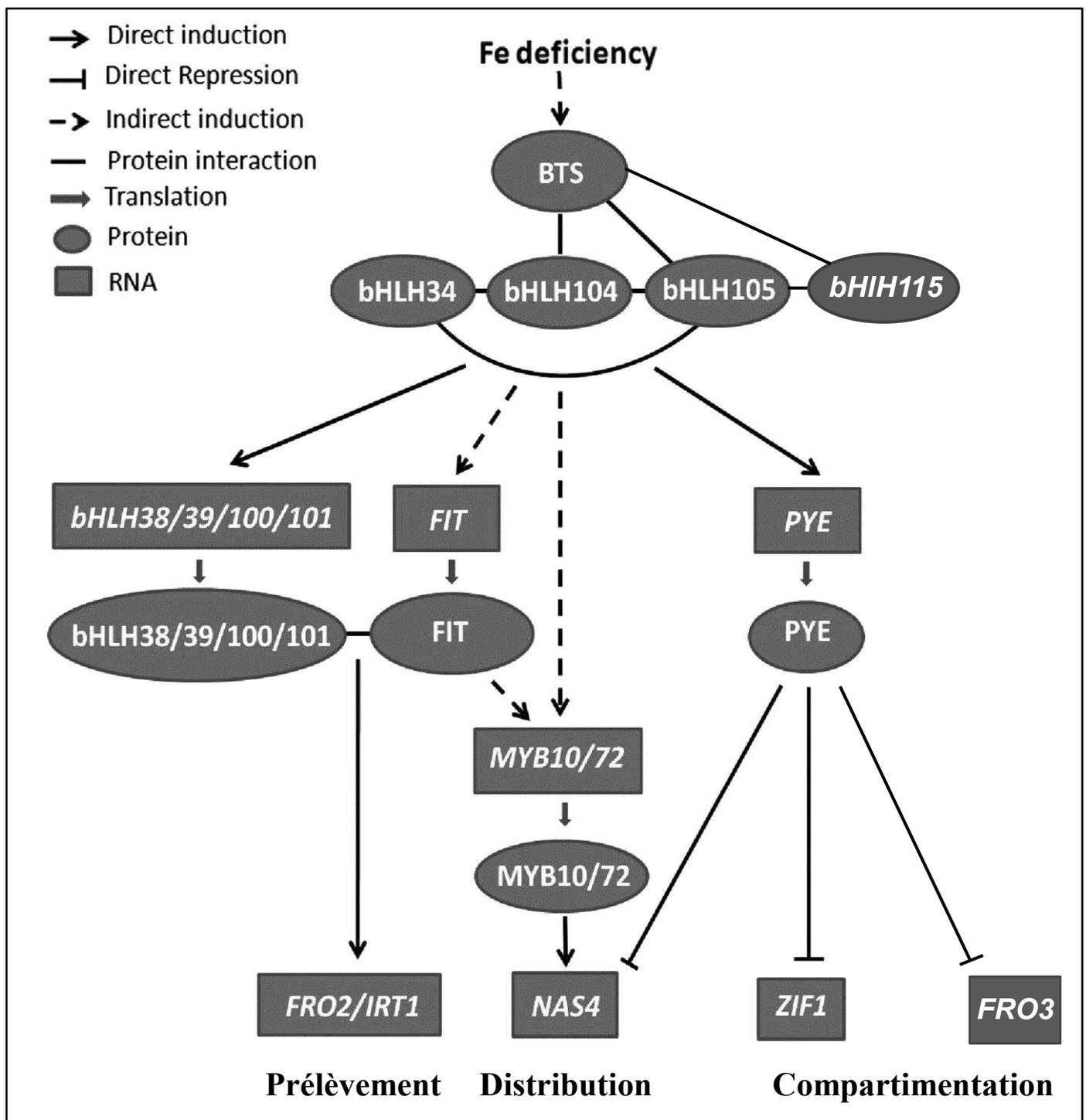


Figure 12 : Les réponses moléculaires à la carence en fer.

BRUTUS se place en principal régulateur en amont de toute la voie. Il interagit directement avec bHLH104, bHLH105/ILR3 et bHLH115 dont les gènes sont fortement induits par la carence en fer. Ensuite bHLH104, bHLH105/ILR3 et bHLH34 sont capables de s'hétérodimériser pour induire la transcription des bHLHs du sous-groupe Ib (*bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100*, et *bHLH101*) connus pour interagir avec bHLH29/FIT. *FIT* est transcriptionnellement induit par la carence en fer, toutefois ses mécanismes d'induction ne sont pas identifiés. En interagissant entre elles, ces protéines bHLH sont capables d'induire *IRT1* et *FRO2* (les gènes impliqués dans le prélèvement du fer présent dans le sol. Les hétérodimères de bHLH104, bHLH105/ILR3 et bHLH34 sont responsables également de l'induction de *bHLH47/PYE* dont la protéine va réguler la compartimentation du fer (en inhibant transcriptionnellement *NAS4*, *ZIF1* et *FRO3*). En parallèle, les R2R3-MYB (MYB10 ou MYB72) induits en carence en fer vont permettre l'expression de *NAS4*, ce qui démontre bien l'aspect dynamique d'un tel modèle.

D'après Li *et al.*, 2016, Long *et al.*, 2010.

2013). Le domaine CHY-Type Zn-finger participe à la mise en place des régulations transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et post-traductionnelle (Gamsjaeger *et al.*, 2007). Le domaine RING E3 ligase permet l'ubiquitination des protéines cibles induisant une modification de leur activité ou leur adressage à la dégradation *via* le protéasome 26S (Hua et Vierstra, 2011). Lors d'une carence en fer, BTS va être sous sa forme stable et active. Cette protéine va alors induire la dégradation de ses cibles en les polyubiquitinant et en les adressant ainsi au protéasome 26S. En présence de fer, le fer est reconnu par le domaine HHE de BTS, la protéine est alors clivée et devient donc inactive (Fig. 11). Chez *Arabidopsis*, les cibles majeures de BTS ont été identifiées, il s'agit de facteurs de transcription de la famille des bHLH (basic helix loop helix). Historiquement, elles ont été nommées les PYEL (POPEYE LIKE ; Fig. 11) et font toutes partie du sous-groupe IVc des bHLHs (BASIC HELIX-LOOP-HELIX). En effet, dans ce groupe, bHLH104, bHLH105/ILR3 (IAA-LEUCINE RESISTANT3) et bHLH115 sont capables d'interagir directement avec BTS afin d'être dégradées (Selote *et al.*, 2015). Dans ce même groupe, seul bHLH34 n'est pas une cible de BTS pour sa dégradation. Ces quatre bHLH sont toutes impliquées dans les régulations de l'homéostasie du fer, et plus particulièrement dans l'induction des gènes de réponse à la carence. Leur expression est fortement induite en réponse à la carence en fer (Zhang *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2016). Curieusement, c'est lors d'une carence en fer que BTS dégrade ces cibles, ce qui laisse penser que (i) cette dégradation est très dynamique car elle permet d'induire les gènes de réponse à la carence, et (ii) qu'elle participe à une boucle de rétrocontrôle permettant d'éviter une suraccumulation du fer une fois la réponse à la carence induite.

3.4.2 BRUTUS module les voies de réponse à la carence.

En aval de BTS, les bHLH104, bHLH105/ILR3 et bHLH34 se placent comme les actrices centrales dans les voies de réponse à la carence en fer (Fig. 12). En effet, ces trois protéines sont capables de s'homo- ou s'hétérodimériser afin de déclencher des cascades transcriptionnelles de régulation (Zhang *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2016). Ces complexes protéiques sont responsables de l'induction transcriptionnelle d'autres facteurs bHLHs du sous-groupe Ib (*bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100*, et *bHLH101*). Ces quatre bHLHs sont également capables de s'hétérodimériser et d'interagir avec bHLH29/FIT (FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR ; Yuan *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2007). Cette interaction va mener à l'induction des gènes impliqués dans la stratégie I du prélèvement du fer (*IRT1* et *FRO2*).

Le gène *FIT* a tout d'abord été identifié chez un mutant de tomate nommé *FER*. Ces plantes très chlorotiques étaient affectées dans les mécanismes de prélèvement du fer mis en place en réponse à la carence (Brown *et al.*, 1971 ; Ling *et al.*, 2002). Ainsi *FIT* a été décrit comme jouant un rôle central dans l'induction des gènes de la stratégie de prélèvement I. De plus, comme les autres *bHLHs* citées précédemment, l'expression de *FIT* est fortement induite en réponse à la carence en fer (Colangelo et Guerinot, 2004). Une approche de ChIP-qPCR (Chromatin Immuno-Precipitation-PCR quantitative) a permis de mettre en évidence l'interaction directe *in planta* entre bHLH104 et bHLH105/ILR3 et le promoteur de quatre gènes bHLHs du sous-groupe Ib (Zhang *et al.*, 2015 ; Fig. 12). Toutefois, cette même expérience a montré que *FIT* n'était pas la cible directe de bHLH104 et bHLH105/ILR3.

En aval de ces acteurs, deux facteurs de transcription de type R2R3-MYB (MYB10 et MYB72) ont été identifiés comme des régulateurs de la réponse à la carence en fer. Le double mutant *myb10/myb72* présente un phénotype de grande sensibilité à la carence (Palmer *et al.*, 2013). Par une approche de transcriptomique, cette étude a montré que MYB10 et MYB72 étaient des inducteurs transcriptionnels de *NAS4* (*NICOTIANAMINE SYNTHASE 4* ; Fig.12). Une nouvelle fois, une approche de ChIP-qPCR a permis de démontrer que cette induction est directe (Palmer *et al.*, 2013). *NAS4* comme les autres *NAS*, est responsable de la production de la NA et participe notamment au transport phloémien du fer.

En parallèle à la voie d'induction du prélèvement gouverné par IRT1 et FRO2 le bHLH105/ILR3 seul, ou avec l'un de ses interactants, est également responsable de l'induction de l'expression de *bHLH47/PYE* (POPEYE). Ce facteur de transcription est capable d'interagir au niveau protéique avec bHLH105/ILR3 et bHLH115 (Long *et al.*, 2010). *PYE* se place en régulateur central de la compartimentation cellulaire du fer. En effet, ce bHLH est un important inhibiteur transcriptionnel (direct) de l'expression de *NAS4*, *ZIF1* et *FRO3* (Long *et al.*, 2010), trois gènes impliqués dans la distribution et la compartimentation cellulaire du fer. Dans cette étude, des microarrays mettent également en évidence la suraccumulation des transcrits de *NRAMP4*, *FRD3* ou encore de certains *VTL* (Cf. §3.2 et §3.3) dans *pye-1*, mais le lien direct n'est pas établi. Il est intéressant de constater que la même voie d'induction transcriptionnelle dépendante des bHLHs du sous-groupe IVc peut induire *NAS4* *via* MYB10 et MYB72 et l'inhiber *via* *PYE*. Ce constat implique que cette cascade de régulation est très dynamique et difficilement caractérisable expérimentalement. De manière remarquable, cette voie de régulation comporte dix facteurs de transcription de type bHLH, ce qui représente près de 10% des gènes appartenant à cette famille (Bailey *et al.*, 2003 ; Heim *et al.*, 2003). Le maintien de l'homéostasie du fer en réponse à une carence de ce

dernier est donc essentiellement contrôlé au niveau transcriptionnel. On observe donc une voie principalement transcriptionnelle, qui répond à la carence en fer et permet le maintien de l'homéostasie. Toutefois, très peu de données sont disponibles quant aux réponses moléculaires mises en place par les plantes face à un excès de fer.

De manière intéressante, le mutant *pye-1* a comme particularité de suraccumuler du fer dans ses tissus, et plus spécifiquement dans ses racines. Cette accumulation va mener à l'induction ou à la dé-répression de nombreux gènes associés au stockage du fer comme les transporteurs vacuolaires de type *VTL*. Elle va également moduler l'homéostasie ferrique des plastes notamment en induisant l'expression des gènes de ferritines *FER1*, *FER3* et *FER4* (Long *et al.*, 2010). Les ferritines sont des protéines de stockage transitoire du fer dans les plastes permettant d'éviter la présence de fer libre. Ainsi *PYE* pourrait être un régulateur de l'homéostasie du fer dans le chloroplaste.

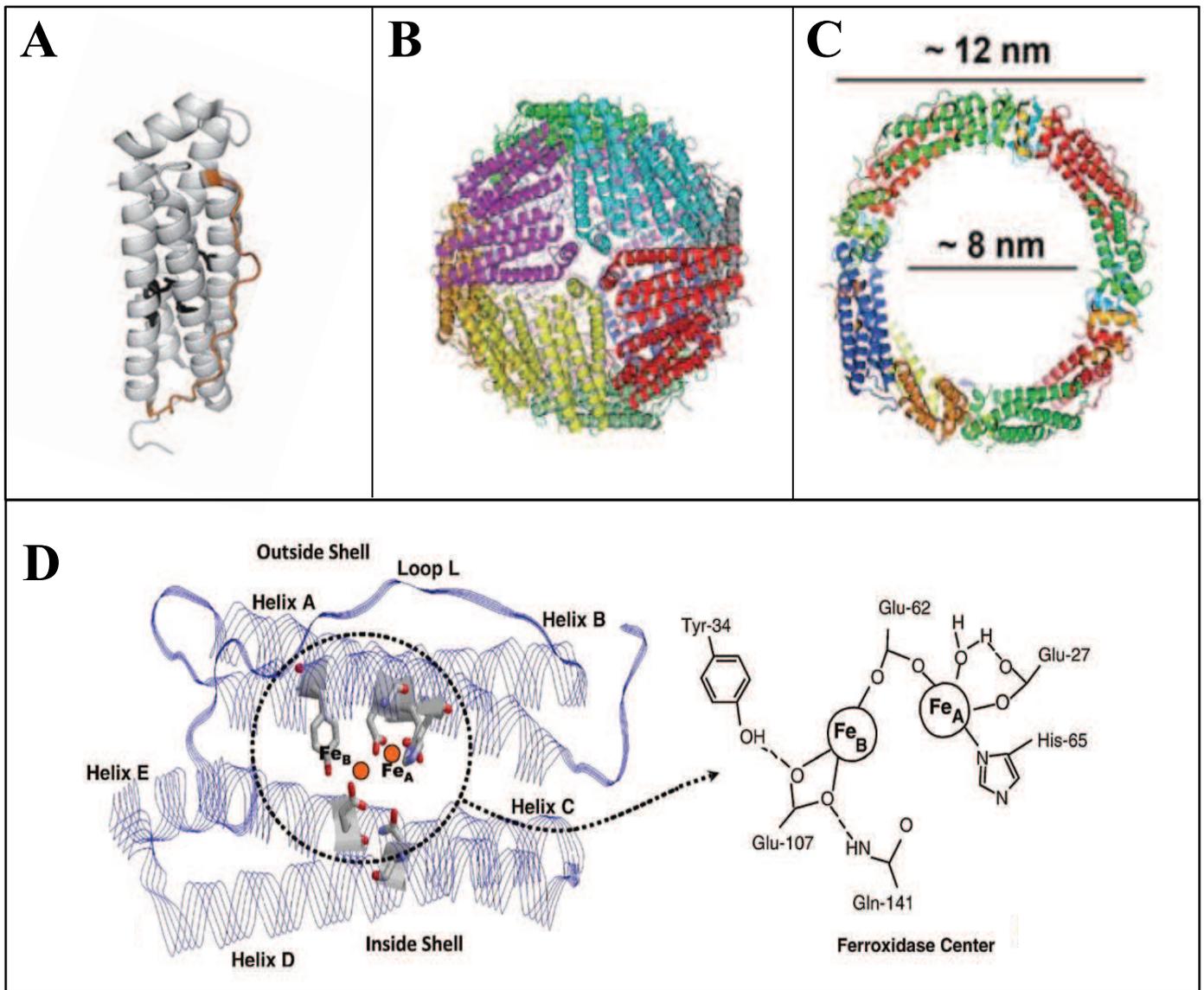


Figure 13 : La structure et le centre ferroxidase des ferritines.

Représentation d'une sous unité de ferritine animale de type H composée de quatre hélices disposées en faisceau (gris), du site ferroxidase ligand du fer (noir) et d'une boucle externe (orange) (A). Ces entités s'assemblent en 24 sous-unités afin de former une sphère protéique à canaux de symétrie d'ordre 4 (B). Cette structure délimite une sphère avec une large cavité interne (8nm environ) pouvant stocker jusqu'à 4500 atomes de fer (C). Les hélices A, B, C et D sont disposées parallèlement et forment le corps principal de la sous-unité (D). L'hélice E est impliquée dans l'assemblage des ferritines en 24 sous-unités. Le centre ferroxidase des ferritines est composé de six acides aminés qui lient ensemble deux atomes de fer (Fe A et Fe B).

D'après Bernacchioni *et al.*, 2016; Finazzi et Arosio 2014.

4. Les ferritines.

Les ferritines sont des protéines ubiquitaires présentes dans tous les règnes du vivant excepté chez la levure (Andrews *et al.*, 2003 ; Briat *et al.*, 2009). Ces protéines ont initialement été isolées chez les animaux. Chez les plantes, les premières ferritines ont été isolées à partir d'hypocotyles et de graines de haricots, après avoir été observées par microscopie électronique (Hyde *et al.*, 1963). Ces protéines ont également été retrouvées chez les champignons et les bactéries (Thiel, 1987). Cette distribution ubiquitaire montre l'importance de ces protéines pour les êtres vivants. Comme il l'est mentionné précédemment, le fer ferrique est très peu soluble et précipite aux pH physiologiques. De plus, il peut former des radicaux libres nocifs pour la cellule. Les ferritines ont la capacité de stocker le fer ferrique sous une forme soluble, non toxique car incapable de réagir avec l'oxygène, et disponible pour le métabolisme cellulaire. L'oxydation du fer ferreux en fer ferrique est réalisée par la protéine elle-même car elle dispose d'un centre ferroxidase (Arosio *et al.*, 2009). Le fer stocké dans les ferritines est disponible pour les besoins de la cellule et il est non réactif avec l'oxygène. Les ferritines animales représentent la forme principale de stockage du fer. Elles sont localisées dans le cytoplasme alors que chez les plantes elles sont dans les plastes (Van der Mark *et al.*, 1983). Les ferritines s'auto-assemblent en une structure comportant 24 sous-unités qui forme une sphère creuse pouvant contenir jusqu'à 4500 atomes de fer couplés à du phosphate (ratio 3/1 ; Andrews et Kumar, 1992 ; Briat *et al.*, 2010). Bien que la structure des ferritines soit très conservée entre les règnes, leurs séquences primaires et leurs régulations sont très diverses.

4.1 Les ferritines animales.

4.1.1 Structure et assemblage.

La structure primaire des sous-unités de ferritines a très tôt été déterminée chez les animaux (Costanzo *et al.*, 1986). Les monomères de ferritines s'assemblent afin de former une sphère creuse d'environ 480 KDa mesurant approximativement 12 nm de diamètre (Fig. 13A, B et C). Les canaux des axes de symétrie des sous-unités d'ordre 3 et 4 sont respectivement hydrophiles et hydrophobes. Seule la première configuration permettrait le stockage du fer. Chez les mammifères, les ferritines contiennent deux types de sous-unités appelées H (Heavy) et L (Light) qui présentent différentes compositions selon leur localisation. Les sous-unités H portent l'activité peroxydase permettant l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique. Cette étape est indispensable pour l'incorporation du fer dans le centre

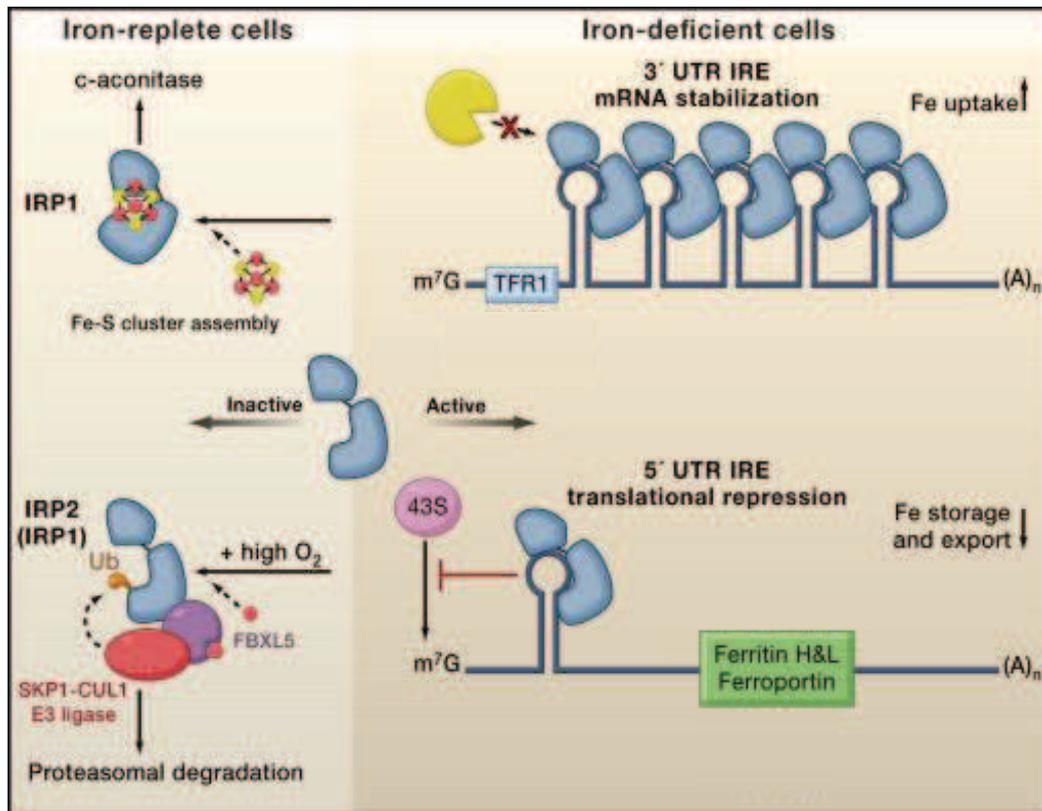


Figure 14 : Régulation de l'homéostasie du fer chez les mammifères par le système IRE/IRP.

En condition de carence en fer (à droite), IRP1 et IRP2 s'accrochent aux séquences cis-régulatrices *IREs* présentes en 3'-UTR des transcrits de transferrine (TFR1) et en 5'-UTR des transcrits de ferritines ou de ferroportines. Une hybridation d'IRP en 5' de son messenger cible va inhiber sa traduction alors que l'hybridation de plusieurs IRPs sur les *IREs* en 3' du messenger de transferrine va augmenter sa stabilité. Les conséquences vont être une entrée de fer dans la cellule et une inhibition de son stockage et de sa sortie. En condition de présence de fer, FBXL5 va interagir avec IRP2 (et IRP1) et recruter le complexe SKP1-CUL1, ce qui va induire l'ubiquitination et la dégradation d'IRP2 (et IRP1) *via* le protéasome. Dans ces conditions, la présence de fer va aussi réguler directement IRP1 en permettant l'assemblage de son centre fer-soufre [4Fe-4S], lui conférant ainsi son activité d'aconitase.

D'après Hentze *et al.*, 2010.

minéral. Le centre ferroxidase est composé de six acides aminés qui lient deux atomes de fer (Glutamate 27, Tyrosine 34, Glutamate 62, Histidine 65, Glutamate 107 et Glutamine 141 ; Fig. 13D). Les sous-unités L sont quant à elles responsables de la nucléation du fer (Lawson *et al.*, 1991). Ainsi, les ferritines riches en sous-unités H auront la capacité de séquestrer rapidement le fer tandis que les ferritines riches en sous-unités L permettront un stockage plus stable et plus long du fer. En effet, le foie et la rate qui stockent une quantité importante de fer ont des ferritines à dominance de L alors que le cœur et le cerveau contiennent une plus grande proportion de sous-unités H (Andrews et Kumar, 1992). Les ferritines animales s'assemblent dans le cytoplasme et représentent un important dispositif de stockage.

4.1.2 Les régulations.

Les ferritines sont fortement accumulées en réponse au fer ou à un stress abiotique et ce, au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Thiel, 2007). Des mécanismes transcriptionnels sont notamment impliqués dans l'expression des sous-unité H ou L selon leurs localisations tissulaires. Les hèmes sont des régulateurs positifs des gènes de ferritines en permettant leur induction par le facteur de transcription Nrf2 (NUCLEAR FACTOR ERYTHROID 2-RELATED FACTOR 2 ; Hintze *et al.*, 2007). En réponse à des stimuli de type stress oxydatif, de nombreux acteurs ont été mis en évidence comme régulateurs transcriptionnels des ferritines (Finazzi et Arosio 2014). Malgré tout ce réseau de régulation, il existe une voie majeure de régulation post-transcriptionnelle qui permet une adaptation rapide aux fluctuations du fer et au stress oxydatif. Ce mécanisme représente un exemple élégant d'une fine coordination d'une régulation cytoplasmique sur l'accumulation des transcrits de différents gènes (Hentze *et al.*, 1989). Ce mécanisme est basé sur l'action de deux protéines cytoplasmiques IRP1 et IRP2 (IRON RESPONSIVE PROTEIN) qui interagissent directement avec les séquences nucléotidiques *IRE* (*IRON RESPONSIVE ELEMENT* ; Thiel *et al.*, 2007) présentes en 5'-UTR des messagers de ferritines. Les *IREs* forment une structure en épingle à cheveux (Pantopoulos *et al.*, 2004). Le système IRE/IRP va être directement modulé par le statut en fer (Fig. 14) : quand le niveau de fer est bas, IRP1 et IRP2 vont s'accrocher aux transcrits de ferritines et ainsi bloquer leurs traductions : quand il y a du fer disponible, IRP2 va être dégradé par le protéasome (Guo *et al.*, 1995), IRP1 quant à lui va s'associer à un cluster [4Fe-4S] et avoir une activité d'aconitase cytoplasmique (Rouault et Tong, 2005). La dégradation d'IRP2 par le protéasome en condition de présence en fer va impliquer la formation d'un complexe ubiquitine E3 ligase avec Skp1 et CUL1 ainsi que FBXL5 (dont BTS est l'orthologue) (Cf. §3.4.1). Cela déclenche l'assemblage d'un

complexe ubiquitine E3 ligase avec Skp1 et CUL1 (Fig. 14). Ce complexe entraîne l'ubiquitination d'IRP2, le conduisant à sa dégradation par le protéasome. Les *IREs* ne sont pas seulement présents sur les messagers de ferritines (Hentze *et al.*, 2010). En effet, on retrouve ces structures en 5'-UTR des transcrits de ferroportine (un transporteur membranaire d'efflux de fer) où elles sont aussi impliquées dans l'inhibition de la traduction, comme pour les ferritines. Il existe des *IREs* également en 3'-UTR des transcrits de TfR1 (Transferrine Receptor 1) un transporteur membranaire d'influx de fer. Dans ce cas les IREs/IRPs vont stabiliser les messagers et ainsi augmenter la quantité de fer dans la cellule. C'est majoritairement IRP1 qui est impliqué dans la stabilisation alors qu'IRP2 est lui majoritairement impliqué dans l'inhibition de la transcription. En conclusion, les IRE/IRP modulent l'homéostasie du fer à la fois en régulant son transit dans la cellule, mais également son stockage (Fig. 14).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les mutants d'aconitase ne présentent pas de dérégulations au niveau de l'expression des ferritines. De plus, aucune séquence IRE n'a été identifiée dans la région 5'-UTR des transcrits de ferritines. Cela suggère donc que la régulation impliquant le système IRE/IRP n'existe pas chez les végétaux (Arnaud *et al.*, 2007).

4.2 Les ferritines végétales.

4.2.1 Structure et assemblage

L'alignement des séquences peptidiques des sous-unités de ferritines montrent à quel point ces dernières sont très conservées entre les règnes. Chez les végétaux, les sous-unités ressemblent plus au type H qu'au type L (Andrew et Kumar, 1992), toutefois elles semblent avoir les deux fonctions. De plus, les sous-unités de ferritines végétales possèdent quelques particularités comme leur hydrophobie ou une extension N-terminale (Lobréaux *et al.*, 1992) que ne possèdent pas les ferritines animales. Elles ont une masse d'environ 32 KDa avant leur maturation. L'extension N-terminale comporte deux domaines : le premier est appelé peptide d'extension et le second en amont de celui-ci est un peptide de transit clivé pour obtenir une ferritine mature. Le peptide d'extension est maintenu après la maturation et est impliqué dans la stabilité de la protéine durant l'entrée ou la sortie du fer (Van Wuytswinkel *et al.*, 1999). Le peptide de transit est composé de 40 à 50 acides aminés et est responsable de la localisation subcellulaire des ferritines chez *Arabidopsis* (Ragland *et al.*, 1990). En effet, contrairement aux ferritines animales cytoplasmiques, les ferritines végétales sont majoritairement dans les plastes (Briat *et al.*, 2010) et ont été observées dans les mitochondries (Vigani *et al.*, 2013).

Les canaux des axes de symétrie d'ordre 3 et 4 sont tous deux hydrophiles alors que chez les animaux, ils sont respectivement hydrophiles et hydrophobes (Cf. §4.1.1) (Fig.13).

4.2.2 Le rôle des ferritines chez *Arabidopsis*.

Chez *Arabidopsis thaliana*, les ferritines sont codées par 4 gènes nommés *AtFER1* à *4*. Des alignements de séquences ont montré que les membres de cette famille multigénique partagent un fort degré d'homologie suggérant une redondance fonctionnelle (Briat *et al.*, 2010). L'analyse de l'expression dans les différents tissus de chacun des gènes de ferritine a permis de mettre en évidence la localisation de leurs ARN. Alors que les transcrits d'*AtFER1*, *3* et *4* sont localisés dans la rosette, les racines, la tige, les fleurs, et les siliques, ceux de *AtFER2* ne s'accumulent que dans la graine (Petit *et al.*, 2001).

Le rôle des ferritines a principalement été déterminé grâce à la caractérisation des simple mutants (*fer1*, *fer2*, *fer3* et *fer4*) et du triple mutant (*fer1-3-4*). Chez *Arabidopsis*, les ferritines sont essentiellement impliquées dans la protection contre le stress oxydatif mais n'ont pas un rôle majeur dans le stockage du fer comme chez les animaux. Dans les feuilles, l'activité des ferritines a un impact modéré sur la photosynthèse. En effet, d'après K. Ravet et ses collaborateurs (2009), dans le triple mutant perte de fonction *fer1-3-4*, la fixation de CO₂ n'est que légèrement affectée. La feuille est le principal puit d'accumulation du fer dans la plante, et les chloroplastes contiennent 80% du fer de cet organe (Shikanai *et al.*, 2003). Cependant, très peu de ferritines ont été trouvées dans les chloroplastes, elles sont majoritairement localisées dans les plastes non chlorophylliens. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que les ferritines pourraient représenter la source de fer majeure dans les phases précoces du développement. Malgré cela, elles ne sont pas indispensables au bon fonctionnement de la feuille. Elles participeraient au stockage transitoire du fer dans les plastes afin de limiter le stress oxydatif (Ravet *et al.*, 2009). En effet, elles permettent de maintenir un équilibre entre la disponibilité en fer pour le métabolisme et une séquestration du fer pour éviter les dommages provoqués par la production de ROS. Les ferritines préserveraient également la plante en cas de stress biotique ou abiotique pour limiter la disponibilité en fer à l'organisme pathogène ou pour prévenir la plante d'un stress hydrique par exemple (Dellagi *et al.*, 2005 ; Briat *et al.*, 2010). De plus, les agents pro-oxydants tels que le NO, l'H₂O₂, l'ozone ou encore la forte intensité lumineuse induisent la synthèse des ferritines (Arnaud *et al.*, 2006; Lobréaux *et al.*, 1995). Ces constatations nous mènent à penser que les ferritines jouent un rôle essentiel dans la limitation de la formation des ROS. Ces

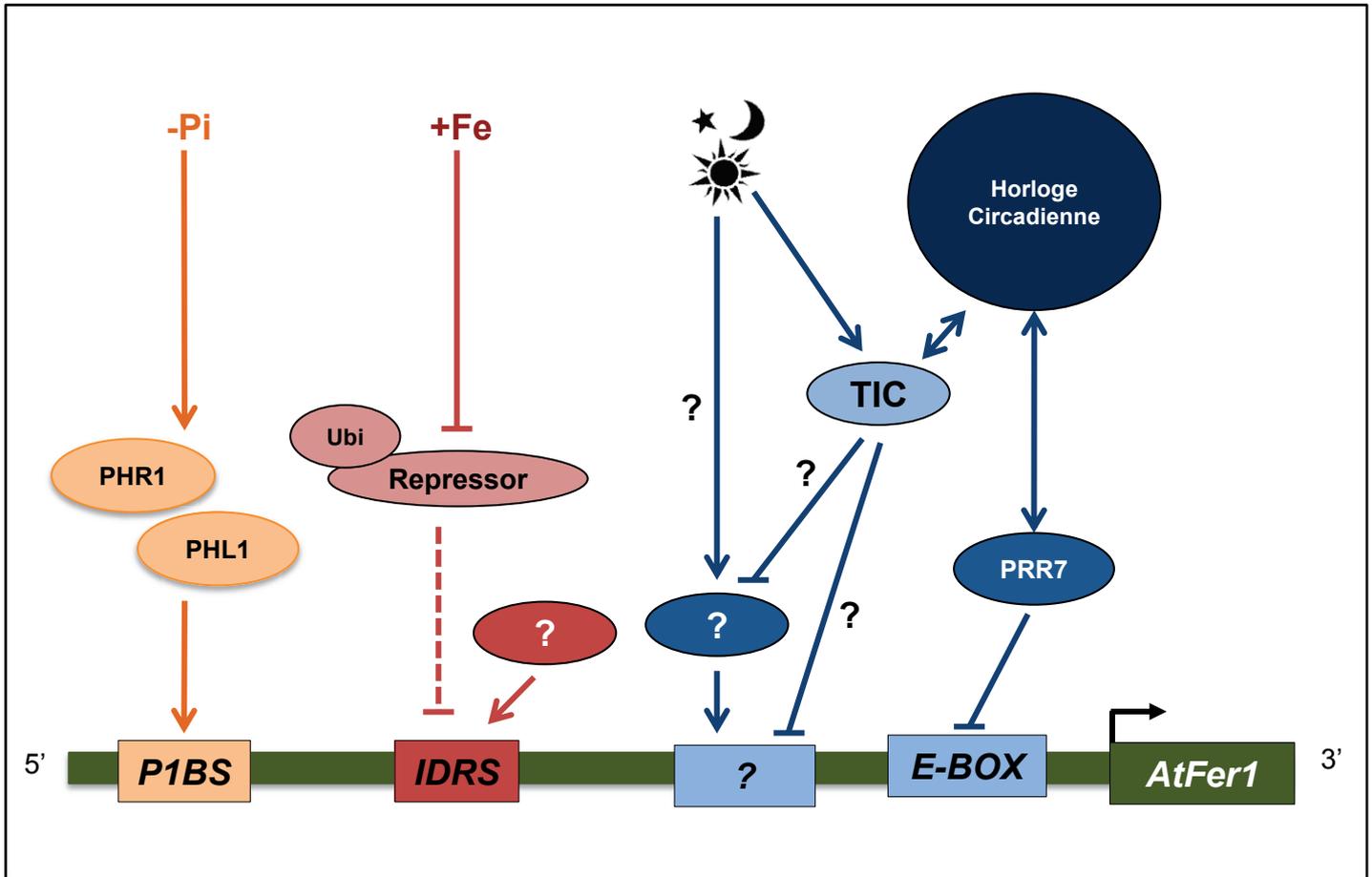


Figure 15 : Régulation transcriptionnelle de l'expression d'*AtFER1*.

AtFER1 est régulé au niveau transcriptionnel par 3 voies : une voie phosphate, une voie fer et une voie lumière/horloge circadienne. Une carence en phosphate (-Pi) induit l'expression d'*AtFER1* via l'action des facteurs de transcription PHR1 et PHL1 (homo-ou hétérodimère). En absence de fer, un élément répresseur empêche la transcription d'*AtFER1*. Cet élément est dégradé en présence de fer par le protéasome 26S (après ubiquitinylation), conduisant à la dé-répression de l'expression d'*AtFER1*. L'élément *cis* impliqué dans cette voie est l'*IDRS* (*Iron Dependent Regulatory Sequence*). Les régulateurs interagissant avec l'*IDRS* en présence et en absence de fer ne sont pas connus. Enfin, l'expression d'*AtFER1* est également régulée par l'horloge circadienne avec un maximum d'accumulation du transcrit à l'aube. Le gène *TIC* est un facteur nucléaire de l'horloge circadienne qui agit comme un répresseur de l'expression d'*AtFER1*. *PRR7* est un facteur de transcription de type bHLH impliqué dans le contrôle de l'horloge circadienne, décrit comme étant un répresseur de l'expression d'*AtFER1*, et interagissant avec ce dernier via un élément *E-box* présent sur son promoteur.

Modèle établi d'après Arnaud *et al.*, 2006 ; Duc *et al.*, 2009 ; Bournier *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2013.

protéines jouent donc un rôle majeur pour que la plante puisse faire face aux situations indésirables imposées par les facteurs environnementaux.

Dans la graine, le mutant *fer2* présente une teneur en fer comparable à celle des graines sauvages (Ravet *et al.*, 2009). Ceci concorde avec les travaux d'une étude démontrant que la majorité du fer utilisé lors de la germination provient de la vacuole (Lanquar *et al.*, 2005). Ce constat ne semble pas s'appliquer à toutes les plantes. En effet, chez l'embryon du pois (*Pisum sativum*. L.) par exemple, le fer provenant des ferritines représenterait 92% du fer total, ce qui laisse penser que les stratégies de stockage du fer pourraient être différentes selon les espèces de plantes (Marentes et Grusak, 1998), dans ce cas entre brassicacées et légumineuses.

4.3.1 Les régulations transcriptionnelles.

Le rôle physiologique des ferritines n'est pas clairement établi chez les végétaux. Toutefois, de nombreuses études ont permis d'identifier un grand nombre de régulations impliquant des voies très diverses. Alors que le mécanisme de régulation le plus connu des ferritines animales est post-transcriptionnel, chez les végétaux, la régulation transcriptionnelle est la mieux décrite et semble être dominante sur les autres régulations. *AtFER1* étant le gène le plus exprimé chez *Arabidopsis*, il a été choisi comme modèle d'étude pour comprendre les mécanismes de régulation des ferritines végétales.

Le gène *AtFER1* est régulé transcriptionnellement par au moins 3 voies indépendantes dans les feuilles et les racines (Fig. 15) : l'excès de fer (i), la lumière et le rythme circadien (ii), et la carence en phosphate (iii).

(i) La voie fer a été identifiée suite à l'analyse structurale (délétion) du promoteur d'*AtFER1*. Cette étude a permis d'identifier un élément *cis* de 15 paires de bases nommé « *Iron-Dependent Regulatory Sequence* » (*IDRS* ; Petit *et al.*, 2001) impliqué dans la réponse au fer. Cette voie dépendante de l'*IDRS* est répressive. En absence de fer, un répresseur empêche la transcription d'*AtFER1*. En présence de fer, le répresseur est ubiquitinylé, puis dégradé par une voie dépendante du protéasome 26S, conduisant à la levée de répression de l'expression d'*AtFER1* (Arnaud *et al.*, 2006). Le répresseur n'est pas fixé sur l'*IDRS*. En effet, par des expériences de retard sur gel, il a été montré que l'*IDRS* était occupé par une (ou des) protéine(s) en condition répressive et dé-répressive (Arnaud *et al.*, 2006). Des approches pharmacologiques ont montré que la voie *IDRS* met en jeu un messager secondaire, l'oxyde nitrique (NO ; Murgia *et al.* 2002 ; Murgia *et al.*, 2004). Après un excès de fer, une forte

augmentation ponctuelle de NO est observée au niveau des chloroplastes (Arnaud *et al.*, 2006) ce qui pourrait être un signal pour induire les ferritines et ainsi prévenir un stress oxydatif dans le siège de la photosynthèse.

(ii) Afin d'identifier les acteurs moléculaires régulant l'expression d'*AtFER1*, un crible génétique a été mis en place. Un traitement à l'éthyl methane sulfonate (EMS) a été appliqué sur des lignées transformées avec le promoteur d'*AtFER1* fusionné au gène de la luciférase (*pAtFER1::LUC*). En condition de carence en fer, les plantes présentant une activité luciférase possédaient donc une mutation affectant le fonctionnement d'une voie répressive de l'expression d'*AtFER1*. Un mutant a été sélectionné, puis une approche de clonage positionnel a permis d'identifier la protéine TIC (TIME FOR COFFEE ; Duc *et al.*, 2009). Bien que TIC et la voie impliquant l'*IDRS* aient un effet répresseur sur l'expression d'*AtFER1*, les deux voies sont indépendantes. Chez *Arabidopsis*, TIC a été décrit comme un régulateur nucléaire de l'horloge circadienne (Ding *et al.*, 2007). TIC est décrit comme impliqué dans le maintien de l'homéostasie métabolique (Sanchez-Villarreal *et al.*, 2013) La régulation d'*AtFER1* semble également être dépendante de l'horloge circadienne (Duc *et al.*, 2009). Plus récemment, des travaux de Chip-Seq menés par Liu et ses collaborateurs (2013) suggèrent que le facteur de transcription PRR7 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7), un composant de l'horloge circadienne, soit un régulateur direct de la transcription d'*AtFER1* confirmant l'importance de cette voie dans le contrôle de l'expression de ce dernier.

L'horloge circadienne se définit par un regroupement de boucles de rétroaction qui génèrent un rythme perpétuel endogène et permet l'anticipation des modifications des conditions environnementales. Ce mécanisme autonome génère des cycles d'environ 24 heures appelés rythme circadien. Le système de l'horloge peut être divisé en trois parties : les entrants qui perçoivent les variations environnementales, comme l'alternance jour/nuit, la température ; l'oscillateur, régulé par les entrants, qui maintient le rythme circadien ; et les sortants qui lient l'oscillateur au métabolisme et à la physiologie de la plante (Mas, 2005). Les mutants affectés dans l'activité de l'horloge permettent de mettre en évidence les sortants (par exemple un faible niveau de croissance, une photosynthèse moins efficace, et un taux de mortalité élevé). De plus, l'horloge a été impliquée dans la régulation de nombreux mécanismes tels que la floraison, la croissance de l'hypocotyle, la synthèse d'hormones ou encore la photosynthèse et la nutrition ferrique (Dodd *et al.*, 2005 ; Nozue *et al.*, 2007; Herrero et Davis, 2012 ; Tissot *et al.*, 2014, Cf. annexe).

Les acteurs moléculaires de l'oscillateur se regroupent en trois boucles de rétro-contrôle : la boucle centrale (Core loop ; constituée de CCA1, LHY et TOC1), la boucle du matin (Morning loop), et la boucle du soir (Evening loop ; Locke *et al.*, 2006).

Dans les racines, l'horloge semble avoir le même mécanisme général, avec toutefois une différence sur les rôles des facteurs de transcription LHY et CCA1. En effet, ces protéines dans les racines ne semblent pas réprimer l'expression de TOC1 contrairement à ce qu'il a été observé dans les feuilles (James *et al.*, 2008). De plus, l'horloge a besoin pour fonctionner d'un signal photosynthétique provenant des parties aériennes. Ces caractéristiques font de l'horloge un mécanisme organe spécifique, mais pas organe autonome.

(iii) Récemment, un crible simple hybride a été mis en place afin de mettre en évidence des facteurs de transcription interagissant avec la région promotrice d'*AtFER1*. Cette approche a mis en évidence que le facteur de transcription PHR1 (Phosphate Starvation Reponse Regulator 1, MYB-like) interagissait avec le promoteur d'*AtFER1* (Bournier *et al.*, 2013). Des expériences de retard sur gel ont permis de montrer que cette protéine se fixe sur un élément *cis* positionné en 5' de l'*IDRS* du promoteur nommé *P1BS* (*PHR1 Binding Sequence*). PHR1 est un facteur impliqué dans les mécanismes de réponse à la carence en phosphate. Cette étude a aussi mis en évidence que PHL1 (PHR1-LIKE) agit de façon conjuguée avec PHR1 pour réguler l'expression d'*AtFER1*.

Le phosphate est un macronutriment essentiel pour le bon développement des plantes. Il est le constituant de plusieurs molécules clés comme l'ATP ou les acides nucléiques. Il joue également un rôle crucial dans l'activation de certaines protéines par la phosphorylation (Marschner, 1995). Chez *Arabidopsis thaliana*, la voie de réponse à la carence en phosphate n'est pas aussi bien décrite que celle de la réponse à la carence en fer. Dans cette voie, PHR1 joue un rôle central dans la voie de réponse à cette carence (Briat *et al.*, 2015b, Cf. annexe). PHR1 est localisé dans le noyau, induit la transcription de nombreux gènes dont le promoteur contient un élément *P1BS* comme celui d'*AtIPS1* (Rubio *et al.*, 2001). *AtIPS1* est un gène marqueur de réponse à la carence en phosphate qui code pour un microARN dont la fonction n'est pas clairement définie. Il a été démontré que PHR1 agit de façon conjugué avec PHL1 (PHR1 Like) pour induire les gènes de réponse à la carence en phosphate (Bustos *et al.*, 2010).

D'un point de vue physiologique, la carence en phosphate génère un excès de fer, au moins chez *Arabidopsis thaliana* (Hirsh *et al.*, 2006). Cette interaction est confirmée par une étude qui a montré que la carence en phosphate génère une accumulation de cations

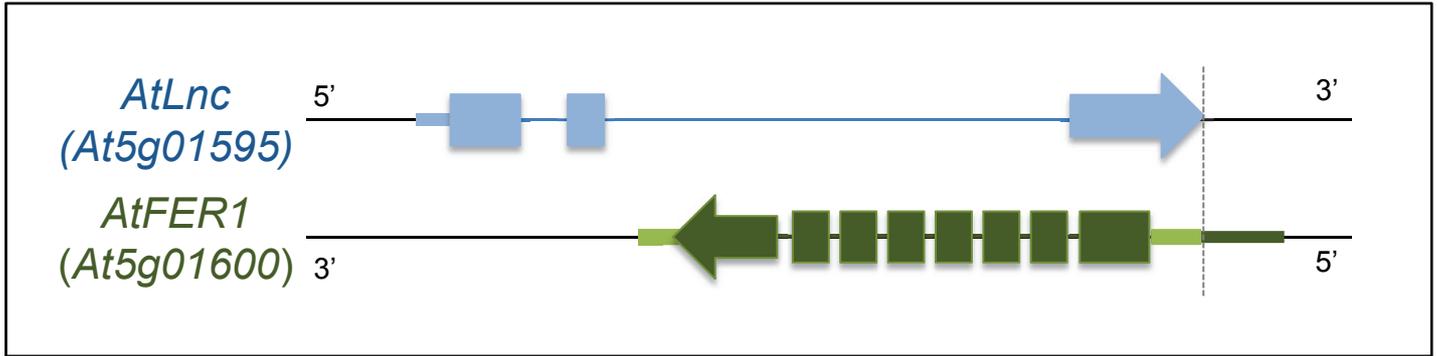


Figure 16 : Le rôle potentiel du lncAtFer1 sur son gène sens.

Un long non-coding RNA (*AtLnc*: LncRNA; bleu) chevauche la séquence génomique du gène sens *AtFER1*(vert) (Castelli *et al.*, 2004). Il est transcrit, polyadénylé et donc détectable en RT-qPCR, mais n'est pas traduit. Les régions 5'-UTR et 3'-UTR d'*AtFER1* sont représentées en vert clair. La fin du Lnc (en 3') s'aligne parfaitement avec l'initiation de la région 5'-UTR d'*AtFER1*.

métalliques (Misson *et al.*, 2005). En cas de carence, le fer stocké dans la vacuole sous forme de complexe fer/phosphate est probablement délocalisé avec le phosphate dans le cytosol, ce qui augmente considérablement la quantité de fer libre dans la cellule et modifie l'homéostasie de cet élément (Hirsh *et al.*, 2006). De plus, il a été montré qu'une carence en phosphate provoque également une augmentation du prélèvement de fer (Ward *et al.*, 2008). D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence que la biodisponibilité du fer lors d'une carence en phosphate régulaient la croissance et le développement racinaire (Muller *et al.*, 2015 ; Rai *et al.*, 2015). Plus précisément, le fer et le zinc affecteraient la réponse des gènes à la carence en phosphate et moduleraient la croissance de la racine primaire *via* l'auxine. C'est donc l'interaction antagoniste du fer et du phosphate qui régule le développement du méristème racinaire. Ainsi, la régulation directe de l'expression d'*AtFER1* par PHR1 pourrait permettre le bon développement racinaire en évitant le stress oxydatif généré par un excès de fer comme abordé dans la publication de Guilhem Reyt (2015).

4.3.2 Les régulations post-transcriptionnelles.

Le gène *AtFER1* est régulé également post-transcriptionnellement en réponse à la disponibilité en fer et plus particulièrement en réponse aux ROS. En effet, en présence de ROS, le transcrit est dégradé (Ravet *et al.*, 2012). Cette dégradation se caractérise par la reconnaissance d'un élément *cis* appelé *Downstream (DST)* présent en 3' du transcrit. Cette séquence est constituée de trois modules conservés (TGA, TAGAT, GTA), séparés par des séquences non conservées (Sullivan et Green, 1996). Cette voie de dégradation dépend des deux éléments *trans* nommés DST1 et DST2 dont les gènes codant ne sont pas identifiés (Ravet *et al.*, 2012). La mesure de la demi-vie du transcrit d'*AtFER1* montre que dans les mutants *dst1* et *dst2*, le transcrit n'est plus déstabilisé par la présence de fer. Ces régulations par les DST semblent être un mécanisme essentiel qui permet aux plantes de faire face à des conditions environnementales défavorables, mais restent secondaires par rapport aux régulations transcriptionnelles.

4.3.3 La régulation potentielle par un ARN non codant.

Un autre élément potentiellement impliqué dans la régulation d'*AtFER1* a été identifié lors d'une campagne de séquençage haut débit de cDNA (Castelli *et al.*, 2004). Il s'agit d'un transcrit anti-sens LncRNA (LONG NON-CODING RNA ; *At5g01595*) chevauchant la séquence génomique d'*AtFER1* (Fig.16). *At5g01595* est transcrit mais non traduit. Il a été observé dans l'équipe que l'accumulation des transcrits d'*At5g01595* était inversement

corrélée à l'accumulation des transcrits d'*AtFER1*, notamment en réponse à une induction par le fer (thèse de Nicolas : Arnaud, 2007). Les mécanismes de régulation impliquant un LncRNA, bien que très étudiés, restent peu compris. Leur importance dans des processus biologiques chez de nombreuses espèces a clairement été expliquée. En effet, il a été montré que les LncRNA peuvent participer à la régulation de leurs gènes cibles en intervenant dans la dégradation des transcrits *via* la formation de petits ARN (régulation épigénétique ; Golden *et al.*, 2008), dans la modification de la structure chromatinienne (modulation des histones ; Rinn *et al.*, 2007), ou bien encore en modulant la traduction de leurs ARNm cibles (Mercer *et al.*, 2009 ; Jabnune *et al.*, 2013 : exemple pour un transporteur de phosphate chez le riz). Chez les plantes, les LncRNA sont transcrits par différentes polymérases, la pol II tenant un rôle majeur, suivie par la pol IV et la Pol V (deux évolutions de la pol II ; Vaughn and Martienssen, 2005) qui diversifient la population de LncRNA. La pol IV serait majoritairement impliquée dans la régulation par les siRNAs (petits ARN ; Zhang *et al.*, 2007) alors que la pol V elle, serait plus impliquée dans le recrutement de la machinerie des méthylations de l'ADN (Wierzbicki *et al.*, 2008). Plus spécifiquement, des études commencent à démontrer la régulation existant entre les LncRNA, le développement racinaire et la nutrition minérale (Jabnune *et al.*, 2013 ; Bazin et Bailey-Serres, 2015), ce qui pourrait être le cas pour le LncRNA d'*AtFER1*.

5. Projet de thèse

Comme il l'a été abordé précédemment, les plantes mettent en place de nombreux mécanismes moléculaires pour maintenir leur homéostasie en fer. Pour permettre une fine régulation de cette balance, le fer est prélevé dans le sol, transporté dans la plante, stocké et utilisé de façon très dynamique tout en évitant qu'il génère un stress oxydatif préjudiciable.

Les ferritines, en séquestrant le fer afin qu'il ne soit pas libre dans la cellule, ont un rôle important dans le maintien de l'homéostasie. *AtFER1* est le gène de ferritines le plus exprimé et dont les transcrits sont les plus accumulés en réponse au fer. Il est donc considéré comme modèle d'étude pour la régulation de l'expression des gènes de ferritines chez *Arabidopsis*. Il est très majoritairement régulé transcriptionnellement, et ce par trois voies indépendantes. Par ailleurs, sur un plan strictement cognitif, la régulation de l'expression d'*AtFER1* est un modèle de choix pour l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes, notamment en raison du nombre et de la complexité des voies potentiellement impliquées. Dans ce contexte, l'objectif a été abordé selon 2 axes différents :

(i) J'ai tout d'abord mis en place une étude fonctionnelle du promoteur d'*AtFER1*. Dans ce but, j'ai créé des lignées stables d'*Arabidopsis* exprimant le gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) sous le contrôle de différentes versions du promoteur d'*AtFER1* (délétions en 5' et en 3', mutagenèse dirigée). Le but de cette approche, en plus d'évaluer la spécificité tissulaire, a été de mettre en évidence le rôle des multiples éléments *cis*, leurs liens éventuels et leurs « forces » d'induction ou de répression (Chapitre I).

(ii) Dans un second temps, j'ai cherché à identifier des facteurs en *trans* impliqués dans la régulation de l'expression d'*AtFER1*. Dans ce but, j'ai mis en place un crible simple hybride en levure. Cette approche a permis d'identifier plusieurs facteurs de transcription pouvant moduler l'activité du promoteur d'*AtFER1*. Parmi eux, un semble particulièrement intéressant car il est lui-même lié à la réponse à la carence en fer. Il s'agit du facteur de transcription bHLH105/ILR3 (Chapitre II).

D'autre part, lors de sa thèse (2007), Nicolas Arnaud a identifié un long ARN non codant (*At5g01595*) pouvant potentiellement réguler *AtFER1*. Dans le cadre de ma thèse, un des objectifs était d'identifier s'il existe un rôle pour *At5g01595* dans le contrôle de l'expression d'*AtFer1*, en étudiant notamment un mutant perte de fonction pour le lncRNA d'*AtFER1* (Chapitre III).

Les mécanismes moléculaires et physiologiques mis en place par les végétaux en réponse à une carence en fer sont relativement bien décrits, et restent toujours très étudiés. A

l'inverse, peu d'informations sur la réponse des plantes à un « excès » de fer sont disponibles. Au niveau moléculaire, la majeure partie des données accumulées l'a été *via* l'étude de la régulation de l'expression d'*AtFER1*. Afin de mieux appréhender la séquence des événements qui se jouent au niveau moléculaire, il a été choisi de travailler à l'échelle du génome, et plus particulièrement du transcriptome, en prenant en compte l'aspect dynamique de cette réponse. En effet, la réponse des plantes aux variations environnementales est un phénomène qui s'effectue à différents pas de temps, depuis la perception de l'excès (quelques secondes) jusqu'au rééquilibrage du métabolisme et du programme développemental (plusieurs heures/jours). L'objectif principal de cette étude visait donc à étendre la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par les plantes en réponse à un « excès » de fer dans le milieu de culture. En nous focalisant sur les mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes, il s'agissait notamment de déterminer les réseaux de régulation qui sont impliqués dans les étapes précoces de la réponse. Cette approche a permis de mettre en place une cinétique d'induction par le fer en se basant sur les niveaux d'accumulation des transcrits d'*AtFer1*, puis de générer les données de transcriptomique (puces à ADN Affymetrix) nécessaires à l'identification des acteurs impliqués dans la réponse précoce à un excès de fer, avant que l'expression d'*AtFER1* ne soit induite (Chapitre IV).

Enfin, l'homéostasie du fer est particulièrement maintenue grâce au prélèvement de ce dernier dans le milieu. L'assimilation du fer est régie par un système de prélèvement bien caractérisé (FRO2/IRT1). En plus de ce système de transport ancré dans les cellules de l'épiderme de la racine, une étude menée par Pierre Fourcroy (Chercheur dans l'équipe d'accueil) a montré que la nutrition en fer était facilitée par la synthèse et la sécrétion de composés phénoliques *via* le transporteur PDR9. Pierre a observé que chez les mutants *pdr9*, une suraccumulation de composés phénoliques était observable dans les vacuoles. Dans le but d'identifier un transporteur vacuolaire responsable de ce phénomène, j'ai mis en place une comparaison transcriptomique du mutant *pdr9* par rapport au sauvage en réponse à la carence en fer. Ce microarray a permis d'identifier quelques gènes pouvant avoir un rôle dans le stockage de ces composés dans la vacuole (Chapitre III). De plus, j'ai cherché à caractériser si le prélèvement du fer par le mécanisme FRO2/IRT1 était lié aux composés phénoliques excrétés par le transporteur PDR9. Plus précisément, le but de cette approche était de savoir si le fer solubilisé par les composés phénoliques était bien prélevé par IRT1. Une caractérisation de mutants affectés dans le prélèvement a donc été mise en place en fonction de différents traitements minéraux (Chapitre V).

**Chapitre I : Etude
fonctionnelle des promoteurs
des gènes de ferritines.**

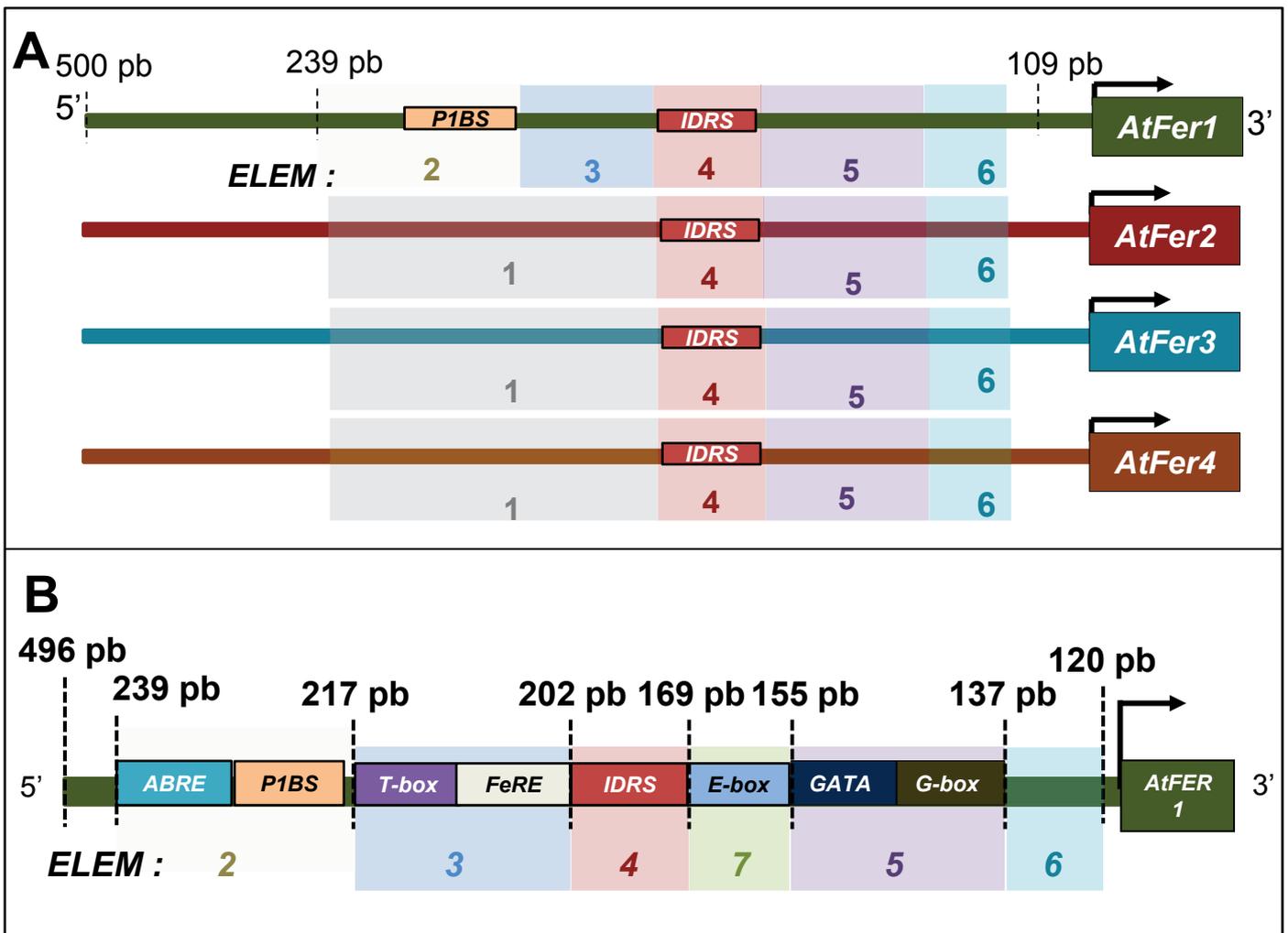


Figure 17 : Représentation schématique du promoteur minimal d'*AtFER1*.

Représentation schématique des promoteurs de ferritines chez *Arabidopsis thaliana* avec les éléments *cis*-régulateurs conservés (*ELEM*s). L'ensemble des éléments *cis*-régulateurs sont compris dans les 239 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. Seuls les *ELEM* 2 et 3 d'*AtFER1* et l'*ELEM* 1 d'*AtFER2*, 3 et 4 diffèrent entre les gènes de ferritines (A). Le modèle du promoteur minimal d'*AtFER1* a été conçu selon (i) les résultats de l'étude menée par Strozycski *et al.*, 2010 combinés à (ii) une analyse complémentaire réalisée à l'aide du logiciel PLACE (A Database of Plant *Cis*-acting Regulatory DNA Elements, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) qui permet d'identifier des séquences *cis*-régulatrices déjà répertoriées (B). Le promoteur minimal d'*AtFER1* est composé de 6 régions (*ELEM*) comprenant des séquences régulatrices potentiellement susceptibles de participer à la régulation transcriptionnelle du gène. *ELEM* 2 est composé de deux *cis*-éléments: un élément *ABRE* (réponse à l'acide abscissique, non démontré pour *AtFER1*) et un élément *P1BS* impliqué dans la régulation de l'expression d'*AtFER1* en réponse à la carence en phosphate. *ELEM* 3 comprend un élément *T-box* et un élément *FeRE*. Ce dernier élément pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression d'*AtFER1* en réponse au fer. *ELEM* 4 est constitué de l'*IDRS* (répresseur de l'expression d'*AtFER1*). *ELEM* 7 est composé d'une *E-box* (proposée comme répresseur de l'expression d'*AtFER1*). *ELEM* 5 est composé d'un élément *GATA* et d'une *G-box*. Enfin, nous avons identifié *ELEM* 6 (nommé « new element ») qui présente des similitudes de séquence avec l'*IDRS* et pour lequel aucun rôle n'a été identifié. Tous ces éléments sont compris dans la région promotrice comprise entre 239 pb et 120 pb en amont du site d'initiation de la transcription d'*AtFER1*.

1. Introduction.

La description des mécanismes qui contrôlent l'expression des ferritines est très complexe par le fait qu'au sein d'une même espèce, les gènes de ferritine sont régulés de manière différentielle (Strozycki *et al.*, 2010 ; Tarantino *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'excès de fer induit l'expression de trois des quatre gènes : *AtFER1*, *AtFER3* et *AtFER4*. L'expression du gène *AtFER2* est induite différemment, notamment par l'acide abscissique (ABA). Par ailleurs, les gènes *AtFER2*, *AtFER3* et *AtFER4* sont induits par la photoinhibition ce qui ne semble pas être le cas pour *AtFER1*.

Malgré les nombreuses études menées ces dernières années pour identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle d'*AtFER1*, peu de candidats ont été identifiés (Arnaud *et al.*, 2006). Une étude de Strozycki *et al.* (2010) a permis de mettre en évidence des éléments potentiellement régulateurs nommés *ELEM 1* à *6* au sein de la séquence promotrice d'*AtFER1*, *2*, *3* et *4* (Fig. 17A). Seuls les *ELEM*s 2 et 3 pour *AtFER1* et l'*ELEM 1* pour *AtFER2*, *3* et *4* diffèrent. Cette région pourrait expliquer les différences de régulation entre le gène majeur de ferritines (i.e. *AtFER1*) et les trois autres. Dans l'étude de Strozycki *et al.* (2010), l'*IDRS* (CACGAGGCCGCCACACGC), déjà identifié comme élément cis régulateur permettant la répression de l'expression du gène de ferritine en situation de carence en fer (Petit *et al.*, 2001) est nommé *ELEM 4*. De manière très intéressante, les auteurs ont montré que chez les plantes supérieures, la séquence promotrice d'*AtFER1* autour de l'*IDRS* (± 100 nucléotides) est très conservée et très semblable entre les gènes codant les sous-unités des ferritines. Cette région qui contient l'ensemble des *ELEM*s a été identifiée (régions nommées *RERRs* : *REGULATORY ELEMENT-RICH REGIONS*). La conservation de ces *ELEM*s semble indiquer qu'ils puissent jouer un rôle majeur dans le contrôle de l'expression des ferritines, dont *AtFER1* (Fig. 17B).

Au niveau des acteurs en *trans*, peu de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression des ferritines ont été identifiés. PHR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1) et PHL1 (PHR1-like 1), deux facteurs de transcription de type MYB-like, interviennent dans le contrôle de l'expression d'*AtFER1* en réponse à une carence en phosphate. PHR1 et PHL1 interagissent avec le promoteur d'*AtFER1* au niveau de l'*ELEM 1*, via la séquence *PIBS* (*PHR1 Binding Site*, GNATATNC). Récemment, une étude basée sur l'analyse par CHIP-Seq des cibles nucléotidiques de PRR7 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7) à l'échelle du génome d'*Arabidopsis thaliana* suggère que ce dernier

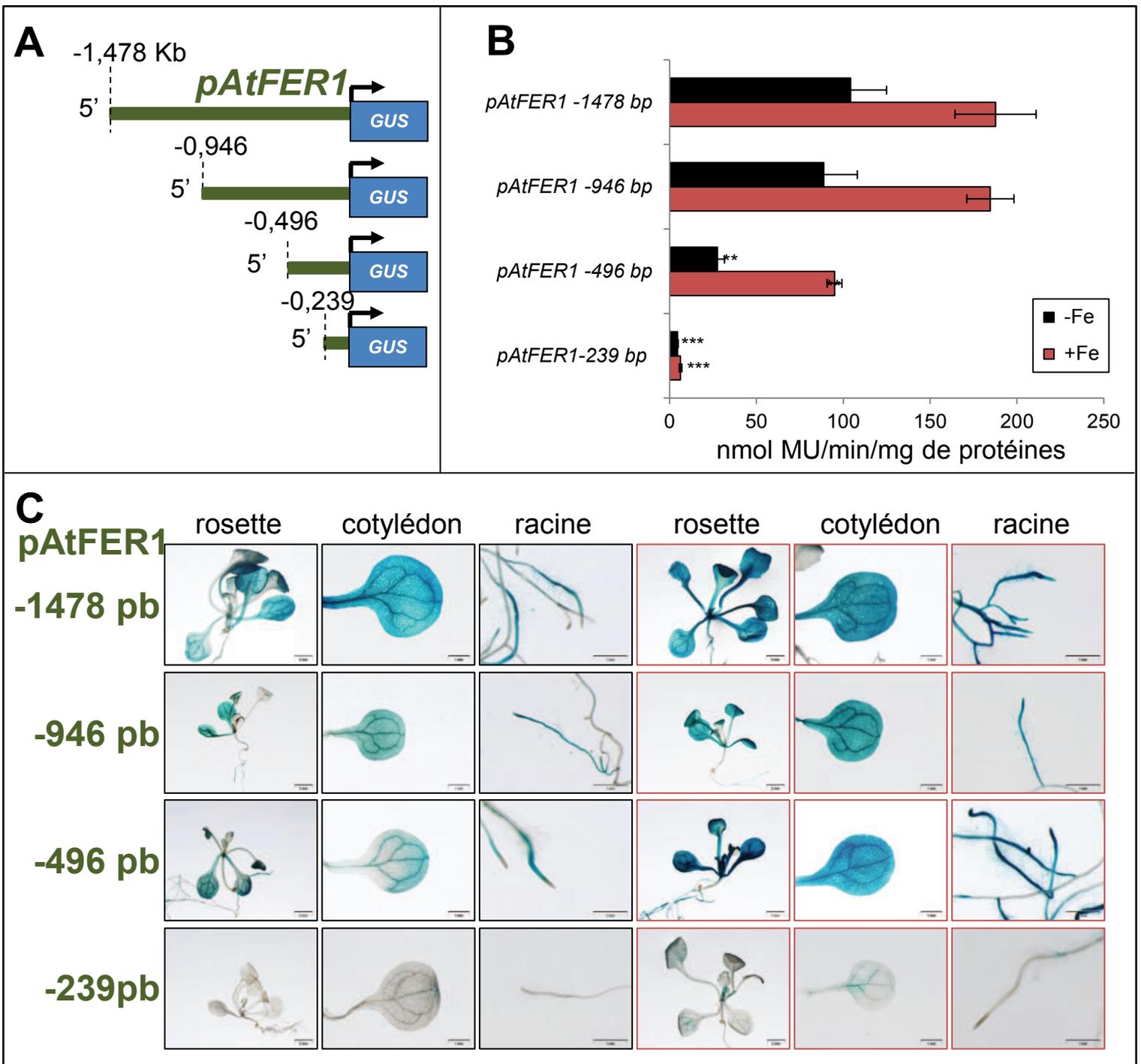


Figure 18 : Observation de l'activité du promoteur d'*AtFER1* en fonction de la disponibilité en fer : délétions en 5'.

Des plantules exprimant le gène *uidA* (GUS) sous le contrôle de différentes délétions en 5' du promoteur d'*AtFER1* ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2. Ces plantes ont ensuite été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours puis ont subi un excès de fer (500 μ M) pendant 24 heures (+Fe) ou sont restées en condition carencée (-Fe). Représentation schématique des constructions (A). Analyse quantitative de l'activité GUS. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=6). La significativité de la différence entre les constructions (indépendamment du traitement) a été déterminée par un test de Student (* = p.value<0,05, ** = p.value<0,01, *** = p.value<0,001) (B). Coloration GUS des plantules après traitement (12h à 37°C). Les images encadrées en noir correspondent aux plantes carencées en fer, les images encadrées en rouge à celles en excès. Barres d'échelle : 2mm pour les rosettes et 1mm pour les cotylédons et les racines (C).

pourrait être un régulateur négatif de l'expression circadienne des ferritines (Liu *et al.*, 2013). Les données présentées dans cette études indiquent que PRR7 interagirait avec le promoteur d'*AtFER1* au niveau d'une *E-box* (*CANNTG*, *ELEM 7*) située en 3' de l'*IRDS*, et avec les promoteurs d'*AtFER3* et d'*AtFER4* au niveau d'une *G-box* (*CACGTG*, *ELEM 5*), présente elle aussi en 3' de l'*IRDS* (Strozycki *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2013). Un autre motif situé à 52 nucléotides en 5' de l'élément *IDRS* du promoteur d'*AtFER1* a été identifié et nommé *FeRE* (*CACACT*). Il a été proposé que cet élément soit impliqué dans l'induction de l'expression du gène *AtFER1* en réponse au fer (Strozycki *et al.*, 2010). Mais cette supposition n'est pas démontrée.

Sur cette base, un modèle de travail a été établi afin de tester les hypothèses qui devraient aider à comprendre comment les différentes voies de régulation transcriptionnelle de l'expression d'*AtFER1* interagissent. Cette approche repose sur l'étude des 496 paires de bases (Fig. 17B) en amont du site d'initiation de la transcription d'*AtFER1*. Couplée à l'étude de Strozycki *et al.* (2010), une analyse complémentaire réalisée à l'aide du logiciel PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) permettant d'identifier des séquences *cis*-régulatrices déjà répertoriées a été mise en place. Elle a permis d'identifier dans les différents *ELEM*s des éléments *cis* potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression d'*AtFER1* (Fig. 17B). Cette représentation schématique (Fig. 17B) a servi de base de travail pour l'étude fonctionnelle du promoteur d'*AtFER1*.

2. Résultats.

2.1 Identification d'un modèle de travail pour le promoteur d'*AtFER1*.

Le fer est impliqué dans l'induction de l'expression du gène de ferritine *AtFER1* chez *Arabidopsis*. Dans le but d'obtenir un support de travail optimal pour la caractérisation détaillée des différents éléments du promoteur d'*AtFER1* (décrits précédemment), une série de délétions aux extrémités 5' et 3' de ce dernier a été réalisée (Fig. 18 et 19).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux délétions générées à l'extrémité 5'. Le promoteur d'*AtFER1* chez *Arabidopsis* est long de 1,478 Kb (Kilo-bases Fig. 18A). Lorsque la construction de 1,478 Kb fusionnée au gène *uidA* (codant la GUS : β -glucuronidase) est exprimée dans des plantules d'*Arabidopsis*, en situation de carence en fer, on observe une accumulation de précipité bleu dans l'ensemble des tissus : les cotylédons, les jeunes feuilles, l'hypocotyle et les racines, avec une plus forte accumulation vers les apices (Fig. 18C ; panels de gauche encadrés en noir, -Fe). Au niveau cellulaire, l'activité GUS est

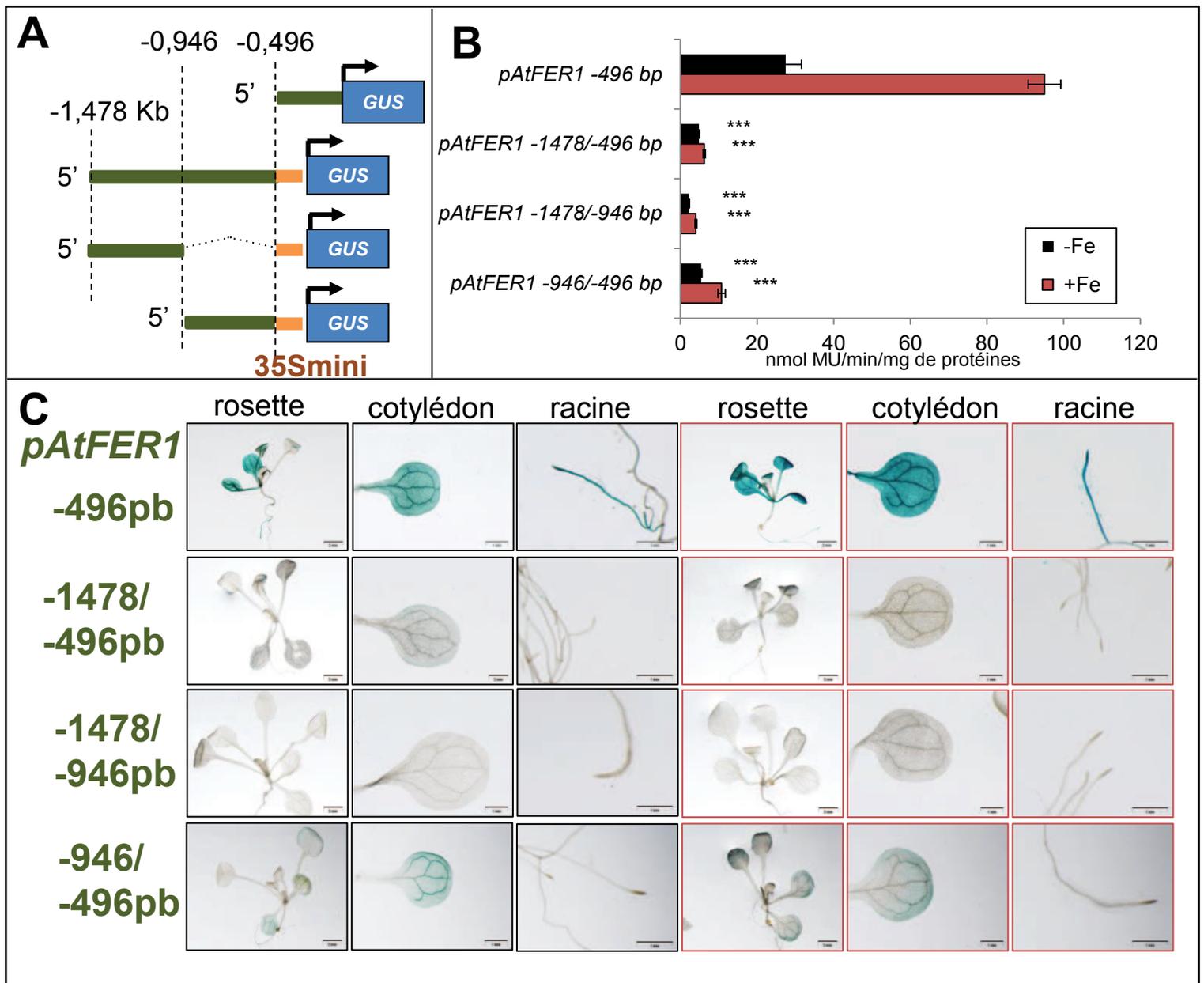


Figure 19 : Observation de l'activité du promoteur d'*AtFER1* en fonction de la disponibilité en fer : délétions en 3'.

Des plantules exprimant le gène *uidA* (*GUS*) sous le contrôle de différentes délétions en 3' et en 5' du promoteur d'*AtFER1* ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2. Ces plantes ont ensuite été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours puis ont subi un excès de fer (500 μ M) pendant 24 heures (+Fe) ou sont restées en condition carencée (-Fe). Représentation schématique des constructions. Les barres oranges représentent le promoteur minimal 35S (35Smini) (A). Analyse quantitative de l'activité *GUS*. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=6). La significativité de la différence entre les constructions (indépendamment du traitement) a été déterminée par un test de Student (* = p.value<0,05, ** = p.value<0,01, *** = p.value<0,001) (B). Coloration *GUS* des plantules après traitement (12h à 37°C). Les images encadrées en noir correspondent aux plantes carencées en fer, les images encadrées en rouge à celles en excès. Barres d'échelle : 2mm pour les rosettes et 1mm pour les cotylédons et les racines (C).

localisée au niveau des cellules péri-vasculaires (données non montrées), ce qui concorde parfaitement avec les données bibliographiques (Reyt *et al.*, 2015). D'après les résultats obtenus, nous pouvons observer qu'en situation de carence en fer, l'activité GUS semble diminuer proportionnellement à la taille du promoteur (Fig. 18C ; panels de gauche encadrés en noir -Fe). Ce constat est confirmé par les résultats de GUS quantitatif (Fig. 18B). L'activité de l'enzyme est corrélée à la taille du promoteur avec une absence d'activité pour le promoteur de 239 pb (paires de bases). En excès de fer, le constat est différent. En effet, l'induction de l'expression est conservée malgré les différentes tailles des promoteurs (Fig. 18C panels de droite encadrés en rouge, +Fe). Lorsque l'on analyse les activités des promoteurs de façon quantitative cette observation est confirmée (Fig. 18B). Toutefois, le promoteur de 239 pb ne semble pas être activé par l'excès de fer (Fig. 18B). Ces résultats montrent que les régions promotrices en 5' des 496 pb régulent l'intensité de l'induction de l'expression d'*AtFER1*. Ces résultats suggèrent également que l'induction par le fer se fait grâce au 496 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Enfin, ils montrent le rôle indispensable de la région de 257 pb comprise entre les promoteurs de 239 et 496 pb. Le promoteur de 0,496 Kb semble donc être indispensable pour l'induction par le fer et nécessaire pour le niveau basal d'expression.

Afin de confirmer ces observations, des délétions à l'extrémité 3' du promoteur ont été également produites en excluant la région de 496 pb avant le site d'initiation de la transcription (Fig. 19A). L'absence de coloration bleue traduit une perte de l'expression du gène *AtFER1* lorsque les séquences promotrices de 496 pb et de 946 pb sont supprimées en 3' (Fig. 19C). Nous pouvons cependant constater une faible activité GUS lorsque la séquence de -946 pb à -496 pb en amont du site d'initiation à la transcription est conservée (Fig. 19C). L'induction par le fer ne modifie pas l'activité GUS sur cette région du promoteur confirmant les résultats précédents (Fig. 19C ; panels de droite encadrés en rouge, +Fe). La mesure quantitative de l'activité GUS a permis de confirmer ces observations (Fig. 19B). Ces résultats suggèrent que la région de -1,478 Kb à -0,946 Kb en amont du site d'initiation à la transcription semble agir comme un élément inhibiteur de l'expression du gène d'*AtFER1*. De plus, ils démontrent que l'intensité de l'induction de l'expression d'*AtFER1* (mesurée *via* l'activité GUS) est corrélée à la taille du promoteur utilisé. La présence d'un niveau basal d'expression avec un promoteur de 496 pb ainsi que l'absence d'expression, lorsqu'il est retiré, indique que ce fragment est nécessaire et suffisant à l'expression du gène en condition carencée en fer (niveau basal) et à l'induction de l'expression par le fer. Cette séquence contient vraisemblablement les éléments régulateurs du gène *AtFER1* comme supposés dans

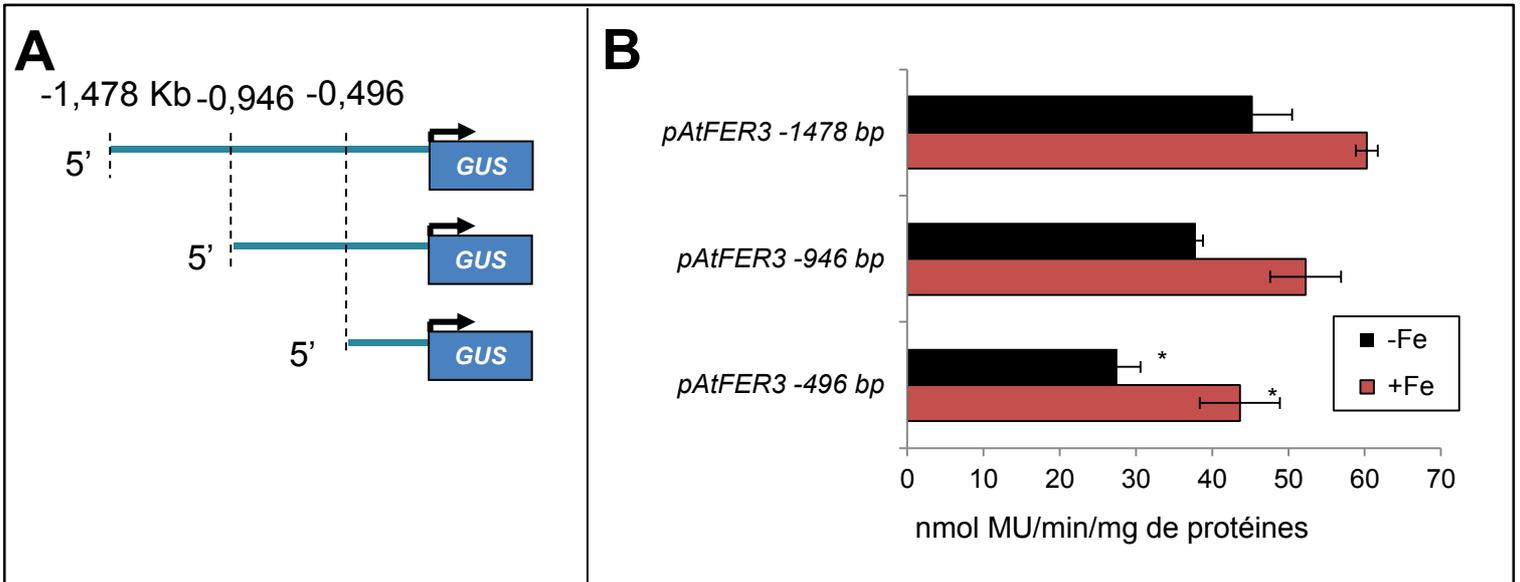


Figure 20 : Observation de l'activité du promoteur d'*AtFER3* en fonction de la disponibilité en fer : délétions en 5'.

Des plantules exprimant le gène *uidA* (*GUS*) sous le contrôle de différentes délétions en 5' du promoteur d'*AtFER3* ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2. Ces plantes ont ensuite été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours puis ont subi un excès de fer (500 μ M) pendant 24 heures (+Fe) ou sont restées en condition carencée (-Fe). Représentation schématique des constructions (A). Analyse quantitative de l'activité *GUS*. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=6). La significativité de la différence entre les constructions (indépendamment du traitement) a été déterminée par un test de Student (* = p.value<0,05, ** = p.value<0,01, *** = p.value<0,001) (B).

le modèle (Fig 17B). La région promotrice de 496 pb a donc été considérée comme le promoteur minimal d'*AtFER1* dans la suite du travail.

2.2 Le promoteur minimal d'*AtFER1* comme modèle d'étude pour les autres promoteurs de ferritines.

Le gène de ferritines le plus exprimé après *AtFER1* est *AtFER3* (Reyt *et al.*, 2015). Dans le but d'établir un parallèle avec le promoteur d'*AtFER1* et celui des autres gènes de ferritines d'*Arabidopsis*, une étude fonctionnelle du promoteur d'*AtFER3* a été mise en place. Nous nous sommes donc intéressés aux délétions générées à l'extrémité 5' du promoteur d'*AtFER3* (Fig. 20A). Comme précédemment abordé (Cf. §2.1), le gène GUS a été fusionné aux différents promoteurs tronqués d'*AtFER3* et l'activité GUS a ensuite été observée. D'après les résultats obtenus, tout comme pour *AtFER1*, nous pouvons observer qu'en situation de carence en fer, l'activité GUS semble diminuer proportionnellement à la taille du promoteur (Fig. 20B, -Fe). En effet, le promoteur pleine longueur (de 1,478 Kb) présente un signal d'activité plus fort que celui de 0,946 Kb qui lui-même présente un signal supérieur au promoteur de 0,496 Kb. En excès de fer, l'induction de l'expression est toujours conservée et ce malgré les différentes tailles de promoteurs (Fig. 20B, +Fe). Cette induction en réponse au fer, tout comme le niveau basal d'expression, est tout de même inférieure à celle observée pour les délétions d'*AtFER1* (Fig. 18B). Dans ces conditions, le comportement du promoteur d'*AtFER3* est donc le même que celui d'*AtFER1* avec une activité plus faible. Enfin, ces données confirment également que l'induction due au fer chez les ferritines dépend bien des 496 pb en amont du site d'initiation de la transcription.

2.3 Les éléments *cis* impliqués dans l'expression d'*AtFER1*.

Afin de confirmer l'implication de certains domaines du promoteur de 496 pb dans la régulation transcriptionnelle d'*AtFER1*, j'ai analysé l'activité de plusieurs variants du promoteur minimal d'*AtFER1* (*pAtFER1*-496pb, muté ou non pour les différents *ELEMs*, en réponse à une carence et à un excès de fer. Les mutations ont été réalisées sur la base de l'étude fine de la séquence du promoteur minimal d'*AtFER1* (Fig. 17B) ainsi que sur la base des éléments publiés comme éléments *cis*-régulateurs. Les éléments concernés ici sont (i) l'*ELEM 2* contenant le *PIBS* (ciblé par PHR1 et PHL1 en carence en phosphate), et un motif *ABRE* (*ACGTG*) également potentiellement impliqué, (ii) l'*ELEM 4* composé de l'*IDRS* (voie de dé-répression par le fer) et (iii) l'*ELEM 7* constitué d'une *Ebox* (ciblée par PRR7 pour la régulation circadienne d'*AtFER1*) (Fig. 21A).

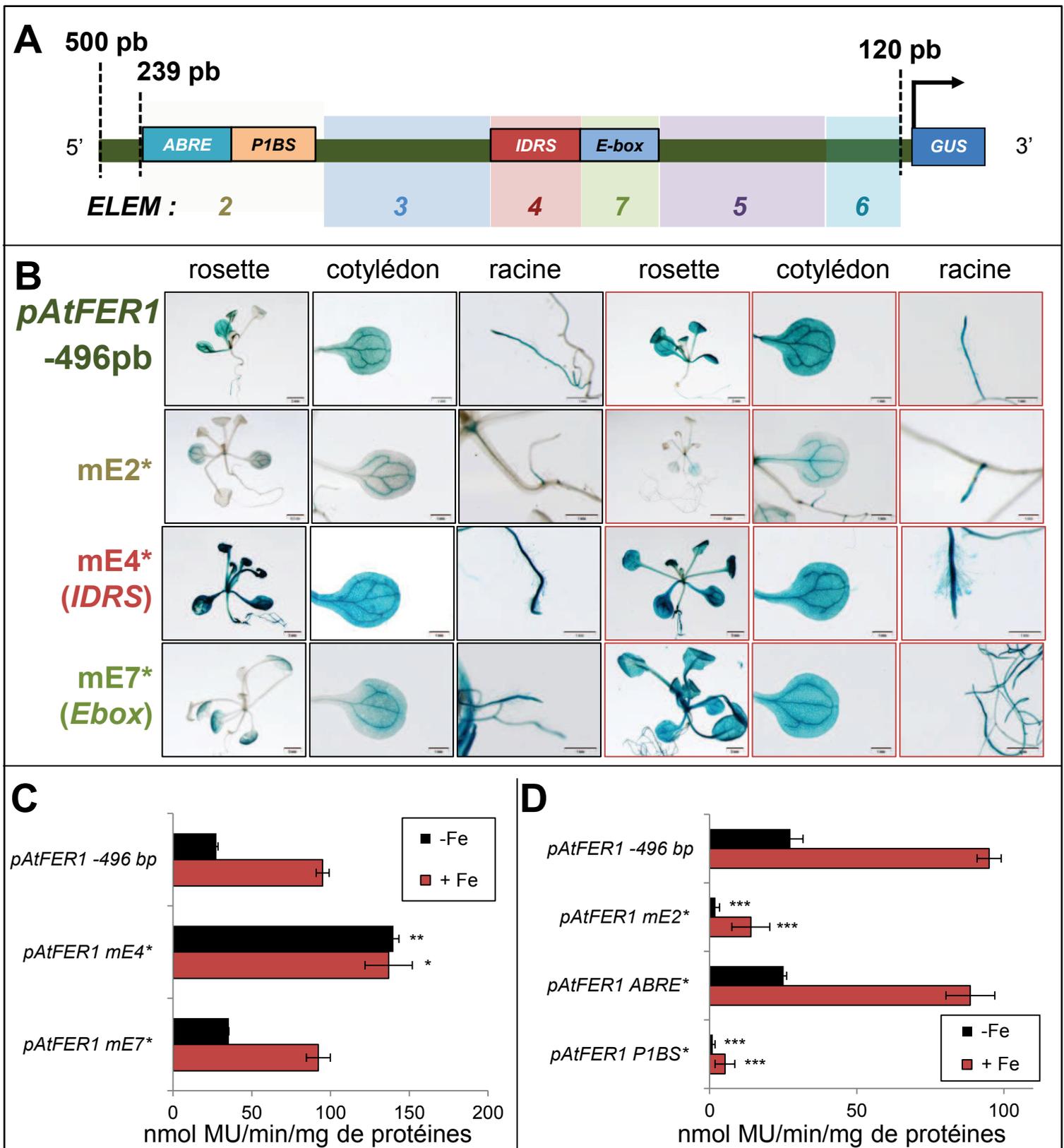


Figure 21 : Observation de l'activité du promoteur minimal d'*AtFER1* en fonction de la disponibilité en fer : effet des mutations dans les éléments *cis*-régulateurs du promoteur déjà décrits dans la littérature.

