



HAL
open science

**Etude de mécanismes cellulaires et moléculaires
impliqués dans la réponse et l'adaptation d'Arabidopsis
à des stress métalliques : dynamique de modifications
post-traductionnelles au cours d'un stress cadmium et
effets de l'uranium sur le système racinaire**

Nelson Serre

► **To cite this version:**

Nelson Serre. Etude de mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse et l'adaptation d'Arabidopsis à des stress métalliques : dynamique de modifications post-traductionnelles au cours d'un stress cadmium et effets de l'uranium sur le système racinaire. Biologie végétale. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV019 . tel-02963885

HAL Id: tel-02963885

<https://theses.hal.science/tel-02963885>

Submitted on 12 Oct 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie Végétale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par **Nelson Serre**

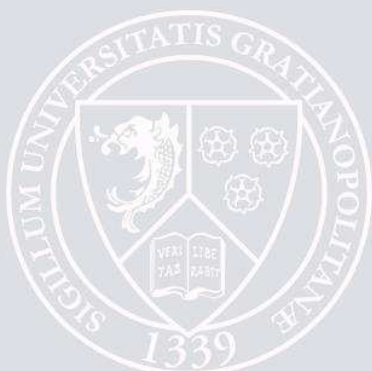
Thèse dirigée par Stéphane Ravanel et préparée au sein du
Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale dans l'École
Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Etude de mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse et l'adaptation d'*Arabidopsis* à des stress métalliques

Dynamique de modifications post-traductionnelles au
cours d'un stress métallique et effets de l'uranium sur le
système racinaire

Thèse soutenue publiquement le **10 octobre 2018**
devant le jury composé de :

Madame Virginie CHAPON	Rapporteur
Monsieur Marc HANIKENNE	Rapporteur
Monsieur Alexandre BERR	Examineur
Monsieur Grégory VERT	Examineur
Monsieur Stéphane RAVANEL	Directeur de thèse
Monsieur Thomas PFANNSCHMIDT	Président



Remerciements

Je tiens, dans un premier lieu, à remercier mon directeur de thèse, Stéphane Ravanel, pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet, pour sa patience face à mes innombrables doutes et questions, ainsi que pour m'avoir guidé à travers cette aventure.

Je remercie les membres de mon jury pour m'avoir fait l'honneur de juger mes travaux de thèse et les membres de mon comité de thèse pour leurs remarques constructives et leurs idées qui ont permis à ma thèse de s'effectuer dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie les membres du laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale pour les partages scientifiques et humains qui m'ont énormément apporté. Plus particulièrement, je remercie l'équipe 4.0 pour son accueil chaleureux, pour l'expertise scientifique et les conseils de Jacques sur le stress métallique ou ceux de Claude sur la biochimie et la méthylation des protéines ; Sylvie pour sa disponibilité, son aide et la qualité de ses cultures végétales ; Jacqueline, entre autres, pour m'avoir aidé dans la réalisation de mon premier gel d'acrylamide qui fût le premier d'une longue série ; Océane pour avoir mené un travail titanesque dans le criblage de mutants de méthyltransférases et Manon pour son travail acharné sur le mutant *sbs2* ainsi que pour son enthousiasme scientifique contagieux.

Plus que tout, je tiens à remercier mes parents pour leur soutien indéfectible dans tout ce que j'entreprends.

Finalement, je remercie la région Auvergne-Rhône-Alpes qui, à travers le financement de mes trois années de thèse, m'a permis de faire d'une passion un métier. Je remercie également la fondation Rovaltain et le programme de toxicologie du CEA pour avoir participé financièrement au fonctionnement de mes travaux.

Abréviations

ABA: acide abscissique

ACP : analyse en composantes principales

A. h.: *Arabidopsis halleri*

A. l.: *Arabidopsis lyrata*

A. th.: *Arabidopsis thaliana*

Ca : Calcium

CaM : calmoduline

Cd : Cadmium

CM : Control medium - Milieu contrôle

DEG : differentially expressed gene – gène exprimé différemment

ETR : electron transfer rate – taux de transfert des électrons dans la chaîne photosynthétique

Fe : Fer

ICP-MS : spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif

KDM : protéine lysine déméthylase

KMe3 : Lysine triméthylée

LP : Low Phosphate – milieu avec une faible concentration de phosphate

NP : No Phosphate – milieu ne contenant pas de phosphate

RNS : Reactive Nitrogen Species – espèces réactives de l'azote

NO : Nitric Oxide – oxyde nitrique

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MS: milieu de culture Murashige et Skoog

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

Pi : Phosphate inorganique

PKMT : Protéine lysine méthyltransférase

PRMT : Protéine arginine méthyltransférase

PTM : Post translational modification – modification post-traductionnelle

ROS : Reactive Oxygen Species – espèces réactives de l'oxygène

SBS : Seven Beta Strands

SDG : SET domain containing

SDS-PAGE: gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

U : Uranium

Zn : Zinc

Table des matières

Abréviations	
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
A. Nutrition minérale des végétaux	1
1. Les éléments minéraux essentiels.....	1
2. Rôle du phosphore, du fer et du zinc.....	2
3. Eléments non essentiels et toxiques	3
4. Notions de spéciation, biodisponibilité et réactivité chimique	4
5. Absorption et transport des minéraux du sol vers la plante	7
6. Hyperaccumulation et phytoremédiation d'éléments toxiques	10
a) Les plantes hyperaccumulatrices du genre <i>Arabidopsis</i>	10
b) La phytoextraction	11
B. Réponse aux stress et plasticité des végétaux	13
1. Les plantes face à l'environnement : organismes sessiles, stress et adaptation	13
2. Production et accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	14
a) Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	14
b) Espèces réactives de l'azote (RNS)	18
3. Notion de dose et d'hormèse.....	18
C. Mécanismes de signalisation et de réponse aux stress	19
1. Signalisation du stress.....	20
2. Régulation épigénétique de la réponse aux stress et modulation de la structure de la chromatine.....	21
3. Régulation transcriptionnelle de la réponse aux stress	23
4. Régulation post-transcriptionnelle de la réponse aux stress	25
5. Régulation traductionnelle de la réponse aux stress	27
6. Régulation post-traductionnelle de la réponse aux stress	28
D. Les modifications post-traductionnelles	29
1. Nature enzymatique ou non enzymatique des modifications post-traductionnelles	29
2. Les PTM participent à la sophistication des protéomes.....	30
3. La phosphorylation des protéines, une modification post-traductionnelle majeure	33
a) La diversité des réactions de phosphorylation des protéines	33
b) Les sérine/thréonine protéines kinases et phosphatases	34
c) Les tyrosines protéines kinases et phosphatases.....	44

d) Les histidines protéines kinases	45
4. La méthylation des protéines, une modification post-traductionnelle essentielle	46
a) Diversité des réactions de méthylation des protéines.....	46
b) La méthylation/déméthylation des arginines.....	51
c) La méthylation/déméthylation des lysines sur les protéines non-histones..	57
5. Modifications post-traductionnelles portées par des protéines histones.....	71
a) La méthylation des protéines histones	72
b) La phosphorylation des protéines histones.....	73
E. Développement du système racinaire et réponses aux stress abiotiques	74
1. Organisation et développement de la racine	74
2. L'auxine, une hormone essentielle à la régulation du développement racinaire	76
3. Réponses du système racinaire aux stress abiotiques.....	79
Objectifs de la thèse	81
Étude du rôle des modifications post-traductionnelles dans la réponse aux stress métalliques chez <i>Arabidopsis</i>	81
Caractérisation physiologique et cellulaire des effets de l'uranium sur l'architecture et le développement racinaire d' <i>A. thaliana</i>	83
Chapitre II : Matériels et Méthodes	
A. Matériel végétal et conditions de croissance	85
B. Extraction des protéines et immunoblots	86
C. Identification de protéines méthylées par spectrométrie de masse	86
D. Criblage de mutants de protéines lysine méthyltransférases pour leur tolérance au cadmium.....	88
1. Génotypage des mutants d'insertion d' <i>A. thaliana</i>	88
2. Conditions de criblage	90
3. Conception et sélection de lignées surexprimant le gène SBS2	91
E. Clonage, expression et purification de protéines recombinantes.....	92
1. Clonage et expression des protéines	92
2. Purification des protéines	93
F. Production d'un sérum dirigé contre la protéine SBS2	93
G. Tests de méthylation de TRXm1 par PPKMT1	94
H. Mesures des paramètres photosynthétiques et quantification des pigments foliaires.....	94
I. Quantification de l'uranium, du phosphate, du phosphore et du fer.....	95
J. Techniques de marquages cellulaires	96
K. Microscopie.....	98

L. Analyses statistiques et graphiques.....	98
Chapitre III : Étude du rôle des modifications post-traductionnelles dans la réponse aux stress métalliques chez <i>Arabidopsis</i>	
.....	
A. Rôle de la méthylation des protéines dans la réponse aux éléments traces métalliques	99
1) Étude des profils de méthylation des protéines	99
2) Identification de protéines lysine méthylées pas MS/MS	102
3) Étude de l'expression des gènes liés à la méthylation et à la déméthylation des résidus lysines	107
a) Construction de la banque de gènes.....	107
b) Expression des gènes liés à la méthylation des lysines lors de stress induits par le cadmium ou l'uranium chez <i>A. thaliana</i>	112
c) Études de l'expression des gènes liés aux phénomènes de méthylation des lysines chez 2 populations métallicoles d' <i>A. halleri</i> exposées au cadmium	117
B. Rôle des PKMT dans la réponse à un stress induit par un élément trace métallique	120
1. Création d'une collection de mutants de PKMT	120
2. Criblage de mutants de protéines lysine méthyltransférases pour leur tolérance à des éléments traces métalliques	121
a) Limitations dans la mise en place d'un criblage pour l'analyse de la tolérance à l'uranium	122
b) Criblage de mutants de PKMT pour leur tolérance au cadmium : méthode par semis direct sur milieu sélectif	123
c) Caractérisation du mutant <i>ppkmt1</i>	123
d) Criblage de mutant de PKMT pour leur tolérance au cadmium : méthode par transfert sur milieu sélectif	127
3. Caractérisation du mutant <i>camkmt1</i>	131
4. Caractérisation de la méthyltransférase SBS2	133
a) Validation de la sensibilité au Cd associée à la mutation du gène <i>SBS2</i> .	133
b) Caractérisation du mutant <i>sbs2</i>	135
c) Caractérisation de la protéine SBS2	138
5. Conclusion et perspectives.....	141
C. Rôle de la phosphorylation des protéines	143
1. Étude des profils de phosphorylation des protéines	143
2. Étude de l'expression des gènes liés à la phosphorylation	145
a) Etude de l'expression des gènes liés à la phosphorylation chez <i>Arabidopsis thaliana</i> lors de stress induits par le cadmium ou l'uranium	146

b) Étude de l'expression des gènes liés à la phosphorylation chez deux populations métallicoles d' <i>A. halleri</i> exposées au Cd	155
3. Conclusion.....	161
Chapitre IV : Caractérisation physiologique et cellulaire des effets de l'uranium sur l'architecture et le développement racinaire d'<i>A. thaliana</i>	
A. Mise au point des conditions d'étude.....	162
1. Développement d'un système hydroponique adapté à l'étude de plantules : μ Ponics	164
2. Effet de l'uranium sur la viabilité cellulaire.....	165
3. Caractérisation des milieux de culture : dosages du Pi et de l'U	167
B. Effet de l'uranium sur le cycle cellulaire.....	172
C. Effet de l'uranium sur l'homéostasie du phosphore et du fer	173
1. Homéostasie de l'uranium et du phosphore.....	173
2. Homéostasie du fer	174
D. Effet de l'uranium sur la synthèse et l'accumulation d'espèce réactives de l'oxygène et d'oxyde nitrique	176
E. Effet de l'uranium sur la synthèse et accumulation de polymères de défense : callose et lignine.....	178
F. Perturbation de l'homéostasie de l'auxine par l'uranium	180
G. Discussion et conclusion	182
Annexes	
Annexe I.....	189
Annexe II.....	192
Annexe III.....	193
Annexe IV.. ..	194
Table des figures	195
Table des tableaux	200
Références	201
Publications et Présentations	222
Abstract	222
Résumé	223

Chapitre I

Synthèse bibliographique

A. Nutrition minérale des végétaux

1. Les éléments minéraux essentiels

Le transfert d'éléments chimiques du sol aux plantes est un processus fondamental qui permet la vie sur Terre (Verbruggen and Hermans 2013). Les plantes absorbent une partie des éléments présents dans le sol qui les entoure. Sur les 118 éléments du tableau périodique seuls 14 sont indispensables pour la croissance des végétaux et sont appelés nutriments essentiels. Pour être considéré comme tel, un élément doit remplir les critères suivants (Kirkby 2012): 1/ la plante ne doit pas être à même de compléter son cycle de vie si l'élément n'est pas présent, 2/ la fonction de l'élément ne doit pas être remplaçable par un autre élément, 3/ l'élément doit être directement impliqué dans le métabolisme.

Parmi les nutriments essentiels on distingue les macroéléments et les microéléments. Les macroéléments sont retrouvés dans la plante dans des concentrations de l'ordre du mM tandis que les microéléments sont retrouvés dans des concentrations de l'ordre du μM (Tableau 1).

Tableau 1. Liste et classification des nutriments essentiels chez les végétaux. Les 14 nutriments essentiels sont divisés entre les macroéléments et les micronutriments. Données pour l'espèce *A. thaliana* extraites de Maathuis and Diatloff (2013) et Jones (2013).

Macroélément	Concentration	Microélément	Concentration
Azote (N)	70 mM	Chlore (Cl)	190 μM
Potassium (K)	17 mM	Bore (B)	120 μM
Calcium (Ca)	8 mM	Fer (Fe)	120 μM
Magnésium (Mg)	5 mM	Manganèse (Mn)	60 μM
Phosphore (P)	4 mM	Zinc (Zn)	20 μM
Soufre (S)	2 mM	Cuivre (Cu)	6 μM
		Molybdène (Mo)	70 nM
		Nickel (Ni)	6 nM

En fonction de leur concentration, ces minéraux peuvent être en excès ou en carence dans le sol et la plante. C'est particulièrement le cas en ce qui concerne les microéléments qui doivent être maintenus à des concentrations de l'ordre du μM dans la plante (Baxter *et al.* 2012). L'excès de ces éléments peut rapidement provoquer des perturbations du métabolisme et des effets négatifs sur le développement de la plante (da Silva Lobato *et al.* 2016). C'est pourquoi les plantes ont développé des transporteurs sélectifs de certains ions qui sont associés à des boucles de régulation négative en cas d'excès de nutriments (Haydon, Bell, and Webb 2011). Lorsque ces mécanismes ne suffisent plus à contenir un excès ou une carence en minéraux, la plante subit un stress (voir partie B).

2. Rôle du phosphore, du fer et du zinc

Le phosphore (P) n'existe pas sous sa forme élémentaire dans la nature mais majoritairement sous des formes de phosphates (Pi). Les Pi sont des formes de P combinées à de l'oxygène, telles que PO_4^{3-} ou encore $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, qui est une des formes absorbables par les plantes (Maathuis and Diatloff 2013). Cet élément a un rôle fondamental chez la plante et dans le vivant car il entre dans la composition des nucléotides, dont l'adénosine triphosphate (ATP), la monnaie énergétique du vivant (Jones 2013). Il entre également dans la composition de la tête hydrophile des phospholipides qui constituent les bicouches lipidiques des membranes plasmiques (Nakamura 2013). D'autre part, les Pi sont à la fois substrat et régulateur de la photosynthèse et la respiration (Maathuis and Diatloff 2013). Pour finir, les Pi jouent un rôle essentiel dans les cascades de signalisation chez les végétaux au travers des événements post-traductionnelles de phosphorylation et déphosphorylation des protéines (voir partie C.1 ; D.3 et chapitre II C.).

Le fer (Fe) est principalement retrouvé sous la forme insoluble Fe^{3+} dans le sol. Les plantes ont donc développé des mécanismes d'absorption du Fe requérant la chélation ou la solubilisation du Fe par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (Maathuis and Diatloff 2013). Le Fe est un élément limitant la croissance des plantes car il est essentiel au transport des électrons dans la chaîne photosynthétique (Ravet *et al.* 2009). La majorité du Fe absorbé par les plantes est retrouvé au niveau des feuilles qui contiennent les chloroplastes (80 % du Fe dans la plante), le siège de la photosynthèse. L'homéostasie de cet élément est régulée de façon très précise grâce à des protéines complexant le métal, telle que la ferritine (Ravet *et al.* 2009 ; Briat *et al.* 2010 ; Reyt *et al.* 2015). Cette complexation est essentielle car le Fe peut participer à la production de ROS via le cycle de Fenton (voir partie B. 2).

Au contraire du Fe, le zinc (Zn) n'est pas sujet à des changements d'état oxydatif et est retrouvé sous forme Zn^{2+} dans la plante (Maathuis and Diatloff 2013). Ce métal n'a pas activité oxydo-réductrice, ce qui le rend propre à interagir avec des macromolécules sensibles comme les protéines ou l'ADN (Sinclair and Krämer 2012). C'est pour cette raison qu'il est essentiel comme cofacteur structural ou catalytique de facteurs de transcription et autres enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Par exemple, les facteurs de transcription à doigt de Zn contiennent un ion Zn^{2+} et sont capables de reconnaître spécifiquement une séquence d'ADN afin de contrôler l'expression des gènes (Takatsuji 1998).

3. Eléments non essentiels et toxiques

Certains éléments présents dans le sol ne sont pas essentiels au développement de la plante. C'est le cas de certains éléments traces métalliques (ETM) tels que l'uranium (U) ou le cadmium (Cd) qui sont naturellement présents en faibles quantités dans la croûte terrestre.

Les causes majeures de pollution par le Cd sont le résultat d'activités anthropiques, telles que l'extraction de Zn du sol et l'amendement d'intrants dans l'agriculture. Ces observations soulèvent l'opinion publique car une concentration de 10 mg de Cd par kg de sol constitue déjà une menace pour les écosystèmes (Tóth *et al.* 2016). Le fait que cette pollution soit répandue à travers le globe et le risque de contamination de la chaîne alimentaire associé positionne le Cd à la 7^{ème} place sur la liste des substances à risque établie par l'Agence des substances toxiques et des maladies (ATSDR 2017). De plus, le Cd n'a pas de rôle connue dans le monde du vivant excepté chez la diatomée marine où le métal peut, dans certaines conditions, participer à l'acquisition du carbone (Lane and Morel 2000). Chez l'Homme, l'exposition chronique au Cd peut mener au développement de maladies graves associées aux reins, au système respiratoire, au système reproducteur ou encore à la structure des os (pour revue, voir Godt *et al.* 2006).

L'U est un ETM non essentiel mais également un radionucléide. Les activités anthropogéniques ont participé à l'augmentation des concentrations d'U dans les sols (Bigalke *et al.* 2018) et les eaux (Coyte *et al.* 2018). Ces activités sont principalement représentées par l'extraction d'U, l'exploitation du Pi et la fertilisation des terres arables avec du Pi (Schnug and Lottermoser 2013). En effet, les engrais phosphatés peuvent contenir de grandes quantités d'U à cause de la forte affinité du radionucléide pour le Pi. L'accumulation de l'U dans le sol et l'eau augmente le risque d'accumulation dans les tissus végétaux et par conséquent le risque de contamination de la chaîne alimentaire (pour revue, voir Anke *et al.* 2009). En effet, l'U ingéré par les humains provient à 33% des végétaux, ce qui constitue la deuxième source d'U après l'eau potable (Anke *et al.* 2009). L'exposition chronique peut mener à de nombreuses pathologies chez l'Homme allant de maladies des reins (pour revue, voir Vicente-Vicente *et al.* 2010), des os (Vidaud *et al.* 2012), à des effets sur le cerveau (Tournier *et al.* 2009) en passant par des effets génotoxiques (Thiebault *et al.* 2007).

4. Notions de spéciation, biodisponibilité et réactivité chimique

La spéciation d'un métal représente l'ensemble des formes chimiques et physiques de l'élément dans un environnement donné. Les formes chimiques comprennent l'état d'oxydation, la charge, la proportion et nature des formes complexées. Les formes physiques sont déterminées par la répartition dans les différentes phases du sol (solubles/solides ; Menager, 2009). La spéciation d'un métal dans un milieu donné influence sa solubilité, son taux de précipitation, son équilibre acido-basique, les possibles réactions de transfert d'électrons, sa diffusion et sa réactivité. La spéciation dépend, de façon non exhaustive, de paramètres tels que la nature géologique du sol, la température, la pression ou encore le pH (Gupta *et al.* 2013).

Tous ces éléments sont des facteurs clés qui définissent la biodisponibilité d'un métal pour les organismes mais surtout son activité biologique une fois dans l'organisme (Álvarez-Fernandez *et al.* 2014). Un élément, qu'il soit toxique ou essentiel, est dit biodisponible lorsqu'il est présent dans la zone d'absorption des racines sous une forme directement absorbable.

Les métaux sous leurs formes ioniques sont considérés comme des acides de Lewis. En 1963, Ralph G. Pearson (Pearson 1963) expose sa théorie « Hard and soft acids and basis » qui reprend la classification de Lewis. Cette théorie classe les ions métalliques en 3 catégories de réactivité chimique : acides ou bases durs, mous et intermédiaires (Tableau 2).

). Les acides durs s'associent préférentiellement avec des bases dures par des interactions ioniques. Par exemple, l'ion uranyle UO_2^{2+} est capable de former des complexes avec les ions orthophosphates PO_4^- . Les acides mous interagissent préférentiellement avec des bases molles par des interactions covalentes. Par exemple, le Cd^{2+} est capable de former des liaisons covalentes avec des molécules contenant des fonctions thiols. Les acides intermédiaires peuvent à la fois réagir avec des bases dures ou molles (Menager *et al.* 2009). À noter que certains métaux sont classés dans différentes catégories selon leur degré d'oxydation, reflétant l'importance de la spéciation dans leur réactivité chimique.

Tableau 2. Classification des acides et bases de Lewis selon Pearson. *R représente une molécule organique. Données adaptées de Pearson (1969).

	Durs	Intermédiaires	Mous
Acides	H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Al ³⁺ , Sc ³⁺ , Ga ³⁺ , La ³⁺ , Cr ³⁺ , Co ³⁺ , Fe ³⁺ , As ³⁺ , Ir ³⁺ , Si ⁴⁺ , Ti ⁴⁺ , Zr ⁴⁺ , Th ⁴⁺ , Pu ⁴⁺ , UO ₂ ²⁺	Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Tl ⁺ , Hg ⁺ , Cs ⁺ , Pd ²⁺ , Cd ²⁺ , Pt ²⁺ , Hg ²⁺
Bases	H ₂ O, OH ⁻ , *RCO ₂ ⁻ , PO ₄ ⁻ , SO ₄ , CO ₃ ²⁻ , *ROH, NH ₃ , *RNH ₂	Cl ⁻ , imidazole	*R ₂ S, *RSH, *RS ⁻ , I ⁻

Spéciation, biodisponibilité et réactivité sont donc étroitement liées et définissent l'activité biologique et la toxicité éventuelle d'un métal (Figure 1). C'est particulièrement le cas pour l'U, dont la spéciation est fortement influencée par le pH et la présence de ligands, tels que le Pi, le carbonate ou le citrate (Figure 2A, Laurette *et al.* 2012a). En effet, les modélisations de spéciation chimique effectuées dans cette étude ont montré que l'U n'est présent sous forme libre qu'en très faibles proportions et seulement à pH acide (< 5). De plus, les modélisations avec ajout de carbonate, Pi ou citrate illustrent la nature de l'U comme métal dur. Lorsque qu'un de ces ligands est ajouté au milieu, l'U est principalement retrouvé sous forme complexée avec le ligand en question. Dans cette étude des dosages par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) ont permis de montrer que la spéciation influence l'absorption de l'U (Figure 2B, Laurette *et al.* 2012a). Dans un milieu de culture de référence, à pH 4 ou 7, ou en présence de carbonate, à pH 4, l'U est principalement retrouvé dans les tissus racinaires et est très peu transloqué vers les feuilles. Lorsque le pH est augmenté à 7 en présence de carbonate ou, quel que soit le pH, en présence de citrate, le scenario est inversé avec une forte translocation du métal des racines vers les feuilles. Finalement, lorsqu'une forte concentration de phosphate est présente dans le milieu, l'U est principalement adsorbé au niveau de la surface des racines.

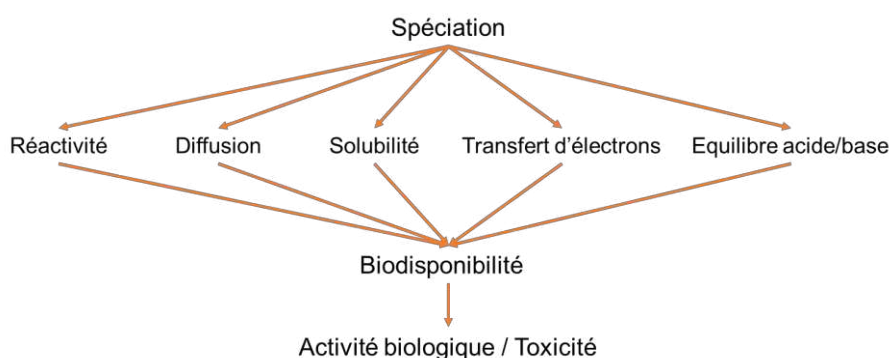


Figure 1. Liens entre spéciation, biodisponibilité et activité biologique d'un élément trace métallique.

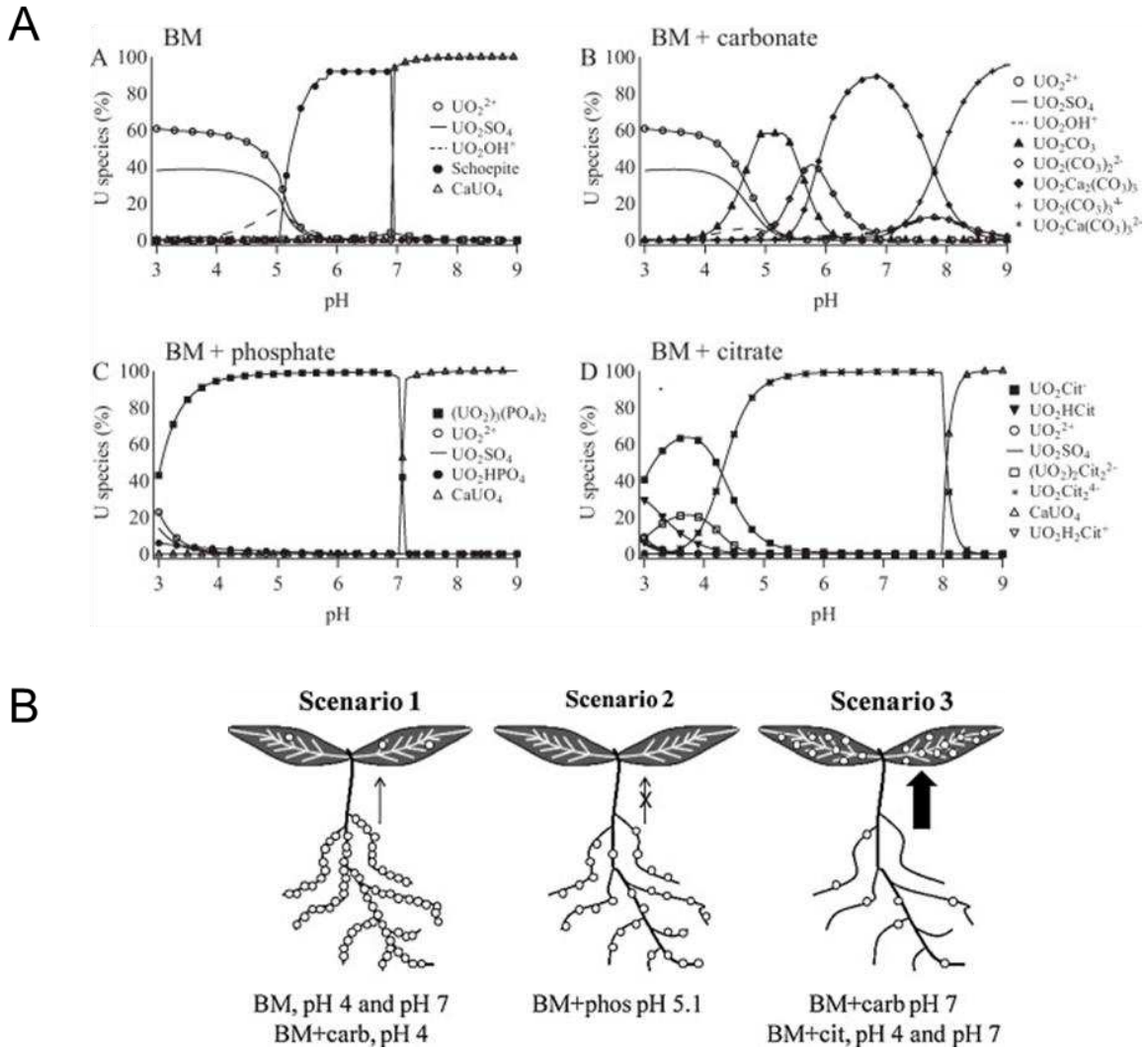


Figure 2. Spéciation de l'U et bioaccumulation. Figure issue de Laurette *et al.* (2012). (A) Spéciation de l'U en fonction du pH et de l'ajout de phosphate, carbonate ou citrate. (B) Modèles d'absorption de l'U. BM : Basic Medium, milieu de référence utilisé dans cette étude. Carb : carbonate. Cit : citrate. Phos : phosphate

5. Absorption et transport des minéraux du sol vers la plante

L'absorption des minéraux se fait principalement au niveau des poils absorbants et de l'épiderme racinaire (Figure 3A). Les solutés de petit poids moléculaire, tels que les ions, sont capables de diffuser passivement à travers la paroi cellulaire qui constitue la première barrière face aux éléments non essentiels au développement de la plante. En effet, les parois cellulaires sont constituées d'un enchevêtrement de polymères complexes, telles que la lignine et la pectine, qui permettent de fixer certains ions et molécules. Certains ETM toxiques, comme le Cd (Figure 3B ; Krzesłowska 2011) ou l'U, sont retrouvés dans les parois des cellules racinaires où ils peuvent former des précipités (Figure 3C ; Laurette *et al.* 2012a).

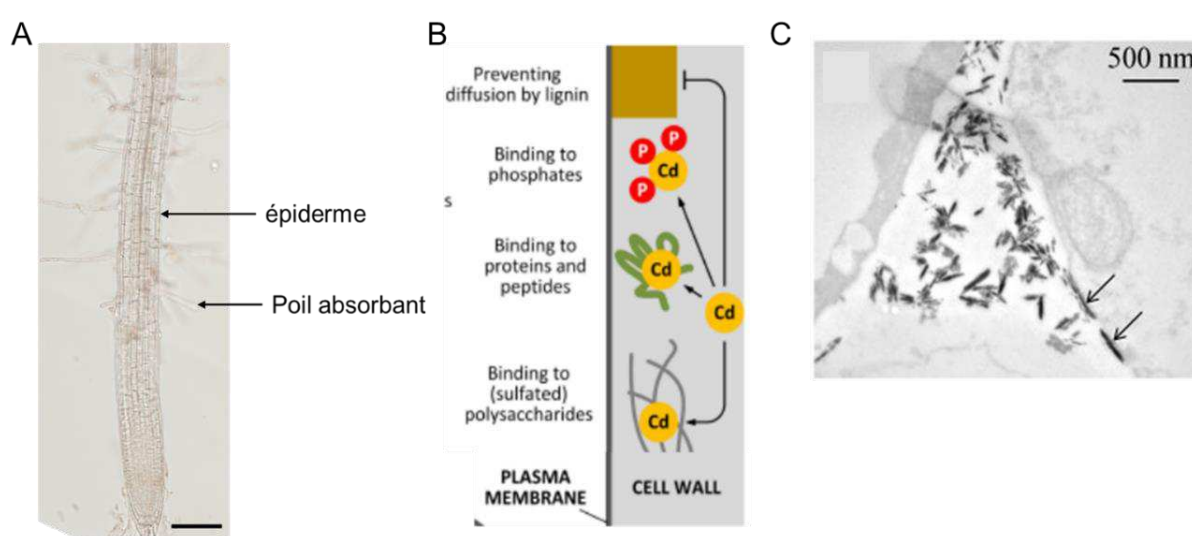


Figure 3. Absorption des nutriments et paroi cellulaire. (A) Racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* observée en microscopie optique. Barre : 100 μm . (B) Fixation de Cd dans la paroi cellulaire. Figure adaptée de Parrota (2015). (C) Observation en microscopie électronique de racines de tournesol exposées à l'U pendant 72 heures. Figure adaptée de Laurette *et al.* (2012a).

Néanmoins, certains ions présents en grande quantités ou n'étant pas bien fixés par les composants des parois sont capables de diffuser dans les premières couches cellulaires des racines. Ces ions peuvent diffuser librement dans les parois des cellules de l'épiderme et du cortex. Cette voie de transfert radial des éléments est appelée la voie apoplastique (Figure 4). La troisième file cellulaire dans la racine d'*A. thaliana*, l'endoderme, constitue une deuxième barrière aux solutés non désirés car dans les parois des cellules de ce tissu on retrouve une accumulation de suber et de lignine, des polymères très imperméables qui constituent les bandes de Caspari (Andersen *et al.* 2015). Il est important de noter que l'imperméabilité apoplastique de l'endoderme n'est pas équivalente tout le long de l'axe racinaire (White 2012) et ce, plus particulièrement au niveau de l'apex racinaire où les bandes de Caspari ne sont pas encore formées (Andersen *et al.* 2015). Ce phénomène rend l'apex racinaire

particulièrement sensible aux éléments toxiques du sol et explique pourquoi c'est une des premières zones touchées par les éléments non essentiels toxiques (Dinneny *et al.* 2008).

L'autre voie de transfert radial des éléments est appelée voie symplasmique, elle permet de faire passer les ions des parois aux cytoplasmes. Afin d'atteindre le cytoplasme, les ions doivent être pris en charge par des transporteurs sélectifs qui leur permettent de traverser la membrane plasmique. Ces derniers constituent la barrière la plus sélective aux éléments toxiques. Cette voie permet aux ions sélectionnés de passer de cellule en cellule par les connexions symplasmiques appelées plasmodesmes et ce jusqu'aux bandes de Caspary des cellules de l'endoderme et d'atteindre les vaisseaux du xylème (Figure 4). Les ions peuvent emprunter la voie symplasmique au niveau des poils absorbants et de l'épiderme, du cortex ou de l'endoderme.

Après avoir été transporté de façon radiale dans les tissus racinaires, les ions sont chargés dans le xylème. Cette étape constitue la dernière barrière aux ions non désirés et requiert également des transporteurs sélectifs. Certains ions peuvent être complexés à des molécules afin qu'ils ne soient pas toxiques lors du transport. Par exemple, le Fe est complexé aux acides organiques nicotianamine ou citrate pour maintenir sa solubilité et éviter qu'il n'entre dans la formation de ROS par réaction de Fenton (Kim and Guerinot 2007). Une fois dans le xylème les ions peuvent être distribués au reste de la plante (Figure 4).

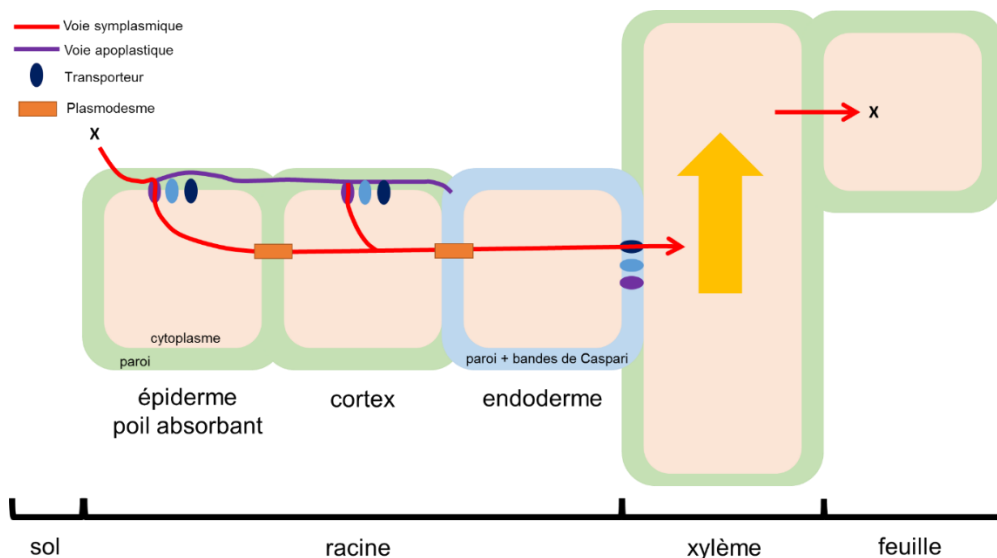


Figure 4. Transport des éléments dans les racines et vers les feuilles. Les voies symplasmique et apoplastique assurant le transfert radial des éléments dans le cylindre racinaire sont présentées en rouge et violet, respectivement.

Les transporteurs de nutriments essentiels ont une sélectivité imparfaite et un élément non essentiel peut partager certaines propriétés chimiques et/ou physiques avec un élément essentiel. Pour ces deux raisons il peut exister une compétition entre un élément essentiel et un non essentiel pour un même transporteur (Clemens and Ma 2016). Le transport de l'U au sein de la plante implique des mécanismes qui sont encore inconnus. L'U perturbe l'homéostasie et l'expression des gènes liés à l'absorption du Fe, tel que le transporteur *IRT1* (Doustaly *et al.* 2014). Néanmoins, Berthet *et al.* (2018) ont montré que l'U n'emprunte pas le transporteur de haute affinité pour le Fe *IRT1* pour entrer dans les tissus racinaires. Le transporteur *IRT1* est situé au niveau de la membrane plasmique des cellules et permet principalement l'absorption de Fe mais aussi d'éléments comme le manganèse, le Zn ou le Cd (Korshunova *et al.* 1999). Ce transporteur fait partie de la famille de transporteurs ZIP qui assure le transport d'ions métalliques divalents (Barberon *et al.* 2014). Le Cd peut également être transporté par des transporteurs de Zn et de calcium (Ca) (Mendoza-Cózatl *et al.* 2011; Baliardini *et al.* 2015). Au niveau du chargement du xylème, le principal transporteur de Cd est *HMA4*, un transporteur de Zn. C'est d'ailleurs ce transporteur qui explique, en partie, les propriétés d'hyperaccumulation de Cd et de Zn chez l'espèce *Arabidopsis halleri*. En effet, chez cette dernière, 3 copies du gène *HMA4* sont retrouvées dans le génome (Hanikenne *et al.* 2008).

Une fois dans la plante, les éléments toxiques perturbent l'homéostasie des minéraux essentiels en rentrant en compétition avec d'autres transporteurs ou avec des molécules chélatrices organiques ou des métalloprotéines. Par exemple, l'U perturbe à la fois l'homéostasie du Fe et celle du Pi. En effet, l'U provoque une relocalisation du Fe, certainement des parois et des vacuoles vers le cytoplasme, et engendre une déplétion du pool des composés phosphorylés dans les cellules (Berthet *et al.* 2018). Le Cd peut, quant à lui, directement se lier de façon covalente aux fonctions thiols des protéines, entraînant, entre autres, des perturbations dans les chaînes de transfert d'électrons de la photosynthèse et de la respiration.

6. Hyperaccumulation et phytoremédiation d'éléments toxiques

a) Les plantes hyperaccumulatrices du genre *Arabidopsis*

Une forte proportion de plantes tolérantes et hyperaccumulatrices d'ETM est retrouvée dans la famille des Brassicacées. En effet, sur environ 400 espèces connues, 87 sont considérées comme hyperaccumulatrices (Brooks *et al.* 1998). La famille des Brassicacées est la famille d'*A. thaliana*, la plante modèle en biologie végétale. *A. thaliana* a été désignée plante modèle car elle possède un cycle de vie court (environ 3 mois de la graine à la graine) et pratique l'auto-fertilisation (possibilité d'avoir des plantes homozygotes). De plus, elle possède un petit génome diploïde facilement manipulable (transformation par *Agrobacterium tumefaciens* Meinke 1998, Crispr-CAS9 Bortesi and Fischer 2015). Le génome a été séquencé en 2001 (The Arabidopsis Genome Initiative 2000) et, depuis, un grand nombre d'informations ont été accumulées au niveau génomique, transcriptomique et protéomique, y compris des données en lien avec la réponse à certains ETM, tels que le Cd (Villiers *et al.* 2011; Herbette *et al.* 2006) et l'U (Doustaly *et al.* 2014).

Parmi la vingtaine d'espèces du genre *Arabidopsis*, on retrouve *A. halleri*, une espèce hyperaccumulatrice et tolérante au Zn et au Cd (Verbruggen *et al.* 2009). En effet, *A. halleri* possède des mécanismes qui lui permettent de tolérer et transloquer une grande quantité de ces 2 métaux de ses racines vers ses feuilles. Récemment, des données de transcriptomiques de plantes d'*A. halleri* exposées à un stress induit par le Cd (Corso *et al.* 2018) et par le Zn (Schvartzman *et al.* 2018) ont été publiées. Ces données ont mis en évidence que la synthèse des flavonoïdes était essentielle à l'hyperaccumulation et la tolérance au Cd (Corso *et al.* 2018). D'un autre côté, l'hyperaccumulation de Zn entraîne une réponse de type carence en Fe (Schvartzman *et al.* 2018).

Plusieurs populations d'*A. halleri* issues de sols contaminés par des ETM sont actuellement étudiées dans différents laboratoires. Ces populations de différentes origines géographiques ont évolué de façon distincte et ont acquis des propriétés particulières de tolérance et d'accumulation du Cd et du Zn. Cela est illustré sur la Figure 5 où la tolérance au Cd des 3 populations d'*A. halleri* utilisées au cours de ce travail est comparée (Meyer *et al.* 2015). Ces populations ont pour origine les sites d'Auby (France), du Val del Rizo en Italie (population I16), et de Bukowno en Pologne (population PL22). De fortes différences de tolérance au Cd sont observables entre ces populations d'*A. halleri*, elles-mêmes 4 à 6 fois plus tolérantes au Cd qu'*A. thaliana* et *A. lyrata*. *A. lyrata* est la plus proche parente d'*A. halleri* au niveau génomique mais elle ne possède pas les capacités de tolérance et d'accumulation de Zn ou de Cd. Son génome est séquencé depuis 2011 (Hu *et al.* 2011).

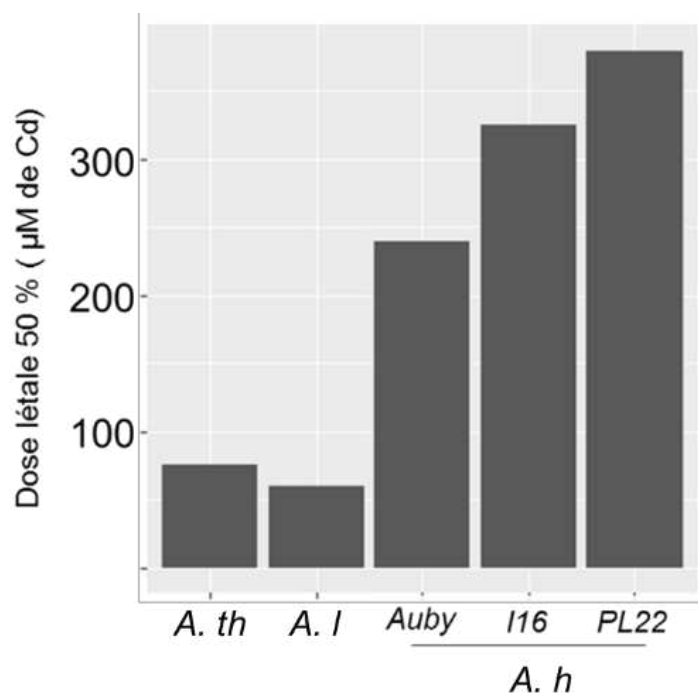


Figure 5. Tolérance au cadmium de différentes espèces du genre *Arabidopsis*. Données adaptées de Meyer *et al.* 2015. *A. th* : *Arabidopsis thaliana* écotype Col0. *A. l* : *Arabidopsis lyrata*. *A. h* : *Arabidopsis halleri* (populations Auby, I16, PL22).

b) La phytoextraction

Les techniques conventionnelles de remédiation des sols pollués par des ETM toxiques, du type excavation des sols et lavages chimiques, sont peu efficaces, chères et lourdes à mettre en œuvre. C'est pourquoi depuis les années 1980, la remédiation des sols par les plantes gagne en intérêt. Cette méthode appelée phytoremédiation, et principalement une des variantes de cette technique, la phytoextraction, détourne les propriétés d'absorption et d'accumulation des plantes à notre intérêt. La phytoextraction ou phytoaccumulation est l'utilisation de plantes pour l'extraction d'éléments traces du sol. Des plantes produisant une forte biomasse ou dites hyperaccumulatrices peuvent accumuler des quantités non négligeables de métaux dans leurs tissus aériens. Une plante est considérée comme hyperaccumulatrice lorsqu'elle accumule un certain pourcentage de métaux (voir exemples Tableau 3).

Tableau 3. Exemple d'espèces hyperaccumulatrices de métaux.