Des plantules exprimant le gène *uidA* (GUS) sous le contrôle de différentes versions mutées du promoteur d'*AtFER1* ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2. Ces plantes ont ensuite été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours puis ont subi un excès de fer (500 μ M) pendant 24 heures (+Fe) ou sont restées en condition carencée (-Fe). Représentation schématique des constructions (A). Coloration GUS des plantules après traitement (12h à 37°C). Les images encadrées en noir correspondent aux plantes carencées en fer, les images encadrées en rouge à celles en excès. Barres d'échelle : 2mm pour les rosettes et 1mm pour les cotylédons et les racines (B). Analyse quantitative de l'activité GUS. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=6). La significativité de la différence entre les constructions (indépendamment du traitement) a été déterminée par un test de Student (* = p.value<0,05, ** = p.value<0,01, *** = p.value<0,001) (C, D).

Des observations ont été réalisées à la fois dans les parties aériennes (rosette, cotylédons) et dans les parties racinaires (Fig. 21B).

pAtFER1 -496 pb présente une activité GUS basale lorsque la plante est en condition carencée en fer, qui augmente en réponse à un excès de fer (Fig. 21B, panels de gauche encadrés en noir). En absence de fer (-Fe), les lignées avec l'*ELEM 2* muté (*mE2**) présentent un signal plus faible que *pAtFER1* -496 pb (Fig. 21B). L'activité GUS associée à cette mutation est conservée au niveau des zones périvasculaires mais est plus faible, et presque nulle dans les autres tissus observés. Les lignées avec l'*ELEM 4* (*mE4**, *IDRS*) muté présentent dans ces mêmes conditions une expression beaucoup plus forte que *pAtFER1* -496pb (Fig. 21B). Enfin, les lignées pour lesquelles l'*ELEM 7* (*mE7**, *E-box*) est muté sont similaires à *pAtFER1* -496 pb (Fig. 21B). Ces résultats démontrent que l'*ELEM 2* participe au maintien de l'expression basale d'*AtFER1*. L'*ELEM 4* est lui impliqué dans des voies inhibitrices de l'expression du gène (ce qui confirme les données publiées sur l'*IDRS* ; Petit *et al.*, 2001). L'*ELEM 7* semble lui, ne pas avoir de rôle majeur sur l'expression d'*AtFER1* dans ces conditions. En effet, lorsqu'il est muté il présente une activité GUS comparable au promoteur de 496 pb non muté.

Dans le but de comprendre comment les éléments régulateurs sont liés à la réponse à l'excès de fer (+Fe), les plantes ont subi un stress ferrique de 24h (ajout de 500 μ M de fer dans le milieu) et ont été observées selon le même protocole qu'en condition -Fe (niveau basal, Fig. 21B). Les lignées mutées pour les *ELEM*s 2 et 7 conservent une induction transcriptionnelle du gène en réponse à un excès de fer (Fig. 21B, panels de droite encadrés en rouge). Les lignées mutées pour l'*ELEM 4* ne semblent pas présenter un signal plus fort en réponse au fer par rapport à leurs expressions basales respectives. Ces observations montrent que les *ELEM*s 2 et 4 jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'expression d'*AtFER1* pour sa régulation transcriptionnelle basale. Ils ont des rôles opposés en absence de fer : l'*ELEM 2* est inducteur alors que l'*ELEM 4* inhibe la transcription d'*AtFER1*. En ce qui concerne la réponse à l'excès de fer, seul l'*ELEM 4* semble être impliqué car l'induction d'*AtFER1* est perdue lorsqu'il est muté (Fig. 21B).

Afin d'évaluer plus spécifiquement le rôle de ces éléments dans l'expression d'*AtFER1*, des mesures quantitatives d'activité GUS ont été mises en place (Fig. 21C et D). L'ensemble des observations sur les *ELEM*s 4 et 7 a été validé par cette approche (Fig. 21C). Dans le but de caractériser précisément la fonction de l'*ELEM 2*, ce dernier a été muté à deux endroits distincts respectivement au sein des motifs *ABRE* et *P1BS* (Fig. 21D). Les lignées avec l'élément *cis ABRE* muté présentent le même profil d'activité que celles avec le

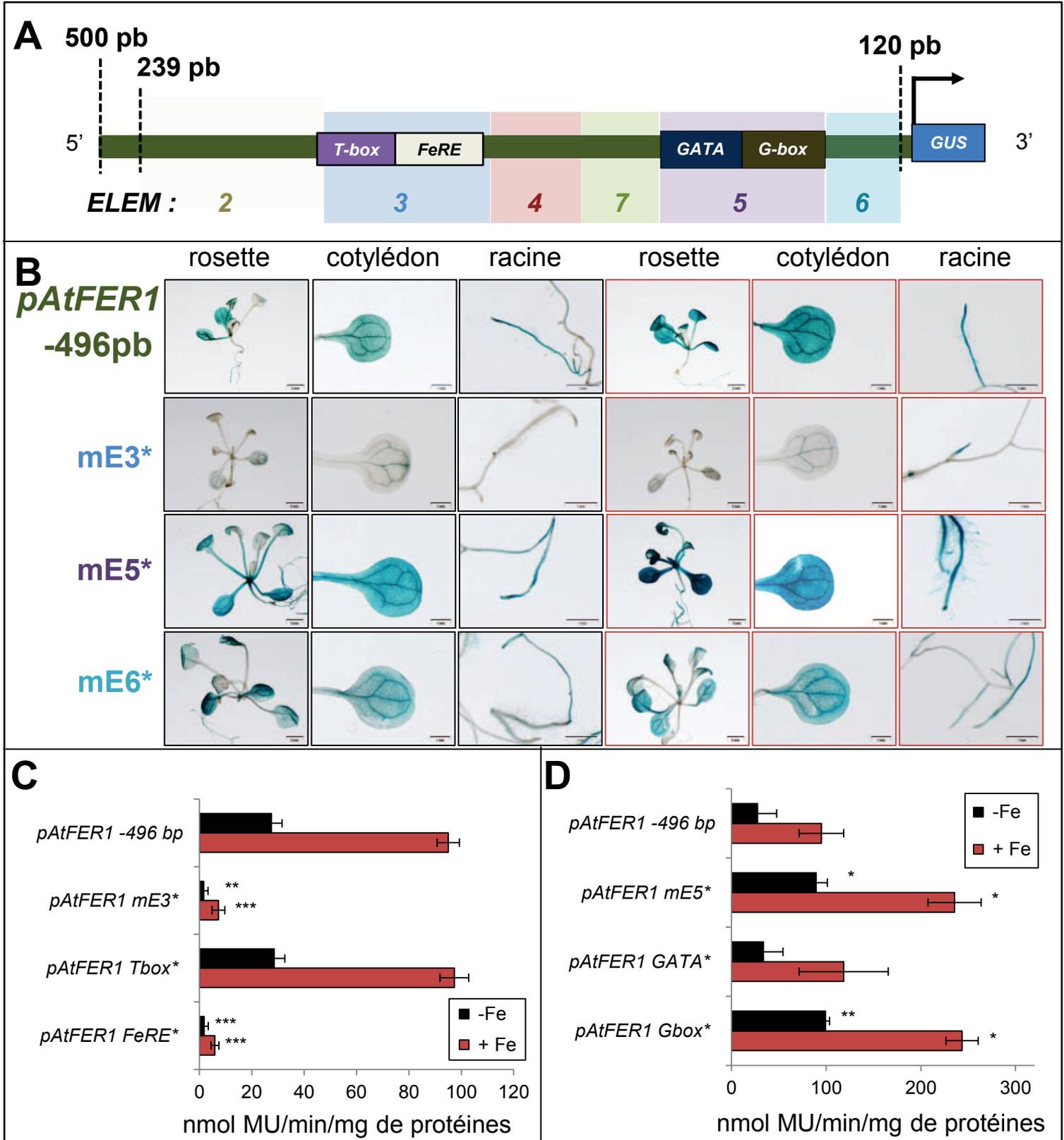


Figure 22 : Observation de l'activité du promoteur minimal d'*AtFER1* en fonction de la disponibilité en fer : mutations dans les éléments *cis* putatifs du promoteur (non décrits dans la littérature).

Des plantules exprimant le gène *uidA* (*GUS*) sous le contrôle de différentes versions mutées du promoteur d'*AtFER1* ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2. Ces plantes ont ensuite été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours puis ont subi un excès de fer (500 μ M) pendant 24 heures (+Fe) ou sont restées en condition carencée (-Fe). Représentation schématique des constructions (A). Coloration *GUS* des plantules après traitement (12h à 37°C). Les images encadrées en noir correspondent aux plantes carencées en fer, les images encadrées en rouge à celles en excès. Barres d'échelle : 2mm pour les rosettes et 1mm pour les cotylédons et les racines (B). Analyse quantitative de l'activité *GUS*. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=6). La significativité de la différence entre les constructions (indépendamment du traitement) a été déterminée par un test de Student (* = p.value<0,05, ** = p.value<0,01, *** = p.value<0,001) (C, D).

promoteur minimal non muté. En revanche, les lignées mutées dans le *PIBS* ont une activité semblable à celle observée chez les lignées mutées pour l'*ELEM 2* (Fig. 21D). Ces résultats démontrent que le *PIBS* est un domaine crucial dans la régulation du gène *via* l'*ELEM 2*. De plus, ils suggèrent que les observations obtenues sur l'*ELEM 2* muté, semblent être dues à la mutation du *PIBS* seul.

2.4 Les éléments *cis* conservés potentiellement impliqués dans la régulation d'*AtFER1*.

Afin de déterminer l'implication de certains domaines du promoteur de 496 pb dans les voies de régulation transcriptionnelle d'*AtFER1*, nous avons analysé l'expression du promoteur minimal d'*AtFER1* (*pAtFER1* -496pb), muté ou non pour les différents *ELEM*s, en réponse à une carence et à un excès de fer. Les mutations réalisées ont été retenues sur la base de l'étude fine de la séquence du promoteur minimal d'*AtFER1* (Fig. 17B) et plus spécifiquement sur des éléments encore non caractérisés et donc décrits comme éléments *cis*-régulateurs. Parmi eux, (i) l'*ELEM 3* entre l'*ELEM 2* et l'*ELEM 4*, constitué d'une *T-box* (*CACGTT*) et d'une séquence *FeRE* (*CACACT*), (ii) l'*ELEM 5* en 3' de l'*IDRS*, constitué d'une boîte *GATA* (*TATC*) et d'une *G-box* (*CACGTG*) et (iii) l'*ELEM 6*, ne comportant pas d'élément *cis* publié mais ayant des similarités de séquence avec l'*IDRS* (Fig. 22A).

En absence de fer (-Fe) les lignées avec l'*ELEM 3* muté (*mE3**) présentent un signal plus faible que *pAtFer1* -496 pb (Fig. 22B, panels de gauche encadrés en noir), voire nul dans la majeure partie des tissus observés. L'activité semble même plus faible que dans les plantes avec l'*ELEM 2* muté (*mE2**). Les lignées avec l'*ELEM 5* muté (*mE5**) présentent dans ces mêmes conditions une expression beaucoup plus forte que *pAtFER1* -496pb (Fig. 22B). Enfin, les lignées avec l'*ELEM 6* muté (*mE6**) semblent similaires à *pAtFER1* -496 pb (Fig. 22B). Ces résultats démontrent que l'*ELEM 3* participe au maintien de l'expression basale en tant qu'inducteur d'*AtFER1* comme l'*ELEM 2*. L'*ELEM 5* est quant à lui impliqué dans des voies inhibitrices de l'expression du gène. L'*ELEM 6* semble lui, ne pas avoir de rôle majeur sur l'expression d'*AtFER1* dans ces conditions. En effet, lorsqu'il est muté, il présente une activité GUS comparable au promoteur de 496 pb non muté.

En condition d'excès de fer (+Fe), les lignées mutées pour les *ELEM*s 5 et 6 conservent une activation transcriptionnelle du gène (Fig. 22B, panels de droite encadrés en rouge). Ces résultats montrent que l'*ELEM 5* contribue à l'expression basale du gène mais n'est pas impliqué dans la réponse au traitement ferrique. L'*ELEM 7* lorsqu'il est muté, ne présente pas d'activité différente du promoteur minimal non muté, ce qui laisse penser que

Mutations	Expression Basale	Réponse au fer	Rôle de l'élément cis
Elément 2 (<i>P1BS</i>)	-	=	Inducteur indépendant du fer
Elément 3 (<i>FeRE</i>)	0	-	Inducteur dépendant du fer
Elément 4 (<i>IDRS</i>)	++	0	Répresseur dépendant du fer
Elément 5 (<i>G-box</i>)	+	=	Répresseur indépendant du fer
Elément 6	=	=	Nul dans nos conditions
Elément 7 (<i>E-box</i>)	=	=	Nul dans nos conditions

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des observations sur l'activité du promoteur d'*AtFER1* en fonction de la disponibilité en fer.

Ce tableau présente de façon synthétique les activités GUS des différents promoteurs mutés (Cf. figure 18 à 22). Les résultats ont été obtenus en comparant les versions du promoteur minimal d'*AtFER1* muté avec la version non mutée, en condition de carence en fer (niveau basal) et d'excès de fer (réponse au fer). Les ponctuations « - » correspondent à un signal plus faible que le promoteur minimal non muté, et « 0 » à une absence de coloration. « + » et « ++ » correspondent à un signal plus important par rapport au promoteur non muté (proportionnellement au nombre de « + »). « = » représentent un signal GUS semblable au promoteur non muté.

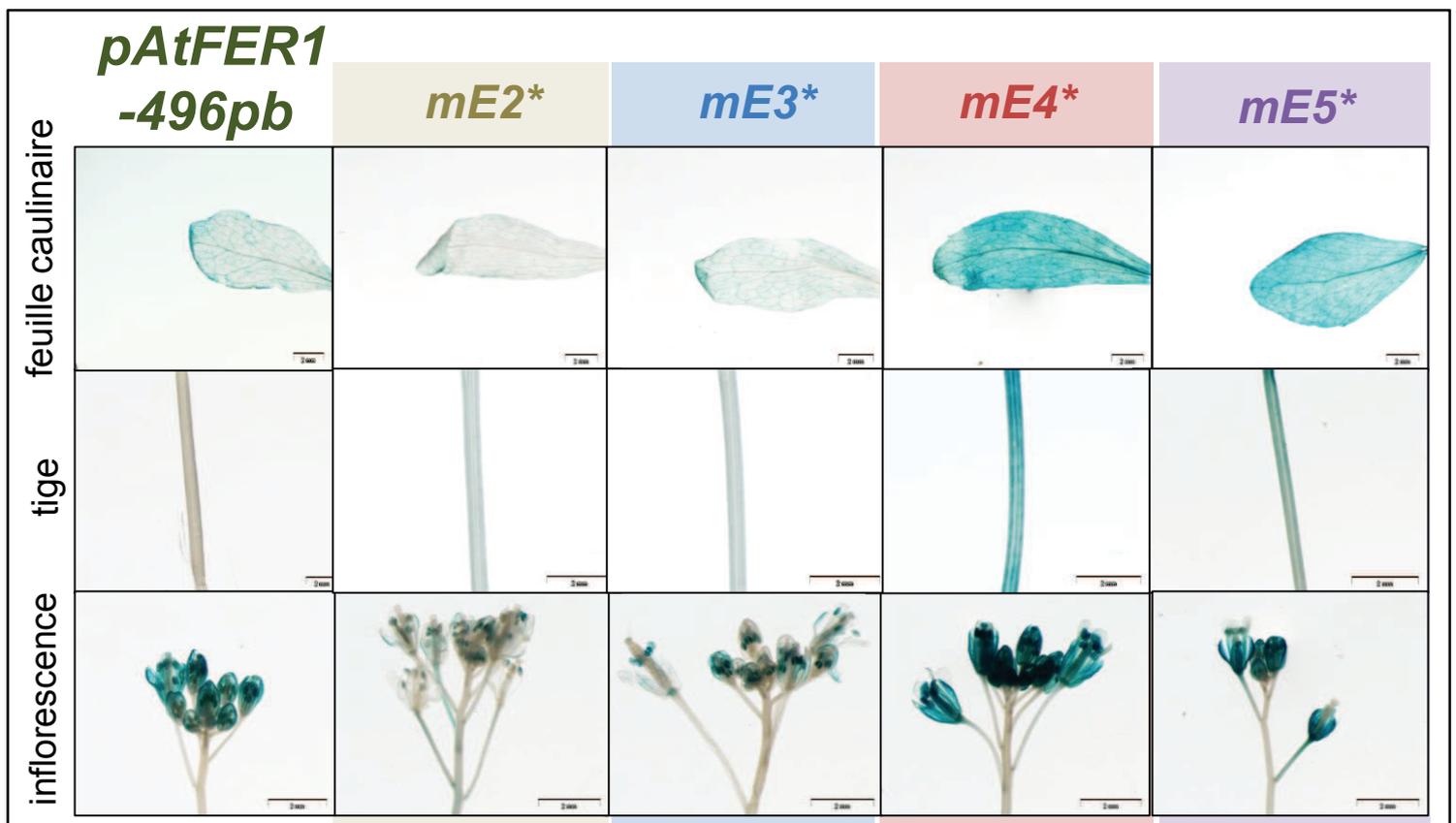


Figure 23 : Observation de l'activité GUS dans différents organes de plantes d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en serre (terreau) associée au promoteur minimal d'*AtFER1* et en fonction de mutations dans les éléments conservés du promoteur). *mE2, *mE3**, *mE4**, et *mE5** : mutations dans les éléments (*ELEM*) 2, 3, 4 et 5, respectivement. Coloration : 12h à 37°C, Barres d'échelle : 2mm.**

dans ces conditions cet élément n'est pas requis pour l'expression d'*AtFER1* (Fig. 22B). En ce qui concerne l'*ELEM 3*, aucune coloration n'est observée en réponse à l'excès de fer comme cela était le cas en absence de fer, ce qui laisse penser que cet élément est nécessaire pour la régulation de la transcription d'*AtFER1* en réponse à la disponibilité du fer.

Dans le but d'évaluer plus spécifiquement le rôle de ces éléments dans l'expression d'*AtFER1*, des approches de GUS quantitatif ont été mises en place (Fig. 22C et D). Les lignées mutées dans les éléments putatifs *FeRE* et *T-box* ont été testées afin de mettre en évidence l'élément *cis* responsable du profil du promoteur avec l'*ELEM 3* muté (*mE3**). Les lignées avec l'élément putatif *cis T-box* muté présentent le même profil d'activité que celles avec le promoteur minimal non muté. D'autre part, les lignées mutées dans l'élément putatif *cis FeRE* ont une activité semblable à celle observée chez les lignées mutées pour l'*ELEM 3* (Fig. 22C). Cette observation permet d'affirmer que l'élément inducteur indispensable pour le niveau basal d'expression d'*AtFER1* et pour son induction en réponse au fer est l'élément *cis*-régulateur *FeRE*. Une approche similaire a été réalisée pour l'*ELEM 5* (*mE5**). Dans ce cas, des mutations pour les éléments putatifs *GATA* et *G-box* ont été réalisées (Fig. 22D). La quantification de l'activité GUS a permis de mettre en évidence que les lignées avec l'élément putatif *GATA* muté présentent le même profil que celles avec le promoteur minimal non muté, alors que les lignées mutées dans la séquence *G-box* ont une activité semblable à celle observée chez les lignées mutées pour l'*ELEM 5* (Fig. 22D). Ces observations suggèrent que la *G-box* dans l'*ELEM 5* est requise pour l'inhibition d'*AtFER1* mais n'intervient pas dans la régulation de la réponse au fer.

L'ensemble des résultats obtenus sur les éléments régulateurs du promoteur d'*AtFER1* est résumé dans le tableau 1. Suite à ces analyses, seules les constructions mutées pour les *ELEM*s 2, 3, 4 et 5 ont été choisies pour continuer notre étude (les *ELEM*s 6 et 7 ne semblant pas avoir de rôle régulateur marqué dans nos conditions d'expérience).

2.5 Les éléments *cis*-régulateurs identifiés sur le promoteur d'*AtFER1* ne sont pas impliqués dans le contrôle de la localisation tissulaire de son expression

Dans le but de confirmer si les observations sur plantules sont maintenues durant le développement des plantes, des colorations sur différents organes de plantes plus âgées ont été réalisées (Fig 23). Pour cela, l'activité du promoteur d'*AtFER1* a été observée sur des plantes âgées de 8 semaines, cultivées en terreau dans des conditions « jours longs » (Fig. 23). Différents organes de la plante ont été prélevés : les inflorescences, des portions de tige et des feuilles caulinaires. Pour le promoteur minimal, une coloration GUS a été observée au niveau

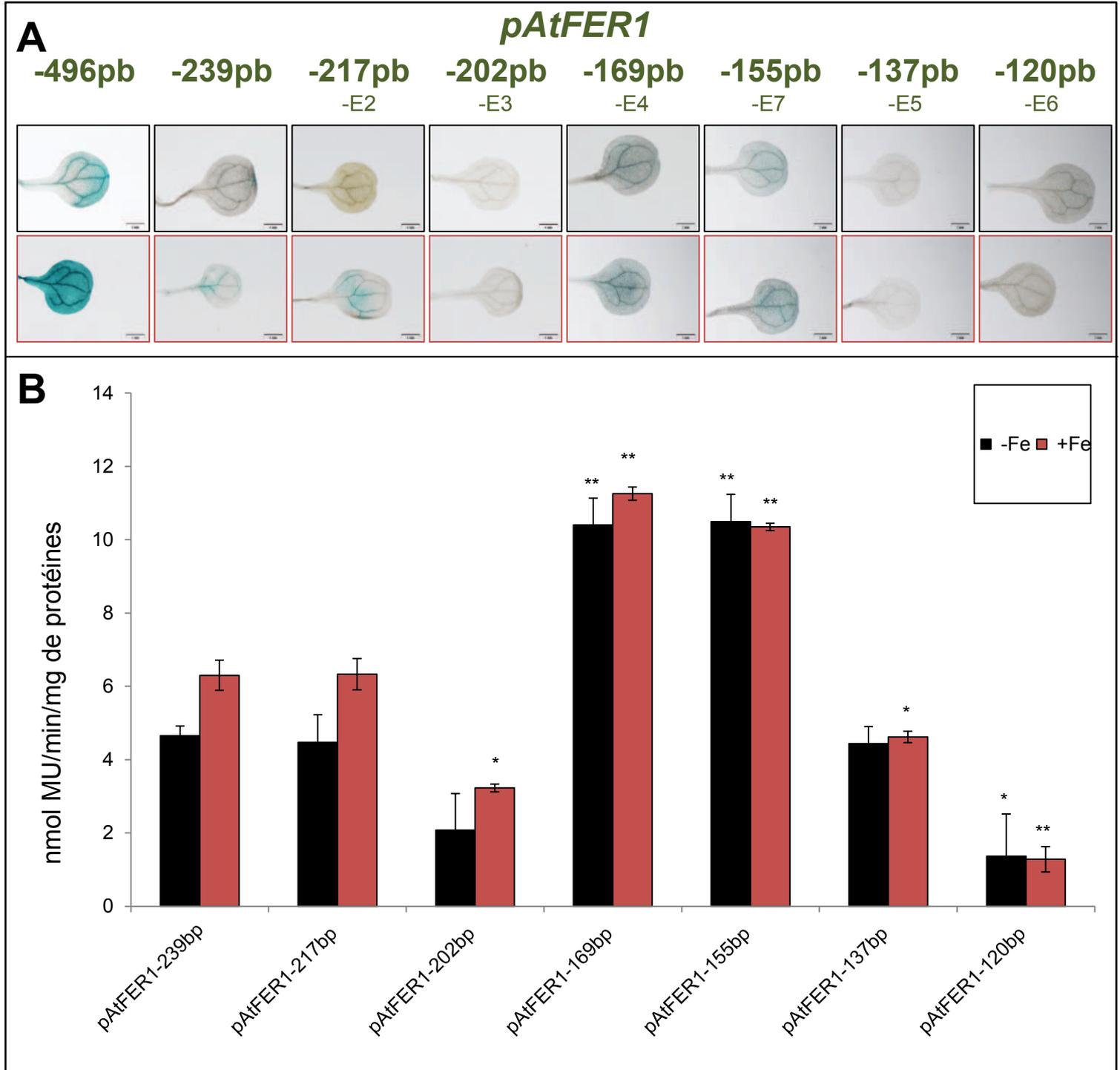


Figure 24 : Observation de l'activité du promoteur minimal d' *AtFER1* en fonction de la disponibilité en fer : délétions en 5' des éléments conservés (ELEM).

Des plantules exprimant le gène *uidA* (GUS) sous le contrôle de différentes délétions en 5' du promoteur minimal d'*AtFER1* ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2. Ces plantes ont ensuite été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours puis ont subi un excès de fer (500 μ M) pendant 24 heures (+Fe) ou sont restées en condition carencée (-Fe). Coloration GUS des plantules après traitement (12h à 37°C). Les images encadrées en noir correspondent aux plantes carencées en fer, les images encadrées en rouge à celles en excès. Barres d'échelle = 1mm (A). Analyse quantitative de l'activité GUS. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=6). La significativité de la différence entre les constructions (indépendamment du traitement) a été déterminée par un test de Student (* = p.valeur<0,05, ** = p.valeur<0,01, *** = p.valeur<0,001) (B).

des feuilles caulinaires et des inflorescences (Fig. 23). Lorsque les *ELEM*s 2 et 3 sont mutés, l'activité promotrice est clairement diminuée voire même absente alors que pour les *ELEM*s 4 et 5, on observe un signal très fort même au niveau des tiges (Fig. 23). Ces observations permettent de conclure qu'il existe bien une ou plusieurs voies activatrices du niveau basal d'expression d'*AtFER1* via les éléments 2 et 3, et que les éléments 4 et 5 sont eux impliqués dans la répression de l'expression. De plus, elles confirment l'implication ubiquitaire d'*AtFER1* au cours du développement et de la floraison des plantes.

2.6 Les délétions dans le promoteur minimal d'*AtFER1* confirment le rôle des éléments régulateurs.

Afin de confirmer l'implication de certains domaines du promoteur dans les voies de régulation transcriptionnelle d'*AtFER1*, nous avons comparé l'activité du promoteur d'*AtFER1* -239 pb avec différentes délétions en 5' sur la région spécifique contenant l'ensemble des *ELEM*s.

La délétion de la région en amont de 239 pb entraîne une diminution de l'activité drastique (Fig. 18). De façon intéressante, lorsque l'on observe l'activité du promoteur de 217 pb (sans *ELEM* 2) en absence de fer (-Fe), on constate qu'elle est très semblable à celle de 239 pb (Fig. 24A et B). Ces données couplées aux précédentes sur le *PIBS* démontrent que pour avoir son effet inducteur, cette boîte dépend de la région en 5' (-496/-239). Lorsque l'*ELEM* 3 est retiré (-202 pb), cette fois, une diminution est observée confirmant le rôle d'inducteur de cette région promotrice d'*AtFER1* en condition contrôle (Fig. 24A et B). De plus cette induction semble se mettre en place indépendamment des régions en amont. Lorsque les *ELEM*s 4 et 7 sont supprimés (respectivement -169 et -155 pb), on constate une augmentation de l'activité témoignant du rôle inhibiteur fort de l'*IDRS* (Fig. 24A et B). De même, lorsque les *ELEM*s 5 et 6 sont à leur tour éliminés (respectivement -137 et -120), on constate une activité du promoteur proportionnelle à sa taille, ce qui est probablement due à l'élimination de séquences régulatrices importantes (Fig. 24A et B). En condition d'excès de fer (+Fe), l'activation transcriptionnelle du promoteur est conservée jusqu'au fragment de 202 pb, même si elle est très faible (Fig. 24B). A partir de la délétion de -169 pb, l'induction par le fer est perdue. Ces données renforcent l'idée que l'*IDRS* est indispensable pour l'induction des ferritines en réponse au fer et ce, même sans les régions en amont.

L'ensemble de ces délétions renforce le rôle des éléments dans le promoteur. Elles mettent également en évidence la dépendance des uns par rapport aux autres (le *PIBS* avec

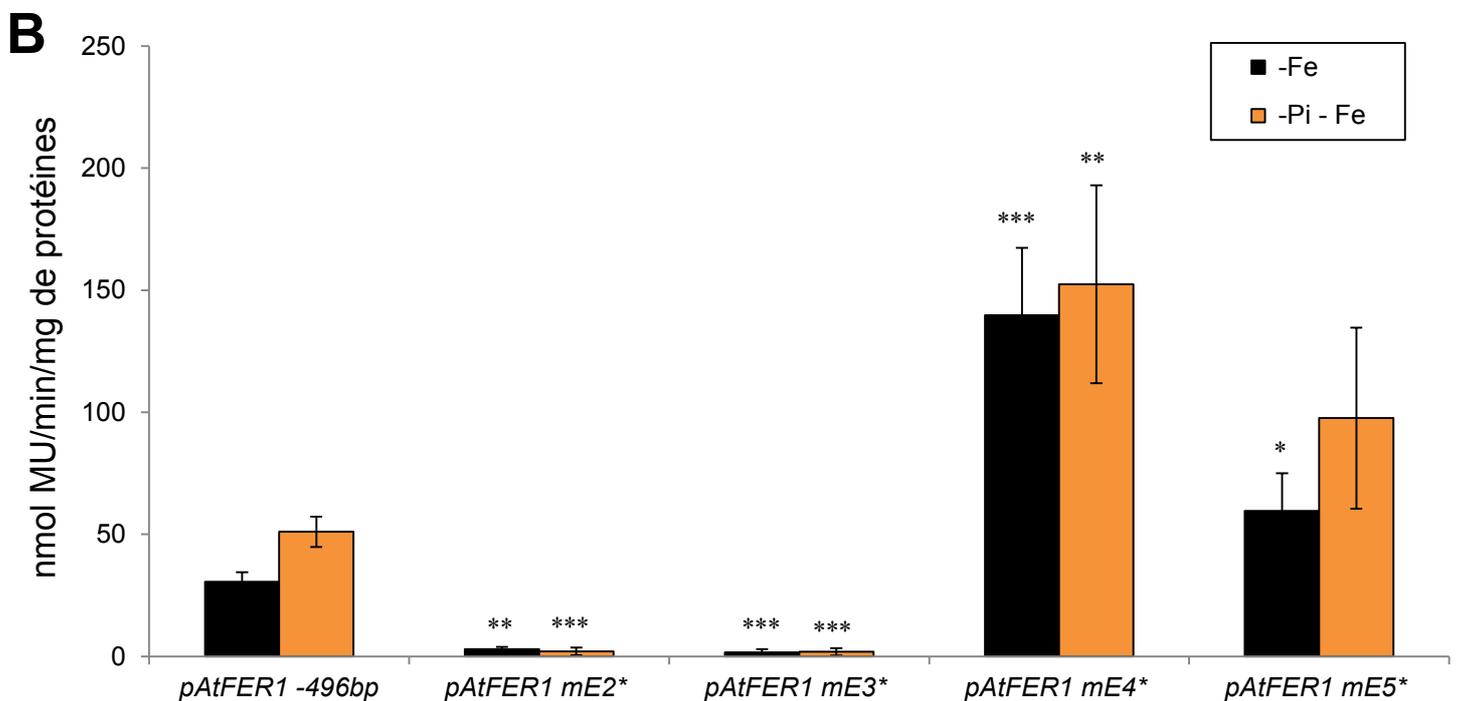
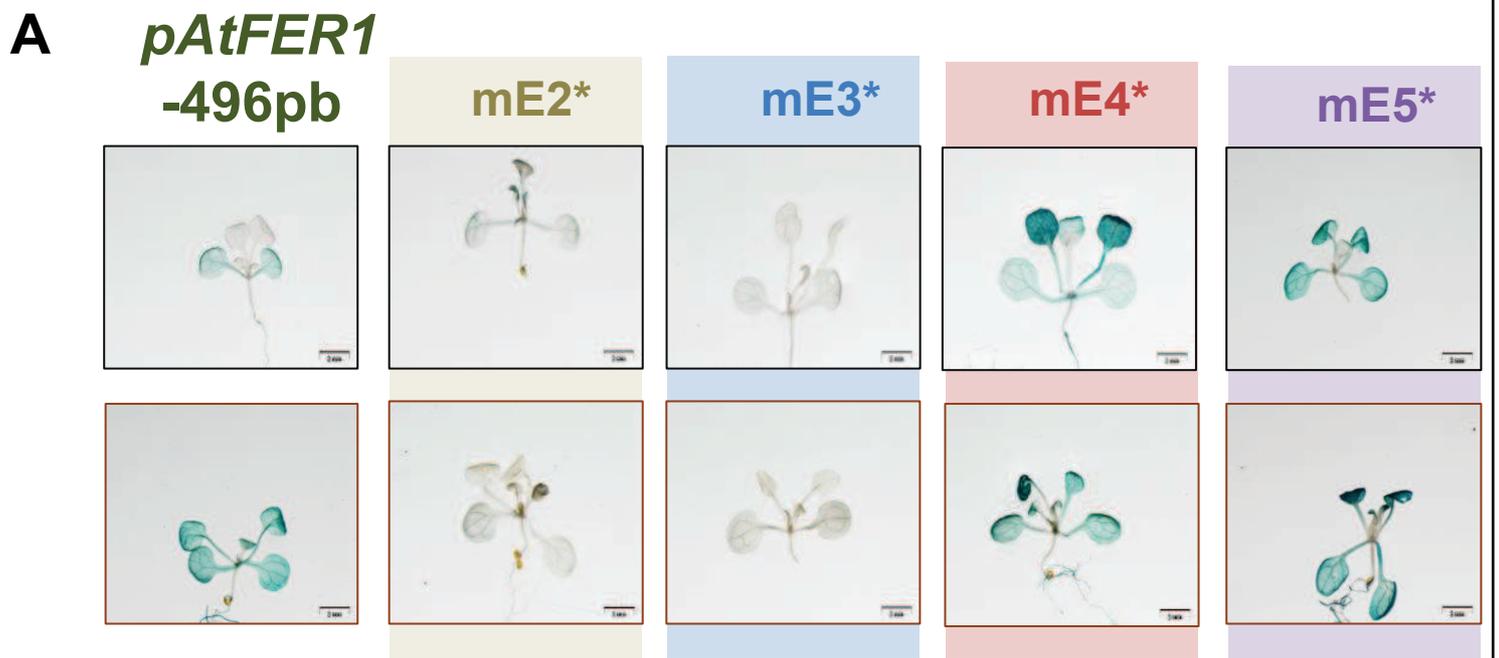


Figure 25 : Observation de l'activité du promoteur minimal d' *AtFER1*, muté ou non pour les éléments conservés (*ELEM*), en réponse à une carence en phosphate.

Des plantules exprimant le gène *uidA* (GUS) sous le contrôle de différentes délétions en 5' du promoteur minimal d'*AtFER1* ont été cultivées durant 9 jours sur milieu MS/2. Ces plantes ont ensuite été transférées dans un milieu carencé en fer et en phosphate durant 5 jours (-Pi -Fe) ou ont seulement été carencées en fer (-Fe). Coloration GUS des plantules après traitement (12h à 37°C). Les images encadrées en noir correspondent aux plantes carencées en fer, les images encadrées en rouge à celles carencées en fer et en phosphate. Barres d'échelle = 2mm (A). Analyse quantitative de l'activité GUS. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=6). La significativité de la différence entre les constructions (indépendamment du traitement) a été déterminée par un test de Student (* = p.valeur<0,05, ** = p.valeur<0,01, *** = p.valeur<0,001) (B). *mE2**, *mE3**, *mE4**, et *mE5** : mutation dans les éléments (*ELEM*) 2, 3, 4 et 5, respectivement.

ses régions en 5') et rappellent l'aspect indispensable de l'*IDRS* pour la régulation transcriptionnelle d'*AtFER1* en réponse au fer.

2.7 L'activité du promoteur d'*AtFER1* suite à une carence en phosphate.

Il a été démontré que l'élément *cis*-régulateur *PIBS* compris dans l'*ELEM 2* du promoteur d'*AtFER1* est impliqué dans l'expression du gène de ferritine suite à une carence en phosphate (Bournier *et al.*, 2013). En se basant sur ces données bibliographiques et afin d'affiner nos connaissances sur cette voie de régulation, nous avons cherché à déterminer si d'autres éléments régulateurs du promoteur étaient impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène suite à une carence en phosphate (Fig. 25). D'un point de vue physiologique, la carence en phosphate conduit à une augmentation de la quantité de fer chez *Arabidopsis thaliana* (Hirsh *et al.*, 2006 ; Ward *et al.*, 2008). Afin de déterminer si les résultats précédents étaient dus à un effet spécifique de la carence en phosphate ou à l'excès de fer conséquent, nous avons appliqué un traitement double (-Fe, et -Pi -Fe ; Fig. 25). Pour la construction contrôle *pAtFER1 -496pb*, on observe que la carence en phosphate conduit à une activation du promoteur dans les parties aériennes et dans les racines (Fig. 25). Ces observations sont en accord avec la bibliographie (Bournier *et al.*, 2013). J'ai donc choisi de poursuivre cette étude en me concentrant sur les différentes versions mutées pour les *ELEM*s de *pAtFER1 -496pb*. L'absence d'activité GUS lorsque l'*ELEM 2* est muté (*mE2**), comparée à la version non mutée, confirme également que cet élément est impliqué dans l'induction de l'expression du gène en condition contrôle et en réponse à une carence en phosphate (Fig. 25). Lorsque l'*ELEM 3* est muté (*mE3**), aucune coloration n'est observée en -Fe et en -Pi -Fe comme pour la mutation *mE2** (Fig. 25). Chez les plantes contenant les constructions avec les promoteurs mutés pour les *ELEM*s 4 et 5 (*mE4** et *mE5**), il y a surexpression du gène rapporteur dans les parties aériennes et racinaires, comme en témoigne l'activité GUS (Fig. 25). De plus, une induction est observée dans ces lignées lors de la double carence -Pi -Fe (Fig. 25B). L'ensemble de ces données suggère qu'en situation de carence en phosphate, seuls les *ELEM*s 2 et 3 sont impliqués dans l'induction de la transcription d'*AtFER1*.

L'ensemble de ces données confirme l'implication de l'*ELEM 2* dans le contrôle de l'activité de *pAtFER1* en réponse à une carence en phosphate (et donc sur l'expression d'*AtFER1*) et montre que l'*ELEM 3* joue aussi un rôle dans cette régulation. Ces données démontrent également que les *ELEM*s 4 et 5 sont des voies inhibitrices indépendantes de la voie « carence en phosphate ». Enfin, ces résultats nous indiquent que l'induction de l'expression d'*AtFER1* en réponse à une carence en phosphate n'est pas nécessairement due à

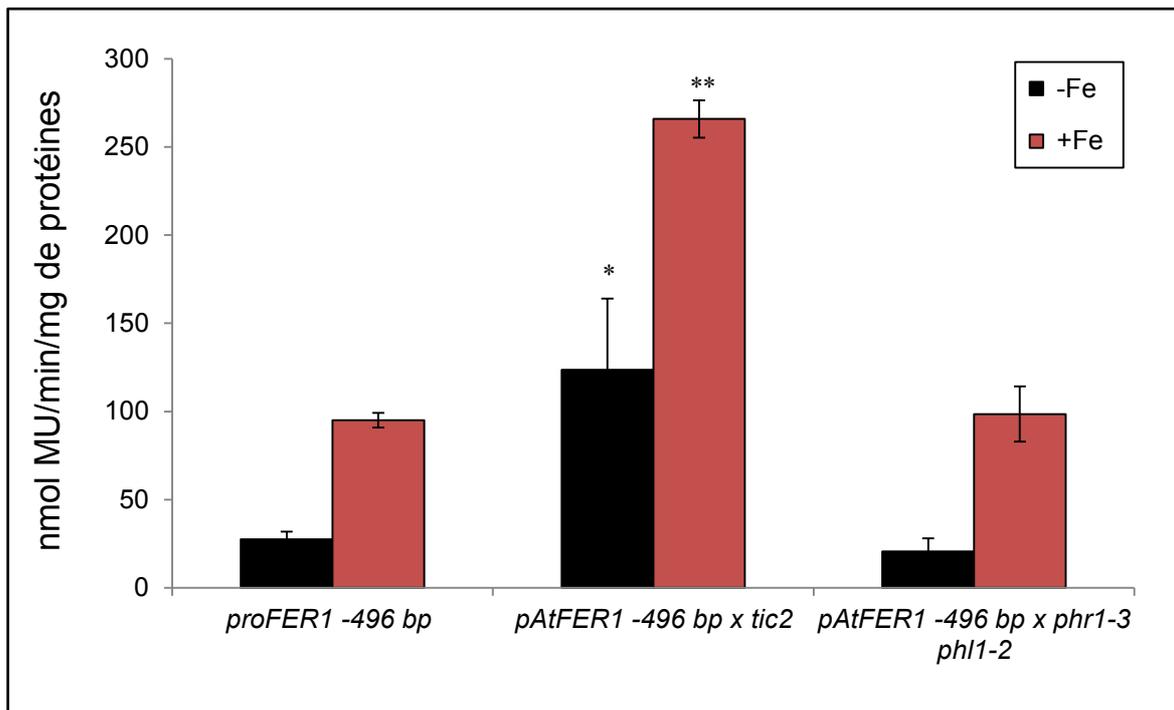


Figure 26 : Implication de TIC et de PHR1/PHL1 dans la régulation de l'activité du promoteur minimal d'*AtFER1* en fonction de la disponibilité en fer.

Des plantules exprimant le gène *uidA* (GUS) sous le contrôle du promoteur minimal d'*AtFER1* ont été croisées avec les mutants *tic-2* et *phr1-3 phl1-2* (double mutant).

Ces plantes ont ensuite été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2. Ces plantes ont ensuite été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours puis ont subi un excès de fer (500 μ M) pendant 24 heures (+Fe) ou sont restées en condition carencée (-Fe). Analyse quantitative de l'activité GUS. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=6). La significativité de la différence entre les constructions (indépendamment du traitement) a été déterminée par un test de Student (* = p.value<0,05, ** = p.value<0,01, *** = p.value<0,001).

une augmentation de la concentration en fer intracellulaire *via* une entrée de fer provenant du milieu extérieur.

2.8 Les implications des acteurs en *trans* TIC et PHR1.

TIC et PHR1 sont deux protéines identifiées comme ayant un impact sur l'expression d'*AtFER1* (Duc *et al.*, 2009 ; Bournier *et al.*, 2013). Dans le but de déterminer si l'implication de ces deux protéines dans le contrôle de l'expression d'*AtFER1* passait par le promoteur minimal d'*AtFER1*, des croisements ont été réalisés entre les lignées contenant la construction avec le promoteur minimal d'*AtFER1* fusionné au gène *uidA* et les mutants perte de fonction *tic-2* ou *phr1-3 phl1-2*. L'analyse de l'activité du promoteur minimal d'*AtFER1* dans ces fonds mutants nous a permis de conclure que TIC est un répresseur ciblant les -496 pb du promoteur d'*AtFER1* et que cette protéine n'est pas impliquée dans la réponse transcriptionnelle à l'excès de fer (Fig. 26). Lorsque l'on s'intéresse aux lignées *phr1-3 phl1-2*, on constate que l'activité GUS présente un profil quasiment identique aux plantes contrôles. Ces observations suggèrent que ces facteurs de transcription ne sont pas responsables de l'induction de l'expression d'*AtFER1* en réponse à l'excès de fer. Par ailleurs, cela indique que l'absence d'activité du promoteur minimal d'*AtFER1*, associée à une mutation de l'élément *cis*-régulateur *P1BS* n'est pas due à une absence d'interaction avec PHR1 et/ou PHL1.

3. Discussion

Au cours de cette étude, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'expression d'*AtFER1*, le gène majeur codant les ferritines chez *Arabidopsis thaliana*. Le but était d'établir les voies de régulation transcriptionnelle de ce gène en réponse à différents stimuli (l'excès et la carence en fer ou la carence en phosphate) et quels étaient les liens potentiels entre elles. Afin de réaliser une étude fine du promoteur (analyse structurale du promoteur à l'aide du gène rapporteur codant pour la β -glucuronidase, GUS), j'ai étudié l'activité de différentes constructions promotrices. Les résultats présentés précédemment montrent que le gène *AtFER1* est régulé transcriptionnellement par différents stimuli *via* plusieurs éléments régulateurs. La région promotrice où se concentre l'essentiel de ces éléments (promoteur minimal) concerne les 496 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Fig. 17B). En effet, bien que les régions en amont du promoteur minimal influent sur l'intensité d'activation du promoteur, elles ne sont

pas indispensables pour son activité (Fig. 18 et 19). Au sein du fragment de 496 pb, les *ELEM*s 2 et 3 ont un rôle central dans l'expression basale du gène et dans son induction par le fer (Fig. 21 et 22). De par leur localisation et leur implication dans des voies inductrices de l'activité du promoteur minimal, il semblerait que ces *ELEM*s soient liés. A l'inverse, les *ELEM*s 4 et 5 semblent participer à l'inhibition de l'expression d'*AtFER1* et seul l'*ELEM* 5 ne semble pas être lié à la voie fer (Fig. 22). Enfin, les *ELEM*s 6 et 7 ne semblent pas participer (majoritairement) à la régulation de l'activité du promoteur minimal d'*AtFER1*, dans nos conditions expérimentales (Fig. 21 et 22). L'ensemble de ces résultats obtenus en culture *in vitro* a été confirmé par l'observation des activités promotrices sur des plantes adultes cultivées en serre (Fig. 23). Mes observations ont également permis de confirmer l'implication du *PIBS* dans l'induction du gène en réponse à la carence en phosphate (Fig. 25) et ce indépendamment des *ELEM*s 4 et 5 (Fig. 25). Mes résultats montrent enfin que l'*ELEM* 3 est central dans les régulations d'*AtFER1*. Il est nécessaire pour l'expression basale du gène, pour la réponse au fer de ce dernier et pour son induction par la carence en phosphate.

3.1 Les éléments inducteurs de l'expression d'*AtFER1*.

Un excès de fer induit l'expression d'*AtFER1*, le gène majeur de ferritine chez *Arabidopsis*. Bien que très étudiée, la région promotrice concernée par cette régulation n'était pas clairement déterminée. Il était établi que l'*IDRS* est la boîte inhibitrice impliquée dans la réponse au fer. D'après mes résultats, les *ELEM*s 2 et 3 du promoteur ont également un rôle important dans cette réponse (Fig. 21 et 22). J'ai pu montrer qu'ils englobent les deux boîtes régulatrices : *PIBS* et *FeRE*.

En ce qui concerne l'élément cis-régulateur *PIBS* (GAATATCC), mes résultats confirment les données de Bournier *et al.* (2013), en montrant que cet élément est nécessaire pour l'expression d'*AtFER1* en réponse à la carence en phosphate (Fig. 25). D'un point de vue plus global, les métabolismes du phosphate et du fer sont connus pour être liés aux niveaux physiologiques et moléculaires. Une question importante est de déterminer pourquoi des facteurs de la voie de réponse à la carence en phosphate (PHR1 et PHL1, MYB-like de la famille MYB-CC) régulent directement un gène impliqué dans le métabolisme du fer (*AtFER1*). La présence de phosphate dans les ferritines indique qu'en plus d'être des éléments régulant la disponibilité du fer intracellulaire, les ferritines pourraient aussi réguler la disponibilité du phosphate dans le chloroplaste, ce dernier étant impliqué dans le transfert de protons (H^+) entre les thylakoïdes et le stroma (par exemple) et dans le métabolisme énergétique *via* l'ATP. D'autre part, mes résultats mettent en évidence l'aspect indispensable

du *PIBS* pour l'expression basale d'*AtFER1* et pour la réponse au fer (Fig. 21). Curieusement, les observations sur les constructions avec le *PIBS* muté ne sont pas la conséquence de l'action de PHR1 ou de PHL1. En effet, dans le double mutant *phr1-3 phl1-2*, l'activité du promoteur minimal n'est pas modifiée par rapport au contrôle (Fig. 26). Cela suggère que d'autres facteurs seraient impliqués pour induire l'expression d'*AtFER1* au niveau basal en interagissant avec la *PIBS*. Chez *Arabidopsis*, les facteurs de transcription PHL2 et PHL3 (deux MYB-CC) sont capables d'induire l'expression de *PAP10* (*PURPLE ACID PHOSPHATASE 10*), un gène impliqué dans la tolérance à la carence en phosphate en interagissant avec la séquence *PIBS* de *pPAP10* (Sun *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2011). D'autre part, il commence à être établi que certains facteurs de transcription de type MYB peuvent interagir avec une séquence *PIBS* indépendamment du statut en phosphate. Par exemple, les facteurs de transcription γ MYB1 et γ MYB2 (deux MYB-CC) interagissent avec le *PIBS* du promoteur de *PLA₂- γ* (*PHOSPHOLIPASE A2*) qui joue un rôle critique dans le développement du pollen (Nguyen *et al.*, 2016). Dans notre cas, il est donc probable que la séquence *PIBS* du promoteur d'*AtFER1* soit le siège d'induction de plusieurs facteurs de transcription de type MYB-CC. PHR1 et PHL1 induiraient le promoteur d'*AtFER1* en réponse à la carence en phosphate alors que d'autres facteurs prendraient leur place en condition de culture non carencée en phosphate. Dans le but de confirmer cette hypothèse, un nouveau criblage simple hybride en levure sur ce motif pourrait être réalisé à partir d'ADNc issus de plantes cultivées en condition standard ou dans des milieux en disponibilité en fer contrastée.

La boîte régulatrice *FeRE* (*CACACT*) a déjà été identifiée comme un élément crucial du maintien de l'homéostasie du fer chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Deng and Eriksson 2007). En effet, cette séquence nucléotidique constitue l'élément *cis* pour l'induction de l'expression chez *Chlamydomonas* de *FOX1* (*FEROXIDASE*) en réponse à la carence en fer. Plus récemment, la séquence *FeRE* a été identifiée dans des voies inhibant l'expression de gènes en réponse à la carence en fer (Fei *et al.*, 2010) mettant en évidence le rôle dual de cet élément par rapport au statut en fer chez *Chlamydomonas*. Concernant la régulation de l'expression d'*AtFER1* en réponse à un excès de fer, il est admis que ce mécanisme passe par une levée d'inhibition de l'expression d'*AtFER1* via l'élément *cis*-régulateur *IDRS*. A l'inverse le mécanisme de régulation de l'expression d'*AtFER1* faisant intervenir l'élément *cis*-régulateur *FeRE* semble être une voie inductrice, potentiellement dépendante du fer (Fig. 22). Cependant, il est possible que l'élément *cis*-régulateur *FeRE* contribue à l'induction de l'expression d'*AtFER1* indépendamment du fer, d'une façon non décrite à ce jour. Dans leur étude, Strozycski *et al.* (2010) indiquent que l'élément *cis*-régulateur *FeRE* du promoteur

d'*AtFER1* jouerait un rôle *via* l'*IDRS*, qui comprend des motifs nucléotidiques proches de la *FeRE*. En effet, ces deux éléments *cis*-régulateurs étant physiquement très proches (15 paires de bases) et répondant tous les deux au fer, il est possible qu'une régulation dynamique prenne place au niveau de ces deux motifs. Une autre hypothèse, probablement la plus vraisemblable, serait que la *FeRE* ne soit tout simplement pas le siège de la réponse au fer, mais plutôt un point de contrôle aspécifique pour permettre l'expression basale d'*AtFER1* et l'induction de l'expression de ce dernier par différents stimuli au travers d'autres éléments *cis*-régulateurs (excès de fer/*IDRS* et carence en phosphate/*PIBS*).

De manière intéressante, les autres gènes de ferritines (*AtFER2*, *AtFER3* et *AtFER4*) ne possèdent pas dans leur « promoteur minimal » les *ELEM*s 2 et 3, mais possèdent à la place l'*ELEM 1* (Fig. 17A). Que l'*ELEM 1* joue le même rôle fonctionnel que les séquences *cis*-régulatrices *PIBS* et *FeRE* est une question qui reste ouverte. Pour y répondre, j'ai réalisé des constructions chimériques où les *ELEM*s 2 et 3 du promoteur minimal d'*AtFER3* et l'*ELEM 1* du promoteur minimal d'*AtFER1* ont été échangés entre ces deux promoteurs minimaux. L'étude des plantes transgéniques devrait apporter des éléments de réponse.

En observant la densité d'éléments *cis*-régulateurs dans le promoteur minimal d'*AtFER1*, il est difficile de concevoir que la « voie phosphate ou *PIBS* » et la « voie fer » soient totalement indépendantes. En effet, le motif *PIBS* est situé à moins de 5 pb de l'*ELEM 3* et à moins de 25 pb de l'*IDRS*. Cette constatation suggère que les facteurs liés au *PIBS* pourraient interagir avec d'autres protéines qui cibleraient la *FeRE* ou l'*IDRS* afin de maintenir l'homéostasie du phosphate et celle du fer *via AtFER1*.

3.2 Les éléments répresseurs de l'expression d'*AtFER1*.

L'expression d'*AtFER1* est finement régulée et implique de nombreux éléments *cis*-régulateurs. Comme évoqué précédemment, le promoteur d'*AtFER1* est régulé par des voies inductrices. En revanche, les résultats obtenus lorsque les *ELEM*s 4 et 5 sont mutés confirment et montrent respectivement que ces derniers sont impliqués dans l'inhibition de l'expression d'*AtFER1* (Fig. 21). L'*IDRS* constituant l'*ELEM 4* est publié comme jouant un rôle d'inhibiteur fort de l'expression d'*AtFER1* en réponse à la carence en fer (Petit *et al.* 2001). En effet, l'expression d'*AtFER1* est bloquée par l'intermédiaire d'un répresseur inconnu à ce jour. Lors d'un excès de fer, il serait dégradé par une voie dépendante du protéasome 26S (Arnaud *et al.*, 2006) et un facteur inducteur viendrait alors activer la transcription. L'*ELEM 5* lui comprend une *G-box* (*CACGTG*) et une *GATA* (*TATC*) mais

parmi elles, seule la *G-box* semble avoir un rôle sur la régulation transcriptionnelle de l'expression d'*AtFER1* (Fig. 22).

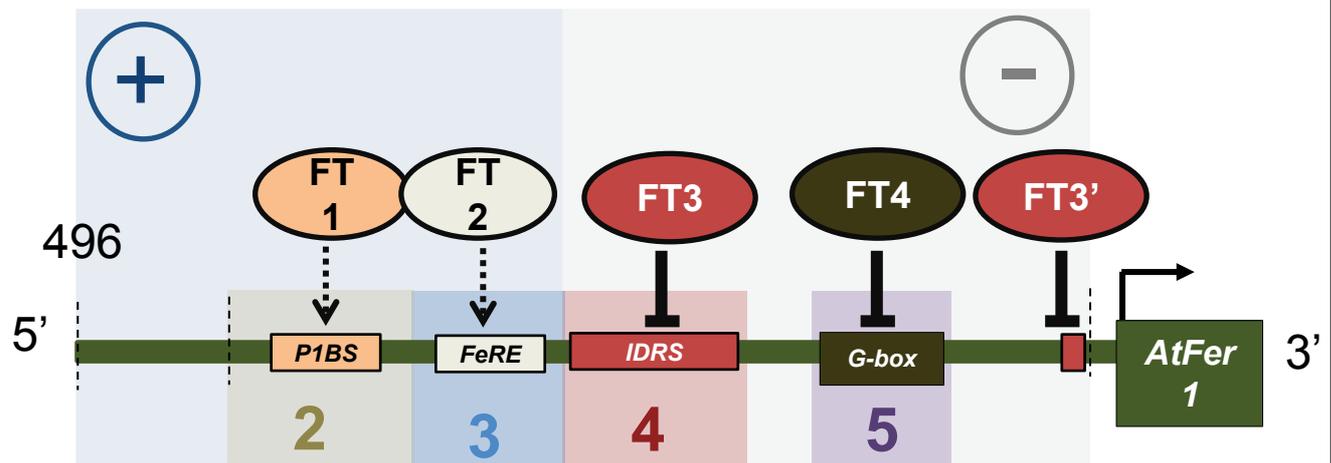
En ce qui concerne l'*IDRS*, mes résultats confirment les données de Petit *et al.*, (2001) qui placent cet élément comme la boîte majeure d'inhibition d'*AtFER1*. Ce motif se définit par deux répétitions en tandem de la séquence *CACNNCNG*. Dans son étude, JM Petit démontre, en mutant une répétition de l'*IDRS* puis les deux, que ces deux motifs ne sont pas indispensables pour inhiber *AtFER1*. En effet la mutation d'une seule ou des deux répétitions entraînent la même réponse : une forte hausse d'activité correspondant à la levée d'inhibition. Le facteur accroché sur l'*IDRS* n'est pas identifié et ce malgré les nombreuses approches mises en place. Il a été démontré par des approches de gel retard, que même en présence de fer un facteur de transcription est accroché sur l'*IDRS*. Dans ces expérimentations, la séquence de l'*IDRS* était toujours plus longue et englobait par exemple également l'*ELEM 3*. Nous pouvons donc imaginer qu'en gel retard, en présence de fer, une protéine s'accroche à la *FeRE* et non à l'*IDRS* entraînant le retard de migration. Mais cette hypothèse reste à ce jour spéculative.

Afin de caractériser plus finement le mode de fonctionnement de l'élément *IDRS*, il serait intéressant de l'introduire dans les promoteurs de gènes qui ne sont pas en lien avec l'homéostasie du fer. Ainsi nous pourrions évaluer si cette séquence est à elle seule capable de bloquer la transcription ou si elle est dépendante des éléments qui l'entourent. D'autre part, une approche de double mutation (*FeRE/IDRS* par exemple) permettrait également d'identifier l'élément *cis* dominant pour la régulation d'*AtFER1* et de déterminer comment les voies s'intègrent entre elles. Par ailleurs j'ai récemment observé qu'il existait une séquence correspondant à un demi *IDRS* situé à 109 pb en amont du site d'initiation de la transcription. J'ai réalisé une expérience préliminaire sur des lignées exprimant le promoteur minimal d'*AtFER1* fusionné au *GUS* avec ce pseudo élément *IDRS* muté. J'ai pu observer par analyse quantitative que l'activité *GUS* en condition contrôle était augmentée et que l'induction par l'excès de fer était conservée. Ces données très préliminaires permettent de supposer que l'inhibition d'*AtFER1* passe par deux, voire trois séquences de type *IDRS* (*CACNNCNG*). L'analyse de lignées *GUS* contenant le promoteur minimal d'*AtFER1* avec les trois éléments de type *IDRS* reste à être réalisée afin de déterminer s'il existe un effet additif entre ces motifs nucléotidiques. Enfin ce type de régulation, par désinhibition, laisse penser à un mécanisme très dynamique qui permet la transcription des ferritines sur un pas de temps très court afin de répondre efficacement à différents stimuli.

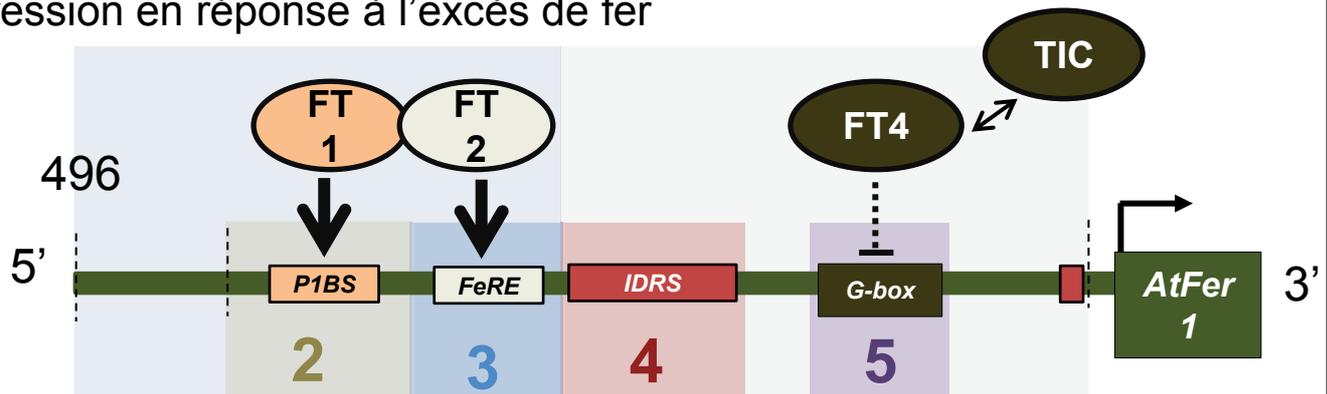
Au cours de ces expériences j'ai pu identifier que la séquence *G-box* est un élément répresseur de l'expression d'*AtFER1* (Fig. 22D). Lorsque ce motif est muté, l'induction par le fer est conservée, ce qui indique que cette *G-box* serait impliquée dans une voie de régulation indépendante de la voie fer impliquant l'*IDRS*. Les *G-box* sont des motifs hexamériques dont la séquence canonique est un palindrome (*CACGTG*). Elles ont été identifiées pour la première fois dans les régions promotrices des gènes codant pour des composantes de la RuBisCo (Ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; Giuliano *et al.*, 1988). Les facteurs de transcription de type *bHLH* reconnaissent les *G-box*, mais peuvent également s'accrocher sur des séquences proches appelées *E-box* (*CANNTG*). Ces deux motifs sont présents dans le promoteur d'*AtFER1* et sont localisés à moins de 18 pb l'un de l'autre. La *E-box* a été publiée comme étant un élément inhibiteur de l'expression d'*AtFER1* via le facteur de transcription *PRR7*. Dans nos conditions, la *G-box* joue un rôle beaucoup plus important dans le contrôle de l'activité du promoteur d'*AtFER1* que la *E-box* qui ne semble pas impliquée dans ce mécanisme. L'élément *trans* impliqué dans l'inhibition d'*AtFER1* via la *G-box* restait à être identifié lorsque j'ai réalisé ces expériences.

Mes résultats sur l'activité du promoteur minimal dans le mutant *tic-2* (Fig. 26) montrent que le profil est très semblable à celui retrouvé chez les lignées comportant la *G-box* mutée. En effet, dans les lignées *pAtFER -496 bp tic-2*, une forte augmentation de l'activité du promoteur est observée tout en conservant l'induction par le fer. Il se pourrait donc qu'il existe un lien avec les études précédentes et que TIC soit impliqué dans la régulation transcriptionnelle de l'expression d'*AtFER1* via la *G-box*. TIC est une protéine nucléaire impliquée dans la régulation du rythme circadien (Ding *et al.*, 2007). Cette protéine a été également identifiée comme coordinateur central de la régulation de l'homéostasie minérale, du développement, de la signalisation hormonale et de la réponse aux stress biotiques et abiotiques des plantes (Shin *et al.*, 2012 ; Sanchez- Villarreal *et al.*, 2013). Par exemple, TIC inhibe l'accumulation du facteur de transcription MYC2 (*bHLH6*) afin de moduler la signalisation du jasmonate chez *Arabidopsis*. Il est possible que dans notre système, TIC module la stabilité et la disponibilité d'un facteur de type *bHLH* qui viendrait inhiber l'expression d'*AtFER1*. Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués, différentes formes du promoteur minimal d'*AtFER1* (mutées ou non) ont été introgressées dans le fond mutant *tic-2*. De plus, des approches de co-immuno précipitations (Co-IP) sont en train d'être réalisées dans l'équipe afin d'identifier *in planta* les interactants potentiels de TIC. Cette approche a récemment été utilisée avec succès par un autre groupe et a permis

Expression en réponse à la carence en fer



Expression en réponse à l'excès de fer



Expression en réponse à la carence en phosphate

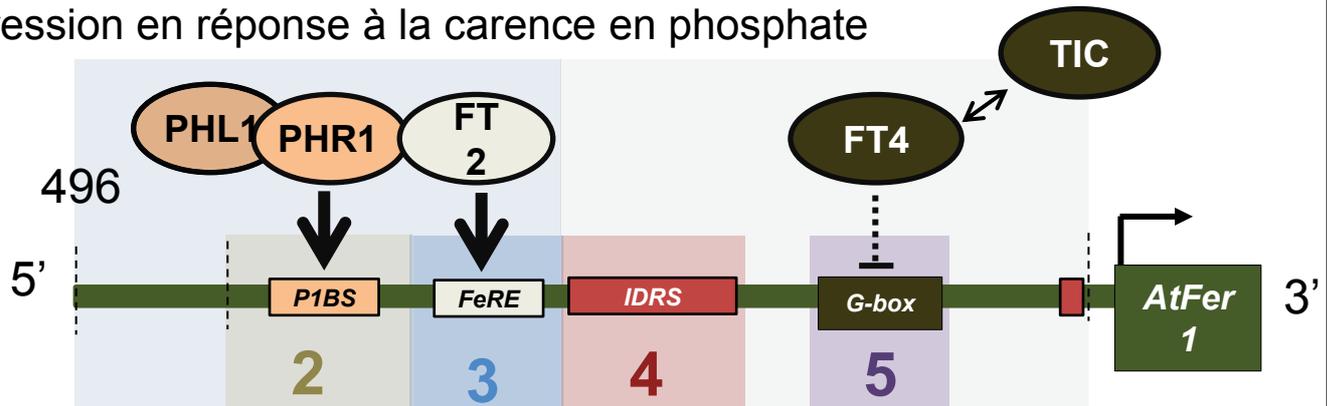


Figure 27 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires connus impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'activité du promoteur minimal d'*AtFER1* en fonction de la disponibilité en fer et en phosphate.

L'ensemble des éléments *cis*-régulateurs sont compris dans les 239 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. Cette région peut être scindée en deux parties : une inductrice regroupant les éléments 2 et 3 (*ELEM 2 & 3*) et une répressive regroupant les éléments 4 et 5 (*ELEM 4 & 5*). Lors d'une carence en fer, l'expression d'*AtFER1* est maintenue faiblement par des facteurs de transcription reconnaissant le *P1BS* et la *FeRE* (FT1 & FT2). En parallèle, des protéines s'accrocheraient aux séquences *IDRS* pour inhiber la transcription (FT3 & FT3'). Lors d'un excès de fer, FT3 et FT3' seraient dégradés et ainsi FT1 et FT2 pourraient induire fortement l'expression d'*AtFER1*. En situation de carence en phosphate, en plus de l'effet « excès de fer » généré physiologiquement, PHR1, PHL1 et FT2 viendraient induire la transcription. L'inhibition via la *G-box* impliquerait un facteur de transcription (FT4) en lien potentiel avec la protéine TIC. Les conditions dans lesquelles FT4 réprime *AtFER1* via la *G-box* ne sont pas connues.

d'identifier un complexe protéique impliquant TIC associé à la boucle du soir de l'horloge circadienne (Huang *et al.*, 2016).

3.3 Le promoteur minimal d'*AtFER1* intègre les signaux issus de multiples voies de signalisation.

Le promoteur minimal d'*AtFER1* intègre, au travers de ses éléments *cis*-régulateurs, les signaux issus de différentes voies de signalisation. Le promoteur peut être scindé en deux régions bien distinctes. La première de -496 à -202 pb est une région inductrice du promoteur. De façon intéressante, les 257 pb en 5' du promoteur minimal (de -496 pb à -239 bp en amont de l'ATG) sont nécessaires pour l'expression. Dans cette portion du promoteur, aucune boîte spécifique et/ou conservée entre les gènes de ferritines n'a été caractérisée. En 3' de cette région deux éléments *cis*-inducteurs, le *PIBS* et la *FeRE*, ont clairement été identifiés. La seconde région de -202 à -109 pb est une région répressive composée de l'*IDRS*, d'un motif pseudo *IDRS* et d'une *G-box*.

Mes résultats couplés aux études précédentes permettent de proposer un modèle pour la régulation transcriptionnelle d'*AtFER1* dans trois configurations différentes (Fig. 27): (i) en carence en fer, *AtFER1* est faiblement exprimé. L'expression pourrait être maintenue faiblement par des facteurs de transcription reconnaissant le *PIBS* et la *FeRE* (FT1 & 2). En parallèle à cette induction, des protéines s'accrocheraient aux séquences *IDRS* pour inhiber la transcription (FT3 & 3') et ainsi empêcher la production de ferritines qui piègeraient le fer nécessaire à l'organisme. De la même manière un facteur de transcription va aussi réprimer l'expression d'*AtFER1* au travers du motif *G-box* (FT4). Il est possible que l'encombrement généré par l'interaction entre les séquences *IDRS* et les FT3 et FT3' empêche l'interaction entre les motifs *PIBS* et *FeRE* et FT1 et FT2, respectivement. (ii) En réponse à l'excès de fer, les protéines s'accrochant aux *IDRS* seraient dégradées permettant ainsi l'induction de l'expression d'*AtFER1* via les séquences *PIBS* et la *FeRE*. Il est aussi possible que le FT4 interagissant avec le motif *G-box* soit lui aussi dégradé dans ces conditions. (iii) En réponse à la carence en phosphate, en plus de l'effet excès de fer généré physiologiquement, PHR1, PHL1 et FT2 viendraient induire la transcription respectivement via les motifs *PIBS* et *FeRE*. L'induction serait moins forte qu'en excès de fer car les protéines FT3 et FT3' seraient moins dégradées (ainsi que potentiellement FT4). Dans les trois configurations, FT4 interagirait avec la *G-box* pour inhiber la transcription d'*AtFER1*.

Par ailleurs, le lien entre l'homéostasie du cuivre et l'horloge circadienne a déjà été évoqué (Perea-Garcia *et al.*, 2010). Plusieurs travaux ont inclu de nombreux signaux entrants

comme la lumière, l'horloge circadienne, le carbone et les signaux nutritionnels dans un réseau de régulations transcriptionnelles complexe conduisant à l'adaptation des plantes à leur environnement (Moore *et al.*, 2003 ; Blasing *et al.*, 2005 ; Smith et Stitt 2007). Dans ces contextes environnementaux, les plantes doivent faire face à différents stress et maintenir une croissance et un développement optimal. Le lien entre le fer, le phosphate et la lumière mis en évidence dans mon étude ouvre la perspective d'étudier le couplage entre la lumière, le rythme circadien, le métabolisme énergétique (fortement couplé au phosphate) et le métabolisme du fer (cofacteur essentiel intervenant dans la photosynthèse, la respiration et la synthèse d'acides aminés et d'ADN par exemple). Il sera intéressant dans l'avenir d'étudier les effets combinés de ces divers signaux environnementaux sur l'expression des ferritines.

Chapitre II : ILR3 est un intégrateur central de l'homéostasie du fer.

AGI Gène	Famille Facteurs de Transcription	Identité
Crible sur l'élément 3 (<i>ELEM 3</i>)		
<i>AT2G21230</i>	BZIP	BASIC LEUCINE-ZIPPER 30
<i>AT2G19520</i>	WD-40	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 64
<i>AT4G34990</i>	MYB	MYB DOMAIN PROTEIN 32
Crible sur l'élément 5 (<i>ELEM 5</i>)		
<i>AT5G54680</i>	bHLH	BASIC HELIX-LOOP-HELIX 105

Tableau 2 : Résultats obtenus à partir des cribles simple hybride en levure.

Une banque de levure exprimant des cDNA de facteurs de transcription a été croisée avec des levures comprenant les fragments d'ADN d'intérêts (élément 3 ou 5). Les levures croisées, ont été repiquées sur milieu SD -U -W pour la sélection des diploïdes. Une dernière sélection a été réalisée sur milieu SD -U -W -His +3AT pour identifier les interactions entre facteurs de transcription et fragments d'ADN. Les deux cribles ont mis en évidence 4 facteurs de transcription pouvant potentiellement interagir *in vivo* dans les éléments 3 et 5 du promoteur d'*AtFER1*.

1. Introduction.

L'expression des gènes de ferritines, et plus spécifiquement *AtFER1*, est régulée très finement par de nombreuses voies transcriptionnelles indépendantes. Grâce à l'étude fonctionnelle du promoteur d'*AtFER1*, de nouveaux éléments *cis* ayant un rôle majeur ont été identifiés. Parmi eux, l'élément 3 (*ELEM 3*) comportant la *FeRE* et l'élément 5 (*ELEM 5*) composé de la *G-box* sont indispensables dans les régulations transcriptionnelles. Afin d'identifier des acteurs en *trans* impliqués dans les régulations transcriptionnelles du gène, des cribles simple hybride en levure ont été réalisés.

Le fragment du promoteur contenant les domaines régulateurs de l'*ELEM 3* (contenant la *FeRE*) a été choisi comme cible. Au total, 3 facteurs de transcription interagissant potentiellement *in vivo* avec l'*ELEM 3* du promoteur d'*AtFER1* ont été identifiés (Tableau 2). Il s'agit de bZIP30 (facteur de transcription de type *bZIP*, impliqué dans la signalisation éthylène ; Jakoby *et al.*, 2002), de NAC064 (facteur de transcription de type *WD-40* ; Ooka *et al.*, 2003) et enfin de MYB32 (facteur de transcription de type *R2R3-MYB*, impliqué dans la régulation du métabolisme secondaire dans le pollen et la réponse au stress hydrique ; Zhou *et al.*, 2015).

Un autre crible ciblant cette fois l'*ELEM 5* (contenant la *G-box*) a été mis en place. Dans ce cas, le bHLH105 (facteur de transcription de type basic helix-loop-helix, impliqué dans les réponses moléculaires à la carence en fer ; Zhang *et al.*, 2015) a été identifié comme interagissant potentiellement *in vivo* avec l'*ELEM 5*. Sur la base des fonctions déjà identifiées, le facteur de transcription bHLH105 semblait être un candidat particulièrement intéressant. D'après les travaux de Zhang *et al.*, (2015), la régulation de l'homéostasie du fer dans la plante est un mécanisme complexe et dynamique qui fait intervenir de nombreux facteurs de transcription de type bHLH. Le bHLH105/ILR3 (IAA LEUCINE RESISTANT 3) a une place centrale dans l'établissement des mécanismes de réponse à la carence en fer.

Cette seconde expérience de simple hybride chez la levure a donc mis en évidence qu'un gène impliqué dans les réponses à la carence en fer pouvait potentiellement être lié aux ferritines et aux réponses des plantes à l'excès de fer. Dans le but de comprendre si cette interaction n'était pas un artefact, je me suis focalisé sur l'étude fonctionnelle des mutants *ilr3* en fonction de différents stress ferriques. J'ai principalement ciblé mon analyse sur les lignées perte de fonction *ilr3-3* et gain de fonction *ilr3-1*. Cette étude fait l'objet d'un article soumis dont je suis premier auteur et est présenté ci-après.

2. Résultats.

2.1 Article soumis pour publication.

Pour cet article la numérotation des figures est indépendante du reste du manuscrit et commence par la figure 1.

Integration of the responses to iron availability fluctuations in *Arabidopsis thaliana* by the bHLH transcription factor ILR3

Nicolas Tissot¹, Jossia Boucherez¹, Fanny Bellegarde¹, Amel Maghiaoui¹, Romain Marcelin¹, Antoine Martin¹, Frédéric Gaymard¹, Jean-François Briat¹, Christian Dubos¹.

1: Biochimie et physiologie moléculaire des plantes, INRA, CNRS, Montpellier Supagro, UM, 34060 Montpellier, France

Corresponding author: Christian Dubos. Address: Biochimie et physiologie moléculaire des plantes, INRA, CNRS, Montpellier Supagro, UM, 2 place Viala, IBIP, Bâtiment 7,34060 Montpellier, France. Tel: 0033 (0)4 99 61 28 18. Email: christian.dubos@supagro.inra.fr

Keywords: basic helix loop helix, bHLH105, iron, homeostasis, *Arabidopsis thaliana*

Abstract.

The control of iron (Fe) homeostasis is essential in all living organisms. Perturbations of Fe homeostasis are responsible for various diseases in humans, and alter productivity and product quality of plants. In mammals, a global and integrated view of the mechanisms managing the responses to Fe deficiency or to Fe excess has emerged. It involves both the IRE / IRP system that controls the expression of key Fe-responsive genes at a post-transcriptional level, and the FBXL5 F-box protein that regulates IRP degradation. In contrast to mammals, the IRE / IRP system is not operating in plants to regulate Fe homeostasis. Instead, Fe homeostasis is mainly transcriptionally regulated. No integrated picture of the regulation of Fe homeostasis is presently available, mostly because plant responses to Fe deficiency or to Fe excess have been considered separately. By using a combination of molecular, genetic and biochemical approaches, we found that the well-described bHLH105/ILR3 transcriptional activator of plant responses to Fe shortage acts as a negative regulator of ferritin gene expression (the main marker of the plant responses to Fe excess) encoding key Fe storage proteins. This regulation is central for the control of plant growth in response to fluctuations in Fe availability. These findings highlight the dual role of ILR3 in controlling Fe homeostasis, whose stability relies on the Arabidopsis FBXL5 ortholog BRUTUS. ILR3 is thus emerging as a main integrator of the plant responses to Fe availability.

Introduction.

The control of iron (Fe) homeostasis is essential in all living organisms. Perturbations of iron uptake, circulation, metabolism or storage are responsible of neurodegenerative diseases (1) and cancer (2) in humans, and alter productivity and product quality of plants (3)

In mammals, a global and integrated view of the mechanisms controlling Fe homeostasis has emerged. At the intracellular level, the expression of various Fe metabolism genes is post-transcriptionally regulated in a coordinated manner (for review see (4)). Specific stem loop structures called Iron Responsive Elements (IREs) are observed in 5' or 3' untranslated regions of mRNAs encoding proteins involved in Fe metabolism. Under low Fe conditions, IREs are bound by two related Iron Regulatory Proteins (IRP1 and IRP2) leading to translational repression of 5' containing IREs mRNAs, and to stability of transcripts exhibiting IREs in their 3'UTR. Conversely, under high Fe conditions, IRPs dissociate from IREs. It enables active translation of 5'UTR IRE-contained mRNAs encoding proteins such as the ferritins involve in the decrease of the cellular Fe labile pool, and induces degradation of transcripts with IRE within their 3'-UTR, like the transferrin receptor required for Fe uptake. A systemic control of Fe homeostasis also occurs. It is mediated by hepcidin, a hepatocyte-secreted hormone that binds the cellular Fe exporter ferroportin (Fpn) in the serum (for review see 5). As a result of this molecular interaction Fpn degradation is activated, leading to cellular retention of Fe. The intracellular and systemic controls of Fe homeostasis in mammals are integrated because Fpn is regulated by IRPs through its 5'-UTR IRE. Co-regulation of both systemic and cellular Fe homeostasis requires the capacity to sense iron levels and to activate degradation of protein regulators such as IRPs or Fpn. A key Fe sensor to regulate Fe homeostasis has been characterized (6). It is the F-box and Leucine-rich Repeat Protein 5 (FBXL5). FBXL5 contains a hemerythrin-like domain able to bind Fe to regulate its stability, leading to a feedback effect on IRPs degradation through E3 ligase activation and ubiquitination (for review see 7). The control of Fe homeostasis in mammals is therefore an integrated pathway enabling to manage both the responses to Fe deficiency or to Fe excess.

In plants, the IRE / IRP system is not operating to regulate Fe homeostasis (8), and although a systemic control of Fe uptake from the soil by the roots does exist (9, 10), hepcidin is not present in the green lineage. Fe homeostasis in plants is mainly transcriptionally regulated (11-13), but so far the transcriptional networks involved to respond to Fe deficiency

or to Fe excess have been studied separately, and in contrast to mammals no integrated picture of the regulation of Fe homeostasis in plants is presently available.

When facing Fe shortage, plants induce the expression of genes involved in Fe uptake, transport and compartmentation (12). In *Arabidopsis thaliana*, the cascade of transcription factors (TFs) that regulates this response has been characterized (1). Upstream this TF network homo- and heterodimers of three-clade IVc basic helix-loop-helix (bHLH) TFs (bHLH34, bHLH104 and bHLH105/IAA-LEUCINE RESISTANT3 [ILR3]) regulate the expression of downstream TFs. Targeted TFs are four clades Ib bHLH TFs (bHLH38, bHLH39, bHLH100, bHLH101) known to interact with bHLH29/FIT (FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR) and bHLH47/PYE (POPEYE) (14-18). FIT-dependent transcriptional complexes activate the transcription of genes encoding the Fe uptake system (e.g. *IRON-REGULATED TRANSPORTER 1*, *IRT1*) located at the root epidermal cells (19-21). In addition, the expression of two R2R3-MYB (MYB10 and MYB72) is also induced leading to the activation of *NICOTIANAMINE SYNTHASE 4* (*NAS4*), a key gene involved in phloem-based transport of Fe to sink (22). Meanwhile, PYE activation will inhibit the expression of genes such as *NAS4* (23). A protein structurally and functionally similar to the mammal FBXL5 Fe sensor, named BRUTUS (BTS), is also involved in the regulation of this transcriptional regulatory network (24, 25). BTS contains a hemerythrin-like domain able to bind Fe and can mediate ubiquitination of target proteins such as bHLH104, bHLH105/ILR3 and bHLH115 (whose role in planta has not yet been elucidated) facilitating their 26S proteasome-mediated degradation (24, 26). Therefore, BTS and related proteins such as HEMERYTHRIN MOTIF-CONTAINING REALLY INTERESTING NEW GENE (RING) AND ZINC-FINGER PROTEIN 1 (HRZ1 and HRZ2 are viewed as potential Fe sensors in plants; 25, 27).

Regulation of Fe excess responses in plants has been studied at cellular and molecular levels by using the *AtFER1* gene (encoding the most expressed Fe storage ferritin protein) as a model (28-31). Although less documented than the transcriptional network regulating Fe deficiency responses, the Fe excess response is also mainly transcriptional, and among the *cis*-elements and the *trans*-acting factors characterized so far, none of them is shared with the network of TFs involved in the control of Fe deficiency responses. Whether or not the Fe deficiency and Fe excess responses are controlled by an integrated pathway involving common players, as for the post-transcriptional regulation of Fe homeostasis in mammals,

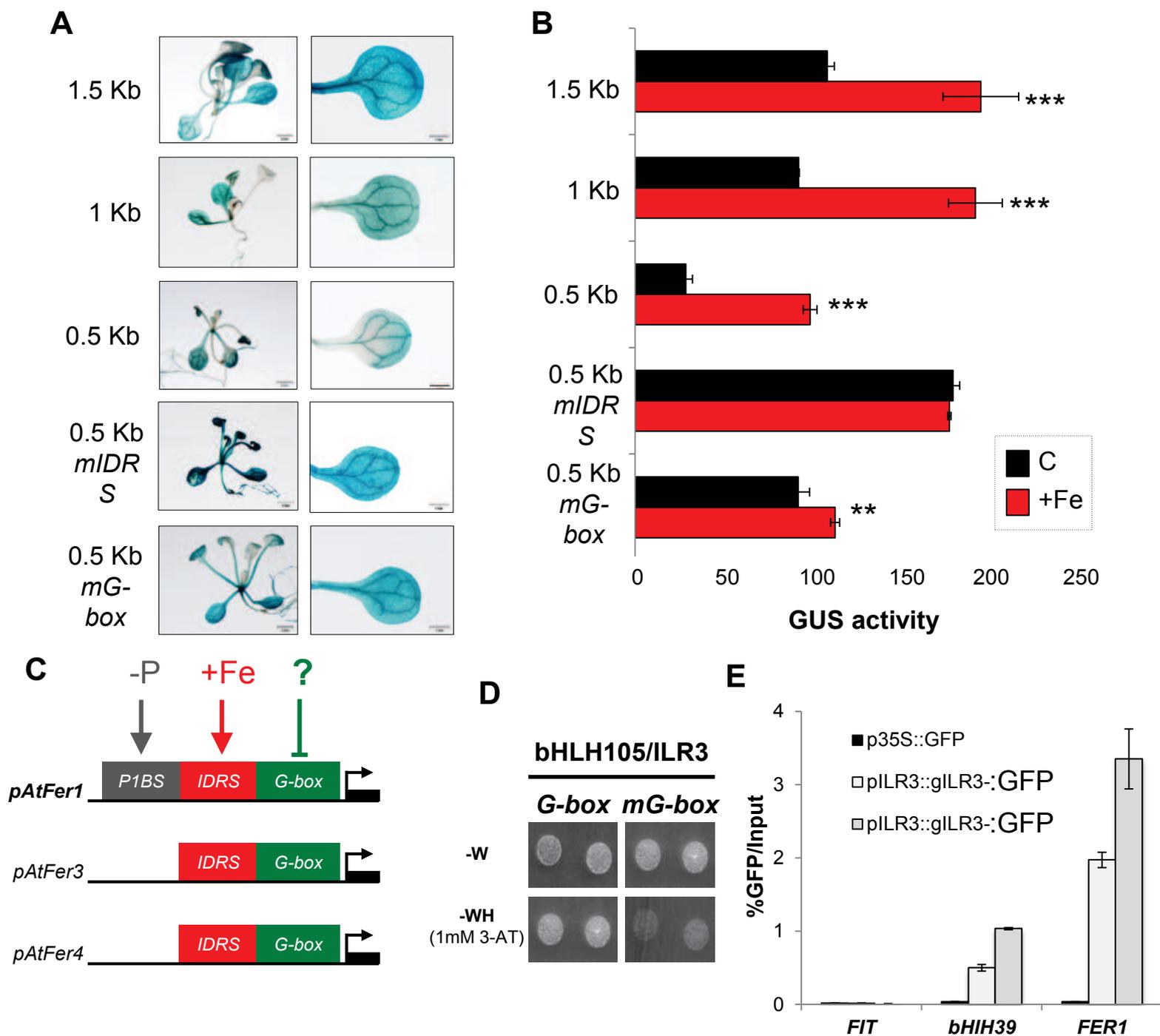


Figure 1 : ILR3 interacts with the promoter of *AtFER1* through a repressive *G-box* cis-regulatory sequence. (A) Functional dissection of *AtFER1* promoter revealed by the GUS (*beta*-glucuronidase) activity driven by the 5'-end deletion and site directed mutagenesis constructs in *Arabidopsis thaliana* seedlings. (B) Quantitative GUS analysis (nmol 4-MU · min⁻¹ · mg⁻¹ proteins) of the 5'-end deletion and site directed mutagenesis constructs under control (C: 50μM) and Fe excess conditions (+Fe: 500μM). *t*-test significance (compared to C condition): ** *P* < 0.01 and *** *P* < 0.001. *mIDRS*: mutated *Iron Dependent Regulatory Sequence*, *mG-box*: mutated *G-box* cis-regulatory sequence. Error bars show SE. (C) Schematic representation of conserved cis-regulatory sequences present in the 500bp upstream from the transcription initiation sequence of the three main ferritin genes expressed in vegetative tissues (*P1BS*: *PHR1* binding site; adapted from (33)). (D) Yeast one-hybrid experiment: yeasts were stably transformed with tetramers of *pAtFER1* DNA fragment containing the native *G-box* or a mutated version (*mG-box*) fused to *HIS3* (auxotrophic markers). These two yeast strains were then transfected with ILR3/bHLH105. Upper panel, growth on control media deprived of W amino acids. Lower panel, growth on selective media deprived of W and H amino acids. 3-AT: 3-amino-1,2,4-triazole. (E) ChIP-qPCR analysis of *AtFER1* promoter immunoprecipitated by antibodies for GFP in 2 weeks old *Arabidopsis* seedlings expressing *pILR3::gILR3::GFP* (2 independent lines) or *p35S::GFP* (negative control). qPCR was used to quantify enrichment at *FIT* (negative control; 18), *bHLH39* (positive control; 18) and *AtFER1* promoters. Error bar indicate SE.

remains therefore an important issue to be addressed, and this is the principal aim of this paper.

Results

Identification of a novel TF interacting with *pAtFER1*.

To identify uncharacterized transcriptional regulators of ferritin gene expression, we first functionally characterized the promoter of *AtFER1* (*pAtFER1*), the most expressed ferritin gene present in *Arabidopsis thaliana* vegetative tissues (32). We identified a 500bp minimal promoter that was still inducible in response to Fe excess, as does the endogenous gene (Fig. 1A and B; 32). Sequence comparison of this *AtFER1* minimal promoter with the corresponding sequence of *pAtFER3* and *pAtFER4* (the two other ferritin genes expressed in vegetative tissues; 32) highlighted some conserved potential *cis*-regulatory motifs (Fig. 1C; 33). Site directed mutagenesis of *AtFER1* minimal promoter revealed a key *cis*-regulatory sequence (*G-box*, *CACGTG*) involved in the transcriptional repression of *AtFER1* expression (Fig. 1A and B) from which a yeast one-hybrid screen was set up (Fig. 1D). This approach leads to the identification of a clade IVc bHLH TF whose interaction with the pray *pAtFER1* domain was abolished when the *G-box* was mutated (Fig. 1D; 34). The gene encoding this TF is bHLH105/ILR3 (IAA-LEUCINE RESISTANT 3) a well-described transcriptional activator of plant responses to Fe shortage (18, 35, 36). Remarkably, the mutation of the *G-box* was not affecting *AtFER1* minimal promoter Fe response, unlike what is observed when the well-known repressive *IDRS* (*Iron-Dependent Regulatory Sequence*) regulatory element is mutated (31). ChIP-qPCR analyses using anti-GFP antibodies on *Arabidopsis* transgenic lines expressing *pILR3::gILR3::GFP* reveal that ILR3 is enriched in the *G-box* region of the *AtFER1* promoter *in planta* (Fig. 1E). *FIT* and *bHLH39* promoters were used as negative and positive control, respectively (18).

ILR3 is a specific inhibitor of ferritin expression.

With the aim to characterize the role of ILR3 on ferritin gene expression, gain- (*ilr3-1*) and loss-of-function (*ilr3-3*) mutants were characterized (Fig.S1A). It is noteworthy that when plants are grown under Fe sufficient condition, *IRT1* expression is only detected in the *ilr3-1* mutant. In contrast, induction of *IRT1* expression in response to Fe shortage is drastically reduced in the *ilr3-3* mutant when compared to wild type and *ilr3-1* plants (Fig.S1B). Ferritins (*AtFER1*, *AtFER3* and *AtFER4*) mRNA and protein abundance (as revealed by qRT-

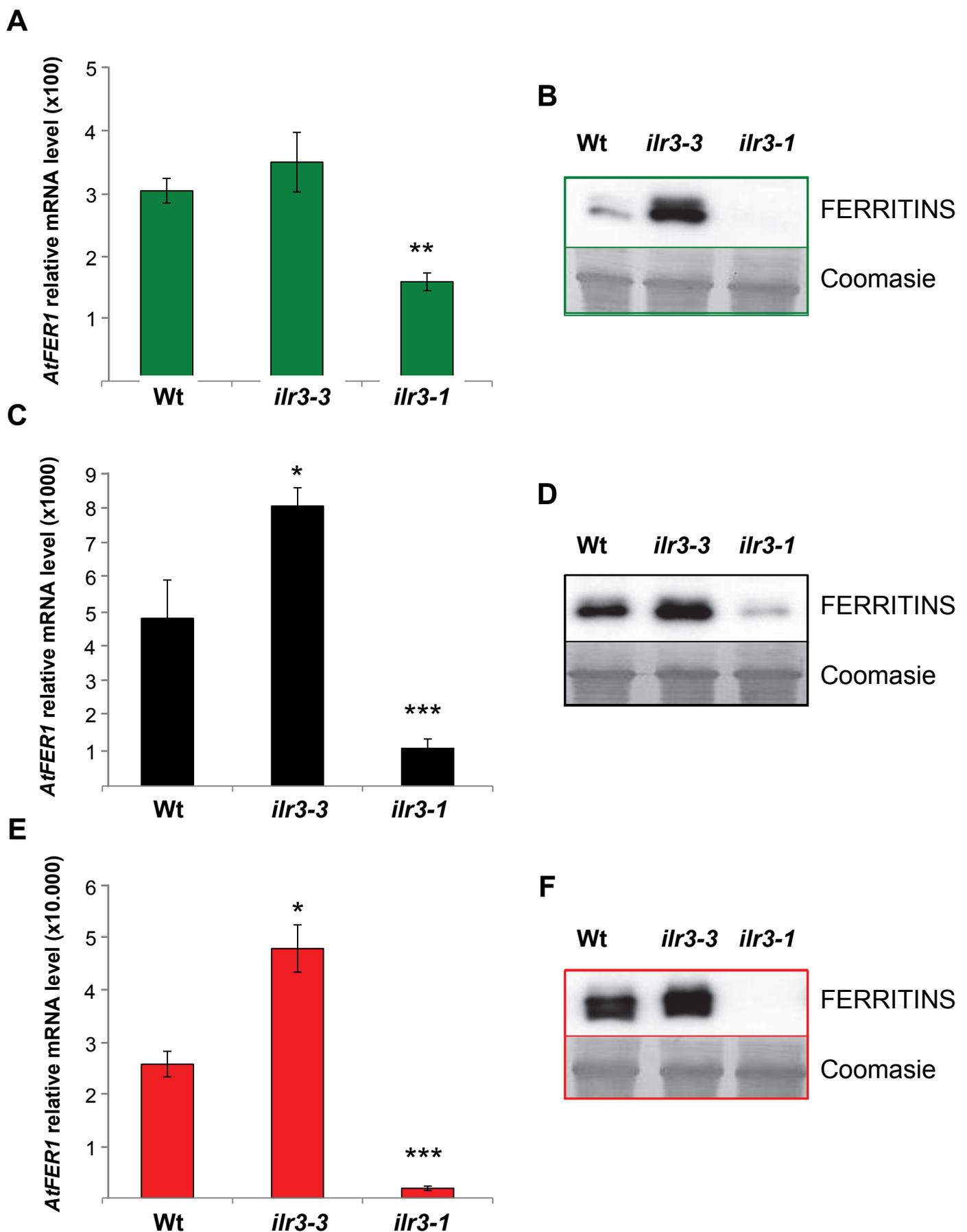


Figure 2 : ILR3 is a repressor of ferritin expression. (A, C, E) Quantitative RT-PCR analysis of the *AtFER1* mRNA levels in two weeks old wild type (Wt) and *ILR3* gain- (*ilr3-1*) and loss-of-function (*ilr3-3*) mutants grown in Fe deficient (A, 0 μ M), sufficient (C, 50 μ M) or excess (E, 500 μ M) conditions. *t*-test significance (compared to Wt) : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Error bars show SE. (B, D, F) Abundance of ferritin proteins in wild type, *ilr3-1* and *ilr3-3* seedlings grown in Fe (B) deficient, (D) sufficient or (F) excess conditions. Proteins loading is evaluated by Coomassie staining.