Métal	% masse sèche	Exemple d'hyperaccumulatrice
cadmium	0,01 %	<i>Arabidopsis halleri</i> <i>Thlaspi caerulescens</i> (Cunningham <i>et al.</i> 1997; Cosio 2004)
plomb	0,1 %	<i>Brassica juncea</i> (Epstein <i>et al.</i> 1999)
nickel	0,1 %	<i>Berkheya coddii</i> (Keeling <i>et al.</i> 2003)
cobalt	0,1 %	<i>Haumaniastrum robertii</i> (Brooks <i>et al.</i> 1998)
zinc	1 %	<i>Arabidopsis halleri</i> <i>Thlaspi caerulescens</i> (Cunningham <i>et al.</i> 1997; Cosio 2004)

Les fonds nécessaires à l'établissement d'une couverture végétale sont minimes et permettent de garder la structure du sol et sa composition biologique en microorganismes, micro et macro invertébrés et végétaux. Les déchets liés à la phytoremédiation peuvent être incinérés, ce qui prend une place infime comparé à des tonnes de sols excavés et stockés. De plus, ces déchets peuvent être valorisés dans certaines filières non-alimentaires (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie 2015).

Néanmoins, avec la phytoextraction, la dépollution est limitée à l'ampleur du système racinaire (Kruger *et al.* 1997). La durée du traitement est dépendante de la croissance des plantes et du climat. De plus, si la concentration en ETM est trop forte, le sol peut ne pas être propice à la culture. Enfin, la phytoextraction sur un site contaminé par plusieurs ETM est encore mal étudiée.

Le tabac (*Nicotiana tabacum*) n'est pas considéré comme une plante hyperaccumulatrice d'ETM mais c'est une espèce produisant une forte biomasse. Sur des sols faiblement pollués en Cd (< 1 mg/ kg de sol), le tabac est capable de pousser et d'extraire jusqu'à 10% du Cd présent dans le sol (Yang *et al.* 2017).

Plusieurs études sur des sols contaminés par de l'U ont été menées *in situ* (Saritz 2005; Willscher *et al.* 2013; Knox *et al.* 2008). Ces dernières montrent que les facteurs de transfert du sol à la plante sont particulièrement faibles. Des études sont encore nécessaires pour évaluer l'amélioration possible de l'extraction mais son application actuelle ne paraît pas envisageable. En condition de laboratoire et principalement en culture hydroponique, 2 espèces se distinguent des autres par leur faculté d'absorption de l'U, la moutarde indienne et le tournesol. Le tournesol, par exemple est capable d'absorber jusqu'à 15 g d'U/kg de matière sèche (Dushenkov *et al.* 1997).

B. Réponse aux stress et plasticité des végétaux

1. Les plantes face à l'environnement : organismes sessiles, stress et adaptation

Les végétaux sont des organismes sessiles et cette condition les contraint à être flexibles pour s'adapter à leur environnement, survivre et se reproduire. Les plantes ont développé des mécanismes de réponse et d'adaptation sophistiqués leur permettant d'examiner les conditions environnantes et internes (nutriments, pathogènes, éléments toxiques, compétition inter-individus...). Cet examen minutieux permet le déclenchement de mécanismes adaptés à la réconciliation de leur équilibre interne avec les conditions extérieures. Les plantes peuvent être confrontées à des stress de nature biotique ou abiotique. Les stress biotiques sont représentés par des stress induits par la présence de microorganismes pathogènes (virus, bactéries, champignons). Les stress abiotiques sont liés à des contraintes physico-chimiques telles que l'excès de lumière, la carence ou le surplus d'un nutriment, l'excès ou le manque d'eau, la température, les éléments et molécules toxiques... Cette étude est focalisée sur les stress induits par des ETM. La notion de stress est importée de la physique où elle est déterminée par la quantité d'une force appliquée par unité de surface (Kranter *et al.* 2010). Chez les plantes, elle est définie par la réponse de la plante à une contrainte environnementale, c'est-à-dire la réponse à un élément non favorable à une croissance optimale. Cette contrainte est présente à un temps et à une force donnée. Chaque plante possède son propre standard de croissance qui n'est pas fixe. Lorsque cette dernière subit et sent un stress c'est la phase d'alarme qui mène à la mise en place de mécanismes de résistance (phase de résistance). Si ces mécanismes ne sont pas suffisants ou non mis en place pour rétablir le standard de croissance, la plante subit des dommages voire la mort (phase d'épuisement). Au contraire, s'ils sont suffisants, la plante entre dans une phase de régénération, le stress est aboli ou la plante s'y adapte, entraînant un nouveau standard de croissance (Lichtenthaler 1998, Figure 6).

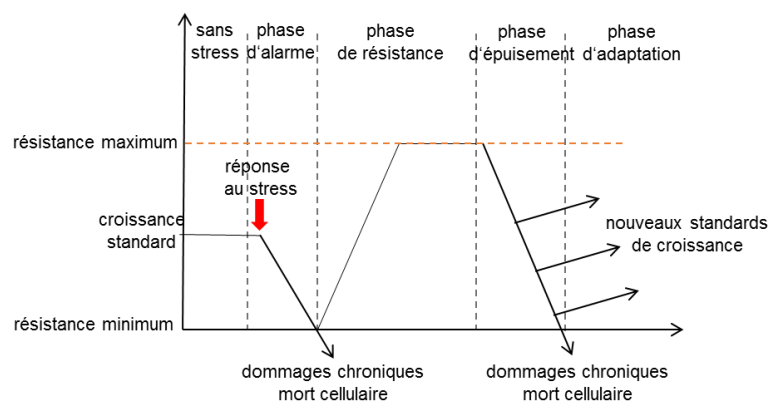


Figure 6. Réponse séquentielle des plantes au stress. Figure adaptée de Lichtenthaler (1998).

2. Production et accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Lors de la plupart des stress, qu'ils soient biotiques ou abiotiques, une production et accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) sont rapidement détectables (del Río 2015). La nature, la production, la détoxification et certains rôles physiologiques de ces 2 familles de molécules sont présentés ci-dessous.

a) Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des formes partiellement réduites ou excitées de l'oxygène atmosphérique. Les principales formes sont $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} et 1O_2 (Halliwell and Gutteridge 2015) et sont principalement des sous-produits du métabolisme. Chez les végétaux, les chaînes de transfert d'électrons de la respiration et de la photosynthèse sont les plus gros producteurs de ROS (Foyer and Noctor 2013 ; Mittler 2017). L'absorption de lumière et l'intensité lumineuse suivent une courbe linéaire. Néanmoins, si l'intensité lumineuse devient trop forte, la chaîne de transfert d'électrons de la photosynthèse est saturée, surexcitant le système par surplus d'électrons. Ce sont ces derniers qui finissent par engendrer la production d' 1O_2 (Tripathy and Oelmüller 2012). D'autre part, la production d' $O_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, ces 2 molécules sont des sous-produits de la production d'ATP à partir d'oxygène lors de la respiration cellulaire (pour revue, voir Møller 2001).

Le Fe sous sa forme ionique participe également à la formation de ROS. D'un côté, le pouvoir réducteur du Fe^{3+} permet de transformer l'ion superoxyde en oxygène. De l'autre côté par réaction de Fenton et d'Haber-Weiss, le Fe^{2+} résultant de la première réaction rentre dans la formation de OH^{\cdot} une molécule très réactive (Figure 7 ; Gill and Tuteja 2010). C'est pour cette raison que le Fe ionique doit être chélaté par des acides organiques ou des protéines (S. A. Kim and Guerinot 2007).

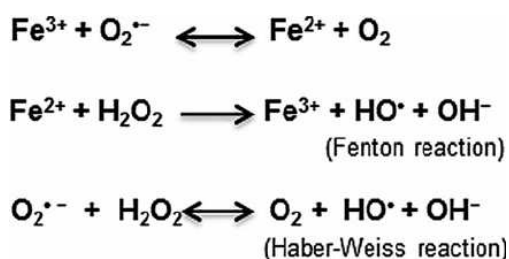


Figure 7. Implication du fer ionique dans la production d'espèces réactives de l'oxygène. Figure issue de Singh *et al.* (2014).

Jusqu'à il y a une dizaine d'années les ROS n'étaient considérés que comme des éléments toxiques pour les cellules car ils sont très réactifs et ont la capacité d'oxyder l'ADN, l'ARN, les protéines ainsi que les lipides des membranes (Mittler *et al.* 2004). Effectivement, les ROS en excès produisent un stress oxydatif important qui peut conduire à la mort cellulaire (Petrov *et al.* 2015). Néanmoins, en 2005, Foyer et Noctor introduisent le concept de signalisation redox. Depuis, les ROS sont plutôt considérés comme des régulateurs de la croissance, du développement et des réponses aux stress en général (Baxter *et al.* 2014 ; Mittler 2017).

La majorité des stress perturbent l'activité métabolique et induisent la production de ROS. La force et la nature de l'élément stressant déterminent la force du stress oxydatif et sa cytotoxicité. Selon l'état oxydatif basal de la plante et la capacité antioxydante des cellules à un temps donné, les réponses aux ROS peuvent aller de l'adaptation aux stress jusqu'à la mort cellulaire programmée, voire la nécrose de l'organe (Figure 8A). La mort cellulaire programmée est dans certains cas indispensable à l'évitement et/ou la tolérance du stress (Petrov *et al.* 2015). La réponse aux stress oxydatifs dépend donc principalement de la balance entre la concentration, la nature des ROS et la capacité antioxydante de la cellule (Figure 8B).

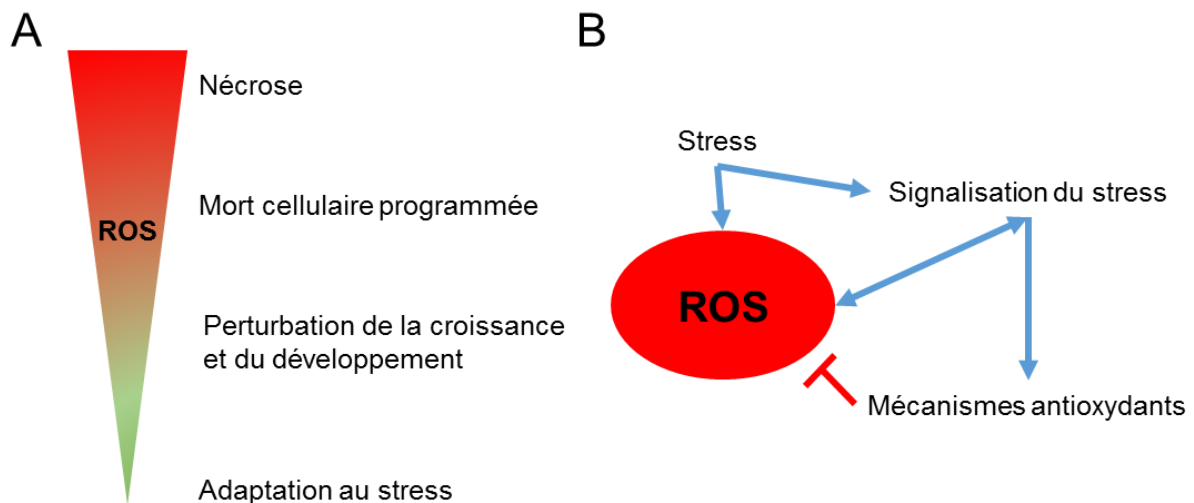


Figure 8. Schéma du stress oxydatif et de ses conséquences chez les végétaux. (A) La réponse cellulaire aux ROS est dose dépendante. (B) Lien entre stress, ROS et mécanismes antioxydants. Figure adaptée de Petrov *et al.* (2015).

Chez les plantes on retrouve des mécanismes antioxydants de nature enzymatique et non enzymatique. La détoxification des ROS se fait principalement par un enchevêtrement d'enzymes et de molécules qui permettent la transformation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène puis en eau en consommant du pouvoir réducteur sous forme de NADPH (Figure 9 ; del Río 2015 ; Bailly 2004)

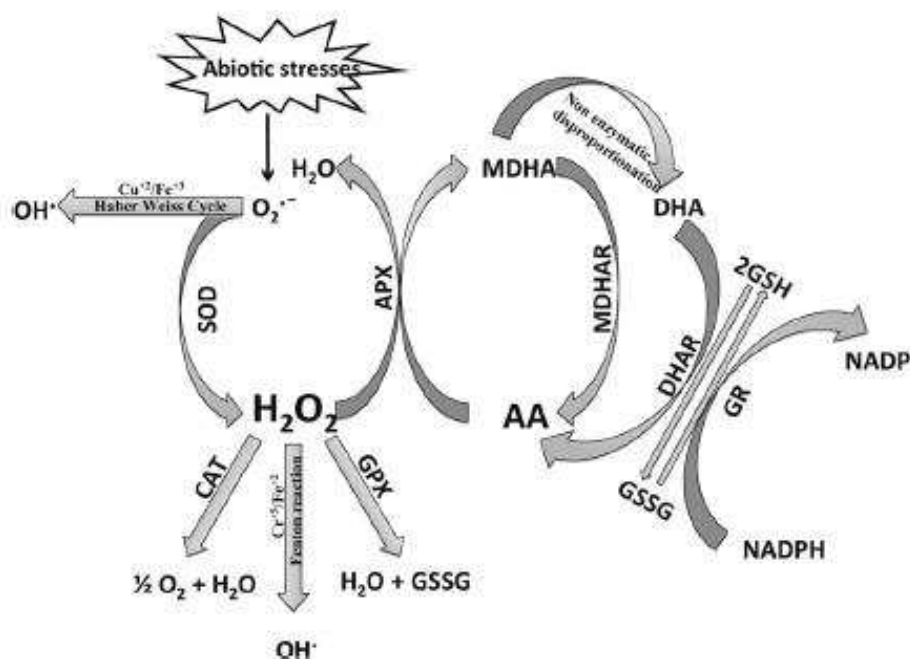


Figure 9. Les principaux systèmes enzymatiques de détoxification des ROS chez les végétaux. Figure extraite de Gill and Tuteja 2010. CAT : catalase ; SOD : superoxide dismutase ; APX : ascorbate peroxidase ; MDHAR : monodehydroascorbate reductase ; DHAR : dehydroascorbate reductase ; GR : glutathione reductase ; ASA : ascorbate ; MDHA : monodehydroascorbate ; DHA : dehydroascorbate ; GSSG : glutathion oxydé ; GSH : glutathion réduit.

En dehors du cycle présenté Figure 9, on retrouve d'autres molécules antioxydantes telles que l'acide aminé proline, les tocophérols, les caroténoïdes ou encore les flavonoïdes (Gill and Tuteja 2010). La proline est un fort piègeur d'OH• (Alia and Saradhi 1991). Les tocophérols ou vitamine E sont des molécules qui servent d'antioxydants des lipides, ils permettent la stabilité des lipides de la membrane plasmique par exemple en piégeant le $^1\text{O}_2$ (Gill and Tuteja 2010). Les caroténoïdes permettent de se débarrasser de l'énergie lumineuse qui sature la machinerie photosynthétique, ils peuvent tout comme les tocophérols, piéger le $^1\text{O}_2$. Finalement, les flavonoïdes sont particulièrement présents dans l'appareil foliaire. Cette famille de molécules inclut, entre autres, les anthocyanes, des pigments protecteurs allant de la couleur rouge à violette. Ces molécules sont très actives biologiquement et permettent de limiter l'accumulation de ROS (Akula and Ravishankar 2011).

Ces différentes enzymes et molécules permettent le maintien d'un faible niveau de ROS non toxique. La moindre déviation de ce niveau déclenche des événements de signalisation afin de rétablir le niveau basal (Mittler *et al.* 2004). De plus, ce signal est capable

de s'auto propager de cellule en cellule créant une vague de ROS, que ce soit au niveau d'un groupe de cellules, d'un organe ou de la plante entière (Miller *et al.* 2009).

Le fort lien des ROS avec le métabolisme, leur forte réactivité avec les molécules du vivant ainsi que la capacité de créer un signal qui se déplace de cellule en cellule font des ROS de parfaites molécules signal qui permettent de déclencher rapidement des mécanismes pour répondre à une perturbation (Mittler *et al.* 2011).

Le Cd est un métal mou extrêmement réactif. Cet ETM est capable d'interagir avec les protéines contenant des fonctions thiols et il peut donc empêcher la formation de pont disulfure. Cette habilité à perturber la formation de ponts disulfures entraîne un déséquilibre des fonction protéiques incluant les enzymes antioxydantes et d'autres protéines (Rodriguez-Serrano *et al.* 2009). C'est par exemple le cas pour les thiorédoxines, des protéines qui contiennent des fonctions thiols et sont essentielles au maintien du statut redox, particulièrement au niveau des chaînes de transferts d'électrons de la photosynthèse et de la respiration (Heyno *et al.* 2008 ; Prinz *et al.* 1997). De plus, le Cd provoque la déplétion des stocks de glutathion indispensables à la régulation du statut redox des cellules (Figure 9). En effet, la détoxification du Cd repose en grande partie sur la synthèse de phytochélatines à partir de glutathion. Une fois complexé aux phytochélatines, le Cd perd sa réactivité et est principalement stocké dans la vacuole (pour revue, voir Villiers *et al.* 2011). Le Cd est donc un oxydant fort et direct qui perturbe fortement les voies métaboliques des végétaux.

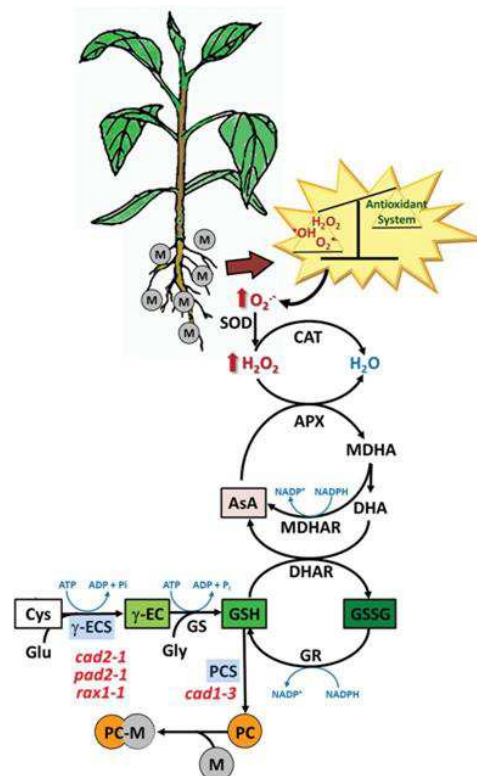


Figure 10. Perturbation du pool de glutathion et de détoxification des ROS par le Cd. Cys : Cystéine. EC : γ -glutamylcystéine. GSH : Glutathion. PC: Phytochélatines. M : Métal. Figure issue de (Hernández *et al.* 2015).

L'U quant à lui n'est pas complexé par les phytochélatines, mais le glutathion reste un métabolite très important dans la réponse des plantes à ce radionucléide. En effet, ce métabolite ainsi que le tocophérol permet aux plantes de limiter l'effet de l'U sur la photosynthèse (Aranjuelo *et al.* 2014). Les effets de l'U sur la photosynthèse sont principalement dus à une perturbation de la chaîne de transfert des électrons (Vanhoudt *et al.* 2014) qui entraîne une forte production de ROS et la surexpression des enzymes antioxydantes (Vanhoudt *et al.* 2011a).

b) Espèces réactives de l'azote (RNS)

Plusieurs espèces réactives de l'azote existent dans le monde vivant. Une des principales formes retrouvée chez les végétaux est l'oxyde nitrique (NO ; del Río 2015). Au contraire des animaux, le NO n'est pas principalement produit par la Nitric Oxyde Synthase qui ne semble pas être présente chez les végétaux (del Río 2011). La source de NO est encore peu comprise chez les plantes. Elle serait principalement métabolique, comme pour les ROS, à partir de nitrite par la nitrate réductase ou encore dans les racines à partir de nitrite par la nitrite:NO réductase. De fortes pistes ont été avancées en ce qui concerne la synthèse de NO à partir de L-Arginine par une enzyme inconnue qui n'est pas une Nitric Oxyde Synthase. De façon similaire aux ROS, les chloroplastes et les mitochondries sont les plus gros producteurs de NO (Wilson, Neill, and Hancock 2008).

Un grand nombre d'effets sont attribués à une augmentation du niveau de NO dans les tissus (del Río 2011). Plusieurs études rapportent des effets sur l'élongation racinaire (Sanz *et al.* 2014; P. Sun *et al.* 2010) et le cycle cellulaire (del Pozo *et al.* 2005) ou encore des effets hormonaux (Fernandez-Marcos *et al.* 2011). Le NO est une composante essentielle de la signalisation des stress abiotiques (revue par Simontacchi *et al.* 2015). De plus le NO et les ROS sont connus pour s'influencer mutuellement et participer à la réponse aux stress (pour revue, voir Hancock and Whiteman 2016). C'est le cas dans la réponse du système racinaire d'*A. thaliana* lors d'un stress induit par l'U. En effet, l'étude menée par Tewari *et al.* (2015) a montré que les accumulations de ROS et de NO sont intimement liées à la toxicité du métal.

3. Notion de dose et d'hormèse

Dès le XVI^{ème} siècle, le philosophe Paracelse déclarait "*Tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison*". Ce principe s'applique également aux végétaux. La concentration de l'agent stressant doit dépasser un certain seuil pour devenir toxique. C'est selon ce principe que pour certains éléments toxiques il est possible de voir un effet bénéfique d'un élément toxique, dans des conditions de croissance particulières, pour une espèce

donnée et pour une concentration précise. C'est le cas, par exemple, pour le chrome chez *A. thaliana*. Dans les conditions d'étude de Castro *et al.* (2007), 200 μM de dichromate inhibent la croissance tandis que 100 μM induisent une stimulation. Cet effet est appelé hormèse, un effet souvent observé mais peu étudié. Pour les chercheurs qui se sont intéressés au phénomène, la production de ROS et la réponse à cette production est partie intégrante de l'hormèse (pour revues, voir Poschenrieder *et al.* 2013 ; Calabrese and Blain 2009). La balance entre l'absence d'effet, un effet stimulant et un effet inhibiteur se tiendrait principalement dans la compensation du stress oxydatif. Une dose dite hormétique engendrerait la mise en place des mécanismes de détoxification des ROS mais de façon disproportionnée au stress oxydatif réel (Calabrese and Blain 2009). La dose de l'élément stressant est donc suffisante pour passer le seuil de détection et déclencher la cascade de signalisation associée mais n'est pas suffisante pour être toxique.

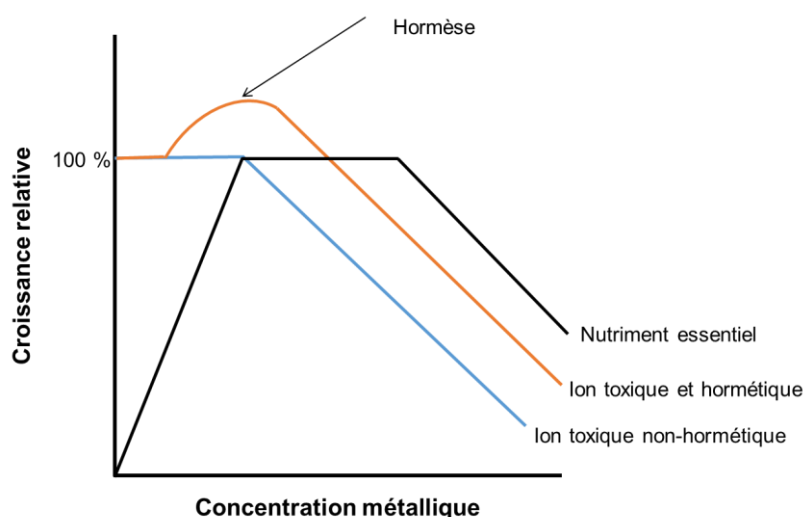


Figure 11. Croissance, ions métalliques et hormèse. Figure adaptée de Poschenrieder *et al.* (2013).

C. Mécanismes de signalisation et de réponse aux stress

Lorsque les plantes sentent un changement dans leur environnement, elles doivent détecter celui-ci et mettre en place des réponses spécifiques. Ces réponses ont pour finalité, de mettre en place le réseau d'acteurs nécessaires à l'adaptation à ce nouvel environnement. Les mécanismes de signalisation et de réponse aux stress constituent un réseau complexe de mécanismes cellulaires et moléculaires. Chaque niveau de régulation communique avec les autres, de la structure de la chromatine et l'expression des gènes aux modifications post-traductionnelles des protéines. Cet enchevêtrement permet de réguler finement et de façon

spécifique les réponses aux conditions environnementales. Chacun de ces niveaux de régulation est présenté ci-dessous.

1. Signalisation du stress

La phase de signalisation précède la phase de résistance au stress (Figure 6) et est constituée de l'activation d'une ou plusieurs cascades de signalisation (Sofia *et al.* 2013). Ces cascades sont un enchainement d'évènements métaboliques et cellulaires menant à la mise en place d'une réaction adaptée au stress ressenti (Figure 12).

La plupart des stress induisent l'accumulation de molécules appelées messagers secondaires. Ces derniers vont transmettre l'information du détecteur aux acteurs qui vont mettre en place les réponses au stress. Trois messagers secondaires sont bien caractérisés chez les végétaux, les ROS, le NO et le Ca. Ces derniers sont capables de transmettre rapidement l'information et sont mobiles de cellule en cellule voire d'organe à organe (Mittler *et al.* 2011 ; Choi *et al.* 2014 ; Domingos *et al.* 2015).

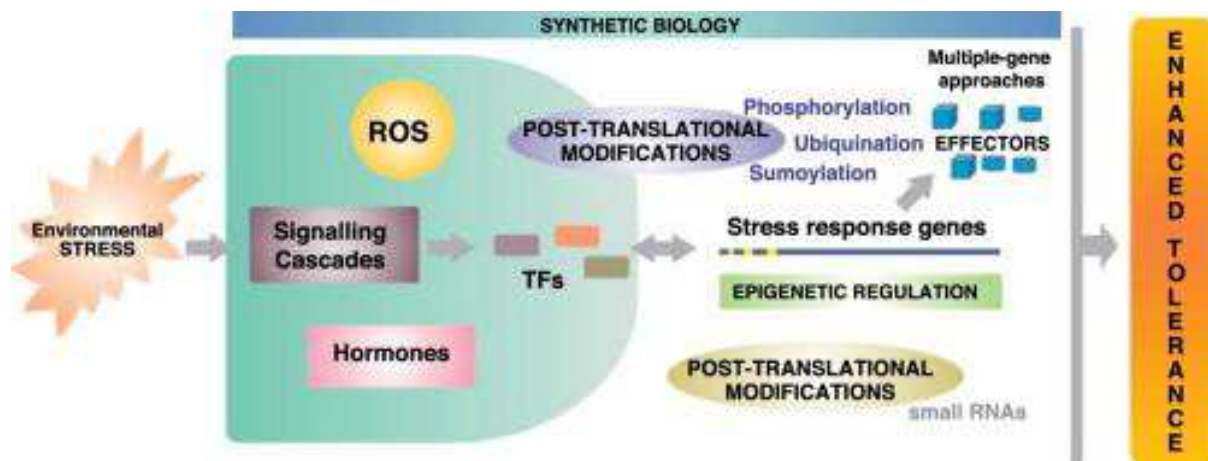


Figure 12. Différents acteurs de la réponse aux stress abiotiques. Figure issue de Cabello *et al.* 2014. TFs : Facteurs de transcription.

Les acteurs en aval peuvent être de nature hormonale, protéique ou métabolique. Les voies de signalisation des stress les plus étudiées sont constituées de cascades de protéines kinases appelées Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK ; Figure 13 ; Smékalová *et al.* 2014, voir partie D. 3). Ces MAPK agissent en cascades de phosphorylations les unes sur les autres jusqu'à ce que le substrat final soit phosphorylé et puisse agir sur les voies associées à cette protéine. Par exemple, le Cd induit la synthèse de NO qui, à son tour, induit la mort cellulaire programmée par le biais de l'activation de la MAPK MPK6 et d'une protéase (Ye *et al.* 2013 ; voir 'heavy metal stress' sur la Figure 13). La/les MPKKK et MPKK impliquées dans cette cascade de phosphorylation sont encore inconnues. Finalement, ces mécanismes de

signalisation conduisent à des évènements de régulation épigénétique, transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, traductionnelle et enfin post-traductionnelle (Figure 12).

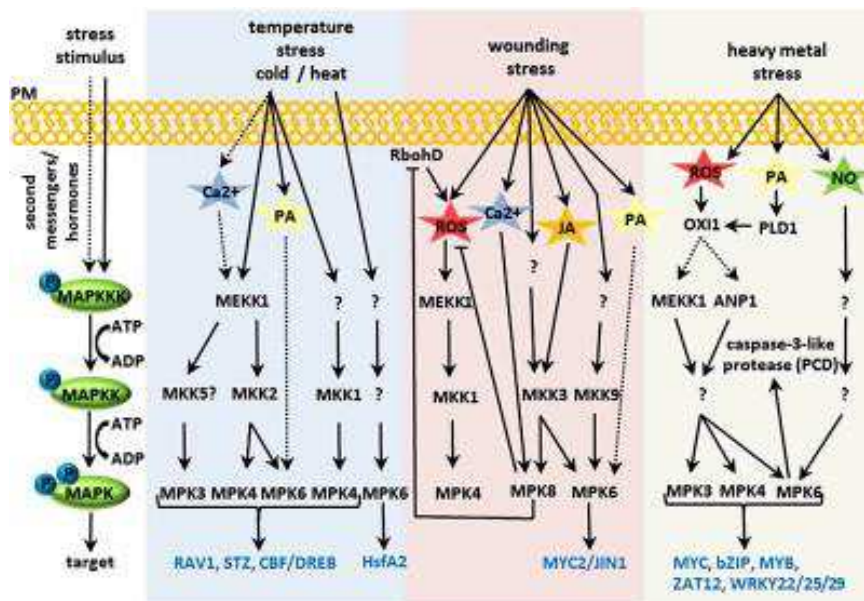


Figure 13. Exemple de cascade de signalisation impliquant les Mitogen Activated Protein Kinases. Figure issue de Smékalová *et al.* (2014).

2. Régulation épigénétique de la réponse aux stress et modulation de la structure de la chromatine

Les mécanismes de régulation épigénétique sont particulièrement développés chez les végétaux, un constat qui reflète leur mode de développement sessile (Pikaard and Mittelsten Scheid 2014). La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones sont les 2 principaux mécanismes de régulation épigénétique. La méthylation de l'ADN sera traitée dans cette partie tandis que les modifications post-traductionnelles des histones seront abordées partie D. 5). Chez les eucaryotes, l'ADN génomique est compacté en une structure complexe appelée chromatine. Les mécanismes épigénétiques ont pour effet de moduler la structure de cette chromatine en hétérochromatine (chromatine compactée) et euchromatine (chromatine déroulée) ; la conformation de la chromatine dirigeant l'expression des gènes. Seuls les gènes présents dans l'euchromatine peuvent être transcrits.

La méthylation des bases cytosines de l'ADN (5-Methylcytosine ; 5mC) est une marque de l'hétérochromatine et donc une marque répressive de l'expression génique. Cette marque apparaît la plupart du temps dans des régions riches en bases G C, CxG ou Cxx (Pikaard and Mittelsten Scheid 2014). Chez les végétaux, elle est retrouvée au niveau des éléments transposables, des centromères des chromosomes mais également au niveau de certains promoteurs et dans les régions codantes de gènes fortement exprimés (Zilberman *et al.* 2007).

Le rôle de la méthylation dans les régions codantes de certains gènes est encore mal connu mais l'hypothèse proposée est que cela influencerait l'épissage alternatif.

Les ADN méthyltransférases sont des enzymes catalysant le transfert d'un groupement méthyle sur une cytosine, que ce soit *de novo* ou pour entretenir la méthylation après réplication de l'ADN lorsque seul un des 2 brins est alors méthylé. Ces méthyltransférases sont très bien conservées dans le monde vivant et on retrouve les homologues des mammifères chez les plantes, DNMT1, 2 et 3. Chez les végétaux l'homologue de DNMT1 est MET1 ; cette enzyme est la méthyltransférase majeure des zones riches en GC et peut également méthyler les cytosines *de novo*. Il existe plusieurs homologues de DNMT2 mais elles n'ont pas d'activité méthyltransférase chez les végétaux. Plusieurs protéines homologues de DNMT3 sont également présentes, ces dernières sont principalement des méthyltransférases *de novo*. Les végétaux possèdent également des méthyltransférases de l'ADN uniques dans le monde vivant. La Chromométhylase 3 (CMT3) est l'enzyme principale qui entretient les méthylation de l'ADN dans les zones CxG. L'enzyme CMT2 entretient, quant à elle, la méthylation de l'ADN au niveau des zone Cxx (Pikaard and Mittelsten Scheid 2014).

La déméthylation des cytosines peut être passive, lorsque l'entretien de la méthylation après réplication n'est pas effectué, ou alors active (enzymatique). Chez *A. thaliana* 4 enzymes sont retrouvées : Repressor Of Silencing 1 (ROS1), Demeter (DME) et Demeter-Like (DML2 et 3) (Pikaard and Mittelsten Scheid 2014). Ces enzymes contiennent des domaines glycosylase à ADN qui leur permettent de remplacer les cytosines méthylées par des cytosines non méthylées en exploitant la machinerie de réparation de l'ADN (Agius *et al.* 2006).

La méthylation de l'ADN est essentielle dans la réponse des plantes aux stress abiotiques. Par exemple, un stress salin induit l'expression de l'enzyme MET1 produisant des changements dans les profils de méthylation de l'ADN. Ces changements influent alors sur la morphologie de la plante (Arikan *et al.* 2018). Le Cd influence également les profils de méthylation de l'ADN (Z. Li *et al.* 2015) mais, à notre connaissance, aucune étude n'a montré l'effet du Cd sur les enzymes qui méthylient l'ADN.

3. Régulation transcriptionnelle de la réponse aux stress

La transcription différentielle des gènes entre condition de croissance optimale et condition stressante est un niveau très important de la régulation de la réponse au stress. En effet, lorsque les végétaux ressentent un stress, de nombreux gènes voient leur expression réprimée ou induite. Certains gènes sont spécifiques de la réponse à un stress tandis que d'autres sont communs aux stress de façon générale. De plus, les produits de ces gènes peuvent impacter la tolérance au stress mais aussi la réponse au stress (Sofia *et al.* 2013). Les expériences de Doustaly *et al.* (2014) ont montré qu'un stress induit par l'U perturbait fortement l'expression des gènes, comme par exemple la répression des gènes liés à l'homéostasie du Fe, dont le transporteur IRT1 (Figure 14). Le Cd perturbe également l'expression des gènes avec, par exemple, l'induction des gènes liés à l'assimilation du soufre. Cette induction permet d'augmenter la synthèse de glutathion puis de phytochélatines afin de détoxifier le Cd (Herbette *et al.* 2006 ; Figure 10).

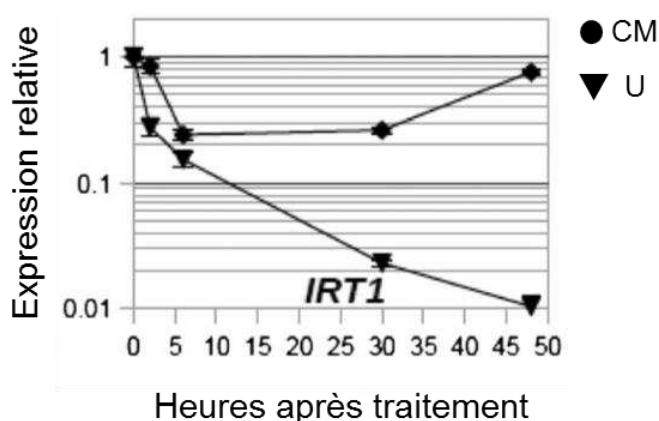


Figure 14. Expression du gène *IRT1* au cours du temps lors d'un stress induit par l'U. Expression mesurée par RT-QPCR. Figure adaptée de Doustaly *et al.* (2014).

La régulation transcriptionnelle consiste en l'interaction de 2 éléments : les éléments ci-régulateurs (amplificateur ou promoteur) et les éléments trans-régulateurs qui sont principalement représentés par les facteurs de transcription. Les promoteurs sont les régions d'ADN localisées en amont des gènes ; ils sont impliqués dans l'interaction avec les facteurs de transcription (Juven-Gershon *et al.* 2008). Les facteurs de transcription sont des acteurs de nature protéique qui facilitent l'attachement de l'ARN polymérase II au promoteur pour débiter la transcription (Figure 15). La nature des facteurs de transcription est très diversifiée (pour revues, voir Bakshi and Oelmüller 2014 ; Alves *et al.* 2013 ; Nakashima *et al.* 2012 ; Roy 2016). Une des familles de facteurs de transcription la mieux caractérisée chez les végétaux est la famille WRKY qui comprend plus d'une centaine de représentants (Eulgem *et al.* 2000). ces

facteurs peuvent agir à la fois en tant qu'activateur ou répresseur de l'expression d'un gène (Bakshi and Oelmüller 2014). Ces protéines font environ 60 acides aminés avec un heptapeptide conservé au niveau N-terminal et une structure ressemblant à des doigts de Zn en C-terminal. Ces 2 structures sont essentielles pour l'affinité aux éléments cis-régulateurs possédant la séquence TTGACT/C (W box). Par exemple, la protéine WRKY6 est impliquée dans la réponse à un stress induit par une carence en Pi par la régulation de la transcription de *PHO1* (Chen *et al.* 2009). Ce dernier joue un rôle dans la translocation du Pi des racines vers les feuilles (Hamburger *et al.* 2002). La carence en Pi réduit l'affinité de WRKY6 pour le promoteur du gène *PHO1* et permet de limiter la production de la protéine PHO1 et donc la translocation de Pi des racines vers les feuilles (Y.-F. Chen *et al.* 2009).

Les séquences d'ADN situées en amont des gènes, appelées amplificateurs, agissent de concert avec des protéines activatrices et médiatrices (facteurs de transcription ou autre). Ce phénomène permet dans certains cas de stabiliser la fixation de l'ARN polymérase II sur le promoteur (Figure 15).

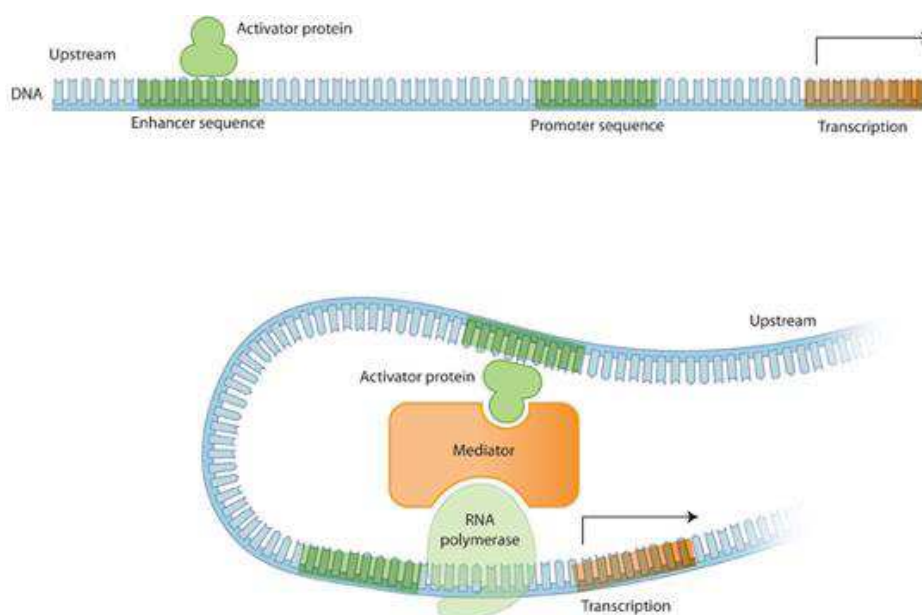


Figure 15. Schéma simplifié illustrant la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes. Figure issue de Nature Education (2010).

4. Régulation post-transcriptionnelle de la réponse aux stress

Une fois que la transcription d'un gène est initiée et que l'ARN pré-messager est transcrit, plusieurs types de régulations post-transcriptionnelles peuvent être mis en place.

Le premier niveau majeur de régulation est l'épissage alternatif de cet ARN pré-messager. Cette étape, conduite par un complexe protéique appelé spliceosome, permet à partir d'un gène de créer plusieurs ARN en excisant de façon spécifique les séquences dites non codantes, les introns, des séquences codantes, les exons (Floris *et al.* 2009). L'épissage alternatif est impliqué dans de nombreux processus physiologiques incluant la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Barbazuk *et al.* 2008). Chez les végétaux ils existent 5 grands types d'épissage alternatif : l'épissage complet, le saut d'exon, l'alternative 5' ou l'alternative 3' et la rétention d'intron (Figure 16 ; Reddy 2007).

L'épissage complet permet la traduction de tous les exons et donc de la protéine dite complète. Un saut d'exon est comme son nom l'indique la traduction d'une protéine en sautant un exon. L'alternative 5' ou 3' produisent des ARN messager (ARNm) dont l'extrémité 5' ou 3' a été tronquée. La rétention d'intron produit un ARNm avec un intron retenu entre 2 exons. Ce dernier type d'épissage entraîne, la plupart du temps, la traduction d'une protéine tronquée car le cadre de lecture est décalé. Cette protéine est destinée soit à être dégradée afin de réguler la quantité d'ARNm lié à ce gène, soit traduite pour donner une forme tronquée de la protéine qui peut avoir un rôle fonctionnel.

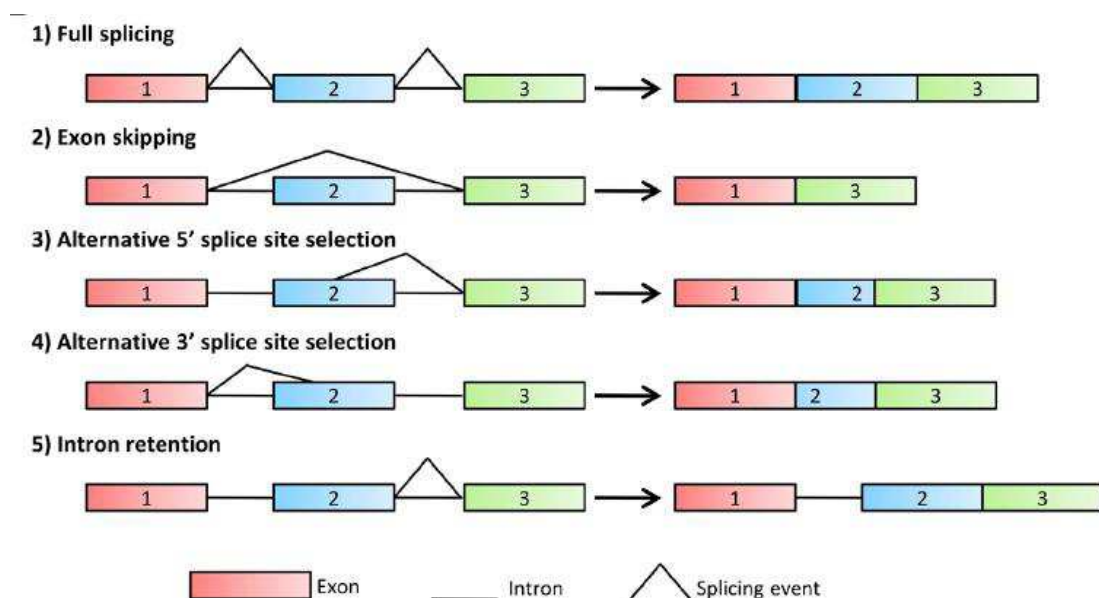


Figure 16. Illustration des différents types d'épissage alternatif. Figure issue de Guerra *et al.* (2015).

Ces différents épissages alternatifs permettent, dans certains cas, d'avoir un pool d'ARN pré-messager prêt à être traduit rapidement en cas de stress sans avoir à passer par

les étapes de transcription et accumulation de l'ARN pré-messager. En effet, le changement d'épissage peut être rapidement mis en place par l'activation de régulateurs de l'épissage que sont, par exemple, les modifications post-traductionnelles (Barbazuk *et al.* 2008). Cette dernière observation met en avant que les différents niveaux de régulation ne sont pas simplement linéaires mais qu'ils peuvent agir les uns sur les autres.

D'autre part, l'épissage alternatif permet la production de protéines différentes n'ayant pas nécessairement la même fonction (Mastrangelo *et al.* 2012). Ce mécanisme peut également contrôler l'affinité d'une protéine pour une autre. Par exemple, les facteurs de transcription de type MYB sont constitués de domaines répétés. L'épissage alternatif permet de contrôler le nombre de ces domaines qui joue sur l'affinité du facteur de transcription pour une séquence d'ADN (Barbazuk *et al.* 2008). Finalement, un épissage alternatif peut influencer la localisation subcellulaire de la future protéine en fonction de l'épissage ou non de l'étiquette d'adressage à un compartiment subcellulaire (Syed *et al.* 2012). Les différentes fonctions de l'épissage alternatif sont résumées sur la Figure 17.

La plupart des gènes subissant un épissage alternatif dans la réponse aux stress sont des gènes codant pour des protéines régulatrices de l'expression génique. Par exemple, une des formes tronquées de la protéine MKP13 agit avec d'autres acteurs protéiques pour l'activation de la transcription de la forme complète de MKP13. Cette dernière joue un rôle dans les cascades de protéine kinases (Lin *et al.* 2010) et pourrait donc entrer dans la signalisation de certains stress. Une étude de l'épissage alternatif chez le riz en réponse au Cd a mis en évidence que 476 gènes étaient épissés de façon alternative ; ces épissages produisant 542 protéines aberrantes. C'est par exemple le cas de plusieurs facteurs de transcription de type WRKY (He *et al.* 2015).