PCR and western blot, respectively) in wild type plants was as expected positively correlated with the amount of Fe present in the growth media (Fig.2, Fig. S2). Irrespective to the concentration of Fe present in the growth media, and protein abundance of the three ferritin genes were increased in the *ilr3-3* mutant when compared to wild type plants. In contrast, ferritins mRNA and protein abundance was decreased in the *ilr3-1* mutant when compared to wild type plants in all the condition tested. Interestingly, the expression of another marker gene of plant responses to Fe excess, namely the cytosolic *ASCORBATE PEROXIDASE 1* (*APX1*; (37), was unaffected in the *ilr3-1* and *ilr3-3* mutant backgrounds when compared to wild type plants indicating that the regulation of ferritins expression by ILR3 is a Fe-specific mechanism (Fig.S3A).

Because ILR3 and the other clade IVc bHLH TF are involved in the transcriptional control of Fe deficiency responses (18, 35), *AtFER1* mRNA abundance was measured in the corresponding loss-of-function mutant (*i.e.* *bhlh34*, *bhlh104* and *bhlh115*). No variation in *AtFER1* expression was found in these three mutants when compare to wild type plants, in contrast to what is observed in the *ilr3-3* and *ilr3-1* mutants as well as in the triple ferritin loss-of-function mutant *fer1,3,4* (Fig.S3B; (38). These data demonstrate that ILR3 is central for the inhibition of ferritin gene expression.

Fe-dependent seedling development relies on ILR3 activity.

Wild type, *ilr3-3* and *ilr3-1* seedlings were grown for nine days on growth media displaying contrasted Fe concentrations. In the absence of Fe a strong reduction of *ilr3-3* root growth was observed when compared to wild type seedlings, confirming observations made in previous studies (Fig. 3A; Fig. S4A; 18, 35). Conversely, an opposite trend was observed for the *ilr3-1* mutant once again confirming previous observations (18). Under Fe-replete condition, no significant difference in root length was observed between the *ilr3-3* and *ilr3-1* mutants and wild type seedlings (Fig. 3B; Fig. S4A). When seedlings were grown on Fe excess, root growth was drastically affected in all three genotypes. However, *ilr3-3* and *ilr3-1* mutants displayed longer and shorter root length when compared to wild type seedlings, respectively (Fig. 3C; Fig. S4A). Aerial parts growth was also affected in a Fe-dependent manner (Fig. S4B). We found that under Fe deficiency *ilr3-3* seedlings were significantly smaller than wild type and *ilr3-1* seedlings whereas under Fe excess *ilr3-1* seedlings were significantly smaller than wild type and *ilr3-3* seedlings. However, no difference between the three genotypes was observed under Fe-replete condition. Altogether these data demonstrate that ILR3 function extends beyond its role in the control of plant response to Fe deficiency to

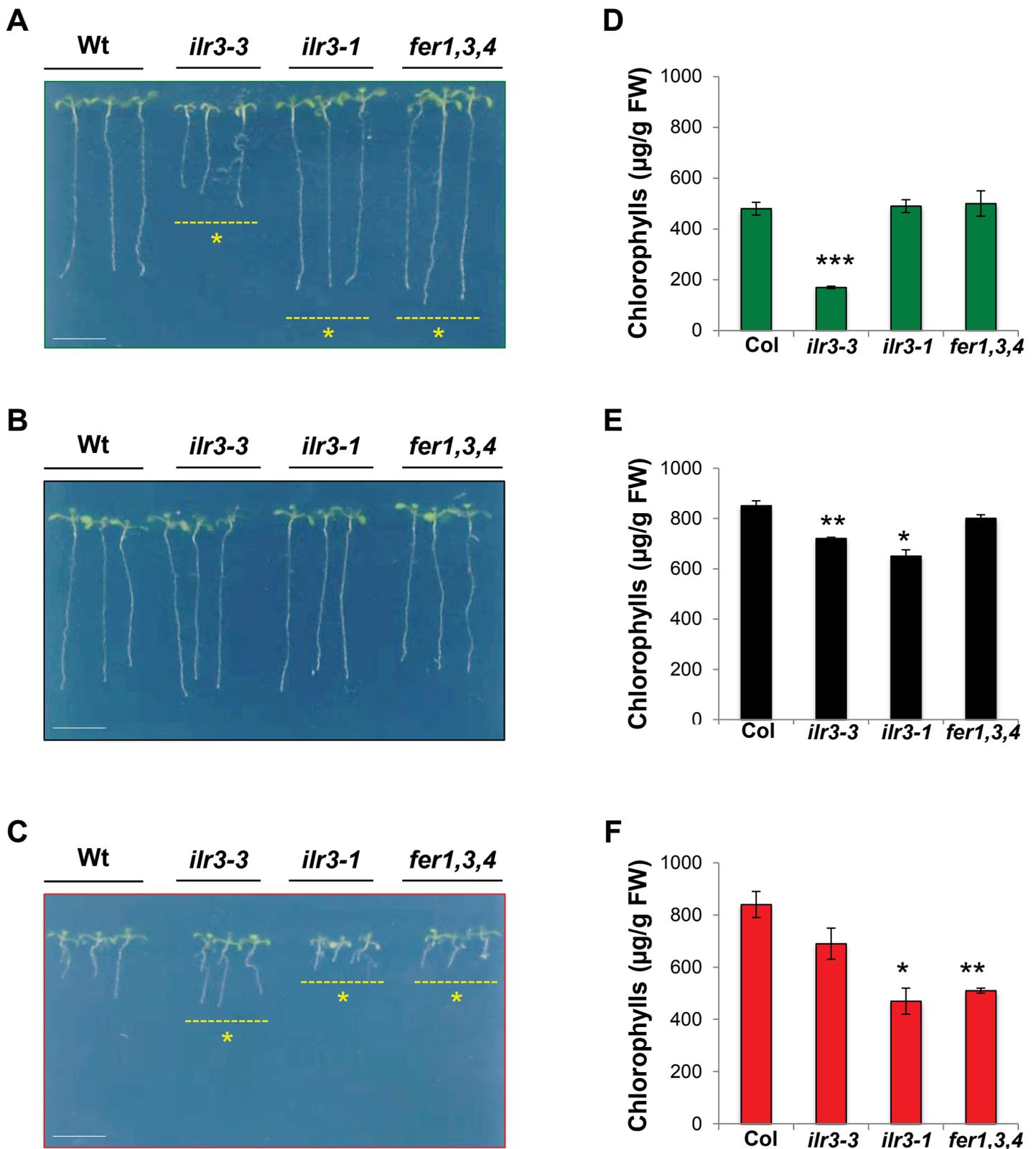


Figure 3 : Fe-dependent control of seedling development by ILR3 involves ferritins activity. (A-C) Seedling phenotypes of the wild type (Wt), *ilr3-1* (ILR3 gain-of-function), *ilr3-3* (ILR3 loss-of-function) and *fer1,3,4* mutants grown for two weeks in Fe deficient (A, 0μM), sufficient (B, 50μM) or excess (C, 500μM) conditions. Bar = 1 cm. Stars indicate significant difference (see Fig. S4A). Chlorophylls content of Wt, *ilr3-1*, *ilr3-3* and *fer1,3,4* mutants were grown for two weeks in Fe deficient (D; green color), sufficient (E; black color) or excess (F; red color) conditions. *t*-test significance (compared to Wt): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Error bars show SE.

a more central role in the transcriptional regulation of plant development in response to Fe availability.

Fe-dependent control of seedling development by ILR3 partly relies on ferritins activity.

Seedlings of the *fer1,3,4* triple ferritin loss-of-function mutant were also grown for nine days on growth media displaying contrasted Fe concentrations. Growth parameters of the *fer1,3,4* mutant were compared with the ones of the *ilr3-3* and *ilr3-1* mutants and wild type seedlings. We found that in all the conditions tested, the *fer1,3,4* and the *ilr3-1* mutants were displaying comparable development (i.e. roots length and fresh weight; Fig. 3A, B and C; Fig. S4) when compared to *ilr3-3* or wild type seedlings. Measurements of chlorophylls content as a proxy of Fe efficiency in seedlings confirmed that the *ilr3-3* mutant was affected in its Fe homeostasis, because it appeared more chlorotic, independently of the Fe present in the media (Fig. 3D, E and F; (18, 35). Strikingly, we found that the *ilr3-1* and *fer1,3,4* mutants were also more chlorotic than wild type seedlings when the Fe concentration in the media was not limiting or in excess (Fig. 3E and F). These later findings suggesting that either ferritins content may exert a negative feedback on Fe acquisition and/or the absence of ferritins induces chlorosis. Altogether, these observations demonstrate that part of ILR3 function in the control of seedling development in response to Fe availability relies on ferritins activity as both *fer1,3,4* and *ilr3-1* mutants are being affected in ferritin accumulation.

ILR3 participates to the plant response to Fe excess.

To further test the hypothesis that ILR3 activity could influence the plant response to Fe excess *ilr3-3*, *ilr3-1*, *fer1,3,4* and wild type plants were grown for three weeks under Fe replete condition before Fe was removed from the nutrient solution. After ten days of growth under Fe deficiency, plants were subjected to Fe excess by supplementing the medium with 700 μ M of Fe(III)-EDDHA (Fe form easily assimilated by the plant) and grown for an additional ten days (Fig. S5A). *ilr3-1*, *fer1,3,4* and wild type plants were chlorotic prior to the application of Fe excess. *ilr3-3* plants presents the more affected phenotype as young leaves showed necrosis (Fig. 4A ; Fig. S5B). Following Fe(III)-EDDHA treatment *ilr3-3* and wild type plants were rescued as chlorosis and necrotic symptoms disappeared from the young leaves (Fig. 4B). In contrast we observed that the re-greening of the *ilr3-1* and *fer1,3,4* plants was not homogenous and that young leaves displayed a patchy phenotype with chlorotic areas. This phenotype was associated with a decrease in the overall chlorophyll content in

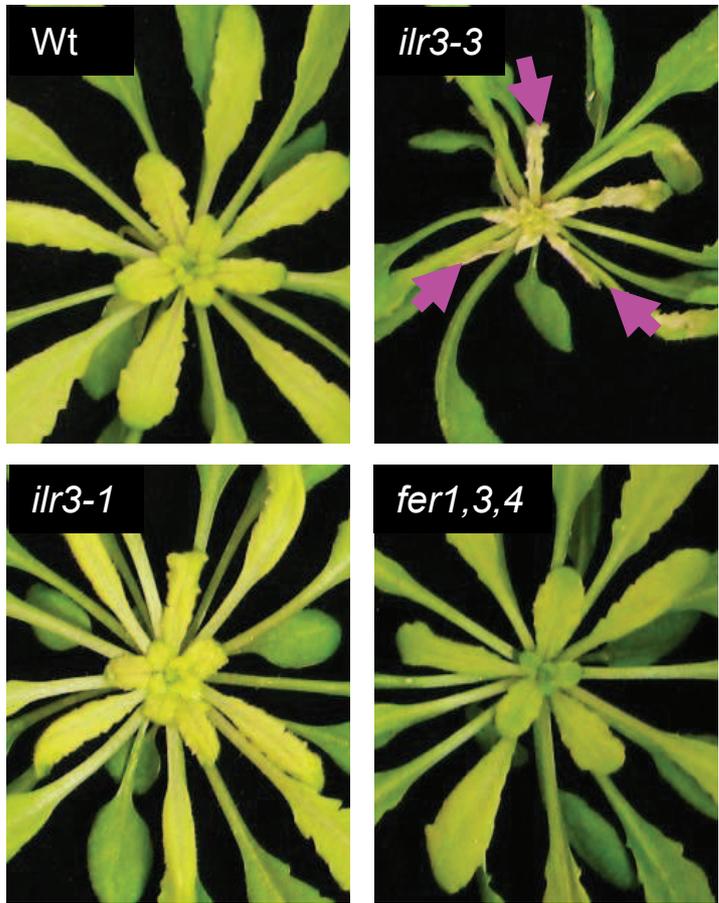
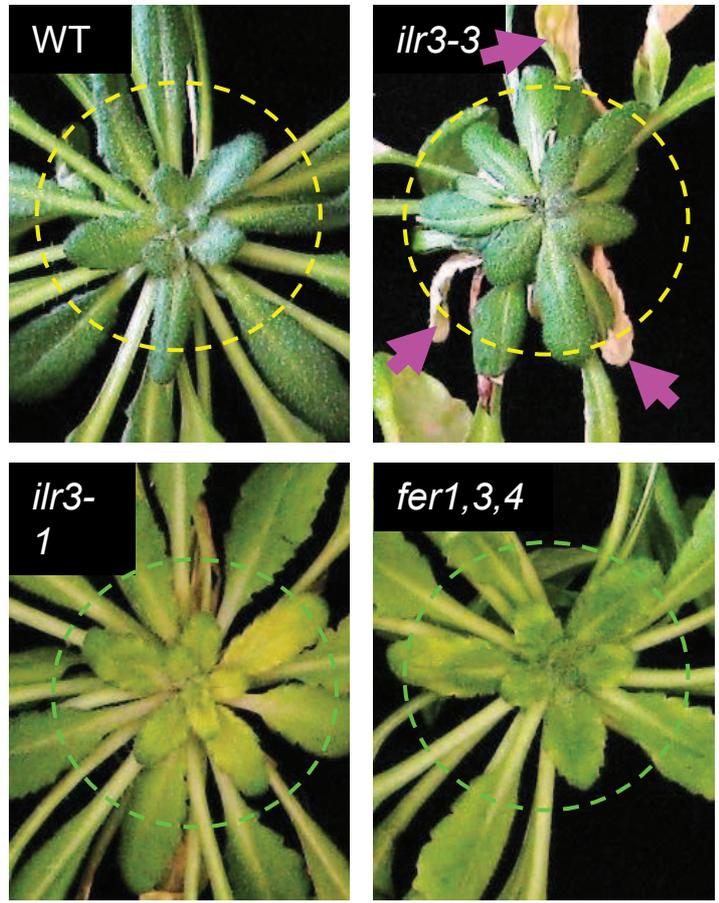
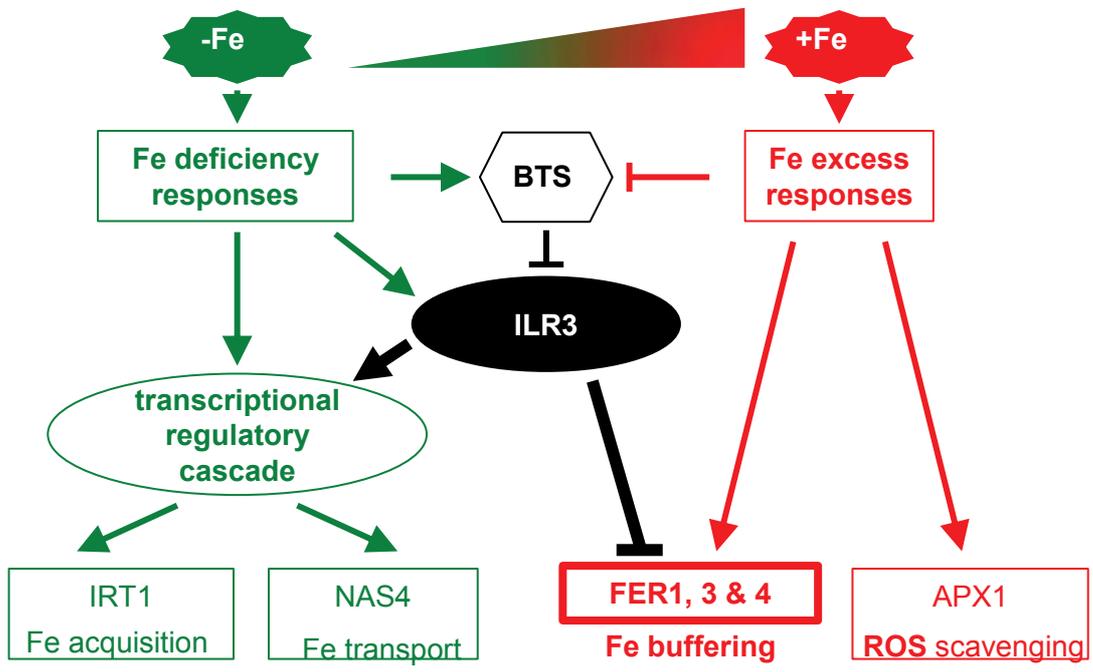
A**B****C**

Figure 4 : ILR3 participates to the plant response to Fe excess. (A) Rosette phenotype of wild type (Wt), *ilr3-1* (*ILR3* gain-of-function), *ilr3-3* (*ILR3* loss-of-function) and *fer1,3,4* mutants after three weeks of growth in Fe replete condition followed by 10 days of Fe deficiency. Arrows indicate necrotic young leaves. (B) Rosette phenotype of Wt, *ilr3-1*, *ilr3-3* and *fer1,3,4* plants after 10 days of growth in Fe excess (700µM Fe-EDDHA) following 10 days of Fe deficiency (*i.e.* plants described panel A). Circles indicate the leaves that developed during the frame of the Fe excess treatment. Arrows indicate leaves that die following to Fe deprivation treatment. (C) Schematic representation of the dual role that plays ILR3 in the control of Fe homeostasis. BTS: BRUTUS; FER 1, 3 & 4: ferritin 1, 3 and 4; APX1: ASCORBATE PEROXIDASE 1; NAS4: NICOTINANAMINE SYNTHASE 4; IRT1: IRON-REGULATED TRANSPORTER 1.

young leaves (Fig. S5B). This later observation indicated that the absence of ferritins was compromising the Fe(III)-EDDHA rescue of the chlorotic defects demonstrating that ILR3 participates to the plant response to Fe excess.

Discussion

Identification of a novel bHLH-type transcriptional regulator of ferritins expression.

The ferritins are a class of ubiquitous Fe storage proteins found in all living kingdoms that play a central role in the control of Fe homeostasis (29). In plants, the role of ferritins is to buffer Fe allowing to maintain Fe concentration to levels that are optimal for metabolic purposes and to avoid the deleterious effects of free Fe-associated reactive oxygen species (ROS) (38). The abundance of ferritins found in plants is transiently induced in response to Fe excess. This is for example the case when plants are recovering from a period of Fe shortage. The induction of ferritins mRNA level is mostly regulated at the transcriptional level and involves a *cis*-regulatory element named *IDRS* (*Iron Dependent Regulatory Sequence*) through which ferritins expression is inhibited (31). No *trans*-acting factors interacting with the *IDRS* have been identified so far. Strikingly, all the studies aiming at decrypting the molecular mechanisms controlling ferritins expression have failed in identifying any actor repressing ferritin gene expression in response to Fe deprivation. Instead it has been found that Fe is not the sole signal that directly modulates ferritin gene expression. Ferritin gene expression is under the control of the circadian clock and involves the nuclear factor TIME FOR COFFEE (TIC) (30, 37). Plant ferritin gene expression is also tightly connected to phosphate availability. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, *AtFER1* expression (the most expressed ferritin gene present in vegetative tissues) is induced under phosphate starvation (28, 29). This induction relies on the interaction between two MYB-like transcription factors (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1, PHR1 and PHR1-like 1, PHL1) and the *P1BS* (*PHR1 binding site*) *cis*-regulatory sequence present on *AtFER1* promoter. We have thus developed an *AtFER1* promoter-based strategy with the aim to identify key molecular players that could coordinate the transcriptional regulatory cascade associated with the Fe acquisition from the soil and the Fe buffering activity of ferritins. This approach leads to the identification of both a *cis*-regulatory motif (*G-box*) through which *AtFER1* expression is repressed and a cognate *trans*-acting factor, namely bHLH105/ILR3 (IAA-LEUCINE RESISTANT 3), which was found to bind *in planta* to this *G-box* (Fig. 1D and 1E). We

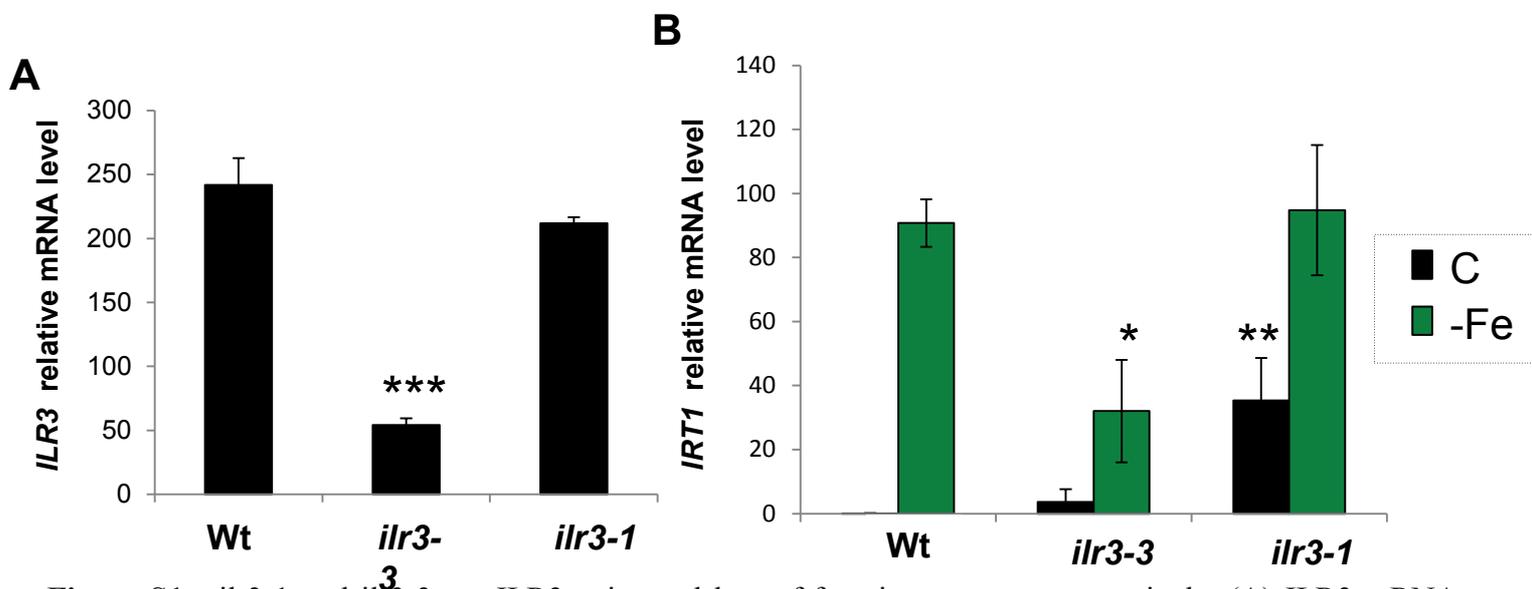


Figure S1 : *ilr3-1* and *ilr3-3* are ILR3 gain- and loss-of-function mutants, respectively. (A) ILR3 mRNA accumulation in two weeks old seedling of wild type (Wt) and *ilr3-1* and *ilr3-3* mutants grown under replete Fe condition (50 μ M). (B) IRT1 mRNA accumulation in two weeks old Wt, *ilr3-1* and *ilr3-3* seedlings grown in control (C: 50 μ M Fe, black) and Fe deficient (-Fe: 0 μ M, green) conditions.

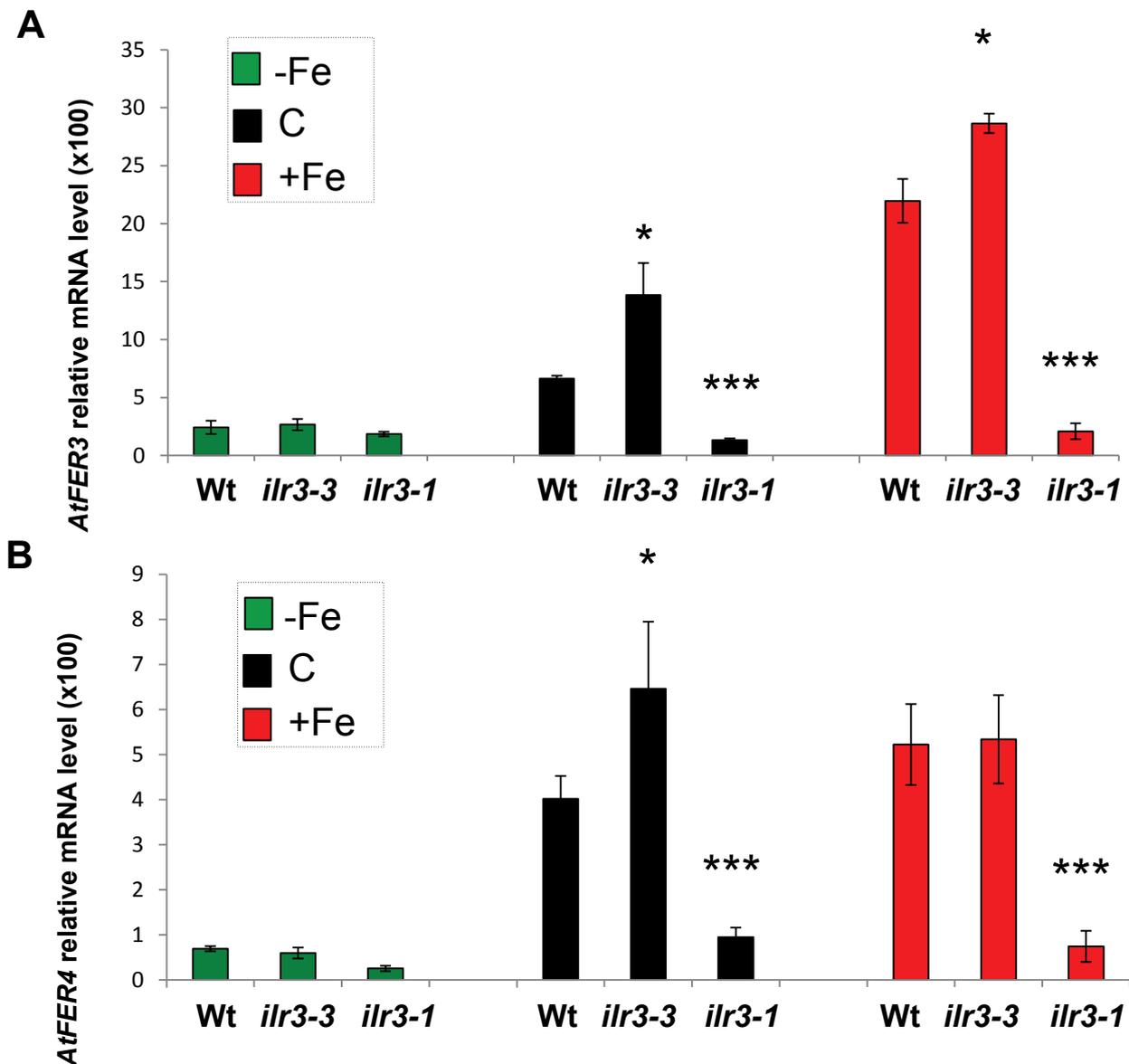


Figure S2 : ILR3 is a repressor of ferritin expression. Quantitative RT-PCR analysis of (A) *AtFER3* and (B) *AtFER4* mRNA levels in two weeks old wild type (Wt) and ILR3 gain- (*ilr3-1*) and loss-of-function (*ilr3-3*) mutants grown in Fe deficient (-Fe: 0 μ M; green), sufficient (C: 50 μ M; black) or excess (+Fe: 500 μ M; red) conditions. *t*-test significance (compared to Wt): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Error bars show SE.

confirm that ILR3 is a repressor of *AtFER1* expression using gain- (*ilr3-1*) and loss-of-function (*ilr3-3*) mutants (36) grown in contrasted Fe concentrations. Importantly, ILR3 is described as a master regulator of the plant responses to Fe shortage acting as a transcriptional activator (18, 35). Therefore, it emerges that the role of ILR3 extends beyond the activation of the Fe acquisition machinery in response to Fe deficiency. Indeed, it connects the plant responses to both Fe deficiency and Fe excess, which is of central importance when plants are recovering from a period of Fe shortage or when Fe availability in the soil solution is fluctuating.

Disequilibria in Fe homeostasis, either due to Fe deficiency or excess, can lead to severe diseases in mammals, and can impact plant productivity and the quality of plant products (3). In mammals, it is well established that such a disequilibria leads to the integrated co-regulation of storage and transport Fe systems, through post-transcriptional mechanisms. It requires the IRE / IRPs system controlling the ferritin mRNA translation on one hand and the transferrin mRNA stability on the other hand. In plants, in contrast, Fe deficiency and excess were studied independently and it was known that the ferritins and the Fe uptake system were both transcriptionally regulated. Whether or not, and how, these transcriptional regulations could be coupled was so far unknown. The discovery that ILR3, known to be a major positive regulator of the Fe deficiency responses in Arabidopsis, also acts as a repressor of ferritin gene expression under such conditions, defines this bHLH transcription factor as a key integrator of the transcriptional regulation of the responses to both Fe deficiency and Fe excess. ILR3 activity is thus centered at the interface between the plant responses to Fe deficiency and Fe excess (Fig. 4C).

Integrated co-regulation of Fe excess and deficiency responses appears therefore to be conserved throughout eukaryotes (plants and animals), with, however, distinct molecular modalities: post-transcriptional in animals and transcriptional in plants.

ILR3 integrates Fe signals to adjust plant development in a ferritin-dependent manner.

The involvement of ILR3 in coordinating the responses to Fe shortage is central for the plant survival. The ILR3-dependent transcriptional regulatory cascade is well characterized and most of the downstream targets involved in Fe assimilation from the soil by the plant have been identified (11, 35). The specific role of ILR3 in the context of Fe deficiency is best exemplified by the extent of the growth defects that are observed in *ilr3-3* mutant when compared to wild type plants (Fig. 3A, 3D and 4A; 18, 35). These growth

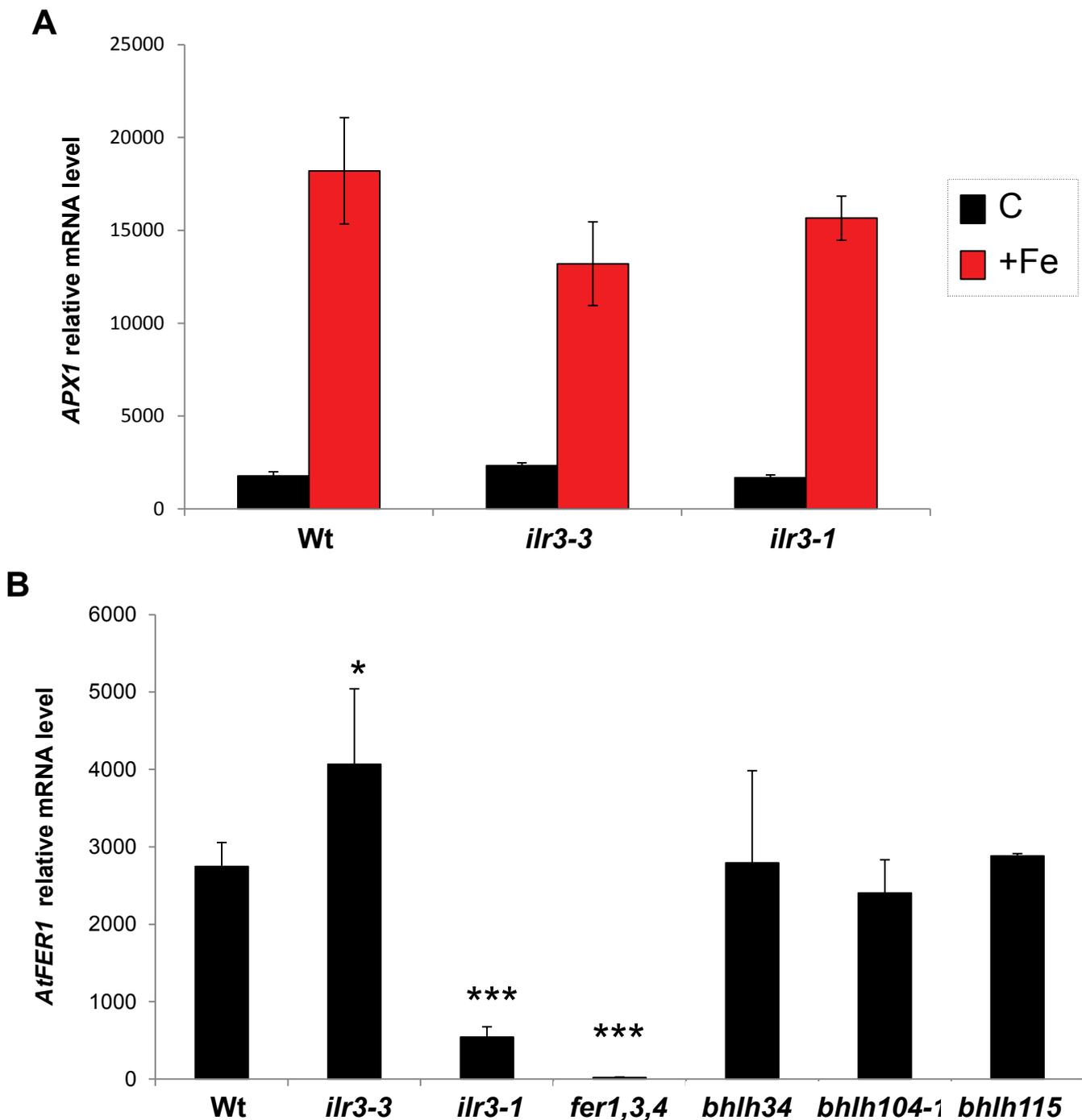


Figure S3 : Regulation of ferritin expression in response to Fe availability is specific to ILR3. (A) Quantitative RT-PCR analysis of *APX1* (*ASCORPATE PEROXIDASE 1*) mRNA levels in two weeks old wild type (Wt) and *ILR3* gain- (*ilr3-1*) and loss-of-function (*ilr3-3*) mutants grown in Fe sufficient (C: 0μM, black) or, excess (+Fe: 500μM, red) conditions. Error bars show SE. (B) Quantitative RT-PCR analysis of *AtFER1* mRNA levels in two weeks old Wt, *ilr3-1*, *ilr3-3*, *fer1,3,4*, *bhlh34*, *bhlh104-1* and *bhlh115* seedlings grown in control Fe condition (50μM). Error bars show SE. *t*-test significance (compared to Wt): * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

defects being abolished in plants displaying increased ILR3 activity (*ilr3-1*). Nevertheless some evidence suggests that ILR3 function may extend beyond the induction of the sole Fe acquisition machinery. ILR3 was first characterized as a potential regulator of metal homeostasis and (auxin) IAA-conjugate metabolism whose activity was dependent on Fe availability (36). In this study the authors found that ILR3 may regulate the expression of three vacuolar iron transporters homologues (39, 40) and a gene encoding a chloroplastic protein involved in [Fe-S] cluster transfer between proteins called NEET (41). A recent study showed that the interaction between ILR3 and the coat protein of Alfalfa mosaic virus was inducing the salicylic acid-dependent defense signaling response in Arabidopsis (42). It is proposed that NEET proteins play a pivotal role in this process and that ILR3 acts as transcriptional activator of NEET expression. NEET function was also shown to be critical for plant development, senescence and reactive oxygen species homeostasis (41). Importantly, plant sensitivity to Fe availability is also dependent on NEET activity as its suppression renders mutant plants more susceptible to Fe deprivation and more resistant to Fe excess than wild type plants (41). In contrast to its role in response to Fe deficiency, we found that ILR3 functions as a repressor of the plant responses to high Fe concentrations, in agreement with an increased sensitivity of the *ilr3-1* mutant to an excess of Fe compared to wild type plants (Fig. 3C, 3F and 4B). Thus, it suggests that ILR3 may play an important role in modulating chloroplastic Fe homeostasis by affecting both NEET and ferritin gene expression.

ILR3 degradation through the 26S proteasome is mediated by BRUTUS (BTS; 24, 25). BTS is a F-box protein similar to the mammal FBXL5 Fe sensor that contains a hemerythrin-like domain able to bind Fe. The binding of Fe to the hemerythrin-like domain of BTS participates to its destabilization and subsequent degradation (24, 26). Taken together the data gathered herein and in previous studies indicate that the core component of the machinery involved in the control of Fe homeostasis is composed of ILR3 and BTS (Fig. 4C). In this model ILR3, whose activity is regulated by BTS in a Fe-dependent manner, acts as both a transcriptional activator of plant response to Fe shortage and as a repressor of plant responses to Fe excess. The plant ILR3 / BTS module appears to be the counterpart of the mammal IRP / FBXL5 regulatory mechanism, with the difference that in plant most of the downstream regulations occur at the transcriptional level (instead of post-transcriptional level in animals). This difference is indeed not surprising as it is postulated that the large proportion of transcription factors found in plants is an adaptation that has occurred once they have diverge from the other kingdoms in order to rapidly adapt to their fluctuating environment.

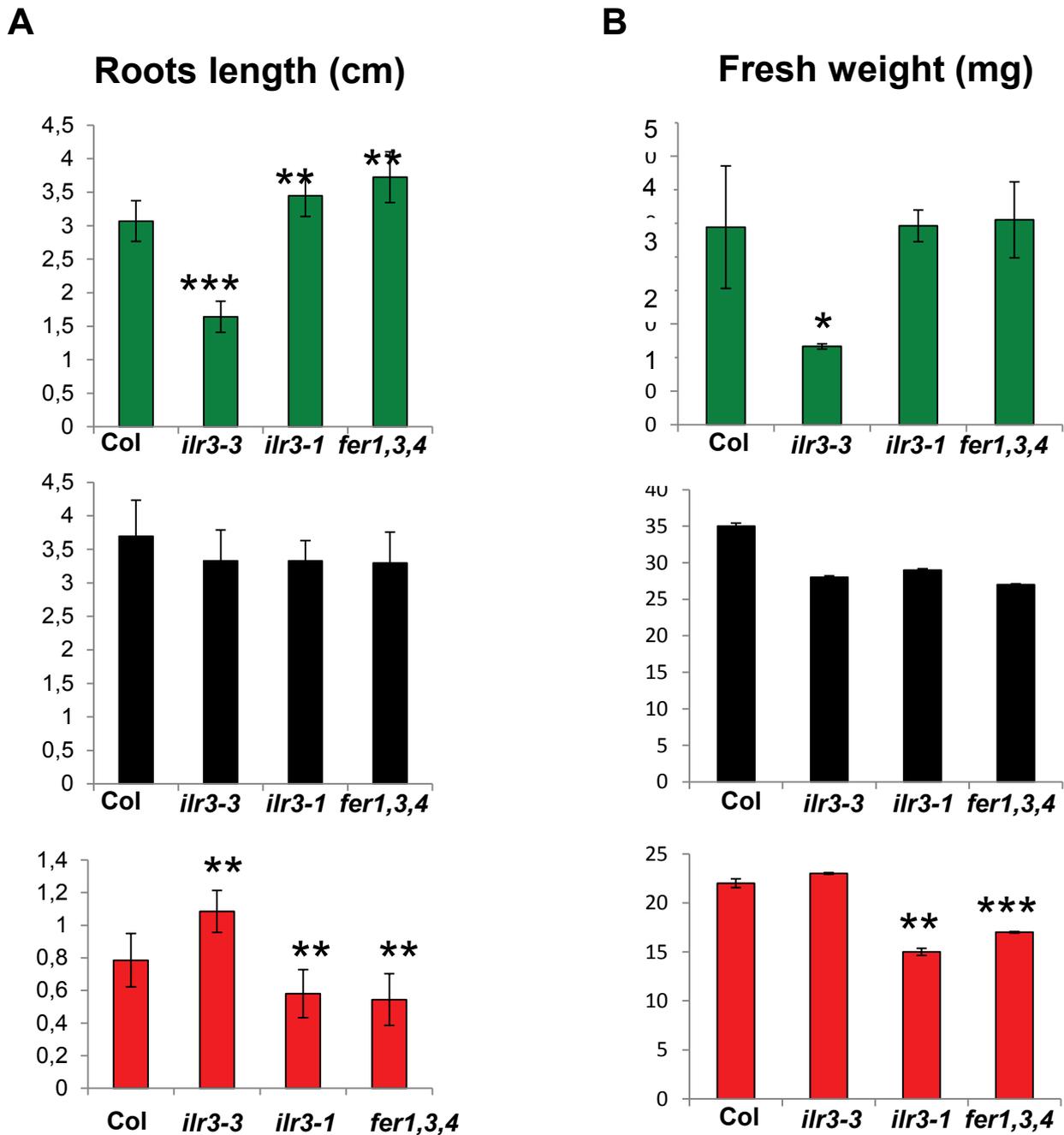


Figure S4 : Fe-dependent control of seedling development by ILR3 involves ferritins activity. (A) Roots length and (B) fresh weight of two weeks old wild type (Wt), *ilr3-1* (ILR3 gain-of-function), *ilr3-3* (ILR3 loss-of-function) and *fer1,3,4* seedlings grown in Fe deficient (-Fe: 0µM; green), sufficient (C: 50µM; black) or excess (+Fe: 500µM; red) conditions. *t*-test significance (compared to Wt): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Error bars show SE.

The tight connection between ILR3 activity and ferritins accumulation (the main marker of the plant responses to Fe excess; Fig. 2) together with the strong similarity of *fer1,3,4* and *ilr3-1* mutant responses to Fe availability (Fig. 3 and 4) suggest that ILR3 integrates, at least partly, Fe signals to adjust plant development in a ferritin-dependent manner. These data strongly suggest that ILR3 function also in coupling chloroplast metabolism and/or development depending on Fe availability, and that NEET and ferritin proteins are essential in this process. In this regard, whether ILR3 acts alone or in concert with downstream (i.e. FIT, Ib clade bHLH, PYE) or additional TFs will need to be further investigated.

Last, one of the key questions that will remain to be elucidated is how ILR3 plays its dual role in regulating the expression of its target genes? It has been clearly demonstrated that ILR3 activates the expression of genes involved in Fe assimilation in response to Fe shortage by forming homo- or hetero-dimers with additional bHLH TFs (e.g. bHLH34 and bHLH104; (18, 35). It can thus be hypothesized that unknown ILR3 partners participating in its transcriptional repressive activity remains to be identified, and the associated molecular mechanism to be characterized.

Material and methods

Plant Materials. *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (col-0) was used as wild type in our experiments. The following mutant lines were used in this study: *bhlh34* (35), *bhlh104-1* (18), *ilr3-1* (36), *ilr3-3* (35), *bhlh115* (Salk_670735) and *fer1,3,4* (38).

Growth Conditions. In vitro culture: plants were grown under long day condition (16h/8h light/dark) on half strength Murashige and Skoog medium (MS/2) with 0.05% MES, 1% Sucrose, 1% agar. Iron (Fe) concentration was 50 μ M and provided as Fe(III)-citrate. Plants were then transferred to liquid MS/2 media for an additional three days of growth in the presence or absence of Fe (50 μ M Fe(III)-citrate). Fe excess treatment was applied by adding 500 μ M Fe-citrate to the growth solution of plants grown in absence of Fe during 6 hours. Hydroponic culture: plants were grown for three weeks under short day condition (8h/16h light/dark) in presence of 50 μ M of Fe-EDTA as described in (43) (Fig. S5A). Plants were then grown for 10 days in the absence of Fe followed by another 10 days of growth

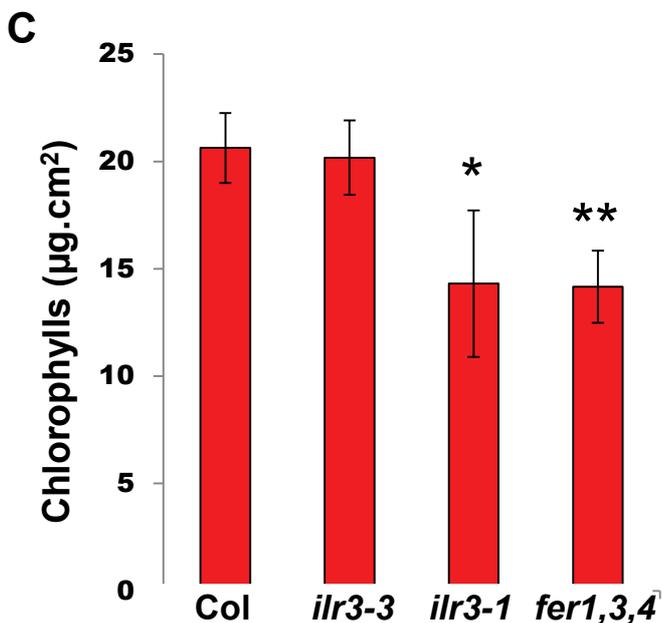
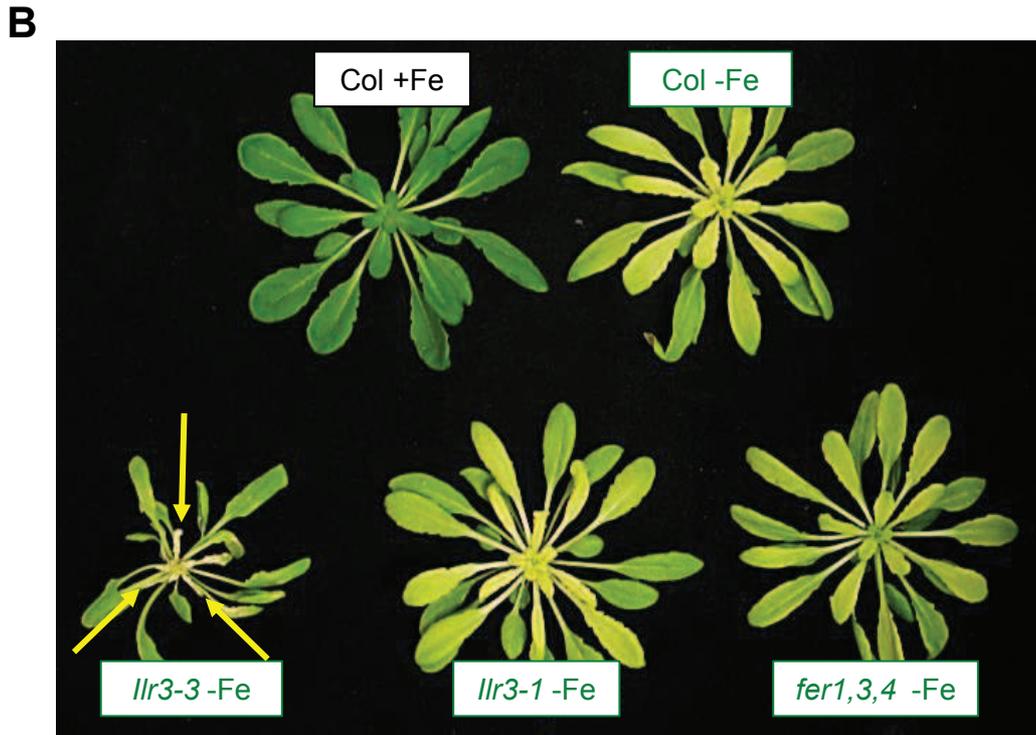
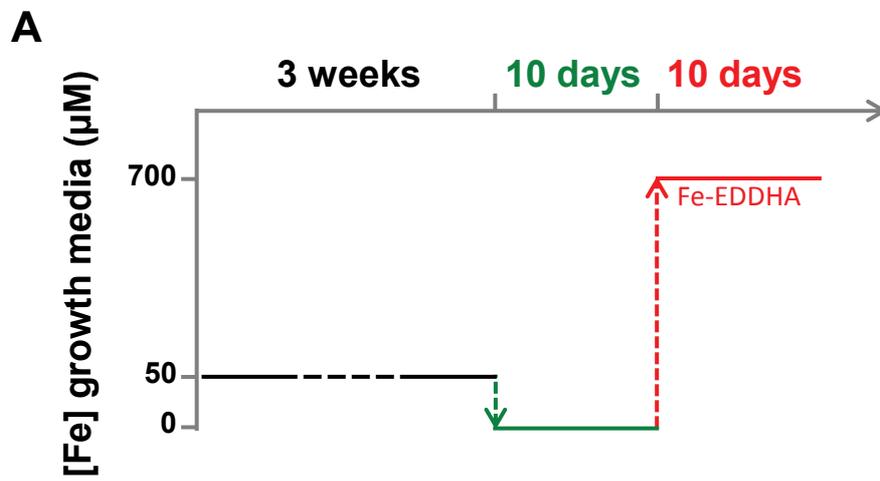


Figure S5 : ILR3 participates to the plant response to Fe excess. (A) Experimental design used to highlight the role that ferritins play in the plant responses to excess Fe, that relies on ILR3 activity (see Fig. 4). (B) Rosette phenotype of wild type (Wt), *ilr3-1* (ILR3 gain-of-function), *ilr3-3* (ILR3 loss-of-function) and *fer1,3,4* after three weeks of growth in Fe replete condition followed by 10 days of Fe deficiency, compare to Wt plant grown in Fe replete condition ($50\mu\text{M}$). (C) Chlorophylls content of young rosette leaves of Wt, *ilr3-1*, *ilr3-3* and *fer1,3,4* plants after 10 days of growth in Fe excess ($700\mu\text{M}$ Fe-EDDHA) following 10 days of Fe deficiency. *t*-test significance (compared to Wt): * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$. Error bars show SE.

under Fe excess condition (700 μ M Fe-EDDHA). Chlorophylls content was quantified according to (44).

Generation of DNA constructs. *AtFER1* promoter (*pAtFER1*) fusion to GUS (pGWB3 binary vector; 45) was carried out as described in (46). *pAtFER1* mutations were obtained by PCR reactions. The same procedure was used to fuse the *ILR3* promoter and genomic region (without stop codon) to the GFP (pGWB4 binary vector; *pILR3::gILR3:GFP*). Following Arabidopsis transformation (Agroinfiltration), 24 independent lines were assayed for GUS activity (for each construct) and 17 for GFP. All the primers used are described in Table S1.

Yeast one-hybrid assays. Experiments were carried out as described in (47). Briefly, tetramers of target *AtFER1* promoter region (containing the *G-box cis*-regulatory sequence) was cloned using the ligation independent cloning system into the pHisi-LIC vector. Following cDNA library screening, interacting proteins were re-cloned and assayed against the target *AtFER1* promoter region that contain or not a mutated *G-box*.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). Experiments were performed as described by (48) with modifications: (i) nuclei were isolated with the following buffer: 20mM PIPES-KOH pH7.6, 1M hexylene glycol, 10mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 15mM NaCl, 60mM KCl, 0.5% Triton X100, 5mM beta-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail (complete tablets EASYpack, Roche), and (ii) after immunoprecipitation using antibodies raised against GFP (Abcam, ab290) DNA was purified with IPURE Kit (Diagenode). Resulting DNA was analyzed by qPCR analysis. All the primers used are described in Table S1.

Gene expression analysis. qRT-PCR and western blot analysis were carried out as described in (28) and (32).

Acknowledgments.

ilr3-1 seeds were kindly provided by Prof. Bonnie Bartel (Rice University, Houston, Texas). N.T. and F.B. were supported by a fellowship from the ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. We thank Drs N. Berger, E. Izquierdo-Alegre and T.C. Xiong for help in preparing this manuscript.

References

1. Li K & Reichmann H (2016) Role of iron in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm (Vienna)* 123(4):389-399.
2. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, & Tsuji Y (2016) Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci* 41(3):274-286.
3. Briat JF, Dubos C, & Gaymard F (2015) Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci* 20(1):33-40.
4. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, & Camaschella C (2010) Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142(1):24-38.
5. Ganz T & Nemeth E (2016) Iron Balance and the Role of Heparin in Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol* 36(2):87-93.
6. Salahudeen AA, *et al.* (2009) An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science* 326(5953):722-726.
7. Thompson JW & Bruick RK (2012) Protein degradation and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823(9):1484-1490.
8. Arnaud N, *et al.* (2007) The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)-cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochem J* 405(3):523-531.
9. Grusak MA & Pezeshgi S (1996) Shoot-to-Root Signal Transmission Regulates Root Fe(III) Reductase Activity in the *dgl* Mutant of Pea. *Plant Physiol* 110(1):329-334.
10. Vert GA, Briat JF, & Curie C (2003) Dual regulation of the Arabidopsis high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol* 132(2):796-804.
11. Brumbarova T, Bauer P, & Ivanov R (2015) Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. *Trends Plant Sci* 20(2):124-133.
12. Kobayashi T & Nishizawa NK (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 63:131-152.
13. Morrissey J & Guerinot ML (2009) Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem Rev* 109(10):4553-4567.
14. Colangelo EP & Guerinot ML (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* 16(12):3400-3412.

15. Wang HY, *et al.* (2007) Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 226(4):897-908.
16. Wang N, *et al.* (2013) Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 6(2):503-513.
17. Yuan Y, *et al.* (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell Res* 18(3):385-397.
18. Zhang J, *et al.* (2015) The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27(3):787-805.
19. Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, & Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397(6721):694-697.
20. Santi S & Schmidt W (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol* 183(4):1072-1084.
21. Vert G, *et al.* (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14(6):1223-1233.
22. Palmer CM, Hindt MN, Schmidt H, Clemens S, & Guerinot ML (2013) MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet* 9(11):e1003953.
23. Klatte M, *et al.* (2009) The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. *Plant Physiol* 150(1):257-271.
24. Long TA, *et al.* (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 22(7):2219-2236.
25. Selote D, Samira R, Matthiadis A, Gillikin JW, & Long TA (2015) Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Physiol* 167(1):273-286.
26. Matthiadis A & Long TA (2016) Further insight into BRUTUS domain composition and functionality. *Plant Signal Behav*:0.
27. Kobayashi T, *et al.* (2013) Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat Commun* 4:2792.
28. Bournier M, *et al.* (2013) *Arabidopsis* ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J Biol Chem* 288(31):22670-22680.

29. Briat JF, Duc C, Ravet K, & Gaymard F (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta* 1800(8):806-814.
30. Duc C, Cellier F, Lobreaux S, Briat JF, & Gaymard F (2009) Regulation of iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by the clock regulator time for coffee. *J Biol Chem* 284(52):36271-36281.
31. Petit JM, van Wuytswinkel O, Briat JF, & Lobreaux S (2001) Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of AtFer1 and ZmFer1 plant ferritin genes by iron. *J Biol Chem* 276(8):5584-5590.
32. Reyt G, Boudouf S, Boucherez J, Gaymard F, & Briat JF (2015) Iron- and ferritin-dependent reactive oxygen species distribution: impact on *Arabidopsis* root system architecture. *Mol Plant* 8(3):439-453.
33. Strozycki PM, Szymanski M, Szczurek A, Barciszewski J, & Figlerowicz M (2010) A new family of ferritin genes from *Lupinus luteus*--comparative analysis of plant ferritins, their gene structure, and evolution. *Mol Biol Evol* 27(1):91-101.
34. Heim MA, *et al.* (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* 20(5):735-747.
35. Li X, Zhang H, Ai Q, Liang G, & Yu D (2016) Two bHLH Transcription Factors, bHLH34 and bHLH104, Regulate Iron Homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 170(4):2478-2493.
36. Rampey RA, *et al.* (2006) An *Arabidopsis* basic helix-loop-helix leucine zipper protein modulates metal homeostasis and auxin conjugate responsiveness. *Genetics* 174(4):1841-1857.
37. Fourcroy P, Vansuyt G, Kushnir S, Inze D, & Briat JF (2004) Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the APX1 gene in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 134(2):605-613.
38. Ravet K, *et al.* (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 57(3):400-412.
39. Gollhofer J, Schlawicke C, Jungnick N, Schmidt W, & Buckhout TJ (2011) Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 49(5):557-564.
40. Gollhofer J, Timofeev R, Lan P, Schmidt W, & Buckhout TJ (2014) Vacuolar-Iron-Transporter1-Like proteins mediate iron homeostasis in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9(10):e110468.

41. Nechushtai R, *et al.* (2012) Characterization of Arabidopsis NEET reveals an ancient role for NEET proteins in iron metabolism. *Plant Cell* 24(5):2139-2154.
42. Aparicio F & Pallas V (2016) The coat protein of Alfalfa mosaic virus interacts and interferes with the transcriptional activity of the bHLH transcription factor ILR3 promoting salicylic-dependent defense signaling response. *Mol Plant Pathol.*
43. Fourcroy P, Tissot N, Gaymard F, Briat JF, & Dubos C (2016) Facilitated Fe Nutrition by Phenolic Compounds Excreted by the Arabidopsis ABCG37/PDR9 Transporter Requires the IRT1/FRO2 High-Affinity Root Fe(2+) Transport System. *Mol Plant* 9(3):485-488.
44. Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant. Physiol* 144:307-313.
45. Nakagawa T, *et al.* (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104(1):34-41.
46. Xu W, *et al.* (2013) Regulation of flavonoid biosynthesis involves an unexpected complex transcriptional regulation of TT8 expression, in Arabidopsis. *New Phytol* 198(1):59-70.
47. Kelemen Z, *et al.* (2015) Analysis of the DNA-Binding Activities of the Arabidopsis R2R3-MYB Transcription Factor Family by One-Hybrid Experiments in Yeast. *PLoS One* 10(10):e0141044.
48. Gendrel AV, Lippman Z, Yordan C, Colot V, & Martienssen RA (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1. *Science* 297(5588):1871-1873.

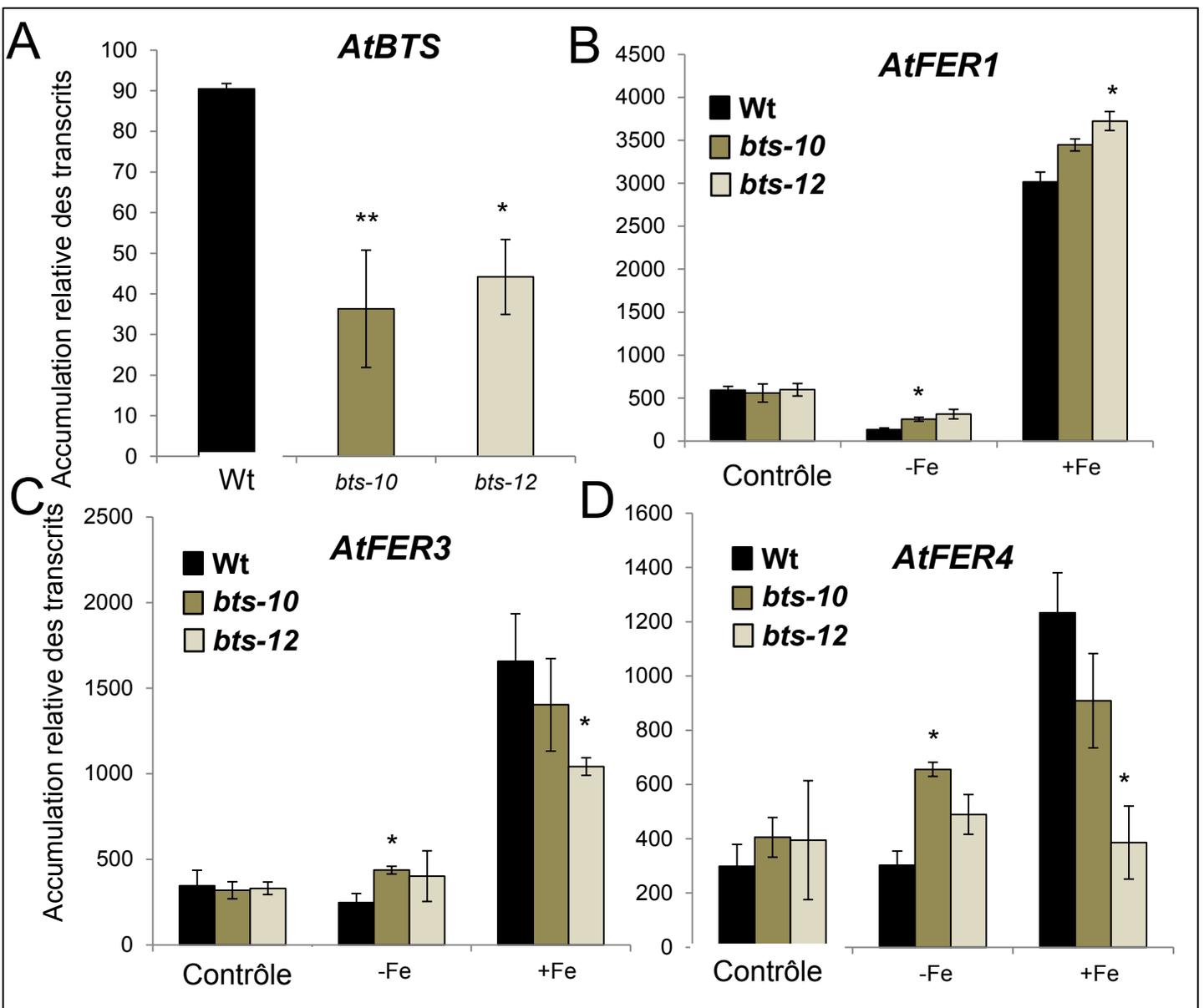


Figure 28 : BRUTUS (BTS) n'a pas d'impact direct sur la régulation de l'expression d'*AtFER1*.

Des plantules sauvages Col-0 (Wt) ou mutantes pour BTS (*bts-10* et *bts-12*) ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2 puis ont été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours (-Fe) ou sont restées en condition optimale de cultures (50 μ M Fe ; Contrôle). A la suite des 3 jours de carence, une partie des plantes a subi un excès de fer (500 μ M) pendant 6 heures (+Fe). L'accumulation des ARNm de *BRUTUS* est présentée en condition contrôle (A). L'accumulation des transcrits d'*AtFER1*, *AtFER3* et *AtFER4* sont représentée dans les 3 conditions de cultures (B, C, et D respectivement). Les différences significatives par rapport au sauvage ont été déterminée par un test de Student (* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$).

2.2 Résultats complémentaires.

2.2.1 Rôle de BRUTUS dans la régulation de l'expression des ferritines.

BRUTUS (protéine de type F-box) est un régulateur important de la nutrition ferrique car il est responsable de la dégradation (*via* le protéasome 26S) de facteurs de transcription clés impliqués dans le contrôle de l'homéostasie du fer. Il dégrade notamment ILR3/bHLH105 qui, comme nous l'avons vu précédemment, lui-même module l'expression des gènes de ferritines. Afin de caractériser le rôle de BTS sur le contrôle de la régulation transcriptionnelle des ferritines, la quantification des transcrits d'*AtFER1*, *AtFER3* et *AtFER4* en réponse à différents stress ferriques chez les mutants *bts* a été mise en place. Les mutants *bts-10* et *bts-12*, qui présentent une accumulation de transcrits *BTS* diminuée par rapport au sauvage (lignée « knock down ») ont été étudiés (Fig. 28A). Lorsque l'on s'intéresse à l'accumulation des messagers d'*AtFER1*, *AtFER3* et *AtFER4* en condition contrôle (50µM Fe ; Fig. 28B, C, D), on constate qu'il n'y a pas de différence entre le sauvage et les lignées mutantes. En carence en fer, on observe une suraccumulation des transcrits de ferritines dans les mutants *bts* par rapport aux plantes sauvages (Fig. 28B, C, D). En condition d'excès de fer, les messagers d'*AtFER1* semblent être suraccumulés dans les mutant *bts* alors que les transcrits d'*AtFER3* et *AtFER4* sont sous-accumulés dans cette même condition (Fig. 28B, C, D). Ces résultats semblent indiquer qu'une altération de l'activité de BTS impacte l'accumulation des ARNm des gènes de ferritines.

2.2.2 ILR3 intègre *via* des régulations transcriptionnelles la répartition intracellulaire du fer.

Le facteur de transcription ILR3 a un rôle central à la fois dans l'induction transcriptionnelle des acteurs permettant le prélèvement du fer et dans l'inhibition transcriptionnelle des gènes de ferritines. Il a aussi été suggéré que ILR3 avait un rôle dans la répartition intracellulaire du fer en modulant l'expression de *AtNEET* ou des *AtVTLs* (*VACUOLAR IRON TRANSPORTER-LIKE* ; Rampey *et al.*, 2006). Dans le but de confirmer cette hypothèse, les transcrits de ces deux gènes ont été quantifiés en fonction de différentes concentrations en fer dans le milieu (Fig. 29). Tout d'abord, j'ai observé que le mutant *ilr3-1* (gain de fonction) présente une sous-accumulation des transcrits de *AtNEET* dans les trois conditions de cultures (contrôle, carence et excès). Dans le mutant *ilr3-3* (perte de fonction) les messagers sont sous-accumulés en carence et en excès de fer. Ils ont un profil semblable au sauvage en condition contrôle (Fig.29). En ce qui concerne l'accumulation des transcrits

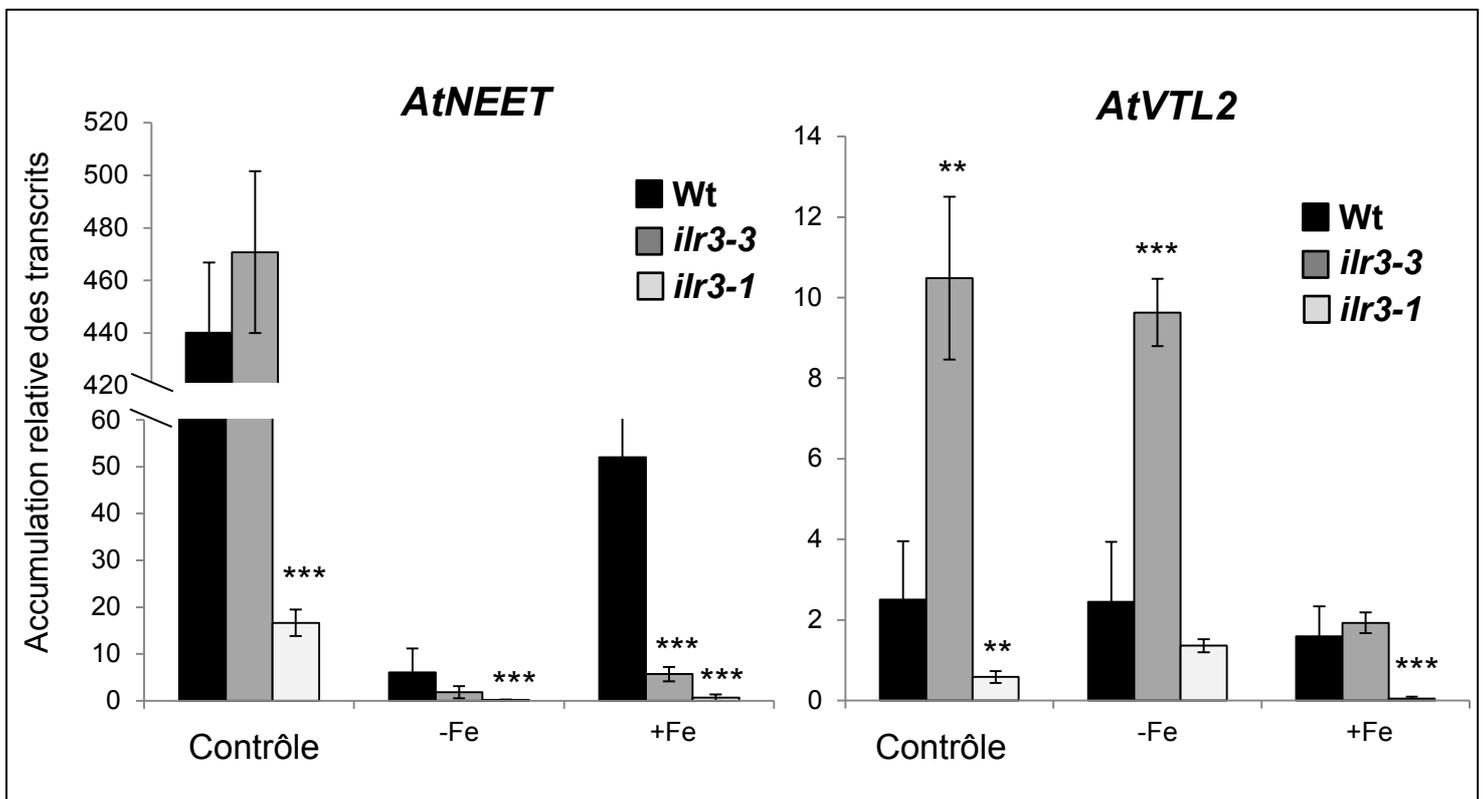


Figure 29 : ILR3 semble contrôler la répartition intracellulaire du fer.

Des plantules sauvages Col-0 (Wt) ou mutantes *ilr3-3* (perte de fonction) ou *ilr3-1* (gain de fonction) ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2 puis ont été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours (-Fe) ou sont restées en condition optimale de cultures (50µM Fe ; Contrôle). A la suite des 3 jours de carence une partie des plantes a subi un excès de fer (500µM) pendant 6 heures (+Fe). L'accumulation des ARNm de *AtNEET* et *VTL2* est présentée dans les 3 conditions de cultures. Les différences significatives par rapport au sauvage ont été déterminées par un test de Student (**= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$.)

d'*AtVTL2* chez les mutants perte et gain de fonction de ILR3, elle est très semblable à celle des messagers de ferritines. En effet, en condition contrôle une suraccumulation chez *ilr3-3* et une sous-accumulation chez *ilr3-1* sont observées (Fig. 29). Ce profil de quantité de transcrits est conservé en carence et en excès de fer. Ces résultats confirment bien que ILR3 pourrait réguler l'expression d'*AtNEET* et des *VTLs* en fonction de la disponibilité en fer dans le milieu. ILR3 serait donc capable à la fois d'induire l'expression d'*AtNEET* et d'inhiber celle des *VTLs*, directement ou indirectement.

2.2.3 ILR3 interagit directement avec les promoteurs de ses gènes cibles.

ILR3 se place comme un régulateur central de l'homéostasie du fer. Dans le but de comprendre si l'ensemble des régulations transcriptionnelles identifiées était directe ou non, des expériences de CHIP-qPCR ont été mises en place en utilisant deux lignées transgéniques *proILR3::gILR3-GFP* (le locus complet de ILR3 fusionné à la GFP) (Fig.30). Les régions promotrices analysées possèdent toutes au moins une *E-box*, canonique ou non (Fig. 30A). Comme présentée dans l'article (cf. § 2.1), lorsque l'on utilise l'anticorps anti GFP, la région promotrice de *bHLH39* est bien enrichie et celle de *FIT* ne l'est pas, ce qui confirme les résultats déjà publiés par Zhang *et al.*, 2015 (Fig. 30B). En ce qui concerne les promoteurs d'*AtFER1*, d'*AtFER3* et d'*AtFER4*, un enrichissement est aussi observé pour les deux lignées transgéniques (Fig. 30C). De plus, un enrichissement plus important est constaté dans les régions en 5' contenant une *G-box* ce qui renforce le fait qu'ILR3 serait localisé aux locus (Fig. 30C). Ces observations renforcent l'idée que ILR3 réprime directement l'expression de ces trois gènes de ferritines.

Dans le but de déterminer si, comme pour les gènes de ferritines, *AtNEET* et les trois *VTLs* sont directement régulés par ILR3, l'enrichissement des régions promotrices de ces gènes a été quantifié par la même approche (Fig. 30D). Une suraccumulation des régions promotrices de *AtNEET* et de *VTL1* a été observée. En ce qui concerne les promoteurs de *VTL2* et *VTL5*, l'enrichissement est moins important que pour les autres gènes testé. Ces données permettent de mettre en évidence qu'ILR3 interagit *in planta* avec les promoteurs de *AtNEET* et des trois *VTL* (avec une présence plus forte pour *VTL1*).

L'ensemble de ces observations met en évidence qu'ILR3 est bien central dans la régulation de l'homéostasie du fer (interaction directe avec les promoteurs de ses gènes cibles, qu'ils soient impliqués dans la réponse à la carence ou à l'excès de fer).

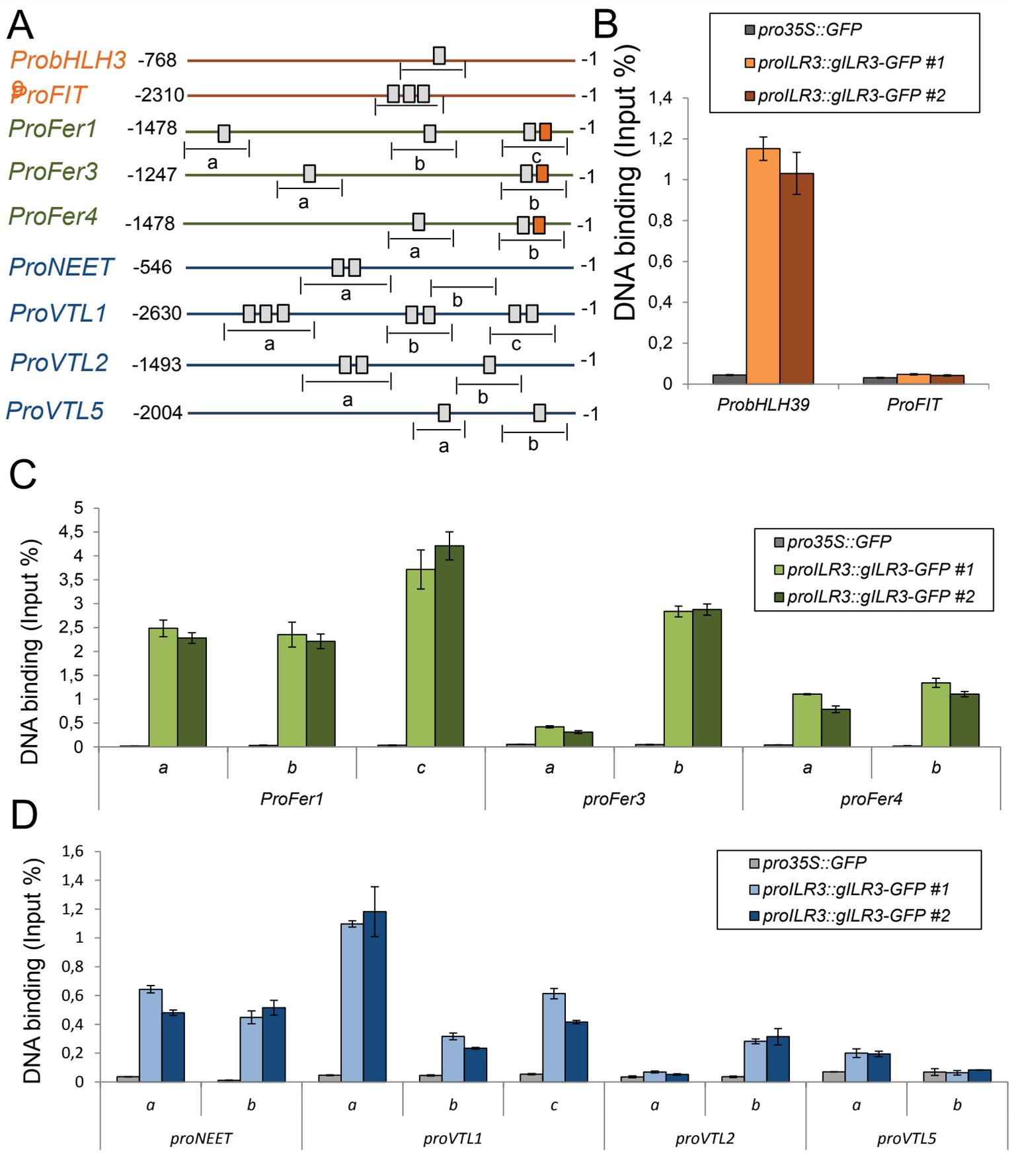


Figure 30 : ILR3 interagit directement avec les promoteurs de ses gènes cibles. Des plantes transgéniques de deux semaines exprimant *pILR3::gILR3:GFP* (2 lignées indépendantes) et *p35S::GFP* (contrôle négatif) ont été analysées par ChIP-qPCR. Représentation schématisées des régions promotrices ciblées dans cette expérience (A). Les carrés gris représentent les *E-box* non canoniques (*CANNTG*) et les carrés oranges des *G-box* (*CACGTG*). L'enrichissement des séquences promotrices est présenté pour *FIT* (Contrôle négatif), *bHLH39* (contrôle positif; B), les trois gènes de ferritines (C) et pour *NEET*, *VTL1*, *VTL2*, et *VTL5* (D).

2.2.4 ILR3 et POPEYE/bHLH47 agissent-ils sous forme d'hétéro-dimères?

ILR3 a largement été décrit comme un inducteur transcriptionnel des voies de réponse à la carence en fer (Zhang *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2016). De ce point de vue, il est probable que l'activité inhibitrice d'ILR3 (qui ne possède pas de domaine de répression de la transcription connu) puisse être conférée par un autre facteur qui interagirait physiquement avec lui. Dans ce contexte, il est possible que POPEYE (PYE) soit cet acteur. En effet, PYE a déjà été identifié comme interagissant avec ILR3 et a été décrit comme un inhibiteur de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (e.g. *NAS4*) (Long *et al.*, 2010).

Dans le but d'évaluer la pertinence de cette hypothèse, des expériences de quantification de transcrits ont été mises en place en fonction de différents traitements au fer. J'ai ainsi pu observer que les messagers d'*AtFER1* sont suraccumulés dans les mutants *pye-1* en carence et en excès de fer, mais ne présentent pas de différence en condition contrôle (Fig. 31A). Cette quantification confirme les données de la littérature. Lorsque l'on s'intéresse cette fois à l'accumulation des transcrits d'*AtNEET* et d'*AtVTL2* dans *pye-1*, on constate une suraccumulation en condition contrôle et de carence en fer, alors qu'aucune différence n'est observée en excès (Fig. 31B et C). Alors que l'expression d'*AtFER1* est induite en réponse à un excès de fer, celle de *AtNEET* et *AtVTL2* est induite en réponse à une carence. Pourtant leurs transcrits sont tous suraccumulés dans *pye-1*, ce qui indique que PYE agit essentiellement comme un répresseur transcriptionnel.

Ces données confirment que PYE pourrait être l'inhibiteur transcriptionnel des cibles d'ILR3. Ainsi des complexes ILR3/PYE inhiberaient l'expression d'un groupe de gènes, très probablement associés à la compartimentation intracellulaire du fer, afin de moduler l'homéostasie de ce dernier.

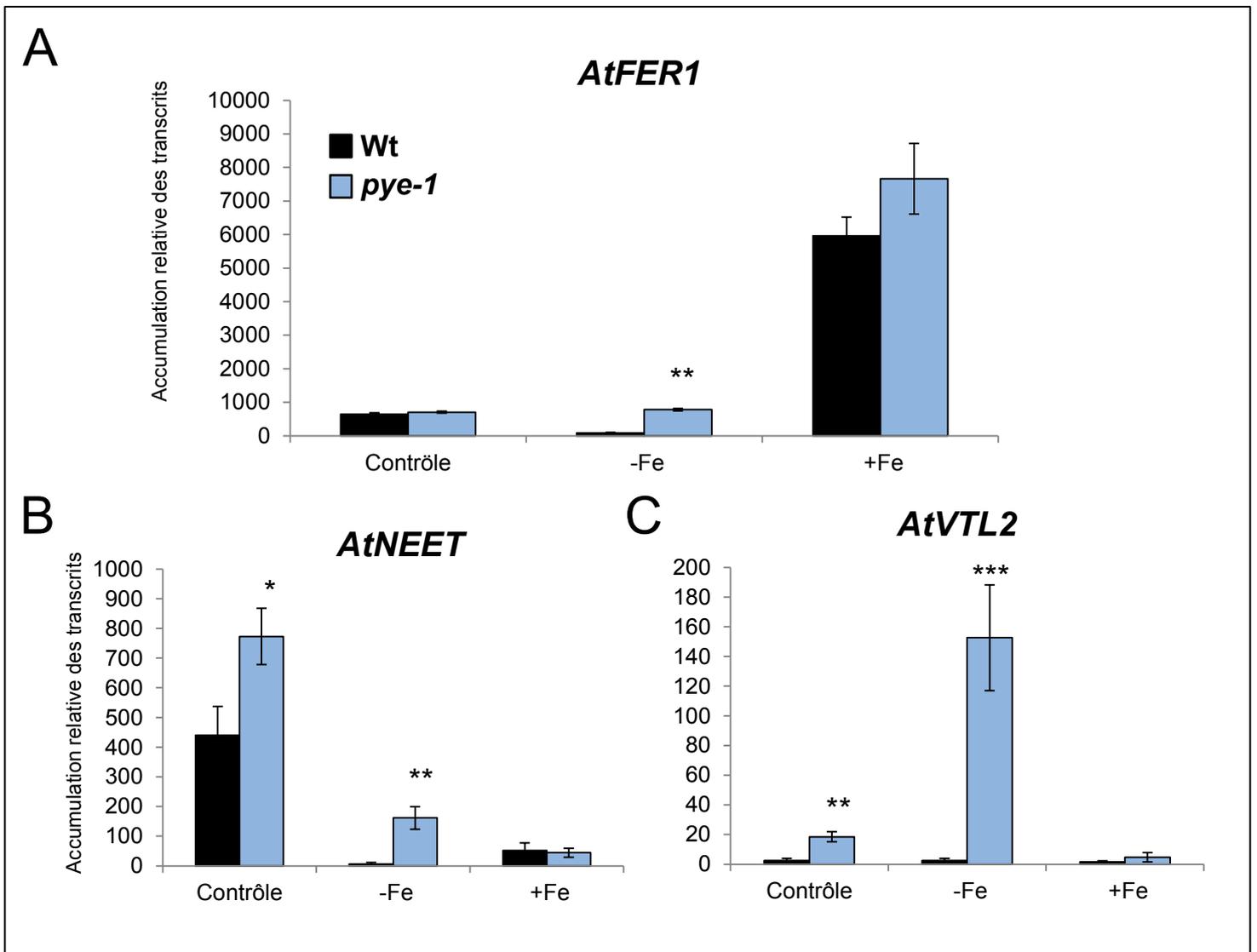


Figure 31 : PYE et ILR3 semblent réprimer l'expression de gènes cibles communs.

Des plantules sauvages Col-0 (Wt) et mutantes *pye-1* ont été cultivées durant 10 jours sur milieu MS/2 puis ont été transférées dans un milieu carencé en fer durant 3 jours (-Fe) ou sont restées en condition optimale de cultures (50μM Fe ; Contrôle). A la suite des 3 jours de carence une partie des plantes a subi un excès de fer (500μM) pendant 6 heures (+Fe). L'accumulation des ARNm de *AtFER1* (A) *NEET* (B) et *VTL2* (C) est présentée dans les 3 conditions de cultures. Les différences significatives par rapport au sauvage ont été déterminées par un test de Student (*= $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$).

3. Discussion

Dans cette étude, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires qui contrôlent l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis*. Le but initial était de mettre en évidence comment ILR3/bHLH105 régulait transcriptionnellement l'expression d'*AtFER1*. En effet, ce facteur a été identifié comme interagissant potentiellement avec une région du promoteur d'*AtFER1* (Fig.1, Article). Ce facteur connu pour induire les mécanismes de réponse à la carence en fer, du fait de sa capacité à potentiellement moduler l'expression d'*AtFER1*, se présentait comme étant l'intégrateur de l'homéostasie du fer chez les plantes. Afin de valider cette hypothèse, j'ai mis en place une caractérisation fonctionnelle de mutants perte et gain de fonction pour *ILR3* en fonction de différents traitements ferriques. J'ai observé que les mutants *ilr3-3* (perte de fonction) présentaient une suraccumulation des transcrits d'*AtFER1* et des autres gènes de ferritines en conditions contrôle, carence et excès de fer (Fig.2 et S2, Article). Un profil inverse a été constaté chez le mutant gain de fonction *ilr3-1*. De façon intéressante, ILR3 semble être le seul bHLH du sous-groupe IVc à avoir un impact sur l'expression des ferritines (Fig. S3, Article). Par la suite, j'ai mis en évidence que le mutant *ilr3-1* présentait le même phénotype que le mutant *fer1,3,4* en excès de fer ou en réponse à un stress ferrique ponctuel (Fig. 3 et 4, Article). L'ensemble de ces données expérimentales m'a permis de proposer un modèle de régulation transcriptionnelle pour le contrôle de l'homéostasie du fer qui place ILR3 au centre de ce réseau.

D'une part, j'ai cherché à évaluer si d'autres acteurs de la réponse à la carence en fer étaient impliqués dans cette régulation. J'ai démontré que BRUTUS n'avait pas de rôle marqué sur la régulation transcriptionnelle des gènes de ferritines (Fig. 28). Par ailleurs, les données indiquent que le faible rôle inhibiteur de BTS sur les ferritines en carence en fer n'était probablement pas du à ILR3. En effet, le profil d'accumulation des transcrits des gènes de ferritines chez *bts* n'est pas le même que celui retrouvé pour les mutants de *ILR3*. D'autre part, j'ai mis en évidence que ILR3 étaient bien un régulateur central de l'homéostasie du fer, jouant un rôle particulier sur l'expression de gènes impliqués dans la compartimentation cellulaire du fer ou la balance du fer chloroplastique (Fig. 29). Par des expériences de ChIP-qPCR j'ai pu établir que les interactions entre ILR3 et les promoteurs des gènes cibles étaient directes (Fig. 30). L'ensemble de mes données expérimentales placent ILR3 comme un inhibiteur transcriptionnel de certains gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie du fer. Ce facteur avait été très largement caractérisé comme étant un inducteur de l'expression de ces gènes cibles (Zhang *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2016), ce qui supposait qu'un partenaire

PERCEPTION

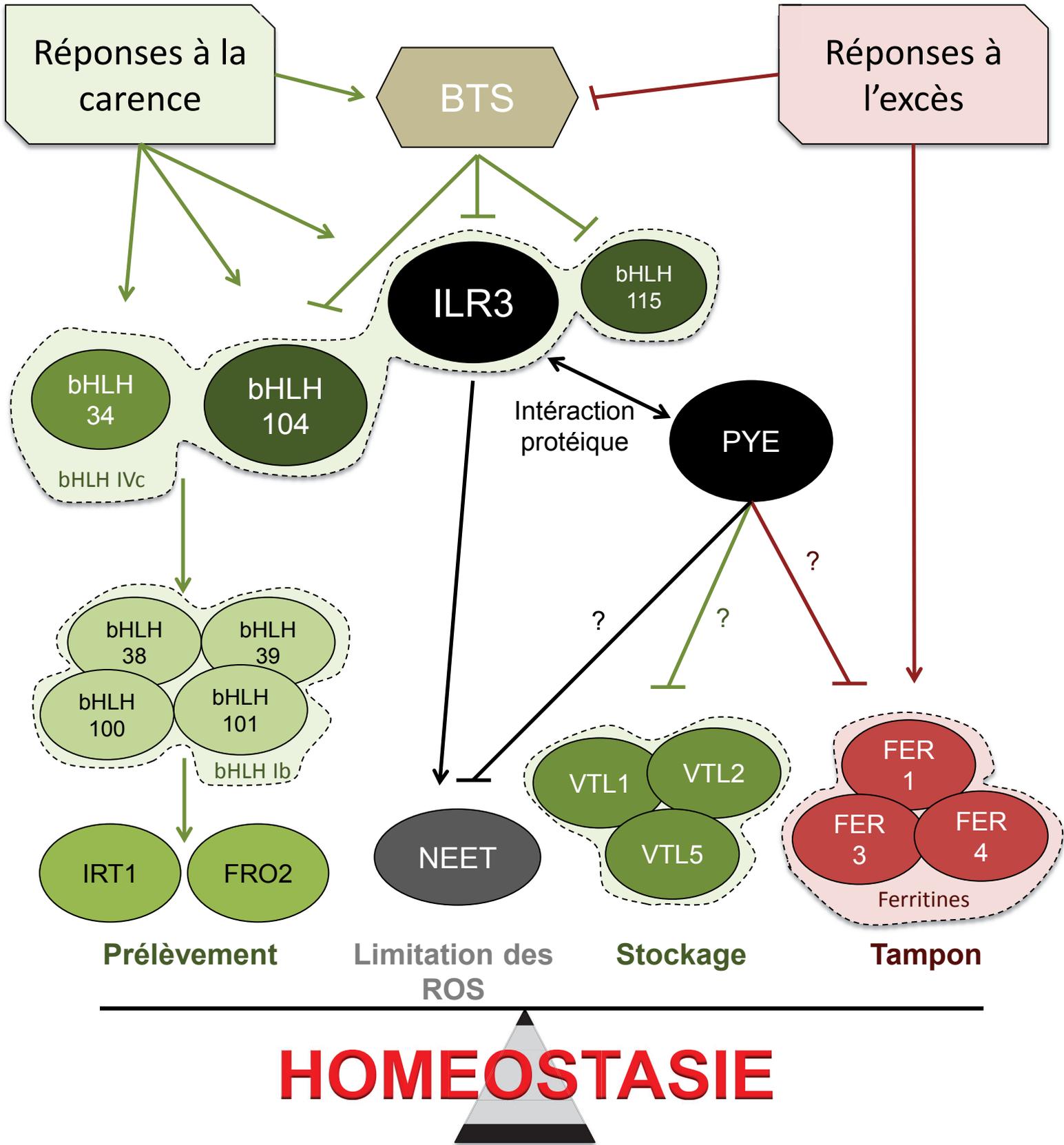


Figure 32 : Représentation schématique de la régulation de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis*.