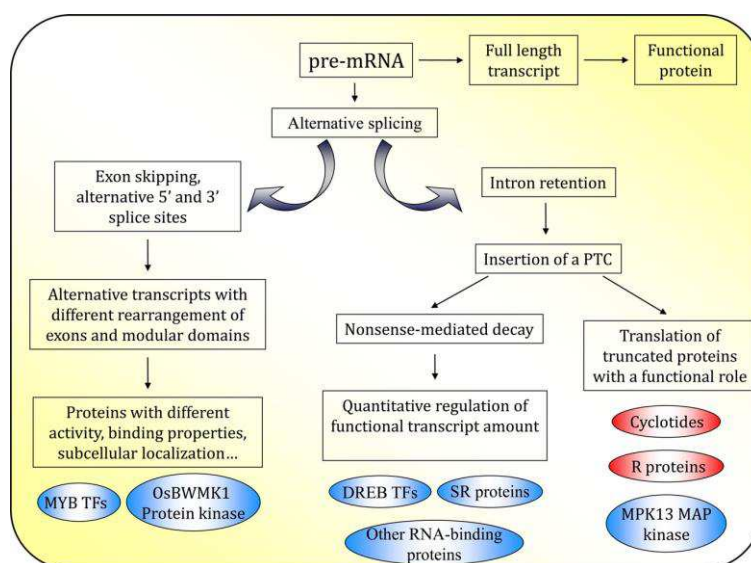


Figure 17. Produits et rôle de l'épissage alternatif chez les végétaux. Figure issue de Mastrangelo *et al.* (2012)

Un deuxième exemple de mécanismes de régulation post-transcriptionnelle est le contrôle de la stabilité des ARNm. Un de ces mécanismes est la production d'ARN non codant, biologiquement fonctionnels en tant qu'ARN. Ces ARN participent à un mécanisme appelé interférence ARN qui agit principalement au niveau post-transcriptionnel en entraînant la dégradation d'ARNm. Néanmoins, l'interférence ARN agit également au niveau transcriptionnel en agissant directement sur la structure de la chromatine ou sur l'expression des facteurs de transcription (Tyczewska *et al.* 2016 ; Floris *et al.* 2009). Ces ARN entrent en jeu dans la plupart des réponses aux stress, y compris ceux d'origine métallique (Guleria *et al.* 2011).

La classe d'ARN non codant la mieux caractérisée chez les végétaux est représentée par les ARN non codant de petite taille. Cette famille est composée des micro ARN (ARNmi) et des small interference ARN (ARNsi). Les ARNmi font pour la plupart 21 nucléotides et leur extrémité 3' est méthylée afin d'éviter leur dégradation. Ces ARN sont exportés du noyau vers le cytoplasme où, avec l'action d'un complexe protéique appelé RISC (RNA-induced silencing complex), ils permettent de guider le clivage d'ARNm spécifiques (Lv *et al.* 2010). De nombreux ARNmi ont été identifiés comme ayant des cibles impliquées dans la réponse aux stress, particulièrement des facteurs de transcription (Guleria *et al.* 2011). Récemment, une étude a montré que chez le tournesol, 13 ARNmi étaient différentiellement exprimés en réponse au Cd (Jian *et al.* 2018). Ces ARNmi ont des rôles allant du contrôle de la morphologie de la plante à la signalisation hormonales en réponse aux ETM (Mendoza-Soto *et al.* 2012).

D'autres mécanismes, comme l'accumulation de ROS, peuvent également provoquer la dégradation des ARNm. En effet, l'oxydation des nucléotides composant un transcrite peut directement provoquer l'oxydation des ARN messagers qui finiront pas être dégradés (Carvalho *et al.* 2013).

5. Régulation traductionnelle de la réponse aux stress

La traduction différentielle des ARNm est mise en place lors de la réponse à de nombreux stress et un des mécanismes majeurs est l'accumulation des protéines qui constituent les polyribosomes, complexes responsables de la biosynthèse des protéines. Ce mécanisme permettrait de limiter la consommation d'ATP afin de produire seulement les protéines dont l'expression est induite en réponse aux stress (Floris *et al.* 2009). Cette régulation peut s'effectuer par la régulation de l'activité du facteur d'élongation de type eucaryote. Par exemple, lors de la réponse d'*A. thaliana* au Cd, le facteur d'élongation eIF2 α est phosphorylé, ce qui le rend inactif (Sesma *et al.* 2017 ; Sormani *et al.* 2011). Cet exemple illustre le lien étroit qui existe entre régulations traductionnelle et post-traductionnelle en réponse à un stress (Van Ruyskensvelde *et al.* 2018).

Un autre mécanisme de la régulation de la production des protéines se fait en jouant sur la phosphorylation des facteurs d'initiation de la traduction. Cette voie, appelée TOR (target of rapamycin), est un réseau de kinases modulé en fonction de l'état nutritif et énergétique des cellules (Xiong and Sheen 2015). Par exemple, la voie TOR permet de ré-initier la traduction d'ARNm de réponse à l'hormone végétale auxine afin d'augmenter l'efficacité de la traduction (Schepetilnikov *et al.* 2013).

6. Régulation post-traductionnelle de la réponse aux stress

La synthèse d'une chaîne polypeptidique au niveau des ribosomes ne donne que très rarement lieu à une protéine complètement fonctionnelle. Afin d'acquérir sa forme mature la protéine néoformée est soumise à une myriade de modifications covalentes, transitoires ou permanentes, qui constituent les modifications post-traductionnelles (PTM). Ces modifications peuvent être catalysées par des enzymes ou résulter de réactions chimiques spontanées et concernent les protéines de type histones et 'non histones'. Les histones gouvernent le repliement de la chromatine et sont des acteurs clés des processus de régulation épigénétique. Depuis une quinzaine d'années, l'étude des PTM des protéines non-histones est un domaine en plein essor. Le rôle majeur des PTM dans la régulation des processus cellulaires, développementaux et de réponse aux stress (Cabello *et al.* 2014) se reflète sur le nombre de protéines modifiées rapportées dans la littérature (Kosová *et al.* 2011; X. Wu *et al.* 2016). C'est un domaine d'étude récent qui ouvre des perspectives pour identifier de nouveaux acteurs dans la réponse des plantes aux stress et qui nécessite donc d'être approfondi (Villiers *et al.* 2011). Par exemple, des protéines phosphorylées ou méthylées ont été identifiées dans tous les processus cellulaires essentiels aux plantes pour répondre à un stress d'origine métallique mais le rôle de ces modifications reste très peu compris.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la phosphorylation des protéines car, comme nous l'avons vu plus haut, cette PTM joue un rôle majeur dans la réponse aux stress. De plus, c'est la PTM la plus abondante dans le monde vivant (Ross *et al.* 2017) et, à notre connaissance, aucun phosphoprotéome de plante exposée à un stress induit par le Cd ou l'U n'a été publié. La méthylation des protéines est un phénomène très bien étudié en ce qui concerne les protéines de types histones à travers les phénomènes épigénétiques. Au contraire, en ce qui concerne les protéines de type non-histones, malgré l'identification d'un grand nombre de protéines méthylées à travers le monde vivant, le rôle de cette modification reste globalement très peu compris (pour revue, voir Serre *et al.* 2018)

D. Les modifications post-traductionnelles

1. Nature enzymatique ou non enzymatique des modifications post-traductionnelles

Ils existent 2 grands types de PTM, les PTM enzymatiques et non enzymatiques. En ce qui concerne les PTM enzymatiques, 2 catégories peuvent être distinguées. La première catégorie de modifications concerne l'addition de petits groupements chimiques (acétylation, phosphorylation, méthylation...) ou de grandes chaînes peptidiques (ubiquitination, sumoylation...) sur la chaîne latérale ou au niveau des extrémités amino- et carboxy-terminales des acides aminés. La dérivatisation de la chaîne latérale peut intervenir sur tous les acides aminés protéinogènes, à l'exception de l'alanine. Les extrémités N- et C-terminales de tous les acides aminés peuvent être modifiées s'ils se trouvent exposés aux extrémités de la protéine. La cystéine, la sérine et la lysine sont les acides aminés pour lesquels le plus grand nombre de PTM a été répertorié (Černý *et al.* 2013). On peut également inclure à cette première catégorie l'addition de cofacteurs liés de façon covalente au site actif de certaines enzymes. C'est le cas, par exemple, de la biotine ou du lipoate qui sont des cofacteurs indispensables au fonctionnement d'un petit nombre d'enzymes clés du métabolisme (Alban *et al.* 2000 ; Rébeillé *et al.* 2007).

La seconde catégorie correspond au clivage du squelette polypeptidique *via* l'action de protéases ou, plus rarement, par clivage autocatalytique. Le clivage de la méthionine initiatrice des polypeptides néosynthétisés est une des PTM les plus communes. Cette réaction est catalysée par une méthionine aminopeptidase, enzyme ubiquitaire retrouvée dans les règnes végétaux, animaux et procaryotes (Bradshaw *et al.* 1998 ; Falb *et al.* 2006 ; Frottin *et al.* 2006). Le clivage du squelette carboné peut également permettre la conversion d'un précurseur inactif (proenzyme) en une chaîne plus courte correspondant à la protéine active. Chez les animaux, ce processus est ainsi impliqué dans la maturation d'enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine), de certaines protéines sanguines (protéines du complément, facteurs de coagulation), ou en encore dans l'activation d'hormones. Chez les plantes, la plupart des protéines mitochondriales et chloroplastiques codées par le génome nucléaire possèdent à leur extrémité N-terminale un peptide de transit qui permet leur adressage aux organites. Ce peptide est généralement clivé consécutivement à l'étape d'import par des endopeptidases présentes à l'intérieur des organites (Millar *et al.* 2006). D'autres exemples de maturation d'enzymes par clivage protéolytique spécifique existent chez les plantes. Par exemple, il a été montré que le domaine régulateur N-terminal de la cystathionine γ -synthase, première enzyme spécifique pour la synthèse de méthionine, est clivé en réponse à une carence en folates chez *A. thaliana* (Loizeau *et al.* 2007). Ce processus permet de maintenir les pools intracellulaires de méthionine et S-adénosylméthionine, donneur universel de groupements méthyles dont

l'homéostasie doit être parfaitement contrôlée. Il a également été montré qu'en réponse à une attaque par des insectes phytophages les cellules de tomate induisent la production jasmonate-dépendante de protéases afin de cliver spécifiquement des enzymes impliquées dans le catabolisme des acides aminés (H. Chen *et al.* 2005). Ces clivages entraînent la perte des domaines régulateurs de ces enzymes qui dégradent alors les acides aminés dans l'intestin de l'insecte, provoquant ainsi une carence néfaste à sa prolifération.

Les PTM non enzymatiques résultent de réactions chimiques spontanées. Elles altèrent les propriétés structurales et biologiques des protéines et sont caractéristiques de leur "vieillesse moléculaire". Dans le but d'éviter l'accumulation des protéines endommagées la plupart des cellules utilisent des mécanismes de protection pour détecter et dégrader rapidement ces protéines. Néanmoins, chez l'Homme, certaines pathologies métaboliques et/ou liées au vieillissement (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives) sont caractérisées par l'accumulation de '*molecular-aged proteins*' résultant de PTM non enzymatiques. Cette catégorie de modifications réfère à une large gamme de réactions chimiques incluant la glycoxydation (ou glycation), l'oxydation, la carbamylation et la carbonylation (Soskić *et al.* ; Jaisson and Gillery 2010).

2. Les PTM participent à la sophistication des protéomes

Plus de 300 acides aminés ont été identifiés à partir des 20 correspondant aux 64 codons présents dans le code génétique. La présence de PTM, après les phénomènes d'épissage alternatif, participe donc à expliquer que les protéomes puissent être beaucoup plus complexes que ce que les données génomiques prédisent (Figure 18 ; Walsh *et al.* 2005). Environ 5% des génomes des eucaryotes supérieurs peuvent être dédiés à des enzymes catalysant les PTM. La diversification des protéomes par des modifications covalentes se produit également chez les procaryotes mais ces modifications sont beaucoup moins fréquentes et diversifiées que dans les cellules nucléées (Walsh *et al.* 2005).

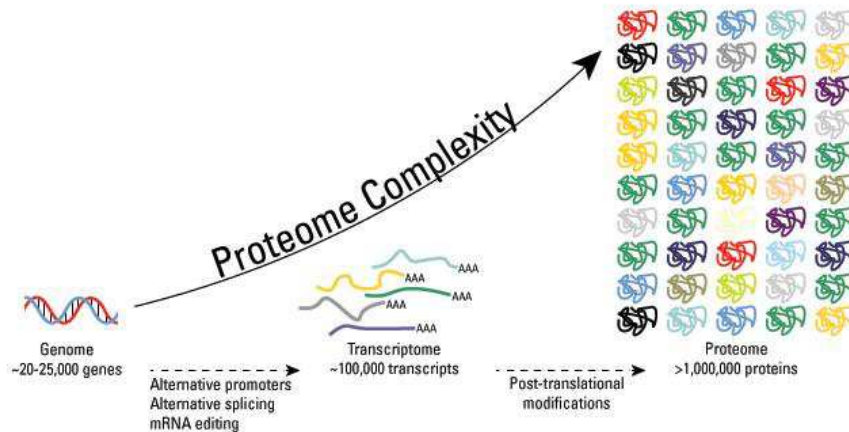


Figure 18. Du génome aux modifications post-traductionnelles. Figure issue de Protein Biology Learning Center ThermoFischer Scientific.

Les PTM enzymatiques participent à la sophistication des protéomes *via* leur diversité (phosphorylation, acétylation, ubiquitination, glycosylation, méthylation...) ainsi que par la multiplicité des effets moléculaires et cellulaires qu'elles peuvent engendrer sur leurs cibles. En effet, elles participent à la régulation d'une large gamme de processus biologiques. De manière très générale elles peuvent affecter (i) la conformation tridimensionnelle, (ii) la stabilité, (iii) l'activité enzymatique, (iv) l'interaction avec des protéines partenaires ou avec les acides nucléiques, (v) ou encore la localisation cellulaire (Figure 19 ; Ryšlavá *et al.* 2013).

Par leur diversité et leur nature parfois dynamique (réversibilité) les PTM incrémentent de façon exponentielle la complexité des protéomes cellulaires. L'étude de ces PTM est une thématique en plein essor et constitue un véritable défi de l'ère post-génomique. Au cours des 15 dernières années les avancées technologiques conséquentes dans le domaine de la protéomique ont permis l'identification de centaines de PTM (Ryšlavá *et al.* 2013).

Chez les plantes, l'amélioration des techniques de spectrométrie de masse combinée au perfectionnement constant de l'annotation des génomes ont révolutionné le domaine de la protéomique végétale. Chaque année un nombre croissant d'études à grande échelle sont ainsi publiées et les inventaires de sous-protéomes modifiés (phosphoprotéome, acétylome, glycoprotéome, carbonylprotéome...) ont fait leur apparition dans la littérature. La compréhension des liens de causalité entre les PTM et les changements fonctionnels qu'elles entraînent constitue un projet très ambitieux nommé '*post-translatomics*'. Ce domaine de recherche émergent laisse entrevoir de fructueuses perspectives quant à l'amélioration des connaissances de la physiologie cellulaire végétale.

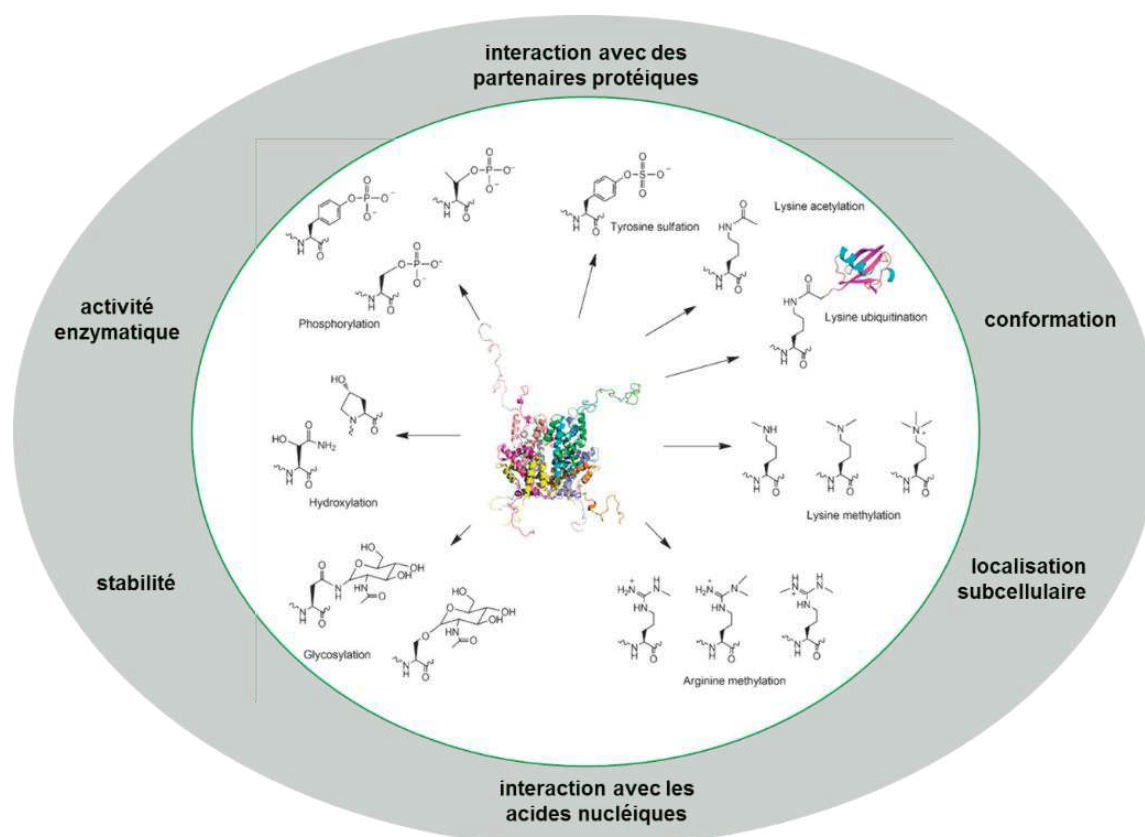


Figure 19. Illustration de la diversité des PTM et de leurs effets sur les protéines cibles. La liste des PTM représentées n'est pas exhaustive mais illustre les plus communes d'entre elles. Le complexe protéique représenté au centre de la figure est un octamère d'histone. Figure adaptée de Liu *et al.* (2011).

Les PTM possèdent des fréquences d'apparition variables. Le site IPTMnet (Huang *et al.* 2018) rapporte qu'à travers le monde vivant, la phosphorylation des protéines est la modification la plus abondante. En deuxième place on retrouve l'acétylation, puis l'ubiquitinylation, et enfin la méthylation. *A contrario* certaines PTM sont très rares mais essentielles. On peut mentionner par exemple le cas de la biotinylation, modification qui consiste à ajouter une biotine (vitamine B8) sur le résidu lysine du site catalytique d'un nombre très limité d'enzymes (carboxylases, décarboxylases, transcarboxylases) et de protéines (histones, protéine SBP65 de la graine ; Alban *et al.* 2000).

3. La phosphorylation des protéines, une modification post-traductionnelle majeure

a) La diversité des réactions de phosphorylation des protéines

La phosphorylation correspond au transfert d'un groupe phosphoryle sur le groupement hydroxyle de différents acides aminés (Figure 20). Cette réaction est catalysée par des protéines kinases qui utilisent le γ -phosphate de l'ATP comme donneur universel de groupements phosphoryles. Le domaine catalysant la réaction de phosphorylation est un domaine très bien conservé de 250 à 300 acides aminés. Ce domaine est retrouvé dans plus de 25 familles de protéines kinases possédant des fonctions bien distinctes (Lehti-Shiu and Shiu 2012). Les familles les plus représentées chez les végétaux sont introduites ci-dessous et leurs rôles dans la réponse aux stress abiotiques sont discutés.

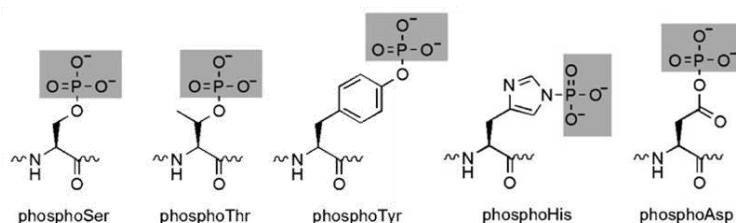


Figure 20. Structure des acides aminés phosphorylés sur leurs chaînes latérales. Figure issue de Walsh *et al.* (2005).

Chez les eucaryotes, la phosphorylation des protéines intervient majoritairement sur les résidus sérine et thréonine, et de façon moins abondante sur les résidus tyrosine (Walsh *et al.* 2005). L'abondance relative des résidus protéiques phosphorylés chez les plantes et les animaux est ainsi estimée à 85% de phosphosérine, 10% de phosphothréonine et 5% de phosphotyrosine (Sugiyama *et al.* 2008). La nature des protéines kinases impliquées dans ces réactions de phosphorylation varie en fonction du résidu modifié. Les enzymes sérine/thréonine kinases et tyrosine kinases sont regroupées dans une superfamille, appelée 'kinome', qui comprend plus de 1100 membres chez *A. thaliana*, soit 2 fois plus que dans le génome humain (Ytterberg and Jensen 2010). Chez les bactéries, les champignons et les plantes il existe également des histidine kinases.

Les réactions de phosphorylation sont réversibles *via* l'activité de phosphatases qui sont également spécifiques des résidus sur lesquels elles agissent. Néanmoins, les protéines phosphatases sont moins spécifiques en termes de reconnaissance de peptide, excepté lorsqu'elles sont en complexe avec un partenaire protéique (Glen Uhrig *et al.* 2013). Ce constat peut expliquer pourquoi il n'existe que 100 à 200 gènes codant pour des protéines

phosphatases chez *A. thaliana*, la diversité se faisant dans les partenaires protéiques (Ytterberg and Jensen 2010).

b) Les sérine/thréonine protéines kinases et phosphatases

(1) Les sérine/thréonine protéines kinases

Les Calcium-Dependent protéines kinases – CDPK

Le Ca est un ion jouant le rôle de messager de façon ubiquitaire dans le monde vivant. La plupart de ses effets sont initiés par sa liaison à la protéine calmoduline qui va agir sur des Calmodulin Binding Proteins (Virdi *et al.* 2015). Chez les végétaux, le Ca permet aussi l'activation des protéines kinases de type CDPK (Hardie 1999). Le Ca se lie à un domaine en C-terminal de la protéine appelée EF hand composée de 2 hélices alpha et qui ressemble à la calmoduline. Cette liaison entraîne alors la rotation de la partie C-terminale qui cachait le site actif de la protéine et permet ainsi la fonction de phosphorylation (Figure 21).

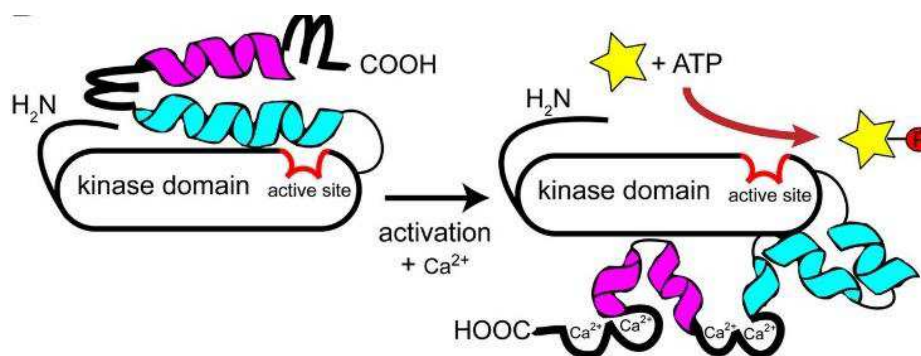


Figure 21. Structure et activation des CDPK. Figure issue de Schulz *et al.* (2013).

Chez *A. thaliana*, il existe 34 gènes codant pour des CDPK (Hrabak 2003). Ces enzymes ont principalement été caractérisées dans la réponse à l'hormone acide abscissique (ABA). L'ABA est une hormone impliquée dans la signalisation des stress et plus particulièrement des stress osmotiques. En effet, CDPK4, CDPK7, CDPK10 et CDPK30 ont été montrées comme phosphorylant deux ABA Response Factor ABF1 et ABF2 impliqués dans la mise en place des réponses à l'ABA. La phosphorylation de ces 2 facteurs de transcription entraîne la stimulation de la transcription des gènes de réponse à l'ABA (pour revue, voir Schulz *et al.* 2013).

Les Sucrose Non Fermenting-Related protéines kinases – SnRK

Chez *A. thaliana*, on trouve 38 représentants de la famille des SnRK. Ces 38 enzymes sont subdivisées en 3 groupes basés sur leur similarité de séquence, SnRK1, SnRK2 et SnRK3. Les groupes 2 et 3 sont uniques aux plantes (Hrabak 2003) et sont introduits ci-dessous.

Les SnRK2 sont impliquées dans la réponse aux stress abiotiques et aux réponses à l'ABA. Ces enzymes ont une structure monomérique avec un domaine sérine/thréonine kinase conservé et 2 domaines spécifiques aux SnRK2 (Figure 22). Le premier domaine est essentiel dans la réponse au stress osmotique tandis que le deuxième est requis pour la signalisation de l'ABA (Kulik *et al.* 2011). La kinase la plus étudiée de cette sous-famille est SnRK2.6, une kinase activée par la présence d'ABA et permettant de réguler la fermeture des stomates en conditions de sécheresse (Mustilli 2002). SnRK2.6 est capable de phosphoryler *in vitro* 54 protéines impliquées dans la réponse à l'ABA. Néanmoins, seule la protéine BTRL1 qui joue un rôle dans l'épissage alternatif des gènes est un substrat qui a été confirmé *in vivo* (Wang *et al.* 2013).



Figure 22. Structure des protéines kinases SnRK2. Figure issue de Anna Kulik *et al.* (2011).

Les SnRK3, ou CIPK ou encore SOS-like, sont des protéines kinases qui sont activées par le Ca intracellulaire. Cette sous-famille est particulièrement importante dans la réponse au stress salin avec la voie SOS (Salt Over Sensitive) qui contient deux SnRK3, SOS2 et SOS3. Ces 2 enzymes sont essentielles dans la régulation de l'homéostasie du potassium et du sodium intracellulaire et plus particulièrement lors d'un excès ou d'une carence. En effet, ces enzymes contrôlent, en outre, la protéine SOS1, un antiport sodium/proton. La protéine SOS3 est activée par l'excès de Ca intracellulaire provoqué par l'accumulation de sodium. SOS3 active ensuite la protéine SOS2 par phosphorylation. La phosphorylation de SOS1 par SOS2 permet alors l'export de sodium du cytoplasme vers l'apoplasme (Figure 23 ; Ji *et al.* 2013).

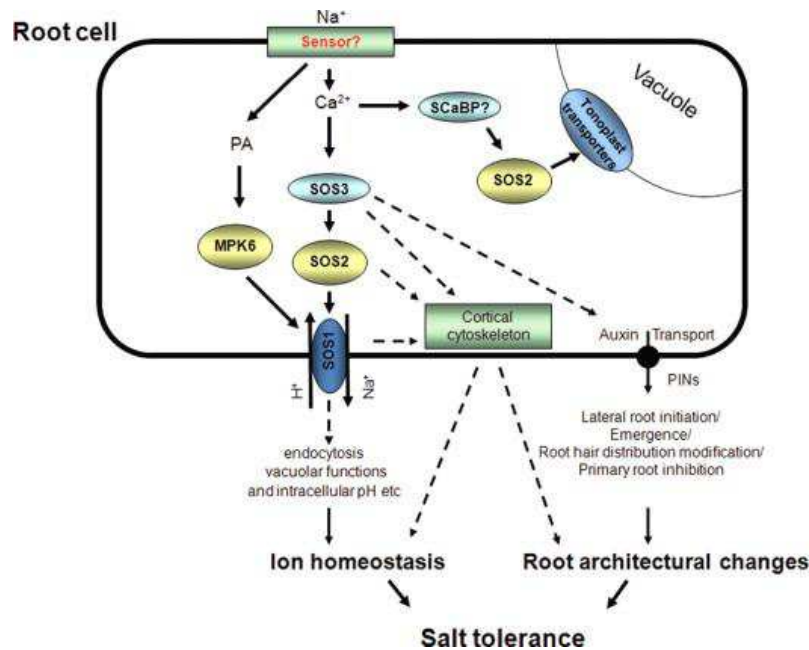


Figure 23. La voie Salt Over Sensitive dans la réponse à un stress induit par le sodium. Figure issue de Ji et al. (2013).

Les Receptor-Like protéines kinases - RLK

Les RLK sont caractérisées par la présence d'un peptide signal hydrophobe en N-terminal et un domaine transmembranaire. Le domaine sérine/thréonine kinase est situé en C-terminal (Hardie 1999). L'analyse du génome d'*A. thaliana* prédit que la famille des RLK contient au moins 610 membres (Shiu and Bleecker 2001). Deux grandes familles ont été caractérisées chez les végétaux : la famille Erecta et les Wall Associated protéines kinases (WAK et WAK-like ; Chevalier and Walker 2005).

Les WAK et WAKL sont liées à la fois à la paroi cellulaire et au cytoplasme des cellules et permettent de faire le lien entre ces 2 compartiments (Kohorn and Kohorn 2012). Le domaine protéine kinase est situé du côté cytoplasmique tandis que le côté récepteur est extracellulaire. Il existe de fortes redondances fonctionnelles entre les différentes protéines (Chevalier and Walker 2005). L'hypothèse est que ces enzymes seraient des récepteurs de fragments de pectine, un constituant des parois cellulaires. Ces enzymes sont essentielles à l'expansion des parois et donc l'expansion cellulaire. Lorsque des fragments de pectine sont formés, par exemple lors d'une attaque de pathogène, ceux-ci peuvent être reconnus par une WAK. Cette reconnaissance entraîne alors l'activation de la protéine kinase et l'activation ou l'inhibition par phosphorylation d'autres protéines kinases. Par exemple, MKP3 et MKP6, sont des Mitogen Activated Kinases impliquées dans les cascades de signalisation des stress (Kohorn and Kohorn 2012).

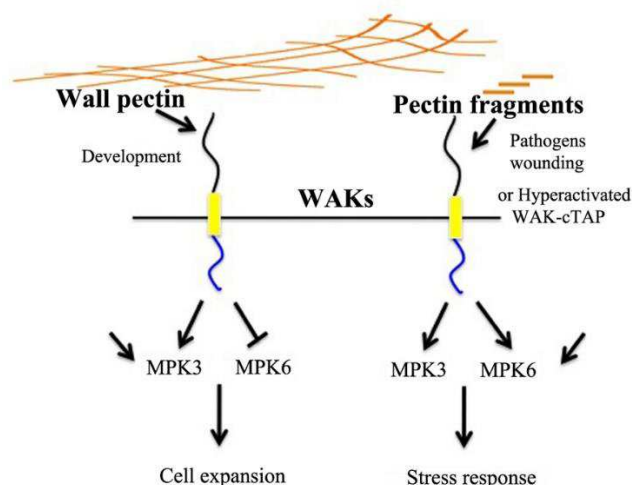


Figure 24. Modèle de la fonction des kinases de type WAK dans la détection de la dégradation de la pectine. Figure issue de Kohorn and Kohorn (2012).

Les Mitogen Activated protéines kinases - MAPK, MAPKK, MAPKKK

Les MAPK constituent des acteurs très importants de la signalisation des stress chez les végétaux sous la forme de cascades de phosphorylations où au minimum 3 kinases interagissent. Chaque kinase est activée par la kinase en amont par phosphorylation. Une MAPKKK phosphoryle une MAPKK qui, à son tour, phosphoryle une MAPK. Ces événements mènent à la phosphorylation d'un substrat spécifique de la cascade en question. Le génome d'*A. thaliana* contient 20 MAPK, 10 MAPKK et 60 MAPKKK. Une de ces kinases peut phosphoryler plusieurs autres kinases et complexifie donc énormément le nombre de cascades possibles (Chevalier and Walker 2005). Plusieurs cascades sont aujourd'hui connues (Figure 13). Par exemple, lorsque la plante subit un stress induit par du Cd, MPK6 et MPK3 sont activées (X.-M. Liu *et al.* 2010). Ces deux MAPK sont activées par MPKK3/MPKK5, qui sont-elles même phosphorylées par la MPKKK ANP1, cette dernière étant active lorsque les cellules subissent un stress oxydatif (Colcombet and Hirt 2008). MPK3 et MPK6 possèdent plusieurs substrats et sont essentielles à la réponse à de nombreux stress. Ces gènes sont par exemple impliqués dans la phosphorylation de facteurs de transcriptions liés à l'éthylène lors de l'attaque d'un pathogène (Xu *et al.* 2016)

Les Cyclin-Dependent protéine kinases - CDK

Les CDK sont les enzymes qui permettent le bon déroulement du cycle cellulaire. Pratiquement la totalité des CDK nécessite d'être liée à une protéine cycline pour devenir fonctionnelle. Les cyclines sont des protéines qui activent de façon spécifique les différentes étapes du cycle cellulaire et sont accumulées de façon cyclique. Sept classes de CDK ont été décrites chez *A. thaliana*, de CDKA à CDKF. Ces dernières sont classées en fonction de leur affinité pour les différentes cyclines (Figure 25 ; Kitsios and Doonan 2011). L'activité des CDK et finalement le cycle cellulaire sont régulés par des inhibiteurs tel que ICK1 dont l'expression est induite en condition de stress par l'ABA (H. Wang *et al.* 1998).

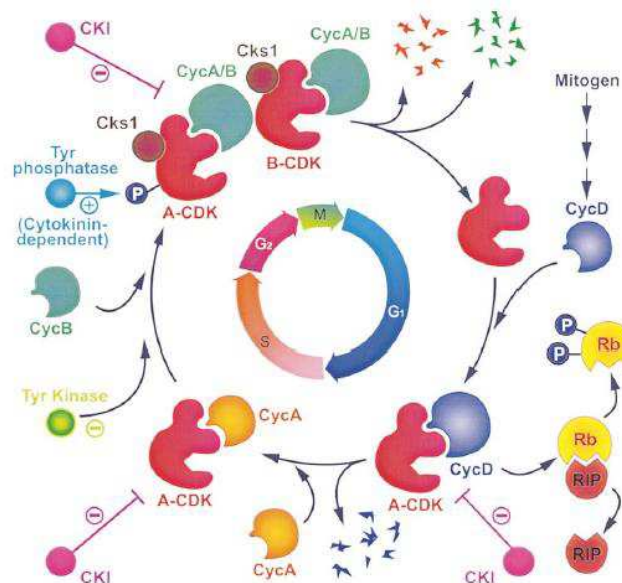


Figure 25. Régulation du cycle cellulaire. Figure issue de Mironov (1999).

Les Glycogen Synthase Kinase/Shaggy- like protéines kinases - GSK3

Les protéines GSK3 sont des kinases clés dans les voies de signalisation du développement et de l'organisation du cytosquelette. Chez *A. thaliana*, 11 membres sont connus. Il est important de noter que les GSK3 ont besoin d'être d'abord phosphorylées par une autre kinase pour pouvoir être actives (priming phosphorylation ; Doble 2003). Le membre le mieux caractérisé dans le monde végétal est la protéine kinase BIN2 inhibitrice de la voie de signalisation des hormones stéroïdes, les brassinostéroïdes. En absence de brassinostéroïdes, BIN2 régule de façon négative les facteurs de transcription de réponse aux brassinostéroïdes, tels que BZR1 ou BES, ceci en phosphorylant de nombreux résidus sérine et thréonine. Ce phénomène entraîne leur dégradation par le protéasome 26S. Lorsque les brassinostéroïdes se fixent sur leur récepteur BRI1 (voir paragraphe suivant), une protéine de réponse aux brassinostéroïdes BSK est phosphorylée, permettant le recrutement de la phosphatase BSU1. Cette dernière déphosphoryle BIN2 ce qui entraîne sa dégradation par le

protéasome 26S et l'activation des facteurs de transcription de réponse aux brassinostéroïdes (Figure 22).

Plusieurs membres de cette famille de kinases voient leur expression modulée en réponse aux stress abiotiques. Par exemple, les gènes *SK13*, *SK31* et *SK42* sont surexprimés en réponse à un stress salin. Leur substrat est encore inconnu mais les produits de ces gènes sont essentiels à la voie de signalisation du stress salin (Charrier 2002).

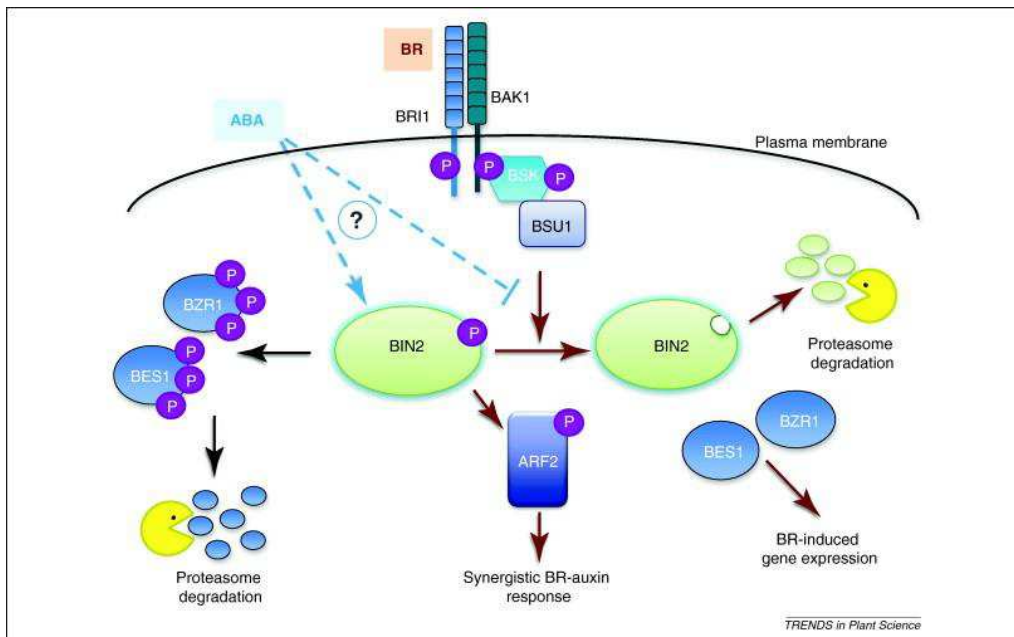


Figure 26. Rôle de BIN2 dans la signalisation des brassinostéroïdes. Figure issue de Saidi *et al.* (2012)

(2) Les sérine/thréonine protéines phosphatases

La majeure partie des sérine/thréonine phosphatases appartient à la famille des Phosphoprotéines Phosphatases (PPP). Cette famille est subdivisée, chez les plantes, en PP1 (TOPP), PP2 (PP2A), PP4, PP5, PP6 et PP7 ainsi que PPKL et SLP qui sont absentes chez les mammifères (Figure 27). La spécificité des PPP se fait grâce à la formation de complexes avec des partenaires protéiques qui permettent de considérablement élargir leur éventail de substrats. Ces partenaires sont appelés sous-unités, plusieurs centaines sont connues chez l'Homme (Glen Uhrig *et al.* 2013) et quelques-unes chez les végétaux (Ogawa *et al.* 2011 ; Takemiya *et al.* 2005, 2013 ; Templeton *et al.* 2011).

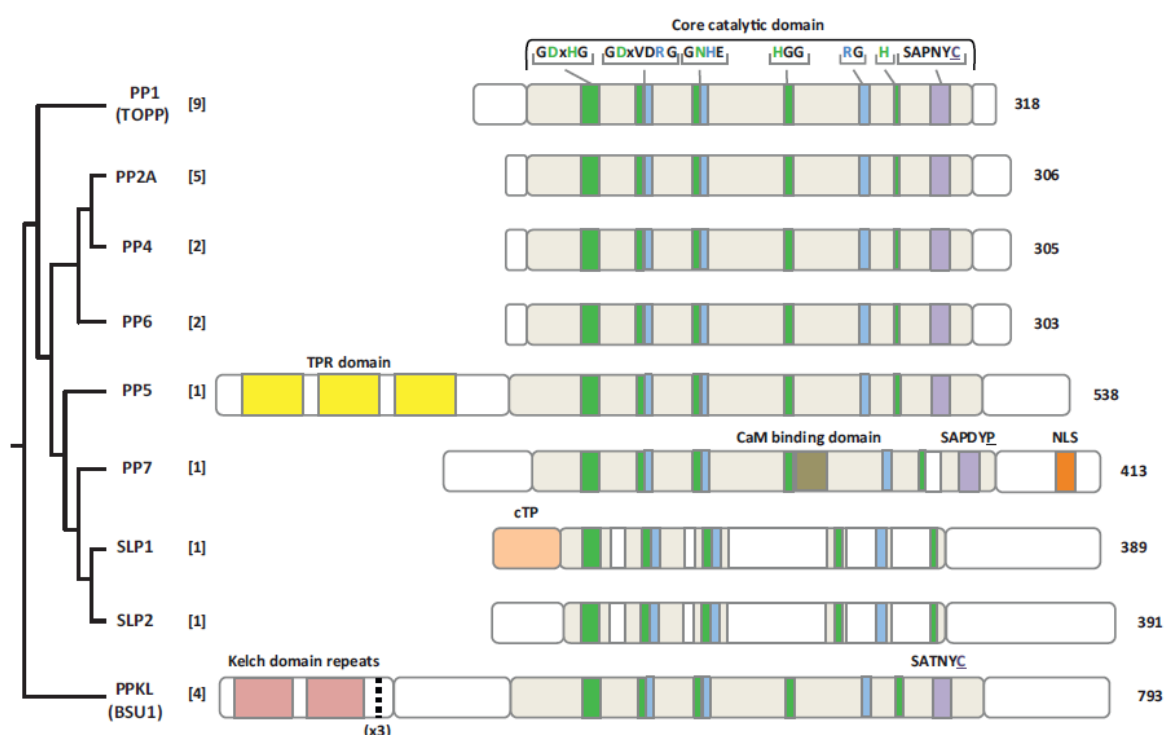


Figure 27. Structures et domaines des Phosphoprotéines Phosphatases. Figure issue de R. Glen Uhrig *et al.* (2013).

Les protéines phosphatases PP1

La sous-famille des PP1 ou TOPP compte 9 représentants chez *A. thaliana* (Kerk *et al.* 2007). Les partenaires des PP1 se fixent sur un motif conservé RVxF (Uhrig *et al.* 2013). La fixation d'un partenaire protéique permet d'activer la phosphatase ou au contraire de l'inactiver mais aussi de recruter d'autres partenaires (Peti *et al.* 2013). L'exemple le mieux caractérisé est l'interaction de la protéine phosphatase PP1 avec son partenaire protéique PRSL1 (PP1 Regulatory Subunit Like 1) dans la détection de la lumière bleue et l'ouverture des stomates. Lorsque la lumière bleue est détectée par les phototropines (PHOT), celle-ci

s'autophosphorylent et phosphorylent BLUS1 (Blue Light Signaling 1), une autre protéine kinase nécessaire à l'interaction entre PP1 et PRSL1. L'interaction de ces 2 protéines est nécessaire à l'ouverture des stomates en activant les pompes à protons mais le mécanisme sous-jacent est encore inconnu (Figure 28 ; Inoue et Kinoshita 2017).

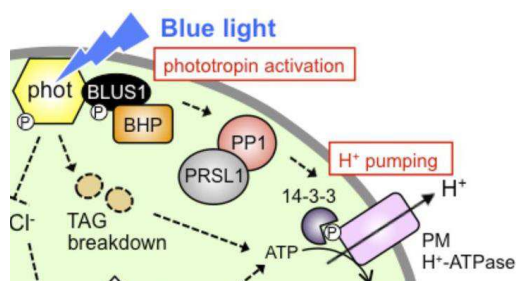


Figure 28. Activation des pompes à protons et ouverture des stomates. Figure adaptée de Inoue et Kinoshita (2017).

Les protéines phosphatases PP2A, PP4 et PP6

Les protéines phosphatases PP2A, PP4 et PP6 sont structurellement très similaires (Figure 27). A notre connaissance, aucun rôle des PP4 n'a été identifié chez les végétaux. Les PP6 ont quant à elles un rôle dans la phosphorylation des transporteurs d'efflux de l'hormone auxine, les PIN-FORMED (PIN ; voir partie E.2 ; Dai *et al.* 2012). Elles participent également à la signalisation de l'ABA à travers la déphosphorylation entraînant l'inactivation d'un facteur de transcription à l'ABA, ABI5 (Dai *et al.* 2013).

Les protéines phosphatases PP2A sont des holoenzymes constituées d'une sous-unité catalytique, d'une sous-unité qui régule la conformation de l'enzyme et d'une sous-unité régulatrice. Chez *A. thaliana*, il existe 5 sous-unités catalytiques, 3 sous-unités conformationnelles et 17 sous-unités régulatrices. Ces sous-unités peuvent toutes interagir entre elles, fournissant des fonctions et des substrats variés (Jonassen *et al.* 2011). Plusieurs holoenzymes ont été décrites comme étant essentielles à la réponse au stress, la signalisation de la lumière, le contrôle de la fonction des microtubules ou encore le contrôle de la croissance racinaire (Uhrig *et al.* 2013).