BTS, ILR3 et PYE se présente comme centraux dans le maintien de l'homéostasie du fer. Ils sont tous les trois avec bHLH34 et bHLH104 (sous-groupe IVc) induit en réponse à la carence en fer. Tous excepté BTS modulent transcriptionnellement leurs cibles. ILR3 interagit avec les autres bHLH du sous-groupe IVc afin d'induire les bHLH du sous groupe Ib qui vont eux même induire transcriptionnellement *IRT1* et *FRO2* pour le prélèvement du fer dans le milieu. ILR3 interagit physiquement avec PYE et cette interaction pourrait mener à l'inhibition de l'expression de *NEET*, des *VTLs* et des ferritines. ILR3 seul pourrait induire l'expression de *NEET* et ainsi moduler l'équilibre en fer chloroplastique. En modulant le prélèvement, la production de ROS, et le stockage/tampon du fer, ILR3 se place comme le régulateur central pour le maintien de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*.

protéique, inhibiteur, interagissait avec ILR3 pour lui conférer cette fonction. Parmi les protéines connues pour interagir avec ILR3, PYE se présentait comme étant le candidat le plus vraisemblable. En effet, l'ensemble des gènes cibles d'ILR3 sont surexprimés dans le mutant *pye* (Fig. 31). Toutefois, l'implication directe de PYE dans ces régulations reste à être établie. Sur la base de mes résultats complémentaires, j'ai pu mettre en place un nouveau modèle de régulation transcriptionnelle de l'homéostasie fer chez *Arabidopsis* (Fig. 32).

3.1 L'homéostasie du fer chez *Arabidopsis* est régulée transcriptionnellement.

Comme cela a été abordé dans l'article soumis pour publication (Cf. §2.1), l'homéostasie du fer est régulée post-transcriptionnellement chez les animaux alors qu'elle est majoritairement transcriptionnelle chez les végétaux. Les deux voies, bien que très diverses sont toutes les deux intégrées par une protéine, senseur direct du fer de type E3-ligase : FBXL5/BTS (Salahudeen *et al.*, 2009 ; Selote *et al.*, 2015). Les différences dans les mécanismes de régulation moléculaire situés en aval de FBXL5/BTS peuvent s'expliquer par le fait que les animaux peuvent moduler leur alimentation alors que les plantes doivent s'adapter à leur environnement afin de s'y développer. Chez *Arabidopsis*, la façon dont BTS dégrade ses cibles (les PYE-LIKEs) n'est pas parfaitement comprise. En effet, cette protéine inhibitrice est clivée en présence de fer mais reste active en absence de fer (Selote *et al.*, 2015). Or, c'est dans cette situation que ses cibles sont exprimées et viennent induire le prélèvement du fer (Fig. 32). Ce constat implique que le rôle de BTS est très dynamique et probablement complémentaire des inductions transcriptionnelles. Il est probable que BTS inhibe certaines cibles dans le but de les empêcher de se dimériser avec d'autres protéines. Pour vérifier cette hypothèse, une série d'immunoprécipitations dans différentes configurations de stress ferrique serait envisageable. Ainsi, on pourrait identifier si en carence, BTS dégrade plus fortement bLH115 pour permettre au bHLH104 de se dimériser avec ILR3 afin d'induire la réponse moléculaire à la carence (Fig. 32). Le bHLH34 non ciblé par BTS pourrait également intervenir dans cette induction mais plus ponctuellement, et avec un moindre effet sur l'expression des gènes cibles (Li *et al.*, 2016). Une fois le fer prélevé, BTS pourrait mener à la dégradation de bHLH104 pour laisser ILR3 libre d'interagir avec PYE. Ce complexe pourrait alors réprimer transcriptionnellement les *AtFERS* ou les *VTLs* afin de laisser le fer disponible au fonctionnement de la cellule. PYE est également induit fortement par la carence en fer et dégradé par BTS (Selote *et al.*, 2015). Dans un troisième temps, le fer libre en excès serait reconnu par les domaines HHE et mènerait à la dégradation de BTS. D'autre part, le fer induirait à son tour transcriptionnellement les ferritines par la voie

dépendante de l'*IDRS* et le dimère ILR3/PYE serait dégradé peu à peu afin de laisser progressivement les mécanismes de stockage s'instaurer. Cette voie de régulation reste hypothétique mais renforcerait l'idée que les inductions transcriptionnelles prédominent sur les autres types de régulations impliquées dans le maintien de l'homéostasie du fer chez les plantes.

3.2 Le chloroplaste comme organite central de l'homéostasie du fer.

ILR3, et probablement PYE, réguleraient ensemble l'expression de *AtNEET* et des ferritines, un ensemble de gènes dont les protéines ont une fonction considérable dans le chloroplaste. De façon intéressante, ILR3 induit *AtNEET* alors qu'il est responsable de la répression des ferritines. Mes données sont bien corrélées avec celles de la littérature. En effet, les mutant *ilr3-3* présentent une sous-accumulation des protéines AtNEET et une plus grande concentration d' H_2O_2 (Aparicio et Pallas, 2016). Ainsi AtNEET permettrait de limiter les ROS chloroplastiques *via* sa fonction dans le transfert des clusters [Fe-S] à d'autres protéines (Nechushtai *et al.*, 2012). Il est probable encore une fois que le rôle d'ILR3 sur ses cibles chloroplastiques se déroule en plusieurs temps. Lorsqu'ILR3 mène son rôle d'inducteur transcriptionnel en permettant le prélèvement du fer, il génère potentiellement la néosynthèse de AtNEET afin de permettre au chloroplaste d'utiliser le fer disponible de façon efficiente. Dans le même temps, ILR3 viendrait avec son partenaire inhiber les ferritines afin de ne pas piéger le fer dans cet organite. Après cette étape, et afin que le fer ne génère pas de ROS, les ferritines seraient dé-réprimées et stabiliseraient l'homéostasie chloroplastique. En parallèle à l'induction des ferritines, il est possible que le fer soit excrété du chloroplaste vers le cytoplasme par les YSL4 et 6 (YELLOW STRIPE1-LIKE 4 et 6), eux même induits par l'excès de fer (Divol *et al.*, 2013). De façon intéressante, les mécanismes qui inhibent ou induisent transcriptionnellement les *YSLs* ne sont pas les mêmes que pour les ferritines. En effet pour leur inhibition, ces gènes ne sont pas des cibles directes d'ILR3 (données non présentées de ChIP-qPCR), et, aucune séquence *IDRS* n'a été identifiée dans leurs promoteurs pour leur induction transcriptionnelle.

Par ailleurs, en lien avec les chloroplastes et le maintien de l'homéostasie du fer, le jasmonate (JA) se place comme un signal hormonal central. En effet, des études ont clairement démontré l'implication du JA dans l'homéostasie du fer. Par exemple, dans leurs travaux en lien avec un stress biotique (Alfalfa mosaic virus), Aparicio et Pallas (2016) démontrent que ILR3 est un inhibiteur de la voie de biosynthèse des JA. Par ailleurs, il a été démontré que le JA était un inhibiteur de l'expression d'*IRT1* et de *FRO2* indépendant de FIT

(Maurer *et al.*, 2011). Ainsi ILR3 pourrait d'une façon non encore caractérisée, inhiber la synthèse de JA et induire le prélèvement du fer. Plus récemment, il a été démontré que les JAs avaient un rôle positif dans la réponse précoce à la carence en fer chez le riz (Kobayashi *et al.*, 2016). Alors qu'HRZ (ORYZA SATIVA HAEMERYTHRIN MOTIF-CONTAINING REALLY INTERESTING NEW GENE (RING)- AND ZINC-FINGER PROTEIN ; l'orthologue de BTS) inhiberait la synthèse de JAs lors d'une réponse précoce à la carence en fer, les facteurs de transcription IDEFs (IDE-BINDING FACTOR) qui sont des cibles de HRZ, seraient induits par les JA et viendraient induire les gènes de la réponse à la carence au fer (Kobayashi *et al.*, 2016). Sans savoir si ce mécanisme est conservé chez *Arabidopsis*, ces données montrent encore une fois l'aspect très dynamique des réponses à la carence en fer et confirment l'importance des JAs dans cette voie. Une autre étude menée par Manzano *et al.*, (2016) met encore une fois en lumière une corrélation entre les JAs et l'homéostasie du fer. Ils ont montré que la FPS (FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE), enzyme impliquée dans la synthèse des stérols dans le cytoplasme serait impliquée dans le contrôle de la viabilité des chloroplastes. En effet, il a été observé une dégradation des chloroplastes chez des plantes sous-exprimant les *FPSs*. Une approche transcriptomique chez ces plantes a démontré une forte augmentation de l'accumulation des transcrits des gènes impliqués dans la synthèse des JAs (Manzano *et al.*, 2016). En parallèle, ce transcriptome a également mis en évidence que les gènes de réponse à la carence en fer étaient induits alors que *AtFER1*, *AtFER4*, *NEET* et *VTL5* étaient eux réprimés. L'ensemble de ces données renforce l'idée que le chloroplaste *via* les JAs serait l'organe siège pour la perception et la nutrition en fer de la plante.

**Chapitre III : La régulation
potentielle d'un long ARN
non codant sur *AtFER1*.**

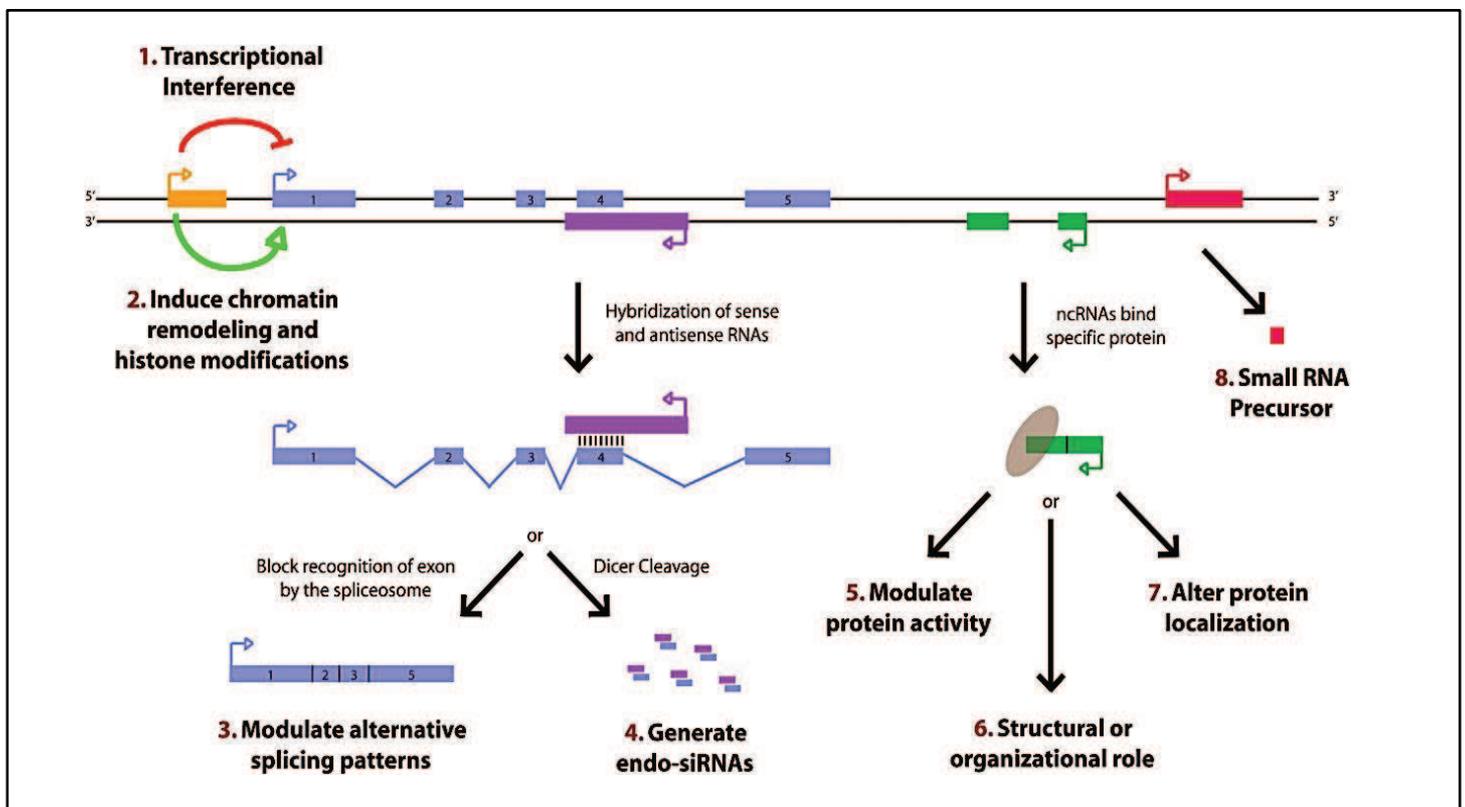


Figure 33 : Paradigme des fonctions connues des LncRNA. Des études récentes ont identifié une grande variété de mécanismes de régulation impliquant les LncRNA. La transcription d'un ARN non codant (orange) en amont du gène cible peut réprimer (1) ou induire (2) l'expression d'un gène cible (bleu) en inhibant la polymérase II ou en modulant le remodelage de la chromatine, respectivement. Un LncRNA positionné en antisens (violet) par rapport à son gène cible peut s'hybrider avec ce dernier et moduler son épissage (3) ou générer des petits ARNs dépendant des DICERs (4). En s'accrochant à une protéine cible, les LncRNA (vert) peuvent moduler l'activité de cette dernière (5), structurer et remodeler la protéine (6), ou altérer sa localisation cellulaire (7). Ils peuvent également générer directement la synthèse de petits ARNs (8). D'après Wilusz et al., 2009.

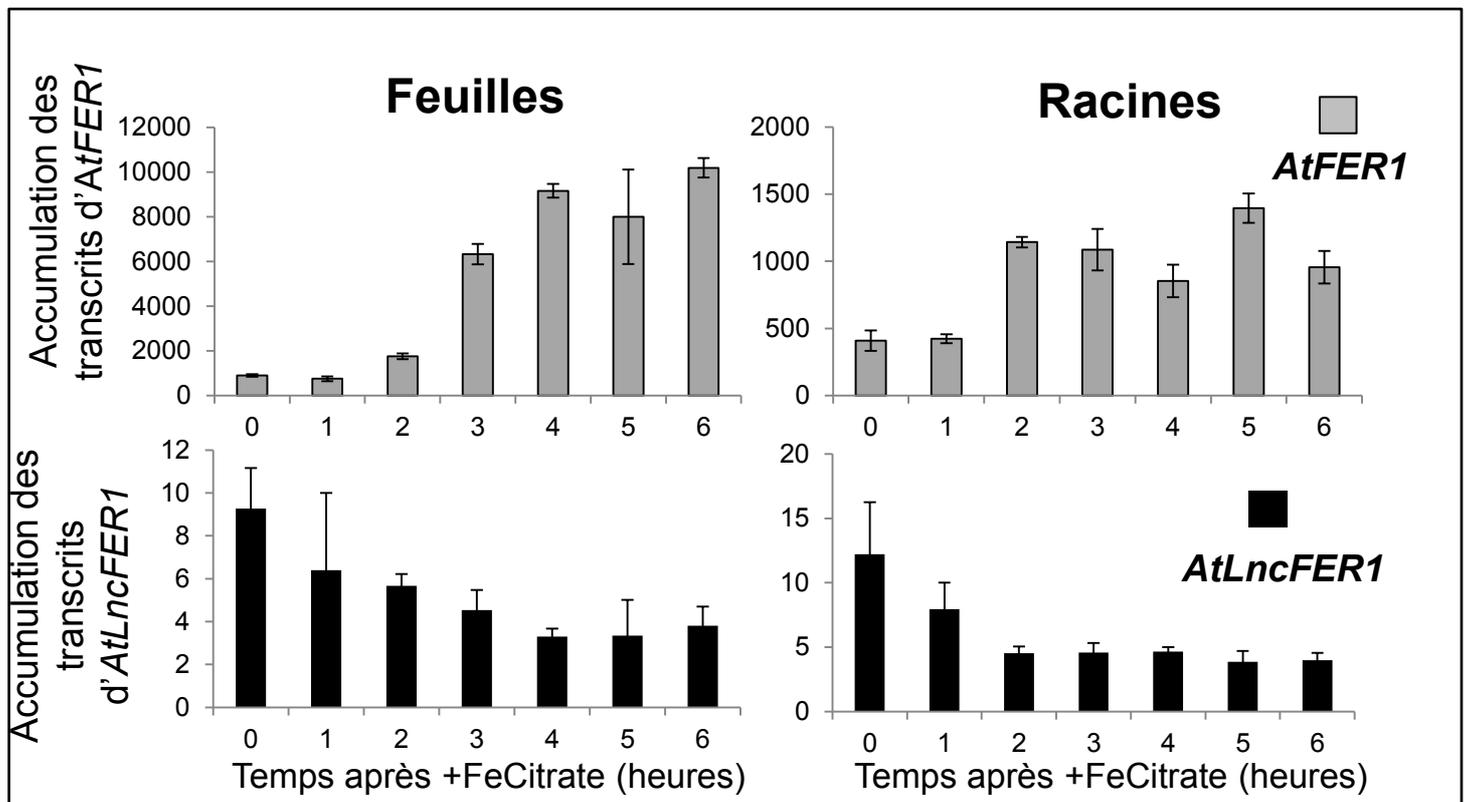


Figure 34 : Analyse de l'accumulation des transcrits d'AtFER1 et d'AtLncFER1 en réponse à un excès de fer. Des plantes sauvages *Col-0* âgées de 14 jours sont traitées avec 500 μ M de Fe-citrate (hydroponie) puis récoltées 0, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 heures après traitement. L'accumulation des transcrits a été quantifiée par qPCR dans les feuilles et dans les racines. Les amorces qPCR utilisées pour *AtLncFER1* encadrent le premier intron (Cf. Fig. 38). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

1. Introduction

A ce jour, il a été observé que la transcription est un phénomène très général qui semble s'appliquer à une grande partie du génome d'un organisme donné, alors que la traduction ne concerne qu'une partie relativement modeste des transcrits produits. Chez l'Homme, par exemple, 73% du génome est transcrit et non traduit (Djebalis *et al.*, 2012). La fonction de la diversité de ces ARNs commence à être particulièrement étudiée. Parmi eux, les mécanismes de régulation impliquant un LncRNA (Long non-coding RNA) restent peu compris. Leur importance dans certains processus biologiques commence à être établie, mais beaucoup reste à découvrir. Il a été montré que les *LncRNAs* peuvent participer à la régulation de leur gène cible à différents niveaux selon leur configuration dans le génome (Fig. 33 ; Wilusz *et al.*, 2009).

(i) Les *LncRNAs* peuvent être dans la même orientation que leurs gènes cibles et réguler ce dernier transcriptionnellement et/ou modifier son environnement chromatinien (Fig. 33.1 et 2 ; Rinn *et al.*, 2007).

(ii) Les *LncRNAs* peuvent être en orientation inverse (anti-sens) ou bidirectionnelle et moduler l'épissage de leur cible ou générer des petits ARNs dépendants des *DICERs* (Fig. 33.3 et 4 ; Golden *et al.*, 2008).

Les mécanismes associés aux modifications de l'environnement chromatinien ou à la production de petits ARNs décrits dans les points (i) et (ii) sont susceptibles d'impliquer la polymérase IV (Zhang *et al.*, 2007).

(iii) Les *LncRNAs* peuvent être localisés dans les séquences intergéniques et moduler l'activité de la protéine codée par le gène cible, ou modifier sa structure, ou bien encore altérer sa localisation (Fig.33.5, 6 et 7 ; Mercer *et al.*, 2009). Les *LncRNAs* localisés dans les séquences intergéniques peuvent aussi être impliqués dans la production de précurseurs de petits ARNs impliqués dans la régulation de l'expression de leur gène cible (Fig.33.8).

Chez les plantes, une campagne de séquençage haut débit de cDNA a mis en évidence l'existence d'un *LncRNA* au locus d'*AtFER1* (Castelli *et al.*, 2004). Il s'agit d'un transcrit anti-sens de type NAT (Natural Antisens Transcript ; *At5g01595* : *AtLncFER1*) chevauchant la séquence génomique d'*AtFER1*. Lors d'une étude précédente, il a été montré que l'expression d'*AtFER1* et d'*AtLncFER1* était inversement corrélée (Arnaud, 2007). Cependant, aucun lien direct entre l'expression de ces deux « gènes » n'a été identifié. J'ai donc cherché par la caractérisation de mutants, à identifier s'il existe un rôle pour *At5g01595*

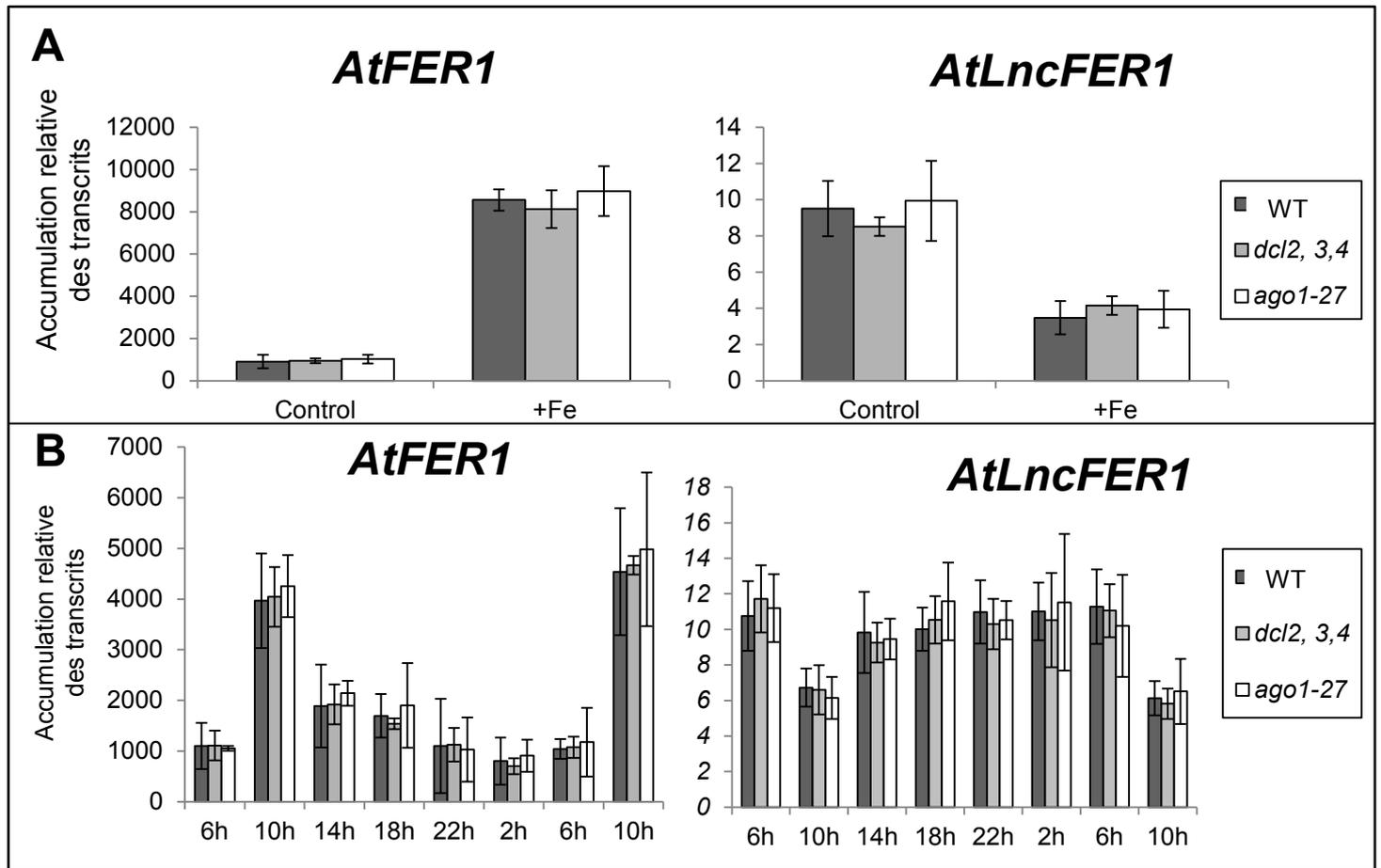


Figure 35 : Analyse de l'accumulation des transcrits d'*AtFer1* et d'*AtLncFER1* au cours du temps chez le sauvage et les mutants *dcl2,3,4* et *ago1-27* (affectés dans la synthèse des petits ARNs). Des plantes sauvages (WT) et mutantes âgées de 14 jours ont été traitées avec 500 μ M de fer durant 6 heures, puis récoltées (A). L'analyse diurnale a porté sur des échantillons qui ont été prélevés toutes les 4 heures (B). L'accumulation des transcrits a été quantifiée par qPCR. Les amorces qPCR utilisées pour *AtLncFER1* encadrent le premier intron (Cf. Fig. 38). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3). Aucune différence significative n'a été déterminée.

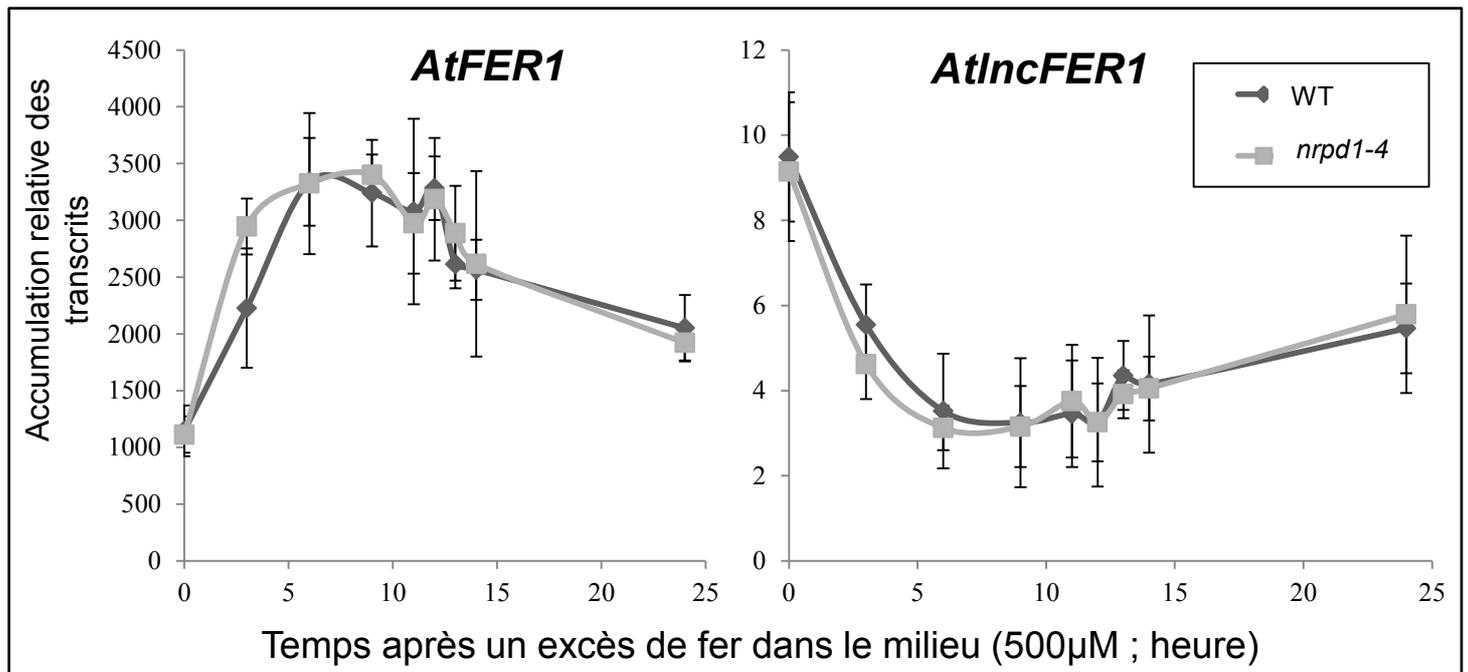


Figure 36 : Analyse de l'accumulation des transcrits d'*AtFer1* et d'*AtLncFER1* au cours du temps chez le sauvage et le mutants *nrpd1-4* (mutant de la polymérase IV). Les plantes sauvages (WT) et mutantes (*nrpd1-4*) âgées de 14 jours ont été traitées avec 500 μ M de fer durant 24 heures, puis récoltées. L'accumulation des transcrits a été quantifiée par qRT-PCR. Les amorces qPCR utilisées pour *AtLncFER1* encadrent le premier intron (Cf. Fig. 38). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

dans le contrôle de l'expression d'*AtFER1*, que ce soit au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel ou post-traductionnel.

2. Résultats

2.1 Etude de l'accumulation des transcrits d'*AtLncFER1* par rapport à *AtFER1*.

Afin d'évaluer s'il existe une régulation de *AtLncFER1* sur l'expression d'*AtFER1*, j'ai tout d'abord confirmé les profils d'accumulation des transcrits de ces deux gènes par qRT-PCR dans des plantes sauvages (Col-0), après addition de fer exogène (Fig. 34). Les plantes ont été cultivées en milieu hydroponique durant 14 jours avant l'addition de fer-citrate (500 µM final) dans le milieu. Dans les feuilles, en condition contrôle, la quantité d'ARNm d'*AtFER1* est 50 fois supérieure à celle de *AtLncFER1* (Fig. 34). Dans les racines, ce rapport est approximativement de 30. Après addition de fer, l'accumulation des transcrits d'*AtFER1* augmente fortement et rapidement alors que celle de *AtLncFER1* diminue (corrélation inverse). Ces résultats confirment bien le rapport identifié précédemment entre l'accumulation des ARNm d'*AtFER1* et du *AtLncFER1* (Arnaud, 2007).

2.2 Caractérisation d'un mécanisme potentiel de régulation de l'expression d'*AtFER1* impliquant *AtLncFER1*.

2.2.1 Un rôle pour les petits ARNs ?

Dans le but de comprendre *via* quelle voie le *AtLncFER1* pourrait avoir un rôle sur l'expression d'*AtFER1*, j'ai mis en place des expériences de quantification de transcrits en réponse à un excès de fer et au cours du temps (conditions diurnales ; Fig. 35.A et B) chez des mutant affectés dans la synthèse des petits ARNs. L'accumulation des transcrits d'*AtFER1* et d'*AtLncFER1* dans les triple mutants *dicer2, 3, 4* et dans le mutant *ago1-27* n'est pas différente de celle du sauvage en condition contrôle (50µM de fer ; Fig. 35A), en condition d'excès de fer (500µM de fer ; Fig. 35A), et au court du temps (condition diurnale ; Fig. 35B). Ces données suggèrent que si *AtLncFER1* est impliqué dans le contrôle de l'expression d'*AtFER1*, ce mécanisme ne serait pas dépendant des petits ARNs.

2.2.2 Un rôle pour la polymérase IV ?

Afin de déterminer si *AtLncFER1* pouvait réguler l'expression d'*AtFER1* *via* la polymérase IV, j'ai mis en place une expérience de quantification de transcrits en réponse à

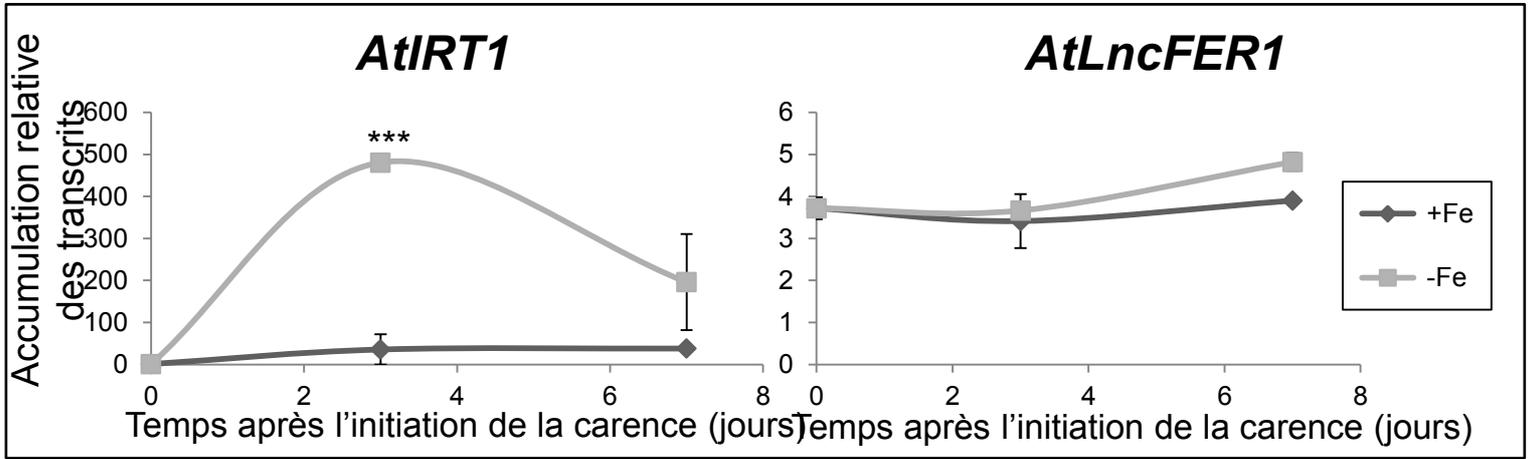


Figure 37 : Analyse de l'accumulation des transcrits d'*AtIRT1* et d'*AtLncFER1* en réponse à une carence en fer. Des plantes sauvages (WT) âgées de 14 jours ont été soumises à une carence en fer (-Fe) ou non (+Fe), puis récoltées à différents temps. A gauche, *AtIRT1* est utilisé comme gène marqueur de la carence en fer. A droite, l'accumulation des transcrits d'*AtLncFER1* est présentée en fonction des traitements. Les amorces qPCR utilisées pour *AtLncFER1* encadrent le premier intron (Cf. Fig. 38). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3). Les différences significatives entre WT et *AtLncfer1* ont été déterminées par un test de Student : *= $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$.

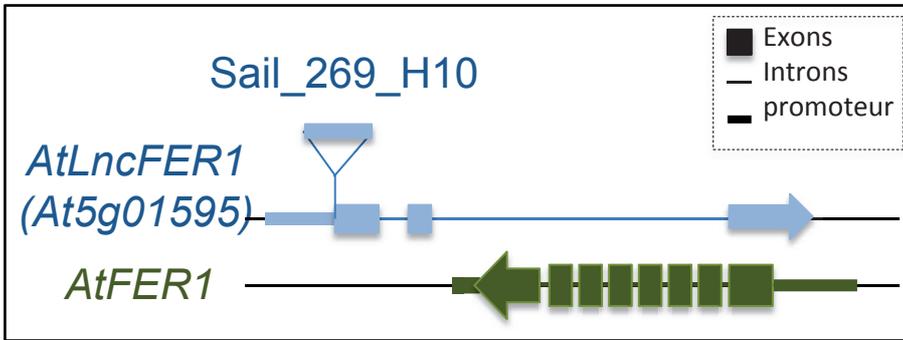


Figure 38 : Localisation du T-DNA dans le mutant *AtLncfer1* (Sail_269_H10). Le transgène est inséré dans la région 5' d'*AtLncFER1* et n'affecte pas le locus d'*AtFER1*.

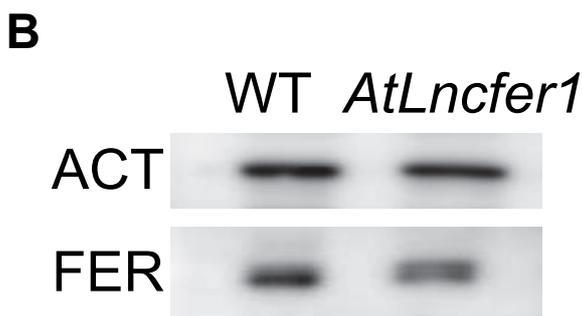
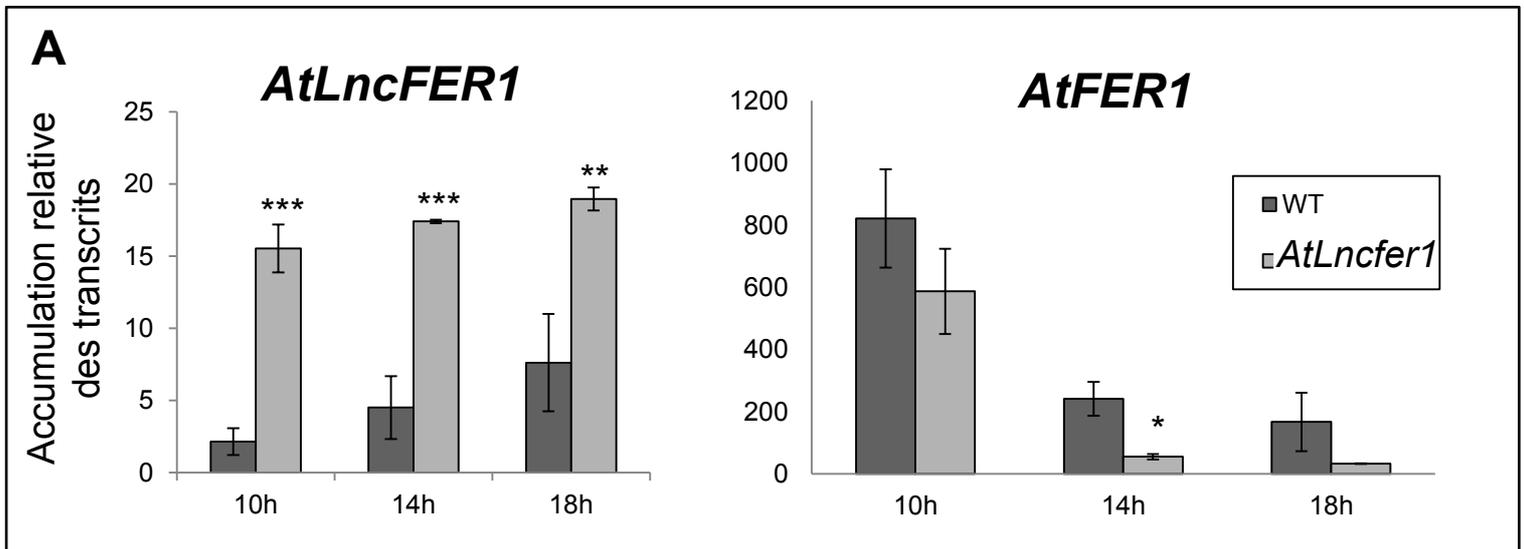


Figure 39 : Accumulation des transcrits d'*AtLncFER1* et d'*AtFER1* et des ferritines dans le mutant *AtLncfer1*. Les plantes sauvages WT et mutantes (*AtLncfer1*) âgées de 14 jours ont été récoltées toutes les 4 heures. Les transcrits sont quantifiés par qPCR (A). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3). Les différences significatives entre WT et *AtLncfer1* ont été déterminées par un test de Student : *= $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. Les protéines sont extraites puis dosées par la méthode de Bradford. La détection des ferritines est réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin dirigé contre les ferritines (B).

un excès de fer à différents temps (Fig. 36). L'accumulation des transcrits d'*AtFER1* et d'*AtLncFER1* dans le mutant *nprdl-4* (mutation affectant la polymérase IV) ne diffère pas de celle du sauvage. Des expériences en condition diurnale ont été réalisées (prélèvement toutes les quatre heures comme pour la figure 35 ; résultats non présentés) et n'ont pas permis d'identifier de différence. Ces données suggèrent que si *AtLncFER1* est impliqué dans le contrôle de l'expression d'*AtFER1*, ce mécanisme ne serait pas dépendant de la polymérase IV.

2.3 Etude de l'accumulation des transcrits d'*AtLncFER1* en réponse à la carence en fer.

Une autre supposition était que le *AtLncFER1* pourrait être induit en réponse à la carence en fer pour inhiber l'accumulation des transcrits d'*AtFER1*. En effet, l'accumulation des transcrits d'*AtLncFER1* étant diminuée en réponse à l'excès de fer, cette hypothèse donnait un rôle physiologique de réponse au fer du *AtLncFER1*. Afin de déterminer si une telle régulation existait, j'ai quantifié les transcrits d'*AtLncFER1* en réponse à une carence en fer. Dans cette expérience, *AtIRT1* a été utilisé comme gène marqueur de la carence (Fig. 37). J'ai pu observer que la carence en fer n'induit pas une augmentation de l'accumulation des transcrits d'*AtLncFER1*. Cette nouvelle expérience renforce l'idée que si une régulation existe, cette dernière serait indépendante du statut nutritif en fer de la plante.

2.4 Caractérisation d'une lignée mutée pour *AtLncFER1*

En parallèle aux approches précédentes (Cf. § 2.2. & 2.3.), j'ai caractérisé une lignée mutée pour *AtLncFER1* (*AtLncfer1* : Sail_269_H10). Cette lignée comporte un T-DNA inséré au niveau du site d'initiation de la transcription d'*AtLncFER1* mais n'affecte pas *AtFER1* (Fig. 38). En condition standard de culture, l'accumulation des transcrits d'*AtLncFER1* est augmentée dans la lignée *AtLncfer1* par rapport au sauvage (Fig. 39A). Ce constat peut s'expliquer par le fait qu'un fragment du T-DNA (e.g. présence du promoteur 35S) active de façon aspécifique la transcription d'*AtLncFER1* dans la lignée *AtLncfer1*. L'analyse de l'accumulation des transcrits d'*AtFER1* dans le mutant *AtLncfer1* est diminuée par rapport au sauvage (Fig. 39A). J'ai par la suite confirmé ces observations au niveau protéique par Western blot, et pu montrer une diminution de l'accumulation des ferritines dans le mutant *AtLncfer1* (Fig. 39B). Ces données nous indiquent que le *AtLncFER1* pourrait agir comme un répresseur de l'accumulation des messagers d'*AtFER1*. Cependant, on ne peut pas exclure que

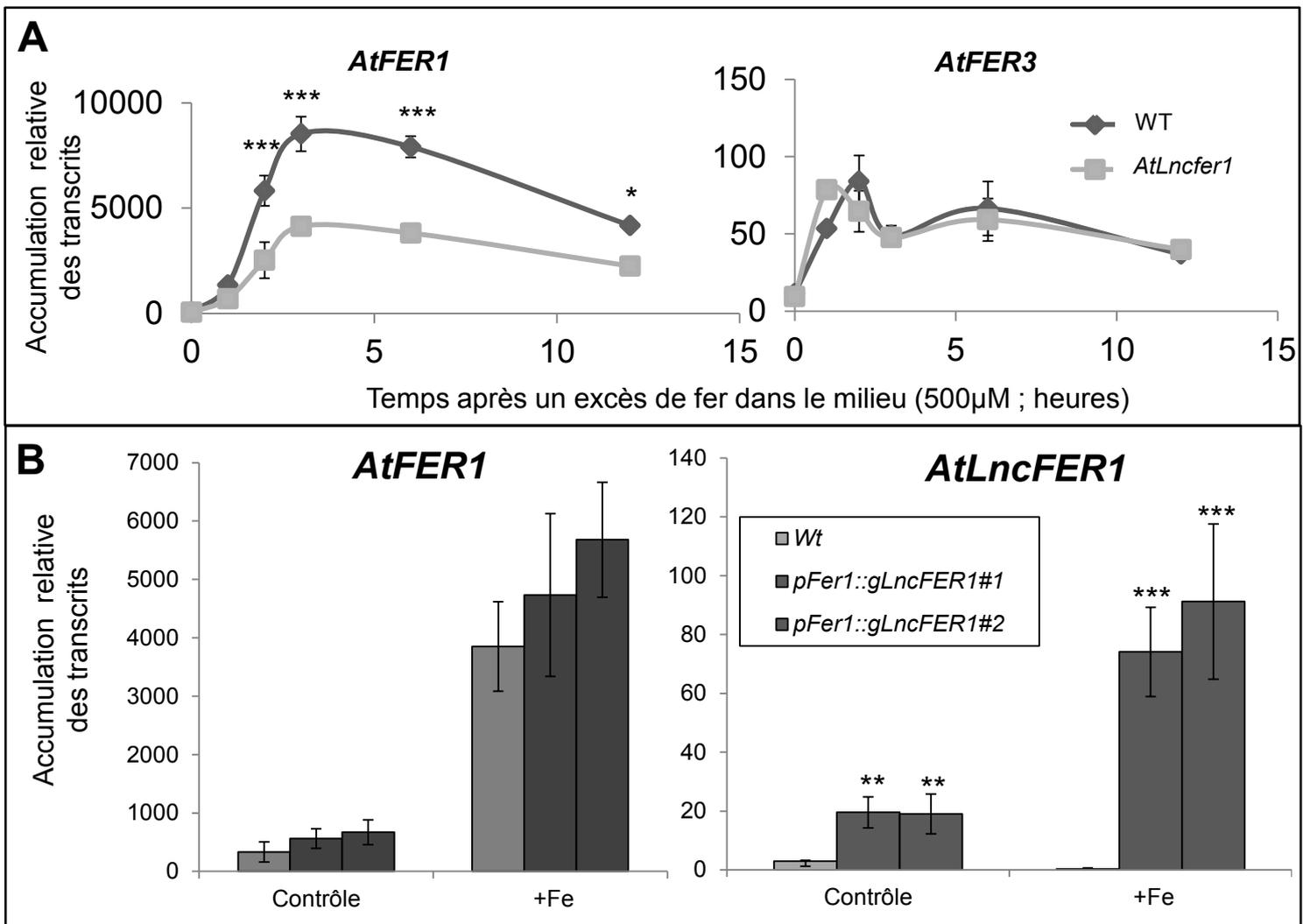


Figure 40 : Accumulation des transcrits d'*AtFER1*, d'*AtFER3* et d'*AtLncFER1* en réponse à différents facteurs. Les plantes sauvages (WT) et mutantes (*AtLncfer1*) âgées de 14 jours ont été traitées avec 500 μ M de fer puis récoltées 1, 2, 3, 6 et 12 heures après le début du traitement (A). Des plantes WT et des lignées transgéniques *pFER1::gAtLncFER1* ont été traitées avec 500 μ M de fer durant 6 heures, puis ont été récoltées (B). L'accumulation des transcrits a été quantifiée par qPCR. Les amorces qPCR utilisées pour *AtLncFER1* encadrent le premier intron (Cf. Fig. 38). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3). Les différences significatives par rapport aux conditions contrôle ont été déterminées par un test de Student (*= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$.)

cela soit du à une compétition entre les séquences promotrices des deux gènes *AtFER1* et *AtLncFER1* pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

J'ai par la suite réalisé la même expérience mais cette fois ci en réponse à un excès de fer. J'ai observé que les messagers d'*AtFER1* sont suraccumulés en réponse à un excès de fer dans le sauvage comme dans le mutant *At5g01595* (Fig. 40A). Toutefois, le mutant présente une moindre quantité d'ARNm d'*AtFER1*, ce qui confirme les résultats précédents. De façon intéressante, le profil observé pour les messagers d'*AtFER1* n'est pas retrouvé pour *AtFER3*, lui-même induit en réponse à l'excès de fer (Fig. 40A). Chez le mutant *At5g01595*, aucune différence des accumulations de transcrits d'*AtFER3* n'est constatée. Ces résultats démontrent fortement que l'impact de la suraccumulation des *AtLncFER1* chez *At5g01595* n'affecte qu'*AtFER1* à son propre locus.

2.5 Les lignées *pAtFER1::gLncFER1* ne sont pas affectées dans la quantité de messagers d'*AtFER1*.

Dans le but de comprendre si la régulation potentielle du *AtLncFER1* sur *AtFER1* était locus dépendant et si le niveau d'expression du *AtLncFER1* pouvait affecter celui d'*AtFER1*, j'ai étudié l'expression d'*AtFER1* et du *AtLncFER1* dans des lignées surexprimant le *AtLncFER1*. Ces lignées transgéniques expriment la séquence génomique du *AtLncFER1* sous le contrôle du promoteur d'*AtFER1* (*pAtFER1::gLncFER1*). Chez ces plantes, aucune différence significative de la quantité de transcrits d'*AtFER1* n'a été observée par rapport au sauvage, que ce soit en condition contrôle ou en réponse à un excès de fer (Fig. 40B). Toutefois ces lignées suraccumulent bien les transcrits du *AtLncFER1* (Fig. 40B), avec une accumulation plus importante en réponse à un excès de fer (*i.e.* l'induction en réponse à un excès de fer étant associée à l'activité du promoteur d'*AtFER1*). Ces données démontrent que si une régulation entre le *AtLncFER1* et *AtFER1* existe, elle est locus dépendant, et est probablement due à une compétition de la machinerie transcriptionnelle au locus.

3. Discussion

Au cours de cette étude j'ai pu confirmer qu'il existe une corrélation inverse entre la quantité de messagers d'*AtLncFER1* et celle d'*AtFER1* (Fig. 34). J'ai démontré que si une telle régulation existait, cette dernière serait indépendante des mécanismes connus de synthèse des petits ARNs (Fig. 35). De plus, j'ai établi que la transcription de la polymérase IV n'avait pas de rôle dans ce système (Fig.36). Si le *AtLncFER1* est réprimé quand *AtFER1* est induit, j'ai supposé que l'inverse pouvait être possible. J'ai donc observé la quantité des messagers du *AtLncFER1* en réponse à la carence en fer, condition expérimentale où les transcrits d'*AtFER1* sont au niveau le plus bas. J'ai démontré que le *AtLncFER1* n'était pas induit en réponse à la carence (Fig. 37). J'ai par la suite caractérisé une lignée mutée pour le *AtLncFER1* (Sail_269_H10 ; Fig. 38) et ai démontré que cette lignée suraccumule les transcrits du *AtLncFER1* et sous-accumule ceux d'*AtFER1* au cours du temps (Fig. 39). La même observation a été réalisée en réponse à un excès de fer (Fig. 40A). Cette relation est spécifique d'*AtFER1* car dans le mutant *AtLncfer1*, les ARNm d'*AtFER3* ne sont pas accumulés de façon différentielle avec le sauvage (Fig. 40A). Enfin, par la caractérisation de lignées *pAtFER1::gLncFER1*, j'ai démontré que la corrélation inverse entre l'accumulation des transcrits d'*AtFER1* et ceux d'*AtLncFER1* était locus dépendant (Fig. 40B). Une analyse fonctionnelle du promoteur potentiel du *LncFER1* m'a également démontré que même complétement d'une séquence 35S minimum, ce dernier n'avait pas d'activité quantifiable ou observable (Données non présentées).

L'ensemble de ces résultats me permet de conclure que l'accumulation des transcrits du *AtLncFER1* par rapport à ceux d'*AtFER1* serait due à une compétitivité de la machinerie transcriptionnelle : lorsque *AtFER1* est transcrit, *AtLncFER1* le serait moins, et inversement. Cette conclusion remet en cause la fonction potentielle d'*AtLncFER1* dans le contrôle de l'expression d'*AtFER1*. Elle pose également la question de savoir si *AtLncFER1* joue un quelconque rôle dans le contrôle de l'expression des gènes, ou de la croissance et du développement de la plante. Une hypothèse qui serait intéressante à développer serait de déterminer comment la polymérase va choisir sa cible entre *AtFER1* et *AtLncAtFER1*, mais celle-ci reste vaste et compliquée à étudier. Plus généralement, il convient de se demander si le *LncFER1* n'est pas tout simplement un bruit de fond du génome transcrit de manière non spécifique et sans lien direct avec *AtFER1*.

**Chapitre IV : Identification
d'un réseau de gènes
impliqués dans la réponse à
l'excès de fer.**

1. Introduction.

L'importance du fer dans le métabolisme des végétaux est particulièrement bien illustrée en cas de carence par le phénomène de chlorose internervaire, qui correspond à une diminution de la quantité des chlorophylles dans les parties aériennes de la plante. Cette diminution se traduit par un jaunissement des feuilles et une baisse de la productivité (Briat *et al.*, 2015a). Cependant, le fer peut être toxique sous forme libre dans les cellules de par sa capacité à produire des radicaux hydroxyles (OH[•]) *via* la réaction de Fenton, ce qui provoque un stress oxydatif pouvant être fatal pour l'organisme. A l'état naturel, chez le riz, un excès de fer provoque le « bronzing du riz » c'est-à-dire un brunissement des feuilles. Cette toxicité ferreuse, essentiellement retrouvée dans des sols anoxiques à pH acide, est un symptôme lié à la présence de fortes concentrations de fer à l'état réduit (Fe²⁺), qui est soluble dans la solution du sol et assimilable. Cette configuration est retrouvée dans les cultures de riz au Sri Lanka et en Afrique de l'Ouest et peut entraîner de lourdes pertes de rendement, voir même provoquer la perte totale de la récolte. Ce problème est également associé à la production de blé en Australie (pour 1/3 des surfaces dédiées à cette culture) et au Brésil (en association avec d'autres métaux ; Khabaz-Saberi et Rengel, 2010). D'une manière générale, l'excès de fer dans les sols est peu fréquent, mais il est très probable que localement (échelle de quelques complexes argilo-humiques), l'hétérogénéité des sols en nutriments soit associée à de fortes concentrations en fer. Dans ce cas, la plante pourra s'adapter en modulant la croissance de son système racinaire (Reyt *et al.*, 2015). Plus globalement, travailler sur la tolérance à l'excès de fer est un enjeu majeur pour l'avenir. En effet, l'appauvrissement des sols en phosphate (un chélateur important du fer) conduira probablement à une suraccumulation de fer ferreux dans les sols, et donc à un excès de fer généralisé. D'autre part, la population humaine connaît de nombreux cas de carence en fer (Cf. Introduction §1.). A l'avenir, comprendre comment les plantes pourraient suraccumuler cet élément et ainsi servir d'aliments enrichis en fer (biofortification) pourrait apporter des solutions pour faire face à cette carence nutritive.

Enfin d'un point de vue plus fondamental, l'excès de fer représente une condition particulièrement intéressante pour identifier et caractériser les mécanismes de stockage ou de transport dépendant du fer, contribuant au maintien de son homéostasie. Il peut mettre en évidence l'existence de différentes voies de signalisation qui mèneraient à l'expression de gènes indispensables à la nutrition des plantes. Comme il a été montré dans le Chapitre II, certaines régulations transcriptionnelles des gènes modulant l'homéostasie du fer n'étaient

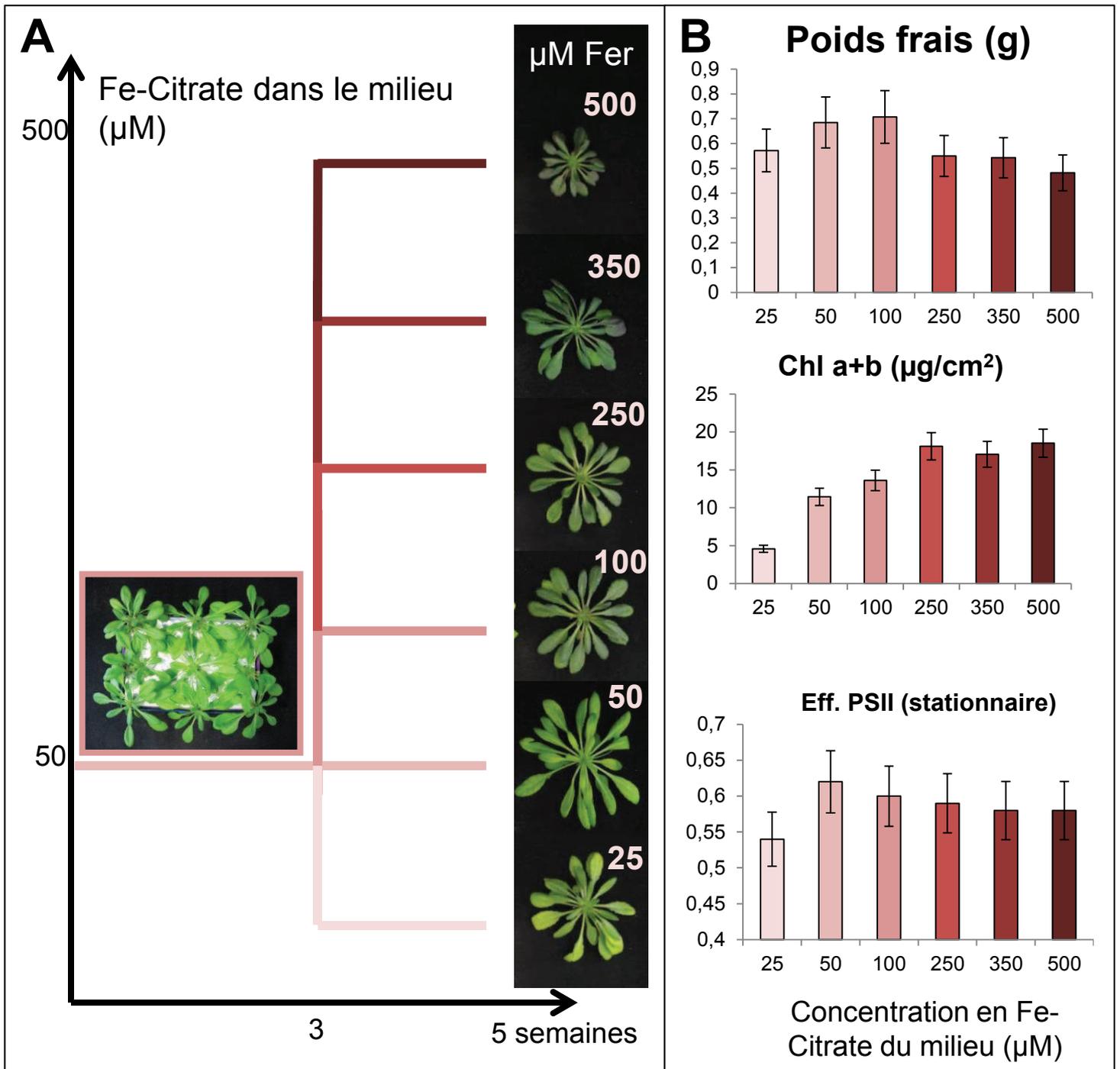


Figure 41 Mesure de la croissance végétative de plants *d'Arabidopsis thaliana* en fonction de la concentration en fer présent dans le milieu.

Des plantes de trois semaines ont été cultivées en hydroponie puis ont subi différents traitements de citrate de fer durant deux semaines. Le plan de croissance est présenté (A). Les plantes ont ensuite été phénotypées *via* différentes expériences (B). La masse fraîche des plantes (n=9), la quantité de leurs chlorophylles totales (n=3) et l'efficacité photosynthétique du PSII (n=3) leur correspondant sont présentées.

perceptibles qu'en condition d'excès de fer. De façon plus focalisée, les études en condition d'excès pourraient permettre d'identifier les régulateurs transcriptionnels responsables de la dé-répression d'*AtFER1* via l'*IDRS*.

Dans ce contexte, afin d'identifier toutes les voies potentiellement impliquées, il a été choisi de travailler à l'échelle du génome, et plus particulièrement du transcriptome, en prenant en compte l'aspect dynamique de cette réponse. En effet, la réponse des plantes aux variations environnementales est un phénomène qui s'effectue à différents pas de temps, depuis la perception du stress (quelques secondes) jusqu'à la rééquilibration du métabolisme et du programme développemental (plusieurs heures/jours).

Cette approche a consisté dans un premier temps, à mettre en place une cinétique d'induction par le fer en me basant sur les niveaux d'accumulation des transcrits d'*AtFER1*. Dans un second temps, nous avons généré des données de transcriptomique (via des puces à ADN Affymetrix) nécessaires à l'identification des réseaux de régulation impliqués. Enfin, nous avons identifié des gènes candidats impliqués dans la réponse précoce à un excès de fer (avant que l'expression d'*AtFER1* ne soit induite). L'analyse de ces données nous a permis d'identifier de nouveaux gènes sentinelles impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer. Parmi ces gènes, nous avons porté une attention particulière aux facteurs de transcription, ces derniers jouant un rôle central dans l'établissement et le fonctionnement des réseaux de régulation qui contrôlent l'homéostasie du fer chez les plantes.

2. Résultats.

2.1 La réponse phénotypique des plantes à l'excès de fer.

Dans le but de comprendre l'impact d'un excès de fer sur le développement d'*Arabidopsis*, des plantes ont été cultivées en hydroponie et ont subi différents traitements ferriques allant de 25 μM à 500 μM (Fig. 41A). Les plantes se développant à 25, 50 et 100 μM de Fe-Citrate présentent une masse fraîche qui augmente proportionnellement au traitement. La quantité de chlorophylle totale augmente également dans ces trois conditions alors que l'efficacité photosynthétique stationnaire du PSII atteint son maximum à 50 μM de Fe-Citrate dans le milieu, puis diminue pour les concentrations plus élevées (Fig. 41B). Ces données suggèrent que pour des plantes âgées de trois semaines évoluant dans ces conditions, la concentration optimale de fer se situe entre 50 et 100 μM . Au-delà de 100 μM de Fe-Citrate, la masse fraîche des plantes diminue pour atteindre un minimum à 500 μM . La quantité de chlorophylle augmente par rapport à 100 μM et parvient à un plateau à partir de

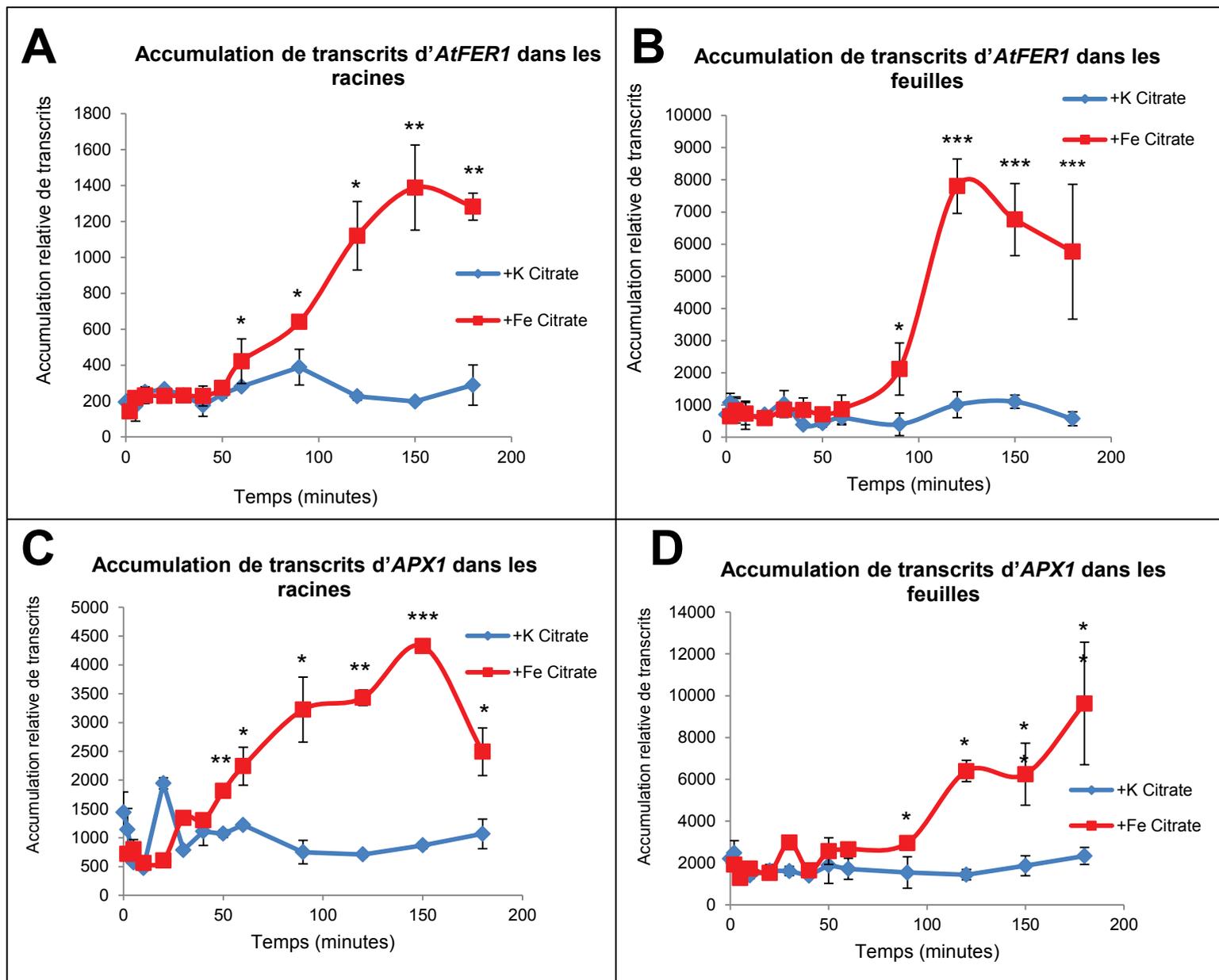


Figure 42 : Accumulation des transcrits d'*AtFER1* et d'*AtAPX1* dans les racines et dans les feuilles.

Données obtenues à partir d'une RT-PCR quantitative. Les ARNs utilisés ont été extraits à différents temps à partir de plantules âgées de 13 jours qui ont, soit été traitées par du K-Citrate (500µM) pour la condition contrôle, soit par du Fe-Citrate (500µM) pour induire un excès de fer. L'accumulation des transcrits d'*AtFER1* et d'*AtAPX1* dans les racines (A et C) et dans les feuilles (B et D) est présentée au cours du temps après l'application du traitement. Les différences significatives par rapport au contrôle (K-Citrate) ont été déterminées par un test de Student (*= $p.value < 0,05$, **= $p.value < 0,01$, ***= $p.value < 0,001$.)

250 μM jusqu'à 500 μM (Fig. 41B). Enfin, l'efficacité photosynthétique stationnaire du PSII diminue proportionnellement au traitement pour atteindre un minimum à 500 μM (Fig. 41B). Ces données confirment expérimentalement chez *Arabidopsis* qu'un excès de fer inhibe la croissance de la plante et diminue sa capacité photosynthétique.

2.2 Cinétique d'induction de l'accumulation des transcrits d'*AtFER1* et d'*AtAPX1* en réponse à un excès de fer.

Nous avons choisi d'étudier la réponse précoce des plantes à l'excès de fer au travers d'une cinétique de réponse à ce dernier (prélèvements 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 et 180 min après le début du traitement) sur des plantes âgées de 13 jours, cultivées en hydroponie en condition stérile. *AtFER1* a été utilisé comme gène marqueur car son expression est directement reliée à la quantité de fer disponible pour la plante (Reyt *et al.*, 2015). Il a été observé par PCR quantitative (deux expériences indépendantes), que l'accumulation des transcrits d'*AtFER1* était augmentée en réponse à l'ajout de fer (sous forme de citrate de fer : 500 μM final), à la fois dans les racines (en contact avec le milieu) et dans les parties aériennes (Fig. 42A et B). A l'inverse aucune induction n'a été constatée en réponse à l'ajout d'une même molarité de citrate de potassium. Une augmentation de l'accumulation des ARNm d'*AtFER1*, deux fois plus importante que pour la condition contrôle, a été observée dans les racines 60 min après l'ajout de fer. 30 minutes plus tard, les transcrits d'*AtFER1* représentent deux fois et demie la quantité observée en condition contrôle dans les parties aériennes (soit 90 min après l'ajout de fer). Ce délai d'induction entre ces deux tissus s'explique par le fait que le fer est appliqué au niveau des racines. Le maximum d'accumulation des transcrits d'*AtFER1* a été observé à 120 min dans les feuilles et 150 min dans les racines après l'ajout de fer. Cette augmentation est respectivement 8 fois et 7 fois plus importante que l'accumulation relative des transcrits de la condition contrôle (Fig. 42A et B). Enfin, la quantité des transcrits d'*AtFER1* diminue progressivement dans les deux tissus jusqu'à 180 min après l'ajout de fer. En moyenne, les niveaux d'accumulation des transcrits d'*AtFER1* mesurés dans les racines sont cinq fois inférieurs à ceux mesurés dans les parties aériennes (Fig. 42A et B).

Un second gène marqueur de la réponse à l'excès de fer a été utilisé afin de valider notre schéma expérimental (Fig. 42A et B). Il s'agit d'*APX1* (*ASCORBATE PEROXIDASE 1*) qui code une enzyme impliquée dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS), et plus particulièrement du peroxyde d'hydrogène (Fourcroy *et al.*, 2004). Comme dans le cas d'*AtFER1*, nous avons observé une augmentation de l'accumulation des transcrits

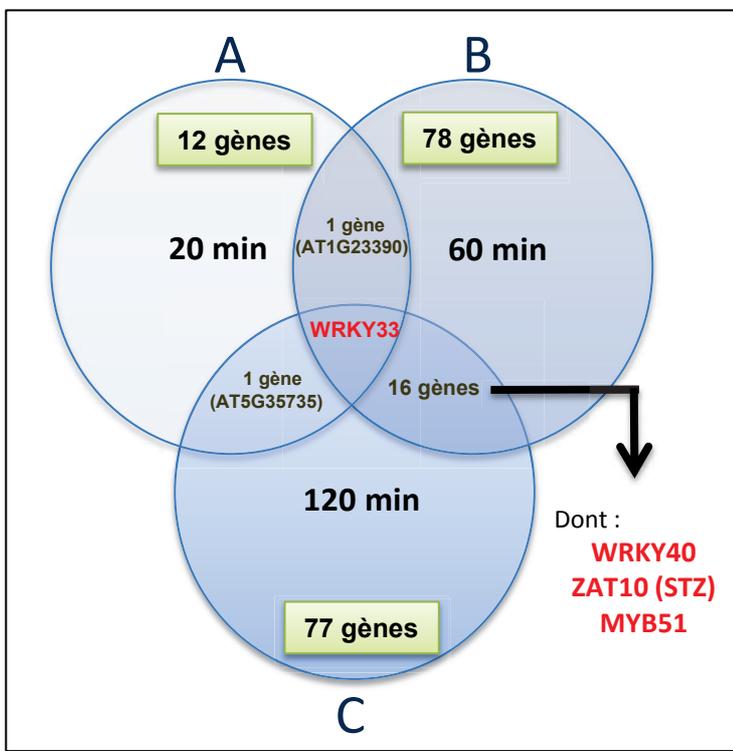


Figure 43 : Diagramme de Venn effectué à partir de trois listes de gènes (à 20min, à 60min et à 120min). Ce diagramme indique qu'il y a un gène commun entre la liste de gènes A à 20 min et la liste de gènes B à 60 min, un gène commun entre la liste A et la liste de gènes C à 120 min, et enfin 16 gènes communs entre la liste B et la C. Le facteur de transcription WRKY33 est, quant à lui, commun aux trois listes. Trois autres facteurs de transcription d'intérêt ressortent de ce diagramme : WRKY40, ZAT10 (STZ) et MYB51. Ils sont communs à la liste B et C.

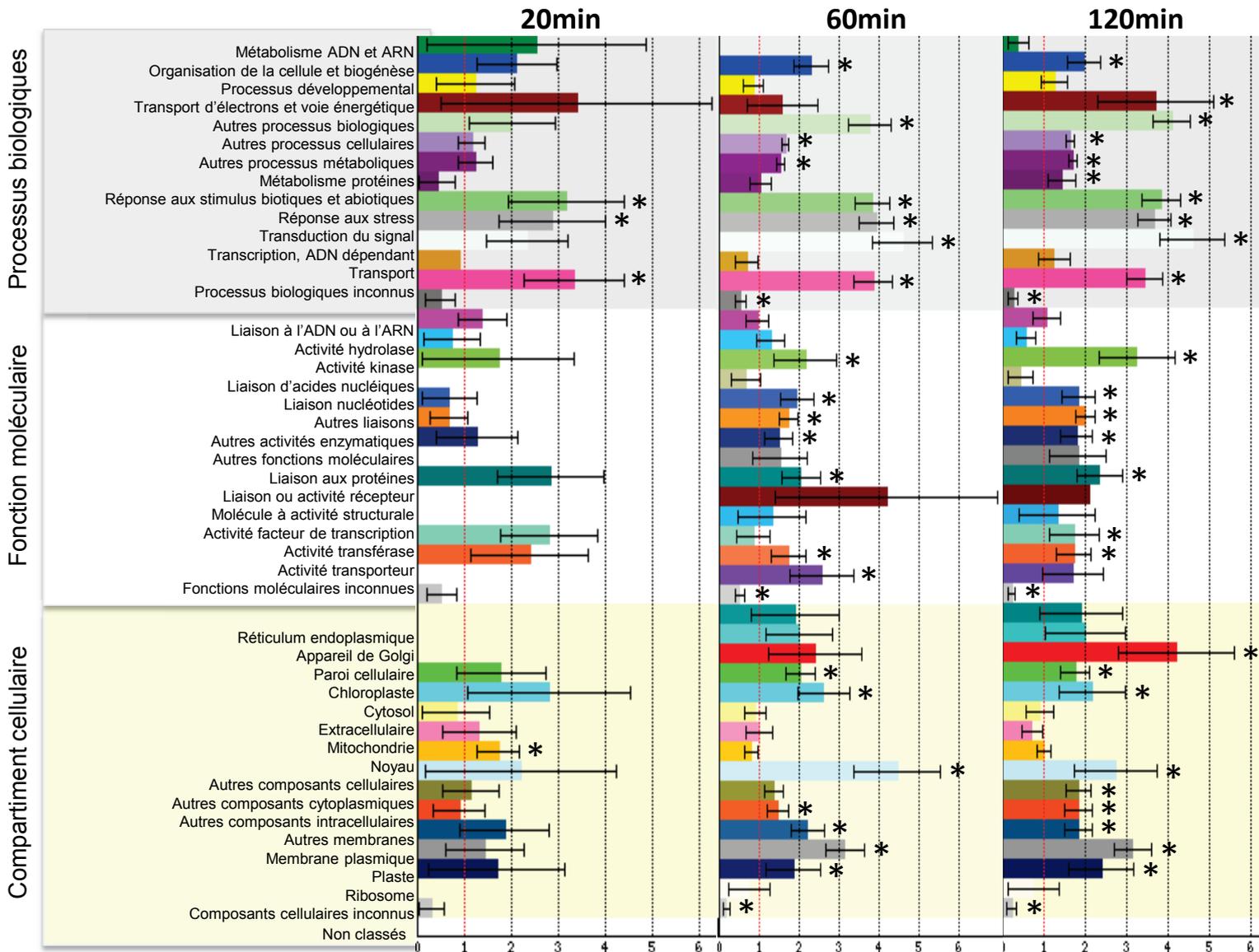


Figure 44 : Classement sur la base des annotations GO (Gène Ontologie) des gènes appartenant aux trois listes à 20 minutes, à 60 minutes et à 120 minutes. Les gènes sont répertoriés selon le processus biologique dans lequel ils sont impliqués, leur fonction moléculaire ou encore leur compartiment cellulaire. L'astérisque représente les catégories dans lesquelles les gènes sont significativement présents (catégories enrichies). Classement établi avec l'outil « Classification SuperViewer » disponible à l'URL suivante : http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi.

d'*APXI* dans les racines puis dans les parties aériennes, c'est-à-dire, respectivement à 30 et à 60 min après l'ajout de fer. Le maximum d'accumulation des ARNm, qui est 4,5 fois supérieur à l'accumulation des transcrits de la condition contrôle, est atteint dans les racines 150 min après le début du traitement avant de chuter à 180 min. A l'inverse, dans les parties aériennes, l'accumulation des transcrits est toujours sur la pente ascendante, 180 min après l'ajout de fer, et elle est 4,5 fois supérieure à celle de la condition contrôle. Comme dans le cas d'*AtFER1*, les niveaux d'accumulation des transcrits d'*APXI* mesurés dans les racines sont deux fois inférieurs à ceux mesurés dans les parties aériennes (Fig. 42A et B).

2.3 Analyse transcriptomique de la réponse précoce à un excès de fer.

2.3.1 Identification des gènes différentiellement régulés en réponse à un excès de fer.

Les échantillons de deux réplicats biologiques (parties aériennes) de deux expériences indépendantes ont été utilisés pour les approches de puces à ADN. Nous avons ciblé notre analyse sur les parties aériennes car l'ensemble des réponses moléculaires observées était plus fort et mieux caractérisé dans ces organes (Cf. §2.2). De plus, en visualisant la cinétique de réponse, plus de points de prélèvement étaient possibles dans les feuilles avant l'induction d'*AtFER1*. Les points de la cinétique que nous avons retenus correspondent au début de l'expérience (temps zéro), au maximum d'accumulation des transcrits d'*AtFER1* (120 min après le début du traitement), et à deux temps avant le début de ce dernier (20 et 60 min après le début du traitement). Dans un premier temps, l'analyse a porté sur l'identification de gènes dont l'accumulation des transcrits est différente entre les deux traitements (citrate de fer contre citrate de potassium). Dans un second temps, les niveaux de transcrits des gènes identifiés ont été comparés à celui du temps zéro (avant traitement).

Nous avons ainsi identifié trois listes de gènes dont l'accumulation des transcrits est significativement différente entre les deux traitements (et différente du temps zéro ; ANOVA avec un seuil de 5%) à 20, 60 et 120 min après le début de l'expérience et comportant 12, 78 et 77 gènes, respectivement (soit 167 gènes au total).

D'une manière générale, nous avons observé peu de gènes communs à ces trois listes excepté *WRKY33* (facteur de transcription de type WRKY ; Fig. 43). Un gène en commun entre les listes 20 et 60 (*AT1G23390* : F-box à domaine Kelch), et un autre entre les listes 20 et 120 min (*AT5G35735* : « Auxin-responsive family protein ») ont été identifiés. Enfin, sur les 16 gènes communs aux listes 60 et 120 min après le début du traitement, trois facteurs de

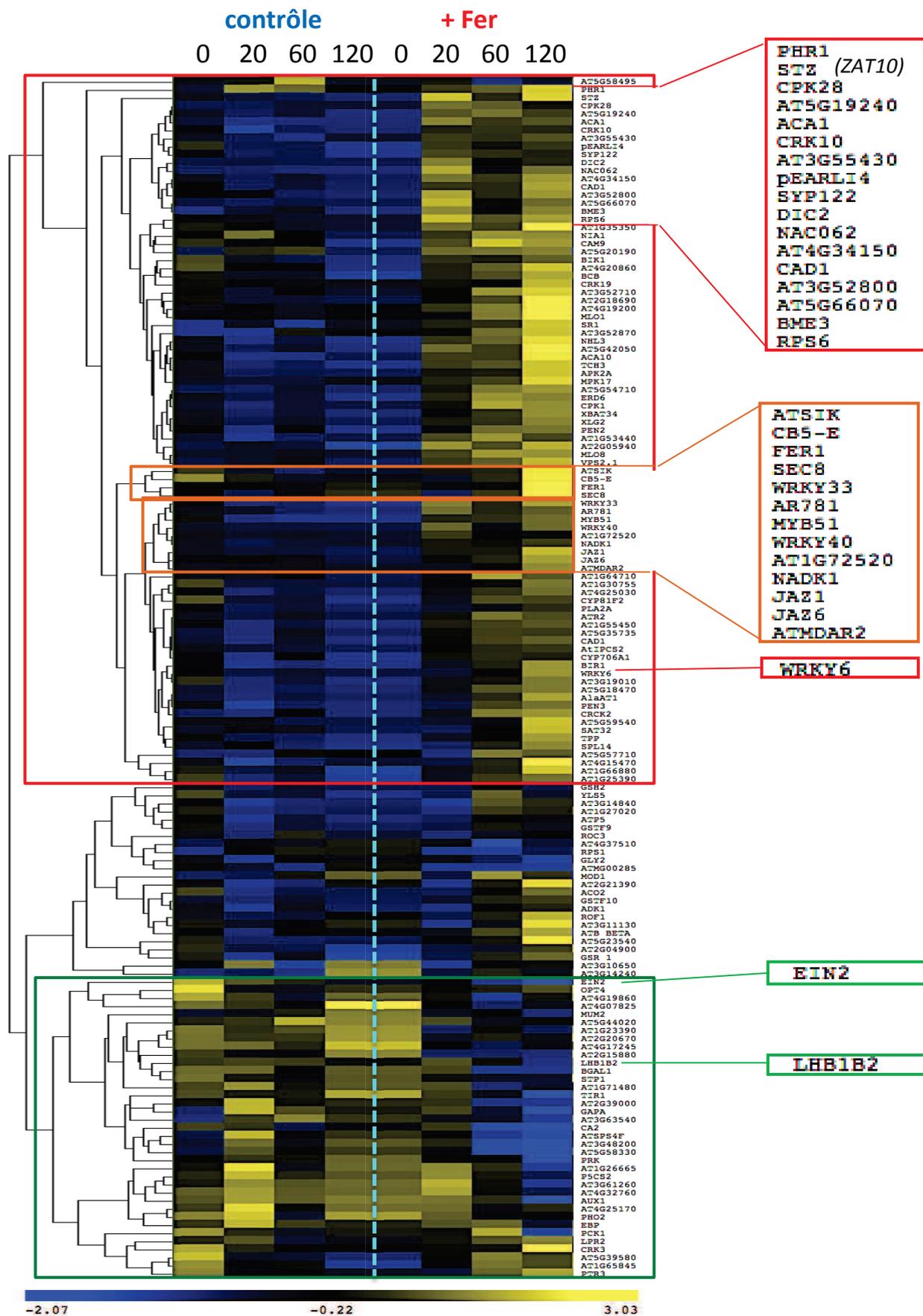


Figure 45 : Carte thermique des 167 gènes des listes A, B et C établie par l'utilisation de MeV (Analyse : « Pearson correlation » et « average linkage »). Les valeurs d'accumulation des gènes générées par les puces à ADN ont été utilisées, les négatives étant pour les gènes inhibés (bleu) et les valeurs positives pour les gènes activés (jaune). Ces valeurs ont été prises à différents temps : 0, 20, 60 et 120 minutes pour la condition contrôle et pour la condition traitée dans les deux expériences. Les gènes ont été classés de manière hiérarchique en fonction de leurs profils d'expression (dendrogramme). Le cadre vert représente les gènes dont l'accumulation des transcrits diminue alors que le cadre rouge représente les gènes dont l'accumulation des transcrits augmente au cours du temps après le traitement. Les deux cadres oranges sont des groupes de gènes qui ont un pattern d'expression proche de celui d'*AtFER1*.

transcription ont été mis en évidence. Il s'agit de WRKY40, ZAT10 (aussi nommé STZ ; classe des zinc fingers de type C2H2) et MYB51 (classe des R2R3-MYB).

2.3.2 Classification fonctionnelle des gènes différentiellement régulés en réponse à un excès de fer.

Les gènes que nous avons identifiés ont été classés sur la base des annotations GO (Gene Ontology). Nous les avons ainsi répertoriés selon le processus biologique dans lequel ils sont impliqués, leur fonction moléculaire, ou bien encore le compartiment cellulaire où ils sont prédits pour être adressés. Parallèlement à ces classifications, nous avons déterminé s'il existait des enrichissements spécifiques dans chacune de ces classifications (Fig. 44).

Les gènes différentiellement accumulés en réponse à l'excès de fer 20 min après le début du traitement sont essentiellement des facteurs nucléaires impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques, ainsi que dans le transport. A 60 et 120 min, la plupart des processus biologiques, des fonctions moléculaires et des compartiments cellulaires sont significativement impactés en réponse à l'excès de fer. On observe cependant, que les gènes impliqués dans le métabolisme des protéines, la transduction du signal, ou encore liés à la paroi cellulaire sont plus induits 120 min après le début du traitement.

2.3.3 Identification de groupe de gènes (clusters) potentiellement impliqués dans le contrôle transcriptionnel de la réponse précoce à un excès de fer.

Les données d'expression (des deux expériences) des 167 gènes identifiés à partir de l'analyse précédente ont été converties en carte thermique (ou heat map). Elle a permis de déterminer l'existence de patrons de variation d'accumulation de transcrits spécifiques à certains groupes de gènes au cours du temps (0, 20, 60, 120 min ; Fig. 45).

Au niveau global, 37 gènes (22%) présentent une accumulation des transcrits qui diminue au cours du temps en réponse au traitement fer. Dans ce groupe, aucun régulateur transcriptionnel n'a été identifié. La plupart des gènes sont, soit associés au métabolisme général de la plante (photosynthèse, dégradation des protéines, transport d'auxine), soit de fonction inconnue. On notera cependant la présence d'EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2), un régulateur clef de la réponse à l'éthylène. EIN2 a été décrit comme étant associé à la réponse à l'excès d'aluminium, le mutant perte de fonction ayant une résistance accrue à ce métal (Zhang *et al.*, 2014).

Parmi les groupes de gènes qui présentent une accumulation de transcrits augmentant au cours du temps, deux ont particulièrement retenu notre attention.

Le premier est celui dans lequel est présent *AtFER1*. Ce groupe est composé de quatre gènes très fortement induits 120 min après le début du traitement (début d'accumulation dès 60 min). Il ne contient pas de régulateur transcriptionnel. Les trois autres gènes qui composent ce groupe sont ATSIK (codant une protéine kinase régulateur négatif de la réponse au stress osmotique), CB5-E (CYTOCHROME B5 ISOFORM E code l'isoforme E du cytochrome b5, protéine contenant un atome de fer associé à un noyau hème) et SEC8 (SUBUNIT OF EXOCYST COMPLEX 8 code une protéine du complexe exocyste, impliqué dans le trafic des vésicules entre l'appareil de golgi et la membrane plasmique).

Le second groupe est composé de neuf gènes dont cinq régulateurs de la transcription (Fig. 45). Ce groupe inclut WRKY33, WRKY40 et MYB51. Ces trois facteurs de transcription ont été initialement décrits comme étant associés à la réponse aux stress biotiques (pathogènes). Cependant, des études récentes ont montré leur implication dans la réponse à des stress abiotiques (Dubois *et al.*, 2013 ; Van Aken *et al.*, 2013). WRKY33 est associé à la réponse au stress hydrique, osmotique et salin alors que WRKY40 joue un rôle central dans la signalisation ABA (acide abscissique ; phytohormone associée à la réponse aux stress abiotiques). MYB51 est un régulateur positif de la biosynthèse des glucosinolates (composés aux propriétés anti-herbivores) et a récemment été décrit comme étant induit en réponse à un stress hydrique. Dans ce même groupe, deux autres régulateurs de la transcription sont présents, il s'agit de JAZ1 et JAZ6 (JASMONATE ZIM-DOMAIN 1 et 6). Les protéines JAZ sont des régulateurs négatifs de l'expression des gènes. Elles interagissent avec certains facteurs de transcription afin de prévenir l'activation des gènes cibles de ces derniers. En présence de jasmonate (JA), les protéines JAZ sont dégradées. Trois autres gènes présents dans ce groupe sont associés au maintien du potentiel redox de la plante en condition de stress (Berrin *et al.*, 2005 ; Blokhina *et al.*, 2003). Il s'agit de MDAR2 (MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE 2), NADK1 (NAD KINASE 1) et LOX4 (LIPOXYGENASE 4 ; enzyme à atome de fer). Le dernier membre de ce groupe correspond au gène AR781 qui code une protéine de fonction inconnue.

Enfin, d'autres facteurs de transcription, dont l'accumulation des messagers est modifiée en réponse au fer, sont présents dans ces listes. Parmi eux, nous retrouvons deux facteurs de transcription impliqués dans l'homéostasie du phosphate, PHR1 (régulateur positif de l'expression d'*AtFER1* ; Bournier *et al.*, 2013) et WRKY6 (répresseur de l'expression du transporteur de phosphate PHO1, PHOSPHATE 1 ; Chen *et al.*, 2009). Deux autres facteurs de transcription associés aux réponses aux stress biotiques et abiotiques ont aussi été identifiés, NAC062 (NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 62 ; réponse aux pathogènes

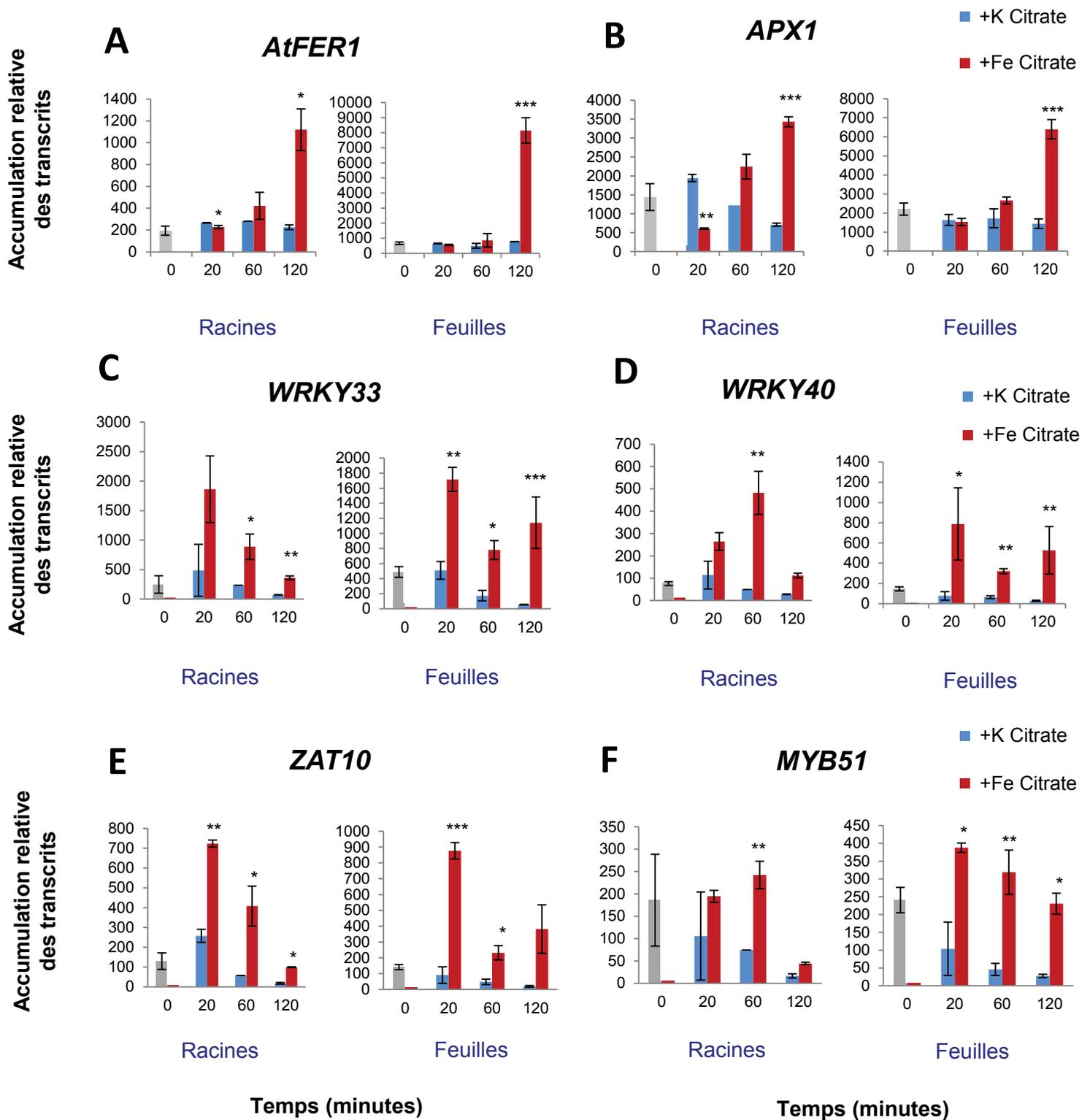


Figure 46 : Accumulation de transcrits d'*AtFER1*, d'*APX1* et des gènes candidats *WRKY33*, *WRKY40*, *ZAT10* et *MYB51* en réponse à un excès de fer. Données obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons de racines et de feuilles prélevées 0, 20, 60 et 120 minutes après le début du traitement. Accumulation de transcrits dans les racines et dans les feuilles d'*AtFER1* (A), d'*APX1* (B), *WRKY33* (C), *WRKY40* (D), *ZAT10* (E) et *MYB51* (F). Les barres bleues correspondent au niveau d'accumulation pour la condition contrôle et les barres rouges pour la condition traitée. Les différences significatives par rapport au contrôle (K Citrate) ont été déterminées par un test de Student (*= p .value<0,05, **= p .value<0,01, ***= p .value<0,001.)

et au stress froid) et ZAT10 (STZ, SALT TOLERANCE ZINC FINGER ; impliqué dans la tolérance aux stress hydrique, salin et thermique). Pour finir, un facteur de transcription impliqué dans le développement embryonnaire et la germination de la graine a aussi été identifié, il s'agit de GATA8 (GATA TRANSCRIPTION FACTOR 8 ; protéine à doigts de zinc).

2.3.4 Validation des facteurs de transcription candidats par RT-PCR quantitative.

Suite à l'analyse préliminaire des puces à ADN, des PCR quantitatives ont été réalisées avec un double objectif : valider les résultats de l'analyse dans les parties aériennes et étudier les profils d'accumulation des transcrits de ces mêmes gènes dans les racines. Pour cela, j'ai sélectionné quatre facteurs de transcription (*WRKY33*, *WRKY40*, *ZAT10* et *MYB51*) et nos deux gènes de référence (*AtFER1* et *APX1*). Pour cette étude complémentaire, nous nous sommes basés sur les mêmes points de cinétique que ceux retenus pour l'analyse préliminaire des puces à ADN (0 et 20, 60 et 120 minutes après traitement ; Fig. 46). Dans un premier temps, nous avons observé, en accord avec les données de la littérature et celles des puces à ADN, une forte accumulation des transcrits d'*AtFER1* et d'*APX1* en réponse à l'excès de fer, 120 minutes après le début du traitement, dans les deux tissus testés (Fig. 46A et B). Les profils d'accumulation des transcrits observés pour *WRKY33*, *WRKY40* et *ZAT10* en réponse au traitement citrate de fer sont très similaires que ce soit dans les feuilles ou dans les racines (Fig. 46C, D et E). Nous observons un maximum d'accumulation 20 min après le traitement, puis une diminution progressive (on notera que le maximum d'accumulation des messagers de *WRKY40* dans les racines est décalé à 60 min). Dans les racines, le retour au niveau initial est atteint 120 min après le début du traitement alors que dans les parties aériennes, cette diminution est moins rapide (l'accumulation à 120 min est 2 à 5 fois supérieure au niveau initial selon le gène considéré). Par contre, l'intensité de l'induction au maximum d'accumulation des transcrits varie en fonction du gène considéré et du tissu : 3,5 fois supérieure à la valeur d'accumulation de la condition contrôle dans les racines et 10 fois dans les feuilles pour *WRKY33*, 5 fois supérieure dans les parties racinaires et 7 fois dans les parties aériennes pour *WRKY40*, et enfin, 3 fois supérieure dans les racines et 6 fois dans les parties aériennes pour *ZAT10* (Fig. 46C, D et E). Pour *MYB51*, si le profil d'accumulation des transcrits dans les parties aériennes est semblable à celui décrit pour *WRKY33*, *WRKY40* et *ZAT10* en réponse au traitement citrate de fer, on observe une nette différence dans les racines (Fig. 46F). En effet, dans ces dernières, le niveau d'accumulation des transcrits reste

Contrôle
(+K-citrate)

Traité
(+Fe-citrate)

0 20 60 120

2
0 10 30 50 90
5 20 40 60 120

Le cluster *AtFER1*:

74 gènes liés au métabolisme des protéines, à la transduction du signal et à la paroi cellulaire.

Parmi eux : *AtFER3* et *SAPX*

Le cluster à 5 minutes:

31 gènes liés aux stress biotiques et abiotiques.

Parmi eux : *ERF5*, *ERF6*, *MKK9*, *WRKY40*, *ZAT10* et *ZAT12*.

Le cluster à 2 minutes:

55 gènes liés au signal calcique, à la perception du signal et à la réponse au stress.

Parmi eux : *ERF11*, *SZF1*, *NAC062*

Figure 47 : Carte thermique des 1500 gènes différentiellement exprimés en réponse à un excès de fer. Les différences significatives ont été établies à partir d'un test ANOVA à 1% incluant l'effet du traitement, le temps / traitement et excluant le traitement / expérience. Les valeurs d'accumulation des gènes générées par les puces à ADN ont été utilisées, les négatives étant pour les gènes inhibés (bleu) et les valeurs positives pour les gènes activés (jaune). Ces valeurs ont été prises à tous les temps de prélèvement de l'expérience pour la condition contrôle et traitée. Un dendrogramme est associé à la carte thermique afin de disposer les gènes de manière hiérarchique en fonction de leur profil d'expression.

stable jusqu'au point 60 min après traitement, puis chute à 120 min (d'un facteur 4,5). Enfin, il semblerait que globalement, pour les gènes étudiés, le traitement au citrate de potassium induise plutôt une baisse de l'accumulation des transcrits. Cependant, l'intensité de cette diminution par rapport au niveau de départ reste très faible comparée aux niveaux d'induction associés au traitement citrate de fer.

2.3.5 Analyse globale du jeu de données.

Dans le but d'avoir une vision plus globale de notre jeu de données, nous avons mis en place un test Anova à 1% incluant l'effet du traitement, le temps par rapport au traitement et excluant le traitement par rapport à l'expérience. Ainsi tous les gènes significativement différents du contrôle, ou du point de cinétique précédent ont été identifiés. Ils sont au nombre de 1500 gènes différentiellement exprimés (Fig. 47). Parmi eux, nous avons noté trois groupes particulièrement intéressants. Le premier groupe identifié est celui dont les gènes se comportent comme *AtFER1*, notre gène modèle. Ce groupe est composé de 74 gènes liés notamment à la transduction du signal, à la réponse hormonale et à la paroi cellulaire. Il contient aussi *AtFER1*, *AtFER3* et *SAPX* (*STROMAL ASCORBATE PEROXIDASE* ; qui code une enzyme cytoplasmique détoxifiant le peroxyde d'hydrogène). On retrouve également *JAZ2*, *JAZ6*, *JAZ9* (*JASMONATE ZIM-DOMAIN 2, 6 et 9*), *ILL6* (*IAA-LEUCIN RESISTANTE-LIKE6*) ou encore *LOX2* (*LIPOXYGENASE2*) qui sont des gènes liés au jasmonate. Un grand nombre de gènes *HSP* (70 et 90 ; *HEAT SHOCK PROTEIN*) codant des protéines chaperonnes, marqueurs de stress, sont également présents dans cette liste (Wirth *et al.*, 2003).

D'autre part, cette approche a mis en avant le fait que l'expression de certains gènes est modifiée très rapidement après l'application du fer. Un groupe de 31 gènes répond à ce *stimulus* dans les 5 minutes qui suivent le traitement (Fig. 47). Parmi eux, *ERF5*, *ERF6* (*ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT 5 et 6*), *MKK9* (*MAP KINASE KINASE 9*), *WRKY40*, *ZAT10* et *ZAT12*, sont tous induits. Ce sont des gènes de réponse au stress induits par les ROS (Dubois *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2013 ; Rizhsky *et al.*, 2004). Étonnamment, un groupe de 55 gènes voit son expression modifiée après seulement 2 minutes d'excès de fer. Ce groupe de gènes est notamment composé de *ERF11*, *SZF1* (*SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER1*) et *NAC062* qui sont des gènes identifiés comme liés aux stress biotiques et abiotiques mais également aux signaux calciques. L'analyse de ces données a permis de montrer que la réponse à l'excès de fer était un phénomène très dynamique qui impliquait un réajustement de l'expression de nombreux gènes à des temps très courts. De plus, dans notre expérience une

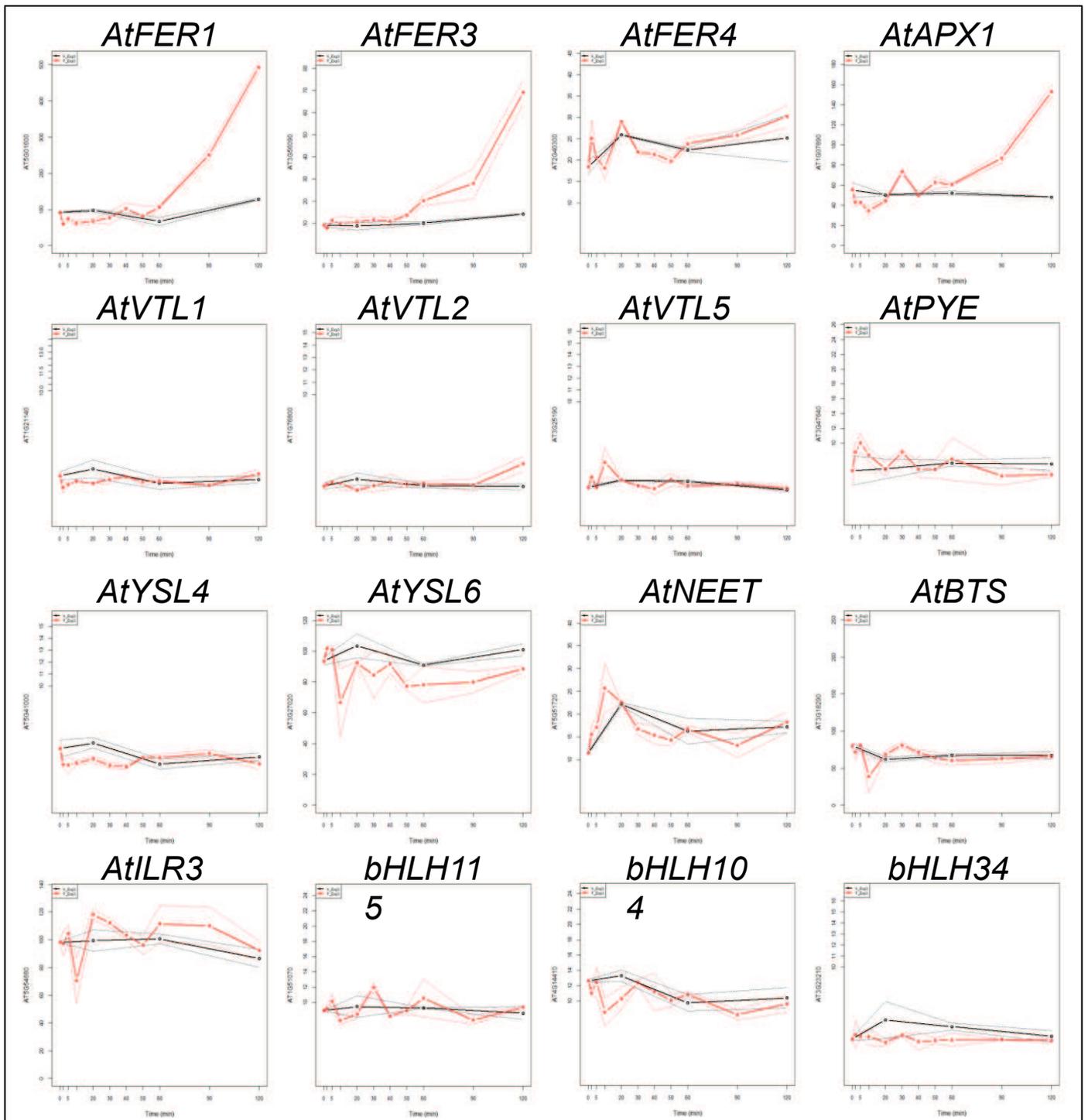


Figure 48 : Représentation de l'accumulation des transcrits des gènes du maintien de l'homéostasie du fer générée à partir des données de puces à ADN (Affymetrix). Un script établi sous le logiciel R a permis avec les données brutes des puces de construire ces graphiques. En noir les accumulations des messagers dans la condition contrôle (K-Citrate), et en rouge dans la condition traitée (Fe-Citrate), en fonction du temps. Les pointillés représentent les écarts-types standards.

tendance semble indiquer que la réponse génique est plus importante aux temps précoces (de l'ordre de quelques minutes) qu'au temps plus long (de une à deux heures). Dans l'ensemble, cette étude montre les mécanismes des variations de transcrits permettant aux plantes de faire face à l'excès de fer. Enfin, cette approche a également confirmé que certains mécanismes impliqués dans la réponse à différents stress biotiques ou abiotiques étaient communs avec la réponse à l'excès de fer.

2.3.6 Le comportement des ARNm des gènes du maintien de l'homéostasie du fer en réponse à l'excès.

Dans le but d'identifier si certains ARNm des gènes du maintien de l'homéostasie du fer étaient modifiés en réponse à l'excès de fer dans des temps très courts, nous avons représenté les accumulations mesurées à partir des puces à ADN (*via* le logiciel R). D'une façon intéressante, seule l'accumulation des transcrits d'*AtFER1*, d'*AtFER3*, et d'*APX1* augmente en réponse à un excès de fer (Fig. 48). Curieusement, les ARNm d'*AtFER4* ne semblent pas affectés. Pour tous les autres gènes contribuant au maintien de l'homéostasie du fer testés (seuls 12 sur les 29 testés sont représentés dans la figure 48), aucun ne présente une modification dans l'accumulation de ses messagers. Ces données suggèrent que les ferritines sont induites indépendamment des autres gènes de l'homéostasie du fer et renforcent l'idée que la voie « Fe/*IDRS* » des *AtFERs* est indépendante de la voie de régulation associée à *ILR3*.

3. Discussion

3.1 Les facteurs de transcription clefs de la réponse précoce à l'excès de fer.

L'objectif de l'étude visait à identifier les réponses transcriptionnelles précoces mises en place par les plantes pour maintenir l'homéostasie du fer lorsqu'il est en excès. Le but était d'identifier les réseaux de gènes impliqués dans cette réponse, notamment les facteurs de transcription majeurs. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé une cinétique de réponses à un excès de fer, et analysé l'impact de celui-ci sur l'expression des gènes par une approche transcriptomique (puces à ADN couplées à la RT-PCR quantitative). L'étude d'une partie des données a permis d'identifier quatre facteurs de transcription qui pourraient agir de façon précoce dans la réponse à l'excès de fer (maximum d'expression 20 minutes après traitement ; Fig. 43). Il s'agit de *WRKY33*, *WRKY40*, *ZAT10* et *MYB51*. Plusieurs études ont montré que

ces régulateurs de la transcription sont associés dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques.

WRKY33 et *WKY40* sont des facteurs de transcription de type WRKY possédant un domaine de liaison à l'ADN à l'extrémité N-terminale et une structure en doigts de zinc à l'extrémité C-terminale (Rushton *et al.*, 2010). Ces facteurs de transcription interagissent avec leurs cibles *via* des éléments *cis*-régulateurs appelés « W-box » (TGCA^C/T). *WRKY33* est impliqué dans la réponse à différents stress biotiques (bactéries et champignons pathogènes) et abiotique (stress salin). Il semble également être dépendant de la voie de signalisation de l'acide abscissique (ABA ; Jiang et Deyholos, 2009). Par ailleurs, l'expression de *WRKY33* est induite par l'accumulation de ROS dans les tissus de la plante et fait intervenir ERF5 et ERF6 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 5 et 6 ; facteurs de transcription de type APETALA2 : AP2/ERF ; Pitzschke *et al.*, 2009). Dans notre jeu de données, *WRKY33* est fortement induit en réponse au traitement citrate de fer. On peut donc supposer que ce facteur de transcription serait induit par ERF5 et ERF6 lors de fortes concentrations en fer afin de permettre la détoxification de la cellule des ROS qui sont produits par l'excès de fer. *WRKY40* joue un rôle dans la réponse aux stress abiotiques (stress salin et stress hydrique) notamment *via* son implication dans la voie de signalisation ABA (inhibition de l'expression d'*ABI4* et *ABI5*, *ABA INSENSITIVE 4* et *5* ; Liu *et al.*, 2012). L'ABA ainsi que l'acide jasmonique, les cytokinines et les brassinostéroïdes sont des inhibiteurs de l'acquisition du fer induite lors de carence (Brumbarova *et al.*, 2015). *WRKY40* a été récemment décrit comme étant impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes chloroplastiques codés par le génome nucléaire en réponse à un stress lumineux, générateur de stress oxydatif (Van Aken *et al.*, 2013). De manière générale, *WRKY40* agit comme un répresseur des réponses de la plante afin de lutter contre les stress. Les études citées ont montré que les variations d'accumulation des transcrits des gènes cibles de *WRKY33* et *WRKY40* étaient modifiées 60 à 120 minutes après le début du traitement, ce qui est en adéquation avec les pas de temps observés dans nos analyses. L'ensemble de ces données suggère donc que *WRKY33* et *WRKY40* pourraient être impliqués dans la réponse précoce à un excès de fer, probablement *via* une étape impliquant la génération de ROS.

ZAT10 et ZAT12 sont des facteurs de transcription à doigts de zinc de type C₂H₂ comportant un domaine de répression de la transcription de type EAR (ERF-ASSOCIATED AMPHIPHILIC REPRESSION). ZAT10 est impliqué dans la réponse des plantes au stress oxydatif provoqué par des stress abiotiques tels que la forte lumière (Mittler *et al.*, 2006 ; Rizhsky *et al.*, 2004). Ce facteur de transcription stimule l'expression de gènes impliqués dans

la détoxification des ROS et améliore la tolérance des plantes à la salinité, à la chaleur et au stress hydrique. L'activité de ZAT10 améliore la tolérance des plantes aux stress notamment en favorisant l'expression de gènes impliqués dans la détoxification des ROS (Mittler *et al.*, 2006) tels que *FSD1* (*FE SUPEROXIDE DISMUTASE 1*) et *APX2* (*ASCORBATE PEROXIDASE 2*). *ZAT10* serait donc induit lors d'un excès de fer afin de permettre la dégradation des ROS. *ZAT12* est impliqué dans la réponse au stress oxydatif également. Il a été montré que l'expression d'*APX1* est dépendante de *ZAT12*, et que ce dernier joue un rôle central dans la signalisation des ROS (Rizhsky *et al.*, 2004). Plus récemment, *ZAT12* a été identifié comme interagissant physiquement avec FIT (le facteur bHLH29 qui induit les mécanismes de prélèvement du fer) afin de mener à sa dégradation (Le *et al.*, 2016). Dans nos conditions expérimentales, *FIT* n'est pas réprimé en réponse à l'excès de fer, ce qui valide le lien entre ces deux acteurs en réponse à un long stress (de l'ordre de plusieurs jours). Il a également été établi que la dégradation de *ZAT12* était modulée par au moins 2 voies, l'une dépendante des ROS et l'autre de son domaine d'interaction avec FIT (EAR ; Brumbarova *et al.*, 2016). Ces données mettent en évidence la complexité et la dynamique de la perception du statut en fer des plantes, avec la balance entre la production de ROS et les mécanismes de réponse à la carence en fer.

MYB51 quant à lui, est un facteur de transcription de type R2R3-MYB (caractérisé par un domaine de liaison à l'ADN composé de deux répétitions MYB localisées dans la partie N-terminale), initialement identifié comme un régulateur positif de la biosynthèse des glucosinolates (Gigolashvili *et al.*, 2007). Plus récemment, *MYB51* a été décrit comme étant associé à la réponse au stress hydrique (Dubois *et al.*, 2013). Il a aussi été montré que ce facteur de transcription était accumulé lors de stress oxydatif. Cependant, aucun lien direct entre *MYB51* et les ROS n'a clairement été identifié.

L'ensemble de ces données suggère que la réponse précoce à l'excès de fer impliquant les facteurs de transcription identifiés, est une réponse associée à un signal ROS et au stress oxydatif engendré.

3.2 Les intégrateurs de la réponse transcriptionnelle à l'excès de fer.

Les données disponibles sur chacun des facteurs de transcription identifiés supportent l'idée qu'ils sont impliqués dans la réponse à l'excès de fer, notamment *via* la détoxification des ROS. Dans cette expérience, la découverte d'*ERF5* et *ERF6* renforce l'implication d'une voie ROS dépendante. En effet, il a été montré que ces deux acteurs, activés en réponse aux ROS, sont des régulateurs transcriptionnels qui agissent très en amont de la réponse des

plantes à un stress hydrique. Ils vont réguler, d'une part, l'inhibition de la croissance foliaire (voie des gibbérellines) et d'autre part, la mise en place des mécanismes de tolérance à ce stress. Parmi les cibles d'ERF5 et ERF6, on retrouve *WRKY33*, *ZAT10* et *MYB51*, gènes qui ont été identifiés comme étant impliqués dans les mécanismes de tolérance aux stress (Dubois *et al.*, 2013). Cette observation indique qu'ERF5 et ERF6 pourraient donc faire partie des premiers acteurs impliqués dans la mise en place des réseaux de régulation transcriptionnelle associés à la réponse à un excès de fer. L'inhibition de la croissance foliaire, mise en relation avec les phénotypes des plantes en réponse à l'excès de fer (Fig. 41) pourrait placer ERF5 et ERF6 comme acteurs centraux de la réponse à ce stress. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier les gibbérellines dans des plantes ayant subi un excès de fer. Nous pourrions aussi potentiellement mettre des plantes double mutantes *erf5erf6* en condition d'excès et évaluer leur développement ainsi que leurs quantité/répartition de ROS.

D'autre part, l'activité d'ERF5 et ERF6 dépend de leur état de phosphorylation, cette dernière étant assurée par deux kinases, MPK3 et MPK6 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3 et 6). Il a été montré que l'action de MPK3/MPK6 sur ERF6 induit l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux ROS, tels que *WRKY33* (Wang *et al.*, 2013). Ces observations indiquent qu'une voie MPK3/MPK6-ERF5/ERF6 joue un rôle dans la réponse précoce à l'excès de fer, *via* les ROS. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'activation de MPK3 et MPK6 (formes phosphorylées) est directement reliée à la présence de ROS (peroxyde d'hydrogène, H₂O₂) dans la cellule (Kovtun *et al.*, 2000). De façon intéressante, les MPK ne sont pas retrouvés dans notre étude. Toutefois, MKK9 est publié comme un inducteur transcriptionnel de *ERF5* et *ERF6*. L'expression de *MKK9* est induite après 5 minutes d'excès de fer et de façon intéressante sa protéine est connue pour activer MPK6 et MPK3 pour induire différentes réponses. En effet, MKK9 avec MPK3 et MPK6 sont tous les trois décrits comme participant à la réponse des plantes à divers *stimuli* tels que la senescence des feuilles (Zhou *et al.*, 2009), l'acquisition du phosphate (Lei *et al.*, 2014) ou encore la réponse à l'éthylène (Yoo *et al.*, 2008). D'autre part, l'importance de ERF5 et ERF6 dans la réponse précoce à l'excès de fer est aussi supportée par une étude récente (Son *et al.*, 2012). En effet, les auteurs ont montré que ERF5 pouvait interagir physiquement avec WRKY33, ERF6, MPK3 et MPK6 et que ERF6 pouvait interagir avec SCL13 (SCARECROW-LIKE 13 ; un facteur de transcription de type GARP), ERF5, MPK3 et MPK6. Dans cette même étude, un réseau d'interactions plus large entre divers facteurs de transcription de type WRKY a été établi, dans lequel figure WRKY40, notamment associé à WRKY6 et WRKY72. Cette étude suggère que *SCL13*, *WRKY6* et *WRKY72* pourraient être

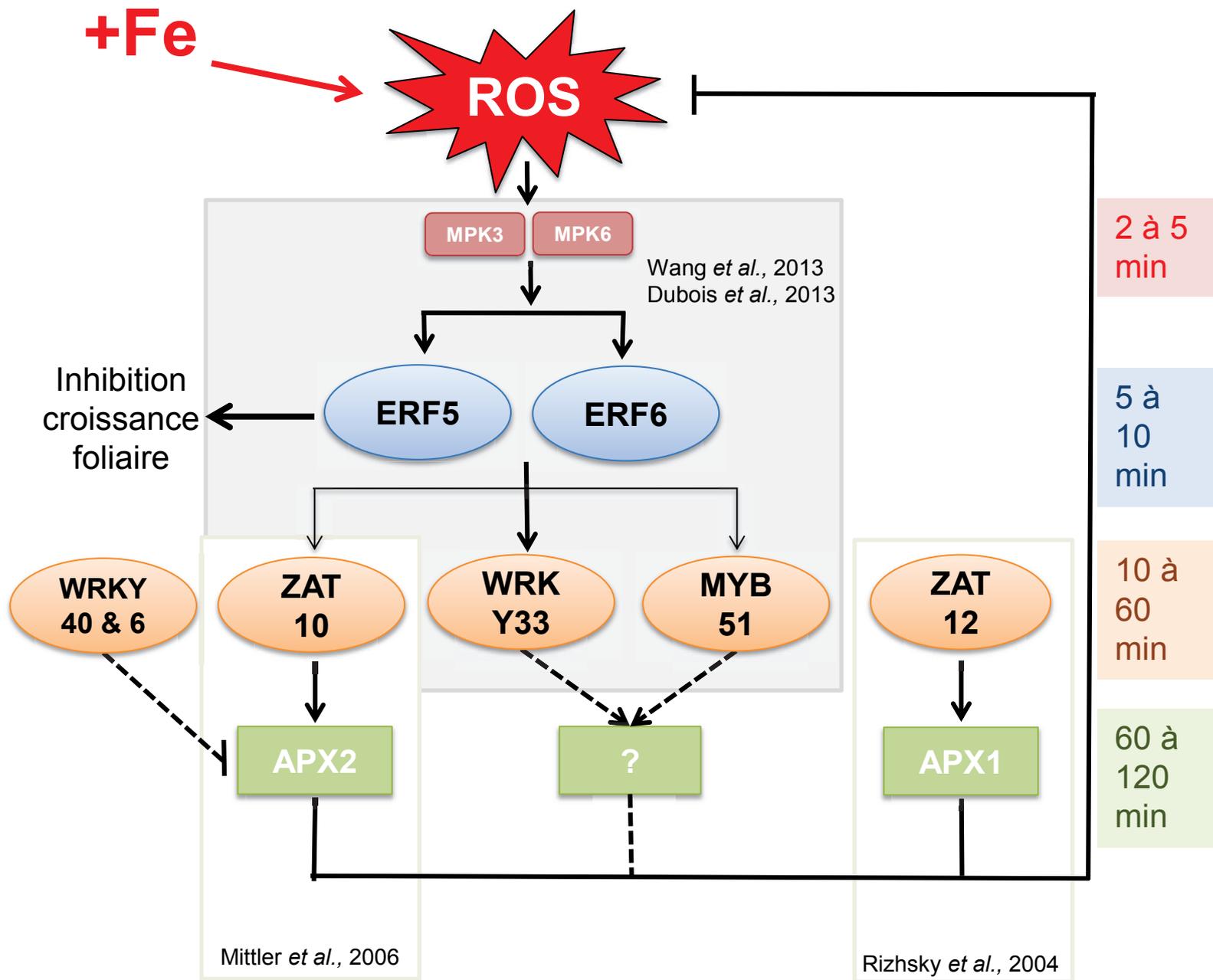


Figure 49 : Exemple de module de régulation transcriptionnelle potentiellement activée en réponse à un excès de fer. Un excès de fer génère l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont induire l'activité des facteurs de transcription ERF5 et ERF6. Ceux-ci vont d'une part, inhiber la croissance du système foliaire et d'autre part, activer l'expression de trois autres facteurs de transcription : WRKY33, ZAT10 et MYB51. Ces derniers vont à leur tour induire l'expression de gènes (comme *APX2* : *ASCORBATE PEROXYDASE 2*) impliqués dans la détoxification des ROS. D'autres facteurs de transcription agiraient aussi dans cette voie, soit en l'inhibant (*via* WRKY40 et WRKY6), soit en activant un gène détoxifiant la cellule des ROS (*via* ZAT12). Il restera à démontrer si ce module intervient dans la régulation de l'expression d'*AtFER1*. Ce modèle est basé sur les données d'expression générées par les puces à ADN et sur les travaux de Dubois et al., 2013, Mittler et al., 2006 et Wang et al., 2013.

des gènes régulateurs de la réponse à l'excès de fer, agissant dans le même réseau de régulation transcriptionnelle qu'ERF5 et ERF6 (certains pouvant être à la fois des cibles et des partenaires). L'ensemble de ces relations géniques peut être considéré comme un module d'expression en réponse à l'excès de fer et plus spécifiquement au ROS (Fig. 49).

Si ERF5 et ERF6 semblent coordonner une partie de la réponse à l'excès de fer (dépendante des ROS), il est fort probable que d'autres modules puissent être impliqués dans cette réponse. Certains modules pourraient être plus spécifiquement associés à la régulation de la croissance ou au réajustement du métabolisme, ou bien encore à l'homéostasie de divers macro- (comme le phosphate) et micro- (comme le zinc) éléments. De façon intéressante, de nombreux gènes *HSP* (*HEAT SHOCK PROTEIN*) ont été identifiés dans notre expérience. Les *HSP* ont par exemple été reliés aux stress métalliques chez l'humain en étant eux même induits transcriptionnellement en réponse au CuCl_2 , ou encore au ZnSO_4 (Steiner *et al.*, 1998).

D'un autre point de vue, si l'excès de fer génère des réponses transcriptomiques aspécifiques, il ne module pas pour autant les gènes du maintien de l'homéostasie (au moins ceux déjà décrits dans la littérature). Parmi les gènes testés, aucun ne voit ses transcrits réprimés ou induits en condition d'excès. Seul les gènes de ferritines (*AtFER1* et *AtFER3*) répondent de façon précoce à un stress ferrique ce qui renforce l'idée de l'induction transcriptionnelle des *AtFERs* par une voie fer, indépendante de celle impliquant ILR3. Cette observation place les ferritines en un point central de la réponse des plantes à la disponibilité en fer en étant acteur contre le stress oxydatif, mais également pour le maintien de l'équilibre ferrique chez les plantes. Il se peut dans ce contexte que l'induction des *AtFERs* dans les parties aériennes soit due au ROS et non au fer. Dans le but de tester cette hypothèse, une expérience d'excès de fer sur des mutants *frd3* (affectés dans le transport xylémien du fer) pourrait être réalisée. Ainsi une quantification des transcrits des *AtFERs* chez ces plantes permettrait de mettre en évidence si le fer est l'acteur responsable de l'induction des gènes de ferritines dans ces conditions. D'autre part, dans l'analyse préliminaire de ce transcriptome, aucun gène identifié ne se place comme candidat potentiel régulateur des *AtFERs*.

Ces résultats très encourageants restent toutefois préliminaires. A court terme, la poursuite des analyses bioinformatiques des données issues des puces à ADN devra porter sur l'ensemble du jeu de données en considérant l'ensemble des points de la cinétique. Le but sera d'identifier d'autres modules de régulation potentiellement impliqués. Cette approche permettra d'identifier les facteurs de transcription qui jouent un rôle clef, en modulant l'expression des gènes de structures potentiellement impliqués dans l'adaptation des plantes à un excès de fer (comme des transporteurs par exemple). Il s'agira aussi de rechercher les

séquences *cis*-régulatrices qui sont associées aux facteurs de transcription qui auront été précédemment identifiés. Finalement, pour les modules qui n'auront pas encore été décrits dans la littérature, il s'agira de valider les interactions qui existent entre les gènes régulateurs et leurs cibles, et de déterminer la fonction précise de ces derniers.

**Chapitre V : PDR9 module
l'homéostasie du fer en
régulant son acquisition.**

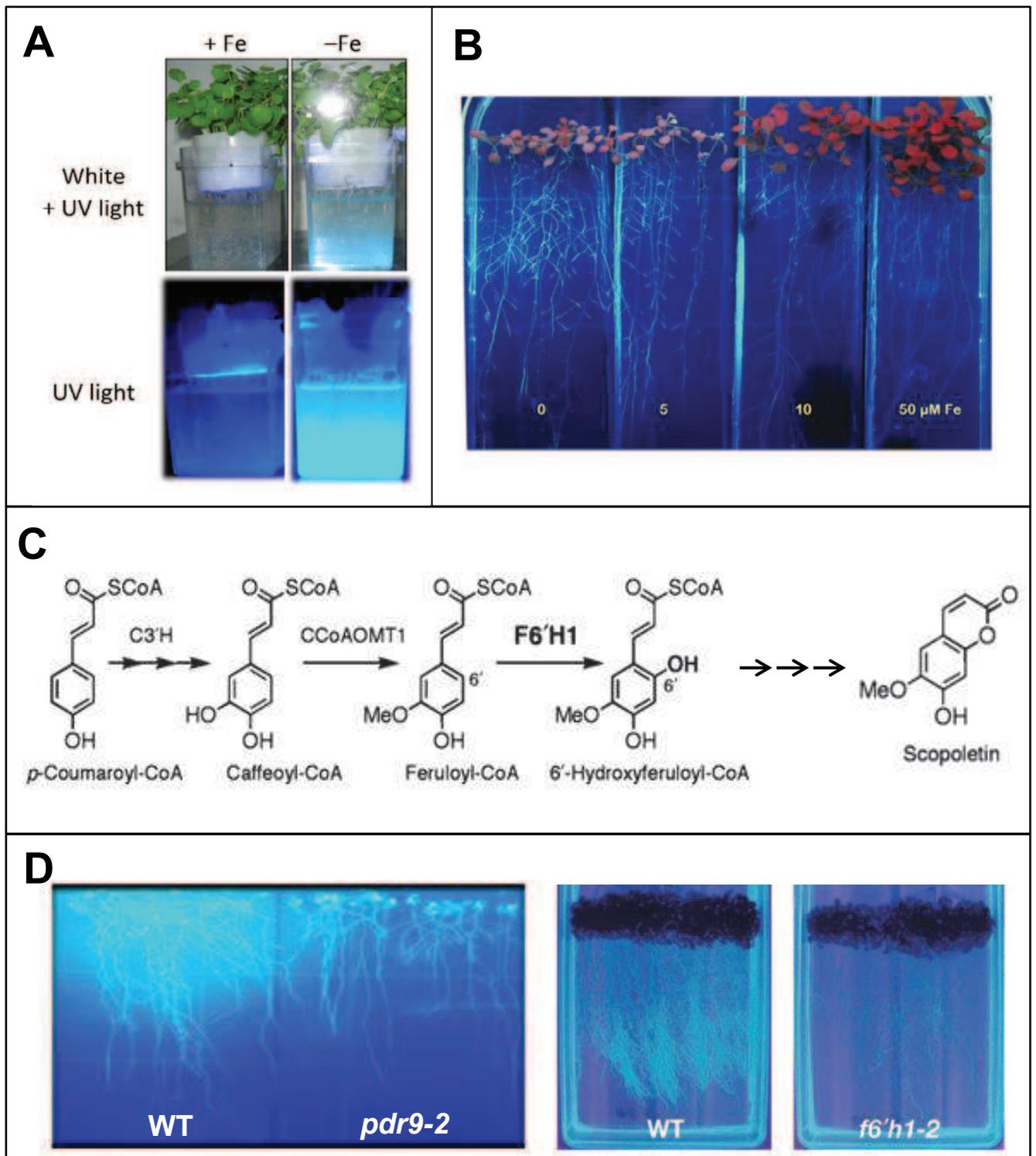


Figure 50 : PDR9 est un transporteur dont la fonction est d'excréter des composés phénoliques (coumarines) dans le sol afin de favoriser l'acquisition du fer. Des plantes de *Brassica napus* de 10 jours ont été placées 7 jours dans un milieu carencé en fer (-Fe) ou sont restées en condition contrôle (+Fe). Les plantes ont été observées à la lumière blanche et/ou aux UV à 365nm. Sous UV, une fluorescence a été observée dans le milieu en condition -Fe, correspondant aux composés phénoliques qui ont été excrétés par les racines (A). Des plantules d'*Arabidopsis thaliana* ont été cultivées verticalement sur boîte de pétri pendant 15 jours en présence de 0, 5, 10 et 50 μM de Fe-EDTA, puis ont été observées en lumière UV à 365nm. On constate que seules les racines des plantes carencées en fer présentent de la fluorescence, correspondant à la biosynthèse de composés phénoliques (B). La voie de biosynthèse de la scopoletine (composé phénolique majeur excrété par les racines de plantes soumises à une carence en fer) est dépendante des enzymes : C3'H (p-coumarate 3'hydroxylase), CCoAMT1 (CoA O-méthyltransferase 1) et F6'H1 (fêruloyl-CoA 6'-hydroxylase 1), et dérive de la voie de biosynthèse des lignines. L'étape catalysée par la F6'H1 est spécifique à la biosynthèse des composés phénoliques qui sont excrétés dans le milieu en réponse à une carence en fer, et conduit à la formation de composés coumarines, tels que la scopoletine. (C). Les plantes de *pdr9-2* et *f6'h1-2* excrètent moins de coumarines dans le milieu que les plantes sauvages (D). D'après Fourcroy *et al.*, 2014 et Kai *et al.*, 2008.

1. Introduction

Le fer est essentiellement présent dans le sol sous forme d'hydroxydes ferriques $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Ces composés sont très stables et peu solubles à pH neutre. Lorsque la concentration en fer présente dans la solution du sol diminue, les plantes perçoivent cette carence et induisent l'expression d'une série de gènes dont la fonction est de faciliter le prélèvement du fer. Chez les dicotylédones, la réductase *FRO2* va réduire le fer ferrique (forme insoluble) en fer ferreux (forme assimilable) et *IRT1* va transporter le fer ferreux du sol vers l'intérieur des racines (Brumbarova *et al.*, 2015). Ce processus est accompagné par une acidification du milieu extérieur *via* la sécrétion de protons par l' H^+ -ATPase *AHA2* afin de faciliter la solubilisation du fer présent dans le sol sous forme d'hydroxydes.

En parallèle à ce système de transport racinaire, il a été récemment montré que la nutrition en fer était couplée à la synthèse et à l'excrétion de composés phénoliques par la plante. Ces composés sont fluorescents aux UV (365nm) et sont essentiellement excrétés dans le milieu en absence de fer (Fig. 50A et B). Parmi les exsudats, plusieurs composés de type coumarines ont été identifiés tels que l'esculine, la scopoletine, la fraxetine ou encore l'isofraxetine (Fourcroy *et al.*, 2014 ; Clemens et Weber, 2016). La voie de biosynthèse et de sécrétion de ces composés phénoliques commence à être assez bien détaillée. Elle place la *F6'H1* (FERULOYL-CoA 6'-HYDROXYLASE 1) comme centrale dans cette voie pour la synthèse de la scopoletine (Kai *et al.*, 2008 ; Fig. 50C), et *PDR9* (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9) comme le transporteur responsable de son excrétion dans le sol (Fourcroy *et al.*, 2014). De façon intéressante, les plantes *pdr9* et *f6'h1* (perte de fonction) excrètent moins de coumarines dans le milieu que des plantes sauvages (Fig. 50D). Les deux gènes, *F6'H1* et *PDR9* sont induits transcriptionnellement par le facteur de transcription FIT, celui-là même qui induit l'expression de *FRO2* et *IRT1* en réponse à la carence en fer (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013). Cette observation suggérant que la synthèse des composés phénoliques et les mécanismes de prélèvement du fer sont probablement liés, voir même dépendant l'un de l'autre.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, le rôle de ces composés phénoliques n'était pas clairement établi. Il était proposé qu'ils puissent réduire et complexer le fer extracellulaire (Cesco *et al.*, 2010) ou moduler l'activité de la réductase *FRO2* (Higa *et al.*, 2010). Dans une autre étude, il avait été démontré que ces composés phénoliques pouvaient participer à la remobilisation du fer apoplasmique (Jin *et al.*, 2007). Plus récemment, ces composés phénoliques ont été identifiés pour solubiliser, chélater et réduire le fer présent dans le sol

(Bashir *et al.*, 2011 ; Ishimaru *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Celma *et al.*, 2013). En revanche, comment le fer solubilisé par l'intermédiaire de ces composés phénoliques était assimilé par la plante restait une question ouverte.

Pierre Fourcroy, un chercheur de notre équipe qui a identifié PDR9 comme étant le transporteur impliqué dans la sécrétion par les racines de ces composés phénoliques chez *Arabidopsis thaliana*, avait observé par imagerie spectrale (couplée à la microscopie confocale) que ces composés phénoliques étaient stockés à l'intérieur des vacuoles des cellules racinaires. Cette accumulation était très prononcée chez le mutant *pdr9* en condition de carence en fer (accumulation bien plus forte qu'en condition contrôle). L'hypothèse était que l'accumulation de composés phénoliques dans la cellule pouvant être toxique, la plante devait les stocker dans les vacuoles. C'est par exemple le cas pour une autre classe de composés phénoliques, les proanthocyanidines ou tannins (avec l'implication du transporteur TT12 ; Marinova *et al.*, 2007).

Afin de caractériser précisément le rôle de PDR9 dans la réponse à la carence en fer des plantes, nous avons mis en place trois approches différentes en collaboration avec Pierre Fourcroy :

(i) Nous avons validé la répartition sous-cellulaire des composés phénoliques dans les racines de plantes d'*Arabidopsis* par imagerie spectrale en microscopie confocale (collaboration avec Geneviève Conejero, plateforme d'imagerie RIO Imaging, Montpellier).

(ii) Dans le but de mieux comprendre comment se met en place le stockage vacuolaire des composés phénoliques, nous avons cherché à identifier un/des transporteur(s) responsable(s) de ce phénomène en réalisant des expériences de transcriptomique comparant les racines du mutant *pdr9* à celles de plante sauvage, en réponse à une carence en fer.

(iii) Nous avons cherché à identifier par des approches de génétique et de physiologie s'il existait un lien entre le système de prélèvement du fer FRO2/IRT1 et les composés phénoliques/PDR9. *FRO2*, *IRT1* et *PDR9* étant induits transcriptionnellement par FIT, il y avait de fortes chances qu'ils participent à un mécanisme commun de prélèvement du fer. Il s'agissait de répondre à trois questions : Existe-il un transporteur spécifique pour des complexes phénoliques-fer ? Le fer lié aux composés phénoliques est-il le même que celui prélevé par IRT1 ? Les composés phénoliques peuvent-ils à eux seuls réduire le fer ferrique du milieu sans l'implication de FRO2 ?

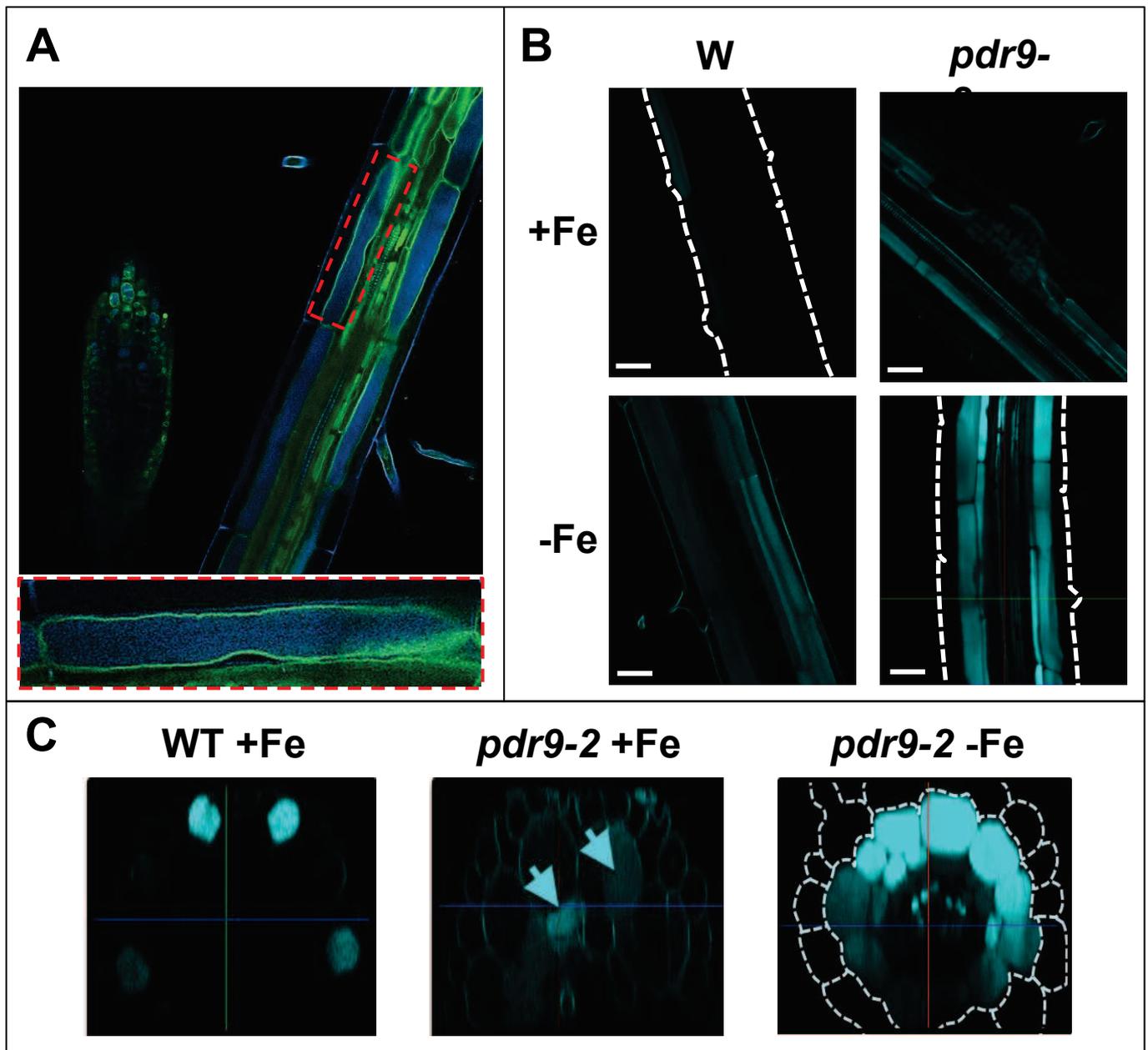


Figure 51 : Les composés phénoliques dans les racines de plantes sauvages et *pdr9-2*, révélés par imagerie spectrale couplée à la microscopie confocale.

Des plantes d'*Arabidopsis* transgéniques *p35S:TIP2;3:GFP* (marqueur du tonoplaste) âgées de 3 semaines, ont été placées 7 jours en milieu carencé en fer (-Fe) et on été observées en microscopie confocale à 470nm (vert : GFP) et aux UV à 365nm (bleu : composés phénoliques) (A). Des plantes sauvages (WT) et mutantes *pdr9-2* âgées de 3 semaines ont été placées 7 jours en milieu carencé en fer (-Fe) ou sont restées en milieu suffisant en fer (50µM), puis ont été observées aux UV afin de révéler la présence de composés phénoliques dans les racines. Barres d'échelle = 50µm (B). Des reconstitutions de coupes transversales de racines ont été réalisées à partir de la superposition des images des coupes longitudinales présentées panel B. Flèches = présence de composés phénoliques dans les cellules du cortex. Pointillés = représentation des contours des cellules de l'épiderme (C).

2. Résultats

2.1 Localisation racinaire des composés phénoliques.

Plusieurs études ont montré une forte accumulation des composés phénoliques dans les racines des mutants *pdr9* (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013 ; Fourcroy *et al.*, 2014). Dans le but d'étudier plus finement la répartition racinaire des composés phénoliques, nous avons observé par imagerie spectrale au microscope confocal des racines de plantes ayant subi une carence en fer (Fig. 51). L'ensemble des images obtenues sur des plantes sauvages en carence en fer montrait une fluorescence marquée dans les vacuoles des cellules épidermiques comportant des poils racinaires (Fig. 51). Afin de confirmer la localisation vacuolaire des composés phénoliques, des observations ont été réalisées sur des racines de plantes transgéniques exprimant un marqueur du tonoplaste (*p35S:TIP2;3:GFP*) soumises à une carence en fer (Fig. 51A). Une importante fluorescence à l'intérieur des vacuoles dans les cellules du cortex et de l'endoderme a été observée, confirmant le stockage vacuolaire de ces composés. Pour évaluer le rôle de PDR9 dans la dynamique de la répartition des coumarines, des racines de plantes sauvages et mutantes *pdr9* ont été observées en condition suffisante de fer ou après 7 jours de carence (Fig. 51B). À la différence des plantes sauvages qui accumulent en condition standard de culture (50µM de fer) les composés phénoliques dans certaines cellules de l'épiderme (Fig. 51B et C ; WT +Fe), les plantes *pdr9* présentent une fluorescence plus forte dans les cellules allant du cortex jusqu'à celles composant l'endoderme. Chez ces mutants, une fluorescence est même observée dans les cellules composant les tissus vasculaires (Fig. 51B et C ; *pdr9-2* +Fe et -Fe). La répartition globale des composés phénoliques observée dans le mutant *pdr9* en condition contrôle (+Fe) est très semblable à celle observée dans les racines des plantes sauvages lors d'une carence en fer. En absence de fer, la répartition des composés phénoliques dans les racines du mutant *pdr9* ne change pas (ou très peu) comparée à la condition contrôle, seule l'intensité de la fluorescence est augmentée, et donc la quantité des composés phénoliques stockés dans les vacuoles (Fig. 51B et C). Aucune fluorescence dans l'épiderme de ces racines n'est observée excepté chez les plantes sauvages en condition contrôle. Cette observation indique que lors d'une carence en fer, les composés phénoliques ne sont pas stockés (ou très brièvement) au niveau de l'épiderme. Cela démontrant que leur sécrétion est concomitante à leur production selon un flux continu entre synthèse au niveau du cortex (et/ou de l'endoderme) et sécrétion au niveau de l'épiderme. Enfin, ces données suggèrent que la sécrétion des composés phénoliques est un phénomène complexe qui fait intervenir différents types cellulaires racinaires et probablement

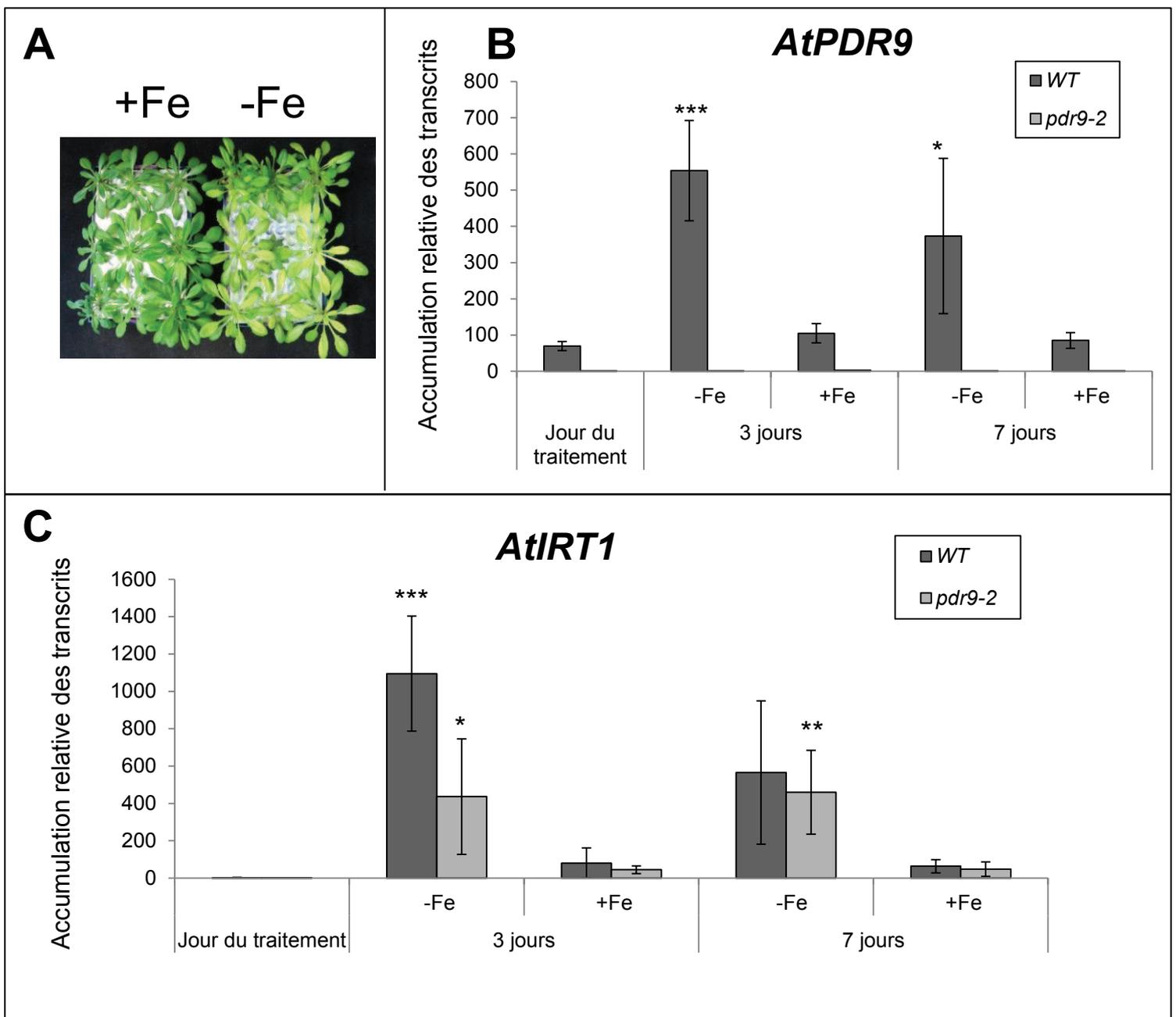


Figure 52 : Analyse transcriptomique du mutant *pdr9-2* : validation des échantillons.

Des plantes d'*Arabidopsis* sauvages (WT) et mutantes *pdr9-2* ont été cultivées en hydroponie durant 3 semaines, puis ont été carencées en fer pendant 3 ou 7 jours. Pour chacune de ces conditions, les racines ont été récoltées séparément. Les plantes ayant subi 7 jours de carence présentent un phénotype de chlorose (A). L'accumulation des transcrits de *PDR9* (B) et d'*IRT1* (C) a été obtenue par RT-qPCR. Les différences significatives par rapport au jour d'initiation du traitement ont été déterminées par un test de Student (*= $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$.)

plusieurs transporteurs dont les activités sont liées les unes aux autres (mécanismes de rétrocontrôle).

2.2 Analyse transcriptomique des racines du mutant *pdr9-2*.

2.2.1 Mise en place du système expérimental.

Afin d'identifier les acteurs moléculaires responsables de la répartition des composés phénoliques dans les racines, nous avons appliqué une carence en fer à des plantes sauvages et *pdr9* âgées de 3 semaines, puis nous avons prélevé leurs racines 3 et 7 jours après l'initiation du traitement. Nous avons ciblé notre analyse sur les racines de plantes cultivées en hydroponie car c'est dans ces organes que les composés phénoliques sont stockés. Les plantes carencées en fer durant 7 jours présentent un phénotype de chlorose indiquant que le stress a bien été établi (Fig. 52A). La quantification des ARNm d'*AtPDR9* nous a permis (i) de confirmer la perte de fonction du mutant *pdr9*, et (ii) de démontrer que le stress était perçu par la plante dès 3 jours après le début du traitement (augmentation des transcrits dans les plantes sauvages ; Fig. 52B). Cette dernière observation a été validée en analysant l'accumulation des messagers d'*AtIRT1* après l'établissement du traitement. Les ARNm d'*AtIRT1* augmentent en réponse à la carence en fer pour les 2 génotypes testés, avec une moindre accumulation pour *pdr9-2*. Le maximum de l'accumulation des ARNm est observé comme pour *AtPDR9* à 3 jours chez le sauvage (Fig. 52C). Ces résultats ont permis de valider le système expérimental que j'ai mis en place pour les analyses transcriptomiques du mutant *pdr9-2*.

2.2.2 Identification de groupes de gènes (clusters) potentiellement impliqués dans la répartition racinaire des composés phénoliques.

Les données d'expression de nombreux gènes identifiés à partir de l'expérience précédente ont été converties en carte thermique (heat map). Un test Anova à 1% incluant l'effet du traitement et celui du traitement par rapport à la mutation a été réalisé sur les données issues des puces à ADN. Cette approche a mis en évidence plusieurs patrons d'expression, 21 au total. Parmi eux, 2 sous-groupes de gènes présentent des profils d'accumulation intéressants, c'est-à-dire avec une expression plus forte lors d'une carence en fer dans les mutant *pdr9-2* à 3 jours ou à 3 et 7 jours par rapport aux sauvages (Fig. 53A et B). En effet, c'est le profil d'expression que nous attendons pour des gènes impliqués dans le stockage/transport des composés phénoliques lors d'une carence en fer, et dont l'expression serait induite en réponse à ce stress chez *pdr9*.

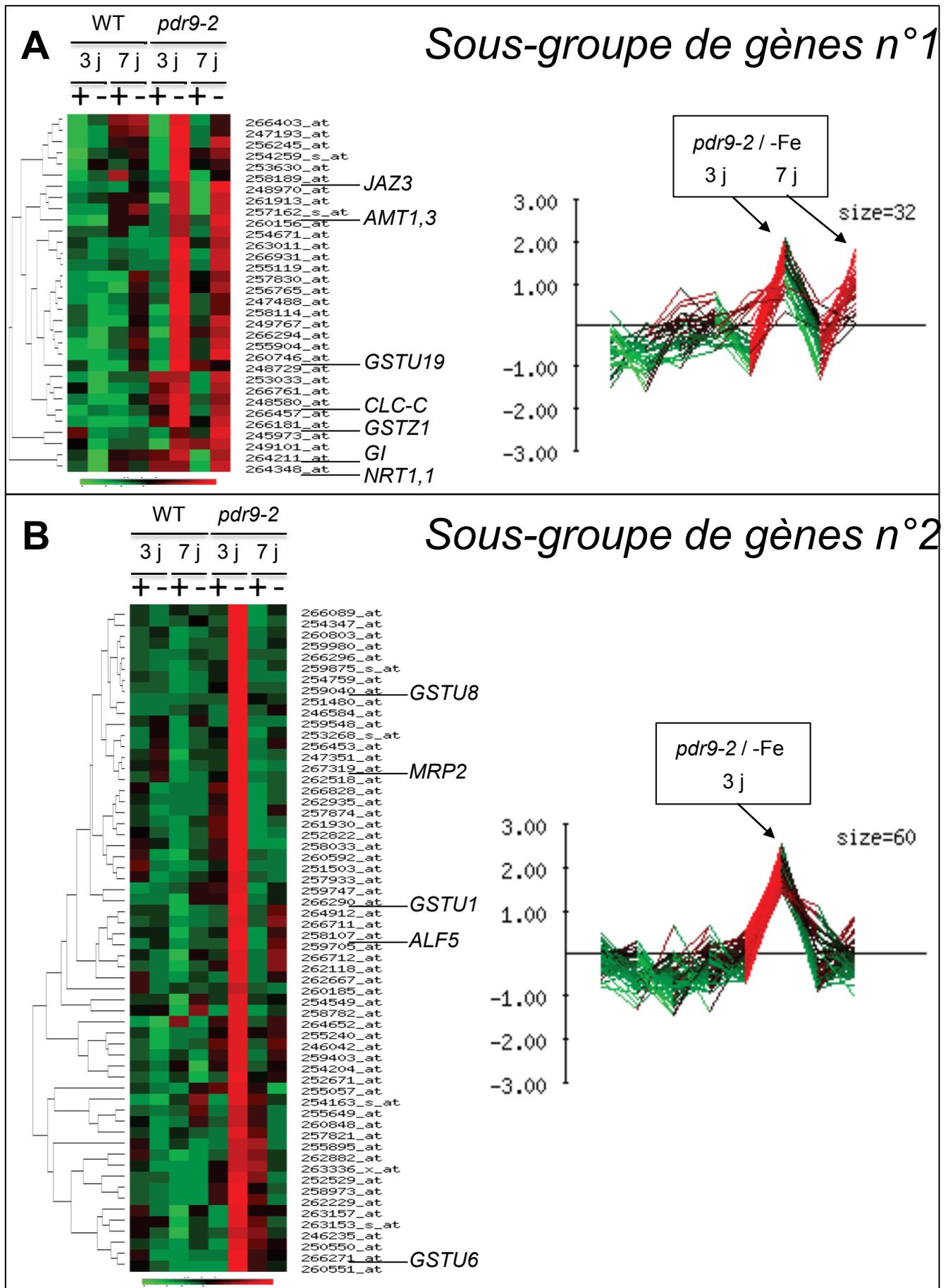


Figure 53 : Carte thermique des gènes différentiellement exprimés entre racines de plantes sauvages et *pdr9-2*, soumis ou non à 3 ou 7 jours de carence en fer, constituant les groupes 1 et 2. Un test ANOVA à 1% incluant l'effet de la mutation et celui du traitement /mutation à été réalisé sur l'ensemble des données issues de l'analyse transcriptomique et a permis d'isoler les gènes différentiellement exprimés. Nous nous sommes focalisés sur deux sous-groupes de gènes, dont l'accumulation des transcrits était induite dans les racines du mutant *pdr9-2* en carence en fer par rapport au sauvage. Les gènes composant les sous-groupes ont été organisés de manière hiérarchique (dendrogramme) en fonction de leurs profils d'expression (A et B).

Le premier sous-groupe (n°1) représente les gènes dont les ARNm sont suraccumulés à 3 et 7 jours après le début de la carence en fer. Ce groupe contient 32 gènes (Fig. 53A). Parmi les gènes appartenant à ce cluster, plusieurs sont associés à la régulation de l'expression des gènes en réponse à différents stress. C'est le cas pour *JAZ3* (*JASMONATE ZIM-DOMAIN3*) un inhibiteur de MYC2, associé à la signalisation jasmonate (Cf. Chapitre IV § 2.3.3). C'est aussi le cas pour *GI* (*GIGANTEA*), un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'horloge circadienne, la réponse au stress hydrique, et modulant le transport du cuivre chez les plantes (Ke *et al.*, 2016 ; Perea-Garcia *et al.*, 2016). Plusieurs transporteurs ont aussi été identifiés. C'est le cas de *NRT1.1/NPF6.3* (*NITRATE TRANSPORTER1/ NRT1/ PTR FAMILY 6.3*) ou *AMT1;3* (*AMMONIUM TRANSPORTER 1;3*), deux gènes impliqués dans l'homéostasie de l'azote et dont l'activité module la morphogénèse racinaire en fonction du statut en azote de la plante (Bouguyon *et al.*, 2016 ; Lima *et al.*, 2010). Ce cluster contient aussi le gène *CLC-C* qui code pour un transporteur tonoplastique (Brini et Masmoudi, 2012) permettant de séquestrer le Cl⁻ dans les vacuoles et dont la fonction semble associée à la résistance aux stress salins (Jossier *et al.*, 2010). Enfin, un ensemble de gènes particulièrement présents dans ce sous-groupe code pour des glutathiones S-transférases de classe *tau* ou *zeta* (respectivement GSTU19 et GSTZ1 ; Fig. 53A). Ces enzymes sont décrites dans la littérature comme étant impliquées dans le métabolisme secondaire, où elles participeraient au stockage vacuolaire de toxines (détoxification) ou de pigments tels que les flavonoïdes. Elles interviennent également dans les réponses au stress (stress oxydatif), ainsi que dans la translocation de signaux (perception des UV) et le métabolisme primaire (Dixon *et al.*, 2010).

Le second sous-groupe (n°2) représente les gènes dont les ARNm sont suraccumulés 3 jours après le début de la carence en fer. Ce groupe contient 60 gènes. Plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la répartition des composés phénoliques dans les racines ont été identifiés. Parmi eux, il y a des gènes codant des GST de classe *tau* (GSTU 1, 8 et 6) qui, comme nous l'avons vu pourraient être potentiellement impliquées dans la relocalisation des coumarines dans la racine. Ce sous-groupe contient également *MRP2* (*MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 2*) qui code pour un transporteur de type ABC permettant notamment le stockage vacuolaire de l'arsenic (Song *et al.*, 2014) et *ALF5* (*ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 5*), un transporteur d'efflux de type MATE (*MULTIDRUG AND TOXIN EXTRUSION*) fortement exprimé dans l'épiderme racinaire, et impliqué dans la tolérance des plantes à certaines toxines (Diener *et al.*, 2001).

AGI	Nom
<i>At3g59140</i>	ATMRP14, MRP14, multidrug resistance-associated protein 14
<i>At3g21250</i>	ATMRP6, MRP6, multidrug resistance-associated protein 6
<i>At3g23560</i>	ALF5, MATE efflux family protein
<i>At5g10820</i>	Major facilitator superfamily protein
<i>At2g34660</i>	ATMRP2, EST4, MRP2, multidrug resistance-associated protein 2
<i>At5g23810</i>	AAP7, amino acid permease 7
<i>At3g45720</i>	NPF, NRT1/PTR Family protein
<i>At5g65380</i>	MATE efflux family protein

Tableau 3 : Liste des gènes candidats potentiels pour la distribution des composés phénoliques dans les racines.

Parmi les 2 groupes de gènes significativement différents chez *pdr9-2* par rapport au sauvage, une liste de transporteurs candidats potentiels est présentée dans ce tableau (Cf. Fig. 53).

2.2.3 Les transporteurs candidats pour la distribution des composés phénoliques.

L'approche transcriptomique a mis en évidence une grande variation de profils d'accumulation des ARNm pour de nombreux gènes. Afin de mettre en place une analyse plus ciblée, une liste de transporteurs extraits des sous-groupes de gènes exprimés de manière significativement différente chez *pdr9-2* en carence en fer par rapport au sauvage (condition contrôle ou carence en fer), ou par rapport à *pdr9-2* en condition contrôle (Cf. §2.2.2) est présenté dans le tableau 3. Cette liste comprend 8 transporteurs appartenant à 6 groupes différents :

- *MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN (MRP 2, 6, et 14)*,
- *MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY*
- *AMINO ACID PERMEASE (AAP7)*
- *NRT1/PTR FAMILY (NPF, At3g45720)*
- *MULTIDRUG AND TOXIN EXTRUSION (MATE, At5g65380)*
- *ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION (ALF5)*

D'un point de vue plus global, cette analyse transcriptomique montre que de nombreux gènes (candidats), potentiellement associés au transport et à la distribution des composés phénoliques sont induits en réponse à la carence en fer et dans le mutant *pdr9-2*.

2.3 PDR9 et IRT1/FRO2, une seule machinerie pour l'assimilation du fer.

Molecular Plant

Letter to the Editor

CellPress
PARTNER JOURNAL

Facilitated Fe Nutrition by Phenolic Compounds Excreted by the *Arabidopsis* ABCG37/PDR9 Transporter Requires the IRT1/FRO2 High-Affinity Root Fe²⁺ Transport System

Dear Editor,

Iron (Fe) is an essential metal nutrient for plant productivity and plant product quality (Briat et al., 2015). Fe exists under two forms, ferrous (Fe²⁺) or ferric (Fe³⁺), and is very reactive with oxygen, explaining why Fe plant nutrition is dependent upon both Fe chelation and Fe reduction. Fe availability in the soil is pH dependent, this metal being particularly insoluble in its ferric form in calcareous soils, representing one-third of the world's cultivated soils. Consequently, plants grown on these soils, in particular non-graminaceous plants, often suffer from Fe deficiency, which alters their growth.

In response to Fe shortage, these plants have evolved a reduction-based mechanism to mine Fe from the soil. In *Arabidopsis*, Fe(III) chelates are reduced by the root FERRIC REDUCTION OXIDASE 2 (FRO2) activity, and the generated Fe²⁺ is subsequently transported across epidermal cells through the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) (Robinson et al., 1999; Vert et al., 2002; Brumbarova et al., 2015). In addition to this transport system anchored at the root epidermal cells, it was reported that Fe nutrition was facilitated by the synthesis and excretion of phenolic compounds (aromatic molecules issued from plant secondary metabolism) in red clover (Jin et al., 2007), belonging to the coumarin subfamily (i.e. plant-derived phenylpropanoids characterized by a 2H-1-benzopyrane-2-one backbone) as recently characterized in *Arabidopsis* (Rodríguez-Celma et al., 2013; Fourcroy et al., 2014; Schmid et al., 2014). In *Arabidopsis*, feruloyl coenzyme A 6'-hydroxylase 1 (F6'H1) has been shown to be a key enzyme for the synthesis of these phenolics in response to Fe deficiency, and the ABCG37/PDR9 transporter is responsible for their secretion in the external medium (Rodríguez-Celma et al., 2013; Fourcroy et al., 2014; Schmid et al., 2014). Both the F6'H1 and ABCG37/PDR9 genes are transcriptionally induced in response to Fe deficiency by the same transcription factor (FIT1, FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1) as the IRT1 and FRO2 genes encoding the high-affinity Fe²⁺ transport system (Rodríguez-Celma et al., 2013; Schmid et al., 2014). In red clover, these phenolics were able to remobilize Fe(III) trapped in the cell wall (Jin et al., 2007). In *Arabidopsis* the root exudates of Fe-deficient plants were able to mobilize 17-fold more Fe (present as Fe hydroxide at alkaline pH) than exudates of Fe-sufficient plants, and this was almost abolished in exudates from Fe-deficient f6'h1 mutant plants (Schmid et al., 2014). The Fe(III) mobilization capacity of these root exudates was associated with the formation of Fe(III) complexes with catechols (aromatic compounds containing a 1,2-dihydroxybenzene moiety allowing

the formation of stable complexes with various di- and trivalent metal ions), and was significantly decreased after passing through a Sep-Pak C18 column (Schmid et al., 2014). Sep-Pak C18 columns are used to adsorb hydrophobic molecules from aqueous solutions, including phenolic compounds (Fourcroy et al., 2014). It has been therefore hypothesized that the increased secretion of phenolics by Fe-deficient plants could help to mobilize Fe(III) precipitates found in calcareous soils. In red clover, Jin et al. (2007) reported that the ferric reductase activity and acidification of the medium (two well-known responses of non-graminaceous plants to Fe deficiency) were increased upon phenolics removal from the culture medium, leading these authors to conclude that enhanced reductase and proton extrusion are likely not involved in taking up cell wall Fe(III) solubilized by secreted phenolics.

This raised the question of the mechanism(s) by which secreted phenolics facilitate Fe nutrition of Fe-deficient plants. If it is well established that these coumarin derivatives could act by chelating Fe(III) (Jin et al., 2007; Schmid et al., 2014), it remains to be determined, as suggested by Rodríguez-Celma and Schmidt (2013), whether or not: (1) the resulting complexes could be translocated into the roots through the activity of an unknown transporter present at the plasma membrane of root epidermis cells, (2) the resulting complexes could be used as substrate for the FRO2 reductase, or (3) that coumarins could reduce Fe(III) to Fe(II).

To discriminate between these three possibilities, we have set up an experimental design (Supplemental Figures 1 and 2) in which root exudates from Fe-deprived *Arabidopsis* plants were used to complement growth defects associated with the presence of a low amount of Fe in a poorly available form for plants (FeCl₃ at alkaline pH, in the culture media).

In this experiment, 4-week-old *Arabidopsis* wild-type, fro2, and irt1 plants were transferred for 7 days to media deprived of Fe. As expected, this led enhanced expression of the IRT1 and FRO2 genes encoding the high-affinity root Fe²⁺ transport system and of the ABCG37/PDR9 gene encoding the phenolic transporter (Figure 1A–1C and Supplemental Figure 1). Following this treatment, plants from each genotype were divided into five pools, each of them being transferred to a different culture medium (Supplemental Figure 2 and Figure 1D). Medium

Published by the Molecular Plant Shanghai Editorial Office in association with Cell Press, an imprint of Elsevier Inc., on behalf of CSPB and IPPE, SIBS, CAS.

Molecular Plant 9, 485–488, March 2016 © The Author 2016. 485

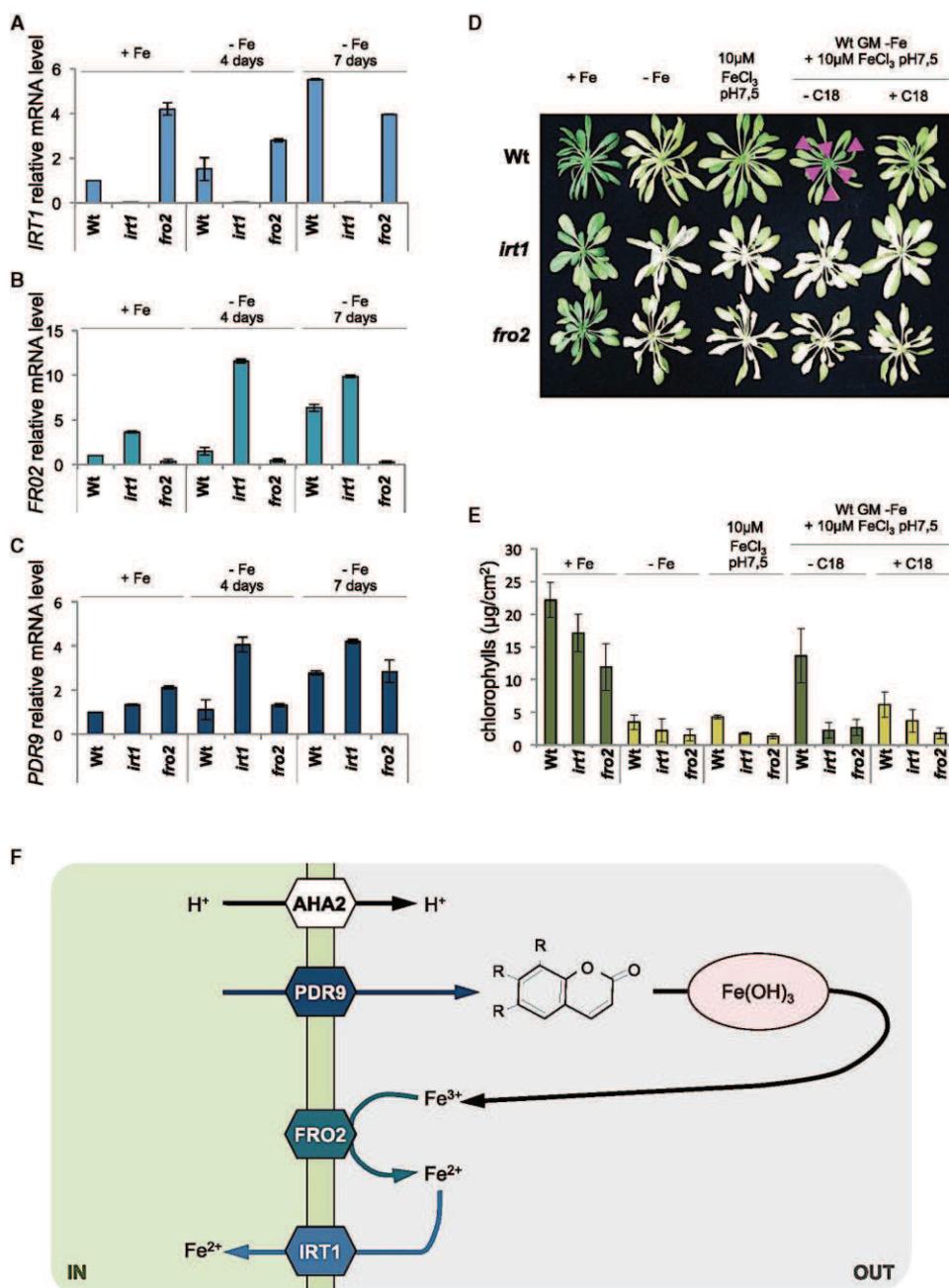


Figure 1. The Positive Effect of Secreted Phenolic Compounds on Fe Acquisition Requires the FRO2 Reductase and the IRT1 Transporter.

(A–C) Quantitative RT–PCR analysis of the *IRT1* (A), *FRO2* (B), and *ABC37/PDR9* (C) mRNA levels measured in roots of wild-type (Wt), and *irt1* and *fro2* loss-of-function mutants prior and 4 and 7 days after iron deprivation (-Fe).

(D) Wt, *irt1*, and *fro2* rosette phenotype after 10 days of treatments (Supplemental Figure 2). Arrowheads in magenta indicate leaves that were sampled for chlorophyll measurements (i.e. same leaf rank for all genotypes and treatments).

(legend continued on next page)

Letter to the Editor

supplemented with Fe(III)-EDDHA (Fe form easily assimilated by the plant) was used as positive control, whereas media deprived of Fe or supplemented with FeCl₃ at pH 7.5 were used as negative controls. Lastly, growth media from Fe-deprived *Arabidopsis* wild-type plants supplemented with FeCl₃ at pH 7.5, filtered or not through a Sep-Pak C18 column, were assayed (i.e. deprived or not deprived of root phenolic exudates, respectively; Supplemental Figure 1). Because it is known that chlorophyll content is correlated with the amount of iron present in the plant, chlorophyll measurement is an appropriate indicator of the iron status of the plant (Thoiron et al., 1997). Therefore, after 10 days of growth in these different media, Fe status of each genotype was assessed through the measurement of chlorophyll contents (Figure 1E). As expected, and regardless of the genotype, the plants grown on Fe(III)-EDDHA displayed a higher chlorophyll content than plants grown on growth media lacking Fe or supplemented with FeCl₃ at pH 7.5. We also confirmed that wild-type plants grown on growth medium from Fe-deprived *Arabidopsis* plants supplemented with FeCl₃ at pH 7.5 displayed a chlorophyll content comparable with that in plants grown on excess Fe(III)-EDDHA. Conversely, when wild-type plants were grown using the same growth medium but filtered through a Sep-Pak C18 column, the measured chlorophyll content was comparable with that of plants grown in the absence of Fe, or in the presence of FeCl₃ at pH 7.5. This observation confirmed the role played by the phenolic compounds present in root exudate of Fe-deprived *Arabidopsis* plants in remobilizing insoluble Fe(III) chelates present in the growth media. In contrast, the chlorophyll content measured for *irt1* and *fro2* mutant plants grown on growth medium from Fe-deprived *Arabidopsis* plants supplemented with FeCl₃ at pH 7.5 filtered on a Sep-Pak C18 column was undistinguishable from that in plants grown on the unfiltered medium (Figure 1E). This latter observation indicates that the *IRT1/FRO2* high-affinity root Fe²⁺ transport system is necessary for the plant to assimilate the insoluble Fe(III) present in the growth medium that is remobilized by the phenolic compounds present in the root exudate.

The involvement of the phenolic compounds present in the root exudate in remobilizing the insoluble Fe(III) present in the growth medium is unambiguous; however, it cannot be ruled out that additional molecules could play a role in this process, because of the properties of Sep-Pak C18 columns which are designed to non-specifically adsorb hydrophobic molecules from aqueous solutions.

In conclusion, the positive effect of secreted phenolic compounds on Fe acquisition requires the *FRO2* reductase and the *IRT1* transporter. Here, we demonstrate that the function of these molecules for Fe nutrition is to facilitate Fe(III) availability for the *FRO2* reductase to generate Fe²⁺ that will be then transported through *IRT1* activity (Figure 1F). The contribution of the phenolics to Fe(III) reduction is unlikely because they do not complement the *fro2* mutation, and the existence of a putative Fe(III)-phenolic complex transporter is also improbable because

Molecular Plant

a functional *IRT1* is required to observe the positive effect of the phenolics on Fe nutrition (Figure 1D–1F).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information is available at *Molecular Plant Online*.

FUNDING

N.T. was supported by a fellowship from the French Ministère De l'Enseignement Supérieur Et De La Recherche.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: P.F. and C.D.; methodology: P.F. and C.D.; investigation: P.F., N.T., and C.D.; writing, original draft: C.D. and J.-F.B.; writing, review and editing: N.T., F.G., J.-F.B., and C.D.; funding acquisition: F.G. and C.D.; supervision: P.F. and C.D.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Amel Maghiaoui for excellent technical support. No conflict of interest declared.

Received: July 24, 2015

Revised: September 2, 2015

Accepted: September 17, 2015

Published: September 25, 2015

Pierre Fourcroy^{1,2,3}, Nicolas Tissot^{1,2},
Frédéric Gaymard¹, Jean-Francois Briat¹ and
Christian Dubos^{1,*}

¹Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Montpellier, SupAgro, Bat 7, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

²These two authors contributed equally to this article.

³This paper is dedicated to the Memory of Pierre Fourcroy, a CNRS researcher, who died suddenly before having seen the achievement of this work, to which he had largely contributed to initiate.

*Correspondence: Christian Dubos (christian.dubos@supagro.inra.fr)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.010>

REFERENCES

- Briat, J.F., Dubos, C., and Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci.* **20**:33–40.
- Brumbarova, T., Bauer, P., and Ivanov, R. (2015). Molecular mechanisms governing *Arabidopsis* iron uptake. *Trends Plant Sci.* **20**:124–133.
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Rey, G., Gaymard, F., Abadía, A., Abadía, J., Alvarez-Fernández, A., and Briat, J.F. (2014). Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* **201**:155–167.
- Jin, C.W., You, G.Y., He, Y.F., Tang, C., Wu, P., and Zheng, S.J. (2007). Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiol.* **144**:278–285.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., and Guerinot, M.L. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**:694–697.

(E) Wt, *irt1*, and *fro2* chlorophylls content of rosette leaves indicated by magenta arrowheads in (D), after 10 days of treatments.

(F) Schematic representation of the reduction-based iron-acquisition mechanism at the plasma membrane of root epidermis cells. AHA2 is a proton-ATPase involved in rhizosphere acidification that is strongly induced by Fe deficiency. Similarly, PDR9, *FRO2*, and *IRT1* are strongly induced under Fe deficiency. Secreted coumarins through the PDR9 transporter will facilitate Fe(III) availability (mostly present in soil as iron hydroxide, Fe(OH)₃) to the *FRO2* reductase to generate Fe²⁺ that will then be transported into the plant through *IRT1* activity.

Molecular Plant

- Rodríguez-Celma, J., and Schmidt, W. (2013). Reduction-based iron uptake revisited: on the role of secreted iron-binding compounds. *Plant Signal. Behav.* **8**:e26116.
- Rodríguez-Celma, J., Lin, W.D., Fu, G.M., Abadía, J., López-Millán, A.F., and Schmidt, W. (2013). Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **162**:1473–1485.
- Schmid, N.B., Giehl, R.F., Döll, S., Mock, H.P., Strehmel, N., Scheel, D., Kong, X., Hider, R.C., and von Wirén, N. (2014). Feruloyl-CoA 6'-

Letter to the Editor

- hydroxylase¹-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **164**:160–172.
- Thoirion, S., Pascal, N., and Briat, J.F. (1997). Impact of iron deficiency and iron resupply during the early stages of vegetative development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Environ.* **20**:1051–1060.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, 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.

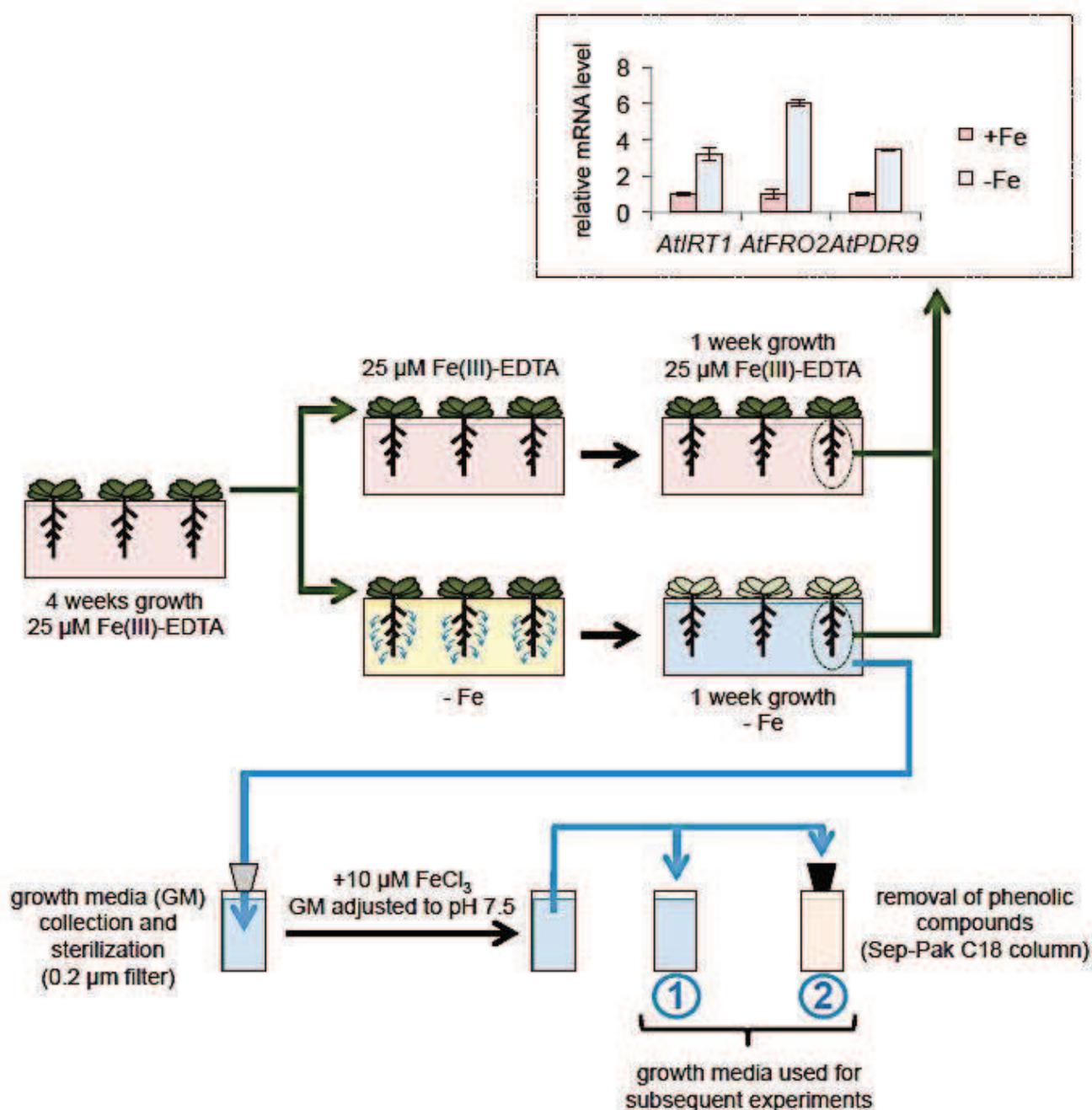


Figure S1. Preparation of growth media (GM) from wild type plant subjected to iron (Fe) deprivation. Wild type (Columbia) Arabidopsis plants were hydroponically grown using the Hoagland nutrient solution for 4 weeks (in presence of 25 μM of Fe(III)-EDTA), and were then transferred to fresh media containing either 25 μM of Fe(III)-EDTA (control condition) or deprived of Fe. 4 days after the beginning of the treatments, roots of a subset of plants were collected, from which quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of the *IRT1*, *FRO2* and *PDR9* mRNA levels were carried out. The observed increased transcript abundance for these 3 genes in response to Fe deprivation was ensuring that the stress was successfully applied. After 7 days of culture, growth medium (GM) of the remaining plants grown in the absence of Fe was collected, filtered (0.2 μm pores - removal of microorganisms), supplemented with 10 μM of FeCl₃, and the pH was adjusted to 7.5 (using HEPES as buffering agent) (blue circle 1). Half of the medium was then filtered through a Sep-Pak C18 column in order to remove the phenolic (*i.e.* coumarins) compounds present in root exudates (blue circle 2). Both media were then stored at 4°C before. Blue arrows: phenolic exudates; red dots: Fe in a low solubility form (FeCl₃ at pH7.5).

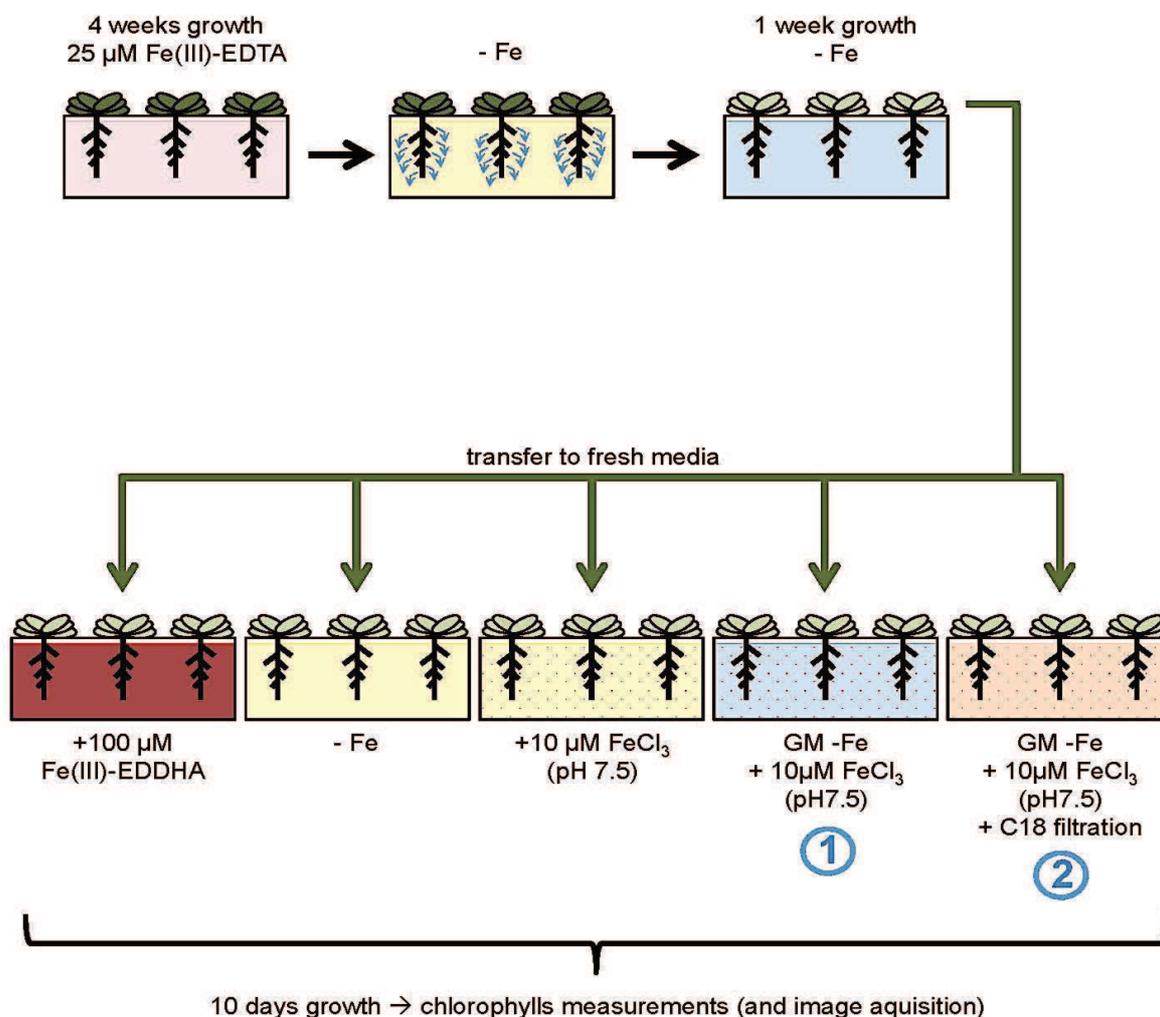


Figure S2. Experimental design used to demonstrate that the positive effect of secreted phenolic compounds on Fe acquisition requires the FRO2 reductase and the IRT1 transporter. Wild type, *irt1* and *fro2* (all in Columbia background) Arabidopsis plants were hydroponically grown using the Hoagland nutrient solution for 4 weeks (in presence of 25 μM of Fe(III)-EDTA), and then transferred to fresh media deprived of Fe for an additional week. Plants were then separated into 5 pools, and transferred to 5 different media for an additional 10 days. At the end of the experiment, plants were collected and chlorophyll content measured. GM: growth media described in Figure S1. Blue arrows: phenolic exudates; red dots: Fe in a low solubility form (FeCl₃ at pH 7.5).