Par exemple, la phosphatase PP2A-C4 et la protéine kinase PINOID (PID) régulent la polarité cellulaire (basale ou apicale) du transporteur PIN1, un transporteur d'efflux de l'auxine. Lorsque PIN1 est phosphorylé sa position est apicale et lorsqu'il est déphosphorylé, sa position est basale (Figure 29). Ce mécanisme permet de rapidement moduler les efflux d'auxine et l'architecture racinaire (Michniewicz *et al.* 2007)

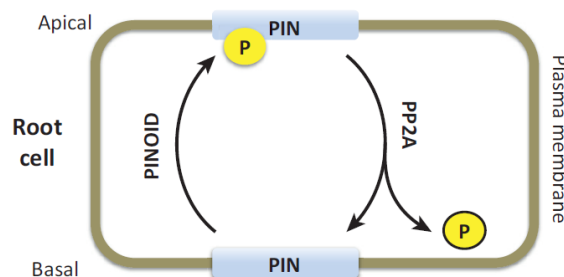


Figure 29. Régulation de la polarité du transporteur d'auxine PIN1 par phosphorylation. Figure adaptée de Glen Uhrig *et al.* (2013).

Les protéines phosphatases PP5

Il existe 2 protéines PP5 qui correspondent à 2 transcrits alternatifs du même gène chez *A. thaliana*. Cet épissage alternatif contrôle la localisation subcellulaire de la protéine. En effet, la forme la plus courte est retrouvée dans le cytoplasme et le noyau tandis que la forme la plus longue est retrouvée dans le réticulum endoplasmique (de la Fuente van Bentem 2003). La protéine phosphatase PP5 est impliquée dans de nombreux processus biologiques incluant la résistance aux stress biotiques, la tolérance aux températures extrêmes et la détection de la lumière (Uhrig *et al.* 2013).

Les protéines phosphatases PP7

Les PP7 possèdent un domaine conservé de fixation de la calmoduline. Ces enzymes montrent également une séquence d'adressage au noyau en C-terminal (Nuclear Localization Signal, NLS ; Figure 27). Les PP7, comme les PP1, sont impliquées dans la régulation de l'ouverture des stomates de façon lumière dépendante. L'hypothèse est qu'à l'obscurité, la protéine Hypersensitive to Red and Blue 1 (HRB1) est maintenue déphosphorylée par PP7, l'empêchant de former un complexe permettant l'activation des pompes à protons et l'ouverture des stomates (Sun *et al.* 2012).

Les protéines phosphatases PPKL et SLP

Les PPKL possèdent des répétitions en tandem d'un domaine appelé Kelch en N-terminal. Ce domaine est connu pour faciliter les interactions protéine-protéine (Kerk *et al.* 2007). Chez *A. thaliana*, il existe 4 PPKL : BSU1, BSL1, BSL2 et BSL3. Seul BSU1 a un rôle bien caractérisé (Uhrig *et al.* 2013). Son rôle dans la signalisation des brassinostéroïdes a été décrit ci-dessus (GSK3 kinases).

La sous famille des SLP possède 2 représentantes, SLP1 et SLP2 chez *A. thaliana*. La phosphatase SLP1 est spécifiquement exprimée dans l'appareil foliaire tandis que SLP2 est spécifiquement exprimée dans les racines. Ces 2 enzymes sont insensibles aux inhibiteurs classiques des sérine/thréonine phosphatases. Leur rôle est encore inconnu (Uhrig and Moorhead 2011).

Les protéines métallophosphatases PP2C, une classe à part

Les protéines phosphatases PP2C forment une classe à part entière des sérine/thréonine phosphatases car ce sont des métallophosphatases, leur activité est dépendante des ions Mg^{2+} et/ou Mn^{2+} . Chez *A. thaliana*, 80 membres ont été identifiés, dont la majorité est impliquée dans la réponse des plantes aux stress (Schweighofer *et al.* 2004). Cette sous famille est encore divisée en 6 classes, nommées clades A à F (Fuchs *et al.* 2013). Les clades les mieux décrits dans la littérature sont abordés ci-dessous.

Le clade des PP2C A contient, en outre, 2 protéines dont la fonction est redondante et liée à la régulation négative de l'hormone ABA par feedback négatif (Figure 30 ; Merlot *et al.* 2001). Les détails de cette régulation sont encore mal connus mais ces enzymes participent à révoquer l'effet de l'ABA sur l'inhibition de la germination, de la croissance racinaire ou encore sur la fermeture des stomates (Fuchs *et al.* 2013).

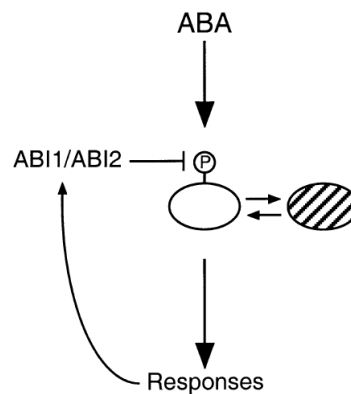


Figure 30. Rôle d'ABI1 et ABI2 dans la signalisation de l'acide abscissique. Figure issue de Merlot *et al.* (2001).

Les PP2C du clade B sont impliquées dans la régulation des cascades de phosphorylation des MAP kinases. Ce clade contient 6 membres chez *A. thaliana*, regroupés sous le terme APC2 (*Arabidopsis* phosphatase 2C). Ces phosphatases possèdent un domaine de reconnaissance des MAPK en N-terminal leur permettant de reconnaître et de déphosphoryler ces kinases. Par exemple, 4 de ces 6 enzymes sont capables de déphosphoryler et d'inactiver MKP6, vue à plusieurs reprises dans cette partie (Fuchs *et al.* 2013).

Les PP2C du clade C contiennent 2 protéines phosphatases avec des fonctions redondantes, POLTERGEIST (POL) et POLTERGEIST-LIKE (PLL) (Song and Clark 2005). Ces 2 enzymes contrôlent l'activité et le maintien des méristème foliaires et racinaires à travers la régulation de l'expression de facteurs de transcription, tels que WUSHEL et CLAVATA (Fuchs *et al.* 2013).

c) Les tyrosines protéines kinases et phosphatases

Comme nous l'avons vu, les Receptor Like Kinases (RLK) sont historiquement et principalement représentées par des sérine/thréonine kinases. Néanmoins, depuis 2009, plusieurs RLK de type tyrosine kinase ont été identifiées, en commençant par un récepteur des brassinostéroïdes (Oh *et al.* 2009). Les brassinostéroïdes sont essentiels au développement et à la mise en place de l'architecture des organes végétaux et jouent un rôle dans la réponse aux stress abiotiques. Leur rôle repose principalement sur l'interaction de ce groupe d'hormones avec d'autres hormones, telle que l'auxine (Ahammed *et al.* 2015). En l'absence de brassinostéroïdes, les protéines BKI1 et BIK1 régulent de façon négative l'activation de la protéine BRI1. La perception de l'hormone entraîne la phosphorylation de BKI1 et BIK1 et lève ainsi l'inhibition de la tyrosine protéine kinase BRI1. Cette levée d'inhibition permet l'interaction physique entre les domaines kinases de BRI1 et BAK1 qui contrôlent la signalisation des brassinostéroïdes (Figure 31 ; Macho *et al.* 2015).

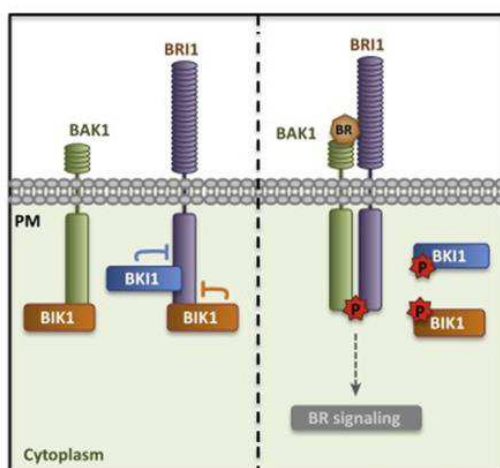


Figure 31. Système de réception des brassinostéroïdes. Figure issue de Macho *et al.* (2015).

Les phosphotyrosine phosphatases sont représentées par 2 groupes distincts, les PTP (PhosphoTyrosine Phosphatase) et les DsPTP (Dual specificity PhosphoTyrosine Phosphatase). Les premières ne réalisent que la réaction de déphosphorylation d'un résidu tyrosine tandis que les deuxièmes peuvent également déphosphoryler les résidus sérine et thréonine (Luan 2003). Peu d'informations sont disponibles concernant les substrats ou les fonctions de la vingtaine de PTP d'*A. thaliana* (Luan 2003). Les DsPTP sont quant à elles mieux caractérisées, elles interagissent avec les cascades de phosphorylation liées au MAP kinases. Par exemple la MAP kinase Phosphatase 1 (MKP1) déphosphoryle MKP6 en réponse à une forte concentration de L-glutamate afin de réguler la division cellulaire et l'élongation racinaire (J. S. López-Bucio *et al.* 2018).

d) Les histidines protéines kinases

Chez *A. thaliana*, cette famille de 11 membres est associée à des mécanismes de transduction de signal de type "systèmes à 2 composants" et englobe par exemple les récepteurs à l'éthylène et aux cytokinines (Figure 32 ; Nongpiur *et al.* 2012). Les histidines kinases catalysent leur autophosphorylation sur un résidu histidine puis le transfert d'un groupe phosphate sur un résidu aspartate du domaine receveur, le groupement aspartyl-phosphate étant l'élément déclencheur de la signalisation (Lieser *et al.* 2005). Certaines enzymes peuvent également jouer le rôle de phosphatase, c'est le cas pour la protéine AHK4 (Mähönen *et al.* 2006). Pour illustrer la fonction des histidines kinases, la signalisation du groupe d'hormones des cytokinines est brièvement expliquée ci-dessous.

Les cytokinines entrent dans les cellules par le transporteur PUP14 (Kang *et al.* 2017). Une fois dans le cytoplasme, les récepteurs histidine kinases de l'hormone se trouvent au niveau du réticulum endoplasmique. Lorsque les cytokinines se fixent sur leurs récepteurs (AHK2, AHK3 et AHK4), ceux-ci s'autophosphorylent sur un résidu histidine conservé. Ensuite, le groupement phosphorylé est transféré des AHK vers les facteurs de transcription liés à la signalisation des cytokinines. Ces facteurs de transcription sont soit inhibiteur (type A), soit activateur (type B), de la transcription des gènes de réponse à l'hormone (Nongpiur *et al.* 2012).

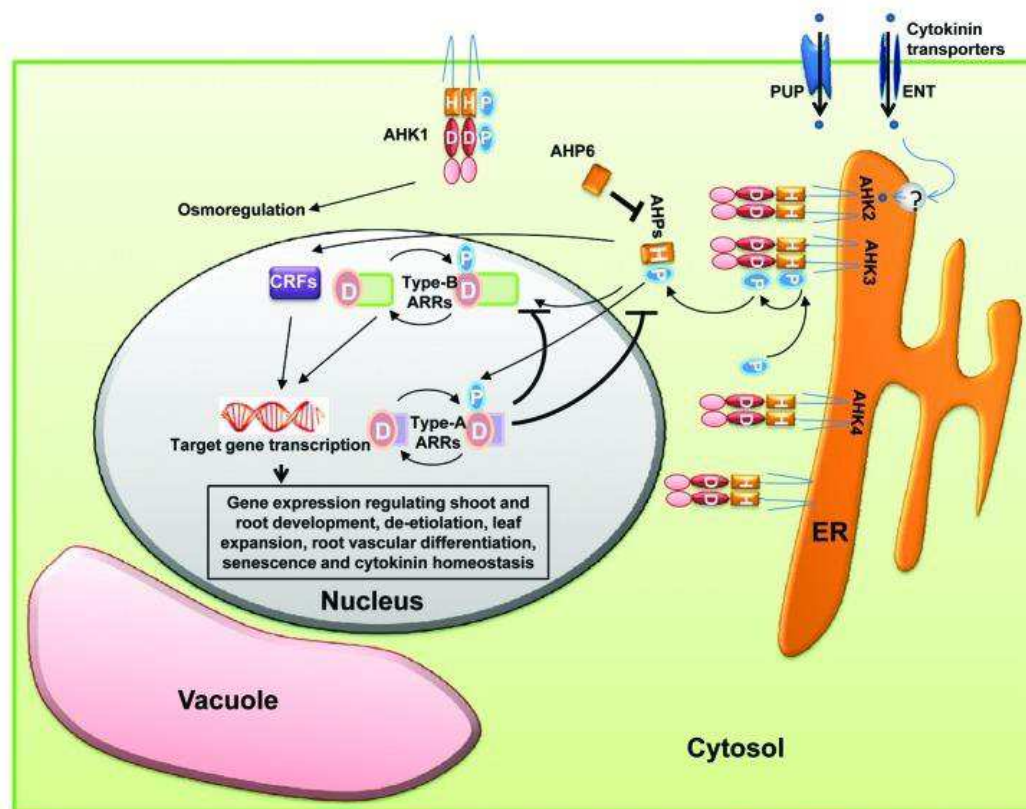


Figure 32. Modèle de la signalisation des cytokinines. Figure issue de Nongpiur *et al.* (2012).

4. La méthylation des protéines, une modification post-traductionnelle essentielle

a) Diversité des réactions de méthylation des protéines

La méthylation des protéines est réalisée par des protéines méthyltransférases qui catalysent le transfert de groupements méthyles depuis un donneur universel, la S-adénylméthionine (AdoMet ou SAM), sur une protéine (Figure 33). Les produits de la réaction sont la protéine méthylée et la S-adénylhomocystéine (AdoHcy ou SAH). Cette dernière est connue pour inhiber l'activité des méthyltransférases AdoMet-dépendantes, enzymes indispensables à de nombreuses fonctions cellulaires. Afin de maintenir la fonctionnalité du système, l'AdoHcy doit donc être dégradée par l'action d'AdoHcy hydrolases puis recyclée en AdoMet dans le "cycle des méthyles" (Ravanel *et al.* 1998).

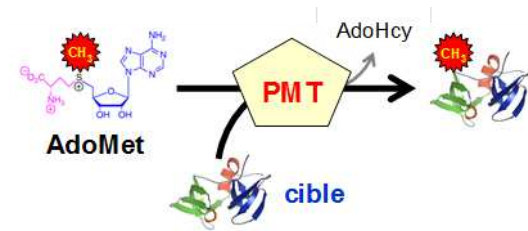
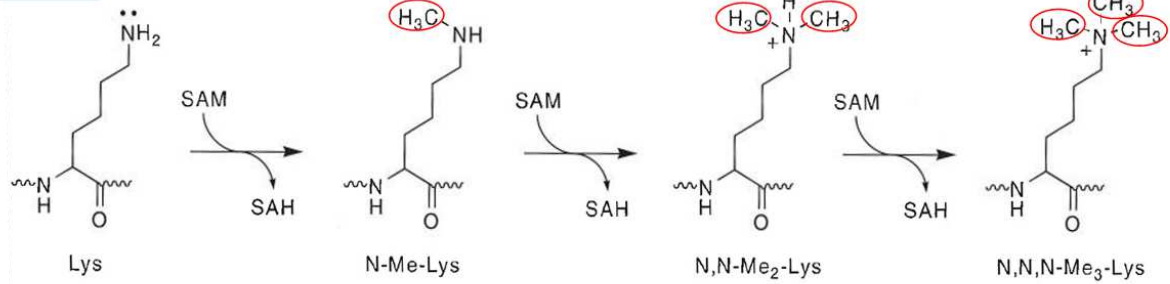


Figure 33. Représentation schématique de la méthylation d'une protéine cible par une protéine méthyltransférase (PMT). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyle de l'AdoMet sur une protéine pour former une protéine méthylée et de l'AdoHcy.

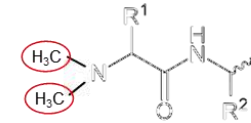
Quatre types d'atomes peuvent être méthylés par les protéines méthyltransférases. Les réactions les plus communes interviennent sur des atomes d'azote (*N*-méthylation) et d'oxygène (*O*-méthylation). De manière moins fréquente, elles peuvent également se produire sur des atomes de carbone (*C*-méthylation) et de soufre (*S*-méthylation). La *N*-méthylation peut intervenir sur (i) l'atome d'azote de la chaîne latérale des acides aminés lysine, arginine, glutamine, asparagine et histidine, et (ii) sur l'atome d'azote *N*- α des acides aminés présents à l'extrémité *N*-terminale des protéines. La *O*-méthylation est retrouvée sur les résidus glutamate et aspartate et sur l'acide aminé présent au niveau de l'extrémité *C*-terminale des protéines. La *C*-méthylation prend place sur les résidus arginine et glutamine. Enfin, la *S*-méthylation est spécifique de la fonction thiol des résidus cystéine (Figure 34).

A N-méthylation des résidus Arg, Lys, Asn, Gln et His

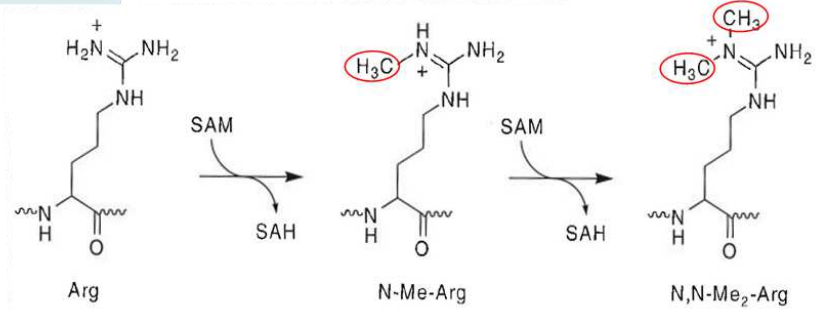
Lysine



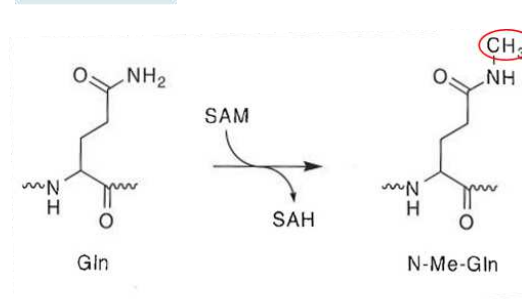
Acide aminé N-terminal



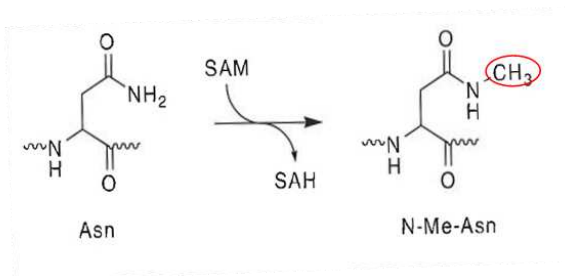
Arginine



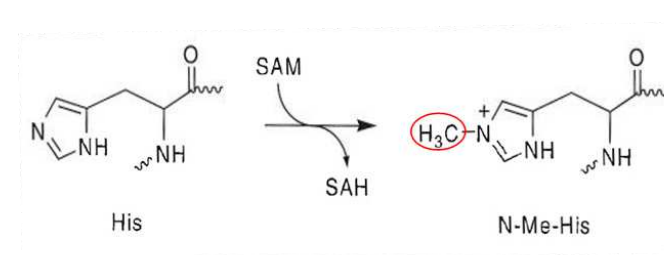
Glutamine



Asparagine

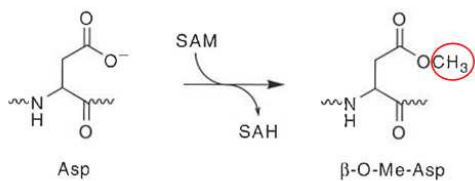


Histidine

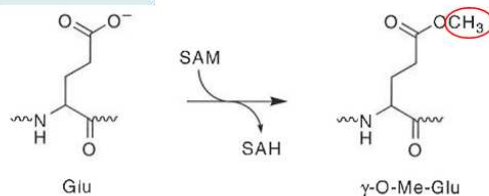


B O-méthylation des résidus Asp et Glu

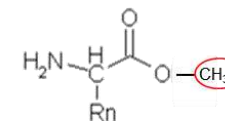
Aspartate



Glutamate

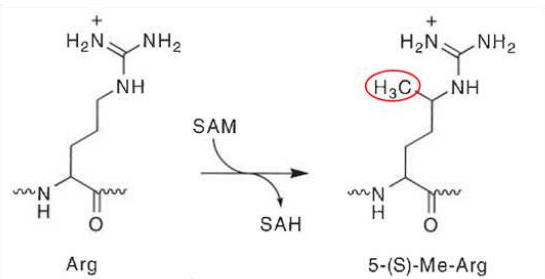


Acide aminé C-terminal

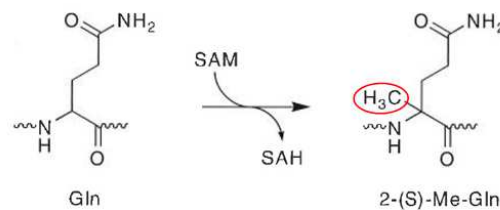


C C-méthylation des résidus Arg et Gln

Arginine



Glutamine



D S-méthylation des résidus Cys

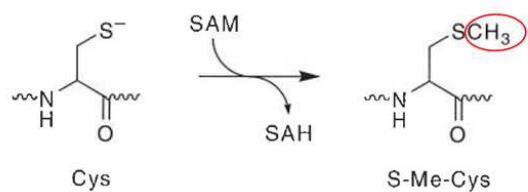


Figure 34. Représentation des 4 classes de réactions de méthylation (N-, O-, C- et S-méthylation) intervenant sur différents acides aminés. Ces schémas réactionnels sont issus de Walsh (2006).

Environ 1 à 2% des gènes des organismes procaryotes et eucaryotes codent pour des méthyltransférases AdoMet-dépendantes (Katz *et al.* 2003; Petrossian and Clarke 2011 ; Wlodarski *et al.* 2011). Ces enzymes possèdent diverses spécificités de substrat et peuvent méthyler des métabolites, des lipides, des protéines ou des acides nucléiques. Les méthyltransférases AdoMet-dépendantes peuvent être identifiées au sein d'un génome grâce à la reconnaissance de leur domaine de fixation de l'AdoMet et éventuellement à leur repliement tridimensionnel. Ces enzymes ont été classées en cinq familles structurales (Figure 35 ; Schubert *et al.* 2003). Les enzymes de la classe I sont caractérisées par un repliement structural caractéristique de type 'seven beta-strand'. Cette classe renferme des méthyltransférases ayant pour substrats des métabolites, de l'ADN ou des protéines. Ces dernières enzymes modifient une grande diversité de résidus : *L*-isoaspartyl, glutamine, arginine ou lysine. La classe II comprend uniquement le domaine de réactivation de la méthionine synthase cobalamine-dépendante (MetH), enzyme qui catalyse la synthèse de méthionine par méthylation du groupement thiol de l'homocystéine (Ravanel *et al.*, 1998). La classe III est composée de la precorrin-4 C11-méthyltransférase qui intervient dans la biosynthèse de cobalamine (Schubert *et al.*, 2003). La classe IV contient les enzymes spoU et trmD qui forment la superfamille des ARN méthyltransférases SPOUT. Les ARN méthyltransférases de la famille spoU sont impliquées dans la méthylation du ribose de l'ARN. Quant aux ARN méthyltransférases trmD, elles catalysent le transfert d'un groupement méthyle de l'AdoMet sur l'atome N¹ de la guanine 37 des ARN de transfert (Toyooka and Hori 2007). Il a été montré que la protéine YOR021C de *Saccharomyces cerevisiae* est une enzyme de la famille SPOUT impliquée dans la méthylation d'une arginine sur la protéine ribosomale Rps3 (Young *et al.* 2012). Enfin, la classe V est celle ayant été décrite le plus récemment. A ce jour, elle contient exclusivement des protéines méthyltransférases impliquées dans la modification de résidus lysine. Ces enzymes partagent un repliement structural particulier caractérisé par un domaine catalytique nommé SET (Qian and Zhou 2006). On distingue 2 types d'enzymes à domaine SET, celles ayant un domaine continu et celles, moins nombreuses, pour lesquelles le domaine SET est interrompu sur la séquence primaire mais reconstitué dans la structure tridimensionnelle.

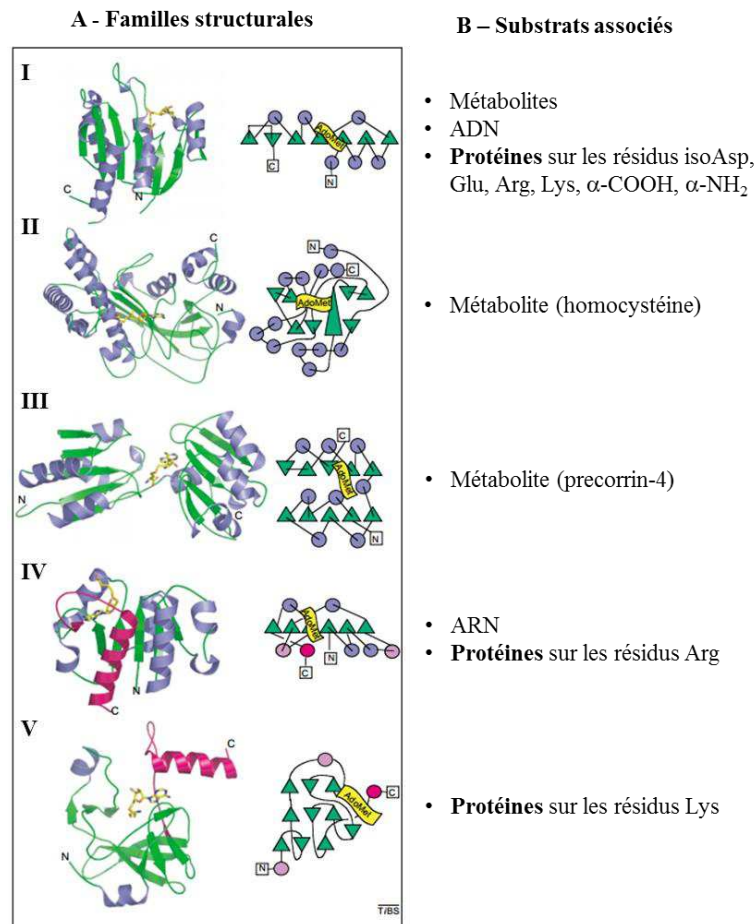


Figure 35. Classification des méthyltransférases AdoMet dépendantes en 5 classes structurales. Pour chaque classe la structure tertiaire est représentée à gauche et un diagramme topologique est présenté à droite. La liste des enzymes appartenant à chaque classe est restreinte aux différents types de substrats manipulés. Les protéines méthyltransférases sont indiquées en gras. Figure adaptée de Schubert *et al.* (2003).

Pour résumer, les protéines méthyltransférases se retrouvent dans 3 familles structurales. Une seconde classification de ces enzymes peut ensuite être réalisée en fonction de la nature de l'atome et du résidu qui sont modifiés. Cette classification permet alors de distinguer quatre grandes familles : (i) les protéines L-isoaspartyl méthyltransférases (PIMT) qui catalysent la O-méthylation de l'isoaspartate ; (ii) les isoprénycystéine méthyltransférases (ICMT) qui catalysent la O-méthylation d'une cystéine isoprénylée ; (iii) les protéines arginine méthyltransférases (PRMT) qui catalysent la mono- et diméthylation des résidus arginines ; et (iv) les protéines lysine méthyltransférases (PKMT) qui catalysent la mono-, di- et triméthylation des résidus lysines (Figure 36). Outre ces familles, la caractérisation fonctionnelle récente de nouvelles méthyltransférases a conduit à l'identification d'enzymes impliquées dans les réactions de S-méthylation de résidus cystéine, de N-méthylation de résidus His, de O-méthylation de résidus glutamine, et de N- et C-méthylation de résidus glutamine (Figure 36). Dans cette étude, seule la N-méthylation des résidus lysine et arginine sera abordée.

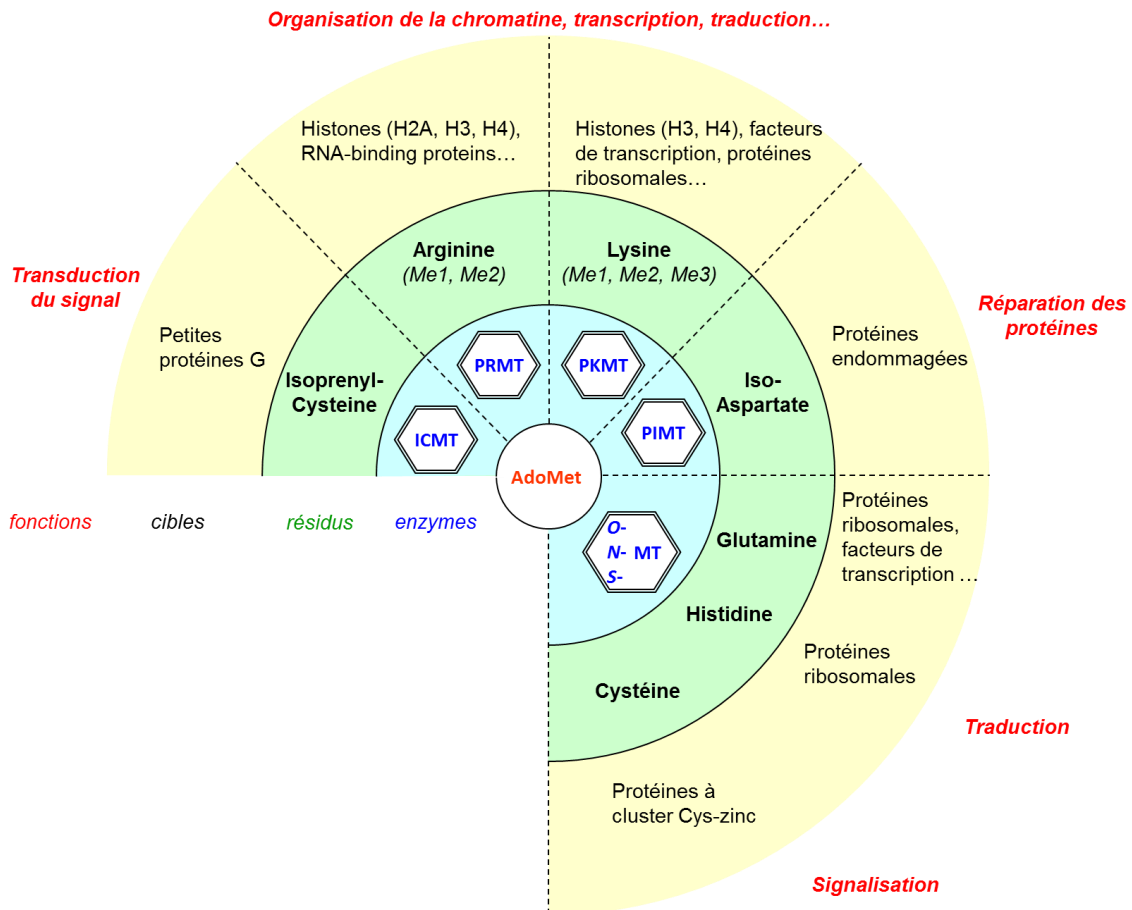


Figure 36. Illustration de la diversité des réactions de méthylation des protéines et de leur implication dans divers processus cellulaires.

b) La méthylation/déméthylation des arginines

(1) Les protéines arginine méthyltransférases (PRMT)

Les PRMT appartiennent à la superfamille de méthyltransférases de type seven β -strand (Figure 35). Les membres de la famille PRMT diffèrent au niveau de leurs séquences primaires, de leurs spécificités de substrat et de leurs localisations subcellulaires (Herrmann *et al.* 2009). Chez *S. cerevisiae* le génome code pour 3 PRMT (HMT1, Hsl7 et Rmt2). Le nombre d'enzymes passe à 9 chez l'homme (*hPRMT1-9*), la drosophile (*DART1-9*), et 11 chez les plantes (*AtPRMT1a*, At2g19670 ; *AtPRMT1b*, At4g29510 ; *AtPRMT3*, At3g12270 ; *AtPRMT4a*, At5g49020 ; *AtPRMT4b*, At3g06930 ; *AtPRMT5*, At4g31120 ; *AtPRMT6*, At3g20020 ; *AtPRMT7*, At4g16570 et *AtPRMT10*, At1g04870) (Ahmad *et al.* 2011). Les enzymes les plus conservées dans l'évolution des eucaryotes sont PRMT1-3-5, ce qui suggère une implication de ces méthyltransférases dans la machinerie cellulaire basale (Bachand 2007). Aucune PRMT n'a été détectée chez les procaryotes.

Classification des PRMT

Les résidus arginine contiennent 2 atomes d'azote ω situés en position terminale et un atome d'azote δ situé à l'intérieur de la chaîne latérale. Ces 3 atomes d'azote sont liés à des atomes d'hydrogène qui peuvent être remplacés par des groupements méthyles pour former différents isomères de méthyl-arginine (Figure 37). En fonction du type de résidu méthyl-arginine formé, les PRMT peuvent être classées en 4 groupes (Ahmad and Cao 2012). Les PRMT de type I catalysent la formation de ω -*N*-monométhyl-arginine (MMA) et de ω -*N*-diméthyl-arginine asymétrique (aDMA). Cette classe inclut les enzymes PRMT1-2-3-4-6 et 8. Les PRMT de type II catalysent la synthèse de MMA et de ω -*N*-diméthyl-Arg symétrique (sDMA). Cette classe renferme les enzymes PRMT5 et Hsl7. Les PRMT de type III catalysent uniquement la formation de MMA et seule PRMT7 possède cette activité catalytique. Les PRMT de type IV catalysent la formation de δ -monométhyl-arginine. Jusqu'à présent une seule PRMT catalysant cette réaction a été identifiée : il s'agit de l'arginine méthyltransférase de levure (RMT2) (Figure 37 ; Ahmad and Cao 2012).

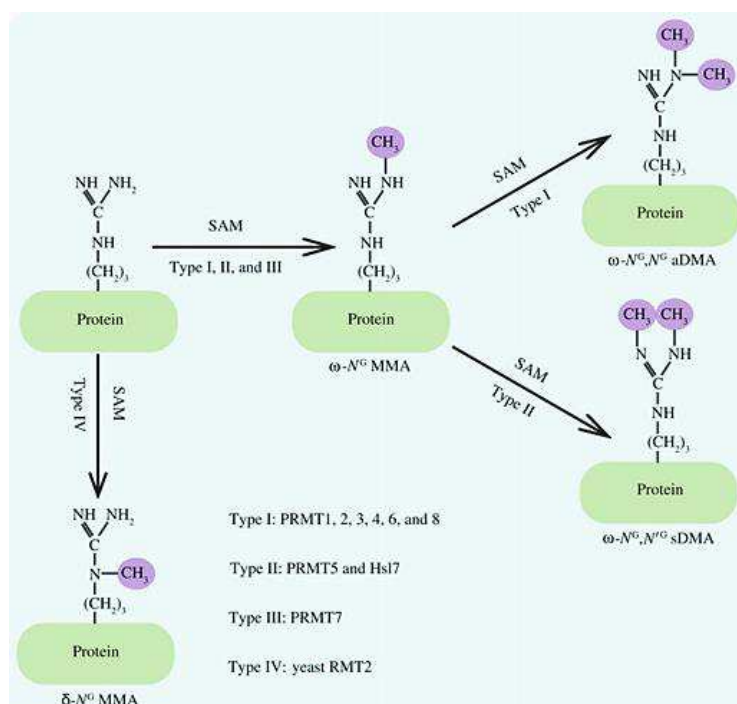


Figure 37. Formation de différents résidus arginines méthylés par les PRMT. Les PRMT de type I catalysent la formation de ω -*N*-mono-méthyl-arginine (MMA) et de ω -*N*-diméthyl- arginine asymétrique (aDMA). Les PRMT de type II catalysent la formation de MMA et de ω -*N*-diméthyl- arginine symétrique (sDMA). La PRMT de type III (PRMT7) catalyse la formation de MMA. Chez la levure, une PRMT de type IV catalyse la méthylation de δ -monométhyl- arginine. Figure issue de Ahmad & Cao (2012).

Effets induits par la méthylation des arginines

L'addition d'un ou de plusieurs groupements méthyles ne modifie pas la charge des arginines. Néanmoins elle augmente l'hydrophobicité et l'encombrement stérique et empêche la formation de liaison hydrogène, pouvant ainsi affecter la fonction des protéines (Pahlich *et al.* 2006). La méthylation des arginines des protéines cibles influence les interactions protéine-protéine, les interactions protéine-ADN, les interactions protéine-ARN, la stabilité des protéines, la localisation subcellulaire des protéines et leur activité enzymatique (Ahmad and Cao 2012).

Les substrats des PRMT

Le dogme concernant les substrats des PRMT a longtemps été que ces enzymes méthylent des protéines qui arborent des motifs nommés GAR car riches en résidus glycines et arginines. Chez les mammifères, qui ne possèdent que 2 classes de PRMT, il a été montré que les enzymes de classe I reconnaissent généralement les substrats contenant des motifs GAR et les enzymes de classe II peuvent méthyler des résidus arginines isolés ou présents au sein de motifs GAR (Bedford and Richard, 2005). De plus, il s'avère que les PRMT possèdent une certaine flexibilité de substrat et peuvent méthyler des protéines histones et non-histones (Ahmad & Cao, 2012).

Processus cellulaires régulés par la méthylation des arginines

Les protéines méthylées sur des arginines sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires incluant le processing et le transport des ARN, la régulation de la transcription, la transduction du signal, la réparation de l'ADN, la traduction, l'apoptose etc. Les substrats méthylés par les PRMT d'*A. thaliana* ainsi que les processus cellulaires affectés sont présentés dans le Tableau 4. Chez *A. thaliana* PRMT1a et PRMT1b diméthylent asymétriquement les histones H2A et H4 et la fibrillarine (protéine de liaison à l'ARN) *in vitro*. La méthylation de ces substrats implique probablement cette PTM dans la transcription et le processing des ARN (Tableau 4) (Yan *et al.*, 2007). Chez la levure et chez l'Homme PRMT3 co-sédimente avec la sous-unité ribosomale 40S et méthyle la protéine ribosomale RPS2 (Swiercz *et al.*, 2005). Des cellules de levure déficientes en PRMT3 présentent un déséquilibre dans le ratio des sous-unités 40S et 60S disponibles (Bachand and Silver 2004). Cette enzyme régule la synthèse des ARN pré-ribosomiaux, affectant ainsi le développement de la plante (Hang *et al.* 2014). Chez *A. thaliana* les 2 protéines PRMT4a/b méthylent H3R17 de manière redondante. En outre PRMT4a et PRMT4b régulent le moment de la floraison *via* le gène *FLC* (*Flowering locus C*) qui code pour un facteur de transcription régulant négativement la transition du stade végétatif au stade reproductif. En effet, aucun des simples mutants *prmt4a* et *prmt4b* ne présente de défaut développemental mais le double mutant *prmt4a prmt4b*

présente un retard de floraison (Tableau 4) (L. Niu *et al.* 2008). Chez *A. thaliana* PRMT5 catalyse la méthylation de H4R3, marque répressive dans le promoteur de *FLC*. La mutation *prmt5* engendre donc une floraison retardée ainsi qu'un retard de croissance et des feuilles recourbées de couleur vert sombre (Pei *et al.* 2007). Par ailleurs, PRMT5 jouerait un rôle dans la régulation du cycle circadien *via* l'épissage d'ARN messagers de certains gènes (Sanchez *et al.* 2010), dans la réponse des plantes au stress salin *via* la méthylation de H4R3 (Z. Zhang *et al.* 2011) ainsi que dans la maintenance des cellules souches de l'apex racinaire en réponse à un stress génotoxique (Q. Li *et al.* 2016). Chez l'Homme PRMT6 est impliquée dans la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN et l'immunité contre l'infection du VIH. Chez les plantes la fonction jouée par PRMT6 est inconnue. Etant donné le rôle de PRMT6 chez l'Homme, l'homologue végétal de PRMT6 pourrait jouer un rôle dans la réponse de la plante à un pathogène (Ahmad and Cao 2012). Chez l'Homme PRMT7 a été impliquée dans des rôles de régulation de la transcription, la réparation des dommages de l'ADN, l'épissage des ARN, la différenciation cellulaire et le développement de métastases (Y. Feng *et al.* 2013). Cette enzyme est active sur toutes les histones recombinantes humaines mais H2B est un substrat préférentiel. L'identification d'un motif de reconnaissance du substrat de type arginine-X-arginine devrait aider à l'identification d'autres substrats de PRMT7 et à l'étude détaillée de ses fonctions biologiques (Y. Feng *et al.* 2013). Aucune donnée n'est disponible à ce jour concernant PRMT7 chez les plantes. Chez *Arabidopsis* PRMT10 méthyle H4R3 et le mutant *prmt10* présente un phénotype similaire à celui de *prmt5* (Tableau 4). Néanmoins des données indiquent que PRMT5 et PRMT10 régulent le moment de la floraison par des voies différentes (Niu *et al.* 2007). Finalement, PRMT11 méthyle la protéine MBD7, une protéine qui se lie à l'ADN méthylé (Scebba *et al.* 2007). Dans cette étude les auteurs posent l'hypothèse que cette interaction pourrait être la preuve de l'existence d'un lien entre la méthylation des protéines et celle de l'ADN.

Tableau 4. Méthylation des arginines chez *A. thaliana* : enzymes, substrats et processus cellulaires impactés.

PRMT	Substrats	Processus cellulaires impactés par la méthylation des Arg
PRMT1a	H2A	Transcription, processing des ARN
PRMT1b	H4 Fibrillarine	
PRMT3	?	Stabilité des ARN pré-ribosomiaux
PRMT4a	H3R17	Régulation de la floraison
PRMT4a/PRMT4b	FLC	
PRMT5	H4R3	Floraison, horloge circadienne, réponse au stress salin, stress génotoxique (cellules souches racinaires)
PRMT6	?	
PRMT7	?	
PRMT10	H4R3	Régulation de la floraison
PRMT11	MBD7	Lien entre méthylation ADN/protéine ?

Régulation de l'activité des PRMT

L'activité méthyltransférase des PRMT est influencée par la liaison de partenaires protéiques qui peuvent inhiber, activer ou altérer la spécificité de substrat des enzymes (Bedford and Clarke 2009). Par exemple, l'interaction entre les enzymes PRMT1 et PRMT2 humaines augmente l'activité catalytique de PRMT1 (Pak *et al.* 2011). L'activité des PRMT peut également être influencée par des PTM. Par exemple, la phosphorylation de PRMT3 humaine sur sa tyrosine 87 augmente son interaction avec son substrat RPS2 ainsi que son activité catalytique (Handrkova *et al.* 2011).

(2) Déméthylation des résidus arginine

La méthylation des histones sur les résidus lysine et arginine a longtemps été considérée comme une marque irréversible, notamment en raison de la robustesse de la liaison covalente carbone-azote. Néanmoins, il est apparu que cette modification peut être régulée de manière dynamique par des 'writers', les méthyltransférases, et des 'erasers', les déméthylases. Ce caractère dynamique de la *N*-méthylation s'applique également aux substrats non-histones qui peuvent être pris en charge par des déméthylases (Lanouette *et al.* 2014).

La recherche de déméthylases spécifiques des résidus arginine est restée vaine jusqu'en 2007. Chang *et al.* (2007) ont alors identifié l'enzyme à domaine Jumonji JMJD6 comme étant capable de déméthyle H3R2 et H4R3 *in vitro* et *in vivo* selon le schéma réactionnel présenté Figure 38. Les rôles de ces déméthylations sont encore hypothétiques.

Par ailleurs les données de Chang *et al.* (2007) font l'objet de controverses puisque JMJD6 reste la seule arginine déméthylase connue à l'heure actuelle (Poulard *et al.* 2016).

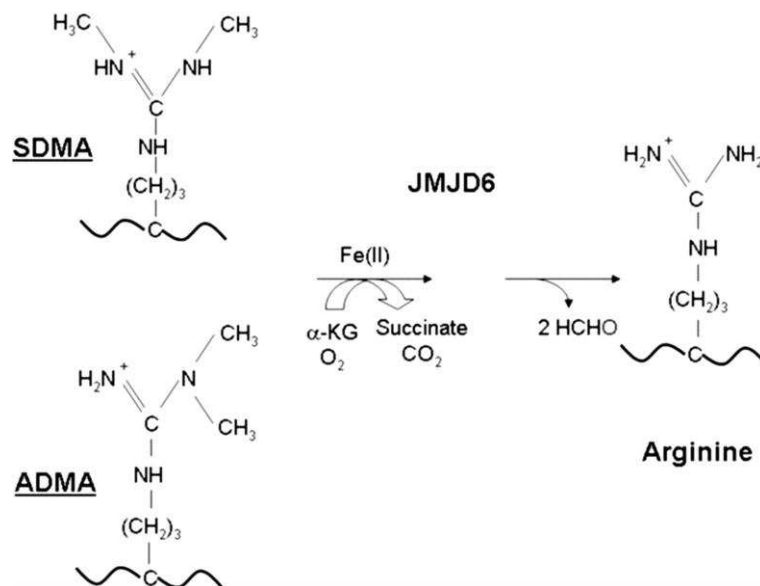


Figure 38. Déméthylation des résidus Arg diméthylés par JMJD6. Figure issue de Litt *et al.* (2009).