3. Discussion

La caractérisation du mutant *pdr9* a permis de mettre en évidence qu'il existait une dynamique au niveau spatiotemporel des composés phénoliques dans les racines des plantes en réponse à la carence en fer. Avant cette étude, cette dynamique n'était pas soupçonnée. L'hypothèse étant que les composés phénoliques étaient synthétisés là où ils étaient excrétés, c'est à dire au niveau de l'épiderme. Ces composés phénoliques sont fluorescents aux UV et sont amassés dans les vacuoles des cellules racinaires au niveau de la zone de maturation (Fig. 51A). En condition de fer suffisant, les coumarines s'accumulent dans les vacuoles des cellules de l'épiderme et plus spécifiquement dans celles qui deviendront des poils absorbants (Fig. 51B). En carence, ces cellules excrètent les composés dans le sol *via* PDR9, et c'est alors que leur production augmente dans la zone du cortex et de l'endoderme (Fig. 51B et C). Il est à noter que cette production passe par une étape faisant intervenir le compartiment vacuolaire, probablement afin d'éviter une suraccumulation de ces composés dans la cellule qui serait toxique pour cette dernière. Dans le cas des mutants *pdr9* en condition suffisante en fer, les composés sont absents de l'épiderme, en revanche, ils s'accumulent comme chez le sauvage en carence, c'est-à-dire dans la zone du cortex et de l'endoderme (Fig. 51B et C). Cela semble indiquer que la perception du mutant *pdr9* (indépendamment de la concentration en fer dans le milieu) pour la répartition des coumarines est similaire à celle de la plante sauvage carencée en fer. Or chez un mutant *pdr9* en condition contrôle, les mécanismes moléculaires de réponse à la carence ne sont pas induits (Fig. 52C). Prises dans leur ensemble, ces observations laissent à penser que l'activité de PDR9 (au travers de l'accumulation des composés phénoliques au niveau de l'épiderme) exerce un rétrocontrôle sur les mécanismes de transport des composés phénoliques, de leur lieu de production vers celui de leur excrétion. Ce type de rétrocontrôle a déjà été décrit pour d'autres métabolites secondaires associées à la voie des phénylpropanoïdes. Il a par exemple été montré qu'une dérégulation de l'activité des gènes spécifiquement dédiés à la biosynthèse des tannins dans la graine d'*Arabidopsis thaliana* affectait en retour l'expression des gènes (situés en amont) impliqués dans la biosynthèse des précurseurs nécessaires à la production des tannins (Dubos *et al.*, 2008).

La nutrition en fer *via* les composés phénoliques dépend des mécanismes de prélèvement gouvernés par IRT1 et FRO2 (Cf. article §2.3). Toutefois, le lien réciproque n'est pas établi. Les données bibliographiques indiquent que *F6'HI* et *PDR9* sont transcriptionnellement induits par le facteur de transcription FIT, tout comme *FRO2* et *IRT1* (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013). Ce constat laisse donc à penser que FIT gouvernerait le

prélèvement du fer en impliquant sa solubilisation par les composés phénoliques. Une nouvelle fois, la dynamique et la complexité des réponses moléculaires à la carence en fer sont mises en évidence. FIT est actuellement le seul facteur de transcription de type bHLH induit transcriptionnellement en carence en fer indépendamment des mécanismes gouvernés par BTS et les bHLH du sous-groupe IVc. Il est même établi que FIT, en réponse à la carence en fer, induit transcriptionnellement *NAS4*, alors que dans un même temps PYE l'inhibe (Palmer *et al.*, 2013). La sensibilité du mutant perte de fonction *nas4* sur des sols alcalins pourrait témoigner du lien entre les composés phénoliques et les réponses modulées par FIT. En lien avec ces données, il a été montré que comme pour le gène *NAS4*, MYB72 est responsable de l'induction transcriptionnelle de *PDR9* (Zamioudis *et al.*, 2014). Dans cette même voie, un autre gène impliqué dans la sécrétion des composés phénoliques en réponse à la carence en fer a aussi été décrit comme étant une cible de MYB72. Il s'agit de *BGLU42*, un gène codant une β -D-Glucosidase de la famille GH1 (Glycoside Hydrolase 1) impliqué dans la glycosylation des composés phénoliques (Garcia *et al.*, 2010). Cette étape pourrait notamment mener à leur excrétion. MYB72 (comme MYB10, son homologue fonctionnel) est une cible de FIT (Palmer *et al.*, 2013), il n'est donc pas exclu que l'expression de *F6'H1* soit régulée par ce facteur de transcription. Par ailleurs, MYB72 agit de manière redondante avec MYB10 pour réguler l'expression de *NAS4*. Il serait donc intéressant de réaliser une analyse d'accumulation des transcrits pour *PDR9* et la *F6'H1* chez le double mutant *myb10myb72*. En effet, cela permettrait d'évaluer l'importance relative de ces deux facteurs de transcription dans l'expression de *PDR9* et de la *F6'H1*. Ces expériences permettraient potentiellement d'intégrer les régulations de la voie de synthèse et d'excrétion des composés phénoliques au transport longue distance du fer impliquant *NAS4*, et plus généralement aux mécanismes moléculaires qui gouvernent l'homéostasie du fer.

L'analyse transcriptomique a montré que l'expression de nombreux gènes était modifiée dans le mutant *pdr9* (Fig. 53A et B). Parmi les gènes identifiés, plusieurs codaient pour des glutathion S transférases (GSTs). Les GSTs participent à la détoxification des cellules en catalysant l'assemblage du glutathion (GSH) avec des molécules toxiques électrophiles. Cette fonction est notamment rencontrée pour les métaux lourds afin de les stocker dans les vacuoles ce qui, d'un point de vue global, modifie la distribution du fer dans la plante (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2008). Par ailleurs, les GST interviennent également dans la séquestration vacuolaire des anthocyanes (Alfenito *et al.*, 1998). Ces enzymes ont aussi une activité de peroxydase (détoxification de l' H_2O_2) ou d'isomérase (comme pour la thiadiazolidine par exemple) afin de protéger la cellule (Jablonkai *et al.* 1997). L'ensemble de

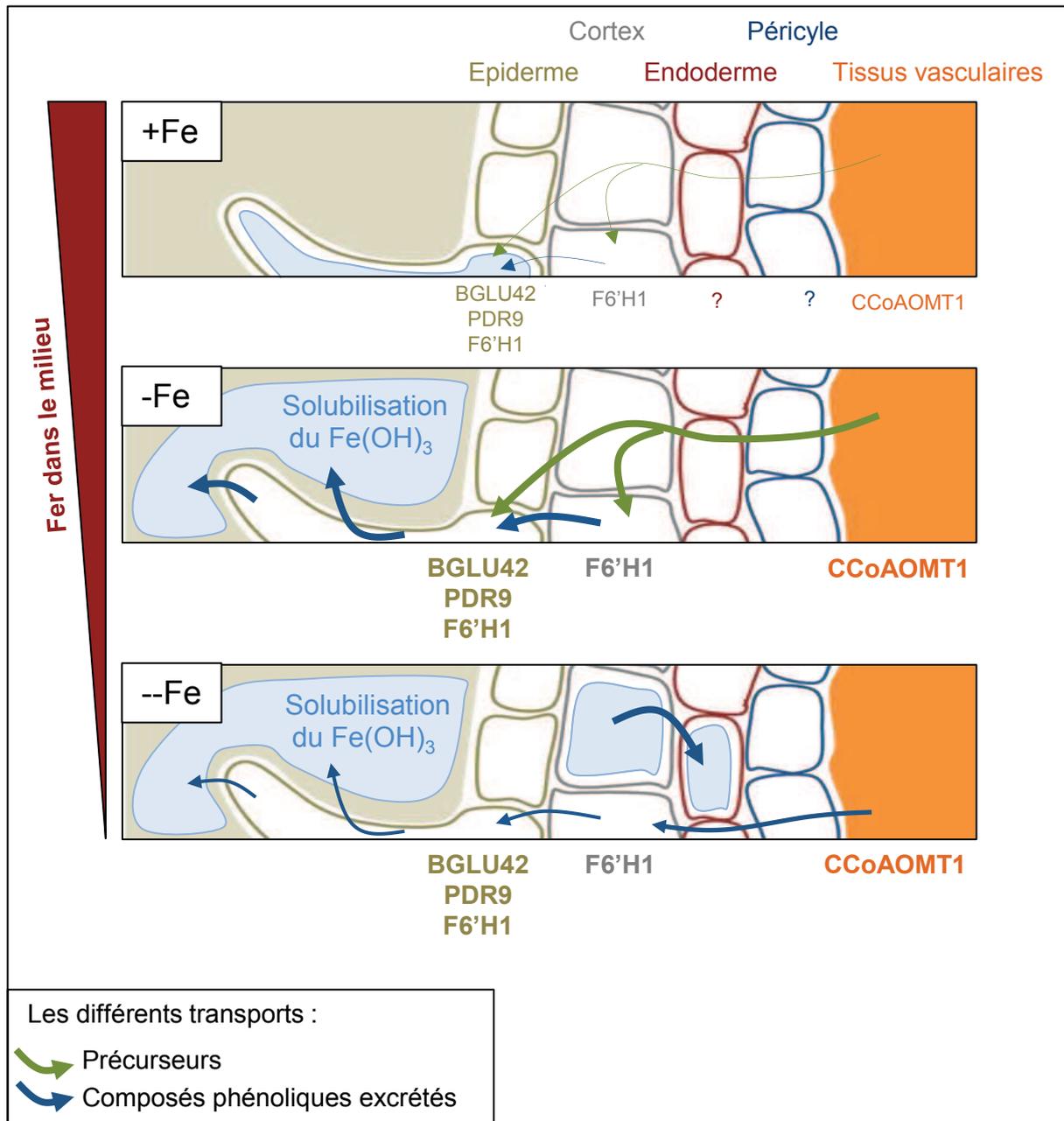


Figure 54 : Modèle hypothétique représentatif de la dynamique des composés phénoliques en fonction de la disponibilité en fer du sol. En condition contrôle (+Fe), les plantes accumulent faiblement les composés phénoliques dans la vacuole des cellules de l'épiderme racinaire. Les précurseurs des composés phénoliques excrétés sont transportés depuis la zone où se développent les tissus vasculaires vers le cortex et l'épiderme, selon un mécanisme encore inconnu. C'est au niveau du cortex et de l'épiderme que prend place la première étape spécifique à leur biosynthèse, catalysée par la F6'H1. En situation de carence, toute la voie de synthèse va être induite, depuis la CCoAOMT1 localisée dans les tissus vasculaires jusqu'à la F6'H1. De la même manière BGLU42 et PDR9 sont induits au niveau de l'épiderme afin de, respectivement glycosyler et excréter les composés phénoliques dans le milieu. Enfin, lorsque la carence est prolongée (--Fe), ces composés semblent se relocaliser dans les cellules du cortex et de l'endoderme. L'épaisseur des flèches correspond à l'intensité supposée du flux de composés phénoliques au travers des tissus/cellules de la racine. Le format du caractère employé pour nommer les enzymes correspond au taux d'activité supposé de ces dernières.

ces fonctions nous suggèrent fortement que les GSTs interviendraient dans le stockage vacuolaire des coumarines. D'autre part, plusieurs types de transporteurs ont également été identifiés. C'est par exemple le cas de trois transporteurs de type MRPs, dont l'expression est fortement induite dans le mutant *pdr9*. Ces transporteurs sont impliqués dans la translocation de composés secondaires glutathionés (comme les anthocyanes) dans les vacuoles des plantes (Martinoia *et al.*, 1993 ; Yazaki 2006). Les MRPs interviendraient donc en aval des GSTs pour transporter les composés phénoliques glutathionés dans les vacuoles des cellules, notamment au niveau du cortex. Dans notre expérience, il est probable que les GSTs couplés aux transporteurs de type MPRs servent au maintien de l'intégrité cellulaire en évitant aux coumarines d'être suraccumulées dans le cytoplasme et d'engendrer des réactions néfastes pour la cellule. Le système de rétrocontrôle potentiel, impliqué dans l'induction des mécanismes de stockage des composés phénoliques dans les vacuoles du mutant *pdr9*, reste à être identifié et pourrait impliquer la voie GST/MRP.

Parmi les gènes codant pour des transporteurs que nous avons identifiés, *CIC-C* semble être un candidat particulièrement intéressant. Principalement exprimé dans les cellules de garde et le pollen, il l'est également faiblement dans les racines et plus particulièrement dans les cellules du cortex ou de l'épiderme (Jossier *et al.*, 2010). L'expression de *CIC-C* est induite chez le mutant *pdr9-2*, ce qui suggère qu'il pourrait contribuer à la répartition des composés phénoliques en modulant le potentiel de turgescence de certaines cellules. En effet, ce transporteur vacuolaire indispensable à l'homéostasie du Cl⁻ interviendrait par exemple pour charger les vacuoles des cellules de l'épiderme en Cl⁻, ce qui augmenterait leur potentiel de turgescence et orienterait les composés phénoliques vers l'intérieur de la racine. Un autre transporteur, *At3g45720*, membranaire cette fois, pourrait contribuer à cette voie en transloquant du Cl⁻ de cellule à cellule (Li *et al.*, 2015). En parallèle à ces mécanismes osmotiques, plusieurs transporteurs identifiés pourraient intervenir dans la répartition des composés coumarines (Tableau 3). *ALF5* et *At5g65380*, deux transporteurs de type MATE serviraient eux à extraire les composés phénoliques afin qu'ils ne s'accumulent pas dans certaines cellules (Diener *et al.*, 2001). Au vu de leurs domaines d'expression, *ALF5* permettrait le déchargement des cellules de l'épiderme pendant que *At5g65380* gèrerait celui de certaines cellules du cortex ou de l'endoderme. Ainsi le fonctionnement des cellules épidermiques, siège de l'absorption minérale, ne serait pas bouleversée par l'accumulation de composés phénoliques dans le cytoplasme.

Un ensemble d'hypothèses sur les flux intercellulaires racinaires est représenté dans le modèle présenté Figure 54. Lorsque la plante se développe sur un milieu suffisant en fer, les

composés phénoliques synthétisés dans les cellules internes des racines par la CCoAOMT1 vont être accumulés dans la vacuole de certaines cellules de l'épiderme pour permettre ponctuellement la solubilisation du fer. Aucune fluorescence n'étant observée (des cellules vasculaires jusqu'à celles composant le cortex) et connaissant le domaine d'accumulation de la F6'H1, nous supposons que ce sont les précurseurs des composés phénoliques (les Feruloyl-Coa), qui transitent (Fig. 54). Il est très probable que la F6'H1 soit active dans le cortex, ce qui impliquerait un transport des coumarines vers les cellules de l'épiderme. Dans la configuration où la plante se développe sur un milieu dépourvu de fer (-Fe), les composés phénoliques vont être glycosylés par BGLU42 et excrétés par PDR9 dans le sol. Cette carence en fer va induire l'expression de *BGLU42*, *PDR9*, *F6'H1* et *CCoAOMT1*, gènes codant les acteurs de la synthèse ou de l'excrétion des coumarines. Lors d'une carence plus marquée ou plus longue (--Fe), les composés sont suraccumulés dans les vacuoles des cellules du cortex et de l'endoderme. Le fait qu'une fluorescence soit observée à cette localisation implique qu'il existerait un mécanisme « d'internalisation » de ces composés phénoliques vers des couches cellulaires plus internes. Cette supposition n'est valable que si on fait l'hypothèse que les composés phénoliques visualisés en imagerie spectrale sont les composés excrétés et non pas leurs précurseurs. Pour y répondre, il serait intéressant de réaliser des observations en imagerie spectrale sur les mutants *f6'h1*, *ccoamt1* et *bglu42*. Ainsi, si le mutant *f6'h1* présente le même phénotype en imagerie spectrale que *pdr9*, cela signifierait que les fluorescences observées sont témoins des précurseurs, et non des coumarines elles-mêmes. Enfin, en parallèle à ce travail, l'utilisation de cette même approche pour les mutants des transporteurs identifiés dans l'approche transcriptomique pourrait permettre d'identifier ceux qui ont un rôle dans la distribution des composés phénoliques.

Discussion et perspectives

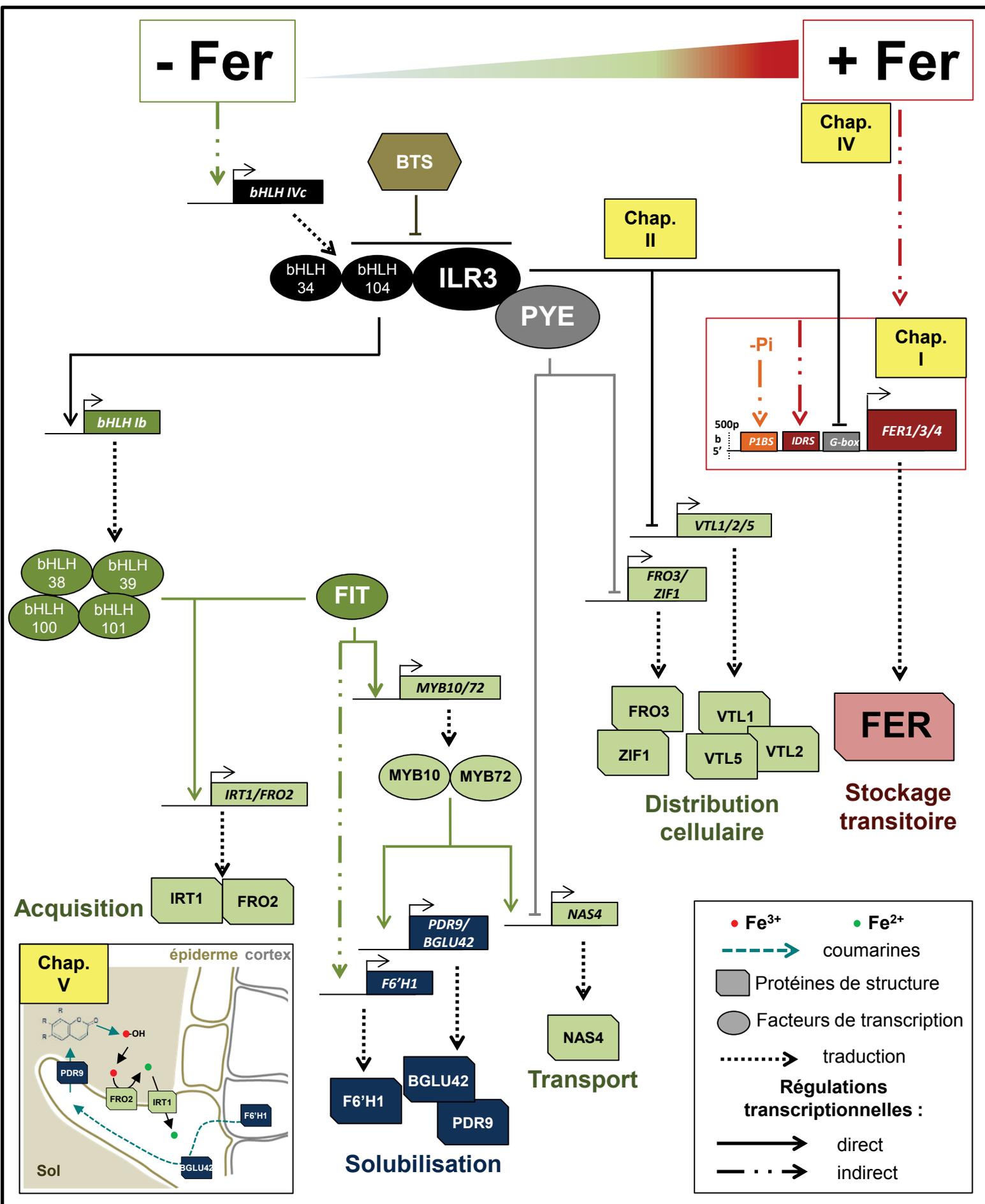


Figure 55 : Modèle intégré des régulations géniques du maintien de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis*. ILR3 est un acteur de l'intégration de la nutrition en fer chez *Arabidopsis*. Ce facteur de transcription va réguler l'acquisition, le transport, la distribution cellulaire et le stockage transitoire du fer. Les différents chapitres (Chap.) développés pendant ma thèse sont indiqués dans les encadrés jaunes.

Au début de ma thèse, l'étude de la nutrition ferrique chez les plantes se scindait en deux études bien distinctes. La première s'intéressait aux mécanismes des plantes pour faire face à la carence en fer, et la seconde portait sur leurs réponses à l'excès afin d'éviter le stress oxydatif. Au cours de mes recherches, j'ai mis en place une étude intégrant à la fois la carence et l'excès afin de comprendre au mieux l'homéostasie ferrique des plantes. Mes travaux de thèse contribuent à la compréhension des processus modulant à la fois l'acquisition, la distribution et le stockage du fer chez la plante. Cette partie de discussion générale vise à soulever les nouvelles questions apportées et les perspectives à mettre en place pour la continuité scientifique de mon projet de recherche.

1. L'homéostasie du fer chez *Arabidopsis*.

La principale découverte de mon travail de thèse est l'identification d'ILR3 comme un régulateur global de la nutrition ferrique. Ce facteur de transcription était connu pour jouer un rôle direct dans l'acquisition du fer par les racines, en induisant transcriptionnellement *IRT1* et *FRO2* via les facteurs de transcription bHLHs du sous-groupe Ib (Fig. 55 ; Zhang *et al.*, 2015). Mon travail a mis en évidence que ILR3 intervient également dans l'inhibition transcriptionnelle des gènes des *FERs* et des *VTLs* dans le but de moduler la répartition en fer dans l'organisme. C'est l'assemblage d'ILR3 avec ses partenaires protéiques qui semble déterminer la spécificité de ses cibles, et par conséquent influe sur la balance entre l'activation du prélèvement et la répartition cellulaire du fer (Fig. 55). Parmi les interactants connus d'ILR3, *PYE* est le candidat le plus évident pour co-inhiber certaines des cibles transcriptionnelles d'ILR3, comme les *FERs* ou les *VTLs*. *PYE* est fortement induit en réponse à la carence en fer et il code pour un inhibiteur transcriptionnel de *FRO3*, *NAS4* et *ZIF1* (Long *et al.*, 2010).

Indépendant transcriptionnellement, mais intégré aux mécanismes régulés par ILR3, FIT a un rôle considérable dans la nutrition ferrique. En effet, alors qu'il interagit avec les bHLHs du sous-groupe Ib pour induire *IRT1* et *FRO2* (gouvernant l'acquisition), FIT induit transcriptionnellement la voie de solubilisation du fer via l'activation de la *F6'H1*, *BGLU42*, et *PDR9* (Fig. 55). Ces dernières régulations pourraient se mettre en place par l'intermédiaire de MYB10 et MYB72 qui sont également capables d'induire transcriptionnellement *NAS4*. Par ailleurs, FIT a été identifié comme interagissant physiquement avec ZAT12 (dont le gène est induit après un excès de fer) afin de le mener à sa dégradation (Le *et al.*, 2016). Cette découverte renforce l'existence de l'intégration moléculaire des mécanismes de réponse à la

carence en fer et ceux de l'excès couplés aux ROS chez les plantes. Plusieurs questions restent cependant à élucider pour mieux interpréter les interactions géniques qui maintiennent l'homéostasie du fer.

Elles concernent particulièrement les régulations spatio-temporelles régissant notre modèle d'étude à travers l'ensemble de la plante. Les gènes des bHLHs composant le sous-groupe IVc (bHLH34, bHLH104, bHLH105/ILR3) sont exprimés dans les cellules périvasculaires des racines et des parties aériennes (Zhang *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2016). Leurs cibles transcriptionnelles, les quatre *bHLH Ib* (*bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100*, *bHLH101*) sont, elles, exprimées dans les parties aériennes et dans les racines de la zone allant de l'endoderme vers l'épiderme. Ce premier point met en évidence qu'un mécanisme moléculaire non identifié viendrait activer transcriptionnellement les *bHLH Ib* en condition de carence. Des analyses ChIP-qPCR ont montré un lien direct entre les bHLH IVc et les promoteurs de leur cible, les *bHLH Ib* (Zhang *et al.*, 2015). Cette observation indique que les bHLH IVc ont très probablement la capacité de migrer de cellules à cellules pour activer l'expression de leurs cibles. Ce type de migration entre cellules a déjà été décrit pour la formation des poils absorbants. En effet, le déplacement de facteurs bHLH IIIc (bHLH1/GL3, bHLH2/EGL3, bHLH12/MYC1) entre les cellules de l'épiderme joue un rôle central dans la détermination du devenir de ces dernières (Bernhardt *et al.*, 2004 ; Grierson *et al.*, 2014). La même suggestion est à faire concernant l'induction des gènes *IRT1* et *FRO2* dans les cellules de l'épiderme par les bHLH Ib. En effet, l'expression de ces derniers se situe essentiellement au niveau du cortex, et ponctuellement dans l'épiderme (Wang *et al.*, 2007). Cependant, la localisation préférentielle au niveau du cortex de ces facteurs de transcription suggère qu'ils pourraient avoir une fonction au niveau de cette localisation. En lien avec mes travaux, il est cohérent de se demander si les bHLH Ib ne joueraient pas un rôle dans la répartition des composés phénoliques, comme c'est le cas pour leur interactant protéique FIT. Cette question qui reste ouverte pourrait se vérifier facilement par l'observation microscopique des racines des mutants pour les *bHLH Ib*.

Actuellement, la/les voie(s) d'induction transcriptionnelle en carence en fer activant les *bHLH IVc* (contenant *ILR3*) et *BTS* n'est/ne sont pas identifiée(s). Il est possible que ces mécanismes transcriptionnels inconnus ciblent à la fois les *bHLH IVc*, *BTS*, les *bHLH Ib* et *FIT*. En supposant que l'induction de ces gènes soit dépendante des mêmes mécanismes, il serait intéressant de présenter un alignement de leurs promoteurs afin d'identifier les séquences *cis* conservées. Ainsi, des candidats potentiels en *trans* pourraient être potentiellement identifiés. D'autres analyses bioinformatiques reposant sur des études

d'expression large échelle pourraient aussi être mises en place pour identifier des gènes potentiellement inducteurs en condition de carence en fer (Krouk *et al.*, 2010 ; Vidal *et al.*, 2013). Cependant, compte tenu de leur position très en amont dans la cascade de régulation transcriptionnelle de la réponse à la disponibilité en fer, il est probable que les mécanismes impliqués soient plutôt de niveau post-traductionnel.

Notre modèle de régulation a été établi à partir de liens moléculaires publiés ou démontrés durant ma thèse, et se focalise essentiellement sur la racine. Or l'ensemble des acteurs précédemment cités sont également exprimés dans les parties aériennes (Wang *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2016 ; Selote *et al.*, 2015). Ces données suggèrent que notre schéma de régulation se met en place dans les parties aériennes de la plante, ce qui pose de nouvelles questions, notamment sur le rôle des bHLH Ib dans ces organes. En effet, si ces facteurs de transcription sont impliqués dans l'acquisition du fer présent dans le sol par les racines, leur rôle dans les parties aériennes reste à élucider.

Enfin, l'aspect temporel n'est pas pris en compte dans notre modèle. Au vu de la complexité des mécanismes et des découvertes contradictoires (BTS dégrade ses cibles en carence en fer ; *NAS4* est induit et réprimé en réponse à la carence), il est certain qu'une part dynamique et temporelle intervient dans notre modèle de régulation. Pour caractériser cinétiquement notre modèle, des traitements à la Cycloheximide (blocage de la traduction) pourraient être mis en place dans différents fonds mutants, en fonction de différentes cinétiques de carence en fer. Toutefois, ce genre d'approche semble très complexe car de nombreuses voix, faisant intervenir beaucoup d'acteurs, interviennent et maintiennent la stabilité de l'homéostasie.

2. Les régulations des voies de nutrition minérale présentent des mécanismes similaires.

La nutrition minérale des végétaux repose sur des acteurs moléculaires clefs qui vont intégrer à la fois la disponibilité pour le végétal en un nutriment donné et le statut nutritionnel de la plante pour ce même nutriment. Le rôle de ces intégrateurs est d'éviter toute carence ou excès, néfastes pour l'organisme. Non seulement pour la nutrition ferrique (citée précédemment), on trouve aussi le cas pour l'homéostasie du phosphate où le facteur de transcription PHR1 joue un rôle central (Briat *et al.*, 2015b). Dans le cas d'une carence en phosphate, PHR1 est sumoylé par l'E3 SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) ligase SIZ1 afin d'activer les gènes associés à la réponse à cette carence (Miura *et al.*, 2005). Dans le cas

d'une perception suffisante en phosphate, les protéines SPX1 et 2 (SPX domaine 1 et 2) interagissent avec PHR1, l'empêchant d'induire transcriptionnellement ses cibles (Wang *et al.*, 2014). PHR1 régule également en partie l'homéostasie du fer en induisant l'expression d'*AtFER1* en réponse à une carence en phosphate (Bournier *et al.*, 2013). Ce constat place PHR1 avec le phosphate au même niveau que ILR3 avec le fer, et permet de mettre en évidence l'interaction moléculaire entre les deux voix nutritionnelles. D'autres intégrateurs associés à la nutrition minérale ont été caractérisés, c'est le cas par exemple pour la nutrition azotée où le transporteur NPF6.3 (NRT1/ PTR FAMILY 6.3) joue à la fois le rôle de transporteur et de senseur (Liu *et al.*, 2015). C'est plus particulièrement sa phosphorylation dépendante du statut azoté qui va moduler son activité. De plus, ce transporteur est retrouvé dans l'analyse du transcriptome de *pdr9*, ce qui démontre l'existence d'un lien entre la nutrition azotée et la carence en fer *via* les composés phénoliques. D'autres mises en évidence d'intégrateurs ont été proposées pour la régulation de l'homéostasie de micronutriments tels que le cuivre ou le zinc (Penarrubia *et al.*, 2015 ; Bouain *et al.*, 2014). De manière très intéressante, l'expression de *PHR1* et *BTS* est induite en réponse à une carence en zinc, ce qui semble indiquer qu'ils puissent jouer un rôle plus large dans le contrôle de l'homéostasie entre plusieurs nutriments (Bouain *et al.*, 2014 ; Kobayashi *et al.*, 2013). Lorsque l'on considère l'homéostasie du fer, il faut garder à l'esprit que l'ensemble du transport se met en place de manière aspécifique, c'est-à-dire qu'au même titre que le fer, un panel de micronutriments est transité par les mêmes acteurs à l'échelle de la cellule comme dans la plante entière (Bashir *et al.*, 2016 ; Palmer *et al.*, 2013). Ce constat, en plus de mettre en évidence l'importance des intégrateurs, confirme la dépendance des différentes homéostasies minérales.

Le contrôle de l'équilibre d'un nutriment chez les plantes impliquent (i) le transport membranaire du nutriment du milieu extérieur vers l'intérieur de la plante, (ii) une ou plusieurs protéine(s) « senseur(s) » du statut minéral (iii) et des voies de régulation du transport ou du stockage du nutriment. Comme nous l'avons vu, certaines protéines semblent être impliquées dans le contrôle de l'homéostasie de plusieurs nutriments. Il serait donc intéressant de caractériser plus en détail ces liens moléculaires et physiologiques, par exemple en réalisant des études multi-stress. Il s'agirait par exemple de coupler différentes configurations de traitement fer/phosphate ou fer/zinc. Ce type d'approche commence à être mis en place dans mon équipe, en couplant notamment l'étude des interactions entre le fer et le soufre. Les résultats obtenus indiquent que la carence en soufre impacte négativement la mise en place des mécanismes de réponse à la carence en fer en inhibant l'accumulation des

messagers de *BTS* ou encore de *FIT*. Cette répression indirecte induit une diminution de l'assimilation aspécifique de microéléments tels que le manganèse et le zinc, montrant une nouvelle fois les liens entre les différentes voies impliquées dans le contrôle de nutrition minérale. Il apparaît donc que les acteurs du maintien de la balance en fer s'intègrent dans d'autres homéostasies, et d'une manière plus générale aux mécanismes de réponses aux stress abiotiques dans leur ensemble.

D'autre part, des études ont montré qu'il existait un lien étroit entre l'homéostasie du fer chez les plantes et la réponse aux stress biotiques (Dellagi, *et al.* 2005 ; Segond, *et al.* 2009 ; Aznar *et al.* 2014 ; Aparicio et Pallas, 2016). En effet, lors de l'attaque d'un pathogène, une « course à la nutrition » se met en place (Aznar, *et al.* 2015). A partir du moment où la plante perçoit un pathogène, elle va appauvrir en fer le tissu concerné (feuilles), notamment en vidant les vacuoles *via* l'activation de NRAMP3 et 4. Le fer libre cytoplasmique va contribuer à amplifier la production de ROS, ce qui inhibe la croissance du pathogène (Segond, *et al.* 2009). Ce mécanisme va induire les gènes de ferritines, afin que ces dernières séquestrent le fer et le rendent indisponible pour le micro-organisme pathogène. Dans un second temps, les gènes de prélèvement *IRT1* et *FRO2* vont être fortement induits afin d'assimiler le fer, probablement pour le développement des parties non contaminées (Segond, *et al.* 2009). Une autre étude met en évidence que la localisation de ILR3 est modulée par un stress biotique (Aparicio et Pallas, 2016). Le *Alfalfa mosaic virus* (AMV) interfère avec l'activité de ce facteur de transcription ce qui induit spécifiquement les voies de signalisation de l'acide salicylique (SA). La régulation de l'homéostasie du fer se place donc comme un mécanisme central dans la réponse aux stress biotiques, notamment pour la limitation de l'infection. L'étude des interactions pathogènes/plantes couplée à différents niveaux de nutrition ferrique permettrait d'étudier plus en détail ce mécanisme, en se rapprochant des conditions naturelles, dans lesquelles les plantes sont constamment soumises à de multiples stress.

3. La nutrition ferrique des plantes est un modèle d'adaptation.

L'homéostasie du fer est contrôlée de manière différente selon les organismes vivants. Chez les procaryotes, la nutrition ferrique est régulée par un intégrateur nommé Fur (Ferric uptake regulation). Ce système peut contrôler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la nutrition ferrique (jusqu'à 90 gènes chez *Escherichia coli* ; Hantke, 2001). La présence de fer permet l'adressage de Fur sur le promoteur de ses cibles afin de les réprimer

transcriptionnellement. En absence de fer, les apo-Fur se délient des promoteurs des gènes cibles, permettant leur expression et donc l'acquisition de cet élément (Andrews *et al.*, 2003). Chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), les facteurs de transcription Afts (Activator of ferrous transcription) jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du fer (Kaplan et Kaplan, 2009). Le statut en fer va moduler la localisation d'Aft1 qui va induire l'expression des gènes impliqués dans le prélèvement du fer en réponse à une carence. Dans le cas où la disponibilité en fer est suffisante, Aft1 va interagir avec les Glutaredoxines Grx3 et Grx4 dans le cytoplasme, l'empêchant d'induire l'expression de ses gènes cibles. Enfin, chez les mammifères la régulation est majoritairement régulée post-transcriptionnellement par le système IRE/IRP avec FBXL5 qui est le senseur du fer (Cf. Introduction § 4.1.2). Dans chaque système, un intégrateur prend place et module les gènes de réponse à la carence (pour l'acquisition) ou les mécanismes de stockage. Les systèmes des procaryotes ou des levures pour le maintien de l'homéostasie du fer présentent quelques similitudes avec ceux des plantes. Toutefois, la complexité, la répartition spatio-temporelle et la dynamique des régulations identifiées chez les végétaux mettent en évidence un système très stable faisant intervenir de nombreux acteurs pouvant faire face à des conditions extrêmes. Même si les végétaux ont un ancêtre commun avec les animaux (remontant à environ 1,6 milliards d'années), leur évolution indépendante et l'acquisition de leur capacité photosynthétique en ont fait des organismes particulièrement efficaces avec des capacités considérables d'adaptation à leur environnement (Meyerowitz, 2002).

En conclusion, les résultats de ma thèse apportent de nouvelles données sur la régulation de l'homéostasie du fer chez les plantes. Mes travaux montrent que certains acteurs sont cruciaux pour percevoir le statut en fer et déclencher les réponses adaptées. De plus, mes résultats démontrent l'existence de modules transcriptionnels mis en place pour faire face à un excès de fer en quelques minutes. Enfin, ils permettent de montrer que la solubilisation du fer dans le milieu est dépendante des mécanismes modulant son acquisition. L'ensemble de mes données soulève de nombreuses questions, concernant notamment l'aspect topologique de mon modèle de régulation, sa variation au cours du développement de la plante et ses implications avec d'autres voies minérales, ou en réponse aux stress biotiques.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal et conditions de culture.

1.1 Matériel végétal.

L'écotype sauvage utilisé dans mes expériences est Columbia-0 (Col-0). Les plantes mutantes ou transformées sont toutes dans un fond génétique Col-0. Parmi les mutants étudiés dans le chapitre II et non présentés dans l'article soumis : *bts-10* et *bts-12* ont été fournies par T. Long (Selote *et al.*, 2015) et *ilr3-1* par B. Bartel (Rampey *et al.*, 2006). Dans le chapitre IV les mutants *dcl2,3,4*, *ago1-27* et *nrd1-4* ont été fournies par T. Lagrange (LGDP, Perpignan). Les autres mutants étudiés lors de ma thèse proviennent du NASC et ont été caractérisés avec les amorces présentées dans le tableau S1.

1.2 Conditions de culture.

Pour l'amplification de graines les plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivées en chambre de culture et/ou en serre avec en jours longs (16h de jour à 20°C et 8h de nuit à 19°C) à une hygrométrie de 70/ou 55% respectivement.

1.2.1 Traitement pour l'excès de fer.

La solution mère d'excès de fer citrate (Fe-Citrate) est préparée à l'aide d'un mélange en volume équivalent d'une solution de Na₃-citrate 200mM et d'une solution de FeSO₄ 100mM dissout dans du HCl 0,1M. La solution mère est diluée dans du milieu de culture en fonction de la concentration finale souhaitée.

1.2.1 Culture en hydroponie.

Les plantes ont été cultivées en chambre de culture dans deux types de conditions :

(i) Pour les microarrays en réponse à l'excès de fer (Chapitre IV), les graines sont mises à germer et cultivées en condition d'hydroponie (stérile) pendant 13 jours dans des Phytatray® (Sigma) en condition de jours longs (16h de jour à 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et à 23°C / 8h de nuit à 20°C). Le milieu Hoagland (pH 5,7, tamponnée avec du MES) est utilisé pour ces cultures (Hoagland et Snyder, 1933). La mise en place de la cinétique d'induction par le fer se déroule en deux étapes. Premièrement, 10 jours après le semis, le milieu est changé afin d'imposer une carence en fer. Cette étape a pour but d'accentuer l'amplitude des réponses qui vont être mises en place par la plante lorsque l'excès en fer est appliqué. Pour cela, le milieu de culture initial (contenant 50 μM de fer) est remplacé par un milieu dépourvu de fer sur

lequel les plantes sont cultivées pendant trois jours. Deuxièmement, au treizième jour, le traitement est appliqué. Il s'agit, soit d'ajouter au milieu de culture du Fe-Citrate (condition « excès de fer »), soit du K-Citrate (condition « contrôle ») à une concentration finale de 500 μ M.

(ii) Pour les cultures hydroponiques sur plantes adultes, les graines sont mises à germer sur milieu Hoagland gélosé pendant 7 jours en condition de jours courts (8h de jour à 23°C / 16h de nuit à 20°C). Ensuite, les plantules sont transférées sur milieu Hoagland liquide. La solution nutritive est renouvelée tous les quatre jours. Après 3 semaines de culture, les traitements de carence en fer ou d'excès (jusqu'à 500 μ M) sont appliqués. Pour les conditions contrôle, les milieux sont complétés de Fe-Citrate à une concentration de 50 μ M finale.

1.2.3 Culture *in vitro*.

La stérilisation des graines (méthode « Vapor-Sterilisation ») se fait à l'aide d'une solution d'eau de javel (100ml) et d'acide chlorydrique 37% (4ml). Le mélange de ces deux solutions génère un dégagement de dichlore (Cl₂), qui est l'agent stérilisant. Les graines sont alors placées dans une boîte hermétique pour une durée de 12h à température ambiante. Elles sont ensuite semées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu MS/2 (Murashige and Skoog dilué ½, Agar 6 g/l) et stratifiées durant 48h à 4°C.

Après 10 jours de culture, les plantes sont transférées sur milieu MS/2 liquide afin de subir différents traitements. Les plantes carencées en fer ou en fer/phosphate subissent plusieurs rinçages puis sont cultivées 3 ou 5 jours respectivement, en milieu MS/2 liquide. Celles subissant un excès de fer (500 μ M) sont cultivées pendant 6h pour les analyses de transcrits ou 24h pour les quantifications d'activité enzymatique.

2. Construction des vecteurs plasmidiques.

Afin d'étudier les régulations transcriptionnelles du promoteur d'*AtFER1*, j'ai effectué une série de délétions du promoteur. Elles ont été réalisées d'une part en 5', pour des tailles finales de 1,5Kb, 1Kb, et 0,5Kb et d'autre part en 3', avec insertion d'un promoteur 35S minimum situé en aval de ces délétions. Ce promoteur permet de créer un site d'initiation de la transcription tout en ne surexprimant pas le gène. Une autre approche a consisté à générer des mutations. Dans ce but, au sein du promoteur minimal (500pb en amont de l'ATG) d'*AtFER1*, des mutations dirigées sur les éléments régulateurs putatifs qui le composent ont

été effectuées. Pour cela, la méthode de mutagenèse dirigée par PCR (Polymerase Chain Reaction) a été utilisée. Elle nécessite l'utilisation de 2 paires d'amorces, un couple d'amorces mutées et complémentaires (1 et 2) et 2 amorces bordant le segment d'ADN à modifier (3 et 4), ainsi que la réalisation de 3 réactions PCR. Lors de la première PCR, l'utilisation des amorces 1 et 4 permet d'obtenir un fragment partiel d'ADNc muté sur la région souhaitée. En parallèle, une deuxième réaction PCR est réalisée. Elle utilise les amorces 2 et 3 pour obtenir de la même façon un fragment d'ADNc partiel et muté. Enfin, une troisième PCR est réalisée grâce aux amorces 3 et 4 des extrémités. Ces 2 fragments s'hybrident par leur partie complémentaire, ce qui permet l'obtention d'un fragment complet comportant la mutation désirée sur les deux brins. Ce dernier est cloné par recombinaison homologue en utilisant le système GATEWAY® (Invitrogen). Cette recombinaison s'effectue en deux étapes. La première, la réaction BP clonase GATEWAY®, consiste à cloner le fragment d'ADN muté dans un vecteur d'entrée, pDONR207. Puis la deuxième, la réaction LR clonase GATEWAY® permet de transférer la séquence d'intérêt (séquence promotrice) dans le vecteur binaire pGWB3 en amont du gène rapporteur GUS. L'activité du promoteur est observée dans la plante en suivant l'expression du gène GUS.

Dans le but de mettre en évidence si ILR3 interagissait directement avec certains promoteurs, des lignées exprimant la séquence génomique d'*ILR3* fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein) sous son promoteur endogène ont été réalisées. Pour cela, le fragment du promoteur de 1,8Kb avec la séquence génomique d'*ILR3* a été amplifié par PCR et cloné par recombinaison homologue en utilisant la technique du GATEWAY® (Invitrogen). Cette expérience a permis de transférer la séquence d'intérêt dans un vecteur binaire pGWB4 en amont de la GFP.

Afin de caractériser le rôle potentiel du *LncRNA* sur *AtFER1*, des lignées exprimant la séquence génomique du *LncFER1* sous le contrôle du promoteur d'*AtFER1* ont été réalisées. La région promotrice d'*AtFER1* (1,5Kb) amplifiée par PCR a été insérée dans un vecteur binaire pBIBHYG (Becker, 1990) par des étapes de digestion/ligation en amont de la cassette GATEWAY®. À la suite, la séquence génomique du *LncFER1* a également été amplifiée par PCR et insérée par recombinaison homologue en utilisant la technique du GATEWAY® (Invitrogen). Les amorces pour les réactions PCR sont détaillées dans le tableau S1.

3. Transformation stable d'*Arabidopsis thaliana*.

Pour transformer les plantes d'*A. thaliana*, l'agrobactérie *Agrobacterium tumefaciens* (souche GV3101) est utilisée. Les bactéries sont pré-cultivées dans 10ml de LB (Luria Broth) contenant trois antibiotiques (Rifampicine, Gentamycine et Kanamycine à des concentrations respectives de 25 mg/l, 25 mg/l et 50 mg/l) durant 24h à 30°C sous agitation. Après 24h d'incubation, une culture de 250ml de LB supplémentée des trois antibiotiques indiqués précédemment, est préparée à partir de 2,5ml de pré-culture et incubée à 30°C sous agitation. Lorsque la DO à 600 nm atteint 1,6, la solution bactérienne est centrifugée à 5000rpm à 4°C pendant 15min. Le surnageant est éliminé, et le culot bactérien est repris dans la solution de trempage (Pour 1 litre : 100ml MS 10X, 0,5g de MES, 25g de saccharose, 100µl de Silwett). Pour réaliser la transformation, les plantes d'*A. thaliana* doivent être âgées de 4 à 5 semaines afin de posséder des hampes florales et des jeunes fleurs. Ces hampes florales sont alors immergées dans la solution d'agrobactéries pendant 2 minutes. Les plantes sont ensuite placées dans une atmosphère humide et confinée pendant 24h. La récolte des graines (génération T1) s'effectue lorsque les siliques issues des fleurs transformées sont sèches. Des lignées résistantes mono-insertionnelles sont sélectionnées (utilisation d'un antibiotique) dans la descendance pour mes expérimentations.

4. Le crible simple hybride en levure.

Dans le système simple hybride utilisé, la détection d'une interaction ADN/protéine est basée sur l'activation du gène rapporteur *HIS3* (*HISTIDINE3*). Dans le cadre de mon projet, quatre constructions différentes du promoteur associé au gène *HIS3* ont été générées. Les premières comprennent la séquence promotrice initiale (*ELEM3* ou 5), les secondes constructions sont mutées dans les sites pouvant être ciblés par les facteurs de transcription. La recherche d'interactants a été réalisée à partir d'une banque normalisée contenant 900 facteurs de transcription où chaque facteur de transcription est exprimé dans une seule colonie de levure. Il s'agit de la banque REGIA (REGulatory Gene Initiative in Arabidopsis ; Paz-Ares et REGIA Consortium, 2002) et de la collection de facteurs de transcription de type R2R3-MYB d'*Arabidopsis* (Kelemen *et al.*, 2015).

Tout d'abord, il est nécessaire d'obtenir une souche de levure contenant le produit d'assemblage, c'est-à-dire le gène rapporteur *HIS3* fusionné à la région promotrice d'*AtFER1* d'intérêt. Les versions mutées et les versions non mutées des éléments ont été synthétisées

chez SIGMA®. Chaque séquence de 20 nucléotides est répétée 6 fois. Ces constructions ont ensuite été intégrées au vecteur pHisi par la méthode LIC (Ligase Independent Cloning ; fusion *ELEM3* et 5 avec *HIS3*) et transférées de manière stable dans des levures de type α EGY48 (Kelemen *et al.*, 2015 ; Kelemen *et al.*, 2016) . Les levures transformées ont été sélectionnées sur milieu SD base (Synthetic Dextrose) dépourvu d'uracile (-URA). Les souches obtenues ont été validées par amplification PCR et séquençage des amplicons. Les facteurs de transcription sont répartis sur 17 boîtes de Pétri carrées (une levure de type « a » contient un seul facteur de transcription compris dans le plasmide pDEST22). L'ensemble des levures est ensuite croisé à l'aide d'un « répliqueur » sur milieu YPDA (Yeast Peptone Dextrose Adénine). Ce milieu est non sélectif, ce qui permet d'obtenir une forte croissance. Les levures obtenues issues du croisement, sont repiquées sur milieu SD -UW (dépourvu d'uracile et de tryptophane) afin de sélectionner uniquement les levures diploïdes. Ces levures diploïdes sont ensuite transférées sur milieu SD -UWH (dépourvu d'uracile, tryptophane et d'histidine) contenant différentes concentrations de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole). En effet, certaines souches sont capables d'auto-activer l'expression du gène *HIS3*, et ainsi induire leur croissance sur milieu dépourvu d'histidine, et donc de générer de faux positifs. C'est pourquoi, le 3-AT, qui est un inhibiteur de la biosynthèse d'histidine est utilisé (sélection plus stringente). Les différentes concentrations de 3-AT choisies sont de 0, 5, 7,5 et 10mM. Cette dernière étape nous permet de sélectionner les levures qui possèdent une interaction physique entre la région promotrice et le facteur de transcription. Ces interactions sont ensuite validées en comparant les souches contenant le promoteur non muté à celles contenant le promoteur muté. Tous les repiquages des levures sur les différents milieux sont effectués selon le même modèle. Les levures sont resuspendues dans 100 μ l d'eau déminéralisée stérile, puis après stérilisation du « répliqueur » à la flamme (bec Bunsen), elles sont repiquées sur le milieu adéquat. Enfin les levures sont mises en culture à 37°C durant 48h avant analyse. Ce protocole pour le crible simple hybride est publié dans un chapitre de livre méthode présenté en Annexe : Kelemen *et al.*, 2016 (Methods in Molecular Biology).

5. Analyse d'expression.

5.1 Gène rapporteur GUS.

5.1.1 Révélation histochimique.

Le gène *uidA* code l'enzyme β -glucuronidase (activité GUS). En présence de son substrat, l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc), la β -glucuronidase génère l'apparition d'un produit de couleur bleue (le diX-indigo) due au clivage du substrat. Une corrélation positive existe donc entre l'activité du promoteur et la quantité de composé bleu observée. Cette technique permet de visualiser l'activité du promoteur et de déterminer la localisation de l'expression du gène rapporteur dans la plante.

La coloration GUS est réalisée sur des plantes âgées de 2 semaines et ayant subi les différents traitements cités précédemment (Cf. §1.2.3). Les plantes sont immergées dans une solution de coloration (tampon phosphate 0,1M pH 7, Triton 0,5%, X-gluc 2mM). Suite à cette immersion, les plantes sont placées sous vide 3 fois 5min avant d'être incubées à l'obscurité à 37°C pour une durée de 12h. Ensuite, les plantules sont immergées consécutivement dans un bain d'eau déminéralisée, un bain de solution de décoloration à base d'acide acétique (14%) et d'éthanol à (86%) durant 3h sous agitation modérée, puis 3 bains successifs d'éthanol (75%). Lorsque la décoloration des plantes est totale les plantes sont conservées dans de l'éthanol (75%) jusqu'à leur observation. La prise des images témoignant de l'activité GUS dans les parties aériennes et racinaires se fait à la loupe binoculaire (Olympus).

5.1.2 Dosage de l'activité enzymatique.

L'activité enzymatique est quantifiée sur des échantillons (100 mg) de jeunes plantules âgées de 14 jours. Les tissus sont congelés dans l'azote liquide puis broyés par agitation en présence de billes d'acier (deux agitations de 30 sec à 30 agitations/sec ; broyeur Retsch Mixer Mills MM400). L'extrait protéique brut est obtenu par ajout de 500 μ L de tampon d'extraction (tampon phosphate 0,1M pH 7, DTT 5mM, EDTA 0,5M pH 8, Triton 0,5%, sodium lauryl sarcosyl 0,1%), puis est centrifugé (4°C, 13000g, 15min). Le surnageant est centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions afin d'éliminer tous les débris restant. Le surnageant de cette seconde centrifugation est utilisé pour mesurer l'activité enzymatique. La quantité totale de protéine est déterminée à l'aide de la coloration Pierce (Thermo Scientifique®) selon les recommandations du fournisseur. L'activité enzymatique est mesurée

à 37°C en présence du substrat 4-methylumbelliferyl glucuronide (1mM). La vitesse initiale d'apparition du produit de la réaction, le 4-methylumbelliférol est mesurée en plaque 96 puits par fluorimétrie (excitation/émission : 355nm/460nm, Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter). L'activité enzymatique ainsi mesurée est rapportée au mg de protéine totale pour chaque extrait.

5.2 Mesure de l'accumulation des transcrits.

5.2.1 Extraction des transcrits.

Avant extraction, les échantillons ont été broyés par agitation à l'aide d'un broyeur Retsch Mixer Mills MM400 (deux agitations de 30sec à 30 agitations/sec). Les ARNs totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy® Plant Mini de Qiagen® selon les recommandations du fabricant. L'ADN génomique résiduel présent dans nos échantillons a été éliminé par traitement à la DNase RNase-Free (Qiagen®). Une fois extraits, les ARNs totaux sont dosés (micro-spectrophotomètre Nanodrop ND-1000) afin de déterminer leur concentration et leur pureté (ratio DO_{260}/DO_{280}). Les échantillons sont ensuite dilués à une concentration de 200ng/ μ l. Pour les analyses de RT-PCR quantitative, une seconde étape de validation est ensuite réalisée par migration de 1 μ l d'ARN dilué sur gel d'agarose (1,2%, TAE 0,5x). Pour les analyses de puces à ADN, cette seconde étape de validation est réalisée par électrophorèse capillaire (système « Agilent® RNA 6000 Nano kit » couplé au « Agilent 2100 Bioanalyser »).

5.2.2 Synthèse des ADNc.

Toutes les réactions sont réalisées dans un «Eppendorf® Mastercycler». La conversion des ARNs messagers en ADNc est réalisée à l'aide du kit « RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit » (Thermo Scientific®) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, cette étape se décompose de la façon suivante: des oligos dT (5'-T(18)-3' ; Sigma®) sont ajoutés à chaque échantillon (1 μ g), puis un choc thermique est appliqué au mélange (5min à 65°C puis dans la glace) afin d'éliminer les structures secondaires. Enfin, la transcriptase inverse est ajoutée et le mélange incubé à 42°C pendant 1h pour permettre la synthèse des ADNc. La réaction est stoppée en incubant le mélange 5min à 65°C. Les échantillons sont dilués deux fois par l'ajout d'eau RNase-Free.

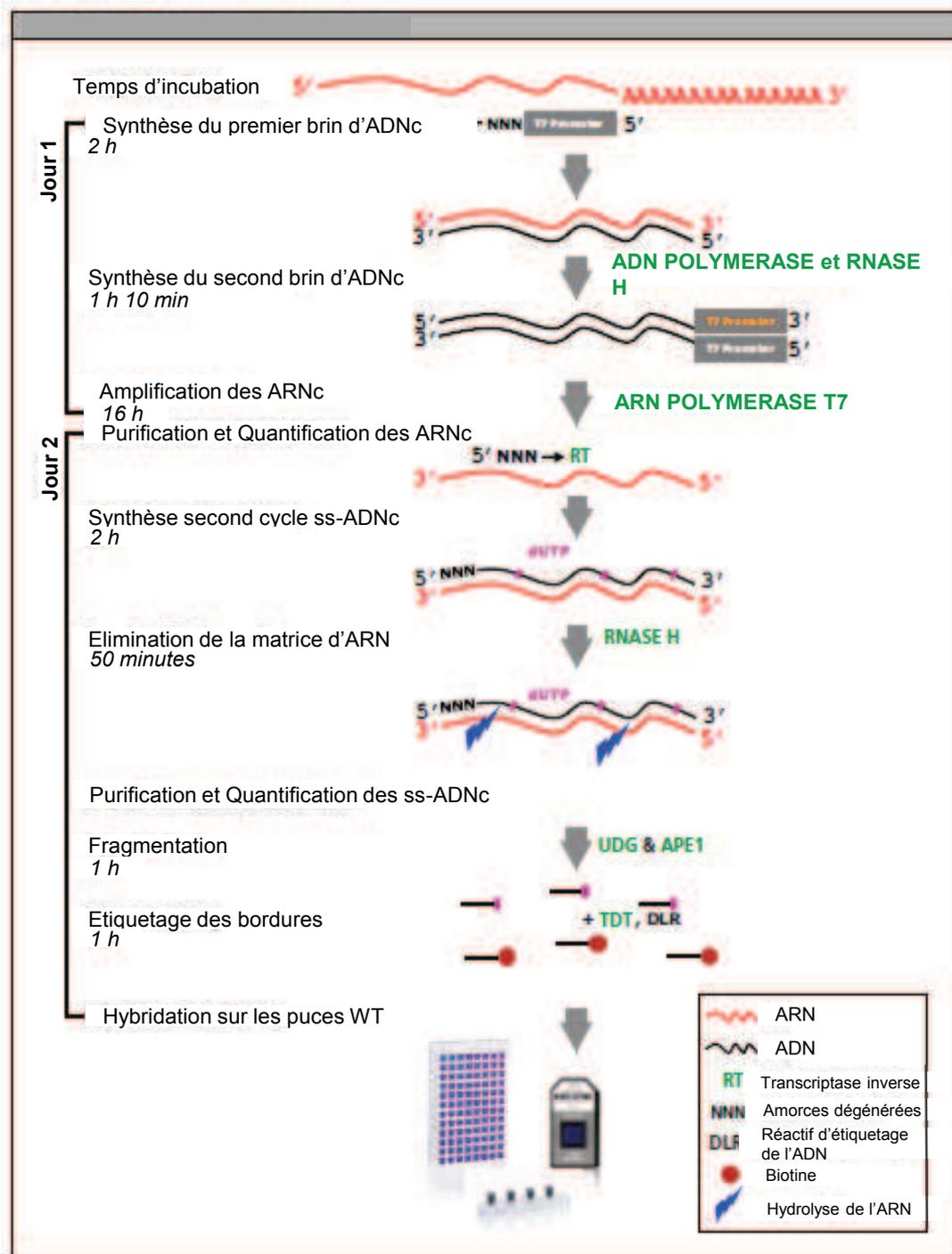


Figure 56: Description des premières étapes de préparation du Microarrays. Les ARNs sont rétrotranscrits une première fois en ADNc à partir du Master Mix du kit (enzyme et tampon avec les amorces dégénérées contenant le promoteur T7). Ils sont placés 60min à 25°C puis 60min à 42°C. Une seconde étape de rétrotranscription est réalisée de nouveau à partir du Master Mix du kit (ADN polymérase, RNASE H et tampon). Les échantillons sont placés 60min à 16°C et 10min à 65°C. Les ADNc ainsi obtenus sont synthétisés en ARNc par transcription *in vitro* par une ARN polymérase T7, le tout étant incubé 16h à 40°C. Les ARNc sont purifiés grâce à des billes aimantées et une plaque magnétique puis quantifiés. Ils sont ensuite rétrotranscrits en ADNc contenant des sites de coupure dUTP. Ils sont placés 5min à 70°C, 5min à 25°C puis 2min à 4°C. Après un traitement au RNASE H afin d'hydrolyser l'ARN, les ADNc sont incubés à 37°C pendant 45min, purifiés avec les billes puis quantifiés. Ils sont ensuite fragmentés par les enzymes UDG et APE1, placés 60min à 37°C puis 2min à 93°C. Chaque fragment va être associé à une biotine, (incubation 60min à 37°C et 10min à 70°C) qui va permettre l'hybridation avec une molécule fluorescente.

5.2.3 RT-PCR quantitative.

L'amplification par PCR quantitative est réalisée à l'aide du kit SYBR Green contenant les dNTPs, l'ADN polymérase et le Master mix TAKARA (Ozyme) SYBR Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus) selon les recommandations du fournisseur, avec 1µl d'ADNc et 0,5µM de chaque amorce pour un volume total de 10µl. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau S1. Les conditions d'amplification sont : 5min à 95°C, 45 cycles de 10sec à 95°C, 10sec à 60°C et 10sec à 72°C ; 5sec à 95°C ; 1min à 65°C. Le gène *PP2A (At1g13320)* est utilisé comme gène de référence (Czechowski *et al.*, 2005). Les Cp (Crossing point) ont été calculés par le logiciel LightCycler480 (Roche) avec la méthode du maximum de la dérivée seconde. Ils correspondent au nombre de cycles à partir duquel l'amplification devient linéaire. Ils rendent compte du nombre initial de copies d'ADNc. Les niveaux relatifs de transcrits (RTL) sont calculés par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CP}$. Cette méthode permet de calculer la quantité relative d'un gène d'intérêt par rapport à un gène de référence.

5.3 Puces à ADN (excès de fer).

Le choix des échantillons analysés sur puces à ADN a été fait en fonction de quatre critères principaux : le nombre de puces à ADN disponibles (54 au total), le nombre de points dans la cinétique d'induction (par l'ajout de fer) de l'expression d'*AtFER1* avant que l'expression de ce dernier ne soit induite, le nombre de répétitions biologiques et enfin, le nombre de répétitions techniques. Sur cette base, nous avons choisi de focaliser nos analyses sur les parties aériennes et sur le point de cinétique initial (point 0) ainsi que tous les points de cinétique de 2 à 120min pour la condition traitée et les points 20, 60 et 120min pour la condition contrôle. Nous avons pris deux répliquats (répliquats techniques) par point de cinétique, sur les deux cinétiques indépendantes qui ont été réalisées (répliquats biologiques).

Les puces à ADN (Affymetrix GeneAtlas®) ont été traitées selon les recommandations du fabricant. L'obtention des données d'expression (accumulation des transcrits) se déroule en trois phases (Figure 56). La première phase consiste en la préparation des échantillons pour les hybridations sur les puces. Cette phase est-elle même composée de plusieurs étapes. Tout d'abord les ARN sont rétrotranscrits en ADNc simple brin par une reverse transcriptase (RT). Lors de cette étape, l'amorçage de la RT fait intervenir un oligonucléotide poly-A qui contient le promoteur T7. Ensuite, les ADNc double brin sont synthétisés (traitement à l'ADN polymérase couplé à la RNase H) et amplifiés en ARNc (à l'aide d'une T7 ARN polymerase). Les ARNc ainsi obtenus sont purifiés et quantifiés avant de servir de matrices pour une nouvelle rétrotranscription. Après traitement à la RNase H, les

ADNc simple brin sont purifiés et quantifiés. Enfin, les ADNc sont fragmentés (à l'aide d'une Uracil-DNA Glycosylase ou UDG et de l'endonucléase APE1), et les fragments ainsi obtenus sont biotinylés au niveau du site de clivage. La seconde phase consiste en l'hybridation proprement dite des puces à ADN. Les fragments d'ADNc biotinylés sont déposés sur les puces à ADN et sont incubés 18h à 48°C dans la station d'hybridation (GeneAtlas® Hybridization Station). Les puces sont ensuite lavées, incubées avec les solutions de marquage, et de nouveau lavées. Ces trois étapes ont lieu dans un équipement dédié, le GeneAtlas® Fluidics Station. Enfin, les puces sont scannées (GeneAtlas® Imaging Station). La troisième phase se décompose en deux temps, le contrôle qualité des puces et l'extraction des « données d'expression ».

6. Analyse de l'accumulation des protéines.

6.1 Extraction des protéines totales.

Les protéines totales sont extraites à partir de 500mg de matériel végétal congelé, puis broyées à l'aide d'un broyeur Retsch Mixer Mills MM400 (deux agitations de 30sec à 30 agitations/sec). Une solution de PMSF 200mM (Phenylmethylsulfonyl fluoride : inhibiteur de protéases) est réalisée, et 10µl sont ajoutés à 1ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 100mM, SDS 1%, EDTA 25mM, β-mercaptoéthanol 5%) juste avant utilisation. Ce mélange est ajouté à la poudre obtenue lors du broyage dans les proportions de 250µl pour 100mg de poudre puis sonicé (sonicateur à sonde plongeante OSI instruments), réglé à 80% de sa puissance maximale en 2 cycles de 10sec. Après centrifugation, le surnageant est récupéré.

6.2 Western blot.

La quantité de protéines totales est déterminée à l'aide de la coloration Pierce (Thermo Scientific®) selon les recommandations du fournisseur. Les gels de « stacking » et de séparation contiennent 4,5% et 13% d'acrylamide, respectivement. Dans un premier temps, les échantillons sont dilués de manière à obtenir 0,5 µg/µl de protéines dans 20µl. Le mélange est dénaturé 5min à 90°C. Puis le gel est chargé et la migration est réalisée à 30mA par gel. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane (1h à 100V) en chambre froide dans du tampon Tris-glycine et éthanol 10%. Après le transfert, un blocage des sites libres de la membrane est réalisé avec une solution bloquante (TBS : Tris Buffer Saline, Tween-20 0,1%, BSA 1%). Enfin, les hybridations avec l'anticorps primaire puis avec l'anticorps secondaire sont réalisées. La détection des ferritines est réalisée à l'aide d'un sérum

polyclonal de lapin dirigé contre les protéines FER purifiées (Arnaud *et al.*, 2007). Les sérums sont utilisés dilués au 1/10000ème dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline : tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 10mM, NaCl 150mM, pH 7,4) Tween-20 0,1%, BSA 1%). Un premier lavage de 10min dans 30ml de solution bloquante est réalisé, suivi d'un second de 5min dans 30ml de TBS 1X et Tween-20 0,1%, puis un dernier lavage de 5min dans 30ml de TBS 1X. Après ces différents lavages, 1ml de solution de révélation Luminata Forte (Millipore) est placé sur chaque membrane. Après 5min d'incubation, les résultats sont révélés au LAS-3000 (DujiFilm).

7. Quantifications physiologiques.

7.1 Dosages des chlorophylles et des caroténoïdes.

Pour les plantes adultes en hydroponie, cinq disques foliaires de 3,5 millimètres de diamètre sont prélevés sur des jeunes feuilles. Pour les jeunes plantules, les parties aériennes complètes ont été pesées puis prélevées. L'extraction des chlorophylles se fait dans 1ml d'acétone. Les tubes sont agités 48h à température ambiante dans l'obscurité, avant lecture de la densité optique (DO) à trois longueurs d'onde (644,8nm ; 661,6nm ; 470nm) au spectrophotomètre (Beckman Coulter DU 520 General Purpose UV/Vis Spectrophotometer). La formule suivante est utilisée pour déterminer la quantité de chlorophylles (a et b) et de caroténoïdes :

$$\text{➤ } ((\text{DO}_{644,8} * 18,09) + (\text{DO}_{661,6} * 7,05)) (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) * \text{volume (ml)} / \text{surface (cm}^2\text{)} \text{ ou } \\ \text{masse fraîche (mg)}$$

où volume = 1ml et surface = 1,923cm²

7.2 Dosage du fer.

Des plantules de 14 jours sont prélevées et placées dans une étuve à 65°C. Après séchage, les échantillons sont broyés à l'aide d'un mortier. La minéralisation des échantillons a lieu par digestion acide au « Speedwave » et est réalisée sur 20mg de poudre repris dans 1ml d'un mélange d'acide nitrique 65% (750µl) et d'H₂O₂ 30% (250µl). Après minéralisation, les échantillons sont dilués avec 4ml d'eau milli-Q. Le fer est alors dosé au MP-AES (Microwave Plasma - Atomic Emission Spectroscopy, Agilent).

7. Chromatin Immunoprecipitation.

Des plantules de 14 jours exprimant ILR3 couplé à la GFP sous le contrôle de son promoteur endogène (*pILR3::gILR3:GFP* ; 2 lignées indépendantes) ou exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur 35S (*p35S::GFP* ; pour le contrôle négatif) ont été fixées dans une solution de formaldéhyde 1%, sous vide, pendant 15min. La fixation est stoppée par ajout de Glycine (125mM ; concentration finale en solution). Les échantillons sont congelés puis broyés au mortier dans le tampon d'isolation des noyaux (20mM PIPES-KOH pH7,6, 1M hexylene glycol, 10mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 15mM NaCl, 60mM KCl, 0,5% Triton X100, 5mM β -mercaptoethanol, inhibiteur de protéase : complete tablets EASYpack, Roche®). Les échantillons sont filtrés puis centrifugés 2 fois (1500xg, 10min) et sont transférés dans du tampon de lyse (50mM Tris-HCL pH8, 10mM EDTA, SDS 1%, inhibiteur de protéase: complete tablets EASYpack, Roche®) afin de subir une sonication (Bioruptor ; 10 fois 30sec). Les échantillons sont prélevés avec des billes magnétiques (INVITROGEN® : Dynabeads protein G) puis sont immunoprécipités toute la nuit à 4°C en utilisant un anticorps anti-GFP (Abcam, ab290). Les échantillons sont lavés avec des billes magnétiques (les même que celles du pré lavage), puis les ADN sont purifiés avec le kit IPURE (Diagenode®) selon les recommandations du fabricant. L'enrichissement des ADN est analysé par RT-PCR quantitative. Les amorces utilisées sont détaillées dans le tableau S1. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la quantité d'ADN total des échantillons.

Références bibliographiques

- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* **10**: 1135-1149
- Andaluz S, López-Millán AF, De las Rivas J, Aro EM, Abadía J, Abadía A** (2006) Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynth. Res* **89**: 141-155
- Andrews DJ, Kumar KA** (1992) Pearl millet for food, feed and forage. *Advances in agronomy* **48**: 90-139
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quinones F** (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 215-237
- Aparicio F, Pallás V** (2016) The coat protein of Alfalfa mosaic virus interacts and interferes with the transcriptional activity of the bHLH transcription factor ILR3 promoting salicylic-dependent defense signaling response. *Mol Plant Pathol.* doi: 10.1111/mpp.12388
- Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F, Gaymard F** (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for Arabidopsis AtFer1 ferritin gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 23579–23588
- Arnaud N, Ravet K, Borlotti A, Touraine B, Boucherez J, Fizames C, Briat JF, Cellier F, Gaymard F** (2007). The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)- cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochemistry Journal* **405**: 523-553
- Arnaud N** (2007) Régulation de l'expression du gène de ferritine AtFer1 en réponse au fer chez Arabidopsis thaliana. Thèse de doctorat, Université Montpellier II, France.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P** (2009) Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 589–599
- Audebert A, Sahrawat KL** (2000) Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition* **23**:1877-1885
- Aznar A, Chen NW, Rigault M, Riache N, Joseph D, Desmaële D, Mouille G, Boutet S, Soubigou-Taconnat L, Renou JP, Thomine S, Expert D, Dellagi A** (2014) Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores. *Plant Physiol.* **164**(4):2167-2183
- Aznar A, Chen NW, Thomine S, Dellagi A** (2015) Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Sci.* **240**:90-97.
- Bailey PC, Martin C, Toledo-Ortiz G, Quail PH, Huq E, Heim MA, Jakoby M, Werber M, Weisshaar B** (2003) Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **15**: 2497-2502

- Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conéjéro G, Curie C, Friml J, Vert G** (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 450-458
- Bashir K, Inoue H, Nagasaka S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK** (2006) Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *J Biol Chem* **281**: 32395-32402
- Bashir K, Ishimaru Y, Nishizawa NK** (2011) Identification and characterization of the major mitochondrial Fe transporter in rice. *Plant Signal Behav.* **6**(10):1591-1593
- Bashir K, Rasheed S, Kobayashi T, Seki M, Nishizawa NK** (2016) Regulating Subcellular Metal Homeostasis: The Key to Crop Improvement. *Front Plant Sci.* **7**:1192
- Bazin J, Bailey-Serres J** (2015) Emerging roles of long non-coding RNA in root developmental plasticity and regulation of phosphate homeostasis. *Front Plant Sci* **6**: 400
- Becker D** (1990) Binary vectors which allow the exchange plant selectable markers and reporter genes. *Nucl. Acids Res.* **18**, 203
- Becker M, Johnson DE** (1998) Legumes as dry season fallow in upland rice-based systems of West Africa. *Biology and Fertility of Soils* **27**: 358-367
- Becker M, Asch F** (2005) Iron toxicity in rice conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**: 558-573
- Bernacchioni C, Pozzi C, Di Pisa F, Mangani S, Turano P** (2016) Ferroxidase Activity in Eukaryotic Ferritin is Controlled by Accessory-Iron-Binding Sites in the Catalytic Cavity. *Chemistry* doi: 10.1002/chem.201602842.
- Bernard DG, Cheng YF, Zhao YD, Balk J** (2009) An allelic mutant series of ATM3 reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron–sulfur proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **151**: 590-602
- Bernhardt C, Zhao M, Gonzalez A, Lloyd A, Schiefelbein J** (2004) The bHLH genes GL3 and EGL3 participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the *Arabidopsis* root epidermis. *Development* **132**(2): 291-298
- Berrin JG, Pierrugues O, Brutesco C, Alonso B, Montillet JL, Roby D, Kazmaier M** (2005) Stress induces the expression of AtNADK-1, a gene encoding a NAD(H) kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **273**: 10-19
- Bläsing O E, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible W R and Stitt M** (2005) Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**: 3257-3281
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV** (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygendeprivation stress: a review. *Ann Bot.* **91**: 179-194

- Bouain N, Shahzad Z, Rouached A, Khan GA, Berthomieu P, Abdelly C, Poirier Y, Rouached H** (2014) Phosphate and zinc transport and signalling in plants: toward a better understanding of their homeostasis interaction. *J Exp Bot.* **65**(20): 5725-5741
- Bouguyon E, Perrine-Walker F, Pervent M, Rochette J, Cuesta C, Benkova E, Martinière A, Bach L, Krouk G, Gojon A, Nacry P** (2016) Nitrate Controls Root Development through Post-Transcriptional Regulation of the NRT1.1/NPF6.3 transporter/sensor. *Plant Physiol.* pii: pp.01047
- Bournier M, Tissot N, Mari S, Boucherez J, Lacombe E, Briat JF, Gaymard F** (2013) Arabidopsis ferritin 1 (*AtFer1*) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 22670–22680
- Briat JF, Curie C, Gaymard F** (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 276-282
- Briat JF, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F** (2009) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of botany* **105**: 811-22
- Briat JF, Duc C, Ravet K, Gaymard F** (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta* **1800**: 806-814
- Briat, JF, Dubos, C, and Gaymard, F** (2015a) Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci* **20**: 33-40
- Briat JF, Rouached H, Tissot N, Gaymard F, Dubos C** (2015b) Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1). *Front Plant Sci.* **6**:290
- Brini F, Masmoudi K** (2012) Ion Transporters and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *ISRN Mol Biol.* 2012:927436
- Brown JC, Chaney RL, Ambler JE** (1971) A new tomato mutant inefficient in the transport of iron. *Physiol Plant* **25**: 48-53
- Brumbarova T, Bauer P, Ivanov R** (2015) Molecular mechanisms governing *Arabidopsis* iron uptake. *Trends Plant Sci.* **20**: 124–133
- Brumbarova T, Le CT, Ivanov R, Bauer P** (2016) Regulation of ZAT12 protein stability: The role of hydrogen peroxide. *Plant Signal Behav.* **11**(2):e1137408
- Busi MV, Maliandi MV, Valdez H, Clemente M, Zabaleta EJ, Araya A, Gomez-Casati DF** (2006) Deficiency of *Arabidopsis thaliana* frataxin alters activity of mitochondrial Fe–S proteins and induces oxidative stress. *Plant J* **48**:873-882
- Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Pérez-Pérez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J** (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **6**: e1001102

- Cadenas E** (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* **58**: 79-110
- Casano LM, Lascano HR, Trippi VS** (1994) Hydroxyl Radicals and a Thylakoid-Bound Endopeptidase are Involved in Light- and Oxygen-Induced Proteolysis in Oat Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **35**: 145-152
- Castelli V, Aury JM, Jaillon O, Wincker P, Clepet C, Menard M, Cruaud C, Quétier F, Scarpelli C, Schächter V, Temple G, Caboche M, Weissenbach J, Salanoubat M** (2004) Whole genome sequence comparisons and "full-length" cDNA sequences: a combined approach to evaluate and improve Arabidopsis genome annotation. *Genome Res* **4**(3): 406-413
- Cesco S, Neumann G, Tomasi N, Weisskopf L** (2010) Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil* **329**(1): 1-25
- Chen YF, Li LQ, Xu Q, Kong YH, Wang H, Wu WH** (2009) The WRKY6 Transcription Factor Modulates PHOSPHATE1 Expression in Response to Low Pi Stress in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**: 3554–3556.
- Clarkson DT** (1993) Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London, Series B* **341**: 5-17
- Clemens S, Weber M** (2016) The essential role of coumarin secretion for Fe acquisition from alkaline soil. *Plant Signal Behav.* **11**(2):e1114197
- Colangelo EP, Guerinot ML** (2004) The essential bHLH protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**: 3400-3412
- Conte SS, Chu HH, Chan-Rodriguez D, Punshon T, Vasques KA, Salt DE, Walker EL** (2013). Arabidopsis thaliana Yellow Stripe1-Like4 and YellowStripe1-Like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis. *Front Plant Sci* **4**: 283
- Costanzo F, Colombo M, Staempfli S, Santoro C, Marone M, Frank R, Delius H, Cortese R** (1986) Structure of gene and pseudogenes of human apoferritin H. *Nucleic Acids Res* **14**: 721-736
- Couturier J, Touraine B, Briat JF, Gaymard F, Rouhier N** (2013) The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Front Plant Sci* **4**: 259
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL** (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**: 346-349
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR.** 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**: 5-17
- Dellagi A, Rigault M, Segond D, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat JF, Gaymard F, Expert D** (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.* **43**(2):262-272

- Deng X, Eriksson M** (2007) Two iron-responsive promoter elements control expression of FOX1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **6**: 2163-2167
- Diener AC, Gaxiola RA, Fink GR** (2001) Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *Plant Cell*. **13**(7): 1625-1638
- Ding Z, Millar AJ, Davis AM, Davis SJ** (2007) TIME FOR COFFEE encodes a nuclear regulator in the Arabidopsis thaliana circadian clock. *Plant Cell* **19**(5): 1522-1536
- Divol F, Couch D, Conéjéro G, Roschztardt H, Mari S, Curie C** (2013) The Arabidopsis YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *Plant Cell*. **25**(3): 1040-1055
- Dixon DP, Skipsey M, Edwards R** (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. **71**(4): 338-350
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, (...) Gingeras TR** (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**: 101-108
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA** (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* **309**: 630-633
- Dubois M, Skirycz A, Claeys H, Maleux K, Dhondt S, De Bodt S, Vanden Bossche R, DeMilde L, Yoshizumi T, Matsui M, Inzé D** (2013) ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 acts as a Central Regulator of Leaf Growth under Water-Limiting Conditions in Arabidopsis. *Plant Physiology* **162**: 319–332
- Dubos C, Le Gourrierc J, Baudry A, Huel G, Lanet E, Debeaujon I, Routaboul JM, Alboresi A, Weisshaar B, Lepiniec L** (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J*. **55**(6): 940-953
- Duc C, Cellier F, Lobréaux S, Briat J-F, Gaymard F** (2009) Regulation of iron homeostasis in Arabidopsis thaliana by the clock regulator time for coffee. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 36271–36281
- Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE** (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol* **144**: 197-205
- Duy D, Wanner G, Meda AR, Wiren von N, Soll J, Philippar K** (2007) PIC1, an Ancient Permease in Arabidopsis Chloroplasts, Mediates Iron Transport. *The Plant Cell* **19**: 986-1006
- Fei X, Eriksson M, Li Y, Deng X** (2010) A novel negative Fe-deficiency-responsive element and a TGGCA-type-like FeRE control the expression of FTR1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biomed Biotechnol*. doi:10.1155/2010/790247.