Un mécanisme alternatif permettant la déméthylation des résidus arginine est possible. Il s'agit de la déimination. Cette réaction convertit les résidus arginine non modifiés et les arginines mono-méthylées en citrulline (Figure 39). Ces réactions sont catalysées par la 'peptidyl arginine deiminase 4' (PADI4 ; Bannister and Kouzarides 2005). Très peu de données sont disponibles sur cette enzyme et sur ses rôles putatifs. Encore une fois ces résultats font l'objet de controverses.

Il est donc difficile de conclure à l'heure actuelle sur la réversibilité de la méthylation des résidus arginine des protéines qui semble être une modification très stable (Ahmad and Cao 2012).

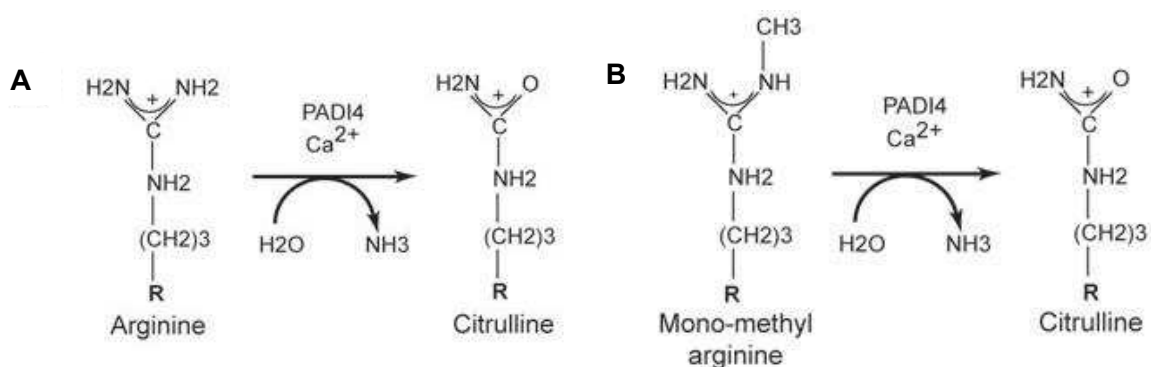


Figure 39. Déimination des résidus Arg non méthylés (A) et monométhylés (B) par PADI4. Les 2 réactions conduisent à la formation de citrulline.

c) La méthylation/déméthylation des lysines sur les protéines non-histones

Cette partie a donné lieu à la publication d'une revue dans *Journal of Experimental Botany* (Serre *et al.* 2018). La version non éditée de la revue est présentée ici.

An outlook on lysine methylation of non-histone proteins in plants

Nelson B.C. Serre, Claude Alban, Jacques Bourguignon, Stéphane Ravanel
Univ. Grenoble Alpes, INRA, CEA, CNRS, BIG, PCV, F-38000 Grenoble, France

Abstract

Protein methylation is a very diverse, widespread and important post-translational modification affecting all aspects of cellular biology in eukaryotes. Methylation on the side chain of lysine residues in histones has received considerable attention due to its major role in chromatin structure and the epigenetic regulation of gene expression. Since the turn of the 21st century, lysine methylation of non-histone proteins emerged as a very common modification contributing to the fine-tuned regulation of protein function. In plants, our knowledge in this field is much more fragmentary than in yeast and animal cells. In this review, we describe the plant enzymes involved in the methylation of non-histone substrates. Also, we review historical and recent advances in the identification of non-histone lysine-methylated proteins in photosynthetic organisms. Last, we discuss the current knowledge and future challenges about the role of protein lysine methylation in regulating molecular and cellular functions in plants.

Running title: Lysine methylation of non-histone proteins in plants

Keywords: lysine, metabolism, methylation, methyltransferase, non-histone protein, post-translational modification, regulation, translation, signalling

Abbreviations: AdoMet, S-adenosyl-L-methionine; CaM, calmodulin; eEF1A, eukaryotic elongation factor 1 alpha; KDM, protein lysine demethylase; KMT, protein lysine methyltransferase; LSMT, large subunit Rubisco methyltransferase; RPL11, ribosomal protein L11; SBS, seven-beta-strand; SILAC, stable isotope labelling with amino acids in cell cultures.

Introduction

Protein methylation was first described more than fifty years ago but is a relatively nascent area of research. Indeed, the initial reports of methylated lysine residues in flagellar proteins from *Salmonella* (in 1959) and in mammalian histones (in 1964) were followed by decades of rather limited interest until the physiological role for protein methylation was documented in the late 1990s (Murn and Shi 2017). Since then our knowledge about protein methylation increased exponentially due to extensive research in the attractive field of histone modifications and epigenetics together with technical advances, mainly in protein mass spectrometry. Currently, methylation is on the fourth position within post-translational modifications in terms of abundance with more than 18,000 methylation sites described in ~7,400 proteins (statistics from iPTMnet v4.1, August 2017; (Ross *et al.* 2017). This modification is also very diverse since methylation can occur on nitrogen, carbon or sulfur atoms of protein residues. Thus, the side chains of eight residues (lysine, arginine, histidine, glutamate, aspartate, glutamine, asparagine, and cysteine), together with the terminal α -amino and α -carboxyl groups can be methylated by specific enzymes. Also, methylation of iso-aspartate residues that spontaneously occur at aspartyl and asparaginyl sites in proteins is a crucial step in the repair of damaged proteins (Oge *et al.* 2008). Overall, protein methylation is now established as a widespread and versatile modification that is an integral part of cellular biology.

The *N*-methylation of histone and non-histone proteins occurs primarily on lysine and arginine residues. Protein lysine methylation is evolutionary conserved, although it is far less abundant in bacteria than in eukaryotes. The ϵ -amino group of lysine can be methylated up to three times, resulting in mono-, di-, and trimethyl-lysine (Figure 1A). Within the early stages of protein lysine methylation research, the dogma was that the modification was stable and irreversible, unlike other modifications such as phosphorylation. The identification of protein lysine demethylases indicated that this modification can be reversible (M. Shi, Li, and Sui 2004). Thus, protein lysine methylation can be either dynamic to serve regulatory purposes or can be static to expand the repertoire of functions of the modified target.

Mono-, di-, or trimethylation of lysine in a target protein gives rise to distinctive biological readouts. Indeed, although the methyl group is one of the smallest post-translational modification, each methylation event removes a proton from the ϵ -amino group and thereby decreases the hydrogen bonding potential of lysine. Also, methylation increases moderately the hydrophobicity and bulkiness of the lysine side chain and, unlike other modifications such as acetylation, does not affect the overall charge of the residue (Figure 1A). Thus, changes of the physicochemical properties of lysine residues by methylation are rather subtle, which explains the difficulty to understand the biological outputs of the modification in non-histone proteins. However, evidence of lysine methylation-driven regulation has been obtained for a number of non-histone proteins since the turn of the 21st century (for reviews, see Lanouette *et al.* 2014; Falnes *et al.* 2016). This modification has been shown to regulate protein-protein and protein-nucleic acid interactions, protein stability, subcellular localization or enzyme activity in essential cellular processes including transcription, protein synthesis, signal transduction and metabolism (Lanouette *et al.* 2014; Falnes *et al.* 2016).

During the last 15 years, lysine methylation of non-histone proteins emerged as an important modification and has been extensively characterized in yeast and animal cells. In plants, our knowledge in this field is much more fragmentary. This review will cover historical and recent advances in the identification of lysine methylproteins in photosynthetic organisms together with the characterization of the enzymes involved in the deposition of methyl marks. Also, we will discuss the current knowledge and future challenges to decipher the role of protein lysine methylation in the biology of plants.

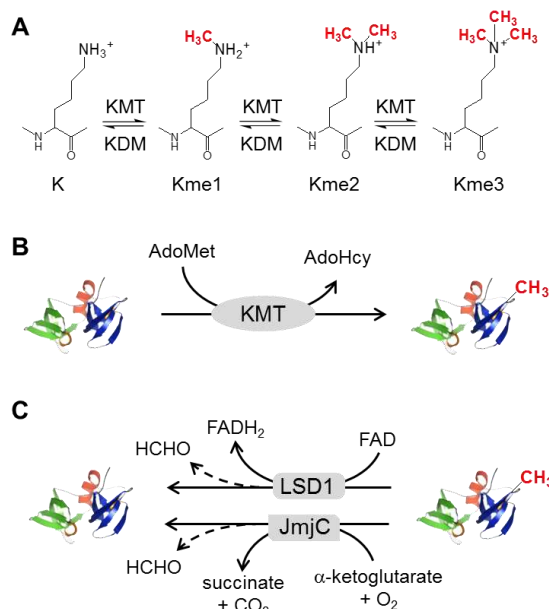


Figure 1. The biochemical mechanisms of protein lysine methylation and demethylation. A/ Lysine can accept up to three methyl groups on its terminal side-chain ϵ -amine, resulting in three methylation states (K_{me1} , K_{me2} , K_{me3}). Methylation does not modify the charge of lysine but decreases its capacity to make hydrogen bonds and induces a little increase in its hydrophobicity and steric hindrance. B/ Protein lysine methyltransferases (KMTs) catalyse the mono-, di- and/or trimethylation of lysine residues in an *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet) dependent process, releasing *S*-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy). C/ Protein lysine demethylases (KDMs) from the LSD1 and JmjC families catalyse the demethylation of lysine residues using different reaction mechanisms. JmjC enzymes demethylate all three lysine methylation states whereas LSD1 enzymes act only on mono- and dimethylated lysine residues. The hydroxymethyl intermediate that is formed during the reactions is subsequently hydrolysed to produce formaldehyde.

Enzymatic regulation of protein lysine methylation

The enzymes involved in methylation reactions are classified into five families according to distinct structural arrangements that bind the methyl-group donor *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet). Due to the diversity and importance of methylation in cellular biology there are hundreds of genes coding methyltransferases in eukaryotic genomes (Petrossian and Clarke 2011) and AdoMet is the second most widely used enzyme substrate after ATP (Schubert, Blumenthal, and Cheng 2003). Protein lysine methyltransferases (KMTs) belong to two families, the seven-beta-strand (SBS) superfamily and the SET domain family, also referred to as class I and class V methyltransferases, respectively. Both SBS and SET domain-containing enzymes catalyse an overall similar reaction with a methyl transfer from AdoMet to the ϵ -amino group of a specific lysine residue of the target protein, leaving the by-product *S*-adenosyl-L-homocysteine (Figure 1B). So far, SET domain-containing enzymes have been shown to catalyse only lysine methylation on histones and non-histone substrates. In contrast, the enzymes of the SBS superfamily methylate a wide array of substrates, including metabolites, DNA, RNA or proteins at lysine, arginine, histidine, glutamine or the α -amino group of the *N*-terminal residues (Petrossian and Clarke 2011; Falnes *et al.* 2016).

Most research on KMTs has focused on the SET domain family due to its essential role in histone methylation and epigenetic regulation. SET domain proteins, named after the three first *Drosophila* proteins containing this domain (Suppressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste, and Trithorax), have been found in all eukaryotic genomes and in numbers of bacterial genomes (Alvarez-Venegas 2014). The SET domain is about 130 residues and comprises non-contiguous conserved regions, known as nSET and cSET, separated by a variable iSET region that is thought to influence substrate specificity and catalytic activity (reviewed in Le and Fujimori 2012). These regions fold into a knot-like structure that forms the active site of the enzyme, organising AdoMet and the lysine binding sites at opposite ends of a methyl-transfer channel that accommodates the substrate side chain. As a result of this organisation many SET domain-containing KMTs are processive enzymes, meaning that the lysine residue can undergo multiple rounds of methylation without dissociation of the enzyme-substrate complex (Le and Fujimori 2012).

In land plants, about 50 genes coding SET domain-containing proteins have been identified (e.g. Ng *et al.* 2007; Aquea *et al.* 2011; Zhang and Ma 2012). Based on phylogenetic analyses and the organization of domains, SET domain proteins have been categorized into seven classes that are proposed to reflect their substrate specificity. Some enzymes from classes I to V are known to methylate histone substrates at different lysine residues (e.g. Lys27 and Lys36 in histone H3 for class I and II enzymes, respectively) (Ng *et al.* 2007; L. Zhang and Ma 2012). Proteins belonging to classes VI and VII are characterized by an insertion of 100 to 300 residues in the middle of the SET domain and are known or predicted to methylate non-histone substrates. In *Arabidopsis thaliana*, there are 15 genes coding SET domain proteins from classes VI and VII (Ng *et al.* 2007; L. Zhang and Ma 2012) (see Supplementary Table S1). Since the KMT-substrate relationship is still poorly described in plants (see below) this classification should be viewed with caution. Indeed, one has to keep in mind that some SET domain-containing enzymes involved in histone methylation (classes I to V) are also able to methylate non-histone substrates. Three examples of this type have been yet described in *Arabidopsis* (Supplementary Table S1). First, the ATXR5 enzyme (class IV) has a dual localization in the nucleus, where it methylates Lys27 in histone H3, and in plastids, with as yet unknown targets (Raynaud *et al.* 2006; Jacob *et al.* 2009). Second, the SDG7 enzyme (class II) has been shown to localize to the endoplasmic reticulum and to methylate a lysine residues in the *N*-terminal tail of the aquaporin PIP2;1, at least *in vitro* (Sahr *et al.* 2010). Last, a cytosolic isoform of ATX1 containing only the SET domain has been shown to methylate Lys396 in the elongation factor 1A whereas the full length ATX1 enzyme (class III) specifically modifies Lys4 in histone H3 (Ndamukong *et al.* 2011).

The SBS superfamily extends throughout eukaryotes, prokaryotes and archaea. SBS proteins have a typical Rossmann-like structural fold, which consists in a seven-stranded β -sheet adjoined by α -helices, together with additional structural elements that reflect the broad substrate diversity of these enzymes.

The first SBS protein with a KMT activity was characterized in bacteria, where the enzyme PrmA has been shown to methylate the ribosomal protein L11 (Vanet *et al.* 1994). In 2011, a comprehensive analysis based on sequence and structural similarity has categorized human and yeast SBS methyltransferases into different groups (Petrossian and Clarke 2011). In the last few years, many enzymes belonging to the same group have been shown to methylate proteins at lysine residues. All but one of these enzymes have been shown to methylate non-histone substrates, including calmodulin (Roberta Magnani *et al.* 2010), translation factors (e.g. Lipson, Webb, and Clarke 2010; Couttas *et al.* 2012; Davydova *et al.* 2014; M. E. Jakobsson *et al.* 2015; Hamey *et al.* 2016; Malecki *et al.* 2017; Magnus E. Jakobsson *et al.* 2017) and ribosomal proteins (Kristofor J. Webb *et al.* 2011), molecular chaperones (Kernstock *et al.* 2012; Cloutier *et al.* 2013; M. E. Jakobsson *et al.* 2013), or the mitochondrial electron transfer flavoprotein (Rhein *et al.* 2014; Malecki *et al.* 2015) and citrate synthase (Malecki, Jakobsson, *et al.* 2017; Rhein *et al.* 2017). Dot1 in *Saccharomyces cerevisiae* and its mammalian homologues DOT1-like are the only SBS enzymes with activity on a histone substrate (methylation of Lys79 in the globular portion of histone H3) (Nguyen and Zhang 2011). In contrast to SET domain-containing enzymes, KMTs of the SBS family studied so far catalyse non-processive reactions (reviewed in Falnes *et al.* 2016). The distributive mode of action implies that the enzyme dissociates from the substrate at each round of methylation to allow an exchange between AdoMet and S-adenosyl-L-homocysteine.

To identify putative KMTs belonging to the SBS superfamily in Arabidopsis we searched for orthologues of bacterial, yeast and human enzymes methylating non-histone protein substrates. We could identify 14 Arabidopsis proteins with significant sequence homology to the query sequences (see Supplementary Table S1). The robust phylogenetic relationship between some plant proteins and their orthologues in bacterial, yeast or human cells suggests that they can methylate similar substrates (Figure 2). The evolutionary conserved function of two of these enzymes, namely the calmodulin KMT (Banerjee *et al.* 2013) and the ribosomal protein L11 KMT (Mazzoleni *et al.* 2015), has been yet demonstrated and will be discussed later in the review.

Overall, there are more than 30 KMTs from the SBS and SET domain families that are possibly involved in the methylation of non-histones substrates in plants (Supplementary Table S1). These proteins have been shown or predicted to be targeted to different subcellular compartments of the plant cells (Figure 3). The cytosol, the nucleus and the plastids contain more than seven predicted KMTs and are anticipated to be hot spots for protein lysine methylation.

Protein lysine methylation can be controlled dynamically by the active removal of methyl groups by protein lysine demethylases (KDMs). Two types of KDMs have been characterized so far in eukaryotes. The first family includes orthologues of the human lysine-specific demethylase 1 (LSD1), which was the first enzyme reported to demethylate mono- and dimethylated Lys4 in histone H3 (Y. Shi *et al.* 2004). LSD1 demethylases are flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent amino oxidases that catalyse the removal of mono- and dimethyl groups from lysine residues in histone and non-histone substrates (Figure 1C). The family is evolutionary conserved from fission yeast to higher eukaryotes. There are four homologues of LSD1 in plants that have been shown to act on histones (reviewed in Xiao, Lee, and Wagner 2016). The second family of KDMs consists of Jumonji C (JmjC) domain-containing proteins. JmjC domain enzymes remove mono-, di- and trimethyl groups of lysine residues in an iron(II)-dependent reaction with α -ketoglutarate and molecular oxygen as cosubstrates (Figure 1C). Thus, JmjC domain demethylases are more versatile than LSD1 enzymes since they can regulate all degrees of protein lysine methylation. JmjC domain proteins are evolutionary conserved in the green lineage and could be divided into seven groups (Huang *et al.* 2016). Five groups have been reported to demethylate lysine, and potentially arginine, residues in histones and two groups were involved in the hydroxylation and demethylation of unknown substrate sites. In contrast with animals, the involvement of LSD1-like or JmjC domain enzymes in the dynamic demethylation of non-histone substrates has not been yet demonstrated in plants.

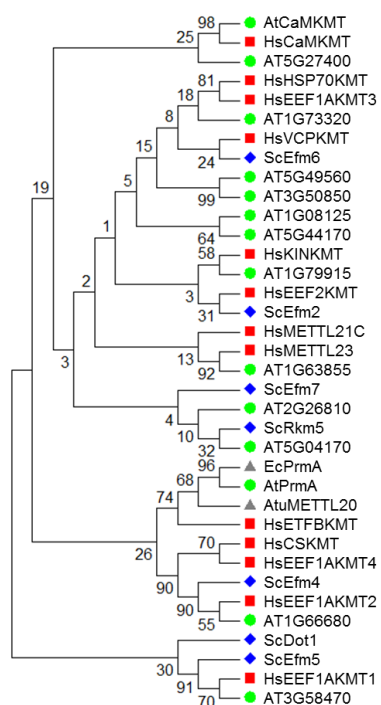


Figure 2. Phylogenetic analysis of protein lysine methyltransferases from the SBS superfamily. The analysis included 36 amino acid sequences from *Homo sapiens* (Hs), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Escherichia coli* (Ec), *Agrobacterium tumefaciens* (Atu), and *A. thaliana* (At). The *A. thaliana* sequences were identified by BlastP search using SBS sequences from other species as queries. Sequences were aligned using Muscle and the phylogenetic tree was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Le-Gascuel model (Le and Gascuel, 2008). The consensus bootstrap tree is shown and branch support values (in % for 1,000 replicates) are indicated. Analyses were done with the Mega 6.06 software (Tamura *et al.*, 2013). UniProt accession numbers of query sequences: AtuMETTL20, A9CHJ5; EcPrmA, P0A8T1; HsCaMKMT, Q7Z624; HsCSKMT, A8MUP2; HsEEF1AKMT1, Q8WVE0; HsEEF1AKMT2, Q5JPI9; HsEEF1AKMT3, Q96AZ1; HsEEF1AKMT4, P0DPD7; HsEEF2KMT, Q96G04; HsETFBKMT, Q8IXQ9; HsHSP70KMT, Q8WXB1; HsKINKMT, Q9BUU2; HsMETTL21C, Q5VZV1; HsMETTL23, Q86XA0; HsVCPKMT, Q9H867; ScDot1, Q04089; ScEfm2, P38347; ScEfm4, P40516; ScEfm5, P53200; ScEfm6, P53970; ScEfm7, Q05874; ScRkm5, Q12367.

The infancy of lysine methylproteomes in plants

The identification of lysine-methylated proteins at the proteome scale has emerged only recently as compared to phospho- or glycoproteins. This delay is essentially due to technical bottlenecks to enrich methylpeptides and to identify methylation sites with confidence (reviewed in Moore and Gozani 2014; Q. Wang, Wang, and Ye 2017). These limitations are strengthened by the low abundance of some methylproteins and/or the sub-stoichiometric methylation of some lysine residues, making the identification of methyl sites difficult to achieve by shotgun proteomics. The first technical issue is the lack of reliable methods to enrich methylproteins or methylpeptides. Indeed, it has proven difficult to develop highly sensitive methyl-lysine-specific antibodies and the efficiency of protein domains recognizing methyl-lysine for affinity capture suffers a strong dependency on the residues flanking the methyl-lysine (Qi Wang, Wang, and Ye 2017). Also, the moderate alteration of the physicochemical properties of peptides by lysine methylation (lack of a charge difference, little change in hydrophobicity, see Figure 1A) is a limitation for the development of highly resolutive liquid chromatography approaches (Qi Wang, Wang, and Ye 2017). The second issue is that a high false discovery rate is associated with the identification of methylation events by tandem mass spectrometry (Hart-Smith *et al.* 2016). This is largely due to the fact that the mass shifts associated with mono-, di- or trimethylation (14.016, 28.031, or 42.047 Da, respectively) are isobaric to mass differences between numerous amino acids (e.g. 14.016 Da between aspartate and glutamate or serine and threonine, 28.031 Da between alanine and valine, 42.047 Da between glycine and valine) (Ong, Mittler, and Mann 2004). Thus, the standard target-decoy approach used to control the confidence of peptide identification in proteomic analyses produces unreliable estimates of methylpeptides discovery as a stand-alone technique (Hart-Smith *et al.* 2016). The current recommendation to obtain reliable and sensitive identification of methylation sites at the

proteome level is to use heavy methyl stable isotope labelling with amino acids in cell cultures (heavy methyl SILAC) (Ong, Mittler, and Mann 2004). In this approach methionine in the culture medium is substituted with $^{13}\text{CD}_3$ -methionine, which is metabolically converted to $^{13}\text{CD}_3$ -AdoMet in the cell, leading to methylation events with heavy methyl groups that can be identified with high confidence by mass spectrometry.

In recent years, a growing number of proteomic analyses have indicated that lysine methylation is widespread among non-histone proteins in animal and yeast cells. By using either the usual target-decoy approach for reliability estimation (e.g. Cao, Arnaudo, and Garcia 2013; Guo *et al.* 2014) or methylpeptide validation by heavy methyl SILAC or similar approaches (e.g. Bremang *et al.* 2013; Wu *et al.* 2015; M. Zhang *et al.* 2018), hundreds of lysine methylated proteins have been reported, some at multiple sites and to different degrees of methylation. Gene ontology annotation indicated that lysine methylated proteins are frequently involved in transcription, RNA processing, ribosome biogenesis and translation, and, with a lower frequency, in diverse processes including protein folding (chaperones), cell signalling or metabolism (for reviews see Lanouette *et al.* 2014; Falnes *et al.* 2016). Methylproteins are predominantly found in the nucleus and the cytoplasm but are also present in other subcellular structures, including mitochondria (Rhein *et al.* 2014; Malecki *et al.* 2015; Caslavka Zempel *et al.* 2016; Malecki, Aileni, *et al.* 2017; Rhein *et al.* 2017).

As compared with other eukaryotes, our knowledge about plant methylproteomes is at its infancy. Indeed, the combination of targeted and proteome-wide analyses performed so far identified 48 lysine methyl-sites in 32 different non-histone protein targets (Table 1). The first lysine-methylated proteins have been identified by targeted approaches employing amino acid analysis of protein hydrolysates and Edman sequencing of proteins and peptides. These proteins include cytochrome *c* from wheat and cauliflower (DeLange, Glazer, and Smith 1969), calmodulin from spinach and tobacco (Watterson, Iverson, and Van Eldik 1980; Lukas *et al.* 1984), α -amylase from wheat (Motojima and Sakaguchi 1982), and the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) from different plants including tobacco, pea or tomato (Houtz *et al.* 1989, 1992). Several methylated lysine residues were then identified by mass spectrometry in the eukaryotic elongation factor 1- α (Lopez-Valenzuela *et al.* 2003; Claude Alban *et al.* 2014; Ndamukong *et al.* 2011), in ribosomal proteins from cytoplasmic, plastidial and mitochondrial ribosomes (Yamaguchi and Subramanian 2000; Carroll *et al.* 2008; Claude Alban *et al.* 2014; Mazzoleni *et al.* 2015), and in plasma membrane aquaporins (Santoni *et al.* 2006; Casado-Vela *et al.* 2010). So far a unique proteome-wide identification of lysine-methylated proteins has been done in land plants (Alban *et al.*, 2014). In this study, proteomic data previously used for a thorough characterization of the *Arabidopsis* chloroplast proteome (Ferro *et al.* 2010) have been searched to identify lysine- and arginine-methylated peptides using a stringent filtering workflow, including manual data curation and the search of neutral loss events of trimethylamine (59 Da) to unequivocally identify lysine trimethylation (Claude Alban *et al.* 2014). This approach identified 30 lysine methylation sites in 19 chloroplastic proteins involved in metabolism, including photosynthesis, and organelle biogenesis and maintenance (translation, protein import, division) (Table 1) (Claude Alban *et al.* 2014).

Recently, 42 lysine methylation sites have been identified in 23 distinct proteins from a fraction containing intact eyespots of the flagellar green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Eitzinger *et al.* 2015). Some methylproteins are specific to the eyespot apparatus, which is important for phototaxis in motile unicellular photosynthetic organisms, and are therefore not anticipated to be present in sessile plants. However, other methylation events could have been conserved during the evolution of Viridiplantae. The evolutionary conservation of methylated lysine residues, and beyond their biological outcomes, should be assessed on a case-by-case basis as some events have been observed in both *C. reinhardtii* and *A. thaliana* (e.g. methylation of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphate aldolases) (Ma *et al.* 2011) whereas others seem to be specific to a phylogenetic clade (e.g. methylation of lysine residues in ferredoxin-NADP reductase from *C. reinhardtii* but not from *A. thaliana*) (Decottignies *et al.* 1995; Eitzinger *et al.* 2015; Lehtimaki *et al.* 2014).

Overall, non-histone methylproteins identified so far in plants are involved in essential cellular processes including metabolism, translation, signalling, metabolite and protein trafficking, and transcription (Table 1). These proteins are present in each subcellular compartment where KMTs have been detected or predicted (Figure 3, Supplementary Table S1), with a significant bias towards plastids due to limited investigations in other subcellular structures. It is clear that our current knowledge of non-histone lysine methylproteins in land plants is far from being comprehensive. Indeed, since animals and plants have a comparable number of KMTs, one can expect lysine methylproteomes of similar size in both kingdoms. Further studies employing state-of-the-art proteomic strategies will be necessary to fill the gap and to appreciate the extent of the lysine methylproteome in plants. This is an exciting challenge since the heavy methyl SILAC approach or its offshoots, which are undoubtedly the best way for global and reliable analysis of lysine-methylated proteins, will be difficult to develop in plants. Indeed, in methionine autotrophs like plants, an efficient incorporation of heavy methyl groups from $^{13}\text{CD}_3\text{-AdoMet}$ is possible only in mutants deficient in methionine synthesis (M. Zhang *et al.* 2018). Such mutations are lethal and are much more difficult to manage in plants than in unicellular organisms.

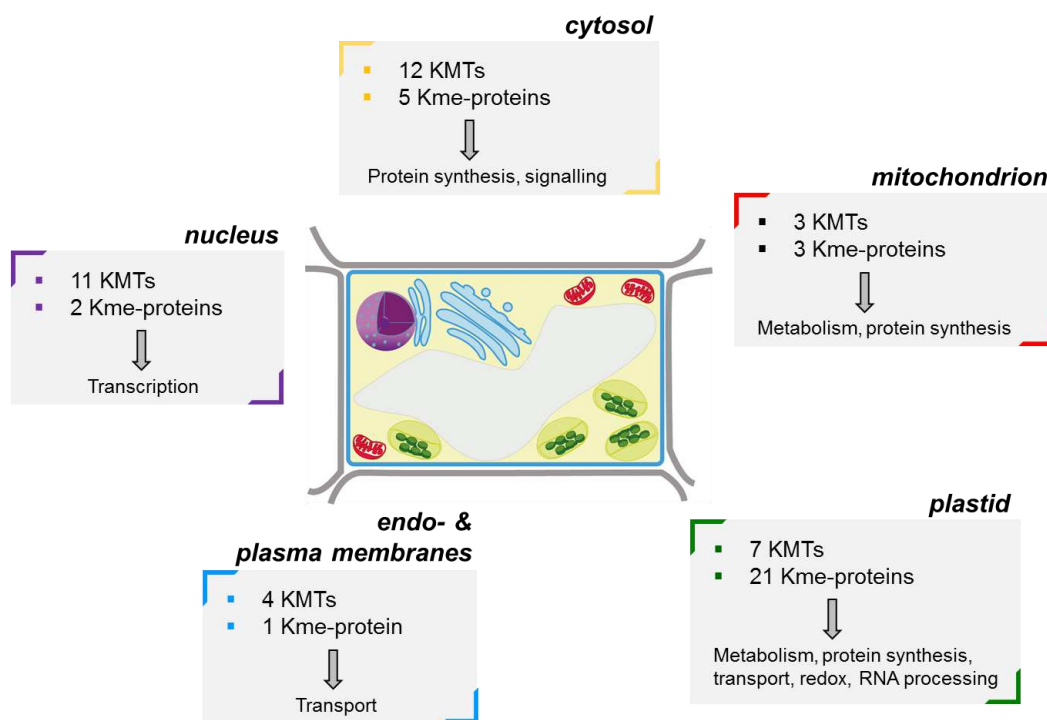


Figure 3. The protein lysine methylation map in plant cells. The subcellular distribution of SET domain-containing and SBS protein lysine methyltransferases (KMTs) is supported by experimental evidences or predictions (see Supplementary Table S1). Some KMTs are targeted to several compartments, e.g. the ribosomal protein L11 methyltransferase PrmA that is located in plastids and mitochondria (Mazzoleni *et al.* 2015). The full list of lysine methylated (Kme) proteins from plants is shown in Table 1.

Table 1: Lysine methylated non-histone proteins in land plants.

Protein name	Species	Methylated lysine (state)	Functional category	Localization	References
Ribosomal protein L11, plastid	<i>Spinacia oleracea</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	K75 (me3), K1111/109 (me3)	Protein synthesis	Plastid	Yamagushi 2000; Alban 2014; Mazzoleni 2015
Ribosomal protein L11, mitochondrion	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K48 (me3)	Protein synthesis	Mitochondrion	Mazzoleni 2015
Elongation factor 1-alpha	<i>Zea mays</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	K36 (me3); K79 (me3); K187 (me3); K227 (me3); K306 (me3); K396 (me1) K44 (me1/2); K55 (me2); K79 (me3); K187 (me3); K261 (me1); K306 (me3); K396 (me3)	Protein synthesis	Cytosol	Lopez-Valenzuela 2003 Ndamukong 2011; Alban 2014
60S ribosomal protein L10a	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K90 (me3)	Protein synthesis	Cytosol	Carroll 2007
60S ribosomal protein L12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K3 (me3)	Protein synthesis	Cytosol	Carroll 2007
60S ribosomal protein L36	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K55 (me1)	Protein synthesis	Cytosol	Carroll 2007
Phosphoglycerate kinase family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K329 (me2)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
Rubisco large subunit	<i>Pisum sativum</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , etc <i>Arabidopsis thaliana</i>	K14 (me3) K32 (me2/3); K201 (me1/2/3); K236 (me1/3); K356 (me2)	Photosynthesis	Plastid	Houtz 1989; Houtz 1992 Alban 2014
Rubisco small subunit 1A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K66 (me1/2); K140 or K147 (me2); K146 (me1/2)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
Fructose biphosphate aldolases, plastid	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K395/394/387 (me3)	Photosynthesis; glycolysis	Plastid	Mininno 2012; Alban 2014
Rubisco activase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K204 (me1/3)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
Ribose 5-phosphate isomerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K200 (me1)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
Phosphoglycerate kinase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K424 (me1)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
Photosystem I subunit E-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K145 (me1)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
Photosystem II subunit O-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K292 (me1)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
Chlorophyll A-B binding family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K101 (me1)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
ATP synthase beta chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K129 (me1/3)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014

Chapitre I : Synthèse bibliographique

ATP synthase subunit beta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K447 (me1/2)	Photosynthesis	Plastid	Alban 2014
Alpha-amylase	<i>Triticum aestivum</i>	unknown (me3)	Metabolism (carbohydrates)	Plastid	Motojima 1982
Pyrophosphate hydrolyase 1	phospho- <i>Arabidopsis thaliana</i>	K118 (me1)	Metabolism (nucleotides)	Plastid	Alban 2014
Protochlorophyllide reductase C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K87 (me2)	Metabolism synthesis (tetrapyrrole)	Plastid	Alban 2014
Saccharopine dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K6 (me3)	Metabolism catabolism) (lysine)	Mitochondrion	Alban 2014
Cytochrome c	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i>	K80 (me3); K94 (me3)	Respiration	Mitochondrion	DeLange 1969; Thompson 1971
2-Cys peroxiredoxin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K202 (me1/2/3)	Redox	Plastid	Alban 2014
Aquaporin (plasma membrane intrinsic protein)	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brassica napus</i>	K3 (me2) K155 (me1)	Transport	Plasma membrane	Santoni 2006; Sahr 2010 Casado-Vela 2010
Triose phosphate/phosphate translocator	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K96 (me1)	Transport	Plastid	Alban 2014
Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 110	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K946 (me2)	Transport targeting) (protein	Plastid	Alban 2014
Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 62	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K79 (me3)	Transport targeting) (protein	Plastid	Alban 2014
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15a	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K85 (me1)	Transcription	Nucleus	Alban 2014
Transcription elongation factor (TFIIS) family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K79 (me3)	Transcription	Nucleus	Alban 2014
Pentatricopeptide containing protein repeat-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	K394 (me1)	RNA processing	Plastid	Alban 2014
Calmodulin	<i>Spinacia oleracea</i> , <i>Nicotiana tabacum</i>	K115 (me3)	Signalling	Cytosol	Watterson 1980; Lukas 1984

From methylproteins to phenotype, a winding path to the function of lysine methylation

Proteome-wide approaches have identified hundreds of lysine methylated proteins and many more methylation events will likely be discovered in the near future. The identification of which methyltransferase and, possibly, demethylase enzymes regulate each lysine methylation event is a critical step towards understanding the biological functions of these modifications. Indeed, inactivating the genes coding KMTs and KDMs is the best way to analyse the functional outcomes of methylation *in vivo*. This approach is not straightforward since, in many cases, mutants affected in lysine methylation of non-histone proteins displayed no or limited phenotype (e.g. Cameron *et al.* 2004; Webb *et al.* 2011; Rhein *et al.* 2017). However, the role of methylation has been clearly established for many proteins involved in different cellular pathways. The most documented role of lysine methylation is to modulate protein-protein interactions, either positively or negatively (for a review, see Erce *et al.* 2012). Lysine methylation has also been shown to affect protein binding to nucleic acids, modifying for example the affinity of transcription factors for their promoters. Beyond methylation, lysine residues are subjected to a variety of modifications on their ϵ -amino groups, including acetylation, ubiquitination or sumoylation. Several reports indicated that methylation can compete with ubiquitination for a common lysine residue, thus modifying the stability of the protein, or can interfere with the phosphorylation or acetylation events of neighbouring residues in the target (Erce *et al.* 2012; K. K. Biggar and Li 2015). Beyond the crosstalk between post-translational modifications, methylation of lysine residues has been shown to regulate a wide range of mechanisms, including the subcellular localization of targets or the activity of enzymes (Cho *et al.* 2012; Malecki, Jakobsson, *et al.* 2017).

By using a combination of genetic, biochemical and cellular approaches together with mass spectrometry, the methyltransferase-substrate networks are emerging and start to reveal their complexity (reviewed in Lanouette *et al.* 2014; Kyle K. Biggar and Li 2014; Falnes *et al.* 2016). Although the current maps in yeast and mammalian cells are fragmentary, they illustrate that some KMTs appear quite specific, with one reported substrate, while others are able to modify several targets *in vivo*, including histones and non-histone proteins. Also, the observation that multiple KMTs can modify a given substrate at different lysine residues adds another level of complexity to these networks. In such cases, deciphering the role of lysine methylation is even more complex than for a single methylation event catalysed by a specific KMT.

The current protein lysine methylation network in plants is in a rather embryonic state with only six KMTs with identified substrates (Table 2). For two SET domain-containing KMTs from Arabidopsis the enzyme-substrate relationship has been shown only *in vitro*. The activity of the four remaining plant KMTs has been established *in vitro* and *in vivo*, enabling phenotypic and molecular analyses to understand the biological outcomes of their methylation events. Besides these examples that will be detailed in the next sections the phylogenetic analysis of KMTs from the SBS superfamily (Figure 2) suggests the existence of three enzyme-substrate pairs that have been conserved during the evolution. The first two Arabidopsis enzymes are orthologues of the EEF1AKMT1/Efm5 and EEF1AKMT2/Efm4 methyltransferases from animal and yeast that methylate the evolutionary conserved Lys79 and Lys316/318, respectively, in the eukaryotic translation elongation factor 1A (Lipson, Webb, and Clarke 2010; Joshua J. Hamey *et al.* 2016; M. E. Jakobsson *et al.* 2017). The third plant enzyme with a predictable substrate is an orthologue of the DNA/RNA binding protein KIN/Kin17 methyltransferase described in human (Cloutier *et al.* 2013). This prediction is supported by the conservation of the trimethylated Lys135 in the closest orthologue of KIN/Kin17 in Arabidopsis (Cloutier *et al.* 2013). Further studies will be necessary to confirm the relationship between these KMTs and their putative substrates.

Table 2. The emerging protein lysine methyltransferase-substrate network in plants

PKMT	Substrate (residue)	Species	Role	Reference
PPKMT2	ATP synthase β -subunit, plastid (K447)	Arabidopsis	Unknown	Alban <i>et al.</i> , 2014
SDG7	PIP2;1 aquaporin (K3)	Arabidopsis	Unknown	Sahr <i>et al.</i> , 2010
soloSET	eEF1A (K396)	Arabidopsis	Actin bundling	Ndamukong <i>et al.</i> , 2011
PrmA	RPL11, plastid (K109)	Arabidopsis	Unknown	Mazzoleni <i>et al.</i> , 2015
	RPL11, mitochondrion (K48)	Arabidopsis	Unknown	Mazzoleni <i>et al.</i> , 2015
CaMKMT	Calmodulin (K115)	Arabidopsis	Interaction with partners	Banerjee <i>et al.</i> , 2013
LSMT	RBCL (K14)	Pea	Unknown	Dirk <i>et al.</i> , 2006
	Fructose bisphosphate aldolase (K395)	Arabidopsis	Unknown	Mininno <i>et al.</i> , 2012
SEE1-like	Unknown	Arabidopsis	Viral replication	Li <i>et al.</i> , 2014
PAP7	Unknown	Arabidopsis	Transcription in plastids	Gao <i>et al.</i> , 2011; Grübler <i>et al.</i> , 2017
CIA6	Unknown	Chlamydomonas	Pyrenoid formation	Ma <i>et al.</i> , 2011

Methylation of the β -subunit of chloroplastic ATP synthase

The Arabidopsis enzyme designated PPKMT2 has been shown to dimethylate the chloroplastic ATP synthase β -subunit at a unique lysine residue exposed at the surface of the protein (Claude Alban *et al.* 2014). The function of this enzyme, which is predicted to be mitochondrial and chloroplastic, has not been reported *in vivo*. Several subunits of mitochondrial and plastidial ATP synthase have been shown to contain methylated lysine residues in both human (Kane and Van Eyk 2009), plants and green algae (Claude Alban *et al.* 2014; Eitzinger *et al.* 2015), but the role of these methylation events is not yet understood.

Methylation of plasma membrane aquaporin

The enzyme SDG7 has been shown to localize to the endoplasmic reticulum and to methylate Lys3 in a synthetic peptide derived from the N-terminal tail of the Arabidopsis aquaporin PIP2;1 (Sahr *et al.* 2010). However, the aquaporin methylation profile was not affected in an Arabidopsis *sdg7* null-mutant, suggesting either functional redundancy among SET domain-containing enzymes *in vivo* or physiological substrate(s) other than PIP2;1 for SDG7. Despite this conflict between *in vitro* and *in vivo* experiments the role of aquaporin methylation has been investigated using plasma membrane vesicles containing the wild-type protein or a non methylable PIP2;1 mutant (Lys3 substituted by an alanine). Methylation at Lys3 did not interfere with the intrinsic water permeability of aquaporin PIP2;1, suggesting a function of this modification in either the subcellular localization or stability of the protein (Santoni *et al.* 2006).

Methylation of translation elongation factor 1A by soloSET

The eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) is an evolutionary conserved protein that contains several lysine methylated residues in animal, yeast, and plant cells (recently reviewed in J. J. Hamey and Wilkins 2018). With as many as nine methylation events described (Table 1), eEF1A is currently the most heavily lysine methylated protein in plants (Lopez-Valenzuela *et al.* 2003; Claude Alban *et al.* 2014; Ndamukong *et al.* 2011). The primary role of eEF1A is to deliver the aminoacyl-tRNAs to the ribosome during peptide chain elongation but non-canonical functions have also been described for the factor, including organization of the cytoskeleton and replication of many RNA viruses. In yeast, five elongation factor methyltransferases (Efm) have been implicated in the methylation of five lysine residues in eEF1A (e.g. (Lipson, Webb, and Clarke 2010; M. E. Jakobsson *et al.* 2015; Joshua J. Hamey *et al.* 2016).

Only the Efm1 enzyme is a SET domain-containing protein, the four other belonging to the SBS superfamily. In human, four SBS methyltransferases have been yet implicated in eEF1A methylation, two are homologues of the yeast enzymes and two modify lysine residues that are methylated only in

the human factor (e.g. (Joshua J. Hamey *et al.* 2016; M. E. Jakobsson *et al.* 2017, 2017). In *Arabidopsis*, a cytosolic isoform of the SET domain-containing protein ATX1, named soloSET, is generated from an internal promoter and has been shown to methylate Lys396 in eEF1A *in vivo* (Ndamukong *et al.* 2011). *Arabidopsis* plants with an abolished expression of the *ATX1* transcripts displayed strong phenotypes, including asymmetric rosettes, chlorosis, and aberrant flowers. Since the *ATX1* locus produces two methyltransferases with different substrates, histone H3 for the full-length ATX1 protein and eEF1A for soloSET, these phenotypes could not be attributed to one or other of the functions with confidence. However, a cytoskeletal phenotype with reduced actin bundles was specifically associated with a defect in the soloSET activity, indicating that methylation of eEF1A at Lys396 in plants has a role in the organization of the cytoskeleton, notably actin bundling, rather than in protein synthesis (Ndamukong *et al.* 2011). Surprisingly, this conserved methylation event is introduced by evolutionary divergent enzymes, namely a SET domain protein in *Arabidopsis* (Ndamukong *et al.* 2011) and a SBS methyltransferase in yeast (M. E. Jakobsson *et al.* 2015).

Methylation of ribosomal protein L11 by PrmA

Besides translation factors, ribosomal proteins are known to be frequently methylated on lysine residues. Among these events, the methylation of ribosomal protein L11 (RPL11) has been described in ribosomes from bacteria, and chloroplasts and mitochondria from plants (Dognin and Wittmann-Liebold 1980, 1980; Cameron *et al.* 2004; Yamaguchi and Subramanian 2000; Mazzoleni *et al.* 2015; Claude Alban *et al.* 2014). Bacterial RPL11 is multiply methylated by a unique methyltransferase of the SBS family, named PrmA, which is able to catalyze the *N*- ϵ -trimethylation of two lysine residues as well as the *N*- α -trimethylation of the *N*-terminal alanine residue of RPL11 (Dognin and Wittmann-Liebold 1980). Orthologues of PrmA have been found in all bacterial phyla and photosynthetic eukaryotes (land plants, green algae, glaucophytes, rhodophytes, and chromists) but not in other eukaryotes (Mazzoleni *et al.* 2015). In *Arabidopsis*, the homologue of PrmA is dual-targeted to both plastids and mitochondria and is capable of methylating plastidial and mitochondrial RPL11 *in vivo* (Mazzoleni *et al.* 2015). Despite their evolutionary relationship, bacterial and plant PrmA display some differences in their substrate site specificity *in vivo*. Thus, plastidial and mitochondrial RPL11 in *Arabidopsis* are trimethylated at internal lysine residues but not at the N-terminus (Mazzoleni *et al.* 2015). So far, the role of RPL11 methylation is not known since null mutants of PrmA in bacteria and *Arabidopsis* are viable and show no obvious phenotype in standard environmental conditions (Vanet *et al.* 1994; Mazzoleni *et al.* 2015; Cameron *et al.* 2004). In prokaryotic-type ribosomes RPL11 contributes to the recruitment of initiation, elongation, and release factors and deletion of the protein has important consequences on ribosomal activity in bacteria and plant organelles. Since the conserved methylated lysine residues are exposed at the surface of the ribosome it has been proposed that methylation could modulate protein-protein interactions and influence binding of translation factors. Also, it has been suggested that a cross-talk between methylation and other post-translational modifications reported in RPL11 (phosphorylation, acetylation) could optimize ribosome biogenesis and function (Mazzoleni *et al.* 2015).

Methylation of calmodulin by CaMKMT

Calmodulin (CaM) is an essential and highly-conserved calcium sensor that regulates the function of numerous enzymes. The conserved Lys115 in CaM has been found trimethylated in animals and plants (Watterson *et al.*, 1980). Three decades after the discovery of this methylation event the CaM methyltransferase has been identified in mammalian cells and designated CaMKMT (Roberta Magnani *et al.* 2010). The CaMKMT enzyme belongs to the SBS superfamily and homologous proteins have been found in higher eukaryotes, including plants (Banerjee *et al.* 2013). At the molecular level trimethylation of Lys115 has been shown to affect the conformational dynamics of CaM upon binding of calcium and the thermal stability of the apoprotein (R. Magnani *et al.* 2012). Also, trimethylation was associated with a significant reduction in the level of NAD kinase activation by CaM, suggesting a role of the modification in the interaction between the two proteins (Roberts *et al.* 1986).

The identification of *Arabidopsis* proteins with differential binding properties to methylated and unmethylated forms of CaM reinforced the idea that methylation could modulate the interaction of CaM with partners (Banerjee *et al.* 2013). *In vivo*, it has been shown that the level of CaM methylation varied

in a developmental state and tissue-specific manner in pea plants (S. H. Oh and Roberts 1990). This was confirmed in *Arabidopsis* where the *CaMKMT* gene expression pattern was found to correlate with tissues where auxin signalling is active, with high expression levels in germinating seeds, root and shoot meristematic regions or flower buds (Banerjee *et al.* 2013). Furthermore, the analysis of null mutants and *CaMKMT* overexpressing lines in *Arabidopsis* indicated that CaM methylation has a role in the fine-tuning regulation of root development, auxin and abscisic acid signalling, and response to various environmental stresses (Banerjee *et al.* 2013).

Methylation of Rubisco and fructose biphosphate aldolases by LSMT

Numerous co- and post-translational modifications have been described in the small and large subunits of Rubisco, the key enzyme for CO₂ fixation during photosynthesis (reviewed in Houtz *et al.* 2008). Trimethylation of Lys14 in the large subunit of Rubisco (RBCL) has been reported in various species from the Fabaceae, Solanaceae, and Cucurbitaceae families whereas Lys14 was found unmodified in spinach, wheat or *A. thaliana* (Houtz *et al.* 1989; Houtz *et al.* 1992; Mininno *et al.* 2012). The SET domain-containing enzyme involved in RBCL methylation at Lys14 has been cloned and characterized in pea (Klein and Houtz 1995; P. Wang, Royer, and Houtz 1995). Homologues of the large subunit Rubisco methyltransferase (LSMT) gene from pea are present in all plant genomes, suggesting a species-dependent substrate specificity for the methyltransferase and raising the question of the nature of the target(s) of the enzyme in plants with unmethylated RBCL. The biochemical characterization of LSMT from *Arabidopsis* identified the chloroplastic isoforms of fructose 1,6-bisphosphate aldolase as the physiological substrates of the enzyme (Mininno *et al.* 2012). Chloroplastic aldolases catalyse the reversible hydrolysis of fructose 1,6-bisphosphate into trioses phosphate and contribute to CO₂ assimilation in the Calvin cycle and to glycolysis. LSMT enzymes from pea and *Arabidopsis* have been shown to methylate aldolases with similar kinetic parameters and product specificity *in vitro* (trimethylation at a conserved lysine residue close to the C-terminus) (Mininno *et al.* 2012). Also, trimethylated chloroplastic aldolases have been detected in all plant species studied, including *C. reinhardtii*, suggesting that they are universal substrates of LSMT in Viridiplantae (Ma *et al.* 2016). By using site-directed mutagenesis, Ma *et al.* (2016) could decipher the molecular evolution of the substrate specificity of LSMT enzymes. Thus, modifying a key motif of three residues located close to the active site of the enzyme was sufficient to transform a monofunctional LSMT (one substrate, aldolases) into a bifunctional LSMT (two substrates, aldolases and RBCL), and vice versa (Ma *et al.* 2016). The phylogenetic distribution of this motif in LSMT sequences together with the *in vivo* methylation status of Rubisco indicated that the ancestral function of LSMT was the methylation of aldolases. In a recent event during the evolution of land plants this function evolved in ancestors of a few plant families (Fabaceae, Solanaceae, and Cucurbitaceae) to allow the monofunctional enzymes to methylate also RBCL (Ma *et al.* 2016).

The biological significance of Rubisco or fructose biphosphate aldolases methylation is still not known. *In vitro*, the kinetic and activation parameters of Rubisco did not change significantly between the native unmethylated spinach enzyme and the enzyme stoichiometrically trimethylated at Lys14 in RBCL (Dirk *et al.* 2006). For aldolases, the catalytic properties for the glycolytic (cleavage of fructose bisphosphate) and photosynthetic (condensation of trioses phosphate) reactions were not modified by stoichiometric trimethylation of the native chloroplastic or recombinantly expressed enzymes (Mininno *et al.* 2012). Also, the steady-state level and stability of aldolases in chloroplasts were not affected by the methylation status of the proteins. In *Arabidopsis*, a *lsmt* null mutant was viable and phenotypically indistinguishable from wild-type plants when grown under standard conditions (Mininno *et al.* 2012). In tobacco, RNAi-mediated knocked-down plants for *LSMT* gene expression displayed no phenotype and no difference in CO₂ assimilation rates as compared to wild-type plants (Dirk *et al.* 2006). Since the methylated lysine residues in RBCL and aldolases are surface-exposed it has been suggested that methylation events could be involved in the fine-tuning regulation of protein-protein interactions in chloroplasts (M. Mininno *et al.* 2012; Dirk, Trievel, and Houtz 2006).

This hypothesis is supported by several reports showing that some enzymes of the Calvin cycle, including Rubisco and aldolases, are organized in supramolecular complexes, forming metabolons that may increase the efficiency of metabolic pathways (Sweetlove and Fernie 2013). A similar role has been

suggested for the methylation of human citrate synthase in the tricarboxylic acid cycle (Rhein *et al.* 2017). Interestingly, the chloroplastic and trimethylated aldolase in *C. reinhardtii* has been shown to interact tightly with a ternary complex known to regulate the activity of the Calvin cycle in a light-dependent manner (Erales *et al.* 2008, 200). The association of aldolase with the ternary complex, which is formed in the dark, was accompanied with an increase by 50% of the cleavage activity of the enzyme (glycolytic reaction) whereas the condensation activity (photosynthetic reaction) was not affected. This suggests that methylation of aldolases may influence the transient association with protein partners to favour either photosynthesis or glycolysis depending on metabolic demands and changes in environmental conditions.

From phenotype to methylproteins, another path towards the function of lysine methylation

Beyond the six methyltransferase-substrate(s) relationships described above there are a few examples of plant KMTs with as yet unknown substrates for which null mutations are associated with marked phenotypes (Table 2). The first orphan enzyme is a plant orthologue of the SEE1 (or Efm4) methyltransferase that methylates Lys316 in eEF1A from yeast (Lipson *et al.* 2010). Silencing of *SEE1*-like expression in *Nicotiana benthamiana* greatly decreased the replication of positive-stranded RNA tombusvirus, suggesting that methylation of eEF1A is important for viral replication in plants (Li *et al.*, 2014). Yet there is no experimental evidence that SEE1-like from plant can methylate eEF1A (Table 1) but the strong phylogenetic relationship between the plant, yeast and human proteins (Figure 2) suggests that the enzyme target the evolutionary conserved Lys306 (in eEF1A from plants). The second orphan KMT is the SET domain-containing protein PAP7 (or PTAC14) that is a subunit of the plastid-encoded RNA polymerase complex in Arabidopsis (Steiner *et al.* 2011). The *pap7* mutation is lethal in photoautotrophic conditions and mutants display an albino phenotype when grown with an exogenous carbon source (Z.-P. Gao *et al.* 2011; Grübler *et al.* 2017). The expression profile of plastid-encoded genes is markedly affected in *pap7*, resulting in plastids arrested at a very early stage of differentiation. The substrate(s) of PAP7 has not been yet identified. The last example is the SET domain protein CIA6 in *C. reinhardtii* (Ma *et al.* 2011). CIA6 is required for normal pyrenoid formation and for an optimal CO₂-concentrating mechanism in the alga. CIA6 was overproduced in *Escherichia coli* cells but did not shown any methyltransferase activity with the substrates tested (histones, Rubisco and Chlamydomonas whole cell extracts) (Ma *et al.* 2011). The identification of the substrates of the three orphan enzymes described here will be a significant step towards a better understanding protein lysine methylation in plant cells.

Conclusion and future prospects

The data discussed in this review show that, despite recent progress, substantial work will be necessary to delineate further the importance of lysine methylation of non-histone proteins in plants. First, our knowledge about lysine methylated proteins is very limited (Table 1) and significant efforts will be necessary to shed light on the lysine methylproteomes in plants. Second, future investigations will have to address the functional importance of protein lysine methylation in plant biology. This will require a detailed analysis of the enzymes involved in methylation reactions, which are still poorly characterized (Table 2), and in the removal of methyl marks, which have not been yet described for non-histone substrates in plants. This will be crucial to decipher whether some methylation events are reversible and play a role in the dynamic regulation of cellular processes. Further studies will also address the biochemical and physiological outputs of lysine methylation, including the identification of the reader proteins that interact with methylated lysine residues. So far most of the analyses performed in plants did not uncover the role of lysine methylation, probably because the effects were too subtle to induce measurable phenotypes in methyltransferase mutants. Noteworthy, phenotypes of KMT-deficient mutants were frequently analysed in standard environmental conditions, with the exception of the CaM methyltransferase mutant that was challenged with salt, cold or heat (Banerjee *et al.* 2013). Also, recent transcriptomic analyses indicated that the expression of some genes coding SET domain proteins was modified during different abiotic stress, including cold, heat, salinity and dehydration (Huang *et al.* 2016 ; Yadav *et al.* 2016). Future investigations will undoubtedly address whether some lysine methylation events in non-histone proteins are important for plants to cope with environmental stress.

5. Modifications post-traductionnelles portées par des protéines histones

L'unité fondamentale de la chromatine est constituée par le nucléosome qui est composé d'environ 146 paires de bases d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones. Cet octamère est composé de 2 copies de chacune des 4 protéines histones H2A, H2B, H3 et H4. Le noyau histone possède une structure globulaire composée d'une région interne hydrophobe formant le repliement des histones et d'acides aminés N-terminaux formant des structures flexibles qui émergent du nucléosome. Ces extrémités N-terminales sont sujettes à de nombreuses PTM incluant l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la phosphorylation, la glycosylation, l'ADP-ribosylation et la sumoylation. Ces modifications jouent des rôles essentiels dans la régulation de la réplication de l'ADN, la recombinaison, la réparation et la transcription en modifiant la structure du nucléosome et en créant des sites de liaison pour des protéines effectrices. En effet, 2 modèles sont envisageables pour expliquer le rôle des PTM sur les protéines : le modèle direct et le modèle faisant intervenir des effecteurs. Selon le premier modèle les PTM affectent directement les propriétés locales des protéines, influençant ainsi leur structure tridimensionnelle. D'après le second modèle il existe des protéines effectrices ('readers') qui reconnaissent spécifiquement les PTM et recrutent des protéines partenaires avec des activités spécifiques au niveau du locus cible. Via ce code les PTM sont donc traduites en réponses biologiques (Rothbart and Strahl 2014). Seules les phosphorylations et méthylations, les 2 PTM détaillées dans cette étude, seront abordées dans cette partie.

a) La méthylation des protéines histones

Contrairement aux protéines non-histones, la méthylation des résidus arginine et lysine est la modification la plus abondante chez les protéines histones (Bobadilla and Berr 2016). De plus, ces modifications possèdent un fort degré de complexité. En effet, le nombre de groupements méthyles ajoutés sur un résidu lysine ainsi que la méthylation de résidus lysine distincts peuvent avoir des fonctions très vastes et parfois opposées en activant ou en réprimant la transcription de gènes cibles. Cette variabilité s'applique également à la méthylation des résidus arginine des histones qui peut avoir un rôle soit négatif soit positif dans la régulation de la transcription (Mosammaparast and Shi 2010).

À ce jour 20 résidus lysine et arginine méthylés ont été identifiés sur les histones et parmi eux certains sont méthylés plus fréquemment que d'autres. Ainsi, chez *Arabidopsis* la méthylation des résidus lysine intervient majoritairement sur les histones H3 au niveau des lysines 4, 9, 27 et 36. Quant à la méthylation des arginines elle intervient principalement au niveau des résidus arginine 2, 8, 17 et 26 de l'histone H3 et sur l'arginine 3 de l'histone H4 (Liu *et al.* 2010 ; Bobadilla and Berr 2016).

La méthylation des histones influence un très grand nombre de fonctions biologiques. Seules quelques fonctions très générales associées à la méthylation des lysines des histones sont résumées brièvement et de manière simplifiée dans ce paragraphe (pour revues, voir Liu *et al.* 2010 ; Mosammaparast et Shi 2010).

Euchromatine et activation de la transcription

La mono-, di- et triméthylation de H3K4 et de H3K36 sont importantes pour la formation d'euchromatine et l'activation de la transcription des gènes cibles. La monométhylation de H3K9 et de H3K27 participe également à l'activation de la transcription. Le rôle de la triméthylation de H3K4 semble être conservé chez les eucaryotes.

Hétérochromatine et répression de la transcription

La di- et la triméthylation de H3K9 et H3K27 ainsi que la triméthylation de H4K20 sont des marques associées à la formation d'hétérochromatine et par conséquent à la répression de la transcription des gènes cibles.

Cycle cellulaire et réparation de l'ADN

Le rôle de la méthylation des histones ne se restreint pas à la modulation de l'activité transcriptionnelle, il peut également intervenir dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Ces fonctions ont été montrées pour la mono et la diméthylation de H4K20. En effet la mutation du site catalytique de Set9 qui méthyle H4K20 chez *S. pombe*

entraîne une augmentation de la sensibilité aux dommages de l'ADN et compromet les points de contrôle du cycle cellulaire. De plus, dans les cellules mammifères et de levure ces méthylations conduisent au recrutement de la protéine 53BP1, connue pour être impliquée dans la réponse à des dommages de l'ADN, au niveau des sites endommagés de l'ADN.

b) La phosphorylation des protéines histones

Chez les plantes, seuls 4 sites de phosphorylation ont été caractérisés sur les histones. Ces sites sont tous portés par l'histone H3. Les sérines 10 et 28 sont phosphorylées par la kinase AURORA3 (Kurihara *et al.* 2006). Ces PTM sont temporellement corrélées avec la ségrégation des chromosomes et la transition métaphase/anaphase. La fonction de ces PTM reste peu claire, mais l'hypothèse est que la phosphorylation jouerait un rôle dans l'addition/soustraction d'autre PTM (Houben *et al.* 2007). Par exemple, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 empêche la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par la méthyltransférase SUVR4 (Demidov *et al.* 2009). Ensuite, Ashtiyani *et al.* (2011) rapportent que les thréonines 3 et 11 de H3 sont phosphorylées par la kinase HASPIN et la phosphorylation de la thréonine 3 est associée avec la condensation de la chromatine.

E. Développement du système racinaire et réponses aux stress abiotiques

1. Organisation et développement de la racine

La plupart des végétaux partagent la même organisation racinaire de base représentée par un organe cylindrique composé de tissus organisés de façon concentrique. Les vaisseaux au centre sont entourés du péricycle et de l'endoderme, lui-même entouré du cortex (1 couche de cellule chez *A. thaliana*). La couche la plus externe constitue l'épiderme (Figure 41 ; Somssich *et al.* 2016).

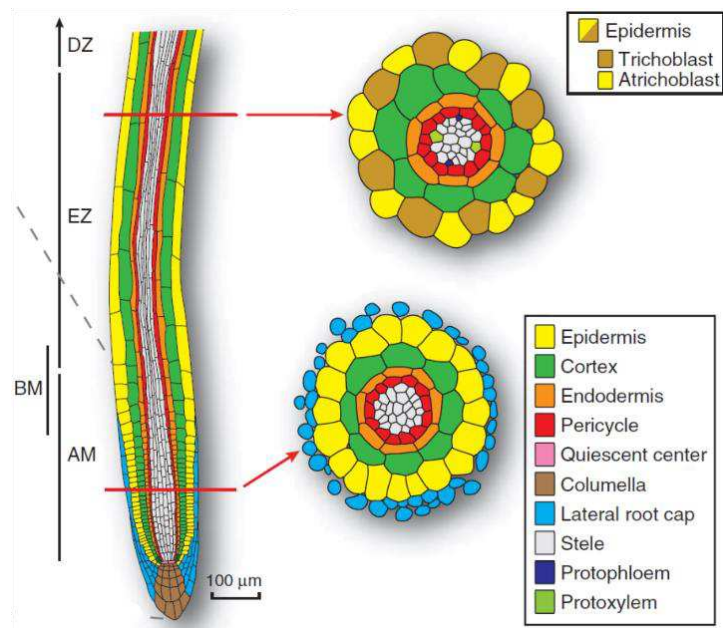


Figure 40. Organisation de la racine d'*Arabidopsis thaliana*. Figure issue de Overvoorde, Fukaki, and Beeckman (2010). DZ : Zone de différenciation. EZ : Zone d'élongation. BM : Méristème basal. AM : Méristème apical.

En longueur, la racine est divisée en plusieurs zones fonctionnelles avec en bout de racine la coiffe, puis la zone méristématique, la zone d'élongation et finalement la zone de différenciation (Figure 41).

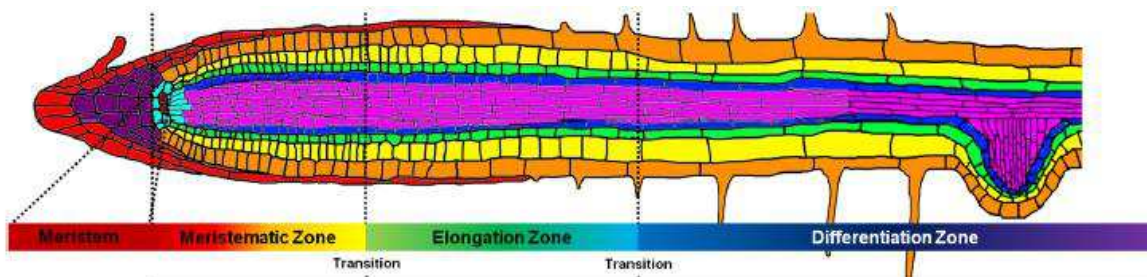


Figure 41. Différentes zones de l'apex racinaire. Figure issue de Somssich, Khan, and Persson (2016).

La coiffe racinaire entoure et protège la zone méristématique. Cette zone est la première en contact avec l'environnement et agit également en tant qu'organe senseur.

Le plus grand rôle de la coiffe, outre la protection du méristème, est de diriger l'orientation de la croissance racinaire en direction ou à l'opposé de certains signaux (Kumpf and Nowack 2015). L'exemple le mieux étudié est le gravitropisme positif de la croissance racinaire. Les cellules de la coiffe contiennent des grains d'amidon, appelés statolites, qui se déplacent dans les cellules selon l'axe de la gravité. Lorsque l'axe racinaire n'est plus orienté dans l'axe gravitationnel, les statolites sédimentent. Ces mouvements entraînent alors des changements intracellulaires liés au réseau de filaments d'actine et à la pression hydrostatique qui agissent sur les flux d'auxine, une hormone contrôlant un grand nombre d'aspects du développement végétal. Ces phénomènes ont pour conséquence la réorientation de la croissance dans l'axe de la gravité.

La zone méristématique contient le centre quiescent qui est constitué de 4 cellules chez *A. thaliana* (Azpeitia *et al.* 2013). Ces dernières permettent le maintien de l'identité des cellules souches indifférenciées, appelées initiales, qui les entourent (Figure 42). Les initiales sont des cellules qui se divisent continuellement pour produire de nouvelles cellules qui entrent dans la formation des différentes files cellulaires composant la racine (Van den Berg *et al.* 1997). La théorie est que les cellules du centre quiescent font passer des signaux vers les initiales par les plasmodesmes (connexion symplasmique de cellule à cellule). Ces signaux ont pour but de maintenir les initiales dans un stade indifférencié mais en forte division (Stahl *et al.* 2013). Ce phénomène serait régulé par l'accumulation différentielle de callose, un polymère permettant la régulation de l'ouverture des plasmodesmes (Wolf 1991).

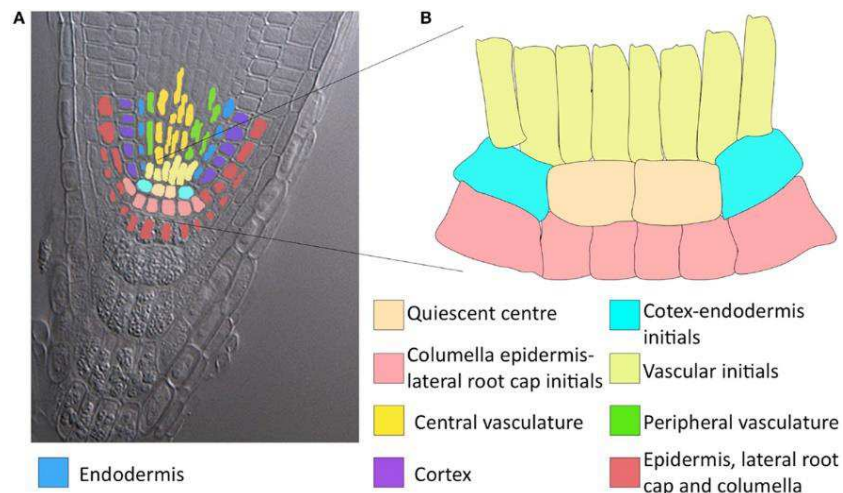


Figure 42. Organisation du méristème apical racinaire d'*A. thaliana*. Figure issue de Azpeitia *et al.* (2013)

La zone d'élongation est une zone d'expansion cellulaire longitudinale (Schiefelbein 1991). Dans cette zone les parois cellulaires sont très fines et élastiques afin de permettre une meilleure élongation par turgescence. Encore une fois, l'auxine joue un rôle dans le développement racinaire en déclenchant l'acidification des parois par l'activation de pompes

à protons. L'acidification des parois permet ensuite l'activation de protéines appelées expansines qui entraînent le relâchement du réseau de microfibrilles de cellulose (Somssich *et al.* 2016). Certaines enzymes peuvent également rigidifier les cellules de la zone d'élongation, ralentissant ou arrêtant ainsi la croissance racinaire (Passardi *et al.* 2004). Ce phénomène fait que cette zone est d'une importance capitale dans la croissance racinaire et la réponse aux stress.

Une fois que les cellules de la zone d'élongation ont atteint leur taille finale, elles entrent dans la zone de différenciation et acquièrent une fonction spécifique. C'est dans cette zone que les vaisseaux sont formés et que les cellules voient leur paroi se rigidifier. C'est particulièrement le cas pour l'endoderme qui constitue, avec les bandes de Caspari, une barrière aux éléments potentiellement toxiques (Andersen *et al.* 2015).

La croissance du système racinaire est donc un équilibre en division cellulaire et élongation cellulaire (Sanchez-Calderon *et al.* 2013).

2. L'auxine, une hormone essentielle à la régulation du développement racinaire

Les auxines sont une famille de composés organiques à cycle hétérocyclique indole. L'auxine la plus répandue chez les végétaux est l'acide indole 3-acétique produit à partir de l'acide aminé tryptophane (Vanneste and Friml 2009). Cette hormone est majoritairement synthétisée par les cotylédons et les jeunes feuilles et est transportée vers les apex racinaires par le phloème. Néanmoins, les apex racinaires sont capables de synthétiser de l'auxine au niveau de leur zone méristématique (Ljung 2005).

La voie de signalisation de l'auxine la mieux caractérisée est la voie SCF/TIR1 (Figure 43). L'expression des gènes de réponse à l'auxine est initiée par les ARF (Auxin Responsive Factor). Lorsque la concentration d'auxine est faible, la présence des protéines AUX/IAA empêche cette initiation en se fixant sur les ARF. Lorsque l'auxine est en plus forte concentration, elle se lie à la protéine TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1). Cette complexation augmente l'affinité de TIR1 pour SCF, une ubiquitine ligase (Skp1/Cullin/F-box) et AUX/IAA. Une fois ce complexe formé, la protéine SCF transfère des groupements ubiquitine à AUX/IAA afin d'entraîner sa dégradation par le protéasome 26S. Cette dégradation permet de soulever l'inhibition des facteurs de transcription ARF et d'initier la transcription des gènes de réponse à l'auxine (Woodward 2005).

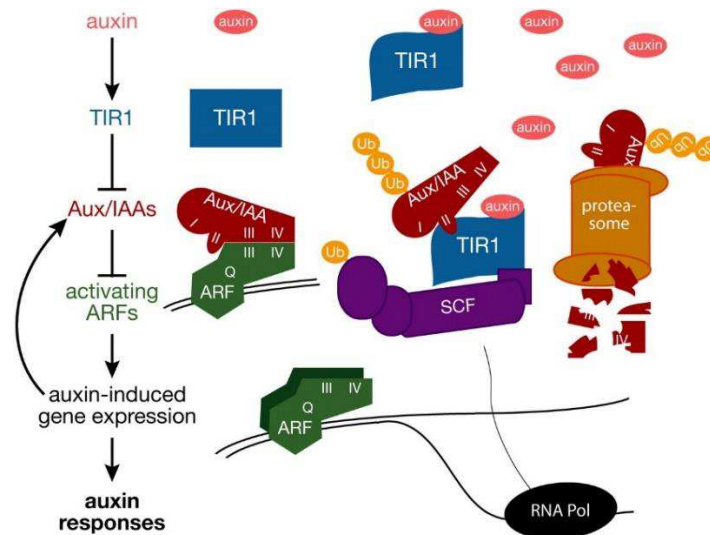


Figure 43. Signalisation de l'auxine par la voie SCF/TIR1. Figure issue de Woodward (2005).

L'auxine est transportée de façon polaire, c'est-à-dire que l'hormone est importée dans les cellules par des transporteurs dont la position est polarisée (d'un côté défini de la cellule). Les transporteurs d'auxine sont caractérisés par : 1/ des transporteurs d'influx tel que AUX1 (AUXIN RESISTANT 1) ou LAX1 (like AUX1) qui importent l'auxine dans les cellules, 2/ des transporteurs d'efflux du type PIN (PIN-FORMED) ou ATPB (ATP Binding cassette type B) qui exportent l'auxine du cytoplasme vers l'apoplasme (Figure 44A et C ; Petrasek and Friml 2009). Au niveau de l'apex racinaire, l'auxine est différenciellement accumulée en fonction des zones racinaires et des groupes cellulaires. Cette accumulation différencielle de l'hormone forme un gradient qui permet le contrôle très fin du développement de l'architecture racinaire (Eshel and Beeckman 2013). L'auxine s'accumule ainsi au niveau de l'apex avec un pic d'accumulation au niveau du centre quiescent et de la coiffe racinaire (Figure 44B). Ce gradient est maintenu par un transport actif de l'hormone qui forme le modèle de transport en fontaine inversée (Figure 44B). Les principaux transporteurs impliqués dans ce transport en fontaine inversée sont les transporteurs PIN1 et PIN2. Le transporteur PIN1, en position basale des cellules, permet d'accumuler l'auxine au niveau du centre quiescent tandis que PIN2, en position apicale des cellules, permet de faire remonter l'auxine (Figure 44C).

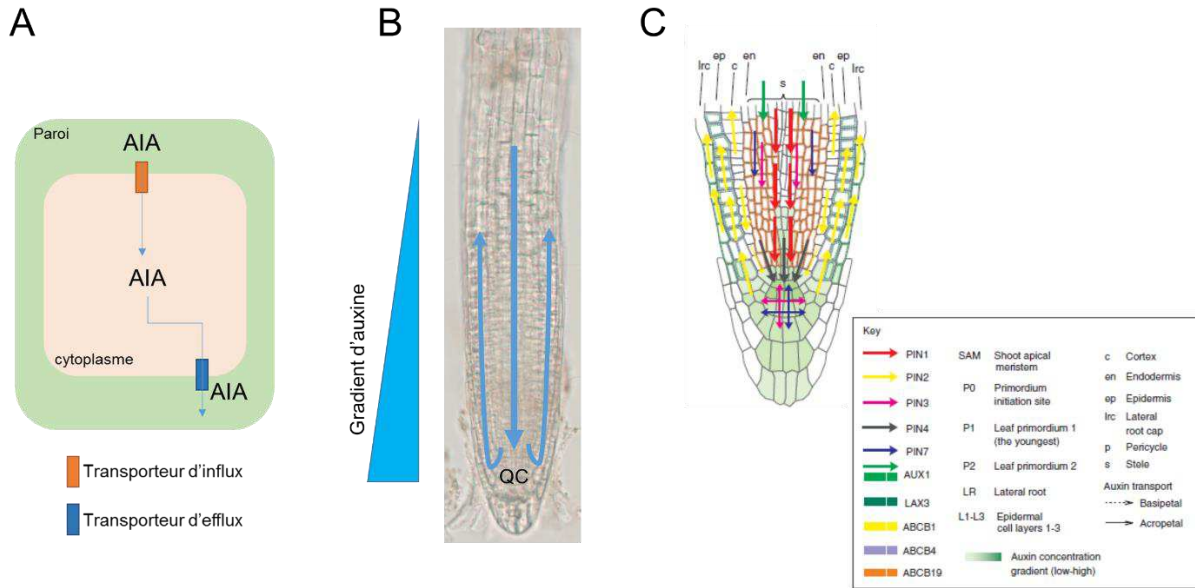


Figure 44. Transport polarisé et gradient d'accumulation de l'auxine. A) Transport polarisé de l'auxine par des transporteurs d'efflux et d'influx. AIA : acide indole 3-acétique. B) Gradient d'auxine et transport en fontaine inversée de l'auxine. QC : Centre quiescent C) Les transporteurs d'auxine. Figure issue de Petrasek and Friml (2009).

La perturbation du transport de l'auxine et de son gradient d'accumulation peut rapidement avoir des conséquences sur le développement du système racinaire. En effet, l'auxine peut rapidement devenir inhibitrice de l'élongation des cellules lorsqu'elle est en excès (Band *et al.* 2012) et plus particulièrement dans le système racinaire où l'auxine agit en très faibles concentrations (Figure 45).

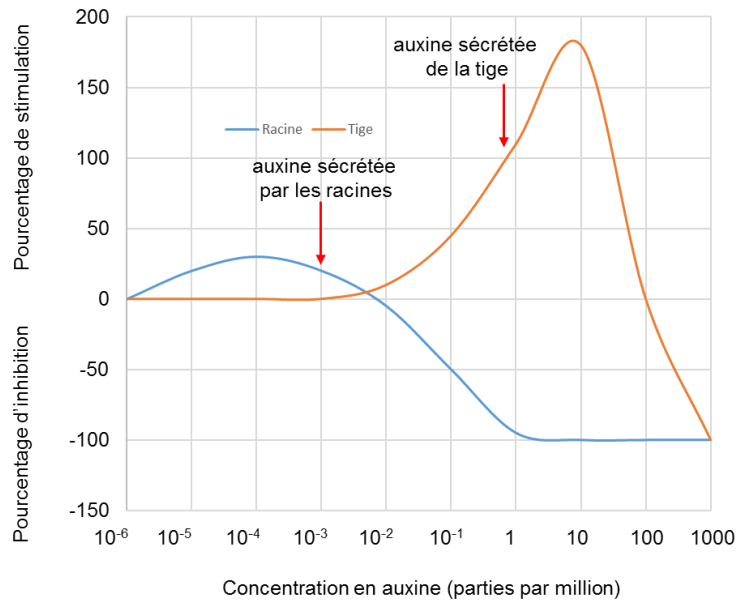


Figure 45. Modulation de l'élongation des cellules végétale par l'auxine. Figure modifiée de Band *et al.* (2012).

Le gradient d'auxine est maximum au niveau du centre quiescent (Figure 44B). Cette accumulation permet le maintien à l'état de cellules souches indifférenciées (Overvoorde *et al.* 2010).

L'hormone est aussi responsable du maintien la zone de transition entre la zone d'élongation et la zone de différenciation (Di Mambro *et al.* 2017).

L'auxine influe également l'architecture racinaire en contrôlant la formation des racines latérales. Les racines latérales sont formées à partir de petits groupes de cellules issues du péricycle. Bien que l'initiation des racines latérale se déroule au niveau de la zone de différenciation, le conditionnement de ces cellules se fait dès la zone méristématique. En effet, sous la forme d'oscillations de pic d'auxine, l'hormone conditionne ces cellules à devenir des cellules initiant une racine latérale. Le mécanisme pouvant expliquer ce phénomène est encore peu clair (pour revue, voir ten Tusscher and Laskowski 2017).

D'autre part, l'auxine interagit avec toutes les autres hormones végétales (Saini *et al.* 2013) et est impliquée dans la réponse racinaire d'un grand nombre de stress *et al.* 2018 ; Kazan 2013).

3. Réponses du système racinaire aux stress abiotiques

L'absorption de nutriments essentiels et l'évitement d'éléments toxiques, tels que les ETM, sont d'une importance capitale pour le développement de la plante. Le maintien d'une morphologie optimale du système racinaire est donc essentiel. Plusieurs morphologies racinaires sont mises en place en fonction du stress ressenti. La réponse la plus commune est l'arrêt de la croissance de la racine primaire et le développement des racines latérales ainsi que des poils absorbants (Potters *et al.* 2009). Ce remaniement permet à la plante d'arrêter la croissance racinaire vers le stress ressenti et de chercher des conditions de croissance optimales sur le niveau horizontal tout en augmentant sa surface d'absorption.

Dans notre étude, nous nous intéresserons particulièrement à la modulation de l'architecture racinaire lorsque la plante ressent une carence en Pi (Figure 46). Lorsqu'une carence en Pi est ressentie au niveau de l'apex racinaire primaire plusieurs acteurs protéiques sont mis en place de façon post-transcriptionnelle. C'est le cas de STOP1 (Sensitive To Proton Rhizotoxicity 1) qui est activée par un faible ratio Pi/Fe. Cette protéine active ensuite ALMT1 (Aluminum Activated Malate Transporter) qui entraîne l'exsudation de malate dans l'apoplasme, un acide organique capable de chélater le Fe. Cet acide organique participe au relargage de Pi de complexes Fe-Pi dans l'apoplasme (Balzergue *et al.* 2017). Cette remobilisation du Fe et l'action de LPR1 (Low Phosphate Root 1), une ferroxidase qui provoque l'oxydation de Fe²⁺ en Fe³⁺, provoque l'accumulation de ROS par la voie de Fenton (partie B .2). Cette accumulation de ROS entraîne alors la synthèse de callose au niveau des plasmodesmes des cellules de la zone méristématique, empêchant ainsi la communication de

cellule à cellule. Or, la communication symplasmique dans cette zone est essentielle à la croissance (Müller *et al.* 2015 ; Figure 47). Cette cascade d'évènements permet de moduler l'architecture racinaire en inhibant la croissance de la racine primaire en diminuant l'activité mitotique (Sánchez-Calderón *et al.* 2005) et en induisant l'épaississement des parois cellulaires (Müller *et al.* 2015 ; Balzergue *et al.* 2017). Cette inhibition induit le développement des racines latérales et le développement des poils absorbants qui permettent, à terme, d'augmenter la surface d'absorption racinaire et de limiter la carence en Pi.

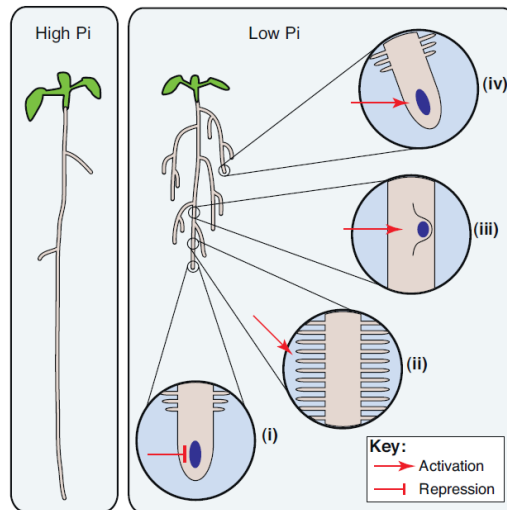


Figure 46. Modulation de l'architecture racinaire en réponse à une carence en phosphate. Figure issue de Péret *et al.* (2011).

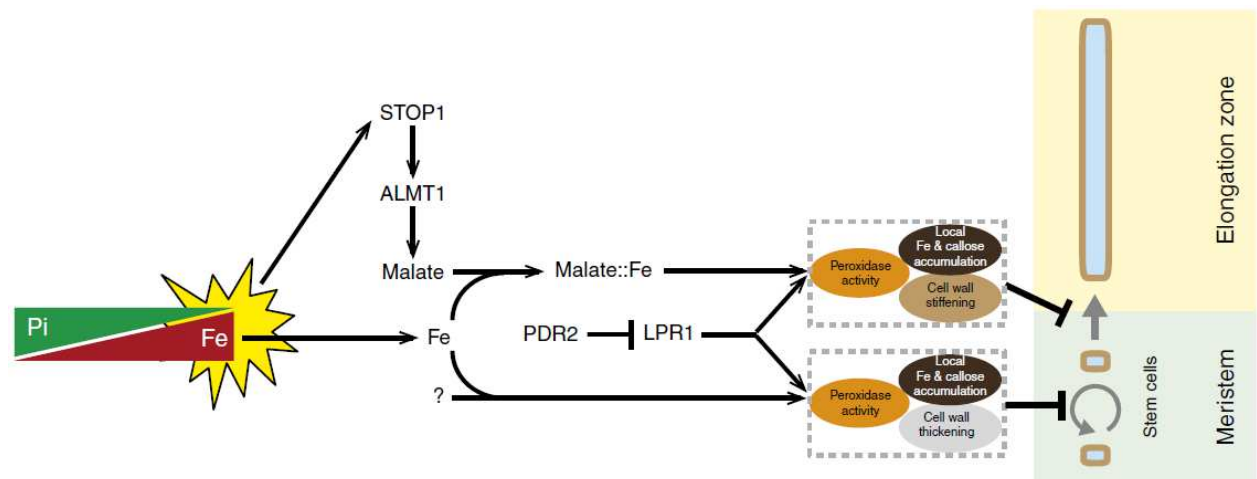


Figure 47. Réponse du système racinaire à une carence en phosphate. Figure issue de Balzergue *et al.* (2017).

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

De nombreux mécanismes biologiques sont perturbés et mis en place chez les végétaux au cours de l'exposition à un stress métallique. De ce fait, une meilleure compréhension des processus de réponse de plantes sensibles et tolérantes, que ce soit au niveau physiologique, moléculaire ou génétique, est indispensable pour avoir une vision globale des mécanismes impliqués.

Étude du rôle des modifications post-traductionnelles dans la réponse aux stress métalliques chez *Arabidopsis*

Les PTM sont vraisemblablement des acteurs clés dans les réponses aux stress dans le monde vivant, en particulier chez les végétaux qui sont des organismes sessiles. En effet, elles permettent de réguler très finement les processus cellulaires fondamentaux de la plante en fonction des caractéristiques de son environnement. Ces modifications concernent les protéines de type histones et 'non histones'. Les histones gouvernent le repliement de la chromatine et sont des acteurs clés des processus de régulation épigénétique. Depuis une quinzaine d'années, l'étude des PTM des protéines non-histones est un domaine en plein essor. Par exemple, des protéines phosphorylées et méthylées ont été identifiées dans tous les processus cellulaires mais le rôle de ces modifications reste très peu compris, en particulier en ce qui concerne la réponse aux stress environnementaux.

L'objectif de la première partie de cette thèse est d'étudier le rôle des PTM dans la réponse et l'adaptation des plantes à un stress induit par les ETM. Plus précisément nous étudierons le rôle de la méthylation des résidus lysine et de la phosphorylation des protéines non histones dans des plantes du genre *Arabidopsis* soumises à des stress induits par le Cd ou l'U. Le choix de ces ETM toxiques repose sur i/ leurs différences de propriétés physico-chimiques (acides dur ou mou suivant la classification de Lewis) qui mettent en jeu des processus de réponse différents chez la plante ; ii/ les très faibles connaissances sur les mécanismes moléculaires mis en place pour répondre à un stress induit par l'U ; iii/ la possibilité d'étudier le rôle des PTM dans des plantes naturellement tolérantes au Cd.

Les 3 espèces du genre *Arabidopsis* étudiées au cours de ce travail sont (Figure 48): i/ *A. thaliana*, plante modèle en biologie végétale pour laquelle des données génomiques, transcriptomiques et protéomiques en relation avec le stress métallique sont disponibles (Villiers *et al.* 2011 ; Doustaly *et al.* 2014) ; ii/ *A. halleri* qui présente la particularité d'être tolérante et hyperaccumulatrice de Zn et de Cd (Verbruggen *et al.* 2009) ; iii/ *A. lyrata*, proche parent d'*A. halleri* ne possédant pas les capacités de tolérance et d'accumulation de Zn ou de Cd. Ces plantes seront étudiées au niveau physiologique et moléculaire suite à des stress

induits par la présence de Cd ou d'U dans le milieu de culture. A l'opposé d'*A. thaliana*, *A. halleri* et *A. lyrata* ne pratiquent pas l'auto-fécondation et chaque individu est donc unique d'un point de vue génétique. Pour ces espèces on ne parle donc pas d'écotype ou de lignée mais de population, terme faisant référence à un ensemble de plantes qui se sont développées dans une zone géographique définie. Chaque population évolue en fonction de son environnement et en particulier de la composition du sol, qu'il soit pollué ou non par des ETM (sol métallicole ou non métallicole). Cette diversité acquise naturellement est une opportunité unique pour identifier de nouveaux acteurs dans la réponse et l'adaptation aux ETM. Dans le cadre d'une collaboration avec le Professeur Nathalie Verbruggen de l'Université Libre de Bruxelles, nous avons eu l'opportunité d'étudier trois populations métallicoles d'*A. halleri* collectées dans des prairies situées à proximité de sites métallurgiques. Pour nos expériences nous avons utilisé les populations Auby (France), PL22 (Pologne), et I16 (Italie) qui sont issues de différentes unités génétiques (Meyer *et al.* 2015).

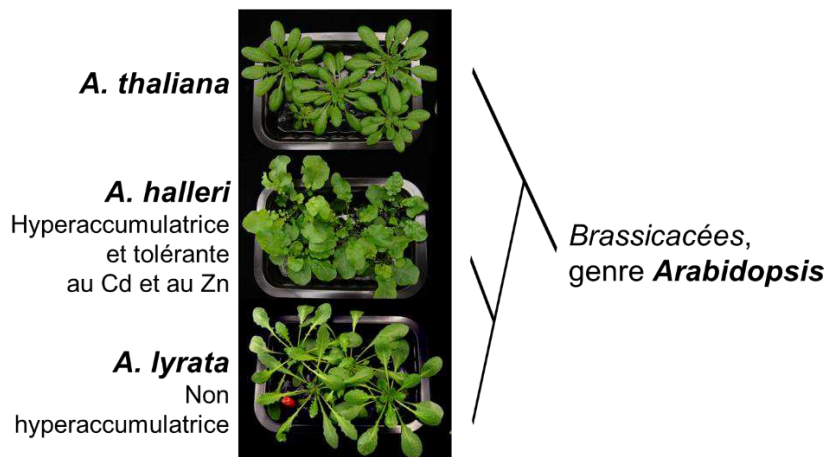


Figure 48. Les trois espèces du genre *Arabidopsis* étudiées au cours de ce travail.

Pour caractériser le rôle des PTM au cours d'un stress métallique nous nous intéressons à la fois aux enzymes qui réalisent les modifications (méthyltransférases, kinases...) et aux protéines modifiées (substrats) par celles-ci. Ainsi, par des approches immunologiques et par spectrométrie de masse des protéines nous analyserons la nature, l'abondance relative et le niveau de modification des substrats. Nous étudierons également l'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans les réactions de méthylation et de phosphorylation lors de stress induits par l'U et le Cd chez les 3 espèces modèles. Pour finir, nous étudierons les conséquences de la mutation de gènes codant des protéines lysine méthyltransférases chez *A. thaliana* afin de mettre en évidence le rôle de ces enzymes dans la tolérance aux stress métalliques. L'objectif global de ce projet est d'identifier de nouveaux acteurs protéiques et de définir leurs rôles dans les processus de réponse et détoxification des

ETM chez les végétaux. Ces mécanismes peuvent se révéler communs à plusieurs métaux ou spécifiques à l'un des polluants. De plus, les processus touchés par ces PTM peuvent contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de réponse et d'adaptation aux stress environnementaux de façon plus générale.

Caractérisation physiologique et cellulaire des effets de l'uranium sur l'architecture et le développement racinaire d'*A. thaliana*

Les connaissances actuelles sur la toxicité de l'U chez les plantes sont fragmentaires. En particulier les cibles directes de l'U et les cascades de signalisation associées sont encore à découvrir. De plus, aucun transporteur d'U n'a encore été caractérisé dans le monde vivant. Caractériser les réponses physiologiques et cellulaires impliquées dans la toxicité de l'U est donc essentiel, et ce plus particulièrement dans le système racinaire, le premier organe en contact avec le métal. Une meilleure compréhension des mécanismes de réponse et d'adaptation à l'U est également nécessaire dans la mise en place de projets de phytoremédiation efficaces. En effet, l'U est peu transloqué des racines vers les feuilles sans ajout d'adjuvants (Laurette *et al.* 2012a; Laurette *et al.* 2012b; Straczek *et al.* 2010).