- Finazzi D, Arosio P** (2014) Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Arch Toxicol* **88**: 1787-1802
- Fourcroy P, Vansuyt G, Kushnir S, Inzé D, Briat JF** (2004) Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the APX1 gene in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol* **134**(2): 605-613
- Fourcroy P, Siso-Terraza P, Sudre D, Saviron M, Reyt G, Gaymard F, Abadia A, Abadia J, Alvarez-Fernandez, A, Briat, JF** (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* **201**: 155–167.
- Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP** (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci* **32**: 63-70
- García MJ, Lucena C, Romera FJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R** (2010) Ethylene and nitric oxide involvement in the up-regulation of key genes related to iron acquisition and homeostasis in Arabidopsis. *J Exp Bot.* **61**(14): 3885-3899
- Gendre D, Czernic P, Conéjéro G, Pianelli K, Briat JF, Lebrun M, Mari S** (2007) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *The Plant Journal* **49**: 1-15
- Gigolashvili T, Berger B, Mock H-P, Müller C, Weisshaar B, Flügge UI** (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **50**: 886–901
- Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR** (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(19): 7089-7093
- Golden DE, Gerbasi VR, Sontheimer EJ** (2008) An inside job for siRNAs. *Molecular Cell* **31**(3): 309–312
- Gollhofer J, Timofeev R, Lan P, Schmidt W, Buckhout TJ** (2014) Vacuolar-iron-transporter1-like proteins mediate iron homeostasis in Arabidopsis. *PLoS One* **9**: e110468
- Green LS, Rogers EE** (2004) FRD3 controls iron localization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**: 2523-2531
- Greene RM, Geider RJ, Kolber Z, Falkowski PG** (1992) Iron-induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion processes in eukaryotic marine algae. *Plant Physiol* **100**: 565-575
- Grierson C, Nielsen E, Ketelaarc T, Schiefelbein J** (2014) Root hairs. *Arabidopsis Book.* **12**:e0172
- Grusak MA, Pezeshgi S** (1996) Shoot-to-Root Signal Transmission Regulates Root Fe(III) Reductase Activity in the dgl Mutant of Pea. *Plant Physiology* **110**: 329-334

- Guerinot ML, Yi Y** (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol* **104**: 815-820
- Guo L, Santschi PH, Warnken KW** (1995) Dynamics of dissolved organic carbon in oceanic environments. *Limnol Oceanogr* **40**: 1392-1403
- Gutteridge JM, Halliwell B** (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci* **899**: 136-147
- Halliwell B, Gutteridge JM** (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**: 1-14
- Hantke K** (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **4**(2):172-177
- Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey PC** (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* **20**: 735-747
- Hell R, Stephan UW** (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**: 541-551
- Hentze MW, Rouault TA, Harford JB, Klausner RD** (1989) Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. *Science* **244**: 357-359
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C** (2010) Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* **142**: 24-38
- Herrero E, Davis SJ** (2012) Time for a nuclear meeting: protein trafficking and chromatin dynamics intersect in the plant circadian system. *Mol Plant* **5**: 554-565
- Higa A, Mori Y, Kitamura Y** (2010) Iron deficiency induces changes in riboflavin secretion and the mitochondrial electron transport chain in hairy roots of *Hyoscyamus albus*. *J Plant Physiol.* **167**(11): 870-878
- Hintze KJ, Katoh Y, Igarashi K, Theil EC** (2007) Bach1 repression of ferritin and thioredoxin reductase1 is heme-sensitive in cells and in vitro and coordinates expression with heme oxygenase1, beta-globin, and NADP(H) quinone (oxido) reductase1. *J Biol Chem* **282**: 34365–34371
- Hirsch J, Marin E, Floriani M, Chiarenza S, Richaud P, Nussaume L, Thibaud MC** (2006) Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. *Biochimie* **88**: 1767–1771
- Hoagland DR, Snyder WC** (1933) Nutrition of strawberry plants under controlled conditions. *Proc Am Soc Hortic.* **30**: 288–296
- Honda K, Smith MA, Zhu X, Baus D, Merrick WC, Tartakoff AM, Hattier T, Harris PL, Siedlak SL, Fujioka H, Liu Q, Moreira PI, Miller FP, Nunomura A, Shimohama S, Perry G** (2005) Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. *J Biol Chem* **280**: 20978-20986

- Hua Z, Vierstra RD** (2011) The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 299-334
- Huang H, Alvarez S, Bindbeutel R, Shen Z, Naldrett MJ, Evans BS, Briggs SP, Hicks LM, Kay SA, Nusinow DA** (2016) Identification of Evening Complex Associated Proteins in Arabidopsis by Affinity Purification and Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. **15**(1): 201-217
- Hyde BB, Hodge AJ, Kahn A, Birnstiel ML** (1963) Studies on phytoferritin. 1. Identification and localization. *J Ultrastruct Res* **9**: 248-258
- Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2011) The role of rice phenolics efflux transporter in solubilizing apoplasmic iron. *Plant Signal Behav.* **6**(10):1624-1626
- Jablonkai I, Komives T, Boger P, Sato Y, Wakabayashi K** (1997) Chemical catalysis of the isomerization of a peroxidising herbicidal thiadiazolidine. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Weeds* : 771–776
- Jabnoute M, Secco D, Lecampion C, Robaglia C, Shu Q, Poirier Y** (2013) A rice cis-natural antisense RNA acts as a translational enhancer for its cognate mRNA and contributes to phosphate homeostasis and plant fitness. *Plant Cell* **25**: 4166-4182
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Percy F** (2001) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **7**(3):106-11
- James AB, Monreal JA, Nimmo GA, Kelly CL, Herzyk P, Jenkins GI, Nimmo HG** (2008) The circadian clock in Arabidopsis roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science* **322**: 1832-1835
- Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML** (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 10619–10624
- Jeong J, Guerinot ML** (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci* **14**(5):280-5
- Jiang Y, Deyholos MK** (2009) Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol.* **69**: 91–105
- Jin CW, You GY, He YF, Tang C, Wu P, Zheng SJ** (2007) Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiol.* **144**: 278–285.
- Jossier M, Kroniewicz L, Dalmas F, Le Thiec D, Ephritikhine G, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Vavasseur A, Filleur S, Leonhardt N** (2010) The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLC_c, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant J.* **64**(4): 563-576

- Kai K, Mizutani M, Kawamura N, Yamamoto R, Tamai M, Yamaguchi H, Sakata K, Shimizu B** (2008) Scopoletin is biosynthesized *via* ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **55**(6):989-999
- Kaplan CD, Kaplan J** (2009) Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chem Rev.* **109**(10):4536-4552
- Ke Q, Kim HS, Wang Z, Ji CY, Jeong JC, Lee HS, Choi YI, Xu B, Deng X, Yun DJ, Kwak SS** (2016) Down-regulation of GIGANTEA-like genes increases plant growth and salt stress tolerance in poplar. *Plant Biotechnol J.* doi: 10.1111/pbi.12628
- Kelemen Z, Sebastian A, Xu W, Grain D, Salsac F, Avon A, Berger N, Tran J, Dubreucq B, Lurin C, Lepiniec L, Contreras-Moreira B, Dubos C** (2015) Analysis of the DNA-Binding Activities of the *Arabidopsis* R2R3-MYB Transcription Factor Family by One-Hybrid Experiments in Yeast. *PLoS One.* **10**(10):e0141044
- Kelemen Z, Przybyla-Toscano J, Tissot N, Lepiniec L, Dubos C** (2016) Fast and Efficient Cloning of Cis-Regulatory Sequences for High-Throughput Yeast One-Hybrid Analyses of Transcription Factors. *Methods Mol Biol.* **1482**: 139-149
- Khabaz-Saberi H, Rengel Z** (2010) Aluminum, manganese, and iron tolerance improves performance of wheat genotypes in waterlogged acidic soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **173**(3):3461–468
- Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML** (2006) Localization of Iron in *Arabidopsis* Seed Requires the Vacuolar Membrane Transporter VIT1. *Science* **314**: 1295-1298
- Kobayashi T, Nishizawa NK** (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* **63**:131-152
- Kobayashi T, Nagasaka S, Senoura T, Itai RN, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2013) Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat Commun* **4**: 2792
- Kobayashi T, Itai RN, Senoura T, Oikawa T, Ishimaru Y, Ueda M, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2016) Jasmonate signaling is activated in the very early stages of iron deficiency responses in rice roots. *Plant Mol Biol.* **91**: 533-547
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37-44
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 2940-2945
- Krouk G, Mirowski P, LeCun Y, Shasha DE, Coruzzi GM** (2010) Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol.* **11**(12):123

- Kruger C, Hell R, Stephan UW** (2001) A metal-binding LEA protein trafficks micronutrients in the phloem of *Ricinus communis* L. *Plant nutrition-food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research* **92**: 194-195
- Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, Davey MW, Papenbrock J, De Rycke R, Engler G, Stephan UW, Lange H, Kispal G, Lill R, Van Montagu M** (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *Plant Cell* **13**: 89-100
- Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2005) Mobilization of vacuolar iron by 120 AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal* **24**: 4041-4051
- Lawson DM, Artymiuk PJ, Yewdall SJ, Smith JMA, Livingstone JC, Treffry A, Luzzago A, Levi S, Arosio P, Cesareni G, Thomas CD, Shaw WV, Harrison PM** (1991) Solving the structure of human H-ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature* **349**: 541-544
- Le CT, Brumbarova T, Ivanov R, Stoof C, Weber E, Mohrbacher J, Fink-Straube C, Bauer P** (2016) ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA12 (ZAT12) Interacts with FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT) Linking Iron Deficiency and Oxidative Stress Responses. *Plant Physiol.* **170**(1): 540-5577
- Lei L, Li Y, Wang Q, Xu J, Chen Y, Yang H, Ren D** (2014) Activation of MKK9 MPK3/MPK6 enhances phosphate acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **203**(4):1146-1160
- Li B, Byrt C, S Qiu J, Baumann U, Hrmova M, Evrard A, Johnson AA, Birnbaum KD, Mayo GM, Jha D, Henderson SW, Tester M, Gilliam M, Roy SJ** (2015) Identification of a Stelar-Localized Transport Protein That Facilitates Root-to-Shoot Transfer of Chloride in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **170**(2): 1014-1029
- Li X, Zhang H, Ai Q, Liang G, Yu D** (2016) Two bHLH Transcription Factors, bHLH34 and bHLH104, Regulate Iron Homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **170**(4): 2478-2493
- Lima JE, Kojima S, Takahashi H, von Wirén N** (2010) Ammonium Triggers Lateral Root Branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-Dependent Manner. *Plant Cell.* **22**(11):3621-3633
- Ling HQ, Bauer P, Berczky Z, Keller B, Ganai M** (2002) The tomato *fer* gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13938-13943
- Liu ZQ, Yan L, Wu Z, Mei C, Lu K, Yu YT, Liang S, Zhang XF, Wang XF, Zhang DP** (2012) Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* **63**: 6371-6392

- Liu T, Carlsson J, Takeuchi T, Newton L, Farré EM** (2013) Direct regulation of abiotic responses by the Arabidopsis circadian clock component PRR7. *Plant J* **76**: 101-114
- Liu Q, Chen X, Wu K, Fu X** (2015) Nitrogen signaling and use efficiency in plants: what's new? *Current Opinion in Plant Biology* **27**: 192–198
- Lobréaux S, Yewdall SJ, Briat JF, Harrison PM** (1992) Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochem J* **288**: 931-939
- Lobréaux S, Thoiron S, Briat JF** (1995) Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. *The Plant Journal* **8**: 443-449
- Locke JCW, Kozma-Bognar L, Gould PD, Fehér B, Kevei É, Nagy F, Turner MS, Hall A, Millar AJ** (2006) Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol* **2**: 59
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt D E, Benfey PN** (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **22**(7): 2219-2236
- Manzano D, Andrade P, Caudepón D, Altabella T, Arró M, Ferrer A** (2016) Suppressing Farnesyl Diphosphate Synthase Alters Chloroplast Development and Triggers Sterol-Dependent Induction of Jasmonate- and Fe-Related Responses. *Plant Physiol.* **172**(1): 93-117
- Marentes E, Grusak MA** (1998) Iron transport and storage within the seed coat and embryo of developing seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Seed Science Research* **8**: 367-375
- Marinova K, Pourcel L, Weder B, Schwarz M, Barron D, Routaboul JM, Debeaujon I, Klein M** (2007) The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺ -antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell.* **19**(6): 2023-38
- Marschner H** (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press
- Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N** (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364**: 247–249.
- Más P** (2005) Circadian clock signaling in Arabidopsis thaliana: From gene expression to physiology and development. *The International Journal of Developmental Biology* **49**: 491-500
- Matsuyama S, Shimura M, Fujii M, Maeshima K, Yumoto H, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Nishino Y, Tamasaku K, Ishizaka Y, Ishikawa T, Yamauchi K** (2010) Elemental mapping of frozen hydrated cells with cryo-scanning X-ray fluorescence microscopy. *X-Ray Spectrometry* **39**: 260-266.
- Maurer F, Müller S, Bauer P** (2011) Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. *Plant Physiol Biochem.* **49**(5): 530-536

- Mendoza-Cózatl DG, Butko E, Springer F, Torpey JW, Komives EA, Kehr J, Schroeder J** (2008) Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J*. **54**(2): 249-259
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS** (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews* **10**(3): 155-159
- Meyerowitz EM** (2002) Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**(5559):1482-1485
- Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, Doumas P, Nacry P, Herrerra-Estrella L, Nussaume L, Thibaud MC** (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 11934-11939
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498
- Mittler R, Kim Y, Song L, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Lee H, Stevenson B, Zhu JK** (2006) Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Lett*. **580**: 6537–6542
- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM** (2005) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase *SIZ1* controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21): 7760-7765
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor *HXK1* in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336
- Morel DA, Machado MO** (1981) Identification of iron toxicity in Brazil. *Int Rice Res Newsl* **6**:9
- Mori S** (1999) Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 250-253
- Müller J, Toev T, Heisters M, Teller J, Moore KL, Hause G, Dinesh DC, Bürstenbinder K, Abel S** (2015) Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Developmental Cell* **33**: 216-230
- Murgia I, Delledonne M, Soave C** (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J* **30**: 521-528
- Murgia I, de Pinto MC, Delledonne M, Soave C, De Gara L** (2004) Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *Journal of Plant Physiology* **161**:777-783

- Nechushtai R, Conlan AR, Harir Y, Song L, Yogev O, Eisenberg-Domovich Y, Livnah O, Michaeli D, Rosen R, Ma V, Luo Y, Zuris JA, Paddock ML, Cabantchik ZI, Jennings PA, Mittler R** (2012) Characterization of Arabidopsis NEET reveals an ancient role for NEET proteins in iron metabolism. *Plant Cell*. **24**(5): 2139-2154
- Nguyen HT, Kim SY, Cho KM, Hong JC, Shin JS, Kim HJ** (2016) A Transcription Factor γ MYB1 Binds to the P1BS cis-Element and Activates PLA2- γ Expression with its Co-Activator γ MYB2. *Plant Cell Physiol* **57**: 784-797
- Nikolic M, Römheld V** (2003) Nitrate does not result in iron inactivation in the apoplast of sunflower leaves. *Plant Physiology* **132**: 1303-1314
- Nishio JN, Taylor SE, Terry N** (1985) Changes in Thylakoid Galactolipids and Proteins during Iron Nutrition-Mediated Chloroplast Development. *Plant Physiol* **77**: 705-711
- Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J Biol Chem* **286**: 5446-5454
- Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN** (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448**: 358-361
- O'Brien JA, Daudi A, Finch P, Butt VS, Whitelegge JP, Souda P, Ausubel FM, Bolwell GP** (2012) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured Arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol* **158**: 2013-2027
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S** (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* **10**(6): 239-247
- Otegui MS, Capp R, Staehelin LA** (2002) Developing seeds of Arabidopsis store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **14**: 1311-1327
- Palmer CM, Hindt MN, Schmidt H, Clemens S, Guerinot ML** (2013) MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PloS Genetics* **9**: e1003953
- Pantopoulos K** (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann NY Acad Sci* **1012**: 1-13
- Paz-Ares J, Regia Consortium** (2002) REGIA, An EU Project on Functional Genomics of Transcription Factors From Arabidopsis Thaliana. *Comp Funct Genomics* **3**(2):102-108
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734

- Peñarrubia L, Romero P, Carrió-Seguí A, Andrés-Bordería A, Moreno J, Sanz A** (2015) Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Front Plant Sci.* **6**:255
- Peng XX, Yamauchi M** (1993) Ethylene production in rice bronzing leaves induced by ferrous iron. *Plant and Soil* **149**: 227-234
- Perea-García A, Sanz A, Moreno J, Andrés-Bordería A, de Andrés SM, Davis AM, Huijser P, Davis SJ, Peñarrubia L** (2016) Daily rhythmicity of high affinity copper transport. *Plant Signal Behav.* **11**(3):e1140291
- Petit JM, Briat JF, Lobréaux S** (2001) Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *The Biochemical Journal* **359**: 575–582
- Pitzschke A, Forzani C, Hirt H** (2006) Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal* **8**: 1757-1764
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H** (2009) A major role of the MEKK1-MKK1/2 MPK4 pathway in ROS signalling. *Mol Plant.* **2**: 120–137
- Polle A** (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* **126**: 445-462
- Ponnamperuma FN, Bradfield R, Pech M** (1955) Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. *Nature* **175**: 265
- Ponnamperuma FN, Tianco EM, Loy TA** (1967) Redox equilibria in flooded soils: the iron hydroxide systems. *Soil Sci* **103**: 374-382
- Pryor WA** (1988) Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radical Biology and Medicine* **4**: 219-223
- Ragland M, Briat JF, Gagnon J, Laulhere JP, Massenet O, Theil EC** (1990) Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *J Biol Chem* **265**: 18339-18344
- Rai V, Sanagala R, Sinilal B, Yadav S, Sarkar AK, Dantu PK, Jain A** (2015) Iron availability affects phosphate deficiency-mediated responses, and evidence of cross-talk with auxin and zinc in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **56**: 1107-1123
- Ramana CV, Boldogh I, Izumi T, Mitra S** (1998) Activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5061-5066
- Rampey RA, Woodward AW, Hobbs BN, Tierney MP, Lahner B, Salt DE, Bartel B** (2006) An *Arabidopsis* basic helix-loop-helix leucine zipper protein modulates metal homeostasis and auxin conjugate responsiveness. *Genetics.* **174**(4): 1841-1857

- Raven JA, Evans MCW, Korb RE** (1999) The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthesis Research* **60**: 111-149
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F** (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant J* **57**:400-412
- Ravet K, Reyt G, Arnaud N, Krouk G, Djouani el-B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F** (2012) Iron and ROS control of the DownStream mRNA decay pathway is essential for plant fitness. *EMBO J* **31**: 175-186
- Reichard P** (1993) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**: 1773-1777
- Reyt G, Boudouf S, Boucherez J, Gaymard F, Briat JF** (2015) Iron- and ferritin-dependent reactive oxygen species distribution: impact on Arabidopsis root system architecture. *Mol Plant*. **8**: 439-453
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY** (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**: 1311–1323
- Rizhsky L, Davletova S, Liang H, Mittler R** (2004) The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis. *J Biol Chem* **279**(12): 1736-1743
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697
- Rodriguez-Celma J, Lin WD, Fu, GM, Abadia, J., Lopez-Millan AF, Schmidt W** (2013) Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by Arabidopsis and Medicago truncatula. *Plant Physiol*. **162**: 1473–1485
- Römheld V, Marschner H** (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol*. **80**(1): 175-180
- Roschzttardtz H, Seguela-Arnaud M, Briat JF, Vert G, Curie C** (2011) The FRD3 citrate effluxer promotes iron nutrition between symplastically disconnected tissues throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **23**: 2725-2737
- Roschzttardtz H, Conéjéro G, Divol F, Alcon C, Verdeil JL, Curie C, Mari S** (2013) New insights into Fe localization in plant tissues. *Front Plant Sci* **4**: 350
- Rouault TA, Tong WH** (2005) Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 345-351
- Rubio MC, Ramos J, Webb KJ, Minchin FR, Gonzalez E, Arrese-Igor C, Becana M** (2001) Expression studies of superoxide dismutases in nodules and leaves of transgenic alfalfa reveal abundance of iron-containing isozymes, posttranslational regulation, and compensation of isozymes activities. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 1178-1188

- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ** (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**: 1360-1385
- Salahudeen AA, Thompson JW, Ruiz JC, Ma HW, Kinch LN, Li Q, Grishin NV, Bruick RK** (2009) An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science*. **326**: 722-726
- Sanchez-Villarreal A, Shin J, Bujdoso N, Obata T, Neumann U, Du S X, Ding Z, Davis A M, Shindo T, Schmelzer E, Sulpice R, Nunes-Nesi A, Stitt M, Fernie AR and Davis SJ** (2013) TIME FOR COFFEE is an essential component in the maintenance of metabolic homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* Volume **76**(2):188–200
- Santi S, Schmidt W** (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol* **183**: 1072-1084
- Segond D, Dellagi A, Lanquar V, Rigault M, Patrit O, Thomine S, Expert D** (2009) NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.* **58**(2):195-207
- Selote D, Samira R, Matthiadis A, Gillikin J W, Long TA** (2015). Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting bHLH transcription factors. *Plant Physiol.* **167**(1): 273-286
- Shikanai T, Müller-Moulé P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M** (2003) PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* **15**: 1333-1346
- Shin J, Heidrich K, Sanchez-Villarreal A, Parker J and Davis S** (2012) TIME FOR COFFEE Represses Accumulation of the MYC2 Transcription Factor to Provide Time-of-Day Regulation of Jasmonate Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**(6): 2470–2482
- Shin LJ, Lo JC, Chen GH, Callis J, Fu H, Yeh KC** (2013) IRT1 degradation factor1, a ring E3 ubiquitin ligase, regulates the degradation of iron-regulated transporter1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 3039-3051
- Singh BP, Das M, Prasad RN, Ram M** (1992) Characteristics of Fe-toxic soils and affected plants and their correction in acid Haplaquents of Meghalaya. *International Rice Research Newsletter* **17**: 18-19
- Shingles R, North M, McCarty RE** (2002) Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes. *Plant Physiol* **128**: 1022-1030
- Smith AM, Stitt M** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell* **30**(9): 1126-1149
- Son GH, Wan J, Kim HJ, Nguyen XC, Chung WS, Hong JC, Stacey G** (2012) Ethylene-responsive element-binding factor 5, ERF5, is involved in chitin-induced innate immunity response. *Mol Plant Microbe Interact.* **25**(1):48-60

- Song WY, Mendoza-Cózatl DG, Lee Y, Schroeder JI, Ahn SN, Lee HS, Wicker T, Martinoia E** (2014) Phytochelatin-metal(loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* **37**(5): 1192-201
- Steiner E, Kleinhappl B, Gutsch A, Marth E** (1998) Analysis of hsp70 mRNA levels in HepG2 cells exposed to various metals differing in toxicity. *Toxicol. Lett.* **96-97**, 169-176.
- Strozycki PM, Szymanski M, Szczurek A, Barciszewski J, Figlerowicz M** (2010) A new family of ferritin genes from *Lupinus luteus*--comparative analysis of plant ferritins, their gene structure, and evolution. *Mol Biol Evol* **27**: 91-101
- Sullivan ML, Green PJ** (1996) Mutational analysis of the DST element in tobacco cells and transgenic plants: identification of residues critical for mRNA instability. *RNA* **2**: 308-315
- Sun L, Song L, Zhang Y, Zheng Z, Liu D** (2016) Arabidopsis PHL2 and PHR1 Act Redundantly as the Key Components of the Central Regulatory System Controlling Transcriptional Responses to Phosphate Starvation. *Plant Physiol.* **170**: 499-514
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK** (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* **15**: 1263-1280
- Tarantino D, Petit JM, Lobreaux S, Briat JF, Soave C, Murgia I** (2003) Differential involvement of the IDRS cis-element in the developmental and environmental regulation of the AtFer1 ferritin gene from Arabidopsis. *Planta* **217**:709-716
- Terry N** (1980) Limiting factors in photosynthesis. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiol* **65**:114-120
- Terry N, Abadía J** (1986) Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition* **9**: 609-646
- Theil EC** (1987) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* **56**: 289-315
- Thiel** (2007) Coordinating responses to iron and oxygen stress with DNA and mRNA promoters: the ferritin story. *Biometals* **20**: 513-521
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4991-4996
- Tissot N, Przybyla-Toscano J, Reyt G, Castel B, Duc C, Boucherez J, Gaymard F, Briat JF, Dubos C** (2014) Iron around the clock. *Plant Sci.* **224**:112-9.
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**: 606-616

- Van Aken O, Zhang B, Law S, Narsai R, Whelan J** (2013) AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins. *Plant Physiol.* **162**: 254-271
- Van der Mark F, Bienfait F, Van den Ende H** (1983) Variable amounts of translatable ferritin mRNA in bean leaves with various iron contents. *Biochem Biophys Res Commun* **115**: 463-469
- Van Nocker S, Walker JM, Vierstra RD** (1996) The *Arabidopsis thaliana* UBC7/13/14 genes encode a family of multiubiquitin chain-forming E2 enzymes. *J. Biol. Chem* **271**: 12150–12158
- Van Wuytswinkel O, Vansuyt G, Grignon N, Fourcroy P, Briat JF.** (1999) Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *The Plant Journal* **17**: 93–97
- Vaughn M, Martienssen R** (2005) Finding the Right Template: RNA Pol IV, a Plant-Specific RNA Polymerase *Mol. Cell* **17**(6): 754–756
- Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena RO** (2009) Comparative analysis of the contribution of phytochelatins to cadmium and arsenic tolerance in soybean and white lupin. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 63–67
- Vazzola V, Losa A, Soave C, Murgia I** (2007) Knockout of frataxin gene causes embryo lethality in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**: 667-672
- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-1233
- Vidal EA, Moyano TC, Krouk G, Katari MS, Tanurdzic M, McCombie WR, Coruzzi GM, Gutiérrez RA** (2013) Integrated RNA-seq and sRNA-seq analysis identifies novel nitrate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *BMC Genomics.* **14**:701
- Vigani G, Tarantino D, Murgia I** (2013) Mitochondrial ferritin is a functional ironstorage protein in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. *Front Plant Sci* **4**: 316
- Virmani SS** (1977) Varietal tolerance of rice to iron toxicity in Liberia. *International Rice Research Newsletter* **2**: 4-5
- Von Wiren N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC** (1999) Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* **119**: 1107-1114
- Wang HY, Klatte M, Jakoby M, Bäumlein H, Weisshaar B, Bauer P** (2007) Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* **226**(4): 897-908
- Wang L, Li Z, Qian W, Guo W, Gao X, Huang L, Wang H, Zhu H, Wu JW, Wang D, Liu D** (2011) The *Arabidopsis* purple acid phosphatase AtPAP10 is predominantly associated with the root surface and plays an important role in plant tolerance to phosphate limitation. *Plant Physiol* **157**: 1283-1299

- Wang P, Du Y, Zhao X, Miao Y, Song C-P** (2013) The MPK6-ERF6-ROS responsive cisactingelement7/GCC box complex modulates oxidative gene transcription and the oxidativeresponse in Arabidopsis. *Plant Physiol* **161**: 1392-1408
- Wang Z, Ruan W, Shi J, Zhang L, Xiang D, Yang C, Li C, Wu Z, Liu Y, Yu Y, Shou H, Mo X, Mao C, Wu P** (2014) Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(41): 14953-14958
- Ward JT, Lahner B, Yakubova E, Salt DE, Raghothama KG** (2008) The effect of iron on the primary root elongation of Arabidopsis during phosphate starvation. *Plant Physiol*. **147**: 1181- 1191
- Waters BM, Chu HH, DiDonato RJ, Roberts LA, Eisley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL** (2006) Mutations in Arabidopsis yellowstripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol* **141**: 1446-1458
- Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS** (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* **135**: 635-648
- Wilusz JE, Sunwoo H, and Spector DL** (2009) Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev* **23**(13): 1494–1504
- Winge DR, Jensen LT, Srinivasan C** (1998) Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**: 216-221
- Wirth D, Christians E, Munaut C, Dessy C, Foidart JM, Gustin P** (2003) Differential heat shock gene hsp70-1 response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice. *Cell Stress Chaperones*. **7**(4):387-395
- Yazaki K** (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett* **580**: 1183–1191
- Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, Mitani N, Ma JF** (2009) OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol* **149**: 297-305
- Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J** (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**(7180):789-95
- Yuan Y, Wu H, Wang N, Li J, Zhao W, Du J, Wang D, Ling HQ** (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res* **18**: 385-397
- Zamioudis C, Hanson J, Pieterse CM** (2014) β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in Arabidopsis roots. *New Phytol*. **204**(2): 368-79

- Zhang X, Henderson IR, Lu C, Green PJ, Jacobsen SE** (2007) Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11): 4536-41
- Zhang Y, He Q, Zhao S, Huang L, Hao L** (2014) Arabidopsis ein2-1 and npr1-1 response to Al stress. *Bull Environ Contam Toxicol* **93**(1):78-83
- Zhang J, Liu B, Li M, Feng D, Jin H, Wang P, Liu J, Xiong F, Wang J, Wang HB** (2015) The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*. **27**(3): 787-805
- Zhou C, Cai Z, Guo Y, Gan S** (2009) An arabidopsis mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiol*. **150**(1):167-177
- Zhou H, Lin-Wang K, Wang H, Gu C, Dare AP, Espley RV, He H, Allan AC, Han Y** (2015) Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *Plant J*. **82**(1): 105-121

Annexes

Tableaux Supplémentaire 1 :

Géotypages	Sequence 5'->3'
Amorce	
phr1-3-F	GGGCTGACCATTTGATCACT
phr1-3-R	CCTTTCTGGCGAACCTGTAG
phl1-2-F	GTTTCATCAGAGGACCAGCTCAGCGGCAG
phl1-2-R	TAATCTTCTCTGACACGTTTCCTTGATG
tic-2-F	GCCTTCCTACAATGGGGTATG
tic-2-R	GAGCTGTCTCTGAGCTTTTGG
irl3-1-F	AGAAATCGCTATGGAATTGTTTATGGTTCT
irl3-1-R	CATTGTTCAACAGATAACAGTTACGATGAT
irl3-3-F	TCAATCAATTCCCGAATCAAG
irl3-3-R	CTTGCCACTATAACGATTTTG
bhlh104-1-F	GGGGAAAGGTTGTGTCTTTTG
bhlh104-1-R	GCCTGAGTTCTTGATCACGAG
bhlh104-2-F	TCATCGGTTTTATTTCGGTCTG
bhlh104-2-R	GAGGAACTAAAGCGTGTCTGTG
pye-1-L	TTCAAGACCTCATTCACTGGC
pye-1-R	GGGGATTGATTATGTTTGGTG
bts-1-L	CCAAATGCGTTCGTAGGTAAG
bts-1-R	TCAGATTTACACAAATTTGCAGC
bts-10-L	AGAAATCTCTTCCGCGTCATC
bts-10-R	AGTAAACCTTGGAGCACATGC
bts-12-L	ATCGACATGGTGACCAGTAGC
bts-12-R	TTAGATTACGAACGGGTGCTG
bhlh34-F	TGGAAATCTTGAGCAAGTTTGT
bhlh34-R	ATCACATCAAACAACGAAATGG
bhlh115-F	CGCTGAGGTAATTCCTCTTCC
bhlh115-R	CAGAGGAACGTAAGCAAACG
SAIL_269_H10 LP	AGAAGGACAAGCTGGTCACTG
SAIL_269_H10 RP	AGAGGAGGAGGACGACGATAG
NRPD1a-4-F	TGGGTTTGCCATTTTCATATC
NRPD1a-4-R	GCATGCTTGAGTAAAAGGTGC
DCL2-F	TGAATCATCTGGAAGAGGTGG
DCL2-R	CTTCACAGGAGTTTTTGGCTG
DCL3-F	ACAGGTAACCTTGCCATGTTG
DCL3-R	TGGAAAAGTTTGCTACAACGG
DCL4-F	TTTGCCAGTCTTACAAGTGGG
DCL4-R	GAGGCACCATATAGCAGCTTG

Clonages	
Nom	Sequence 5'->3'
pFER1-1,478Kb-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcccactctcgaccgttgattcg
pFER1-1Kb-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcgcctacccttgctttgtgc
pFER1-496bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttccctatgtcaatgtgtcacagg
pFER1-239bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcTTAACGTGGATCGAATATCC
pFER1-217bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcACGTTACACTATCCCATTGG
pFER1-202bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcCATTGGATGTAGCACGAGGCCG
pFER1-169bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcTACATCTGGCTTTCATATCC
pFER1-155bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcATATCCACCCTCCACGTGGATC
pFER1-137bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcGATCTCAATCCAACGGTGACC
pFER1-120bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcGACCACACGCCTTTTCCCTC
pFER1-B2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcCGTTGGAAAATGTAGAAGAGG
pFER1-1Kb-35mB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgtcctctccaatgaaatgaacttcttatatagaggaagg gtcttgcgcacaaagacaagggtaggc
pFER1496pb35mB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgtcctctccaatgaaatgaacttcttatatagaggaagg gtcttgccttgtgacacatattgacatagg
pFER1-496bp-mELEM2F	AatggatATCaAtggaCtTCACGTTACACTATCCCATTGG
pFER1-496bp-mELEM2R	GAaGTccaTtGATatccatTAACATCTCTCCAAATAAAG
pFER1-496bp-mELEM3F	ATCCTCAaGtTCcCAgTAatCCATTGGATGTAGCACGAGG
pFER1-496bp-mELEM3R	GatTAcTGgGAaCtTGAGGATATTCGATCCACGT
pFER1-496bp-mELEM4F	atgGAGGCCCGcggatCGCCCCTACATCTGGCTTTC
pFER1-496bp-mELEM4R	GGGCGatccGCGGCCTCcatCTACATCCAATGGGATAGTG
pFER1-496bp-mELEM5F	ATgTCCACCCTCatggatGATCTCAATCCAACGGTGACCAC
pFER1-496bp-mELEM5R	TCatccatGAGGGTGGAcATGAAAGCCAGATGTAGGGG
pFER1-496bp-mELEM6F	acATCCtACGGgGACCACACGCCTTTTCCCTC
pFER1-496bp-mELEM6R	GTGTGGTcCCGTaGGATgtAGATCCACGTGGAGGGTGGa
pFER1-496bp-mELEM7F	atggatGCTTcCATATCCACCCTCCACGTGGATCTCAATCC
pFER1-496bp-mELEM7R	GTGGATATGgAAGCatccatTAGGGGCGTGTGGCGGCCTC
pFER1-496bp-mGATAR	TCatccatGAGGGTGGATATGAAAGCCAGATGTAGGGG
pFER1-496bp-mGboxF	ATgTCCACCCTCCACGTGGATCTCAATCCAACGGTGACCAC
pFER1-496bp-mGboxR	TCCACGTGGAGGGTGGAcATGAAAGCCAGATGTAGGGG
pFER1-496bp-mNewIDRSF	CGGTGACatgACGCCTTTTCCCTCTTATATAAACCCCTTCTCC
pFER1-496bp-mNewIDRSR	GGCGTcatGTCACCGTTGGATTGAGATCCACGTGG

Clonages	
Nom	Sequence 5' ->3'
pFER1-496bp-mABRE-F	AatggatATCGAATATCCTCACGTTACACTATCCCATTGG
pFER1-496bp-mABRE-R	GAGGATATTCGATatccatTAACATCTCTCCAAATAAAG
pFER1-496bp-mP1BS-F	AACGTGGATCaAtggaCtTCACGTTACACTATCCCATTGG
pFER1-496bp-mP1BS-R	GAAGtccaTtGATCCACGTTAACATCTCTCCAAATAAAG
pFER1-496bp-mTbox-F	ATCCTCAaGtTCACACTATCCCATTGGATGTAGCACGAGG
pFER1-496bp-mTbox-R	GGATAGTGTGAaCtTGAGGATATTCGATCCACGT
pFER1-496bp-mFeRE-F	ATCCTCACGTTCCaAgTAatCCATTGGATGTAGCACGAGG
pFER1-496bp-mFeRE-R	GatTAcTGgGAACGTGGAGGATATTCGATCCACGT
pFER3-1478bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcCACCTGAGCTCTCTAAGCTGAAG
pFER3-1247bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcAACTGGCTTTACATTGTGTTG
pFER3-946bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcaaatagtctctttcatcaag
pFER3-496bp-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttctaaggctcgagattattaaatcc
pFER3-B2	ggggaccactttgtacaagaagctgggtctttctctgtgtcgcacg
pIRL3-1.5Kb-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcAGCAACAGGAGGACGAAGGACATG
gILR3-B2	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcAGCAACAGGAGGACGAAGGACATG
pFER1-1478bp-F	tctctcgagaaggatagag
pFER1-R	CGTTGGAAAATGTAGAAGAGG
gLncRNA-B1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcTCATCCCCAAACAACACTACG
gLncRNA-B2	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcTTATAGTAAACAATTGTATTTG

qPCR	
Nom	Sequence 5'->3'
ILR3-Q1	GCAACCTATTGGTGTTCCTTCTAACTC
ILR3-Q2	CCAGGTTCTTTGCTAGCTTCTGA
bHLH104-Q1	CCAGCTGCATTTAACCACAACA
bHLH104-Q2	TTAAGCAGCAGGAGGCCTGAG
PYE-Q1	CAGGACTTCCCATTTTCAA
PYE-Q2	CTTGTGTCTGGGGATCAGGT
BTS-Q1	ACCATGTCGATCTCCGGCTG
BTS-Q2	CAAGAGAATATGTTTTCGCTACATT
bHLH34-Q1	TCGTCATCTGTTGGAGCTGT
bHLH34-Q2	GTTTCTCGCGACAGGCTTG
PP2-F	TAAGGTGGCCAAAATGATGC
PP2-R	GTTCTCCACAACCGCTTGGT
FER1-F	TCGTTGAGAGTGAATTTCTGG
FER1-R	ACCCCAACATTGGTCATCTG
FER3-F	AGAGTGTGTTTCTGAACGAAC
FER3-R	CCAAACTGCGAGATTACAGC
FER4-F	AGAGCGAGTTTCTGACAGAG
FER4-R	CACAGTAGACACAAGACTCC
IRT1-F	CGGTTGGACTTCTAAATGC
IRT1-R	CGATAATCGACATTCCACCG
VTL1-Q1	AGTGTGGAAAGGCCACTTGTG
VTL1-Q2	GCTTACAAAGAGATCCCATTACTATCAA
VTL2-Q1	GATGGGAGTTGGAGCTGTGAA
VTL2-Q2	CCTGCGAATCCGGAGAGAA
VTL5-Q1	CATGCAAATCTAGAGGCTCTTTCA
VTL5-Q2	CAAACATAACGGAACACTAGTTGTGA
NEET-Q1	TCGTTGTCACCGAGCTTCC
NEET-Q2	ACGTCCCCGACCTCAA
LncRNA-FER1-Q1	TTCCCTGAGAGTCCCGGAAG
LncRNA-FER1-Q2	CACTTTCCACCGAGAAGGACA
APX1-Q1	GGTGCATGGACATCAAACCC
APX1-Q2	ACAGGGTCGTCCAATAGTGC
WRKY33-Q1	CTCGTGGTAGCGGTTACGCC
WRKY33-Q2	CCTTTGCTCTAGAGAATCCACC
WRKY40-Q1	CTTGACTGTGCCGGTGACTA
WRKY40-Q2	GAAGAAGCCATTTGCTCCAC
MYB51-Q1	GGCCAATTATCTTAGACCTGACA
MYB51-Q2	CCACGAGCTATAGCAGACCATT
ZAT10-Q1	TTTCCACCACAAAACCTCACT
ZAT10-Q2	GTAGCTCAACTTCTCCACCGCC

ChIP-qPCR	
Nom	Sequence 5'->3'
ProbHLH39-F	CCAGTCTACTTGTGACTAGACCTTG
ProbHLH39-R	AACCAAAACTTTAAAAATTCGCAAA
ProFITF	GCTTGTGACAATAAACAGTTGAC
ProFIT-R	ATCGATCAGACCGTATTAATAAAGGT
ProFer1-a-F	TGCACTATTCCTGCAGCCAA
ProFer1-a-R	AGTTGTAATGTTGGCAAGGACA
ProFer1-b-F	TCCGATTCCTATGTCAATATGTGT
ProFer1-b-R	ATTTCGGTTCCTACTCTCGC
ProFer1-c-F	CAACGCGAGAGTAGGAACCG
ProFer1-c-R	AGAGGATAGTGTGAGCCGC
ProFer3-a-F	TCTCTGTCTTTTGAGCACAGTGA
ProFer3-a-R	TGTGTGAGCATTTCATTCTTTACA
ProFer3-b-F	GCCAAAATTACACAAATACCAACGG
ProFer3-b-R	TGTGCGACGAAATTGGAGGA
ProFer4-a-F	TCTTCAATTTGAGGAATGTGCCA
ProFer4-a-R	AGAGTGCATAAGGAAAACAATTTGGT
ProFer4-b-F	AGTGAAAGAGATTTTGAAGCTGCA
ProFer4-b-R	AGGAAAGTTTTCTTCGCGAGA
proNEET-a-F	GCCTATGACCAAATCCTTTGCA
proNEET-a-R	TTGTTCTCAAATTCGTCTAACTAAGT
proNEET-b-F	ACTTAGTTAGACGAATTTGAGAACAA
proNEET-b-R	AGCGTGTGTATGAGATGGAAGA
ProVTL1-a-F	TGTGTGCAAACAAGTGACGA
ProVTL1-a-R	TGATGGATTGGTGAATTGGA
ProVTL1-b-F	TACCAACCACACTCCGATCA
ProVTL1-b-R	CATTCCTTTTGGCAGCTGTA
ProVTL1-c-F	CCCCTTTCGGTCTCTCAAAT
ProVTL1-c-R	AAAAAGTTGATTGCCCGTA
ProVTL2-a-F	CAGTGACAAAAGTGATGTACAAACGA
ProVTL2-a-R	CGGTGTAGAAGGTGATTTATGG
ProVTL2-b-F	TGTGACTGGATTTTGGCAAT
ProVTL2-b-R	TTTGTAGTCGGTGCATAACGA
ProVTL5-a-F	TTGCAAGTTTATTAACGAATCAACTCA
ProVTL5-a-R	TCGAACTTTTGAATGCGACCTG
ProVTL5-b-F	AGATTATGCATGTCATGATGTTAGCA
ProVTL5-b-R	ACCAGGTTAAAGTGATTCTGGA
ProYSL4-a-F	TTGACCGTTTGAACCTTGAAGA
ProYSL4-a-R	TTGATGACGAATTGCGGTTA
ProYSL4-b-F	TATAACCGCAATTCGTCATCA
ProYSL4-b-R	AAAAATTGAGAATTTCTGCAGAT
ProYSL6-a-F	AGCATCATTGCAATTATTTGGACTCT
ProYSL6-a-R	GGCTGGGCCTTGCTATTAAT
ProYSL6-b-F	TCGCTTTGATGTAACAAGATTAACGT
ProYSL6-b-R	TGAGTTTGACGGATTTTGGAGG



Review

Iron around the clock



Nicolas Tissot, Jonathan Przybyla-Toscano¹, Guilhem Reyt, Baptiste Castel, Céline Duc²,
Jossia Boucherez, Frédéric Gaymard, Jean-François Briat*, Christian Dubos*

Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (INRA, CNRS, Montpellier SupAgro, Université Montpellier 2), 34060 Montpellier Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2013
Received in revised form 14 March 2014
Accepted 15 March 2014
Available online 22 March 2014

Keywords:

Iron homeostasis
Circadian clock
Chloroplast
Retrograde signalling
Arabidopsis thaliana

ABSTRACT

Carbon assimilation, a key determinant of plant biomass production, is under circadian regulation. Light and temperature are major inputs of the plant clock that control various daily rhythms. Such rhythms confer adaptive advantages to the organisms by adjusting their metabolism in anticipation of environmental fluctuations. The relationship between the circadian clock and nutrition extends far beyond the regulation of carbon assimilation as mineral nutrition, and specially iron homeostasis, is regulated through this mechanism. Conversely, iron status was identified as a new and important input regulating the central oscillator, raising the question of the nature of the Fe-dependent signal that modulates the period of the circadian clock. Several lines of evidence strongly suggest that fully developed and functional chloroplasts as well as early light signalling events, involving phytochromes, are essential to couple the clock to Fe responses. Nevertheless, the exact nature of the signal, which most probably involves unknown or not yet fully characterized elements of the chloroplast-to-nucleus retrograde signalling pathway, remains to be identified. Finally, this regulation may also involve epigenetic components.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

Introduction	112
Clock regulation of Fe homeostasis	113
Fe as an input regulating the clock	113
Towards the identification of the signal coupling Fe homeostasis to the circadian clock	115
Epigenetic effectors	117
Conclusion	118
Acknowledgements	118
References	118

Introduction

Circadian clocks control various daily rhythms in organisms, providing them with a competitive advantage [1]. Input signals

adapt the phase of rhythms in plants to local environmental changes through the central oscillator. The central oscillator is a complex network of interlocked feedback loops involving numerous transcriptional regulators. Central to this network is a feedback loop that connects the morning and evening part of the circadian clock regulatory circuit. This loop is composed of two morning-expressed R1/2-MYB transcription factors [2] *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (CCA1) and *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (LHY), and of the evening-phase transcriptional repressor *TIMING OF CAB EXPRESSION 1/PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1* (TOC1/PRR1) [3]. Although most of the regulations of the clock occur at the transcriptional level, post-transcriptional and post-translational regulations are also concerned. For example, the evening loop component *ZEITLUPE* (ZTL) is a F-box protein that targets the highly

* Corresponding authors at: Bat 7, Campus INRA/SupAgro, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France. Tel.: +33 04 99 61 26 13/29 32.

E-mail addresses: briat@supagro.inra.fr (J.-F. Briat), christian.dubos@supagro.inra.fr (C. Dubos).

¹ Present address: Université de Lorraine, Interactions Arbres – Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

² Present address: Génétique, Reproduction et Développement, CNRS UMR6293, Clermont Université, INSERM U1103, 24 avenue des Landais, 63171 Cedex Aubière, France.

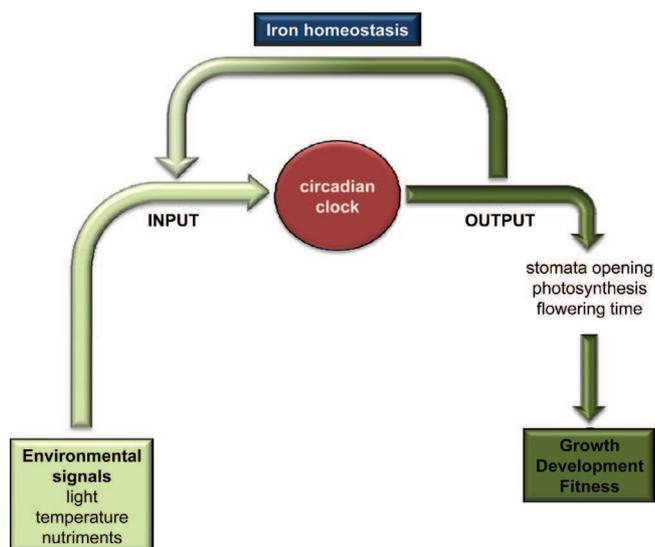


Fig. 1. Schematic representation of the reciprocal interaction existing between iron homeostasis and the circadian clock. The regulation of plant iron homeostasis is under circadian regulation, controlling optimal distribution of iron pools at the cellular and sub-cellular levels throughout plants. Iron status of the plant is modified depending on iron availability in the soil solution, which in turn alter circadian clock periodicity that adapt plant physiology to its new environment.

phosphorylated forms of TOC1 for ubiquitylation and subsequent degradation by the proteasome [4]. Conversely, the interaction of TOC1 with PRR3 prevents its ZTL-mediated degradation [4].

Light and temperature are the major inputs of the clock [5]. Many biological processes including stomatal opening [6], photosynthesis [1], and flowering [7] are outputs of the circadian clock, through the re-programming of expression of various gene sets [8]. More recently, nitrogen, copper, magnesium [9–11] as well as iron [12,13] mineral nutrition has been shown to be regulated by the clock. They constitute another important input acting on the expression of central oscillator genes (Fig. 1) [12–14].

Photosynthesis efficiency is also dependent upon mineral nutrition in addition to light, temperature and the circadian clock. Fe, among metals, has a major role in this process because of its redox properties within proteins of the electron transport chain. Altered Fe homeostasis in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking the iron storage protein ferritin in their leaves had impaired carbon assimilation, resulting in a decrease in biomass production [15]. Because Fe homeostasis and photosynthesis are interdependent and both are regulated by the circadian clock ([16]; Fig. 1), it is a major issue to understand how these various determinants of biomass production are integrated into the physiology of plants. In addition to its major role in the photosynthesis process, Fe is also required for respiration, DNA synthesis, nitrogen and sulphur assimilation, and hormone synthesis. Furthermore, Fe being highly reactive with oxygen, it can produce reactive oxygen species (ROS), which are potentially toxic for cell structures [15]. As a consequence Fe content, speciation and distribution in plants need to be finely tuned through the control of Fe homeostasis.

This paper highlights recent new developments that put forward a link between Fe homeostasis and the circadian clock. The principal aim is to propose a critical review of our understanding of the control of Fe homeostasis by the clock, and the impact of Fe nutrition on the expression of clock components. To what extent clock and Fe regulatory circuits can be integrated into a comprehensive scheme will contribute to improve our understanding of the mechanisms by which plants adapt to their fluctuating environment.

Clock regulation of Fe homeostasis

Fe homeostasis in plants results from the action of integrated regulatory pathways controlling the expression of genes at the transcriptional and post-transcriptional levels. The activation or repression of these genes depends on Fe availability, namely Fe scarcity or Fe excess [17]. These genes encode proteins that are required for Fe uptake by the roots, Fe distribution throughout the whole plant body, and intracellular compartmentation and storage [18,19].

Gramineous plants (cereals) use a chelation strategy to acquire Fe from the soil. Their roots secrete methionine derivatives from the mugineic acid family of phytosiderophores (MAs), which chelate and solubilize Fe(III) in the rhizosphere. The resulting Fe(III)–MAs complexes are taken up by root cells. This MA secretion by roots fluctuates throughout the day in a diurnal manner [20]. For example, MAs secretion from barley roots occurs within 2–3 h after sunrise under Fe-deficient conditions. This rhythmic secretion of phytosiderophores in cereals is mainly mediated by changes in light rather than temperature [21]. Furthermore, large-scale expression analysis of Fe-deficiency stressed barley roots revealed that among the genes whose mRNA steady state level was increased, 25% exhibited different abundance levels in Fe-deficient roots at noon and at night [22]. However, these studies do not address whether these regulations are driven by light independently of the circadian clock. In addition, among the genes highlighted by this transcriptomic approach, no *Arabidopsis* orthologous genes encoding clock components (e.g. *CCA1*, *LHY*, etc.) have been identified.

The first molecular evidence that Fe homeostasis was connected to the clock came from a genetic screen designed to search for regulators of the expression of the *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene, encoding a Fe storage protein located in the plastids [23]. *TIME FOR COFFEE* (TIC), a previously described regulator of the circadian clock [24,25], repressed *AtFer1* expression. This finding prompted determining whether *AtFer1* was a cycling gene (i.e. whose expression is rhythmically regulated by the circadian clock). Indeed *AtFer1* cycles with peak expression at dawn. Cycling is abolished in genetic backgrounds mutated for genes of the central oscillator such as *cca1-11* or *lhy-21*. Regulation of ferritin genes (*AtFer1*, *AtFer3* and *AtFer4*) expression by the clock was confirmed by showing that they are direct transcriptional targets of PRR7, a central clock component [26]; PRR7 being involved in the adaptation to iron excess. Furthermore, the promoter activities of *AtFer1* and two other genes involved in the Fe deficiency response (namely *IRT1*, for *IRON-REGULATED TRANSPORTER 1*, the major Fe²⁺ transporter in roots, and *bHLH39*, a key transcription factor involved in this process) are under circadian control [27].

Fe as an input regulating the clock

Three independent studies have recently demonstrated that the period length of the circadian clock is directly modulated by the iron status of *Arabidopsis* plants. The period is longer under Fe-deficient conditions and shorter under Fe-excess conditions [12–14].

The impact of iron status on the periodicity of the expression of key central oscillator genes was evaluated through the analysis of their promoter activity using the luciferase reporter gene (Tables 1 and 2). This analysis demonstrated that the period length of all the studied circadian clock genes was affected in a Fe-dependent manner, with a greater effect on *CCA1* and *TOC1* promoter activities [12–14]. These variations in the period length are quantitative and directly dependent on the amount of Fe actually available for the plant. This finding was also observed at the mRNA steady state levels [12]. However, the periodicity of the circadian oscillations is also regulated at the post-translational level

Table 1
Growth conditions and genetic backgrounds used in the three studies that have demonstrated the reciprocal interaction between iron homeostasis and the circadian clock [12–14].

	[12]	[13]	[14]
Experimental design			
Growth conditions	- Half MS medium, L/D: 12 h/12 h - Treatments on 8 days old seedlings for 36 h prior analysis (LUC) - Treatments on 12 days old seedlings for 3 days prior analysis (qRT-PCR)	- Minimal medium deprived of Fe, L/D: 12 h/12 h - Treatments on 6 days old seedlings (LUC) - Treatments on 10 days old seedlings (qRT-PCR)	- Hoagland medium deprived of Fe, L/D: 16 h/8 h - Fe treatment from plating (LUC) - Other treatments from germination (LUC)
Iron treatments	- Ferrozine (100 μM) - Agar	- Ferrozine (300 μM) - Agar - Fe(III)-EDTA (50 μM)	- Ferrozine (300 μM) - Fe-free agar (EDTA washed) - FeHBED gradient (0.25–100 μM)
Other metals	- Cu - Mn - Zn	- Zn - Zn + Fe	- Cu - Mn - Zn
Other treatments	- CPTIO - L-NAME - Tungstate - GSNO - Lincomycin - Darkness		- pH modification - Haem - Erythromycin - Kanamycin - Lincomycin - Chloranphenicol - Norflurazon - Darkness
Mutant alleles used			
Circadian clock	- <i>cca1-1</i> (Col) - <i>lhy-101</i> (Col) - <i>toc1-101</i> (Col) - <i>elf4-101</i> (Col) - <i>gi-2</i> (Col) - <i>prr7-11</i> (Col) - <i>prr9-10</i> (Col) - <i>cca1-1 lhy-101</i> (Col) - <i>prr7-11 prr9-10</i> (Col)	- <i>prr5-1</i> (Col) - <i>ztl-4</i> (Col) - <i>prr7-3 prr9-1</i> (Col) - <i>cca1-1 lhy-20</i> (Col) - <i>cca1-11 lhy-21</i> (WS)	- <i>cca1-1</i> (Col) - <i>lhy-20</i> (Col) - <i>toc1-101</i> (Col) - <i>elf3-1</i> (Col) - <i>ztl-4</i> (Col) - <i>gi-201</i> (Col) - <i>prr7-3</i> (Col) - <i>prr9-1</i> (Col) - <i>prr7-3 prr9-1</i> (Col) - <i>cca1-1 lhy-20</i> (Col) - <i>cca1-11 lhy-21</i> (WS)
Iron homeostasis		- <i>fit1-2</i> (Col) - <i>frd1-1</i> (Col) - <i>irt1-1</i> (Col) - <i>fer1 fer3 fer4</i> (Col)	- <i>fit1-2</i> (Col) - <i>irt1</i> (Col)
Additional mutants			- <i>gun1-7</i> (Col) - <i>gun1-9</i> (Col) - <i>gun2-1</i> (Col) - <i>hy6</i> (Col) - <i>gun4-1</i> (Col) - <i>gun5-1</i> (Col) - <i>fc-2</i> (Col) - <i>hy2^{WISC}</i> (Col) - <i>gun1-9 gun5-1</i> (Col) - <i>phyB amiR</i> (Col) - <i>phyA-211 phyB-9</i> (Col) - <i>hmr-2</i> (Col) - <i>prmd5-54</i> (Col)

Mutants for which more than one allele was used are in bold. L: light, D: dark, MS: Murashige and Skoog, LUC: *LUCIFERASE* reporter gene, qRT-PCR: quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid (iron chelating compound), HBED: hydroxyl benzyl ethylene diamine (iron chelating compound), Cu: copper, Mn: manganese, Zn: zinc, CPTIO: 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (nitric oxide scavenger), L-NAME: N^ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (nitric oxide synthesis inhibitor), GSNO: S-nitrosoglutathione (nitric oxide donor). The ecotype for the different mutant alleles is given in parenthesis (Col: Columbia-2, WS: Wassilewskija).

by affecting the localization, the activity or the degradation of key central oscillator proteins [28]. In this regard, it would be very informative to determine the impact of Fe status on the stability and localization of clock proteins, in addition to measuring promoter activity and/or transcript abundance of their corresponding genes [12–14].

Interestingly, ZTL (F-box protein involved in the targeting of TOC1 and PRR5 proteins to the proteasome) was a circadian clock target of the response to Fe deficiency, since the *ztl-4* mutant was defective in lengthening the period of *CCA1* promoter activity in response to Fe deficiency [13]. This observation prompted these authors to propose that the expression of *CCA1* and *LHY* could be the ultimate targets of Fe status signalling via ZTL. This assumption

is supported by an absence of effect of Fe deprivation on the periodic expression (i.e. mRNA level over a 78 h period) of *TOC1* in the *gi* (*gigantea*) mutant [12]. *GI* encodes a protein whose activity is intricately related to ZTL through the formation of heterodimers allowing reciprocal co-stabilization essential for robust circadian oscillations [27]. How ZTL (and/or GI) could act as a signal intermediate between Fe and CCA1/LHY is unclear, since ZTL is at a distance from CCA1/LHY in models of the oscillator system. Genetic data indicate that neither TOC1 nor PRR5 are involved [26]. In such a context it could be useful to assay *toc1 prr5* double mutants.

Nevertheless, this attractive hypothesis to explain the regulatory mechanisms that reprogram the circadian clock in response to Fe status will require further investigation because contradictory

Table 2

Summary of the promoter activities and mRNA steady state measurements carried out in the three studies that have demonstrated the reciprocal interaction between iron homeostasis and the circadian clock [12–14].

	[12]	[13]	[14]
Promoter activities (Luciferase)			
Circadian clock	- <i>TOC1</i> in WT - <i>CCA1</i> in WT - <i>LHY</i> in WT. - <i>PRR5</i> in WT - <i>PRR7</i> in WT - <i>PRR9</i> in WT - <i>GI</i> in WT - <i>ELF4</i> in WT	- <i>TOC1</i> in WT - <i>CCA1</i> in WT, <i>ztl-4</i> , <i>prp5-1</i> , <i>prp7-3</i> <i>prp9-1</i> , <i>cca1-1 lhy-20</i> , <i>cca1-11 lhy-21</i> , <i>irt1-1</i> , <i>fit1-2</i> , <i>frd1-1</i> , <i>fer1 fer3 fer4</i>	- <i>TOC1</i> in WT, <i>cca1-1</i> , <i>lhy-20</i> , <i>toc1-101</i> , <i>ztl-4</i> , <i>gi-201</i> , <i>prp7-3 prp9-1</i> , <i>irt1</i> , <i>fit1-2</i> , <i>fc2</i> , <i>hy6</i> , <i>phyB</i> <i>amiR</i> , <i>cca1-1 lhy20</i> , <i>phyA-211 phyB-9</i> & <i>hmr-2</i> - <i>CCA1</i> in WT & <i>gun2-1</i> - <i>LHY</i> in WT, <i>gun4-1</i> & <i>gun5-1</i> - <i>PRR7</i> in WT
Circadian clock output		- <i>CAB2</i> in WT - <i>CAT3</i> in WT	- <i>CAB2</i> in WT, <i>gun1-7</i> , <i>gun1-9</i> & <i>cca1-1 lhy20</i> - <i>CAT2</i> in WT - <i>CAT3</i> in WT & <i>prmt5-54</i> - <i>FKF1</i> in WT
Iron homeostasis		- <i>IRT1</i> in WT, <i>ztl-4</i> & <i>prp7-3 prp9-1</i> , <i>irt1-1</i> , <i>fit1-2</i> - <i>bHLH39</i> in WT - <i>FER1</i> in WT	
Expression analysis (mRNA steady state levels)			
Circadian clock	- <i>TOC1</i> in WT & <i>gi-2</i> - <i>CCA1</i> in WT - <i>LHY</i> in WT - <i>PRR5</i> in WT - <i>PRR7</i> in WT, <i>cca1-1 lhy-101</i> & <i>gi-2</i> - <i>PRR9</i> in WT - <i>GI</i> in WT, <i>cca1-1</i> , <i>lhy-101</i> , <i>cca1-1 lhy-101</i> , <i>prp7-11</i> , <i>prp9-10</i> , <i>prp7-11 prp9-10</i> , <i>toc1-101</i> & <i>elf4-101</i> - <i>ELF4</i> in WT		
Iron homeostasis		- <i>IRT1</i> in WT - <i>bHLH39</i> in WT - <i>FER1</i> in WT	

WT: wild type, *CAB2*: *CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN 2* (clock-controlled gene), *CAT2*: *CATALASE 2* (clock-controlled gene), *CAT3*: *CATALASE 3* (clock-controlled gene), *FKF1*: *FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F BOX 1* (clock-controlled gene).

results were described in another study in which the period of *TOC1* promoter activity was lengthened by Fe deficiency in the *ztl-4* and *gi-201* mutants [14]. However different growth conditions and reporter luciferase lines were used between these various experiments that may explain these divergent results [29]. Nevertheless, two of these studies [12–14] clearly revealed by the use of (double) mutants (i.e. *cca1-1 lhy20* and *cca1-11 lhy-21*) that *CCA1* and *LHY* are required for the modulation of the circadian period length in response to Fe status, indicating that these genes are most likely the main integrators of the Fe signal into the central oscillator [12,13].

The finding that the Fe status acts as an input of the clock is sustained by these three papers [12–14], which contain robust and convincing data. However, in these three studies [12–14] only one loss of function allele was studied for the *TOC1* (i.e. *toc1-101*), *EARLY FLOWERING 3* (i.e. *elf3-1*), *ELF4* (i.e. *elf4-101*), *PRR5* (i.e. *prp5-1*) and *ZTL* (i.e. *ztl-4*) genes (Table 1). As a consequence, it cannot be excluded that the observed variation in the Fe response in these mutants may be due to another genetic factor linked to a second mutation [30] or to the used mutant allele itself (i.e. hypomorphic mutation causing a partial loss of gene function, dominant negative allele generating a new function). For example, the Fe response was altered in opposite manners by two independent loss-of-function mutants of the *GUN1* (*GENOME UNCOUPLED 1*) gene (i.e. *gun1-7* and *gun1-9* [14]), a key gene of the retrograde signalling pathway occurring between the chloroplast and the nucleus [31]. In this case, *gun1-7* may correspond to a dominant-negative allele, as it carries a missense mutation in the first pentatricopeptide repeat of the protein and not a premature stop codon. As such, it would be useful to use various alleles of the above mentioned circadian clock genes in order to firmly conclude on their respective role in this specific biological process that is the response to Fe deficiency.

Towards the identification of the signal coupling Fe homeostasis to the circadian clock

The three papers analyzed above [12–14] agree that the period of the Arabidopsis circadian clock varies as a function of Fe availability, but do not answer the question of what Fe-dependent signal modulates the period of the circadian clock.

Several lines of evidence strongly suggested that chloroplast-mediated retrograde signalling might be involved in the longer circadian period induced by Fe-deficiency. Chloroplasts of mature photosynthetic Arabidopsis leaves are the major Fe sink, containing up to 80% of the whole leaf Fe content [32]. Furthermore, chloroplast integrity is necessary to entrain the circadian system since the *crb* Arabidopsis mutant defective in the *CHLOROPLAST RNA BINDING* (*CRB*) protein has an altered chloroplast structure correlated to a phase delay in its circadian rhythm [33]. A recent review stresses the interplay between cellular metabolism and iron signalling in plants, and the potential roles that chloroplasts could play in generating and transducing retrograde signals that control Fe homeostasis [34]. Fully developed functional chloroplasts are required for circadian Fe sensing [12,14]. Etiolated seedlings or light-grown plants treated with plastid translation inhibitors (i.e. erythromycin, kanamycin, and lincomycin) were not able to respond to changes in Fe supply (as revealed by the analysis of *TOC1* promoter activity [14]). Similar results were also observed when the plastid and mitochondrial protein translation inhibitor chloramphenicol was used [14]. Conversely, norflurazon (an inhibitor of carotenoid biosynthesis that ultimately inhibits chloroplast biogenesis) as well as erythromycin, lincomycin and chloramphenicol caused longer circadian period when plants were grown on Fe-replete condition (as revealed by the analysis of *CCA1* and *TOC1* promoter activities [12]). However, the lengthening of the clock

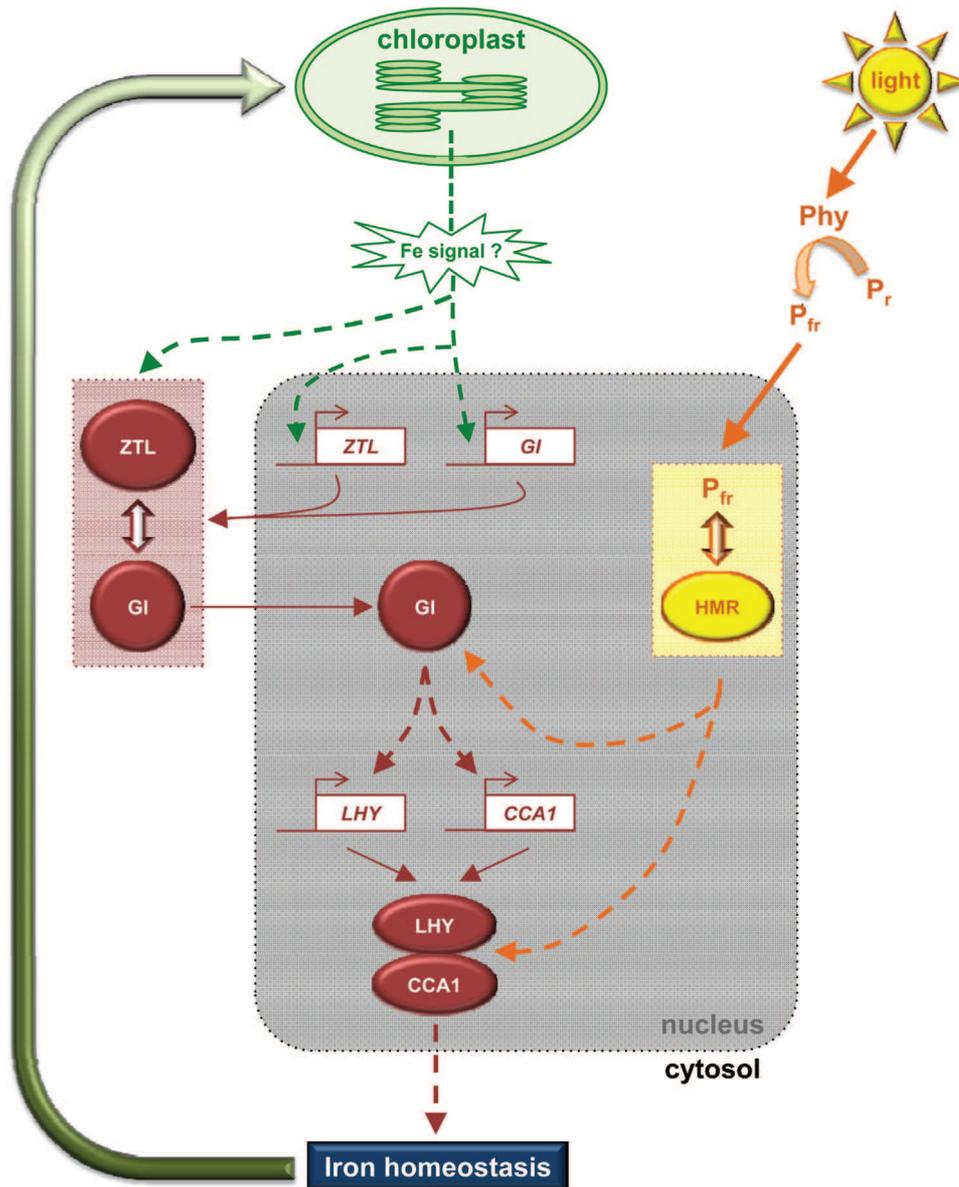


Fig. 2. Schematic representation of the molecular mechanisms involved in the coupling of iron homeostasis to the circadian clock. The iron status of the plant is a key factor that directly modulates the period length of the circadian clock oscillations. This regulation involves a chloroplast-mediated retrograde signalling. Several lines of evidence suggest that this chloroplast signal integrates into the central oscillator through *ZTL* (*ZEITLUPE*) and *GI* (*GIGANTEA*), by affecting either genes expression or proteins activity (e.g. *ZTL* and/or *GI* post-translational modifications, nucleus translocation of *GI*). These modifications in turn impact on *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) and *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) activity, and ultimately could reset the balance of iron homeostasis. To established such a reset, direct measurements of the Fe status (concentration, speciation, localization), in various genetic background affected in the circadian clock would need to be performed, which is not the case in the various papers discussed within the frame of this review. The nature of the Fe signal involved in this chloroplast-to-nucleus retrograde signalling still needs to be characterized. Nevertheless, it was shown that nitric oxide, haem synthesis or catabolism, and the retrograde tetrapyrrole pathway are not involved. Similarly, the actual mechanisms by which the central oscillator directly affects the expression of genes involved in iron homeostasis remain to be identified. It is suggested that this process may probably involve two key transcription factors belonging to the basic helix-loop-helix family, namely bHLH29/FIT1 and bHLH39/ORG3. Circadian Fe responses require also the translocation of photoactivated phytochromes (P_{fr}) into the nucleus to regulate clock genes. P_{fr} nuclear relocation involves HMR (HEMERA) activity. Phy: phytochrome A and B. Dashed lines: putative regulatory interactions, Double arrows indicate molecular interactions.

period in response to these drugs was lower than what was observed in response to Fe deficiency. In addition, a non-additive effect was observed between the drugs and the Fe deficiency treatments. Altogether these data, independently reported by two research groups, strongly suggest that the alteration of the length of the circadian period in response to Fe-deficiency signals involves plastid-to-nucleus retrograde signalling (Fig. 2) [12].

Nitric oxide (NO) is an obvious candidate to be considered for retrograde signalling. NO is a major component of the signalling pathway in Fe acquisition under Fe-deficient conditions [35]. Furthermore, chloroplasts could have an essential role in the control of

NO levels [36]. A rapid NO burst occurs in chloroplasts in response to Fe excess [37]. This NO burst is required to abolish the repression of the expression of the clock regulated *AtFer1* gene [23,37,38]. However it has been clearly demonstrated that NO is not involved in signalling the plant Fe status to the clock [12]. Iron imbalance is known to induce oxidative stress in cells by promoting the generation and accumulation of ROS, causing oxidation of cellular components, hindering metabolic activities, and affecting organelle integrity [17]. Furthermore, it has been well documented that the response to oxidative stress was regulated by circadian rhythms [39]. In plants, ROS could therefore play a role in the production

of the retrograde signal linking Fe homeostasis to the clock. This hypothesis is further sustained by the fact that TIC, the first molecular actor reported to link Fe homeostasis and the clock in plants [23], is involved in the control of the redox status, since *tic* mutants exhibited hypersensitivity to oxidative stress and had an increase in total glutathione content [40]. Moreover, CCA1 has recently been shown to play a central role in regulating ROS homeostasis and oxidative stress responses [39], which is in agreement with the increased sensitivity to Fe excess of the *cca1-11 lhy-21* double mutant when compared to wild type plants [26].

Chloroplast integrity is required to couple Fe sensing with the circadian clock [12,14]. Furthermore chloroplast differentiation, including the regulation of nuclear encoded photosynthesis genes expression is under the control of a retrograde pathway. Tetrapyrroles are likely signalling intermediates in this pathway, although the precise nature of the signal molecule is still unclear, due to the many negative feedbacks and flux changes [41]. Although this retrograde pathway has been challenged [42], there are strong genetic arguments that favour it, based on the characterization of *gun* mutants exhibiting a de-repression of the *LIGHT HARVESTING COMPLEX B (LHCB)* gene expression in the presence of norflurazon. Most *gun* mutants are defective in tetrapyrrole biosynthesis, therefore potentially affecting Mg-protoporphyrin IX production. It is thus an attractive hypothesis that the “protoporphyrin retrograde pathway” is responsible of the coupling between the control of Fe homeostasis and the circadian clock.

The function of the clock *NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 1 GROUP D MEMBER 1 (NR1D1)* receptor in coordinating mammalian circadian and metabolic pathways (*i.e.* glucose homeostasis and energy metabolism) depends on its interaction with haem [43]. It was shown that circadian Fe responses were affected in the *gun2/hy6/ho1 (haem oxygenase)* mutant [14]. A globally constant free-running period (*i.e.* a circadian rhythm that is not entrained by any kind of external time cues, such as the natural dark-light cycle) was observed in this mutant, independently of the Fe concentration present in the media. Similarly, the circadian phase during entrainment did not lag under Fe deficiency condition. The *gun2/hy6/ho1* mutant plants accumulate haem [44], are de-regulated in their chloroplast-to-nucleus retrograde signalling [31], and lack active phytochromes [45]. It was then investigated whether these *gun2/hy6/ho1* effects were involved in linking Fe homeostasis to the circadian clock. The haem content was almost constant over the range of Fe concentrations tested and was not correlated with the free-running period [14]. In addition, variations in the haem content of seedlings did not interfere with the control of the circadian period [14]. Various other *gun* mutants (*gun 4-1*, *gun 5-1*, and *gun 1-9*; see [46] for details) were used. Although *gun1* mutants are not defective in tetrapyrrole biosynthesis, the *hy2* mutant is, and was used to further rule out the role of haem in the Fe signal [14]. The *gun2/hy6/ho1* mutant is much more pleiotropic than *hy2*, since it suffers from negative feedback on tetrapyrrole biosynthesis from the accumulation of haem. These data ruled out the possibility that a defect in tetrapyrrole biosynthesis prevents circadian Fe responses. These results strongly suggest that circadian Fe responses are unlikely to be dependent on haem synthesis or catabolism, and on the retrograde tetrapyrrole pathway.

Finally, *gun2/hy6/ho1* mutants have no active phytochromes, and do not adjust their free-running period to Fe supply as observed with etiolated wild-type seedlings. This led to examining the role, if any, of the phytochromes in the circadian Fe responses [14]. Various genetic backgrounds mutated in *PHYTOCHROME (PHY)* genes (*phyB-9* single and *phyA-211 phyB-9* double mutants) showed that only the double *phyA phyB* mutant had a short free-running period irrespective of Fe supply, as observed with the *gun2/hy6/ho1* mutant. The role of *HEMERA (HMR)*, a protein necessary for phytochrome targeting to the nucleus and photomorphogenesis initiation upon light

exposure [47], was then explored. Consistent with the role of HMR, circadian Fe responses in *hmr-2* mutant were partially altered and reminiscent of those observed in etiolated seedlings in which functionality of the chloroplasts was impaired [14]. These later findings demonstrate that circadian Fe responses require the translocation of photoactivated phytochromes into the nucleus to regulate clock genes (Fig. 2).

Epigenetic effectors

Numerous studies have demonstrated the importance of epigenetic regulations in the control of various aspects of plant growth and development. Among these “epi-regulations”, histone post-translational modifications are of central importance. Such epigenetic “marks” affect the state of chromatin, between the open and transcriptionally active (euchromatin) and the condensed and transcriptionally inactive forms (heterochromatin).

The demonstration that the circadian clock pace was regulated at the epigenetic level came from the study of the *TOC1* promoter locus [48]. It has been demonstrated that the cyclic accumulation of *TOC1* mRNA was positively correlated with histone H3 acetylation (AcH3) level present at the *TOC1* promoter locus. It was also reported that the presence of AcH3 post-translational “mark” (leading to the formation of euchromatin) is dependent on *STRUCTURE SPECIFIC RECOGNITION PROTEIN 1 (SSRP1)* activity and the photoperiod. Further studies showed that AcH3 level at the *TOC1* promoter locus was dependent on the opposite effect of two R1/2-MYB proteins involved in the regulation of the circadian clock pace [49], namely CCA1 (facilitating H3 hypo-acetylation) and *REVEILLE 8/LHY-CCA1-LIKE 5 (REV8/LCL5)*, favouring H3 acetylation. Histone H3 methylation (*e.g.* H3K4 trimethylated) is an additional epigenetic “mark” that is also involved in the regulation of the expression of key circadian clock components such as *TOC1*, *CCA1* or *LHY*. This later regulation most probably involves the *SET DOMAIN GROUP 2/ARABIDOPSIS TRITHORAX RELATED 3 (SDG2/ATXR3)* histone methyltransferase [49]. Along the same line, JM30 histone demethylase (a JUMONJI C domain-containing protein) has also been identified as a clock component controlling the circadian period [49].

Iron homeostasis is also regulated at the epigenetic level. Recently, Fe deficiency has been shown to affect the distribution of histone H4 post-translational modifications, thus affecting chromatin conformation at specific loci [50]. As a consequence, the expression of key transcription factors involved in the regulation of iron homeostasis is induced, as well as the expression of their target genes (*e.g.* *IRT1* and *FRO2*, *FERRIC REDUCTION OXIDASE 2*). These transcription factors belong to the bHLH subgroup *bHLH39*, *bHLH100* and *bHLH101*. Conversely, when plants are grown under Fe sufficient conditions, the expression of these transcriptional regulators is repressed. This repression is associated with conformational changes in their promoter region that are associated with the symmetric dimethylation of histone H4 at arginine 3 (H4R3sm2). H4R3sm2 post-translational modification depends on *PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 5/SHK1 BINDING PROTEIN 1 (AtPRMT5/SKB1)* activity.

Interestingly, AtPRMT5/SKB1 is also part of a feedback regulatory loop within the central oscillator [51]. AtPRMT5/SKB1 activity modulates *CCA1*, *LHY* and *TOC1* timing of expression, and conversely *AtPRMT5/SKB1* expression is regulated by the circadian clock. AtPRMT5/SKB1 involvement within the circadian clock relies, at least in part, on its ability to methylate splicing proteins in addition to histones. AtPRMT5/SKB1 dependent alternative splicing controls the proportion of *PRR9* mRNA isoforms that present premature stop codon, *PRR9* being a negative regulator of *CCA1* and *LHY* expression [52].

Together, findings on AtPRMT5/SKB1 activities provide a direct molecular link between plant iron status and circadian clock period. It also suggests that the interaction between these two pathways involve regulations occurring at the post-transcriptional (alternative splicing) and post-translational (chromatin modification) levels. However, AtPRMT5/SKB1 is not playing a major role under Fe deficient conditions as the period of the circadian clock in *prmt5-54* mutants is lengthened in a similar manner to that of wild-type plant [14]. This is in agreement with AtPRMT5/SKB1 function as H4R3sm2 post-translational modification occurs in Fe replete condition and as PRR9 is not involved in the lengthening of the circadian period in response to Fe deprivation [50,52].

Nevertheless, epigenetic regulations encompass many processes beyond chromatin's modifications that remain to be explored which could link iron homeostasis with the control of the circadian system.

Conclusion

Fully developed and functional chloroplasts as well as early light signalling events, involving phytochromes, are essential to couple the clock with Fe responses. Chloroplast encoded protein(s) which remain to be identified are also involved. Known members of the chloroplast-to-nucleus retrograde signalling pathway involving the tetrapyrrole biosynthesis pathway are not required for these Fe responses to take place. Therefore, some unknown or not yet fully characterized elements of the chloroplast-to-nucleus retrograde signalling pathway are involved in the reciprocal interaction between iron homeostasis and the circadian clock (Fig. 2).

Why iron regulates the circadian rhythms and what is the physiological relevance of lengthening the period under Fe deficiency? It was suggested by the authors of one of the papers reviewed above [12–14] that lengthening the period under Fe deficiency may help plants to continue to accumulate Fe by remaining in the vegetative stage, thereby reducing the chances of forming immature fruits and seeds. They concluded that such a mechanism might therefore be an adaptive strategy that would improve progeny fitness under Fe deficiency. It has to be kept in mind that one of the major physiological consequences of Fe deficiency is interveinal leaf chlorosis, which is an outcome of chloroplast structure disorganization and alteration of the photosynthetic activity. In that respect Fe deficiency has to be first considered as a “chloroplast disorganiser”. Chloroplasts are also altered by CO₂ depletion or by the use of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-1-dimethylurea (DCMU), an inhibitor of photosystem II (PSII), and such conditions have recently been shown to increase the period of the clock by 2.5–3 h [53], which is very reminiscent of what was reported under Fe deficiency [12–14]. This lengthened period was suppressed by the addition of exogenous sugars, indicating that endogenous sugars produced by photosynthesis can entrain circadian rhythms in Arabidopsis. Fe deficiency could therefore impact the clock because it alters photosynthesis and sugar production. CO₂ depletion or DCMU treatment modulate the expression of key circadian clock genes [53]. As observed under Fe deficiency conditions, *CCA1* mRNA abundance is heavily decreased in response to CO₂ depletion or DCMU treatment. Because the *PRR7* gene expression was observed to be up-regulated under CO₂ depletion, it was hypothesized that *PRR7* repressed *CCA1* expression. This is likely not what is occurring under Fe deficiency since *PRR9* and *PRR7* gene expression are down regulated, as *CCA1* expression, under such conditions [12–14]. Therefore, although it clearly emerges that chloroplast integrity and functional photosynthesis are a common platform to sense environmental cues and to adapt plant physiology via the circadian clock, there are some specificities in the observed responses which are dependent upon

the nature of the stimulus used to promote chloroplast disorganization. It is well established that the ability of a stimulus to reset the clock is a function of the time of day and also of the light intensity at which the stimulus is administered. For example CO₂ depletion or DCMU treatment have a much stronger impact on the clock at low light than at high light [53]. Because Fe metabolism and light are deeply integrated to achieve photosynthesis, the reset of the clock under Fe deficiency is likely dependent of the light conditions and this point would deserve to be investigated in future studies.

Acknowledgements

N.T. and G.R. were supported by a fellowship from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. We thank Dr Nathalie Berger for help in preparing this manuscript.

References

- [1] A.N. Dodd, et al., Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage, *Science* 309 (2005) 630–633.
- [2] C. Dubos, et al., MYB transcription factors in Arabidopsis, *Trends Plant Sci.* 15 (2010) 573–581.
- [3] C. McClung, Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the Arabidopsis circadian clock, *F1000Prime Rep.* 6 (2014) 2.
- [4] S. Fujiwara, et al., Post-translational regulation of the Arabidopsis circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 23073–23083.
- [5] C.R. McClung, S.J. Davis, Ambient thermometers in plants: from physiological outputs towards mechanisms of thermal sensing, *Curr. Biol.* 20 (2010) 1086–1092.
- [6] C. Chen, Y.G. Xiao, X. Li, M. Ni, Light-regulated stomatal aperture in Arabidopsis, *Mol. Plant* 5 (2012) 566–572.
- [7] Y.H. Song, S. Ito, T. Imaizumi, Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves, *Trends Plant Sci.* 18 (2013) 575–583.
- [8] C.J. Doherty, S.A. Kay, Circadian control of global gene expression patterns, *Annu. Rev. Genet.* 44 (2010) 419–444.
- [9] N. Andres-Colas, A. Perea-Garcia, S. Puig, L. Penarrubia, Deregulated copper transport affects Arabidopsis development especially in the absence of environmental cycles, *Plant Physiol.* 153 (2010) 170–184.
- [10] R.A. Gutierrez, et al., Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene *CCA1*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (2008) 4939–4944.
- [11] C. Hermans, et al., Early transcriptomic changes induced by magnesium deficiency in *Arabidopsis thaliana* reveal the alteration of circadian clock gene expression in roots and the triggering of abscisic acid-responsive genes, *New Phytol.* 187 (2010) 119–131.
- [12] Y.Y. Chen, et al., Iron is involved in the maintenance of circadian period length in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 161 (2013) 1409–1420.
- [13] S. Hong, S.A. Kim, M.L. Guerinot, C.R. McClung, Reciprocal interaction of the circadian clock with the iron homeostasis network in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 161 (2013) 893–903.
- [14] P.A. Salome, M. Oliva, D. Weigel, U. Kramer, Circadian clock adjustment to plant iron status depends on chloroplast and phytochrome function, *EMBO J.* 32 (2013) 511–523.
- [15] K. Ravet, et al., Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis, *Plant J.* 57 (2009) 400–412.
- [16] C. Varotto, et al., The metal ion transporter *IRT1* is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 31 (2002) 589–599.
- [17] J.F. Briat, et al., New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants, *Ann. Bot.* 105 (2010) 811–822.
- [18] J. Morrissey, M.L. Guerinot, Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4553–4567.
- [19] W. Schmidt, T.J. Buckhout, A hitchhiker's guide to the Arabidopsis ferrome, *Plant Physiol. Biochem.* 49 (2011) 462–470.
- [20] T. Nozoye, et al., Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the *YXX ϕ* or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice, *Plant J.* 77 (2013) 246–260.
- [21] S.M. Reichman, D.R. Parker, Probing the effects of light and temperature on diurnal rhythms of phytosiderophore release in wheat, *New Phytol.* 174 (2007) 101–108.
- [22] T. Negishi, et al., cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots, *Plant J.* 30 (2002) 83–94.
- [23] C. Duc, F. Cellier, S. Lobreaux, J.F. Briat, F. Gaymard, Regulation of iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by the clock regulator time for coffee, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 36271–36281.

- [24] Z. Ding, A.J. Millar, A.M. Davis, S.J. Davis, TIME FOR COFFEE encodes a nuclear regulator in the *Arabidopsis thaliana* circadian clock, *Plant Cell* 19 (2007) 1522–1536.
- [25] A. Hall, et al., The TIME FOR COFFEE gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis* circadian clocks, *Plant Cell* 15 (2003) 2719–2729.
- [26] T. Liu, J. Carlsson, T. Takeuchi, L. Newton, E.M. Farre, Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7, *Plant J.* 76 (2013) 101–114.
- [27] J. Kim, R. Geng, R.A. Gallenstein, D.E. Somers, The F-box protein ZEITLUPE controls stability and nucleocytoplasmic partitioning of GIGANTEA, *Development* 140 (2013) 4060–4069.
- [28] J. Kusakina, A.N. Dodd, Phosphorylation in the plant circadian system, *Trends Plant Sci.* 17 (2012) 575–583.
- [29] G.T. Wilson, E.L. Connolly, Running a little late: chloroplast Fe status and the circadian clock, *EMBO J.* 32 (2013) 490–492.
- [30] L. Westphal, D. Scheel, S. Rosahl, The *coi1-16* mutant harbors a second site mutation rendering PEN2 nonfunctional, *Plant Cell* 20 (2008) 824–826.
- [31] R.E. Susek, F.M. Ausubel, J. Chory, Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development, *Cell* 74 (1993) 787–799.
- [32] T. Shikanai, P. Muller-Moule, Y. Munekage, K.K. Niyogi, M. Pilon, PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts, *Plant Cell* 15 (2003) 1333–1346.
- [33] M. Hassidim, et al., Mutations in CHLOROPLAST RNA BINDING provide evidence for the involvement of the chloroplast in the regulation of the circadian clock in *Arabidopsis*, *Plant J.* 51 (2007) 551–562.
- [34] G. Vigani, G. Zocchi, K. Bashir, K. Philippar, J.F. Briat, Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation, *Trends Plant Sci.* 18 (2013) 305–311.
- [35] M. Graziano, L. Lamattina, Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots, *Plant J.* 52 (2007) 949–960.
- [36] E. Gas, U. Flores-Perez, S. Sauret-Gueto, M. Rodriguez-Concepcion, Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism, *Plant Cell* 21 (2009) 18–23.
- [37] N. Arnaud, et al., An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene expression, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 23579–23588.
- [38] B. Touraine, J.F. Briat, F. Gaymard, GSH threshold requirement for NO-mediated expression of the *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene in response to iron, *FEBS Lett.* 586 (2012) 880–883.
- [39] A.G. Lai, et al., CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109 (2012) 17129–17134.
- [40] A. Sanchez-Villarreal, et al., TIME FOR COFFEE is an essential component in the maintenance of metabolic homeostasis in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 76 (2013) 188–200.
- [41] M.J. Terry, A.G. Smith, A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 14.
- [42] M. Moulin, A.C. McCormac, M.J. Terry, A.G. Smith, Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (2008) 15178–15183.
- [43] L. Yin, et al., Rev-erba, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways, *Science* 318 (2007) 1786–1789.
- [44] J.D. Woodson, J.M. Perez-Ruiz, J. Chory, Heme synthesis by plastid ferrochelatase 1 regulates nuclear gene expression in plants, *Curr. Biol.* 21 (2011) 897–903.
- [45] T. Muramoto, T. Kohchi, A. Yokota, I. Hwang, H.M. Goodman, The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant *hy1* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase, *Plant Cell* 11 (1999) 335–348.
- [46] A. Nott, H.S. Jung, S. Koussevitzky, J. Chory, Plastid-to-nucleus retrograde signaling, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 739–759.
- [47] M. Chen, et al., *Arabidopsis* HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes, *Cell* 141 (2010) 1230–1240.
- [48] M. Perales, P. Mas, A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the *Arabidopsis* biological clock, *Plant Cell* 19 (2007) 2111–2123.
- [49] P.J. Seo, P. Mas, Multiple Layers of posttranslational regulation refine circadian clock activity in *Arabidopsis*, *Plant Cell* (2014), <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.119842>.
- [50] H. Fan, et al., SKB1/PRMT5-mediated Histone H4R3 dimethylation of Ib subgroup bHLH genes negatively regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* (2013) 209–221.
- [51] E. Petrillo, S.E. Sanchez, A.R. Kornblihtt, M.J. Yanovsky, Alternative splicing adds a new loop to the circadian clock, *Commun. Integr. Biol.* 4 (2011) 284–286.
- [52] S.E. Sanchez, et al., A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing, *Nature* 468 (2010) 112–116.
- [53] M.J. Haydon, O. Mielczarek, F.C. Robertson, K.E. Hubbard, A.A. Webb, Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock, *Nature* 502 (2013) 689–692.

Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1)

Jean-François Briat*, Hatem Rouached, Nicolas Tissot, Frédéric Gaymard and Christian Dubos

OPEN ACCESS

Edited by:

Leon Kochian,
United States Department
of Agriculture – Agricultural Research
Service, USA

Reviewed by:

Rashid Ali,
University of Connecticut, USA
Miguel A. Pineros,
United States Department
of Agriculture, USA

*Correspondence:

Jean-François Briat,
Biochimie et Physiologie Moléculaire
des Plantes, Centre National de la
Recherche Scientifique – Institut
National de la Recherche
Agronomique – Université
Montpellier 2, SupAgro, Bat 7,
2 Place Viala, 34060 Montpellier
Cedex 1, France
briat@supagro.inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Traffic and Transport,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 09 December 2014

Accepted: 09 April 2015

Published: 28 April 2015

Citation:

Briat J-F, Rouached H, Tissot N,
Gaymard F and Dubos C (2015)
Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition
signals in *Arabidopsis thaliana*:
potential involvement of PHOSPHATE
STARVATION RESPONSE 1 (PHR1).
Front. Plant Sci. 6:290.
doi: 10.3389/fpls.2015.00290

Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique – Institut National de la Recherche Agronomique – Université Montpellier 2, Montpellier, France

Phosphate and sulfate are essential macro-elements for plant growth and development, and deficiencies in these mineral elements alter many metabolic functions. Nutritional constraints are not restricted to macro-elements. Essential metals such as zinc and iron have their homeostasis strictly genetically controlled, and deficiency or excess of these micro-elements can generate major physiological disorders, also impacting plant growth and development. Phosphate and sulfate on one hand, and zinc and iron on the other hand, are known to interact. These interactions have been partly described at the molecular and physiological levels, and are reviewed here. Furthermore the two macro-elements phosphate and sulfate not only interact between themselves but also influence zinc and iron nutrition. These intricate nutritional cross-talks are presented. The responses of plants to phosphorus, sulfur, zinc, or iron deficiencies have been widely studied considering each element separately, and some molecular actors of these regulations have been characterized in detail. Although some scarce reports have started to examine the interaction of these mineral elements two by two, a more complex analysis of the interactions and cross-talks between the signaling pathways integrating the homeostasis of these various elements is still lacking. However, a MYB-like transcription factor, PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1, emerges as a common regulator of phosphate, sulfate, zinc, and iron homeostasis, and its role as a potential general integrator for the control of mineral nutrition is discussed.

Keywords: PHR1, mineral homeostasis, phosphate, zinc, iron, sulfate, crosstalks, integration

Introduction

Among environmental constraints, mineral nutrition plays a key role for plant growth and development. Variations in soil nutrient composition and availability are the rule and plants have evolved mechanisms to cope with conditions ranging from extreme deficiency to toxicity due to excess. Plant breeding was oriented these last 50 years to provide crops to modern agriculture with high intrinsic growth rates and yields, under the condition that mineral nutrition was not limiting. Such condition was obtained by the massive use of fertilizers, in particular considering nitrogen (N),

phosphorous (P), and potassium (K) (López-Arredondo et al., 2013). The future of agriculture will undoubtedly require to use so far uncultivated lands, some of them exhibiting unfavorable soil mineral composition, and to reduce the use of fertilizers in order to promote sustainable practices. In such a context of lower input into the environment, new cultivated plant genotypes will need to be selected in a way improving their mineral use efficiency. Reaching such a goal would be facilitated by a knowledge-based approach rooted in the understanding of how plants sense and signal changes in the availability of nutrients (López-Arredondo et al., 2013).

A wealth of knowledge was obtained these last 20 years on the physiological and morphological adaptation of plants in response to variations in availability of a given mineral element (Maathuis, 2009; Krouk et al., 2011; Gruber et al., 2013; Briat et al., 2014; Giehl and von Wirén, 2014). Genes encoding proteins involved in uptake, translocation, assimilation, and storage of macro and micro-elements have been characterized and the regulation of their expression in response to mineral status has started to be elucidated (Schachtman and Shin, 2007; Giehl et al., 2009; Gojon et al., 2009; Liu et al., 2009; Pilon et al., 2009; Hindt and Guerinot, 2012; Vígani et al., 2013). More recently multi-level studies integrating transcriptome to metabolome and to enzyme activities data enabled to begin to understand how plants reprogram various metabolic pathways in response to removal and/or resupply of mineral nutrients. It gives an insight into how plants integrate metabolism adaptation to mineral nutrition deficiency to growth (Amtmann and Armengaud, 2009; Kellermeier et al., 2014). However, it is well known that interactions between nutrients for uptake can cause imbalances if one of them is deficient or in excess (Marschner, 1995; Rouached et al., 2010). Multi-level interactions between the various mineral elements need therefore to be studied in order to understand how the different sensing and signaling pathways activated in response to changes in availability of one element are coordinately integrated with the ones of other elements.

In such a context, the principal aim of this paper is to review interactions between phosphorus (P) and sulfur (S) on one hand, and between zinc (Zn) and iron (Fe) on the other hand. In addition, phosphate (Pi) and sulfate (SO₄) not only interact between themselves but also influence Zn and Fe nutrition, and these intricate nutritional cross-talks are presented, pointing out the emerging role of transcription factors (TFs) belonging to the MYB family.

The MYB Family of Transcription Factors and its Role in Abiotic Stress Responses

Due to their sessile nature plants must face and adapt to a variety of biotic (e.g., bacteria, fungi, etc.) and abiotic (e.g., cold, drought, etc.) stresses throughout their life cycle. As a consequence plants have evolved molecular mechanisms allowing a tight control of their growth and development. This process is complex and dynamic, and requires the coordinated expression of several thousands of genes.

Transcription factors are sequence-specific DNA binding proteins that play a key role in the control of genes expression by acting as transcriptional activators, repressors or both. TFs possess a modular structure that is characterized by two key domains, a DNA-binding domain (DBD) and a transcriptional regulatory domain. TFs have been categorized into various families on the basis of some specific amino acid signatures mostly present in their DBD (Charoensawan et al., 2010).

Among the various classes of TFs found in plants, the MYB family is one of the largest and most diverse (Riechmann et al., 2000; Dubos et al., 2010). MYB proteins are characterized by their DBD (**Figure 1**), or MYB domain. It is composed of different numbers (from 1 to 4) of imperfect repeats (R) of approximately 50 amino acids (Lipsick, 1996). Each repeat forms a helix-turn-helix (HTH) structure containing three evenly spaced tryptophan residues. These residues form a hydrophobic core playing a key role in the sequence-specific binding to DNA. The MYB gene family is divided into various groups according to the number and the type of repeat(s) found in their DBD (Stracke et al., 2001; Du et al., 2013).

To date, no biological role directly related to plant responses to abiotic stresses has been clearly reported for the 3R- and 4R-MYB proteins. 3R-MYBs are found in all eukaryotic cells where they participate to the control of the cell cycle. In contrast, the role of the plant specific 4R-MYBs remains elusive.

The R2R3-MYB class (two repeats) is the largest group of MYB-proteins exclusively found in plant species. For instance, out of the 196 MYB genes found in the *Arabidopsis thaliana* genome, 126 encode R2R3-MYB proteins (Dubos et al., 2010). R2R3-MYBs are specifically involved in the transcriptional control of plant-specific processes, including plant responses to various abiotic stresses, such as cold or drought. This TF sub-family has been extensively studied in *Arabidopsis* allowing to determine the biological role played by more than half of its members (Dubos et al., 2010). For example, AtMYB14 and AtMYB15 are involved in the plant response to cold stress (Agarwal et al., 2006; Chen et al., 2013). AtMYB60 and AtMYB96 act through the ABA signaling cascade to modulate plant response to drought, by controlling stomatal movement, and root growth and cuticular wax deposition, respectively (Cominelli et al., 2005; Seo et al., 2009, 2011). In contrast, AtMYB2 and AtMYB44/AtMYB181 regulate the expression of their target genes in response to drought in an ABA-dependent manner (Abe et al., 2003; Jaradat et al., 2013). AtMYB88 and AtMYB124/FLP paralogs are key regulators of stomata differentiation. They have recently been shown to be involved in sensing and/or transducing salt stress (and most probably other abiotic stresses; Xie et al., 2010). AtMYB20 and AtMYB73 are also involved in salt stress tolerance, whereas AtMYB108/BOS1 displays a less specific role as it is required in the response to both pathogens and abiotic stresses, including drought, salinity, and oxidative stress (Mengiste et al., 2003; Cui et al., 2013; Kim et al., 2013).

Last, the single MYB repeat proteins forms a heterogeneous group that gather genes that can be classified into five major subgroups: the CPC-like, the CCA1-like/R-R, the I-box-like, the TRF-like, the TBP-like, and the GARP (Du et al., 2013). To

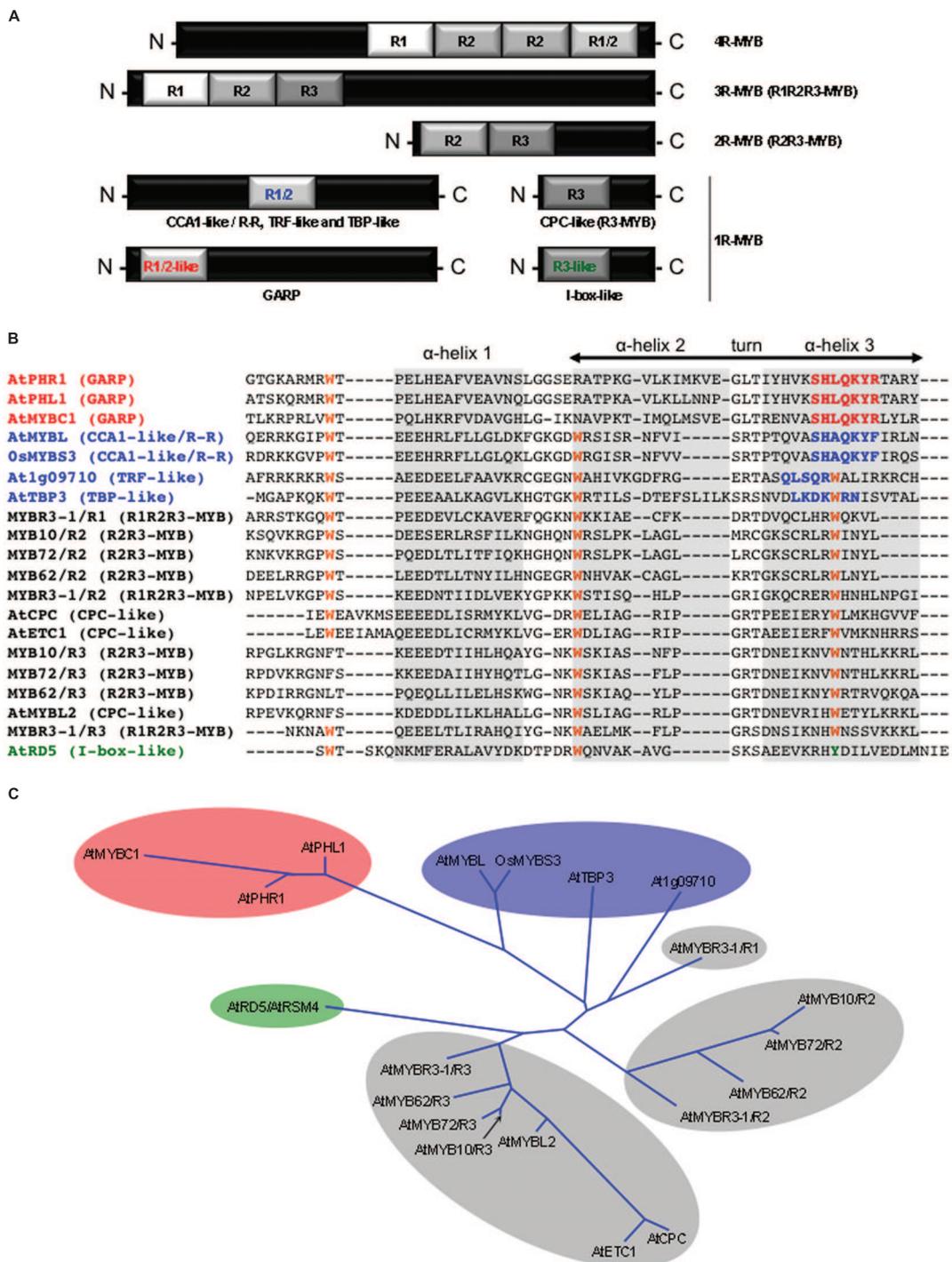


FIGURE 1 | The plant MYB protein family. (A) Schematic representation of the different MYB protein classes based on the number (from 1 to 4) and the type (i.e., R1, R2, R3, R1/2, R1/2-like, and R3-like) of adjacent MYB repeat (R). It must be noted that the position of the R1/2 MYB repeat alongside the polypeptide chain of the proteins may vary between the different 1R-MYB subclasses that contain this domain (i.e., CCA1-like/R-R, TRF-like, and TBP-like). **(B)** Sequence alignment of MYB repeats from different classes of MYB proteins. Conserved tryptophan (W) residues are highlighted in orange. Specific amino acid signatures of the GARP, the CCA1-like/R-R, TRF-like, and TBP-like, and the I-box-like 1R-MYB classes are highlighted in red, blue, and

green, respectively. α -Helices are shaded in gray. The α -helix 3 is the recognition helix that makes direct contacts with DNA nitrogen bases (i.e., interacting with *cis*-regulatory sequences). Protein sequences were downloaded from TAIR (except for OsmYBS3, GenBank: accession AAN63154). **(C)** Phylogenetic relationship (unrooted tree, neighbor joining method) between the different classes of MYB repeats. The corresponding protein name is given at the extremity of each branch of the tree. The GARP, the CCA1-like/R-R, TRF-like, and TBP-like, and the I-box-like repeats are shaded in red, blue and green, respectively. (Adapted from Stracke et al., 2001, Dubos et al., 2010, and Du et al., 2013).

date, only 1R-MYBs belonging to the CPC-like (also called R3-MYB), and CCA1-like/R-R subgroups, have been associated to plant abiotic stress responses. The *Arabidopsis* AtMYB12 is a CPC-like MYB protein whose activity is decreased under high light stress, and which acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis (which provide a natural sunscreen for plants), and (Dubos et al., 2008). Amongst the CCA1-like/R-R group of MYB proteins, OsMYB3 has been shown to be involved in cold tolerance in rice (*Oryza sativa*), whereas AtMYB12 plays a role in the *Arabidopsis* response to salt stress (Su et al., 2010; Zhang et al., 2011). AtMYB12 that belongs to the GARP subgroup was found to be a negative regulator of freezing tolerance in *Arabidopsis* (Zhai et al., 2010).