Nous nous intéresserons tout d'abord à la toxicité cellulaire de l'U et à ses effets sur l'architecture racinaire. L'homéostasie du Fe et du Pi étant perturbée lors d'un stress induit par l'U (voir Chapitre I partie A. 4)) nous quantifierons ces éléments en parallèle de l'U dans les milieux de culture et les plantes. Ensuite, nous nous intéresserons à la synthèse et l'accumulation spatiotemporelle de messagers secondaires, tels que le NO et les ROS, ainsi que de polymères jouant un rôle dans l'imperméabilisation des parois cellulaires (lignine et callose). Pour finir, l'auxine étant essentielle au développement du système racinaire (voir Chapitre I partie E. 2), nous étudierons les profils d'accumulation de l'hormone ainsi que l'abondance de ces principaux transporteurs au niveau de l'apex racinaire.

Cette étude est la première approche globale visant à découvrir les mécanismes physiologiques et moléculaires mis en place par le système racinaire d'*A. thaliana* en réponse à l'U.

Chapitre II

Matériels et méthodes

A. Matériel végétal et conditions de croissance

Au cours de cette étude différentes lignées et populations d'*Arabidopsis* ont été utilisées : *Arabidopsis thaliana*, écotype sauvage Col0, mutants d'insertion dans des gènes codant des protéines lysine méthyltransférases (Tableau 5) et lignées transgéniques *DR5::GFP* (Lequeux *et al.* 2010), *PIN1::PIN1-GFP* (Blilou *et al.* 2005), *PIN2::PIN2-GFP* (Blilou *et al.* 2005), et *Cycline B1::GUS* (Lequeux *et al.* 2010) ; *Arabidopsis halleri*, populations Auby, PL22 et I16 (Meyer *et al.* 2015); *Arabidopsis lyrata*, sous espèce *Petraea*.

Après stérilisation des graines (15% (v/v) NaClO, 0,01% (v/v) Triton X100), ces dernières ont été stockées 2 jours à 4°C à l'obscurité pour stratification. Les graines ont ensuite été semées dans des flotteurs contenant 0,65% (m/v) d'agar (Sigma-Aldrich, Agar type A) dans différents systèmes hydroponiques en fonction du stade de développement désiré. Les systèmes hydroponiques ont été modélisés en utilisant le logiciel FreeCAD v 0.15 (freecadweb.org, 2015) et imprimés en Acrylonitrile Butadiène Styrène (plastique ABS) en utilisant une imprimante 3D Ultimaker 2 (Ultimaker, Netherlands).

Le milieu de croissance hydroponique (milieu nommé « Bruxelles ») (Meyer *et al.* 2015) est composé de : 0,88 mM K₂SO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O, 1 mM MgSO₄ · 7 H₂O, 0,25 mM KH₂PO₄, 10 µM H₃BO₃, 0,1 µM CuSO₄ · 5H₂O, 0,6 µM MnSO₄ · H₂O, 0,01 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 10 µM ZnSO₄ · 7 H₂O, 10 µM NaCl, 20 µM FeEDTA and 0,25 mM MES (Meyer *et al.* 2015). Le pH de la solution a été ajusté à 5,8 avec du KOH 1M.

Les conditions dans la chambre de culture sont de 21 ± 2°C, 80 µmoles de photons par m² et par sec, humidité de 70 ± 5 %. Les cultures hydroponiques classiques ont été effectuées en jours courts (12 heures de lumière/12 heures d'obscurité) tandis que les cultures de type « µponie » ont été effectuées en jours longs (18 heures de lumière/6 heures d'obscurité).

Les traitements des plantules par les ETM ont été effectués après 4 semaines pour l'hydroponie classique et 6 jours pour la µponie. Ces traitements consistent à changer le milieu de culture par différents milieux décrits ci-dessous :

- **Traitement cadmium (Cd)** : milieu Bruxelles supplémenté avec 0,2, 1 ou 5 µM de sulfate de Cd (CdSO₄).
- **Traitement zinc (Zn)** : milieu Bruxelles supplémenté avec 150 µM ou 2 mM de sulfate de Zn (ZnSO₄).
- **Traitement No Phosphate (NP)** : le milieu No Phosphate est un milieu Bruxelles totalement dépourvu de KH₂PO₄.
- **Traitement Low Phosphate (LP)** : le milieu Bruxelles Low Phosphate est carencé en phosphate, il contient 25 µM de KH₂PO₄ à la place de 250 µM dans le milieu de référence.
- **Traitement uranium (U)** : milieu Bruxelles Low Phosphate contenant 10, 20, 30, 40 ou 50 µM de nitrate d'uranyle (UO₂(NO₃)₂).

Avant toute analyse les plantes traitées avec de l'U ont été rincées 2 fois avec une solution de Na_2CO_3 10 mM et 2 fois avec de l'eau distillée afin de désorber l'U adsorbé à la surface des racines (Doustaly *et al.* 2014). Suite aux traitements avec du Cd ou du Zn les racines des plantules sont rincées 2 fois dans de l'eau distillée.

B. Extraction des protéines et immunoblots

Les protéines solubles ont été extraites en incubant pendant 30 min à 4°C des tissus congelés et réduits en poudre (racines ou feuilles) dans un tampon d'extraction Tris-HCl 100 mM, pH 8, contenant 10% (v/v) de glycérol et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science, ref. 04 693 132 001). Après centrifugation de l'extrait (14000 g, 4°C, 15 min) les protéines solubles sont récupérées dans le surnageant. L'extraction des protéines insolubles a été effectuée par resuspension des culots dans le tampon d'extraction contenant 2% (m/v) de SDS suivie d'une incubation de 30 min à température ambiante. Après centrifugation (14000 g, 4°C, 15 min) les protéines membranaires solubilisées sont récupérées dans le surnageant. Les protéines ont ensuite été séparées en gels de polyacrylamide SDS-PAGE 12 ou 15% (m/v) et transférées sur membranes de nitrocellulose en utilisant un appareil TransBlot (BioRad). L'immunoblot a été conduit avec des anticorps anti thréonines phosphorylées (Cell Signaling Technology, ref. 9381, dilution 1:1000), anti sérines phosphorylées (Invitrogen, ref. 61-8100, dilution 1:1000), anti arginines monométhylées (Cell Signaling Technology, ref. 8015, dilution 1:1000), anti arginines diméthylées de façon asymétrique (Cell Signaling Technology, ref. 13522, dilution 1:1000) et anti lysines triméthylées (abcam, ref. ab76118, dilution 1:1000). Nous avons également utilisé le PhostagTM (Fujifilm Wako Chemical), réactif qui reconnaît les différents résidus phosphorylés

La détection des anticorps sur les membranes a été effectuée en utilisant des anticorps secondaires de souris ou de lapin (dilution 1:40000) conjugués à des peroxydases de raifort. Le signal a été révélé avec un kit de détection chémiluminescent ECL Plus (Thermo Fischer Scientific) et un scanner laser Typhoon (Amersham Biosciences).

C. Identification de protéines méthylées par spectrométrie de masse

L'identification de protéines lysine méthylées chez les 3 espèces d'*Arabidopsis* a été réalisée par la plateforme de spectrométrie de masse protéomique (MSPP) de Montpellier. Les bandes découpées sur les gels SDS-PAGE ont été décolorées dans 50% (v/v) acétonitrile dans un tampon 25 mM NH_4HCO_3 , déshydratées dans 100% acétonitrile, puis séchées à température ambiante. La réduction des ponts disulfures a été réalisée dans 250 μl de DTT 10 mM à 56°C

pendant 45 min, puis les cystéines ont été alkylées dans 250 µl d'iodoacetamide 55 mM pendant 30 min. Après déshydratation, les protéines ont été digérées par une solution de trypsine 0.0125 µg/µL (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, Madison, USA) dans 25 mM NH₄HCO₃ pendant une nuit à 37°C. Les peptides ont été extraits dans 100 µl d'acétonitrile 80% (v/v) et d'acide formique 2% (v/v), séchés sous vide puis resuspendus dans 10 µl d'acide formique 2% (v/v).

Les analyses de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ont été réalisées sur un système Ultimate 3000 RSLC nano system couplé en ligne avec une source nano easy ion et un spectromètre de masse Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Les échantillons ont été chargés sur une pré colonne PepMap 100 C18 (Thermo Scientific, 5 µm particle size, 100 Å pore size, 300 µm i.d. x 5 mm length) puis séparés par phase inverse sur une colonne PepMap C18 (Thermo Scientific, 2 µm particle size, 100 Å pore size, 75 µm i.d. x 50 cm length) à l'aide d'un gradient d'acétonitrile 0 à 80% (v/v) dans 0.1% (v/v) d'acide formique (300 nl/min, durée totale 125 min). Les peptides ont été transférés en phase gazeuse par ionisation electrospray à 1.7 kV. Les spectres ont été enregistrés à l'aide du logiciel Xcalibur (4.0.27.19) (Thermo Fisher Scientific).

Les données de MS/MS ont été analysées avec le logiciel Proteome Discoverer (version 1.4.0.288, Thermo Fisher Scientific) et le moteur de recherche Mascot (version 2.4.1, Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). Les données MS/MS obtenues à partir des échantillons d'*A. thaliana* ont été confrontées à la base de données non redondante TAIR (2011) ; celles issues des échantillons d'*A. halleri* et *A. lyrata* ont été confrontées à une base générée spécialement pour notre étude par la plateforme MSSP à partir des données de séquençage du génome d'*A. lyrata* (v2.1) disponibles à partir du portail https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Alyrata. Les paramètres de recherche Mascot sont : trypsine comme enzyme, 3 « missed cleavage » autorisés (la méthylation des lysines étant connue pour réduire l'efficacité de coupure de la trypsine), carbamidométhylation des cystéines, mono-, di- et triméthylation des lysines, N-terminal acétylation, déamidation des asparagines et glutamines, et oxydation des méthionines. Les limites de tolérance sur la masse ont été fixées à 10 ppm sur les scans complets et à 0.02 Da pour les ions fragmentés. Les protéines validées contiennent au moins 2 peptides avec une p-value <0.05.

D. Criblage de mutants de protéines lysine méthyltransférases pour leur tolérance au cadmium

1. Génotypage des mutants d'insertion d'*A. thaliana*

Extraction d'ADN génomique - L'extraction d'ADN génomique (ADNg) a été effectuée selon Edwards *et al.* (1991) à partir de plantules d'*A. thaliana* âgées de 3 semaines. Après broyage au poter d'une feuille, 400 µl de tampon d'extraction (200 mM Tris, pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% (m/v) SDS) sont ajoutés. Le mélange est alors centrifugé (14000 g, température ambiante, 1 min). Trois cents µl de surnageant sont prélevés, auxquels sont ajoutés 300 µl d'isopropanol. Le mélange est incubé 2 min à température ambiante puis centrifugé (14000 g, température ambiante, 5 min). Après élimination du surnageant, l'ADNg est repris dans 100 µl de tampon TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8,0).

Génotypage par PCR - Cette technique est utilisée pour identifier les copies sauvage et mutée d'un gène en utilisant des couples d'amorces dédiés à l'amplification de ces deux allèles (Tableau 5). L'amorce RP (Right genomic Primer) est située dans le gène d'intérêt, à proximité de l'insertion de l'ADN-T. L'utilisation de cette amorce avec celle nommée LP (Left genomic Primer), également localisée dans le gène d'intérêt, permet d'amplifier l'allèle sauvage. En utilisant une amorce s'hybridant sur le bord gauche de l'ADN-T, c'est la copie mutée du gène qui est amplifiée.

La réaction de PCR est réalisée en présence des quantités d'enzyme et de tampon recommandées par le fournisseur (Euromedex), de 0,2 µM de chaque amorce, de 0,2 mM de chaque dNTP et de 1 µL d'ADN génomique (volume final de 30 µL). Le programme d'amplification est le suivant : 1 cycle de 5 min à 95°C, puis 35 cycles de 50 s à 95°C, 50 s à 55°C, 80 sec à 72°C, puis 1 cycle de 4 min à 72°C. Les amplicons sont analysés en gels d'agarose 0,8% (m/v) et visualisés en présence de SYBR Safe DNA gel stain. Afin d'identifier le site exact d'insertion de l'ADN-T au sein du locus la même réaction de PCR est réalisée pour amplifier la copie mutée du gène. Après purification sur une colonne Nucleospin® (Macherey-Nagel), l'amplicon est séquencé (Eurofins).

Tableau 5. Caractéristiques des mutants d'insertion d'*A. thaliana* dans des gènes codant des protéines lysine méthyltransférases

	AGI	Nom	Classe	Mutant	Nom du mutant	Amorces utilisées pour le génotypage		Criblage pour la tolérance au Cd
						Amorce droite	Amorce gauche	
PKMT de type SBS	AT1G08125	SBS1	-	SALK_124644C	<i>sbs1</i>	AAAGACGAAACCTCAAAAGGC	CTTCCTGCTATTTTCCCCTG	OUI
	AT1G63855	SBS2	-	GK-911F08	<i>sbs2</i>	TTTGGAGAAGAATGAGACAGTCG	GTGATTCTTCGATACTCGAGGTTA	OUI
	AT1G66680	SBS3	-	GK-032H01	<i>sbs3</i>	AGGTAACAGAAAGAAAGTGC GGTA	TGTTTCTGAAAACGATGTTACGAC	OUI
	AT1G73320	SBS4	-	NA	NA	-	-	NON (lignée non disponible en 2015)
	AT1G79915	SBS5	-	SALKseq_42690	<i>sbs5</i>	CTGATTTCCATGGCATTGTG	TTCGCTATTATCCCCAAAC	OUI
	AT3G50850	SBS6	-	GK-125E08	<i>sbs6</i>	CCAAAGTATAAGGGTGTCTGGAT	ATAACAACCCTCCACGTGTAACC	OUI
	AT4G35987	CaMKMT	-	SALK_138607C	<i>camkmt1</i>	GCTCTGCTCTGTGATTTGGC	TCAACTTTCAAGTCCACCCAC	OUI
	AT5G27400	SBS7	-	SALK_019618C	<i>sbs7</i>	AAATCCCAGCATACCAACTC	CTCCGTCATCACTCTCGCTAG	OUI
	AT5G44170	SBS8	-	SALK_128491C	<i>sbs8</i>	AAAACATCTCCGATTTGACCC	TCGCATAACTCCCCAAACAAC	OUI
AT5G49560	SBS9	-	SALK_046849C	<i>sbs9</i>	CGGTAATGTACTGAAGCTCCG	GCTGACGTCACAAGGTCTCTC	OUI	
AT5G53920	PrmA	-	SALK_070621	<i>prma</i>	GAAGCTGCAAAAAGAGCATTG	GTTATGCTCAAACTCAGCGC	OUI	
PKMT de type SDG	AT1G01920	SDG42	VII	SAIL_321_C10	<i>sdg42</i>	TCCACATTCTTTCGTGTTCC	TACTCGGAATTGCCTCAACAG	OUI
	AT1G14030	LSMT	VII	SAIL_1156_C01	<i>lsmt1</i>	CCAGAGACAGTGACTGCTTCC	CACAAGCCGAAGGTAAGTGAAG	OUI
	AT1G24610	PPKMT2	VII	GK-833G12	<i>ppkmt2</i>	AAATTTCCAGTAATCGCATTGAAC	CCGTTTATGAATTTGGTTCCG	OUI
	AT1G26760	SDG35 (ATXR1)	VI	SALK_117606	<i>sdg35</i>	ATCGTAGTACCGCTGCTGTTG	CCTAACGCAAGACGTCTTCAC	OUI
	AT2G17900	SDG37 (ASHR1)	VI	SALK_127952C	<i>sdg37</i>	AAGTTCGGCCTAACACTAGCC	TGCTTGCTTCTTAGGAGCAAG	NON (site d'insertion de la mutation non confirmé)
	AT2G18850	SDG50	VII	SAIL_849_G09	<i>sdg50</i>	GAAGTTCCTCCAAAGATGATCCC	TGGTTTGAATTTGAGTCCAG	OUI
	AT2G19640	SDG39 (ASHR2)	VI	SALK_024470C	<i>sdg39</i>	GGATAAATCCCATAAGCTCGC	TATGGACGGCTAAGTGTGGAG	OUI
	AT3G07670	PPKMT3	VII	SALK_150387 (CA)	<i>ppkmt3</i>	AACCGAACCAACCGTAAATC	ACTGCATCAATGATTTCCAGC	OUI
	AT3G21820	SDG36 (ATXR2)	VI	SALK_026154C	<i>sdg36</i>	TTGTGAAGCAGAAGTCTTCCTC	TCTCGATTGATCCAATGAACC	OUI
	AT3G55080	SDG51	VII	SALK_057077C	<i>sdg51</i>	TTGAATTTTGTGTTGGCCAC	TTGTCTTCATCCCTCAAACG	OUI
	AT3G56570	SDG52	VII	SALK_131900C	<i>sdg52</i>	CCATGGTAATCATCGATTTCCG	AACCAAAATTCGGATTGAACAC	OUI
	AT4G20130	PTAC14 (PAP7)	VII	SAIL_566_F06	<i>ptac14</i>	TGCAGAGAATGATCAATCGTG	AGAAGGTCCAGATGGTTTTGG	NON (mutation létale en condition autotrophique)
	AT5G06620	SDG38 (ATXR4)	VI	SAIL_1267_H02	<i>sdg38</i>	TTGTCATGTATGAGATCAGCCC	TTAAGACATTGACGACGCCTC	OUI
	AT5G14260	PPKMT1	VII	SALK_123180C	<i>ppkmt1</i>	TTTCCATACGAAATGCGTCTC	ATGGGTATTGCTGCAAAACAC	OUI
	AT5G17240	SDG40	VII	SALK_097673C	<i>sdg40</i>	GATATCAGCGCAAAAGACAGC	CACTTTCTTCGACTCAGGTGC	OUI

Extraction des ARN totaux et reverse transcription-PCR - L'extraction et la purification des ARN totaux sont réalisées selon le protocole fourni dans le RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Un µg d'ARN totaux est ensuite reverse transcrit en présence d'oligo(dT)₂₀ dans les conditions du kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). La qualité des ADNc obtenus est évaluée en réalisant une PCR sur le transcrit *ACTIN7* (At5g09810), avant de réaliser une PCR avec un couple d'amorces spécifiques du gène *SBS2* (Tableau 6). La réaction de PCR est réalisée en présence des quantités d'enzyme et de tampon recommandées par le fournisseur (Euromedex), comme décrit pour le génotypage. Le programme d'amplification est le suivant : 1 cycle de 5 min à 95°C, puis 40 cycles de 50 sec à 95 °C, 50 sec à 56°C, 30 sec à 72 °C, puis 1 cycle de 4 min à 72 °C. Les amplicons sont analysés en gels d'agarose 1,4% (m/v) et visualisés en présence de GelRed Nucleic Acid gel stain.

Tableau 6. Séquences des amorces utilisées pour l'étude du gène *SBS2* d'*A. thaliana*.

Primer	Séquence (5' → 3')
Actin7-1	ACATCGTTCTCAGTGGTGCTCC
Actin7-2	ACCTGACTGATCGTACTCACTC
SBS2-A	ATGATGACTACTACGACGACGAC
SBS2-D	CTCAATACGATCTCAACCAACTGA
pFP-SBS2-BamHI	<u>ggatcc</u> aaAAATGATGACTACTACGACGACG
pFP-SBS2-Sall	<u>gtcgac</u> TCCCTAGTCCAGAGATTCTG

2. Conditions de criblage

Les graines d'*A. thaliana* écotype Col0 et des 23 mutants de protéines lysine méthyltransférases ont été stérilisées (0,25% (v/v) NaClO, 0,02% (m/v) SDS and 75% (v/v) éthanol), rincées à l'eau distillée et semées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu ½ Murashige et Skoog (MS) avec 0,8% (m/v) agar. Après 2 jours de stratification à 4°C et à l'obscurité, les graines ont été mises à germer. Après 4 jours de culture, 20 plantules de chaque lignée ont été transférées dans un nouveau milieu ½ MS contenant 20 µM de nitrate de Cd (Cd(NO₃)₂). Les conditions dans la chambre de culture sont de 21 ± 2 °C, jours longs (18 heures de lumière/6 heures d'obscurité), 80 µEinstein d'intensité lumineuse et une humidité relative de 20 ± 5 %. Les plantules ont été suivies à 0, 3, 6, 8 et 10 jours de traitement en utilisant un scanner BioRad GS-800. L'élongation de la racine primaire de chaque individu a été mesurée en utilisant le logiciel ImageJ (Schneider et al 2012). Les longueurs racinaires primaires présentées correspondent à la longueur après 8 jours de traitement. Les vitesses d'élongation, en cm par jour, ont été déterminées entre le 3^{ème} et le 8^{ème} jour de traitement. Les index de tolérance ont été calculés en divisant un paramètre (longueur ou élongation) en

condition Cd par le paramètre en condition contrôle (CM, control medium). Pour chaque mutant, les TI ont été calculés et moyennés en sélectionnant de façon aléatoire une valeur dans chaque condition (Cd et CM) et en répétant l'opération 100 fois, avec remise entre chaque tirage.

3. Conception et sélection de lignées surexprimant le gène SBS2

La totalité du gène *SBS2* a été amplifiée par PCR (Tableau 5) et cloné dans le plasmide pFP101 (Figure 49). Ce vecteur contient un double promoteur constitutif viral 35S en amont de la séquence codante de *SBS2*, permettant ainsi une surexpression constitutive du transgène dans tous les territoires de la plante. Le vecteur pFP101 permet la sélection des graines transformées sur la base de la fluorescence de la GFP (Bensmihen *et al.* 2004).

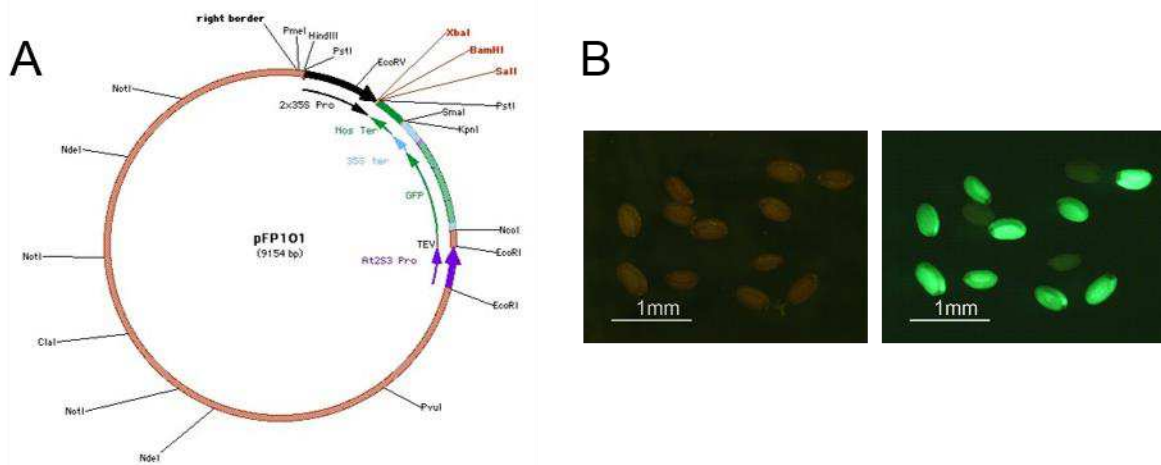


Figure 49. Représentation schématique du vecteur pFP101 (A) et observation de graines d'*Arabidopsis* issues d'une plante transformée par pFP101-SBS2 (B). Les graines sont observées en lumière blanche (image de gauche) et sous une lumière excitatrice à 395 nm (image de droite). Seules les graines ayant intégré le plasmide pFP101-SBS2 sont fluorescentes.

La transformation est basée sur le protocole de Zhang *et al.* (2006). Des plantes d'*A. thaliana* (écotype Col0 et mutant *sbs2*) sont cultivées jusqu'à apparition des premières siliques matures. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 pMP90, préalablement transformée avec la construction pFP101-SBS2 par électroporation, est mise en culture jusqu'à une DO_{600} d'environ 2. Les bactéries sont ensuite culotées puis resuspendues dans un milieu saccharose 5% (m/v) et Silwett L77 0,02% (v/v). Après avoir éliminé les siliques matures, les plantules contenant les bourgeons floraux sont entièrement immergées dans la suspension d'agrobactéries durant 5 sec puis remises en culture, en faible éclairage pendant 48 h, puis en conditions classiques, jusqu'à la récolte des graines.

Après plusieurs cycles de sélection des lignées indépendantes homozygotes pour le locus *35S::SBS2* ont été obtenues (4 lignées dans le fond génétique Col0, 5 lignées dans le fond *sbs2*). Les différents transformants n'ont, pour l'instant (juillet 2018), pas été analysés pour connaître le niveau d'expression du transgène et la tolérance des plantules au Cd.

E. Clonage, expression et purification de protéines recombinantes

1. Clonage et expression des protéines

Les protéines recombinantes ont été produites dans *Escherichia coli*. Le protocole général de transformation et d'expression bactérienne est présenté ci-dessous. Les primers, plasmides et étiquettes liés aux différentes constructions sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Amorces et vecteurs utilisés pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes.

Protéine	Identifiant	Amorces (5' puis 3')	Plasmide	Etiquette
TRXm1	AT1G03680.1	CATATGGACTGCTACAGGAATTCC CTCGAGTTACAAGAATTTGTTGATGCTGG	pET28-c(+)	6xHis (N-terminal)
SBS2.2	AT1G63855.2	CATATGACTACTACGACGACGAC GAATTCGTTTATATTACATTACAGTTCAGCTTG	pET28-c(+)	6xHis (C-terminal)
SBS2.4	AT1G63855.4	AGACCATGGCTACTACGACGACGAC GAATTCGAAAGCTGCTGATTTTCATTTGGGA	pET23-d(+)	6xHis (N-terminal)

Après amplification PCR avec les amorces correspondant aux différentes séquences, les produits PCR ont été purifiés sur colonne Nucleospin (Macherey-Nagel). Les produits PCR ont ensuite été digérés, en parallèle des plasmides, par le couple d'enzymes de restriction choisi pendant 3-5 heures à 37°C dans du tampon CutSmart (New England Biolabs). Les produits de digestion ont ensuite été purifiés en gel d'agarose 1% (m/v) avec le kit Nucleospin (Macherey- Nagel).

La réaction de ligation entre le plasmide et les inserts digérés a été effectuée à 16°C sur la nuit en présence de l'ADN ligase T4 et de son tampon réactionnel, en respectant un ratio molaire insert/plasmide de 3/1. Nous avons ensuite transformé des bactéries *E. coli* DH5alpha avec le produit de ligation et effectué une sélection des colonies transformées sur antibiotiques. Après une nuit de culture à 37°C une dizaine de colonies ont été testées par PCR afin de sélectionner une colonie possédant un plasmide recombinant. Cette colonie a ensuite été mise en culture en milieu LB liquide sur une nuit à 37°C. Le plasmide a été purifié sur colonne Nucleospin (Macherey- Nagel) et séquencé pour s'assurer qu'aucune erreur n'a été introduite lors de l'étape de PCR.

Nous avons alors procédé à la transformation de bactérie compétentes *E. coli* Rosetta avec le plasmide recombinant. Une ou plusieurs colonies transformées ont ensuite été cultivées dans

du LB liquide contenant les antibiotiques appropriés, à 37°C, jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0.6. L'induction de l'expression de la protéine a alors été déclenchée par ajout de 0,4 mM d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) et transfert des cultures à 20°C pour expression sur la nuit.

2. Purification des protéines

Après centrifugation des cultures bactériennes (4000 g, 20 min, 4°C), les culots ont été repris et soniqués dans un tampon de lyse composé de Tris-HCl 100 mM, pH 8, 10% (v/v) de glycérol et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science). Après centrifugation (20000 g, 20 min, 4°C), les surnageants correspondant aux extraits bactériens solubles ont été gardés. Les protéines recombinantes ont ensuite été purifiées par chromatographie sur colonne de nickel-Sepharose (GE Healthcare). Après ajout de 10 mM d'imidazole, les protéines ont été chargées sur la colonne et éluées avec des concentrations croissantes d'imidazole (10, 30, 50, 250 mM) dans un tampon Tris-HCl 25 mM, pH 7.4, 0,3 M NaCl, 10% (v/v) de glycérol. Les différentes fractions ont été analysées sur gel SDS-PAGE 12% afin d'estimer leur pureté. La fraction présentant la meilleure qualité (éluée à 50 ou 250 mM imidazole en fonction de la protéine considérée) a ensuite été dessalée sur une colonne de Sephadex G25 (PD-10, GE Healthcare) et finalement concentrée par centrifugation sur unité de filtration Amicon (Merck Millipore).

La purification de la protéine recombinante SBS2.2 a été réalisée dans des conditions dénaturantes à partir de corps d'inclusion. Tous les tampons décrits précédemment ont été supplémentés avec 6 M d'urée.

F. Production d'un sérum dirigé contre la protéine SBS2

Les anticorps polyclonaux anti-SBS2 ont été produits en utilisant la protéine recombinante SBS2.2. Après purification sur colonne de Ni-Sepharose et dessalage, 2 mg de protéine recombinante ont été séparés par SDS-PAGE. La portion de gel correspondant à la protéine SBS2.2 a été découpée puis la protéine a été électroéluée dans 50 mM de carbonate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Après lyophilisation l'antigène purifié a été envoyé à la compagnie Covalab (Villeurbanne, France) pour la réalisation du protocole d'immunisation d'un lapin.

G. Tests de méthylation de TRXm1 par PPKMT1

Les tests de méthylation ont été menés en incubant une source de substrat et une source d'enzyme avec le donneur de méthyle AdoMet tritié. Nous avons testé plusieurs sources d'enzymes : soit la protéine PPKMT1 recombinante purifiée (Mininno *et al.* 2012), soit des extraits de protéines solubles de chloroplastes (stroma) de plantules Col0 ou de mutants null *ppkmt1* (la protéine PPKMT1 étant localisée dans le stroma des chloroplastes) (Mininno *et al.* 2012 ; Alban *et al.* 2014). La source de substrat est la protéine recombinante TRXm1 produite et purifiée dans cette étude.

Le milieu réactionnel est composé d'un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, supplémenté avec 10 mM de dithiothréitol oxydé ou réduit, 20 μ M de [methyl-³H]AdoMet, 10 μ g de protéine TRXm1, et 36 μ g de protéines de stroma ou 5 à 10 μ g de protéine PPKMT1 recombinante. Après 3 heures d'incubation à 25°C, la réaction a été stoppée par ajout de 500 μ l d'acide trichloroacétique 10% (m/v) et de 10 μ l de sodium déoxycholate 1% (m/v) au milieu réactionnel. Après 15 min d'incubation à 4°C les protéines précipitées sont collectées par centrifugation, reprises dans 150 μ L de NaOH 0,1 M, et à nouveau précipitées par ajout d'acide trichloroacétique 10% (m/v). Après centrifugation et élimination du surnageant, les culots protéiques ont été (i) repris dans de l'acide formique, transférés dans des fioles de comptage contenant du liquide scintillant (ReadyProt) pour comptage de la radioactivité incorporée, ou (ii) repris dans du tampon de solubilisation des protéines, séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane de PVDF, puis placés en autoradiographie pendant 7 à 14 jours. L'autoradiographie a ensuite été révélée avec un scanner laser Typhoon (GE Healthcare Life Sciences).

H. Mesures des paramètres photosynthétiques et quantification des pigments foliaires

Mesures des paramètres photosynthétiques - La fluorescence de la chlorophylle des feuilles a été mesurée *in vivo* avec une caméra Speedzen MX (JBeamBio, Bio-Logic Science Instruments) en utilisant les paramètres décrits dans Allorent *et al.* (2013, 2015). Le paramètre Φ PSII a été mesuré en tant qu'indicateur de l'efficacité du photosystème II dans un état adapté à l'obscurité. L'état stationnaire du Φ PSII a été mesuré sur des plantes adaptées à l'obscurité pendant 15 minutes puis exposées à 300 μ mol de photons par m² par seconde pendant 4,5 minutes. Le transport d'électrons maximum (ETR) a été déduit des mesures de fluorescence selon la formule : $ETR = \Phi PSII \times 0,5 \times 0,84 \times I$, où I est l'incidence lumineuse en μ mol de photons par m² par s.

Quantification du contenu en pigments des feuilles - Les chlorophylles et les caroténoïdes ont été extraits en incubant les feuilles récoltées dans du N,N-diméthylformamide pendant 24 heures à -20°C. Les anthocyanes ont été extraits dans du méthanol contenant 1% (v/v) d'HCl concentré. Après broyage et centrifugation (14000 g, 15 min, température ambiante), les surnageants ont été analysés par spectrophotométrie (spectrophotomètre Safas Monaco UVmc2) aux absorbances 470, 644 et 661 nm pour les chlorophylles et les caroténoïdes et à 530 et 657 nm pour les anthocyanes. Les quantités de pigments ont ensuite été déterminées grâce aux formules suivantes issues de (i) Wellburn 1994 et (ii) Teng 2005 :

- (i) Chlorophyll a ($\mu\text{g/mL}$) = $11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}$
Chlorophyll b ($\mu\text{g/mL}$) = $20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}$
Caroténoïdes totaux ($\mu\text{g/mL}$) = $(1000 \times A_{470} - 1,90 \times \text{Chla} - 63,14 \times \text{Chlb})/214$
- (ii) 1 unité arbitraire d'anthocyanes = $A_{530} - 0,25 \times A_{657}$

I. Quantification de l'uranium, du phosphate, du phosphore et du fer

Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) - Les tissus racinaires, foliaires ou les plantules entières ont été déshydratés au four Pasteur à 90°C pendant 24 heures, pesés puis minéralisés 4 heures à 90 degrés dans de l'acide nitrique 65% (m/v). Les échantillons ont ensuite été dilués dans de l'acide nitrique 0,5% (v/v) et analysés avec un ICP-MS iCAP-RQ (Thermo Fischer Scientific). Les concentrations en phosphore (^{31}P) et en fer (^{56}Fe et ^{57}Fe) ont été déterminées à partir de courbes standard en utilisant le mode collision à l'hélium pour limiter les interférences polyatomiques. L' ^{238}U a été mesuré en mode standard. Les données ont été corrigées par l'intégration des standards internes ^{45}Sc , ^{103}Rh et ^{172}Y injectés en parallèle aux échantillons. L'intégration des données a été effectuée avec le logiciel Qtegra (Thermo Fischer Scientific).

Quantification du phosphate soluble par la technique du vert de malachite - Des plantules traitées pendant 3 jours ont été récoltées, congelées dans de l'azote liquide et réduites en poudre fine. L'extraction du phosphate soluble s'est effectuée en utilisant le protocole de Kanno *et al.* (2016) adapté aux plaques 96 puits. Les échantillons ont été mis en solution dans un tampon MES 170 mM, pH 5,8, contenant 100 mM de dithiothreitol et un inhibiteur de phosphatase (Roche Applied Science) à raison de 10 μL par mg d'échantillon. Après 10 min d'incubation à 4°C le surnageant a été mélangé à une solution acide de molybdène (1,755% (m/v) $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dans du H_2SO_4 3M). Après 10 min d'incubation, la solution de vert de malachite (0,35% (m/v) alcool polyvinylique et 0,035% (m/v) vert de malachite) a été ajoutée. Les échantillons ont ainsi été incubés pendant 2 heures avant lecture

de l'absorbance à 610 nm avec un Tecan Spark. Le contenu en phosphate soluble a été déterminé en utilisant une courbe de calibration effectuée avec du KH_2PO_4 .

J. Techniques de marquages cellulaires

Viabilité cellulaire - La viabilité cellulaire de l'apex racinaire primaire a été déterminée en utilisant une coloration double contenant de la fluorescéine diacétate (FDA) pour marquer les cellules vivantes et de l'iodure de propidium (PI) pour marquer les cellules mortes (K. Jones *et al.* 2016). La solution de coloration a été préparée fraîche pour chaque expérience en mélangeant une solution stock de FDA dans de l'acétone (Thermo Fisher Scientific) et une solution stock de PI (Sigma-Aldrich) dans du milieu NP ou LP afin d'obtenir des concentrations finales de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FDA et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI. Les plantules ont ainsi été colorées pendant 20 min à l'obscurité puis rincées avec du milieu NP ou LP. Le signal lié au FDA a été observé sous un filtre FITC (excitation 480 nm, émission 543 nm) et le signal lié au PI avec un filtre Texas Red (excitation 550 nm, émission 630 nm). Après acquisition des 2 signaux séparément, ces derniers ont été fusionnés en utilisant le logiciel de microscopie Zen (Zeiss).

Détection fluorescente des espèces réactives de l'oxygène - La distribution spatiale et temporelle des ROS a été réalisée en utilisant la sonde fluorescente 2,7-dichlorofluorescein diacetate (Thermo Fisher Scientific) à une concentration finale de 2 μM dans du milieu NP ou LP. Les plantules ont ainsi été colorées pendant 20 min à l'obscurité et rincées dans du milieu NP ou LP avant observation avec un filtre FITC. Le même temps d'exposition de 120 ms a été utilisé tout le long de l'étude.

Détection fluorescente de l'oxyde nitrique - L'accumulation d'oxyde nitrique dans les tissus racinaires a été suivie en utilisant le fluorophore 4,5-diaminofluorescein diacetate (Abcam) en solution dans du DMSO. La solution de coloration a été préparée en diluant cette solution à une concentration finale de 10 μM dans un tampon HEPES 20 mM, pH 7,2. Les plantules ont ainsi été colorées pendant 10 min à l'obscurité et rincées avec le tampon HEPES. L'observation a été effectuée en utilisant un filtre FITC. Le même temps d'exposition de 400 ms a été utilisé tout le long de l'étude.

Détection fluorescente de la callose - La détection de la callose a été conduite conformément à Schenk et Schikora (2016). Les plantules ont été rincées avec une solution de KH_2PO_4 150 mM et colorées pendant 25 min avec une solution contenant 0.01% (m/v) de bleu d'aniline dans du KH_2PO_4 150 mM. Après rinçage avec du KH_2PO_4 150 mM, les plantules ont été observées avec un filtre DAPI (excitation 365 nm, émission 460 nm). Le même temps d'exposition de 200 ms a été utilisé tout le long de l'étude.

Détection de la lignine - La détection de la lignine a été conduite conformément au protocole de Pradhan Mitra et Loqué (2014). La solution de coloration a été préparée fraîche en mélangeant dans un ratio 2:1 une solution de phloroglucinol (Prolabo) 3% (m/v) dans de l'éthanol 100% avec de l'acide chlorhydrique 37%. Les plantules ont directement été colorées sur lame de microscopie et observées sous Differential Interference Contrast (DIC) après 5 min de coloration.

Détection du fer - Le marquage du fer dans les tissus a été conduit en utilisant la méthode de Perls suivie d'une intensification au 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Hannetz Roschztardtzt *et al.* 2009). Les plantules ont d'abord été colorées 45 min avec la solution de Perls contenant 2% de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (m/v) dans du HCl 2% et rincées avec de l'eau distillée. Les plantules ont ensuite été transférées dans une solution de méthanol contenant 0,065% (m/v) de NaN_3 et 0,3% (v/v) de H_2O_2 et incubées 1 heure. Finalement, après un rinçage dans un tampon phosphate 100 mM, pH 7,4, les plantules ont été incubées 5 min dans la solution d'intensification contenant 0,00005% (m/v) CoCl_2 , 0,00002% (v/v) H_2O_2 et 0.025% (m/v) DAB dans du tampon phosphate 100 mM, pH 7,4. L'observation s'est faite sous Differential Interference Contrast (DIC).

Détection du signal lié à l'activité de la β -glucuronidase (coloration de GUS) - La coloration de GUS a été effectuée après fixation des plantules de l'acétone 90% (v/v) froid pendant 20 min. Les plantules ont ensuite été incubées 24 heures dans la solution de coloration GUS contenant 0,2% (v/v) de Triton X100, 2 mM de ferricyanure de potassium, 2 mM de ferrocyanure et 2 mM d'acide β -D-glucopyranosiduronique 5-bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl dans un tampon sodium phosphate 50 mM, pH 7,2.

K. Microscopie

Après les différentes colorations, les plantules ont été montées entre lame et lamelle de microscopie dans une solution de glycérol 10 % (v/v). Les observations en microscopie optique ont été effectuées avec un microscope Leica Axioscope A1 et le filtre adapté aux différentes colorations. La microscopie à illumination structurée a été utilisée pour l'observation des plantules d'*A. thaliana* *PIN1::PIN1-GFP*, *PIN2::PIN2-GFP* et *DR5::GFP* afin d'obtenir des coupes optiques numériques. Ces observations ont été conduites avec un Axioimager Z3 Apotome (Zeiss). Les signaux ont été observés avec un filtre GFP et le même temps d'observation de 120 ms a été conservé pour l'observation du signal *DR5::GFP*.

L. Analyses statistiques et graphiques

Les analyses statistiques et les graphiques ont été conduits avec le logiciel R (R Core Team 2017). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le package nparcomp (Konietschke *et al.* 2015). La p-value a été fixée à 0,05% pour les différents tests statistiques.

Chapitre III

Étude du rôle des modifications post-traductionnelles dans la réponse aux stress métalliques chez *Arabidopsis*

A. Rôle de la méthylation des protéines dans la réponse aux éléments traces métalliques

1. Étude des profils de méthylation des protéines

Afin d'identifier de nouveaux acteurs de la réponse et de l'adaptation des plantes aux ETM nous nous sommes intéressés aux phénomènes de méthylation des protéines. Nous avons tout d'abord conduit une étude préliminaire consistant à observer les profils protéiques liés à la méthylation par des Western blots. Cette technique nous permet, s'il y a lieu, de mettre en évidence des différences majeures de profils de méthylation entre des plantes traitées avec différents ETM et des plantes non traitées. L'observation de protéines différenciellement méthylées suite aux différents traitements est une étape préliminaire à leur identification par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Pour ceci, nous avons cultivé des plantes d'*A. thaliana* (écotype Col0), d'*A. halleri* (population Auby) et *A. lyrata* (sous espèce *petraea*) en hydroponie dans un milieu contrôle (CM) pendant 5 semaines. Les plantes ont ensuite été transférées dans des milieux de culture hydroponique contenant 5 µM de sulfate de Cd ou 150 µM de sulfate de Zn ainsi que dans un milieu contenant peu de phosphate (LP, 25 µM au lieu de 250 µM Pi) supplémenté ou non avec 50 µM de nitrate d'uranyle. Après 9 à 10 jours de traitement, les racines et les feuilles des plantes ont été récoltées pour extraction des protéines solubles et insolubles.

Nous avons ensuite extrait les fractions protéiques solubles de feuilles et de racines des 3 espèces correspondant à ces différentes conditions de traitement. Ces extraits ont été obtenus par extraction dans un tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8, contenant 10% (v/v) de glycérol et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Cette méthode n'extrait pas ou peu les protéines histones qui nécessitent l'ajout d'acide sulfurique 0,2 M dans le tampon pour être solubilisées (Shechter *et al.* 2007). Cette méthode nous permet donc d'écarter les PTM portées par des histones, qui sont impliquées dans les phénomènes de régulation épigénétique et dans l'expression des gènes. Cette thématique ne fait pas partie du projet abordé dans cette étude. Afin d'étudier les profils de méthylation dans les différents extraits protéiques nous avons utilisé des anticorps spécifiquement dirigés contre les résidus arginine monométhylés (Cell Signalling Technology, référence 8015), les résidus arginine diméthylés de façon asymétrique (Cell Signalling Technology, référence 13522) et les résidus lysine triméthylés (abcam, référence ab76118).

Lorsque nous avons analysé les profils de méthylation des arginines avec les 2 anticorps anti-arginines mono- ou diméthylées, nous avons mis en évidence des profils très pauvres (données non présentées). Par ailleurs les quelques bandes marquées ne présentaient pas de différence notable entre les échantillons issus de plantes stressées ou non par les ETM.

Nous avons donc jugé que cette approche n'était pas compatible avec nos objectifs d'identifier de nouveaux acteurs dans la réponse, l'adaptation et la détoxification des ETM.

Par la suite, nous avons analysé l'effet d'un stress induit par le Cd sur les profils de méthylation des résidus lysine dans le genre *Arabidopsis*. En utilisant les anticorps dirigés contre les lysines triméthylées, nous avons mis en évidence que les profils étaient complexes avec un grand nombre de protéines détectées dans les extraits racinaires et foliaires (Figure 50). Plusieurs différences de signal sont détectables entre les espèces ou entre les 2 conditions (CM *versus* Cd). L'exemple le plus flagrant, et qui met en avant un effet du Cd sur les profils de méthylation des lysines, est un doublet de protéines vers 25 kDa. Ce dernier est détecté dans les extraits protéiques foliaires solubles d'*A. lyrata* traitée avec du Cd ainsi que ceux d'*A. halleri* traitée ou non, mais n'est pas détecté chez *A. thaliana* (Figure 50A). Un doublet à la même masse moléculaire apparente est présent dans les extraits racinaires solubles où il est détecté de façon constitutive, quel que soit l'espèce ou le traitement appliqué (Figure 50B).