Nutrients availability is also an important environmental factor which modulates plant growth and development, and therefore crop productivity. Consequently, deficiencies in nutrient supplies are abiotic stresses against which plants have evolved signaling cascades aiming to improve nutrient acquisition and homeostasis. Similarly to the above-mentioned abiotic stresses, MYB proteins have also been found to be involved in the plant response to nutrient deficiencies. For example, two homologous R2R3-MYB proteins (namely AtMYB10 and AtMYB72) have been shown to play a key role in improving growth under Fe-limiting conditions (van de Mortel et al., 2008; Palmer et al., 2013; Zamioudis et al., 2014). However, most of the MYB proteins identified so far as involved in the regulation of mineral nutrition were associated with Pi starvation. For example AtMYB62 participates in the response to Pi shortage (Devaiah et al., 2009), whereas AtETC1 (ENHANCER OF TRY AND CPC 1) is a CPC-like MYB TF acting to modulate root hair density under Pi limited conditions (Savage et al., 2013).

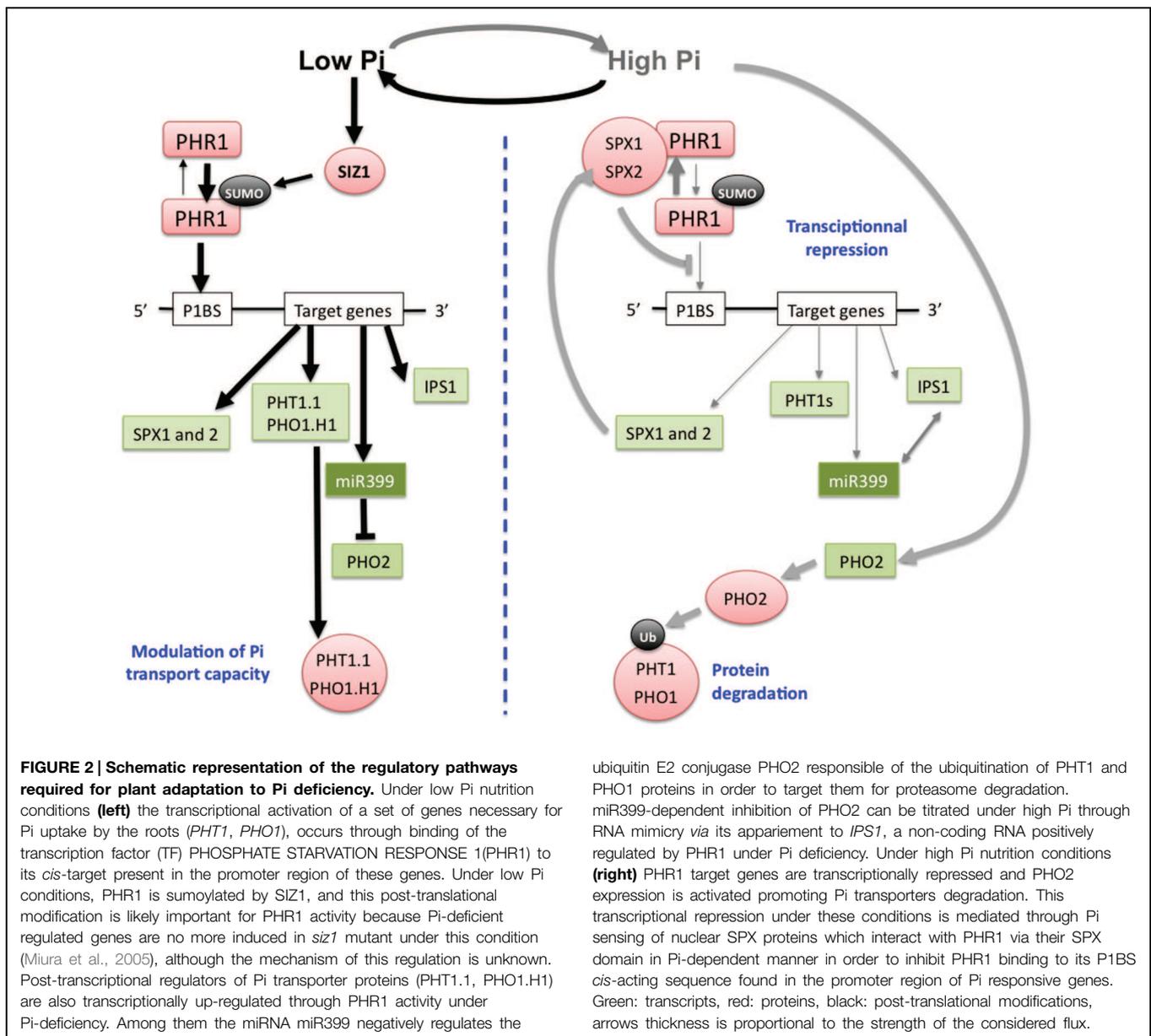
PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) and PHR1-Like 1 (PHL1) are two homologous GARP MYB proteins that play a critical role in the adaptation of plant to Pi (inorganic phosphate) deficiency. Originally, PHR1 was first identified as a regulator of Pi nutrition in *Chlamydomonas reinhardtii*, and named PSR1. It is required for the transcriptional induction of Pi-deficiency responsive genes in this green algae (Shimogawara et al., 1999; Wykoff et al., 1999). A genetic screen enabled to identify a PSR1 ortholog in *Arabidopsis*, AtPHR1 (Rubio et al., 2001). Several years later a redundant gene to *AtPHR1* was characterized and named *AtPHL1* (Bustos et al., 2010). These two TFs are able to interact, and they recognize the same *cis* element located in the promoter sequence of their target genes. A consensus sequence of this element, called *PHR1 Binding Site* (P1BS), has been defined as 5'-GNATATNC-3' (Rubio et al., 2001; Bustos et al., 2010; **Figure 2**). Transcriptome analysis revealed that most of the genes induced in response to Pi deficiency lost this ability in *phr1 phl1* double mutant plants. Furthermore, the frequency of occurrence of the P1BS element is much higher in the promoter region of genes induced in response to Pi deficiency than in others (Bustos et al., 2010). Interestingly, two *Arabidopsis* PHR1 orthologs, *OsPHR1*, and *OsPHR2*, have been characterized in rice (Zhou et al., 2008), and functional P1BS *cis*-elements have been reported in barley (Schünmann et al., 2004a,b). These data indicate that the regulatory pathway involving PHR1 to activate the expression of some genes in response

to Pi starvation is likely to be conserved between monocotyledonous and dicotyledonous plants. It is noteworthy that a recent study has pointed out that the expression of *AtFer1*, a key gene involved in Fe homeostasis, was transcriptionally regulated by AtPHR1 and AtPHL1, providing a direct molecular link between Fe and Pi homeostasis (Bournier et al., 2013, and see below the "PHR1 involvement in Pi and Fe homeostasis interactions" section).

PHR1 and the Control of Pi Nutrition

P is an essential macronutrient required by living organisms. It is found in essential biological molecules including nucleic acids, ATP (a major energy carrier) and phospholipids. P is intimately linked with energy metabolism, the production of numerous metabolic intermediates, and the post-translational modification of proteins (a key parameter in signal transduction cascades; Poirier and Bucher, 2002). Its deficiency has deleterious effects on plant growth and development, evidenced by a strong decrease in shoot growth, and by the accumulation of anthocyanins. Plants acquire P by their roots as inorganic Pi. Pi concentration is heterogeneous in the soil, and often very low at the root/soil interface (Poirier and Bucher, 2002). Root architecture responds to Pi deficiency by inhibiting primary root growth and by increasing lateral root density. This is an adaptive strategy to explore more soil volume, resulting in an increased Pi uptake capacity of the plants. After having crossed the plasma membrane of epidermal and cortical root cells, Pi is distributed throughout the plant under the control of a cascade of Pi transporters belonging to the PHT and PHO1 families. For an extensive review of the Pi transporter gene family, readers are referred to Poirier and Bucher (2002), and to Nussaume et al. (2011). Plant adaptation to Pi deficiency involves wide changes in gene expression. It implicates several TFs. Few of them have been identified including WRK75, ZAT6, bHLH32, MYB62, and PHR1 (Yi et al., 2005; Chen et al., 2007; Devaiah et al., 2007a,b, 2009; Svistoonoff et al., 2007; Ticconi et al., 2009). So far, the major regulations of the expression of numerous Pi deficiency-induced genes was attributed to PHR1, *via* the PHR1-PHO2-miRNA399 pathway described below (**Figure 2**). In addition to this pathway, plants respond to Pi deficiency through pathways involving phytohormones and various metabolites (Buchner et al., 2004). Among phytohormones, cytokinins suppress the up-regulation of several genes in response to Pi deficiency, including Pi uptake transporters. It requires the cytokinin receptor CYTOKININ RESPONSE 1/WOODEN LEG/ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 4 (CRE1/WOL/AHK4) pathway (Maruyama-Nakashita et al., 2004; Franco-Zorrilla et al., 2005). Among the metabolites, carbohydrates are involved in the Pi deficiency response. The expression of Pi transporters is sensitive to the carbon status of the plant, either upstream or downstream of the hexokinase (HXK) activity in glycolysis (Lejay et al., 2008).

At a molecular level Pi deficiency is regulated both at the transcriptional and post-transcriptional levels. The major actors coordinating these various regulations are PHR1 and PHL1, two TFs likely conserved amongst flowering plants.



Indeed, sensing of the Pi status of the plant is likely conserved between mono- and dicotyledonous plants, as recently reported (Wang et al., 2014a). Expression of *AtPHR1* and of its rice orthologous gene *OsPHR2*, are not responsive to Pi, raising the question of how plants sense the intra-cellular variations of Pi concentrations. In this context, Wang et al. (2014a) recently reported that rice OsSPX1 and 2, which are nuclear proteins whose expression is itself activated by OsPHR2 under low Pi conditions, interact with OsPHR2 by their SPX domain in a Pi-dependent manner. This interaction results in the inhibition of OsPHR2 binding on its *cis*-acting P1BS sequence (Figure 2). Therefore, this mechanism constitutes a very efficient transcriptional regulatory feedback loop to fine tune the PHR1 dependent expression of Pi responsive genes, according to the intracellular fluctuations of Pi concentrations.

Among the genes transcriptionally regulated by PHR1/PHL1 in response to Pi deficiency are the *PHT1* genes (Figure 2). They encode plasma membrane high-affinity H⁺/Pi co-transporters (Okumura et al., 1998; Mudge et al., 2002), preferentially expressed in the root epidermal or cortical cells, and therefore directly involved in Pi acquisition (Karthikeyan et al., 2002; Mudge et al., 2002). Once Pi has entered the root, it is loaded into the xylem sap for translocation to the shoots *via* PHO1, which is specifically expressed in the pericycle (Hamburger et al., 2002). PHT1 and PHO1 transporters are also post-translationally regulated during their intracellular trafficking to the plasma membrane, and the C terminus phosphorylation of PHT1 proteins retains them at the ER upon Pi refilling (Bayle et al., 2011). During the post-ER trafficking, the ubiquitin E2 conjugase PHO2 modulates the ubiquitination status of PHT1 and PHO1 transporters

in order to control their rate of degradation by the proteasome. *PHO2* expression is itself post-transcriptionally repressed by miR399, a small non-coding RNA up-regulated by Pi deficiency at the transcriptional level through PHR1/PHL1 activity (Fujii et al., 2005; Aung et al., 2006; Bari et al., 2006; Chiou et al., 2006; Liu et al., 2014; **Figure 2**). Post-translational control of Pi loading into the xylem *via* the degradation of PHO1 under Pi-sufficient conditions has also been reported to be mediated by PHO2 (Liu et al., 2012).

Phosphate Starvation Response 1 is itself regulated post-translationally in response to Pi deficiency through the action of SIZ1, a sumo E3 ligase (**Figure 2**). PHR1 can be sumoylated *in vitro* by SIZ1, and Pi-deficient regulated genes are no more induced in *siz1* mutant in response to Pi deficiency (Miura et al., 2005). This post-translational regulation of PHR1 could modify its activity, in order to modulate the transcriptional activation of its target genes, among which the *IPS1* gene (Rubio et al., 2001). *IPS1* encodes a non-coding RNA whose sequence is in part complementary of the microRNA miR399, enabling post-transcriptional regulation *via* RNA mimicry (Liu et al., 2014). *IPS1*-miR399 matching would therefore lead to the inhibition of the miR399 RNA activity (Franco-Zorrilla et al., 2007) known to target *PHO2* (**Figure 2**). It could explain the increased expression of PHT1-8 and PHT1-9 in *pho2* mutant plants (Bari et al., 2006), and the decreased expression of *PHO2* and of the *PHT1-8* and *PHT1-9* Pi transporter genes in miR399 over-expressing transgenic lines (Aung et al., 2006). The involvement of *PHT1-8* and *PHT1-9* in Pi uptake (Remy et al., 2012) and/or in Pi root-to-shoot translocation (Lapis-Gaza et al., 2014) has been reported. More recently an iTRAQ based quantitative membrane proteomic approach was used to search for components downstream of PHO2. It enables to show that PHO2 mediates the degradation of PHT1 proteins by interacting in the post-endoplasmic reticulum compartments where ubiquitination of endomembrane-localized PHT1-1 occurs (Huang et al., 2013). Finally the systemic effect of miR399 was evidenced by grafting experiments. It demonstrated the transport of this small RNA from leaves to root within the phloem sap, explaining why specific overexpression of the miR399 in leaves led to decrease the expression of *PHO2* in roots (Pant et al., 2008).

Pi, S, and Their Biological Interactions

Sulfur is an essential element for plant growth and development. The major source of S for plants is inorganic sulfate (SO₄; Leustek et al., 2000). In the cell, S is involved in different functions and aspects of plant metabolism. It is found both in reduced (amino acids, peptides, and proteins, lipoic acid, iron-sulfur clusters), and in oxidized (polysaccharides, lipids, and sulfonate group modifying proteins) forms (Kopriva, 2006). Thus S deficiency has profound effects on plant physiology. When challenged by SO₄ deficiency, shoot growth is affected, resulting in a decrease in the total biomass. Modulation of root system architecture has also been observed in response to S limitation (Osmont et al., 2007). The primary root continues to grow, but the lateral roots form closer to the root tip, with an increased density. During

the last two decades, a comprehensive view of SO₄ transport in *Arabidopsis* and other plant species has emerged. Numerous “*SULTR*” genes encoding SO₄ transporters for uptake as well as for inter-organs and subcellular distribution have been functionally characterized (Takahashi, 2010). The first key step for SO₄ uptake in *Arabidopsis* is mainly carried out by the two high-affinity SO₄ transporters *SULTR1;1* and *SULTR1;2* (Rouached et al., 2009). The possibility that *SULTR1;2* may function as a sensor of S status or as a component of a S sensory mechanism has recently been proposed (Zhang et al., 2014).

Some key regulatory molecular mechanisms and components involved in the regulation of SO₄ transport have been discovered, among which a regulatory pathway requiring miRNAs, including miR395 (Kawashima et al., 2009). This microRNA contributes to the regulation of SO₄ root-to-shoot transfer involving the *SULTR2;1* gene. The transcript abundance of this gene is strongly decreased under deficient S conditions (Takahashi et al., 1997, 2000). It can be explained by the increased level of miR395 under such conditions (Kawashima et al., 2009), leading to a strictly restricted expression of the *SULTR2;1* gene in the xylem (Kawashima et al., 2009). miR395 acts downstream of the TF *SULFUR LIMITATION 1* (*SLIM1*), also known as *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 3* (*EIL3*; Maruyama-Nakashita et al., 2006; Kawashima et al., 2009).

Plants have evolved tightly controlled mechanisms allowing the coordination of the S transport and homeostasis with photosynthesis and the carbon status, in a similar manner to Pi transport system (Lejay et al., 2008). In addition to these mechanistic similarities in the regulation of the Pi and SO₄ transport systems, plants have developed coordinated and tightly controlled mechanisms to maintain intracellular homeostasis of both elements in response to their external availability. It has been reported that plant cells operate a rapid replacement of sulfolipids by phospholipids under S deficiency, and the replacement of phospholipids by sulfolipids during Pi deficiency (Essigmann et al., 1998; Hartel et al., 1998; Yu et al., 2002; Sugimoto et al., 2007). Such a metabolic switch attests the P/S nutritional interdependency. Interestingly, two genes necessary for the replacement of phospholipids by sulfolipids in Pi-deficient plants, *SQD1* and *SQD2*, contain a PHR1 binding sequence (*PIBS*) in their promoter, and are up-regulated by Pi deficiency in a PHR1-dependant manner (Franco-Zorrilla et al., 2004; Stefanovic et al., 2007). The accumulation of SO₄ and Pi was affected in *Arabidopsis* lines characterized by a very low inositol-6-phosphate (phytic acid, PA) content (Belgaroui et al., 2014). The expression of genes involved in the SO₄ and Pi transport or signaling was altered in these low PA mutants. PA emerged thus as a component of the co-regulation of SO₄ and Pi homeostasis. Hsieh et al. (2009) reported that the increased accumulation of miR395, known to be up-regulated by SO₄ starvation, is suppressed in Pi-deficient plants. It could be therefore a mean to increase the S translocation from root to shoot by *SULTR2;1*, enhancing thus the sulfolipid biosynthesis in replacement of phospholipids under Pi deficiency. Evidences for co-regulation of Pi and S signaling pathways are starting to emerge from recent data. Rouached et al. (2011a) reported that the SO₄ concentration increases in roots and decreases in shoots of *Arabidopsis* Pi-deficient plants. These

results indicate an adaptive regulation of the SO_4 transport process upon Pi deficiency in plants, and particularly the inter-organ SO_4 distribution. Interestingly, PHR1 is required for this process to take place, likely through its positive regulatory role on *SULTR1;3* expression (Rouached et al., 2011a). PHR1 has also a negative effect on the expression of *SULTR2;1* and *SULTR3;4* in response to Pi deficiency (Rouached et al., 2011a). Noteworthy, such a function is also preserved in *Chlamydomonas reinhardtii* via the PHR1 ortholog PSR1 (Moseley et al., 2009). An integrative model for the regulation of the expression of genes involved in intracellular and inter-organ SO_4 transport under Pi deficiency in *Arabidopsis* has been proposed, in which PHR1 plays an integrative role (Rouached, 2011). Considered together, these data reveals an unsuspected level of complexity and interconnection in the regulation of SO_4 and Pi homeostasis in plants.

Fe, Zn, and Their Biological Interactions

Zn is an essential microelement for cell life. It is the only metal represented in all six classes of enzymes: oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases, and ligases (Coleman, 1998). It also plays a structural role in regulatory proteins (Berg and Shi, 1996). Despite its essentiality, high concentrations of Zn can be toxic for the cell, and cause oxidative stress, a decrease in accumulation of ATP, disintegration of cell organelles, and biogenesis of vacuoles (Sresty and Madhava Rao, 1999; Xu et al., 2013).

Zn deficient plants exhibit deformed and chlorotic leaves, and interveinal necrosis, leading to decrease biomass production. Transport across the plasma membrane is achieved by transporters belonging to the ZIP (ZRT, IRT-like protein) family (Mäser et al., 2001) such as AtIRT1 (Vert et al., 2002; Barberon et al., 2011). A passive Zn influx can also occur through the depolarization-activated non-selective cation channel (DA-NSCC; Piñeros and Kochian, 2003), or by the voltage-independent NSCCs (VI-NSCCs; Demidchik and Maathuis, 2007). Zn loading into the xylem sap involves plasma membrane transporters which are members of the P1B-ATPases family, namely AtHMA2, and AtHMA4 (Hussain et al., 2004; Verret et al., 2004). For further information on the Zn transport in plants, readers are referred to Sinclair and Krämer (2012). So far, how plants sense and transmit the signal of Zn deficiency remains poorly understood.

Fe, as Zn, is essential. It is also potentially toxic when in excess because of its reactivity with oxygen which catalyzes the formation of free radicals able to oxidize organic molecules, ultimately leading to cell death (Briat et al., 2010b). Fe is a key element to ensure the electron flow through the PSII-b6f/Rieske-PSI complex. It is therefore essential for CO_2 fixation by the photosynthesis process. Indeed it has been well documented that Fe is a limiting factor for biomass production, as well as for the quality of plant products (Briat et al., 2014). Fe enters the plant via the roots, from where it is distributed within the plant. According to the plant family considered – i.e., *graminacea* plants versus other plants – two mechanisms prevail for mining Fe

from the soil solution. They involve, respectively, chelation of the ferric iron (Fe^{3+}) by small organic molecules, among which methionine derivatives constitute the mugenic acid (MAs) family, or its reduction in its ferrous form (Fe^{2+}) prior to transport across the plasma membrane of root epidermal cells (Curie et al., 2009; Morrissey and Guerinot, 2009; Conte and Walker, 2011). This transport is achieved by transmembrane proteins exhibiting transporter activities, such as YS1 responsible of the transport of Fe^{3+} -MAs complexes in *graminacea*, or IRT1 responsible of the root uptake of Fe^{2+} by non-*graminacea* plants (Curie et al., 2001; Vert et al., 2002). Many other transporters, as well as soluble proteins, responsible for Fe long distance distribution, sub-cellular compartmentation, and storage have also been characterized this last decade (Morrissey and Guerinot, 2009; Briat et al., 2010a; Kobayashi and Nishizawa, 2012). The expression of these genes encoding proteins responsible of Fe homeostasis at the whole plant level is precisely regulated through integrated pathways modulated by the sensing of the Fe status of the plant. These controls mainly operate at the transcriptional level via a network of TFs, most of them belonging to the bHLH family (Ivanov et al., 2012; Kobayashi and Nishizawa, 2012; Hindt and Guerinot, 2012), but also at the post-transcriptional level (Ravet et al., 2012). How plants sense their Fe status is now the new frontier in this field of research. It could be achieved, at least in part, by some TFs and/or by Hemerythrin motif-containing Really interesting new gene and Zinc-finger proteins (HRZs)/BRUTUS (BTS), that were recently identified both in rice and *Arabidopsis*, respectively (Kobayashi and Nishizawa, 2014).

Fe deficiency in *Arabidopsis* leads to the activation of expression of *IRT1*, the primary transporter responsible of root Fe uptake. *IRT1* has a weak substrate specificity and contributes therefore to the accumulation of a broad range of divalent transition metals including Zn (Vert et al., 2002; Arrivault et al., 2006; Haydon et al., 2012). Conversely, excess Zn causes physiological Fe deficiency. Early studies reported an absence of IRT1 protein in *Arabidopsis* roots from plants grown under Zn excess conditions (Connolly et al., 2002), suggesting that the known post-translational regulation of IRT1 protein levels through ubiquitin-mediated proteasomal degradation (Kerkeb et al., 2008; Barberon et al., 2011) might predominate under this condition. However, it was reported more recently that IRT1 protein in *Arabidopsis* grown under excess Zn increased in abundance, comparatively to plants grown under standard Zn nutrition conditions (Fukao et al., 2011; Shanmugam et al., 2011). IRT1 could therefore be a major contributor to Zn deficiency.

MTP3 (a member of the Cation Diffusion Facilitator family), HMA3 (belonging to the P1B-type ATPase family), and ZIF1 (a member of the Major Facilitator Superfamily transporters) are vacuolar membrane proteins required for Zn tolerance, and encoded by genes which are transcriptionally activated in response to excess Zn or Fe deficiency (Becher et al., 2003; Arrivault et al., 2006; van de Mortel et al., 2006; Haydon and Cobbett, 2007; Haydon et al., 2012). Indeed MTP3 and HMA3 gene expression is decreased in the *fit* mutant. This mutant lacks a bHLH TF that activates root Fe deficiency responses, in particular the transcriptional up-regulation of the Fe(III)-chelate reductase

FRO2 and of the Fe²⁺ transporter IRT1 (Colangelo and Gueriot, 2006). Interestingly, transcriptional regulation of the ZIF1 gene under Fe deficiency is independent of Fe deficiency-induced Zn accumulation (Arrivault et al., 2006; Haydon et al., 2012). The bHLH TF POPEYE, controlling a set of genes expressed in the stele and important for the control of Fe homeostasis was reported to directly interact with the ZIF1 promoter and to repress its transcription, although there is a concurrent net increase in ZIF1 transcript levels, under Fe deficiency (Long et al., 2010).

These results evidence the complexity of the cross-talks between the pathways at work to regulate Fe deficiency and Zn excess in order to establish an integrated response, and the necessity of additional work in the future to decipher them.

The two macro-elements Pi and S on one hand, and the two metals Zn and Fe on the other hand, do not only interact between themselves as reported above. Indeed Pi and S status of the plant can also influence Zn and Fe nutrition, and these aspects will now be reviewed below.

S and Fe Homeostasis Interactions

From a biochemical point of view, Fe and S are known to interact for the building of Fe–S clusters, which are a major sink for Fe, and known to be essential for photosynthesis, respiration, and many cellular enzymatic reactions (Couturier et al., 2013). However, it is only recently that Fe and S interactions have been documented at physiological and molecular levels, although the cross-talks between the pathways regulating the integrated homeostasis of these two elements remain to be deciphered. It is well established that leaf Fe concentration decreases in S-deficient tomato, comparatively to S-sufficient control plants. This is consistent with the observation that the expression level of the *LeFRO1* gene encoding a root Fe³⁺-chelate reductase, the activity of this reductase, and the reduction based of ⁵⁹Fe uptake, are decreased in response to S starvation (Zuchi et al., 2009). In agreement with these observations a strong repression of expression of the *Arabidopsis thaliana* IRT1 Fe²⁺ transporter in response to S deficiency was recently reported (Frieri et al., 2013). Reciprocally, it has been observed that Fe starvation modifies S uptake and assimilation. At a genome wide level, data mining of transcriptomes from Fe deficient *Arabidopsis* plants revealed a cluster of S-metabolism related genes (including genes encoding plasma membrane and tonoplast S transporters, and enzymes of the S assimilation pathway such as adenosine phosphosulfate reductase) co-expressed with Fe-deficient genes (Schuler et al., 2011). Also, the high affinity S transporter *SULTR1;1* mRNA abundance is 2.5-fold lower in absence of Fe (Frieri et al., 2013). However, a contrasted report was recently published concerning this last point (Paolacci et al., 2014). It indicated that the expression of most of the group 2 and 4 S transporters were up-regulated in Fe starved tomato plants. It turned out to be also the case of the *SIST1;1* and *SIST1;2* tomato high affinity transporters of the group 1, to which belongs the *SULTR1;1*

transporter from *Arabidopsis*. Resolution of these discrepancies concerning the impact of Fe deficiency on the regulation of expression of high affinity SO₄ transporters clearly requires further work.

The interaction between Fe and S metabolisms has not only been studied in plants acquiring Fe from the soil through a reduction-based strategy as it occurs in tomato (*Solanum lycopersicum*) or *Arabidopsis*. It has also been investigated with graminaceous plants. Synthesis of Fe³⁺-chelators of the MAs family (Kobayashi and Nishizawa, 2012) and their release in the rhizosphere were reduced in barley (*Hordeum vulgare* L.) plants grown under S starvation (Kuwajima and Kawai, 1997; Astolfi et al., 2006). However, transcript abundance of the *YS1* gene encoding the Fe³⁺-MAs transporter (Curie et al., 2001) increased in response to Fe deficiency at the same level, whatever the S nutrition conditions imposed (Astolfi et al., 2012). The modifications of S metabolism occurring in response to Fe deficiency have also been investigated in durum wheat (*Triticum turgidum* L.; Ciaffi et al., 2013). These authors have shown that Fe deficiency under S sufficient nutrition conditions led to a S deficiency response at a molecular level. This response was characterized by an increase in abundance of some of the transcripts encoding enzymes of the S assimilation pathway, including APS reductase, ATP sulfurylase, sulfite reductase, and serine acetyltransferase. Furthermore, the activity of the corresponding enzymes was also found to be increased by Fe shortage. However, changes in mRNA abundance of some other genes of the S assimilation pathway, and the activity of the corresponding enzymes, were observed to be uncoupled in their response to Fe or S deprivation. In addition, the expression of the wheat *SULTR1;3* high affinity SO₄ transporter was significantly increased in roots and shoots in response to both S or Fe shortage, with the highest expression level observed under Fe deficiency conditions. In contrast, the expression of the *SULTR1;1* transporter gene, mainly expressed in roots, was strongly induced in response to S deficiency, but unaffected by Fe deficiency (Ciaffi et al., 2013).

In conclusion, the interactions between Fe and S metabolisms are attested both in graminaceous and non-graminaceous plants. These interactions have started to be documented at a molecular level, reporting that Fe deficiency modifies the expression of genes involved in S transport and assimilation, and *vice-versa*. Nevertheless, the characterization of these interactions is still in its infancy, and more work is needed to understand the complexity of the integration of the various pathways involved. Of particular interest would be the study of a possible role of the synthesis of Fe–S cluster, and of their relative abundance in response to various nutritional stress, as driving forces of the Fe–S interactions (Couturier et al., 2013; Frieri et al., 2013).

PHR1 Involvement in Pi and Fe Homeostasis Interactions

Clear physiological links have been established between Fe and Pi (Hirsch et al., 2006; Ward et al., 2008). The complexation of Fe by Pi in soils leads to the formation of precipitates, decreasing the

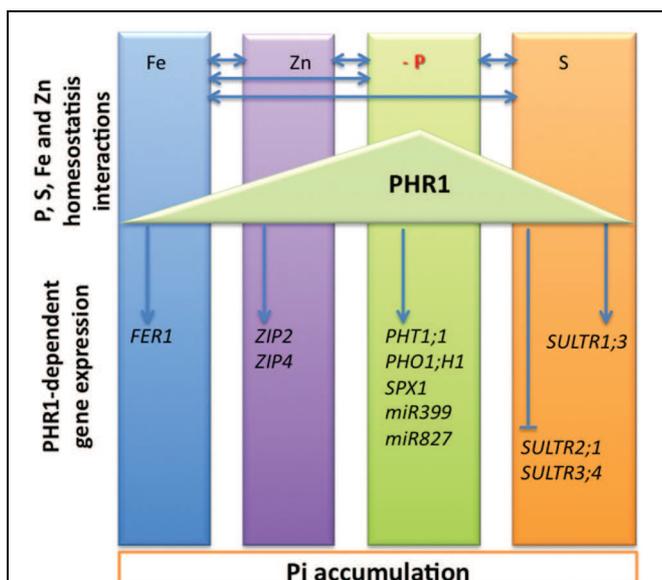


FIGURE 3 | Schematic representation of the macro- and micronutrients homeostasis crosstalks. The interactions between phosphorus (P), sulfur (S), iron (Fe), and zinc (Zn) homeostasis are indicated by left right arrows. At a molecular level, the PHR1 transcription factor was initially identified as a key regulator of the expression of phosphate starvation induced (PSI) genes, including phosphate transporters *PHT1;1*, *PHO1;H1*, and genes involved in phosphate deficiency sensing and signaling including *SPX1*, *miR399*, and *miR827*. PHR1 appeared also as a regulator of the expression of genes involved in sulfate transport including the sulfate transporters *SULTR1;3*, *SULTR2;1*, and *SULTR3;4*. The arrowheads and flat ended lines indicate the positive and negative effects of PHR1, respectively. The transcriptional regulation of some genes involved in maintaining Fe and Zn homeostasis has also been shown to be PHR1-dependent; it includes the *FER1* gene encoding the Fe storage protein ferritin, and the *ZIP2* and *ZIP4* genes encoding zinc transporters.

availability of these two elements for plants. As a consequence, the high affinity root Fe^{2+} uptake system, which is induced by Fe deficiency, is also activated under Pi excess conditions (Ward et al., 2008). Conversely, Pi starvation promotes metal accumulation in plants, mainly aluminum, and Fe (Misson et al., 2005; Hirsch et al., 2006; Ward et al., 2008). From a developmental point of view, it is also well documented that a decrease of primary root growth under Pi deficiency is partly due to Fe toxicity (Ward et al., 2008; Ticconi et al., 2009). Once taken up by the roots, Pi is translocated to the shoots, and Fe can interact with Pi inside roots leading to a reduced Pi translocation to the shoots (Cumbus et al., 1977; Mathan and Amberger, 1977). The same kind of interaction has been described in leaves in which high Pi content favors chlorosis, even if the leaf Fe level is sufficient (Dekock et al., 1978). Finally, in seeds Fe is stored in vacuoles under the form of globoids composed in part of phytate (inositol hexakisphosphate = IP6)-Fe complexes (Lanquar et al., 2005). These observations indicate that Pi is a very efficient Fe chelator. As a consequence, changes in Pi homeostasis will strongly influence Fe availability.

At the molecular level, transcriptome analysis of Pi deficient plants revealed an increase in abundance of transcripts

from Fe excess responsive genes, and reciprocally a decrease in abundance of transcripts from Fe deficiency responsive genes (Misson et al., 2005; Müller et al., 2007; Thibaud et al., 2010). In this context, the induction of expression of the *AtFER1* gene, encoding the Fe storage protein ferritin, in response to Pi deficiency was interpreted by some authors as a consequence of an increase in available Fe under such conditions (Hirsch et al., 2006). Indeed this interpretation is likely wrong since the abundance of *AtFER1* mRNA in response to Pi starvation was recently shown to be mediated by PHR1 and PHL1, through their binding to a *PIBS cis*-element found in the *AtFER1* promoter, independently of the plant Fe nutrition conditions (Bournier et al., 2013). Furthermore, the Fe-dependent IDRS *cis*-acting element present in the *AtFER1* proximal promoter (Petit et al., 2001a) is not required for Pi-deficient induction of *AtFER1* expression (Bournier et al., 2013). Moreover, *AtFER3* and *AtFER4* ferritins genes, lacking *PIBS cis*-element in their promoter and known to be induced by Fe excess (Petit et al., 2001b), have their expression unchanged by Pi starvation (Bournier et al., 2013). Finally, induction of *AtFER1* expression in response to Fe excess is not altered in *phr1* (Bournier et al., 2013) nor in *phr1xphl1* (Bustos et al., 2010) mutant plants.

At a cellular level, Fe distribution around the vessels was abnormal in *phr1x phl1* double mutant (Bournier et al., 2013), suggesting that PHR1 and PHL1 may link Fe and Pi homeostasis not only by regulating *AtFER1* gene expression, but also by having a broader regulatory function of Fe metabolism. Indeed, genome wide analysis of Pi starved wild-type (Misson et al., 2005; Müller et al., 2007; Thibaud et al., 2010) and double *phr1xphl1* mutant (Bustos et al., 2010) plants revealed other Fe homeostasis related genes such as *NAS3* (*NICOTIANAMINE SYNTHASE 3*) and *YSL8*. These genes were induced upon Pi starvation in wild type, and exhibit a decreased induction in the double mutant plants. Moreover, Fe deficiency responsive genes, including *FRO3*, *IRT1*, *IRT2*, *NAS1*, and *FRO6* were repressed upon Pi starvation in wild type and miss-regulated in the *phr1xphl1* double mutant plants. These observations strengthen a global role of PHR1 and PHL1 in the overall control of Fe homeostasis that is, by this mean, integrated to the Pi status of the plant.

PHR1 Involvement in Pi and Zn Interactions

Pi and Zn homeostasis in plants are known to strongly interact (Loneragan et al., 1982; Cakmak and Marschner, 1986; Huang et al., 2000; Zhu et al., 2001; Misson et al., 2005; Bouain et al., 2014a; Khan et al., 2014). Nevertheless, the molecular bases of the Pi-Zn interactions remain so far poorly understood. Long-term Pi deprivation leads to Zn over-accumulation (Misson et al., 2005), and inversely Zn starvation appears to cause an over-accumulation of Pi (Loneragan et al., 1982; Huang et al., 2000; Bouain et al., 2014a; Khan et al., 2014). Transcriptome data from roots of Pi- or Zn-deficient *Arabidopsis* plants (Hammond et al., 2003; Wintz et al., 2003; Wu et al., 2003; Misson et al., 2005; van de Mortel et al., 2006; Müller et al., 2007; Bustos et al., 2010; Rouached et al., 2011b; Woo et al., 2012),

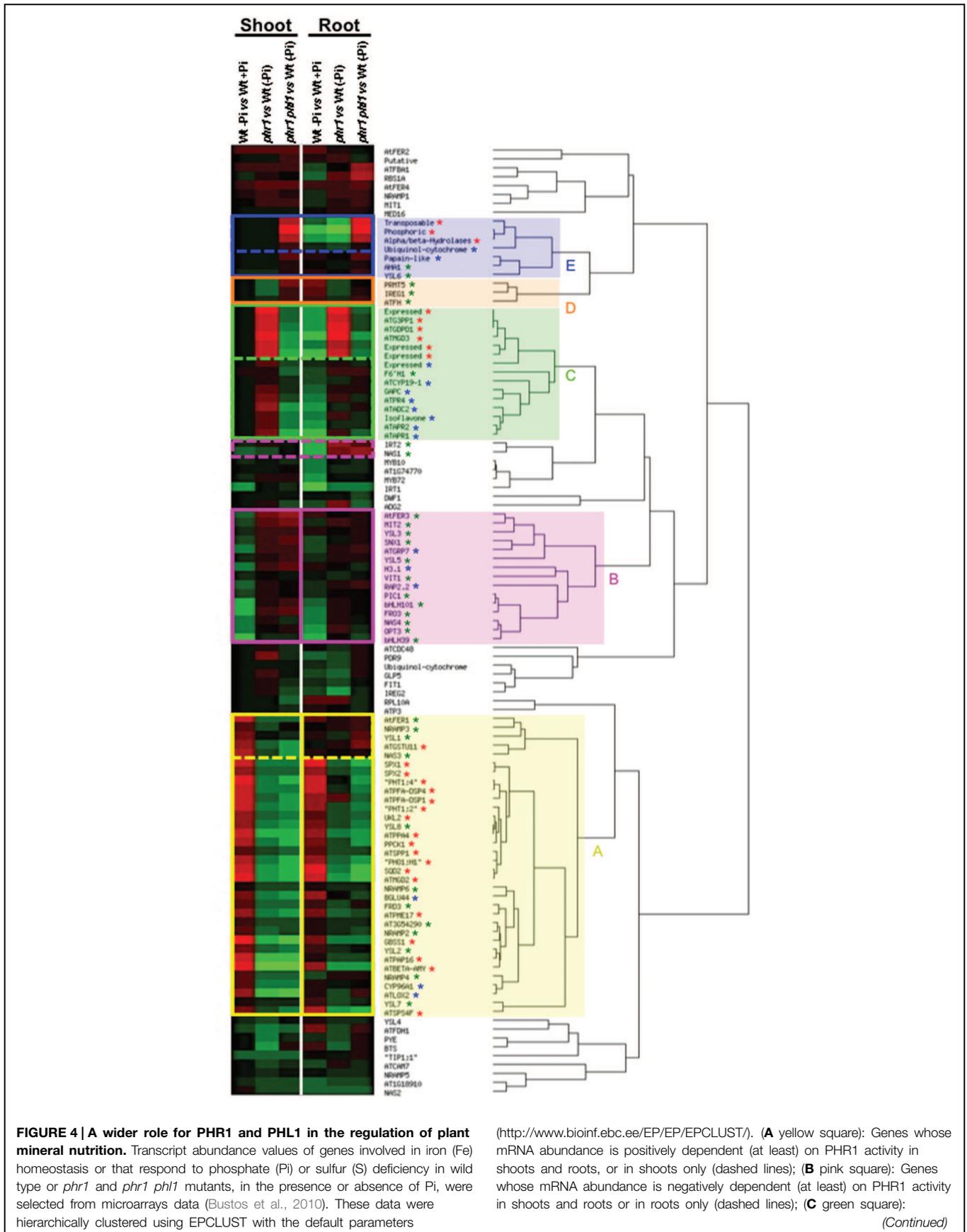


FIGURE 4 | Continued

revealed that Zn deficiency Genes whose mRNA abundance is positively dependent on PHR1 activity but negatively dependent on PHL1 activity both in shoots and roots or in shoots only (dashed lines). (D orange square): Genes whose mRNA abundance is negatively dependent on PHR1 activity but positively dependent on PHL1 activity both in shoots and roots. (E blue square): Genes whose mRNA abundance is negatively dependent on both PHR1 and PHL1 activities in shoots and roots or in shoots only (dashed lines). Red star, Pi deficiency response; blue star, S deficiency response; green star, Fe homeostasis.

could induce the expression of many Pi-related genes (van de Mortel et al., 2006), and that Pi starvation modifies the expression of genes involved in the maintenance of metal homeostasis such as Zn and Fe (Misson et al., 2005; Bustos et al., 2010). Considered together, this transcriptome data reinforce the evidence of a cross-talk between Pi and Zn signaling pathways *in planta*. Cross-analysis of these expression data showed that Pi and Zn deficiencies often act in an opposite manner on these sets of genes. Many genes induced by Zn deficiency are repressed by Pi deficiency (Bustos et al., 2010; Bouain et al., 2014b). Interestingly, it was observed that most of these genes were further repressed in the *phr1* mutant genetic background (Bustos et al., 2010; Bouain et al., 2014a). This observation further supports the implication of PHR1 in the regulation of expression of Pi-related genes under Zn limitation in *Arabidopsis* (Bouain et al., 2014b). It agrees with a report by Khan et al. (2014) showing the involvement of AtPHR1 in the cross-talk between Pi and Zn homeostasis. As aforementioned, PHR1 was already known as a major regulator of Pi deficiency signaling through its involvement in the PHR1-miR399-PHO2 regulatory pathway (Bari et al., 2006). However, this regulatory pathway is not involved in the over-accumulation of Pi in the shoot in response to Zn deficiency (Khan et al., 2014). The Zn-responsive signaling pathway in which PHR1 is involved thus remains to be elucidated. Khan et al. (2014) also identified two additional genes that are involved in the control of Pi accumulation in response to Zn deficiency, namely *PHO1* and its homolog *PHO1;H3*. *PHO1* is a well-characterized root-to-shoot Pi transporter (Hamburger et al., 2002). It is likely one of the final targets of the Zn-deficiency signaling pathway. Since its level of expression is unchanged in response to Zn deficiency, one favorite hypothesis is that its activity would be regulated through a protein-protein interaction, considering that a similar mechanism involving *PHO1* and *PHO2* has already been reported (Liu et al., 2012). The *PHO1;H3* gene appeared to be specifically and strongly induced by Zn deficiency (Khan et al., 2014). *PHO1;H3* constitutes thus an interesting entry point to study Pi-Zn crosstalk and the regulation of Pi transport under Zn limitation. A first model illustrating Pi-Zn crosstalk in plant has been proposed (Bouain et al., 2014b; Kisko et al., 2014). In the future, this model would benefit from an in depth characterization of the molecular mechanisms underlying the effect of Pi starvation on Zn nutrition, together with the effects of Zn deficiency on Pi nutrition. The identified and characterized key genes and mechanisms acting in the coordination of Pi and Zn transport and signaling in plants could help to point to specific mutants or genetic variants that could be used in breeding programs. Taken together, this knowledge should have important

consequences for both basic and applied research in agronomy and should be valuable to plant biologists, agronomists and breeders.

PHR1 as an Integrator of Multiple Nutrition Signals and Beyond

PHR1 was initially described as a major transcriptional regulator of Pi homeostasis. It activates the transcription of Pi deficiency responsive genes encoding Pi transporters (Rubio et al., 2001), as well as regulatory RNA (Fujii et al., 2005) and proteins involved in the post-transcriptional and post-translational regulation of these transporters, respectively (Aung et al., 2006; Bari et al., 2006; Liu et al., 2012; Figure 2). More recently, few reports indicated that PHR1 regulated also the expression of genes required for S, Fe, and Zn transport and homeostasis (Rouached et al., 2011a; Bournier et al., 2013; Khan et al., 2014), linking the metabolism of these nutrients to Pi nutrition (Figure 3). PHR1 is therefore the first molecular link common to various pathways controlling mineral nutrition of both macro- and micro-elements. It can be extended to some aspects of the control of plant response to water stress, for which AtPHL1 activity is required (Elfving et al., 2011). As mentioned above, in response to Pi starvation PHR1 controls the transcription of post-transcriptional and post-translational regulators such as miR399, IPS1, and PHO2 (Figure 2). Whether or not these PHR1-dependent regulators play a role in the regulation of S, Fe, or Zn metabolisms is unknown, and would deserve to be investigated. Furthermore, the requirement of PHR1 has been documented in the case of two by two interactions of only some of the elements considered: Pi and S, Pi and Fe, Pi and Zn but to our knowledge no reports mentioned a direct role of PHR1 in the Fe-S or Fe-Zn interactions.

PHR1 has been the most studied regulator of Pi deficiency response, but it is known that other regulators are involved. Among them TFs including WRKY75 (Devaiah et al., 2007a), ZAT6 (Devaiah et al., 2007b), MYB62 (Devaiah et al., 2009), PTF1 (Yi et al., 2005), bHLH32 (Chen et al., 2007), and WRKY45 (Wang et al., 2014b) have been reported. Furthermore, not only additional TFs have to be considered. In addition to the well-characterized role of miR399 in the regulation of Pi homeostasis in *Arabidopsis*, other miRNAs (miRNA778, miRNA827, and miRNA2111) were reported to be specifically and strongly induced in response to Pi starvation (Fujii et al., 2005; Hsieh et al., 2009; Pant et al., 2009). The role of these miRNA in the potential cross-talks between pathways regulating homeostasis of various mineral nutrients has already been suggested for miRNA82, involved in the cross-talk between Pi-limitation and nitrate-limitation signaling pathways affecting anthocyanin synthesis (Pant et al., 2009; Liu et al., 2014). Finally, chromatin modification could also be concerned through H2A.Z histone deposition *via* the nuclear actin-related protein ARP6 in order to activate the expression of many genes related to the Pi deficiency response (Smith et al., 2010).

Integration of pathways controlling two by two nutrient homeostasis has started to be documented. However a survey of transcriptome data reveals that the role played by PHR1 and PHL1 in these interactions could be wider (Figure 4). Indeed PHR1 and PHL1 control transcript accumulation of key genes of Fe homeostasis as well as genes whose expression is directly dependent on S or Pi availability. In consequence, a major challenge in the future will be to consider mineral nutrition as a system, and to develop tools enabling to model integrative gene networks

that will take into account the availability of a maximum of macro- and micro-elements, and their interactions, at a given time.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00290/abstract>

References

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15, 63–78. doi: 10.1105/tpc.006130
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C. H., Fujii, H., Zheng, X., et al. (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chem.* 281, 37636–37645. doi: 10.1074/jbc.M605895200
- Amtmann, A., and Armengaud, P. (2009). Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 275–283. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.014
- Arrivault, S., Senger, T., and Krämer, U. (2006). The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *Plant J.* 46, 861–879. doi: 10.1111/j.1365-3113.2006.02746.x
- Astolfi, S., Cesco, S., Zuchi, S., Neumann, G., and Roemheld, V. (2006). Sulphur starvation reduces phytosiderophore release by Fe-deficient barley plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 52, 80–85. doi: 10.1111/j.1747-0765.2006.00010.x
- Astolfi, S., Zuchi, S., Neumann, G., Cesco, S., Sanità di Toppi, L., and Pinton, R. (2012). Response of barley plants to Fe deficiency and Cd contamination as affected by S starvation. *J. Exp. Bot.* 63, 1241–1250. doi: 10.1093/jxb/err344
- Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Huang, Y. T., Su, C. L., and Chiou, T. J. (2006). pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol.* 141, 1000–1011. doi: 10.1104/pp.106.078063
- Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conejero, G., Curie, C., Friml, J., et al. (2011). Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 450–458. doi: 10.1073/pnas.1100659108
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M., and Scheible, W. R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* 141, 988–999. doi: 10.1104/pp.106.079707
- Bayle, V., Arrighi, J. F., Creff, A., Nespoulous, C., Vialaret, J., Rossignol, M., et al. (2011). *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell* 23, 1523–1535. doi: 10.1105/tpc.110.081067
- Becher, M., Talke, I. N., Krall, L., and Krämer, U. (2003). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J.* 37, 251–268. doi: 10.1046/j.1365-3113.2003.01959.x
- Belgaroui, N., Zaidi, I., Farhat, A., Chouayekh, H., Bouain, N., Chay, S., et al. (2014). Over-expression of the bacterial phytase US417 in *Arabidopsis* reduces the concentration of phytic acid and reveals its involvement in the regulation of sulfate and phosphate homeostasis and signaling. *Plant Cell Physiol.* 55, 1912–1924. doi: 10.1093/pcp/pcu122
- Berg, J. M., and Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271, 1081–1085. doi: 10.1126/science.271.5252.1081
- Bouain, N., Kisko, M., Rouached, A., Dauzat, M., Lacombe, B., Belgaroui, N., et al. (2014a). Phosphate/zinc interaction analysis in two lettuce varieties reveals contrasting effects on biomass, photosynthesis, and dynamics of Pi transport. *Biomed. Res. Int.* 2014, 548254. doi: 10.1155/2014/548254
- Bouain, N., Shahzad, Z., Rouached, A., Khan, G. A., Berthomieu, P., Abdely, C., et al. (2014b). Phosphate and zinc transport and signalling in plants: toward a better understanding of their homeostasis interaction. *J. Exp. Bot.* 65, 5725–5741. doi: 10.1093/jxb/eru314
- Bournier, M., Tissot, N., Mari, S., Boucherez, J., Lacombe, E., Briat, J. F., et al. (2013). *Arabidopsis* ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J. Biol. Chem.* 288, 22670–22680. doi: 10.1074/jbc.M113.482281
- Briat, J. F., Dubos, C., and Gaymard, F. (2014). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci.* 20, 33–40. doi: 10.1016/j.tplants.2014.07.005
- Briat, J. F., Duc, C., Ravet, K., and Gaymard, F. (2010a). Ferritins and iron storage in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 806–814. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.12.003
- Briat, J. F., Ravet, K., Arnaud, N., Duc, C., Boucherez, J., Touraine, B., et al. (2010b). New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann. Bot.* 105, 811–822. doi: 10.1093/aob/mcp128
- Buchner, P., Prosser, I., and Hawkesford, M. J. (2004). Phylogeny and expression of paralogous and orthologous sulphate transporter genes in diploid and hexaploid wheats. *Genome* 47, 526–534. doi: 10.1139/g04-011
- Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F., Puga, M. I., Rubio, V., Pérez-Pérez, J., et al. (2010). A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 6:e1001102. doi: 10.1371/journal.pgen.1001102
- Cakmak, I., and Marschner, H. (1986). Mechanism of phosphorus induced zinc deficiency in cotton. I. Zinc deficiency-enhanced uptake rate of phosphorus. *Physiol. Plant.* 68, 483–490. doi: 10.1111/j.1399-3054.1986.tb03386.x
- Charoensawan, V., Wilson, D., and Teichmann, S. A. (2010). Lineage-specific expansion of DNA-binding transcription factor families. *Trends Plant Sci.* 26, 388–393. doi: 10.1016/j.tig.2010.06.004
- Chen, Y., Chen, Z., Kang, J., Kang, D., Gu, H., and Qin, G. (2013). AtMYB14 regulates cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31, 87–97. doi: 10.1007/s11105-012-0481-z
- Chen, Z.-H., Nimmo, G. A., Jenkins, G. I., and Nimmo, H. G. (2007). BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* 405, 191–198.
- Chiou, T. J., Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Chiang, S. F., and Su, C. L. (2006). Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 412–421. doi: 10.1105/tpc.105.038943
- Ciaffi, M., Paolacci, A. R., Celletti, S., Catarcione, G., Kopriva, S., and Astolfi, S. (2013). Transcriptional and physiological changes in the S assimilation pathway due to single or combined S and Fe deprivation in durum wheat (*Triticum durum* L.) seedlings. *J. Exp. Bot.* 64, 1663–1675. doi: 10.1093/jxb/ert027
- Colangelo, E. P., and Guerinot, M. L. (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 322–330. doi: 10.1016/j.pbi.2006.03.015
- Coleman, J. E. (1998). Zinc enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 222–234. doi: 10.1016/S1367-5931(98)80064-1

- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., et al. (2005). A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr. Biol.* 15, 1196–1200. doi: 10.1016/j.cub.2005.05.048
- Connolly, E. L., Fett, J. P., and Guerinot, M. L. (2002). Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14, 1347–1357. doi: 10.1105/tpc.001263
- Conte, S. S., and Walker, E. L. (2011). Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol. Plant* 4, 464–476. doi: 10.1093/mp/ssp015
- Couturier, J., Touraine, B., Briat, J. F., Gaymard, F., and Rouhier, N. (2013). The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Front. Plant Sci.* 4:259. doi: 10.3389/fpls.2013.00259
- Cui, M. H., Yoo, K. S., Hyoung, S., Nguyen, H. T., Kim, Y. Y., Kim, H. J., et al. (2013). An *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factor, AtMYB20, negatively regulates type 2C serine/threonine protein phosphatases to enhance salt tolerance. *FEBS Lett.* 587, 1773–1778. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.028
- Cumbus, I. P., Hornsey, D. J., and Robinson, L. W. (1977). The influence of phosphorus, zinc and manganese on absorption and translocation of iron in watercress. *Plant Soil* 48, 651–660. doi: 10.1007/BF00145775
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., et al. (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann. Bot.* 103, 1–11. doi: 10.1093/aob/mcn207
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S. L., Briat, J. F., and Walker, E. L. (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. *Nature* 409, 346–349. doi: 10.1038/35053080
- Dekock, P. C., Hall, A., and Inkson, R. H. E. (1978). Active iron in plant leaves. *Ann. Bot.* 43, 737–740.
- Demidchik, V., and Maathuis, F. J. M. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol.* 175, 387–404. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x
- Devaiah, B. N., Karthikeyan, A. S., and Raghothama, K. G. (2007a). WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143, 1789–1801. doi: 10.1104/pp.106.093971
- Devaiah, B. N., Nagarajan, V. K., and Raghothama, K. G. (2007b). Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiol.* 145, 147–159. doi: 10.1104/pp.107.101691
- Devaiah, B. N., Madhuvanathi, R., Karthikeyan, A. S., and Raghothama, K. G. (2009). Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 2, 43–58. doi: 10.1093/mp/ssn081
- Du, H., Wang, Y. B., Xie, Y., Liang, Z., Jiang, S. J., Zhang, S. S., et al. (2013). Genome-wide identification and evolutionary and expression analyses of MYB-related genes in land plants. *DNA Res.* 20, 437–448. doi: 10.1093/dnares/dst021
- Dubos, C., Le Gourrierec, J., Baudry, A., Huet, G., Lanet, E., Debeaujon, I., et al. (2008). MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55, 940–953. doi: 10.1111/j.1365-3113.2008.03564.x
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 15, 573–581. doi: 10.1016/j.tplants.2010.06.005
- Elfving, N., Davoine, C., Benloch, R., Blomberg, J., Brännström, K., Müller, D., et al. (2011). The *Arabidopsis thaliana* Med25 mediator subunit integrates environmental cues to control plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 8245–8250. doi: 10.1073/pnas.1002981108
- Essigmann, B., Guler, S., Narang, R. A., Linke, D., and Benning, C. (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1950–1955. doi: 10.1073/pnas.95.4.1950
- Forieri, I., Wirtz, M., and Hell, R. (2013). Toward new perspectives on the interaction of iron and sulfur metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 4:357. doi: 10.3389/fpls.2013.00357
- Franco-Zorrilla, J. M., Gonzalez, E., Bustos, R., Linhares, F., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2004). The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Exp. Bot.* 55, 285–293. doi: 10.1093/jxb/erh009
- Franco-Zorrilla, J. M., Martín, A. C., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2005). Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol.* 138, 847–857. doi: 10.1104/pp.105.060517
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., et al. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* 39, 1033–1037. doi: 10.1038/ng2079
- Fujii, H., Chiou, T. J., Lin, S. I., Aung, K., and Zhu, J. K. (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 15, 2038–2043. doi: 10.1016/j.cub.2005.10.016
- Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., et al. (2011). iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 155, 1893–1907. doi: 10.1104/pp.110.169730
- Giehl, R. F., Meda, A. R., and von Wirén, N. (2009). Moving up, down, and everywhere: signaling of micronutrients in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 320–327. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.006
- Giehl, R. F., and von Wirén, N. (2014). Root nutrient foraging. *Plant Physiol.* 166, 509–517. doi: 10.1104/pp.114.245225
- Gojon, A., Nacry, P., and Davidian, J. C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 328–338. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.015
- Gruber, B. D., Giehl, R. F., Friedel, S., and von Wirén, N. (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 163, 161–179. doi: 10.1104/pp.113.218453
- Hamburger, D., Rezzonico, E., MacDonald-Comber Petétot, J., Somerville, C., and Poirier, Y. (2002). Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* 14, 889–902. doi: 10.1105/tpc.000745
- Hammond, J. P., Bennett, M. J., Bowen, H. C., Broadley, M. R., Eastwood, D. C., May, S. T., et al. (2003). Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol.* 132, 578–586. doi: 10.1104/pp.103.020941
- Hartel, H., Essigmann, B., Lokstein, H., Hoffmann-Benning, S., Peters-Kottig, M., and Benning, C. (1998). The phospholipid-deficient pho1 mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1415, 205–218. doi: 10.1016/S0005-2736(98)00197-7
- Haydon, M. J., and Cobbett, C. S. (2007). A novel major facilitator superfamily protein in the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143, 1705–1719. doi: 10.1104/pp.106.092015
- Haydon, M. J., Kawachi, M., Wirtz, M., Stefan, H., Hell, R., and Krämer, U. (2012). Vacuolar nicotianamine has critical and distinct roles under iron deficiency and for zinc sequestration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 724–737. doi: 10.1105/tpc.111.095042
- Hindt, M. N., and Guerinot, M. L. (2012). Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1521–1530. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.010
- Hirsch, J., Marin, E., Floriani, M., Chiarenza, S., Richaud, P., Nussaume, L., et al. (2006). Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. *Biochimie* 88, 1767–1771. doi: 10.1016/j.biochi.2006.05.007
- Hsieh, L. C., Lin, S. I., Shih, A. C., Chen, J. W., Lin, W. Y., Tseng, C. Y., et al. (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol.* 151, 2120–2132. doi: 10.1104/pp.109.147280
- Huang, C., Barker, S. J., Langridge, P., Smith, F. W., and Graham, R. D. (2000). Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and -deficient barley roots. *Plant Physiol.* 124, 415–422. doi: 10.1104/pp.124.1.415
- Huang, T. K., Han, C. L., Lin, S. I., Chen, Y. J., Tsai, Y. C., Chen, Y. R., et al. (2013). Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 25, 4044–4060. doi: 10.1105/tpc.113.115998
- Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., et al. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 1327–1339. doi: 10.1105/tpc.020487
- Ivanov, R., Brumbarova, T., and Bauer, P. (2012). Fitting into the harsh reality: regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. *Mol. Plant* 5, 27–42. doi: 10.1093/mp/ssp065
- Jaradat, M. R., Feurtado, J. A., Huang, D., Lu, Y., and Cutler, A. J. (2013). Multiple roles of the transcription factor AtMYB1/AtMYB44 in ABA signaling, stress responses, and leaf senescence. *BMC Plant Biol.* 13:192. doi: 10.1186/1471-2229-13-192

- Karthikeyan, A. S., Varadarajan, D. K., Mukatira, U. T., D'Urzo, M. P., Damsz, B., and Raghothama, K. G. (2002). Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol.* 130, 221–233. doi: 10.1104/pp.020007
- Kawashima, C. G., Yoshimoto, N., Maruyama-Nakashita, A., Tsuchiya, Y. N., Saito, K., Takahashi, H., et al. (2009). Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant J.* 57, 313–321. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03690.x
- Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T. J., Danku, J., Salt, D. E., and Amtmann, A. (2014). Analysis of the root system architecture of *Arabidopsis* provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals. *Plant Cell* 26, 1480–1496. doi: 10.1105/tpc.113.122101
- Kerke, L., Mukherjee, I., Chatterjee, L., Lahner, B., Salt, D. E., and Connolly, E. L. (2008). Iron-induced turnover of the *Arabidopsis* IRON-regulated transporter1 metal transporter requires lysine residues. *Plant Physiol.* 146, 1964–1973. doi: 10.1104/pp.107.113282
- Khan, G. A., Bouraine, S., Wege, S., Li, Y., de Carbonnel, M., Berthomieu, P., et al. (2014). Coordination between zinc and phosphate homeostasis involves the transcription factor PHR1, the phosphate exporter PHO1, and its homologue PHO1;H3 in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 65, 871–884. doi: 10.1093/jxb/ert444
- Kim, J. H., Nguyen, N. H., Jeong, C. Y., Nguyen, N. T., Hong, S. W., and Lee, H. (2013). Loss of the R2R3 MYB, AtMyb73, causes hyper-induction of the SOS1 and SOS3 genes in response to high salinity in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 170, 1461–1465. doi: 10.1016/j.jplph.2013.05.011
- Kisko, M., Bouain, N., Rouached, A., Choudhary, S. P., and Rouached, H. (2014). Molecular mechanisms of phosphate and zinc signaling crosstalk in plants: phosphate and zinc loading into root xylem in *Arabidopsis*. *Environ. Exp. Bot.* 114, 57–64. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.05.013
- Kobayashi, T., and Nishizawa, N. K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 131–152. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105522
- Kobayashi, T., and Nishizawa, N. K. (2014). Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Sci.* 224, 36–43. doi: 10.1016/j.plantsci.2014
- Kopriva, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Ann. Bot.* 97, 479–495. doi: 10.1093/aob/mcl006
- Krouk, G., Ruffel, S., Gutiérrez, R. A., Gojon, A., Crawford, N. M., Coruzzi, G. M., et al. (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Sci.* 16, 178–182. doi: 10.1016/j.tplants.2011.02.004
- Kuwajima, K., and Kawai, S. (1997). "Relationship between sulfur metabolism and biosynthesis of phytosiderophores in barley roots," in *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment. Developments in Plant and Soil Sciences*, Vol. 78, eds T. Ando, K. Fujita, T. Mae, H. Matsumoto, S. Mori, and J. Sekiya (Dordrech: Kluwer Academic Publishers), 285–286.
- 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
- Lapis-Gaza, H. R., Jost, R., and Finnegan, P. M. (2014). *Arabidopsis* PHOSPHATE TRANSPORTER1 genes PHT1; 8 and PHT1; 9 are involved in root-to-shoot translocation of orthophosphate. *BMC Plant Biol.* 14:334. doi: 10.1186/s12870-014-0334-z
- Lejay, L., Wirth, J., Pervent, M., Cross, J. M. F., Tillard, P., and Gojon, A. (2008). Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiol.* 146, 2036–2053. doi: 10.1104/pp.107.114710
- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J. A., and Davies, J. P. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 141–165. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.141
- Lipsick, J. S. (1996). One billion years of Myb. *Oncogene* 13, 223–235.
- Liu, T. Y., Chang, C. Y., and Chiou, T. J. (2009). The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 312–319. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.004
- Liu, T. Y., Huang, T. K., Tseng, C. Y., Lai, Y. S., Lin, S. I., Lin, W. Y., et al. (2012). PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 2168–2183. doi: 10.1105/tpc.112.096636
- Liu, T. Y., Lin, W. Y., Huang, T. K., and Chiou, T. J. (2014). MicroRNA-mediated surveillance of phosphate transporters on the move. *Trends Plant Sci.* 19, 647–655. doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.004
- Loneragan, J. K., Grunes, D. L., Welch, R. M., Aduayi, E. A., Tengah, A., Lazar, V. A., et al. (1982). Phosphorus accumulation and toxicity in leaves in relation to zinc supply. *Soil Sc. Soc. Am. J.* 46, 345–352. doi: 10.2136/sssaj1982.03615995004600020027x
- Long, T. A., Tsukagoshi, H., Busch, W., Lahner, B., Salt, D. E., and Benfey, P. N. (2010). The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 22, 2219–2236. doi: 10.1105/tpc.110.074096
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., Alatorre-Cobos, F., and Herrera-Estrella, L. (2013). Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 595–610. doi: 10.1387/ijdb.130268lh
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 250–258. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.003
- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic Press
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K., and Takahashi, H. (2006). *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulphur response and metabolism. *Plant Cell* 18, 3235–3251. doi: 10.1105/tpc.106.046458
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T., and Takahashi, H. (2004). A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *Plant J.* 38, 779–789. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02079.x
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., et al. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 1646–1667. doi: 10.1104/pp.126.4.1646
- Mathan, K. K., and Amberger, A. (1977). Influence of iron on the uptake of phosphorus by maize. *Plant Soil* 48, 413–422. doi: 10.1007/BF00010097
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., and Dietrich, R. (2003). The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2551–2565. doi: 10.1105/tpc.014167
- Misson, J., Raghothama, K. G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M. A., Bligny, R., et al. (2005). A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11934–11939. doi: 10.1073/pnas.0500778102
- Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A. S., Raghothama, K. G., et al. (2005). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7760–7765. doi: 10.1073/pnas.0500778102
- 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
- Moseley, J. L., Gonzalez-Ballester, D., Pootakham, W., Bailey, S., and Grossman, A. R. (2009). Genetic interactions between regulators of *Chlamydomonas phosphorus* and sulfur deprivation responses. *Genetics* 181, 889–905. doi: 10.1534/genetics.108.099382
- Mudge, S. R., Rae, A. L., Diatloff, E., and Smith, F. W. (2002). Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31, 341–353. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01356.x
- Müller, R., Morant, M., Jarmer, H., Nilsson, L., and Hamborg Nielsen, T. H. (2007). Genome-wide analysis of the *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiol.* 143, 156–171. doi: 10.1104/pp.106.090167
- Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Pochon, N., Ayadi, A., et al. (2011). Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. *Front. Plant Sci.* 2:83. doi: 10.3389/fpls.2011.00083
- Okumura, S., Mitsukawa, N., Shirano, Y., and Shibata, D. (1998). Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 5, 261–269. doi: 10.1093/dnares/5.5.261
- Osmont, K. S., Sibout, R., and Hardtke, C. S. (2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 93–113. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104006
- Palmer, C. M., Hindt, M. N., Schmidt, H., Clemens, S., and Guerinot M. L. (2013). MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet.* 9:e1003953. doi: 10.1371/journal.pgen.1003953
- Pant, B. D., Buhtz, A., Kehr, J., and Scheible, W. R. (2008). MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J.* 53, 731–738. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03363.x

- Pant, B. D., Musialak-Lange, M., Nuc, P., May, P., Buhtz, A., Kehr, J., et al. (2009). Identification of nutrient responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol.* 150, 1541–1555. doi: 10.1104/pp.109.139139
- Paolacci, A. R., Celletti, S., Catarcione, G., Hawkesford, M. J., Astolfi, S., and Ciaffi, M. (2014). Iron deprivation results in a rapid but not sustained increase of the expression of genes involved in iron metabolism and sulfate uptake in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings. *J. Integr. Plant Biol.* 56, 88–100. doi: 10.1111/jipb.12110
- Petit, J. M., van Wuytswinkel, O., Briat, J. F., and Lohréaux, S. (2001a). Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of AtFer1 and ZmFer1 plant ferritin genes by iron. *J. Biol. Chem.* 276, 5584–5590. doi: 10.1074/jbc.M005903200
- Petit, J. M., Briat, J. F., and Lohréaux, S. (2001b). Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochem. J.* 359, 575–582. doi: 10.1042/0264-6021:3590575
- Pilon, M., Cohu, C. M., Ravet, K., Abdel-Ghany, S. E., and Gaymard, F. (2009). Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 347–357. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.011
- Piñeros, M., and Kochian, L. (2003). Differences in whole-cell and single-channel ion currents across the plasma membrane of mesophyll cells from two closely related *Thlaspi* species. *Plant Physiol.* 131, 583–594. doi: 10.1104/pp.011932
- Poirier, Y., and Bucher, M. (2002). Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 1:e0024. doi: 10.1199/tab.0024
- Ravet, K., Rey, G., Arnaud, N., Krouk, G., Djouani, el-B., Boucherez, J., et al. (2012). Iron and ROS control of the DownStream mRNA decay pathway is essential for plant fitness. *EMBO J.* 31, 175–186. doi: 10.1038/emboj.2011.341
- Remy, E., Cabrito, T. R., Batista, R. A., Teixeira, M. C., Sá-Correia, I., and Duque, P. (2012). The Pht1; 9 and Pht1; 8 transporters mediate inorganic phosphate acquisition by the *Arabidopsis thaliana* root during phosphorus starvation. *New Phytol.* 195, 356–371. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04167.x
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., et al. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290, 2105–2110. doi: 10.1126/science.290.5499.2105
- Rouached, H. (2011). Multilevel coordination of phosphate and sulfate homeostasis in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 952–955. doi: 10.4161/psb.6.7.15318
- Rouached, H., Secco, D., and Arpat, A. B. (2009). Getting the most sulfate from soil: regulation of sulfate uptake transporters in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 166, 893–902. doi: 10.1016/j.jplph.2009.02.016
- Rouached, H., Secco, D., and Arpat, B. A. (2010). Regulation of ion homeostasis in plants: current approaches and future challenges. *Plant Signal. Behav.* 5, 501–502. doi: 10.4161/psb.11027
- Rouached, H., Secco, D., Arpat, A. B., and Poirier, Y. (2011a). The transcription factor PHR1 plays a key role in the regulation of sulfate shoot-to-root flux upon phosphate starvation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 11:19. doi: 10.1186/1471-2229-11-19
- Rouached, H., Stefanovic, A., Secco, D., Bulak Arpat, A., Gout, E., Bligny, R., et al. (2011b). Uncoupling phosphate deficiency from its major effects on growth and transcriptome via PHO1 expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 65, 557–570. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04442.x
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A. C., Iglesias, J., Leyva, A., et al. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15, 2122–2133. doi: 10.1101/gad.204401
- Savage, N., Yang, T. J., Chen, C. Y., Lin, K. L., Monk, N. A., and Schmidt, W. (2013). Positional signaling and expression of ENHANCER OF TRY AND CPC1 are tuned to increase root hair density in response to phosphate deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8:e75452. doi: 10.1371/journal.pone.0075452
- Schachtman, D. P., and Shin, R. (2007). Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 47–69. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103750
- Schuler, M., Keller, A., Backes, C., Philipp, K., Lenhof, H. P., and Bauer, P. (2011). Transcriptome analysis by GeneTrail revealed regulation of functional categories in response to alterations of iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 11:87. doi: 10.1186/1471-2229-11-87
- Schünmann, P. H., Richardson, A. E., Smith, F. W., and Delhaize, E. (2004a). Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 55, 855–865. doi: 10.1093/jxb/erh103
- Schünmann, P. H., Richardson, A. E., Vickers, C. E., and Delhaize, E. (2004b). Promoter analysis of the barley Pht1;1 phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 136, 4205–4214. doi: 10.1104/pp.104.045823
- Seo, P. J., Lee, S. B., Suh, M. C., Park, M. J., Go, Y. S., and Park, C. M. (2011). The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1138–1152. doi: 10.1105/tpc.111.083485
- Seo, P. J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J. Y., Lee, Y. N., Kim, S. G., et al. (2009). The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 275–289. doi: 10.1104/pp.109.144220
- Shanmugam, V., Lo, J. C., Wu, C. L., Wang, S. L., Lai, C. C., Connolly, E. L., et al. (2011). Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* — the role in zinc tolerance. *New Phytol.* 190, 125–137. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03606.x
- Shimogawara, K., Wykoff, D. D., Usuda, H., and Grossman, A. R. (1999). *Chlamydomonas reinhardtii* mutants abnormal in their responses to phosphorus deprivation. *Plant Physiol.* 120, 685–694. doi: 10.1104/pp.120.3.685
- Sinclair, S. A., and Krämer, U. (2012). The zinc homeostasis network of land plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1553–1567. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.016
- Smith, A., Jain, A., Deal, R., Nagarajan, V., Poling, M., Raghothama, K., et al. (2010). Histone H2A.Z regulates the expression of several classes of phosphate starvation response genes, but not as a transcriptional activator. *Plant Physiol.* 152, 217–225. doi: 10.1104/pp.109.145532
- Sresty, T. V. S., and Madhava Rao, K. V. (1999). Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeon pea. *Environ. Exp. Bot.* 41, 3–13. doi: 10.1016/S0098-8472(98)00034-3
- Su, C. F., Wang, Y. C., Hsieh, T. H., Lu, C. A., Tseng, T. H., and Yu, S. M. (2010). A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiol.* 153, 145–158. doi: 10.1104/pp.110.153015
- Sugimoto, K., Sato, N., and Tsuzuki, M. (2007). Utilization of a chloroplast membrane sulfolipid as a major internal sulfur source for protein synthesis in the early phase of sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 581, 4519–4522. doi: 10.1016/j.febslet.2007.08.035
- Stefanovic, A., Ribot, C., Rouached, H., Wang, Y., Chong, J., Belbahri, L., et al. (2007). Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant J.* 50, 982–994. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03108.x
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 447–456. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00199-0
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., et al. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genet.* 39, 792–796. doi: 10.1038/ng2041
- Takahashi, H. (2010). Regulation of sulfate transport and assimilation in plants. *Int. Rev. Cell. Mol. Bio.* 281, 129–159. doi: 10.1016/S1937-6448(10)81004-4
- Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F. W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M. J., and Saito, K. (2000). The role of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23, 171–182. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00768.x
- Takahashi, H., Yamazaki, M., Sasakura, N., Watanabe, A., Leustek, T., Engler, J. A., et al. (1997). Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11102–11107. doi: 10.1073/pnas.94.20.11102
- Thibaud, M. C., Arrighi, J. F., Bayle, V., Chiarenza, S., Creff, A., Bustos, R., et al. (2010). Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 64, 775–789. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04375.x
- Ticconi, C., Lucero, R., Sakhonwasee, S., Adamson, A., Creff, A., Nussaume, L., et al. (2009). ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14174–14179. doi: 10.1073/pnas.0901778106

- van de Mortel, J. E., Almar Villanueva, L., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P. D., et al. (2006). Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 142, 1127–1147. doi: 10.1104/pp.106.082073
- van de Mortel, J. E., Schat, H., Moerland, P. D., Ver Loren van Themaat, E., van der Ent, S., Blankestijn, H., et al. (2008). Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.* 31, 301–324. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01764.x
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., et al. (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett.* 576, 306–312. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.023
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J. F., et al. (2002). IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14, 1223–1233. doi: 10.1105/tpc.001388
- Vigani, G., Zocchi, G., Bashir, K., Philippar, K., and Briat, J. F. (2013). Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends Plant Sci.* 18, 305–311. doi: 10.1016/j.tplants.2013.01.006
- Wang, Z., Ruan, W., Shi, J., Zhang, L., Xiang, D., Yang, C., et al. (2014a). Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 14953–14958. doi: 10.1073/pnas.1404680111
- Wang, H., Xu, Q., Kong, Y. H., Chen, Y., Duan, J. Y., Wu, W. H., et al. (2014b). *Arabidopsis* WRKY45 transcription factor activates PHOSPHATE TRANSPORTER1; 1 expression in response to phosphate starvation. *Plant Physiol.* 164, 2020–2029. doi: 10.1104/pp.113.235077
- Ward, J. T., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D. E., and Raghothama, K. G. (2008). The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 147, 1181–1191. doi: 10.1104/pp.108.118562
- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y. Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H. S., et al. (2003). Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 47644–47653. doi: 10.1074/jbc.M309338200
- Woo, J., MacPherson, C. R., Liu, J., Wang, H., Kiba, T., Hannah, M. A., et al. (2012). The response and recovery of the *Arabidopsis thaliana* transcriptome to phosphate starvation. *BMC Plant Biol.* 12:62. doi: 10.1186/1471-2229-12-62
- Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F., et al. (2003). Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol.* 132, 1260–1271. doi: 10.1104/pp.103.021022
- Wykoff, D. D., Grossman, A. R., Weeks, D. P., Usuda, H., and Shimogawara, K. (1999). Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 15336–15341. doi: 10.1073/pnas.96.26.15336
- Xie, Z., Li, D., Wang, L., Sack, F. D., and Grotewold, E. (2010). Role of the stomatal development regulators FLP/MYB88 in abiotic stress responses. *Plant J.* 64, 731–739. doi: 10.1111/j.1365-3113.2010.04364.x
- Xu, Q., Chu, W., Qiu, H., Fu, Y., Cai, S., and Sha, S. (2013). Responses of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle to zinc: in situ localization, subcellular distribution and physiological and ultrastructural modifications. *Plant Physiol. Biochem.* 69, 43–48. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.04.018
- Yi, K., Wu, Z., Zhou, J., Du, L., Guo, L., Wu, Y., et al. (2005). OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiol.* 138, 2087–2096. doi: 10.1104/pp.105.063115
- Yu, B., Xu, C., and Benning, C. (2002). *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5732–5737. doi: 10.1073/pnas.082696499
- Zamioudis, C., Hanson, J., and Pieterse, C. M. (2014). β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* 204, 368–379. doi: 10.1111/nph.12980
- Zhai, H., Bai, X., Zhu, Y., Li, Y., Cai, H., Ji, W., et al. (2010). A single-repeat R3-MYB transcription factor MYBC1 negatively regulates freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 1018–1023. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.114
- Zhang, B., Pasini, R., Dan, H., Joshi, N., Zhao, Y., Leustek, T., et al. (2014). Aberrant gene expression in the *Arabidopsis* SULTR1; 2 mutants suggests a possible regulatory role for this sulfate transporter in response to sulfur nutrient status. *Plant J.* 77, 185–197. doi: 10.1111/tpj.12376
- Zhang, X., Ju, H. W., Chung, M. S., Huang, P., Ahn, S. J., and Kim C. S. (2011). The R-R-type MYB-like transcription factor, AtMYBL, is involved in promoting leaf senescence and modulates an abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 52, 138–148. doi: 10.1093/pcp/pcq180
- Zhou, J., Jiao, F., Wu, Z., Li, Y., Wang, X., He, X., et al. (2008). OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiol.* 146, 1673–1686. doi: 10.1104/pp.107.111443
- Zhu, Y. G., Smith, S. E., and Smith, F. A. (2001). Plant growth and cation composition of two cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in P uptake efficiency. *J. Exp. Bot.* 52, 1277–1282. doi: 10.1093/jexbot/52.359.1277
- Zuchi, S., Cesco, S., Varanini, Z., Pinton, R., and Astolfi, S. (2009). Sulphur deprivation limits Fe-deficiency responses in tomato plants. *Planta* 230, 85–94. doi: 10.1007/s00425-009-0919-1

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.

Copyright © 2015 Briat, Rouached, Tissot, Gaymard and Dubos. 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.

1 2

3

4

5

6

7 8

9

1

2

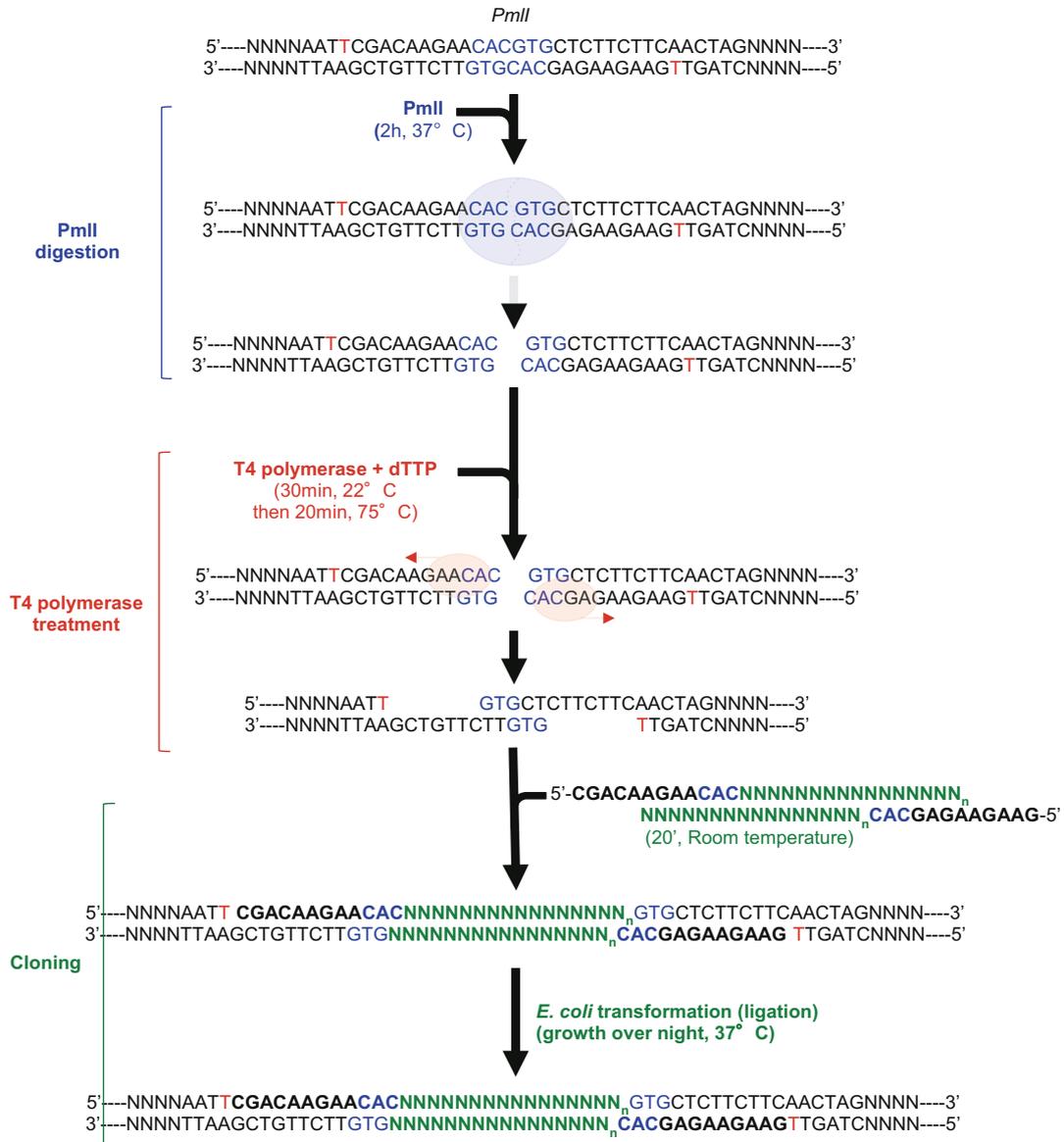
3.1

3

1

4

3.1



5

6

7

8

9

10

11

8

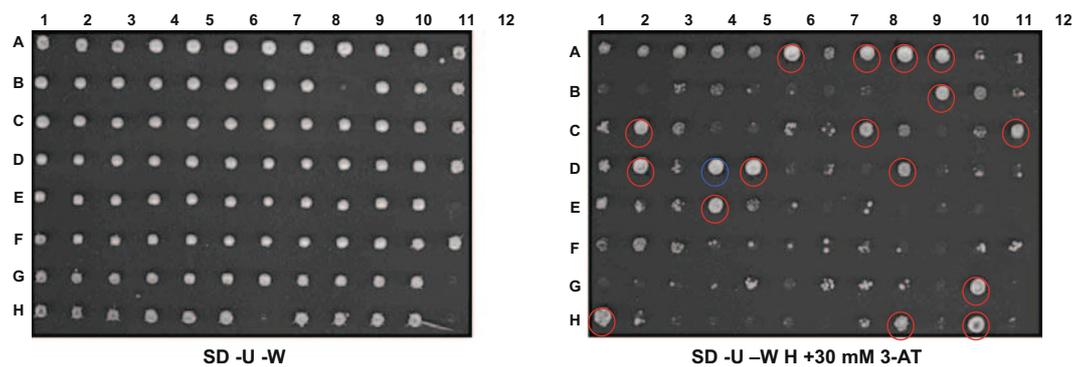
12

2

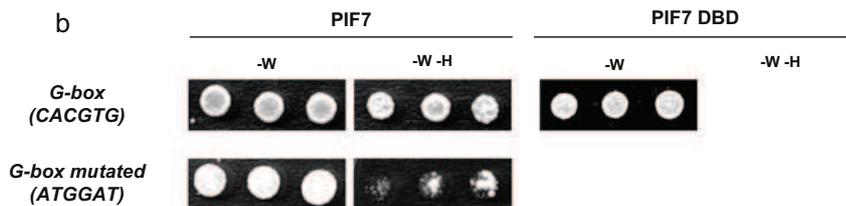
2

a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AtMYB030	AtMYB031	AtMYB060	AtMYB094	AtMYB096	AtMYB013	AtMYB014	AtMYB015	AtMYB058	AtMYB063	AtMYB003	AtMYB004
B	AtMYB007	AtMYB032	AtMYB123	AtMYB075	AtMYB090	AtMYB113	AtMYB114	AtMYB011		AtMYB111	AtMYB016	AtMYB017
C	AtMYB106	AtMYB009	AtMYB039	AtMYB107	AtMYB041	AtMYB074	AtMYB102	AtMYB028	AtMYB029	AtMYB034	AtMYB051	AtMYB076
D	AtMYB122	AtMYB050	AtMYB055	AtMYB061	AtMYB086	AtMYB036	AtMYB037	AtMYB038	AtMYB068	AtMYB084	AtMYB087	AtMYB000
E	AtMYB023	AtMYB066	AtMYB018	AtMYB019	AtMYB045	AtMYB033	AtMYB065	AtMYB081	AtMYB097	AtMYB101	AtMYB104	
F	AtMYB021	AtMYB024	AtMYB002	AtMYB062	AtMYB078	AtMYB108	AtMYB112	AtMYB116	AtMYB052	AtMYB054	AtMYB056	AtMYB069
G	AtMYB105	AtMYB110	AtMYB117	AtMYB044	AtMYB070	AtMYB073	AtMYB077	AtMYB001	AtMYB025	AtMYB109	AtMYB053	AtMYB092
H	AtMYB093	AtMYB022	AtMYB064	AtMYB100	AtMYB115	AtMYB118		AtMYB005	AtMYB026	AtMYB035	AtMYB046	AtMYB057



b



11

12

8

13

RESUME

Le fer (Fe) est un élément indispensable à la vie. Sa capacité à perdre ou à gagner un électron lui permet d'être un cofacteur de choix pour de nombreuses réactions enzymatiques telles que la photosynthèse, la synthèse d'ADN ou la respiration. Cependant, le fer est très réactif et potentiellement toxique pour la cellule. Les plantes doivent donc strictement réguler leur homéostasie en fer afin d'éviter toute carence ou tout excès préjudiciable pour leur organisme. Parmi les acteurs du maintien de l'équilibre ferrique, les ferritines jouent un rôle majeur. Chez les végétaux, elles sont principalement régulées transcriptionnellement. Le gène modèle des ferritines, *AtFER1*, est régulé par au moins trois voies indépendantes (l'excès de fer, la carence en phosphate, et l'alternance jour/nuit). Toutefois, la façon dont ces signaux s'intègrent au niveau de son promoteur n'est pas formellement établie.

Mon travail a consisté à mettre en place une étude fonctionnelle du promoteur d'*AtFER1* en caractérisant des lignées stables d'*Arabidopsis thaliana* exprimant le gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) sous le contrôle de différentes versions du promoteur d'*AtFER1* (délétions en 5' et en 3', mutagenèse dirigée) selon différents traitements (e.g. disponibilité en fer). Cette approche a mis en évidence le rôle clef de certains éléments *cis* du promoteur. Des cribles simple hybride chez la levure sur ces éléments ont permis l'identification du facteur de transcription bHLH105/ILR3 comme régulateur potentiel d'*AtFER1*. Une caractérisation moléculaire et physiologique des mutants *ilr3* a démontré l'implication de ce facteur dans la réponse des plantes à l'excès de fer. Elle a aussi mis en évidence qu'ILR3 avait un rôle central d'intégrateur dans l'homéostasie du fer chez les plantes. D'autre part, des données suggéraient qu'un long ARN non codant (*At5g01595*) pouvait potentiellement réguler *AtFER1*. Une caractérisation des mécanismes potentiellement impliqués a démontré que cette régulation n'était pas avérée.

Les mécanismes moléculaires et physiologiques mis en place par les végétaux en réponse à une carence en fer sont relativement bien décrits. A l'inverse, peu d'informations sur la réponse des plantes à un « excès » de fer sont disponibles. Dans ce contexte, une expérience visant à décrypter, au niveau du transcriptome (puces à ADN), la dynamique de la réponse précoce (de quelques minutes à 2 heures) à un excès de fer a été mise en place. Une analyse de variance a été réalisée sur les données d'expression générées afin d'identifier les gènes dont l'expression est affectée par le traitement. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'identification de facteurs de transcription, acteurs majeurs du maintien de l'homéostasie du fer. Parmi eux, *WRKY33*, *WRKY40*, *ZAT10* et *MYB51*, tous liés à la réponse au ROS, semblent avoir un rôle clé dans la réponse précoce au fer.

D'autre part, un mécanisme clé de l'homéostasie du fer est le prélèvement. Une précédente étude a montré que la nutrition en fer était facilitée par la synthèse et la sécrétion de composés phénoliques *via* le transporteur PDR9. Une caractérisation des mutants *pdr9* a permis d'établir que d'une part (i) ses composés pouvaient être stockés dans les vacuoles des cellules racinaires, et d'autre part (ii) qu'ils permettaient l'entrée de fer *via* le système de prélèvement gouverné par le mécanisme FRO2/IRT1.

Mes travaux de thèse ont permis d'apporter des éléments nouveaux sur les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis*.

Mots clés : homéostasie du fer, ferritine, ILR3, facteurs de transcription, PDR9, *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

Iron (Fe) is an essential micronutrient required for life. Since it can transfer electrons, Fe is a crucial cofactor for several enzymatic reactions such as photosynthesis, DNA synthesis or respiration. However, Fe is potentially toxic for the cells as it can react with oxygen and generate ROS (Reactive Oxygen Species). Therefore plants have evolved robust strategies to monitor Fe homeostasis in order to avoid Fe deficiency or excess that could be detrimental for their growth and development. Among the molecular actors involved in Fe homeostasis sensing, ferritins are central actors. In plants, ferritins are mainly transcriptionally regulated. *AtFER1* (model of ferritin genes in *Arabidopsis thaliana*) is regulated by at least three independent environmental pathways (Fe excess, phosphate deficiency and diurnal/circadian rhythms). However, how these environmental signals are integrated at *AtFER1* promoter remains elusive.

During my PhD, I have functionally characterized the *AtFER1* promoter in different growth conditions (i.e. Fe availability), using GUS as a reporter gene. This approach leads to the identification of specific *cis*-regulatory sequences within the *AtFER1* promoter. Yeast one-hybrid screens using these *cis*-regulatory elements allowed the identification of the transcription factor bHLH105/ILR3 as putative transcriptional regulator of *AtFER1* expression. In addition, molecular and physiological characterization of *ilr3* mutants (gain- and loss-of-function mutations) brought out the involvement of ILR3 in plant responses to Fe excess and confirmed that ILR3 is a central integrator of Fe homeostasis in plants. I have also investigated the potential role of a long non-coding RNA in controlling *AtFER1* expression. A deep characterization of the mechanisms potentially involved in this process demonstrated that this long non-coding RNA is most probably not involved in the control of *AtFER1* expression.

The molecular mechanisms by which plants face and adapt against Fe deficiency are well documented, however, very few data are available with regard to Fe excess. In this context, we set up a transcriptome analysis (microarrays) aiming at deciphering the dynamics of the early response (i.e. prior *AtFER1* expression is induced) to an excess of Fe in *A. thaliana*. An analysis of variance was performed on the expression data generated in order to identify genes whose expression is affected by the treatment. We particularly focused on the identification of transcription factors that are major players in the regulation of gene expression in response to Fe and ROS excess. Among them, *WRKY33*, *WRKY40*, *ZAT10* and *MYB51* have been identified.

Finally, I have been investigating the mode of action of PDR9, a transporter involved in the secretion of phenolic compounds in response to Fe deficiency. Through the characterization of *pdr9* mutants, I have shown that the secreted phenolic compounds (i) allow the entrance of Fe *via* the FRO2 / IRT1 mechanism and (ii) that these compounds are stored in the vacuoles of the root cells before secretion.

In conclusion, my PhD brings new elements on the molecular and physiological mechanisms involved in maintaining Fe homeostasis in *Arabidopsis*.

Key words: iron homeostasis, ferritin, ILR3, transcription factor, PDR9, *Arabidopsis thaliana*.