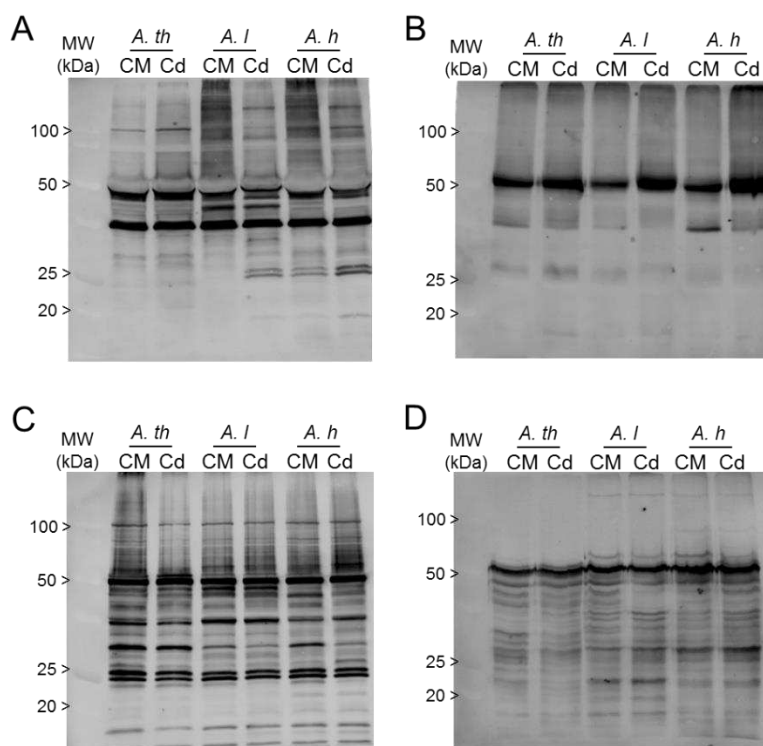


Figure 50. Etude par Western blot des protéines triméthylées sur des résidus lysines chez *Arabidopsis* lors d'un stress induit par le Cd. Les fractions protéiques solubles (A et C) et insolubles (B et D) ont été extraites à partir des feuilles (A et B) et des racines (C et D) de plantes de 5 semaines d'*A. thaliana* écotype Col0 (*A. th*), d'*A. lyrata* sous espèce *petraea* (*A. l*) et d'*A. halleri* population Auby (*A. h*) cultivées en hydroponie et traitées 10 jours en condition contrôle (CM) ou avec 5 μ M de sulfate de Cd. Ces fractions ont ensuite migré sur gel SDS-PAGE 12% et ont été transférées sur membrane de nitrocellulose avant analyse par Western blot avec un anticorps anti-lysine triméthylée (abcam, référence ab76118, 1 :1000). MW : Masses moléculaires en kilo Dalton (kDa). Trente μ g de protéines par puits.

Des analyses similaires ont été conduites avec 2 autres populations d'*A. halleri*, I16 et PL22. Les patterns de méthylation de ces 2 populations sont similaires à ceux observés pour la population Auby (Figure 51). On retrouve notamment le doublet de protéines portant un ou plusieurs résidus lysine triméthylés vers 25 kDa. Cette méthylation constitutive de ces 2 protéines dans les feuilles et racines de différentes populations d'*A. halleri* pourrait suggérer un rôle dans la tolérance au Cd et au Zn de cette espèce.

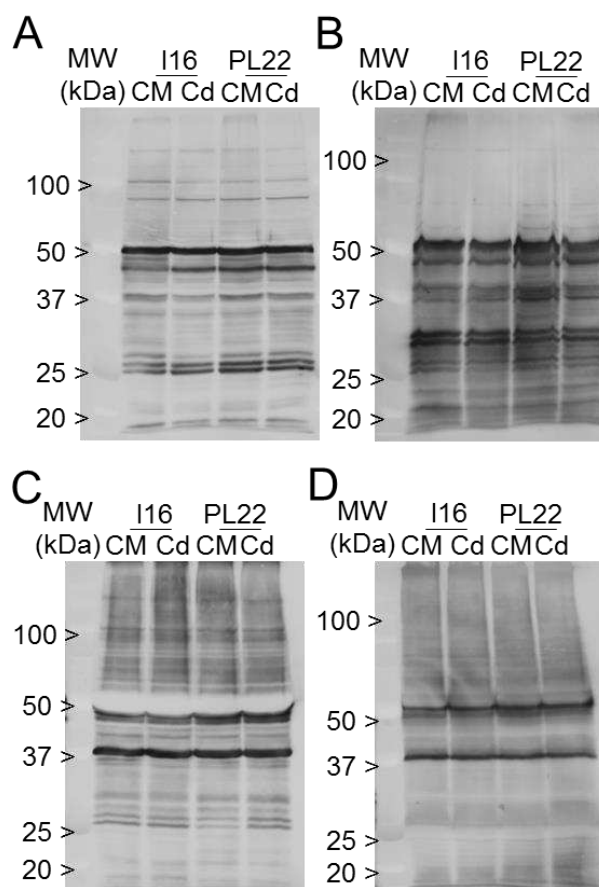


Figure 51. Etude par Western blot des protéines triméthylées sur des résidus lysines chez deux populations d'*A. halleri* lors d'un stress induit par le Cd. Les fractions protéiques solubles (A et C) et insolubles (B et D) ont été extraites à partir des feuilles (A et B) et des racines (C et D) de plantes de 5 semaines d'*A. halleri* populations PL22 et I16 cultivées en hydroponie et traitées 10 jours en condition contrôle (CM) ou avec 5 μ M de sulfate de Cd. Ces fractions ont ensuite migré sur gel SDS-PAGE 12% et ont été transférées sur membrane de nitrocellulose avant analyse par Western blot avec un anticorps anti-lysine triméthylée (abcam, référence ab76118, 1 :1000). MW : Masse moléculaires en kilo Dalton (kDa). Trente μ g de protéines par puits.

Avant d'explorer cette hypothèse et identifier les protéines dans ce doublet par spectrométrie de masse, nous avons souhaité savoir si ce doublet était détecté dans des échantillons protéiques extraits de plantes traitées avec de l'U. Le doublet de protéines méthylées est également retrouvé de façon constitutive dans les échantillons protéiques solubles de racines (Figure 52B). En ce qui concerne les extraits protéiques solubles foliaires, le signal lié au doublet est faible mais semble être différentiellement détecté en fonction du

stress et de l'espèce (Figure 52A). En effet, de façon intéressante, le signal lié au doublet est détecté en condition LP chez *A. lyrata* et ne l'est plus en condition U alors qu'il suit un profil inverse chez *A. halleri*.

Ce doublet est donc détecté de façon différente selon le stress métallique et en fonction de l'espèce considérée. Ces observations font de ce doublet un candidat pour la découverte de nouveaux acteurs de la réponse aux stress induit par des ETM. Néanmoins, l'interprétation des résultats obtenus par la technique du Western atteint ici ses limites.

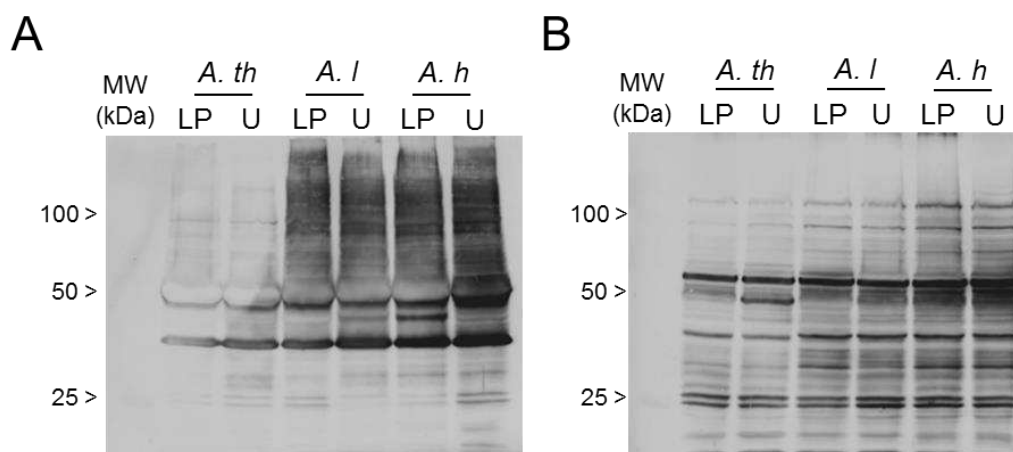


Figure 52. Etude par Western blot des protéines méthylées sur des résidus lysine chez *Arabidopsis* lors d'un stress induit par l'uranium. Les fractions protéiques solubles ont été extraites à partir des feuilles (A) et des racines (B) de plantes de 5 semaines d'*A. thaliana* écotype Col0 (*A. th*), d'*A. lyrata* sous espèce *petraea* (*A. l*) et d'*A. halleri* population Auby (*A. h*) cultivées en hydroponie et traitées 10 jours en milieu Low Phosphate (LP, 25 μ M Pi) ou avec 5 μ M de nitrate d'U. Ces fractions ont ensuite migré sur gel SDS-PAGE 12% et ont été transférées sur membrane de nitrocellulose avant analyse par Western blot avec un anticorps anti-lysine triméthylée (abcam, référence ab76118, 1 :1000). MW : Masses moléculaires en kilo Dalton (kDa). Trente μ g de protéines par puits.

2. Identification de protéines lysine méthylées pas MS/MS

Afin d'identifier les protéines qui forment ce doublet de bandes triméthylées, nous avons utilisé la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) avec les échantillons protéiques racinaires et foliaires solubles des 3 espèces traitées avec du Cd ou en condition contrôle. Les échantillons protéiques solubles racinaires et foliaires ont migrés en gel SDS-PAGE, été colorés au bleu de Coomassie et la portion de gel entre 25 et 30 kDa a été excisée (Figure 53). Après déshydratation, les échantillons ont été transmis à la plateforme d'analyses protéomiques du laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes (Montpellier). Après digestion des protéines à la trypsine, les peptides obtenus ont été séparés par nano chromatographie en phase liquide et analysés avec un spectromètre de masse Q Exactive Plus Orbitrap.

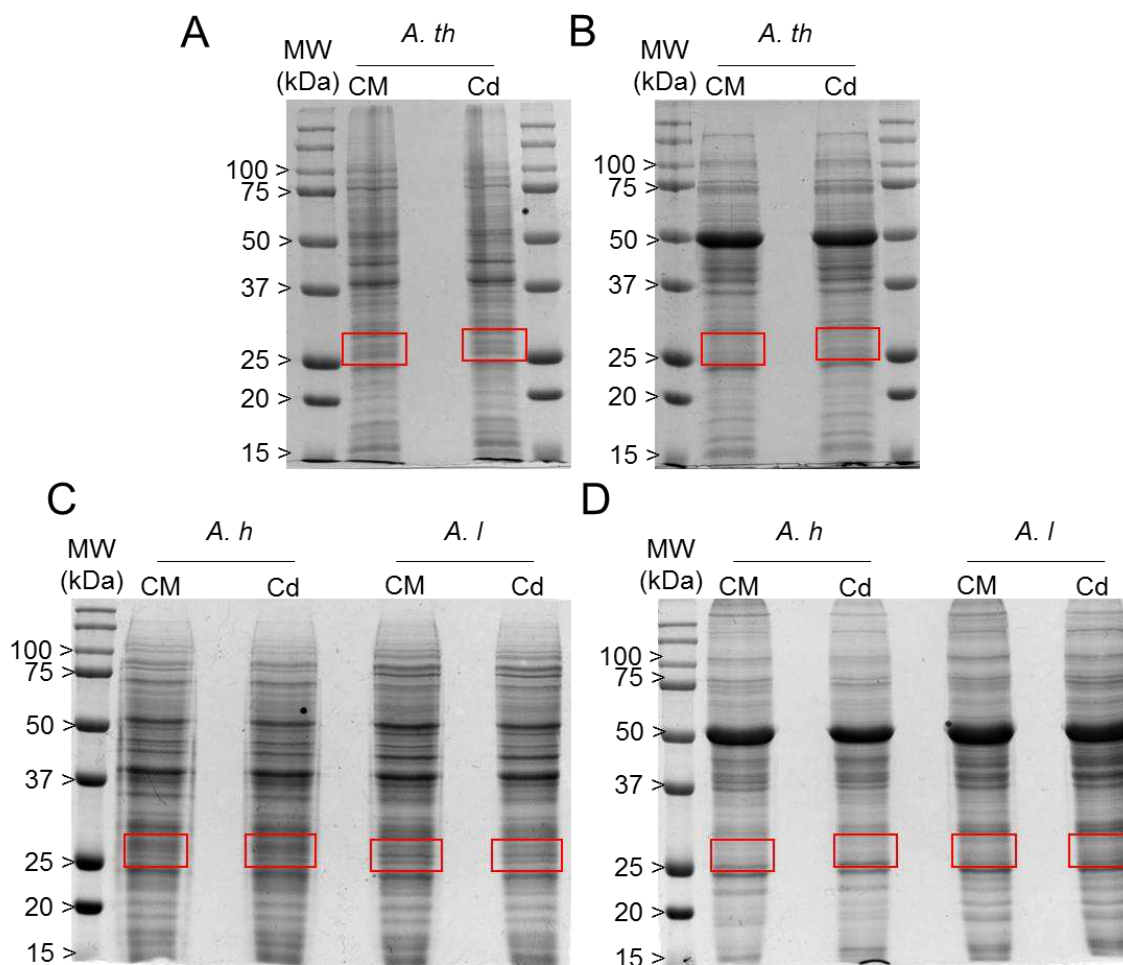


Figure 53. Gels d'électrophorèse utilisés pour l'identification de protéines triméthylées par spectrométrie de masse. Les fractions protéiques solubles ont été extraites à partir des racines (A et C) et des feuilles (B et D) de plantes de 5 semaines d'*A. thaliana* écotype Col0 (*A. th*, A et B), d'*A. lyrata* sous espèce *petraea* (*A. l*, C et D) et d'*A. halleri* population Auby (*A. h*, C et D) cultivées en hydroponie et traitées 10 jours en condition contrôle (CM) ou avec 5 μ M de sulfate de Cd. Ces fractions ont ensuite migré en gel SDS-PAGE 12%. Après coloration des protéines au bleu de Coomassie, les portions de gel entre 25 et 30 kDa ont été excisées pour analyse MS/MS (cadres rouges). MW : Masses moléculaires en kilo Dalton (kDa). Trente μ g de protéines par puits.

L'identification de lysines méthylées par MS/MS est limitée par plusieurs facteurs (Serre *et al.*, 2018). En particulier, la masse associée à une mono-, di- ou triméthylation portée par une lysine est isobarique de la différence de masse entre plusieurs acides aminés (Ong *et al.* 2004). Afin de limiter l'identification artéfactuelle de résidus lysine triméthylés les résultats obtenus par MS/MS pour les espèces *A. halleri* et *A. lyrata* ont été confrontés à une base de données construite à partir du génome d'*A. lyrata* (Alyrata_384_v2.1 from the Joint Genome Institute) et non pas à la base de données TAIR d'*A. thaliana*.

Nous avons identifié un nombre comparable de peptides entre les 3 espèces dans les différents échantillons protéiques de racines et de feuilles. Les résultats obtenus ont été filtrés par une méthode adaptée d'Alban *et al.* (2014) afin d'identifier avec un grand niveau de confiance des peptides portant une/des lysines triméthylées. Brièvement, le seuil de score

Mascot a été fixé à 30 et les limites de tolérance sur la masse ont été fixées à 10 ppm. Pour certains résidus lysine des ambiguïtés subsistaient entre la présence d'une triméthylation (42,047 Da) ou d'une acétylation (42,011 Da). Afin de résoudre ces ambiguïtés les limites de tolérance sur la masse ont été abaissées à 2 ppm. Cette méthode nous a permis d'identifier avec certitude 12 peptides portant des lysines triméthylées appartenant à 5 protéines différentes (Tableau 8).

Identification de lysines triméthylées dans les échantillons racinaires

Dans les échantillons racinaires, où les 2 bandes du doublet sont fortement détectées par l'anticorps anti triméthyl-lysine, et ce de façon constitutive (Figure 50C), nous avons identifié des peptides triméthylés associés au Facteur d'élongation eucaryote 1A (EEF1A), à la protéine ribosomale L10 (RPL10A) et à une isoforme de la malate déshydrogénase (MDH2).

Le peptide associé à la protéine MDH2 chez *A. lyrata* nous a permis de mettre en évidence pour la première fois que la lysine 249 était triméthylée, et ce seulement après traitement au Cd. Ensuite, nous avons identifié 3 lysines triméthylées sur les peptides appartenant à EEF1A. Deux d'entre elles (lysine 79 et 187) ont été détectées chez les 3 espèces et étaient déjà rapportées chez plusieurs espèces végétales (Lopez-Valenzuela *et al.* 2003 ; Ndamukong *et al.* 2011 ; Alban *et al.* 2014). Le troisième site de triméthylation (lysine 227) n'a été détecté que chez *A. thaliana* et n'était pas connu avant cette étude. Finalement, nous avons trouvé 2 lysines triméthylées sur la protéine RPL10A. La lysine 90 avait déjà été identifiée dans une étude des ribosomes cytosoliques d'*A. thaliana* (Carroll *et al.* 2008) tandis que la lysine 46 était un site de méthylation encore inconnu.

L'identification de sites de méthylation précédemment identifiés sur les protéines EEF1A et RPL10A nous a permis de valider l'approche et plus particulièrement la première utilisation du génome d'*A. lyrata* dans une étude de MS/MS.

L'identification de lysines triméthylées portées par EEF1A et RPL10A dans les 6 échantillons racinaires (Tableau 8) nous permet de suggérer que les signaux observés par Western blot (Figure 50C) pourraient correspondre à ces 2 protéines.

Identification de lysines triméthylées dans les échantillons foliaires

Dans les feuilles, où la détection du doublet de protéines lysine triméthylées est espèce et condition dépendante (Figure 50A), nous avons également détecté les 3 protéines mentionnées ci-dessus (EEF1A, RPL10A et MDH2) ainsi que 2 autres protéines, la EP1-like glycoprotein et une isoforme de la fructose 1,6 biphosphate aldolase chloroplastique (Tableau 8). La triméthylation de la lysine 395 de l'aldolase chloroplastique a été précédemment rapportée (Mininno *et al.*, 2012 ; Alban *et al.*, 2014 ; Ma *et al.*, 2016) tandis que la EP1-like glycoprotein 1 n'était pas connue comme étant une protéine portant des méthylation.

Aucun des peptides lysine triméthylée n'a montré un profil de détection correspondant aux profils observés par Western blot, c'est-à-dire une détection constitutive chez *A. halleri*, en condition Cd chez *A. lyrata* et une absence de signal dans les échantillons d'*A. lyrata* en condition contrôle et constitutive chez *A. thaliana* (Figure 50A). Dans l'approche MS/MS que nous avons utilisé l'absence de détection d'un peptide méthylé dans un échantillon donné n'est pas une preuve de son absence. Il nous est donc impossible de conclure sur la nature des protéines lysine triméthylées qui présentent un profil d'expression modulé par le stress Cd dans les feuilles de certaines espèces d'*Arabidopsis*. Une approche de protéomique quantitative devra être mise en œuvre pour savoir si certaines des protéines méthylées identifiées ici sont des marqueurs du stress métallique.

Tableau 8. Identification de peptides triméthylés sur des lysines par MS/MS dans le genre *Arabidopsis* en réponse à un stress induit par le Cd. Des échantillons protéiques solubles et foliaires d'*A. thaliana* (*A. th*), *A. lyrata* (*A. l*) et *A. halleri* (*A. h*) traitées en condition contrôle (CM) ou avec 5 µM de sulfate de Cd ont été résolus en gel SDS-PAGE 12%. Après excision de la portion de gel entre 25 et 30 kDa (Figure 50), les protéines ont été digérées à la trypsine. Les peptides ainsi obtenus ont ensuite été résolus par nano chromatographie en phase liquide et analysés en MS/MS. Les données correspondent aux scores Mascot obtenus après traitement des données.

AT	Nom	Séquence du peptide	Racine						Feuille					
			<i>A. th</i>		<i>A. l</i>		<i>A. h</i>		<i>A. th</i>		<i>A. l</i>		<i>A. h</i>	
			CM	Cd	CM	Cd	CM	Cd	CM	Cd	CM	Cd	CM	Cd
AT1G07920/AL1G18230	eEF1A	ERGITIDIALW K ₇₉ FETTK	30	38	-	-	-	-	28	26	-	-	-	-
		GITIDIALW K ₇₉ FETTK	63	75	74	81	66	85	27	22	54	49	-	-
		VGYNPD K ₁₈₇ IPFVPISGFEGDNMIER	34	59	47	40	39	49	-	-	31	34	-	19
		KVGYNPD K ₁₈₇ IPFVPISGFEGDNMIER	33	35	32	48	37	17	-	-	-	-	-	-
		GPTLLEALDQINEP K ₂₂₇	27	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		STNLDWYKGPTLLEALDQINEP K ₂₂₇	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-	-
AT1G08360/AL1G18770	RPL10AA	NYDPQKD K ₄₆ R	31	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		MGLENMDVESL K ₉₀ K	62	36	-	-	29	72	-	-	-	-	-	
AT2G27530/AL4G22860		MGLSNMDVEAL K ₉₀ K	-	-	46	36	62	48	-	-	-	40	-	24
AT1G53240/AL1G61640	Malate dehydrogenase	AG K ₂₄₉ GSATLSMAYAGALFADACK	-	-	-	50	-	-	-	22	-	-	-	
AT1G78820	EP1-like glycoprotein 1	TTQFCSSG K ₃₇₈	-	-	-	-	-	-	-	44	-	-	-	
AT2G21330	Fructose-bisphosphate aldolase 1	YTGESESEEAKEGMFV K ₃₉₅	-	-	-	-	-	-	44	18	-	-	-	

3. Étude de l'expression des gènes liés à la méthylation et à la déméthylation des résidus lysines

Les méthodes employées pour étudier les profils de méthylation des lysines sur les protéines n'ont pas permis d'identifier clairement de nouveaux acteurs dans la réponse et l'adaptation des plantes aux ETM. Néanmoins, les analyses par Western blot ont mis avant qu'il existe des différences dans les profils de méthylation entre les différents traitements métalliques et les différentes espèces du genre *Arabidopsis*. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression des gènes régulant les phénomènes de méthylation/déméthylation dans différentes conditions de stress métallique.

a) Construction de la banque de gènes

Les PKMT sont classées en 2 familles représentées par les protéines méthyltransférases à domaine SET et les méthyltransférases à domaine SBS. Les 48 méthyltransférases à domaine SET recensées à ce jour ont été extraites des publications Ng *et al.* (2007) et Alban *et al.* (2014). Les 11 méthyltransférases à domaine SBS ont quant à elles été identifiées par homologie de séquence protéique avec des enzymes caractérisées (couple enzyme/substrat connu) chez *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli* (Figure 54 ; Tableau 10). Il est important de noter que, même si les couples enzymes/substrats sont connus, le rôle de la méthylation est inconnu dans la majorité des cas. Les listes PKMT à domaine SET et SBS constituent une liste de 59 PKMT qui sera utilisée tout au long de cette étude.

La liste des 25 lysine déméthylases (KDM) probables est issue de la publication de Chen *et al.* (2011). Ces enzymes sont présentées dans le Tableau 11.

Tableau 9. Liste des gènes codant pour les protéines lysine méthyltransférases à domaine SET utilisées dans l'étude. La liste des gènes codant pour les protéines méthyltransférases à domaine SET a été extraite des travaux de Ng *et al.* (2007) et de Alban *et al.* (2014). Les poids moléculaires ont été récupérés à partir de la base de données Uniprot (uniprot.org). Les localisations subcellulaires prédites et expérimentales ont été extraites de la base de données SUBA4 (suba.live).

AT	Nom	Classe	Masse moléculaire (kDa)	Localisation subcellulaire	
				Prédite	Expérimentale
AT1G43245	SDG41	-	62	Noyau	NA
AT1G02580	MEA (SDG5)	I	79	Noyau	Cytoplasme, Noyau
AT2G23380	CLF (SDG1)	I	100	Noyau	NA
AT4G02020	SWN (SDG10)	I	95	Noyau	NA
AT1G76710	ASHH1 (SDG26)	II	55	Noyau	NA
AT1G77300	ASHH2 (SDG8)	II	199	Noyau	NA
AT2G44150	ASHH3 (SDG7)	II	41	Noyau	NA
AT3G59960	ASHH4 (SDG24)	II	40	Noyau	NA
AT4G30860	ASHR3 (SDG4)	II	56	Noyau	Noyau
AT1G05830	ATX2 (SDG30)	III	123	Noyau	NA
AT2G31650	ATX1 (SDG27)	III	120	Noyau	NA
AT3G61740	ATX3 (SDG14)	III	116	Noyau	NA
AT4G15180	ATXR3 (SDG2)	III	267	Noyau	NA
AT4G27910	ATX4 (SDG16)	III	117	Noyau	NA
AT5G42400	ATXR7 (SDG25)	III	159	Noyau	NA
AT5G53430	ATX5 (SDG29)	III	119	Noyau	NA
AT5G09790	ATXR5 (SDG15)	IV	40	Noyau	Noyau, Plaste
AT5G24330	ATXR6 (SDG34)	IV	40	Noyau	Noyau
AT1G04050	SUVR1 (SDG13)	V	83	Noyau	Noyau
AT1G17770	SUVH7 (SDG17)	V	78	Noyau	NA
AT1G73100	SUVH3 (SDG19)	V	73	Noyau	NA
AT2G05900	SUVH10 (SDG11)	V	35	Noyau	NA
AT2G22740	SUVH6 (SDG23)	V	87	Noyau	NA
AT2G23740	SUVR5 (SDG6)	V	155	Noyau	NA
AT2G24740	SUVH8 (SDG21)	V	85	Noyau	NA
AT2G33290	SUVH2 (SDG3)	V	73	Noyau	Noyau
AT2G35160	SUVH5 (SDG9)	V	88	Noyau	NA
AT3G03750	SUVR3 (SDG20)	V	37	Noyau	NA
AT3G04380	SUVR4 (SDG31)	V	56	Noyau	Noyau
AT4G13460	SUVH9 (SDG22)	V	72	Noyau	NA
AT5G04940	SUVH1 (SDG32)	V	74	Noyau	Noyau
AT5G13960	SUVH4 (SDG33)	V	70	Noyau	NA
AT5G43990	SUVR2 (SDG18)	V	79	Noyau	Noyau
AT1G26760	ATXR1 (SDG35)	VI	61	Noyau	NA
AT2G17900	ASHR1 (SDG37)	VI	55	Noyau	NA
AT2G19640	ASHR2 (SDG39)	VI	38	Noyau	NA
AT3G21820	ATXR2 (SDG36)	VI	53	Noyau	NA
AT5G06620	ATXR4 (SDG38)	VI	36	Mitochondrie	NA
AT1G01920	SDG42	VII	65	Cytoplasme	NA
AT1G14030	LSMT	VII	55	Plaste	Plaste
AT1G24610	PPKMT2	VII	53	Plaste	NA
AT2G18850	SDG50	VII	62	Noyau	NA
AT3G07670	PPKMT3	VII	58	Plaste	NA
AT3G55080	SDG51	VII	53	Noyau	Membrane plasmique
AT3G56570	SDG52	VII	59	Noyau	NA
AT4G20130	PTAC14	VII	56	Plaste	Noyau, Plaste
AT5G14260	PPKMT1	VII	58	Plaste	Plaste
AT5G17240	SDG40	VII	56	Noyau	NA

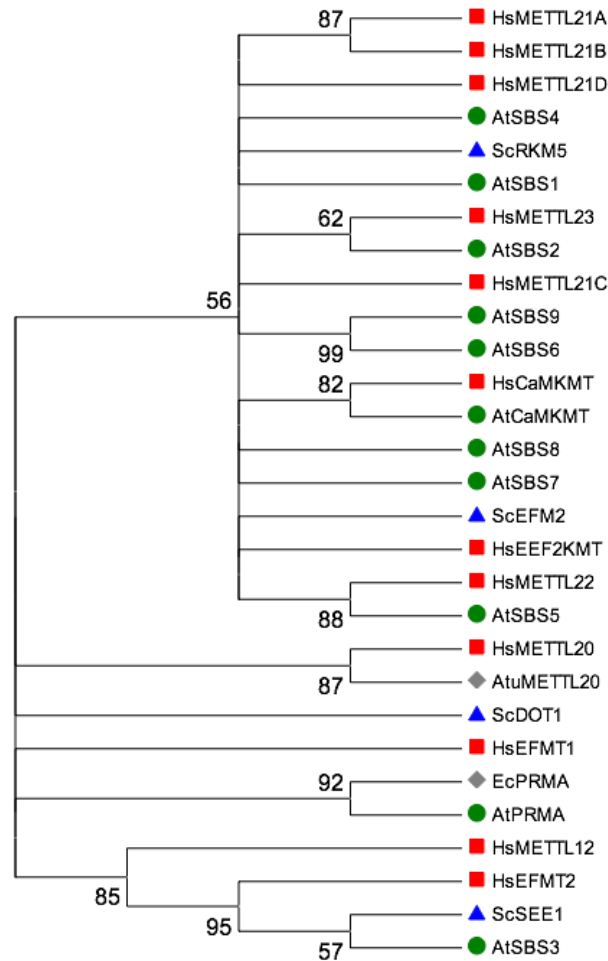


Figure 54. Analyse phylogénétique des protéines lysine méthyltransférases de la famille des seven-beta-strand (SBS) chez *A. thaliana*. L'analyse a été effectuée en 2016 avec 29 séquences protéiques venant de l'*Homo sapiens* (Hs), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Escherichia coli* (Ec), *Agrobacterium tumefaciens* (Atu) et *A. thaliana* (At). Les séquences ont été alignées avec ClustalW et l'arbre phylogénétique créé en utilisant la méthode de Maximum Likelihood basée sur le modèle de Le et Gascuel (Le and Gascuel, 2008). Une distribution discrète de Gamma a été utilisée pour modéliser les taux de différence évolutive entre les sites (5 catégories (+G, paramètre = 2,7507). Le modèle du taux de variation permet à certains sites d'être invariables d'un point de vue évolutif ([+], 1,0515% des sites). L'arbre et les bootstraps présentés sont représentatifs de 1000 modélisations (Les branches présentant dans moins de 50 % des modélisations ont été retirées). L'analyse a été conduite avec le logiciel Mega version 6.06 (Tamura *et al.* 2013). Identifiants Uniprot des séquences utilisées : AtuMETTL20, A9CHJ5; EcPRMA, P0A8T1 ; HsCaMKMT, Q7Z624; HsEEF2KMT, Q96G04; HsEFMT1, Q8WVE0; HsEFMT2, Q5JPI9; HsMETTL12, A8MUP2; HsMETTL20, Q8IXQ9; HsMETTL21A, Q8WXB1; HsMETTL21B, Q96AZ1; HsMETTL21C, Q5VZV1; HsMETTL21D, Q9H867; HsMETTL22, Q9BUU2; HsMETTL23, Q86XA0; ScDOT1, Q04089; ScEFM2, P38347; ScRKM5, Q12367; ScSEE1, P40516. Les PKMTs de type SBS sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Liste des gènes codant pour les protéines lysine méthyltransférases à domaine seven beta stands utilisées dans l'étude. Les gènes codant pour les protéines méthyltransférases à domaine seven beta strands (SBS) ont été prédites par homologie de séquence protéique avec des enzymes dont le couple enzyme/substrat est connu chez l'Homme, la levure et la bactérie *Escherichia coli*. Après construction d'un arbre phylogénétique, 11 PKMT de type SBS ont présenté des clusters forts et sont décrites ci-dessous. Les poids moléculaires ont été extrait de la base de données Uniprot (uniprot.org). Les localisations subcellulaires prédites et expérimentales ont été extraites de la base de données SUBA4 (suba.live).

AT	Nom	Masse moléculaire (kDa)	Localisation subcellulaire		Orthologue (espèce)	Substrat de l'orthologue (position)	Publication
			Prédite	Expérimentale			
AT1G08125	SBS1	35	Cytoplasme	NA	METTL21D (Homme)	Valosin containing protein, VCP (K315)	(Kernstock <i>et al.</i> 2012; Cloutier <i>et al.</i> 2013)
AT1G63855	SBS2	18	Extracellulaire, membrane plasmique	NA	METTL21D (Homme)	Valosin containing protein, VCP (K315)	(Kernstock <i>et al.</i> 2012; Cloutier <i>et al.</i> 2013)
AT1G66680	SBS3	39	Cytoplasme	NA	EFM4/SEE1 (levure)	Eukaryotic Elongation Factor 1A, EEF1A (K316)	(Lipson, Webb, and Clarke 2010)
AT1G73320	SBS4	34	Cytoplasme	NA	METTL21D (Homme)	Valosin containing protein, VCP (K315)	(Kernstock <i>et al.</i> 2012; Cloutier <i>et al.</i> 2013)
AT1G79915	SBS5	35	Membrane plasmique	NA	METTL22 (Homme)	KIN (K135)	(Cloutier <i>et al.</i> 2013)
AT3G50850	SBS6	28	Cytoplasme	NA	METLL21A (Homme)	Heat Shock Protein 70 et isoformes	(Cloutier <i>et al.</i> 2013)
AT4G35987	CaMKMT1	34	Plaste	NA	Calmodulin lysine methyltransferases, CAMKT (Homme)	Calmodulin, CaM (K115)	(Roberta Magnani <i>et al.</i> 2010)
AT5G27400	SBS7	41	Cytoplasme	Cytoplasme	Eukaryotic Elongation Factor 2 Lysine Methyltransferase, EEF2KMT (Homme)	Eukaryotic Elongation Factor 2, EEF2 (K525)	(Davydova <i>et al.</i> 2014)
AT5G44170	SBS8	26	Cytoplasme	NA	METTL21D (Homme)	Valosin containing protein, VCP (K315)	(Kernstock <i>et al.</i> 2012; Cloutier <i>et al.</i> 2013)
AT5G49560	SBS9	30	Cytoplasme	NA	METLL21A (Homme)	Heat Shock Protein 70 et isoformes	(Cloutier <i>et al.</i> 2013)
AT5G53920	PrmA	40	Cytoplasme, Mitochondrie	Chloroplaste, mitochondrie	Protein ribosomal L11 Methyltransferase PrmA (<i>Escherichia coli</i>)	Protein ribosomal L11, <i>E. coli</i> RPL11 (K3 et K39) Arabidopsis RPL11 plaste K109, RPL11 mitochondrie K48	(Demirci <i>et al.</i> 2008) (Mazzoleni <i>et al.</i> 2015)

Tableau 11. Liste des gènes codant pour les protéines déméthylases utilisées dans l'étude. La liste des gènes codant pour les protéines déméthylases a été extraite des travaux de Chen *et al.* 2007. Les poids moléculaires ont été extraits de la base de données Uniprot (uniprot.org). Les localisations subcellulaires prédites et expérimentales ont été extraites de la base de données SUBA4 (suba.live).

AT	Nom	Masse moléculaire (kDa)	Localisation subcellulaire	
			Prédite	Expérimentale
AT1G08620	JMJ16	135	Noyau	NA
AT1G09060	JMJ24	106	Noyau	NA
AT1G11950	JMJ26	100	Noyau	NA
AT1G30810	JMJ18	93	Noyau	Cytosquelette
AT1G62310	JMJ29	101	Noyau	NA
AT1G63490	JMJ17	127	Noyau	NA
AT1G78280	JMJ21	109	Cytoplasme	Cytoplasme
AT2G34880	JMJ15	92	Noyau	NA
AT2G38950	JMJ19	79	Noyau	NA
AT3G07610	JMJ25	116	Noyau	NA
AT3G20810	JMJ30	47	Cytoplasme	NA
AT3G45880	JMJ32	39	Cytoplasme	NA
AT3G48430	JMJ12	153	Noyau	NA
AT4G00990	JMJ27	96	Noyau	NA
AT4G20400	JMJ14	108	Noyau	NA
AT4G21430	JMJ28	105	Noyau	NA
AT5G04240	JMJ11	150	Noyau	NA
AT5G06550	JMJ22	57	Mitochondrie	NA
AT5G19840	JMJ31	57	Cytoplasme	Cytosquelette
AT5G46910	JMJ13	89	Noyau	NA
AT5G63080	JMJ20	54	Cytoplasme	NA
AT1G62830	LDL1	93	Noyau	NA
AT3G10390	FLD	96	Plaste	Cytoplasme
AT3G13682	LDL2	82	Cytoplasme	NA
AT4G16310	LDL3	179	Noyau	NA

b) Expression des gènes liés à la méthylation des lysines lors de stress induits par le cadmium ou l'uranium chez *A. thaliana*

Grâce à des travaux réalisés au laboratoire avant à mon arrivée, nous avons eu accès à des données transcriptomiques de type puces à ADN. Ces études nous ont permis d'étudier les gènes liés à la méthylation/déméthylation des protéines dans des plantes d'*A. thaliana* ayant subi un stress induit par l'U ou le Cd. Les données d'expression des gènes en réponse à un stress induit par l'U ont été obtenues avec des plantes cultivées en hydroponie pendant 7 semaines. Afin de limiter la formation de complexes entre l'U et différents composés tel que le Pi et afin de n'étudier que la toxicité de l'U, les plantes ont été transférées dans de l'eau en présence ou non 50 μM de nitrate d'uranyle pour le traitement. Les racines et les feuilles ont été récoltées séparément après 2, 6 et 30 heures pour l'extraction des ARN (Doustaly *et al.* 2014). À ce jour, ces analyses sont les seules données transcriptomiques disponibles afin d'étudier l'effet d'un stress induit par l'U sur l'expression des gènes chez les plantes.

Les données d'expression des gènes en réponse à un stress induit par le Cd ont été obtenues à partir de plantes cultivées 4 semaines en hydroponie. Afin de n'étudier que la toxicité liée au Cd, les plantes ont été transférées dans de l'eau en présence ou non de 5 ou de 50 μM de sulfate de Cd. Les racines et les feuilles ont été récoltées séparément après 2, 6 et 30 heures de traitement pour l'extraction des ARN (Herbette *et al.* 2006). L'effet du Cd sur l'expression des gènes a été décrit dans plusieurs autres études transcriptomiques avec l'espèce *A. thaliana*. Nous avons ainsi récupéré les données d'expression obtenues dans 4 autres études (Weber, Trampczynska, and Clemens 2006; J.-Y. Li *et al.* 2010; Khare *et al.* 2016; Fischer, Spielau, and Clemens 2017) à partir de la base de donnée Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Ceci nous a permis d'avoir accès à l'expression des gènes lorsque les plantes sont exposées à des doses de Cd différentes, dans des milieux de culture et à des stades de développement différents. Les conditions expérimentales de ces études sont détaillées dans le Tableau 12. Les données d'expression correspondant aux gènes codant pour des PKMT et des KDM ont été extraites des différentes données de puce à ADN. Afin de sélectionner les gènes dont l'expression est régulée de façon significative par le stress métallique (Differentially Expressed Gene, DEG), une analyse statistique a été conduite. Les valeurs d'expression des répliques de plantes ayant été traitées ont été comparés avec les valeurs des répliques de plantes non traitées en utilisant un test de Student non paramétrique (Package Nparcomp, Konietzschke *et al.* 2015). Lorsque l'expression d'un gène était statistiquement affectée par le stress métallique, nous avons calculé le ratio : expression en condition métallique sur expression en condition contrôle. Seuls les ratios exprimés en base Log_2 inférieurs à -1 et supérieurs à 1 ont été retenus. Ils représentent un changement d'expression d'un facteur 2.

Tableau 12. Description des études sélectionnées pour étudier l'expression des gènes liés aux modifications post-traductionnelles lors d'un stress induit par le Cd chez *A. thaliana*. Les données ont été extraites de travaux menés par Herbette *et al.* 2006 et de la base de données de puces à ADN GEO (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Les références ont été ordonnées en fonction de la concentration de Cd utilisée et de la condition de culture. Les études utilisant plusieurs doses ou différentes durées de traitement ont été séparées en plusieurs références.

Référence	Matériel biologique	Concentration en Cd	Durée du traitement	Condition de culture	Publication
1	Racines de plantes de 4 semaines	200 µM sel de Cd non spécifié	6 heures	Hydroponie	Li <i>et al.</i> 2010
2	Racines de plantes de 3 semaines	50 µM sel de Cd non spécifié	2 heures	Hydroponie	Weber <i>et al.</i> 2006
3	Racines de plantes de 4 semaines	50 µM CdSO ₄	2 heures	Hydroponie	Herbette <i>et al.</i> 2006
4			6 heures		
5			30 heures		
6	Racines de plantes de 3 semaines	10 µM sel de Cd non spécifié	2 heures	Hydroponie	Weber <i>et al.</i> 2006
7	Racines de plantes de 4 semaines	5 µM CdSO ₄	2 heures	Hydroponie	Herbette <i>et al.</i> 2006
8			6 heures		
9			30 heures		
10	Racines de plante de 5 semaines	1 µM CdCl ₂	7 jours	Hydroponie	Fischer <i>et al.</i> 2017
11	Plantules entières de 2 semaines	70 µM CdCl ₂	2 heures	Milieu gélosé agar	Khare <i>et al.</i> 2016

(1) Expression des gènes en réponse à un stress induit par l'uranium

Aucun des gènes codant pour les 25 KDM étudiées ne voit son expression modulée par l'U. Seuls 4 gènes codant des PKMT sont différentiellement exprimés, ce qui constitue une réponse modérée au stress induit par l'U (7% des gènes *PKMT*). La réponse transcriptionnelle est principalement racinaire (4 DEG contre un seul dans les feuilles) et relativement tardive, prenant généralement place après 30 heures de traitement (Figure 55). Les 4 PKMT font partie des enzymes de la famille SET Domain (Tableau 9). PPKMT2 (classe VII), SDG36 (classe VI) et SDG39 (classe VI) seraient des PKMT ayant pour substrats des protéines non-histones. SDG5 (classe I) est une enzyme prédite pour agir sur un substrat de type histone.

Le gène codant pour PPKMT2 est 2 fois plus exprimé dans les feuilles et les racines après 30 heures de stress induit par l'U. Cette protéine méthyltransférase est connue pour diméthylter la sous unité bêta de l'ATPase chloroplastique sur sa lysine 447 (Claude Alban *et al.* 2014). Malheureusement, le rôle de cette modification est encore inconnu. Le gène *SDG5* est aussi surexprimé, mais seulement dans les racines ; il code pour une méthyltransférase appelée MEA dont les transcrits sont fortement accumulés avant la fertilisation des fleurs. Cette accumulation permet de réguler négativement le développement des graines avant la fertilisation (Wohrmann *et al.* 2012). Concernant les gènes réprimés, les substrats non histone de SDG39 et SDG36 sont inconnus.

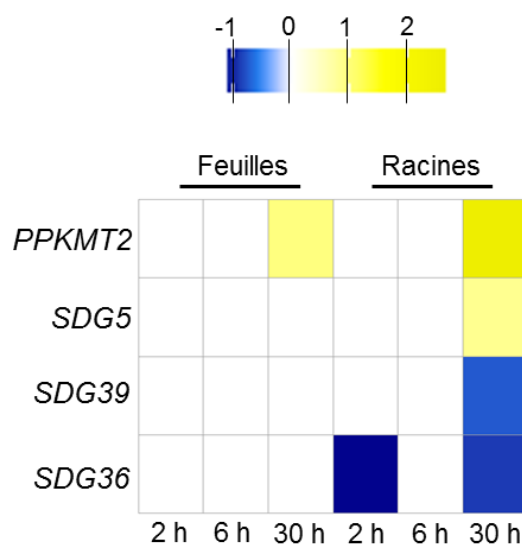


Figure 55. Heatmap représentant les gènes codant des protéines lysines méthyltransférases dont l'expression est modulée en réponse à l'uranium chez *A. thaliana*. Les données ont été extraites de Doustaly *et al.* (2014). Des plantes de 7 semaines ont été transférées dans de l'eau contenant +/- 50 µM de nitrate d'uranyle. Les racines et les feuilles ont été récoltées séparément après 2, 6 et 30 heures de traitement pour extraction d'ARN et hybridation sur puce à ADN. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas en condition contrôle et les 3 réplicas en condition U grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 2 fois ont été sélectionnés (\log_2 de 1 ou -1). L'échelle est exprimée en base \log_2 .

(2) Expression des gènes en réponse à un stress induit par le cadmium

Les données de la réponse transcriptionnelle d'*A. thaliana* au Cd ont été traitées de façon similaire à l'analyse de l'expression des gènes en réponse à un stress induit par l'U. La plupart des DEG entre la condition contrôle et les conditions Cd sont observés dans les données extraites de Li *et al.* (2010) qui utilisent une dose très forte de Cd (200 μ M) (Figure 56). Quinze des seize gènes codant des PKMT différentiellement exprimées sont issus de cette étude. Nous avons donc décidé de nous concentrer sur les autres études (réf. 2 à 11) qui utilisent des doses plus faibles. Dans ces conditions, seuls 2 gènes codant pour les enzymes SBS7 et SDG29 sont, respectivement, réprimé et surexprimé. SBS7 est une PKMT de type SBS dont le substrat est supposé de nature non-histone. Son rôle biologique ou son substrat sont inconnus. SDG29 est une PKMT de type SET domain de classe III. Cette dernière est impliquée dans la transformation du système racinaire en réponse à *Agrobacterium tumefaciens*. En effet, lorsque le gène est muté, une réduction de la taille des tumeurs dues à la bactérie est observée (Crane and Gelvin 2007). SDG29 joue également un rôle dans la signalisation de l'ABA en méthylant la lysine 4 de l'histone H3 au niveau du gène *AHG3* impliqué dans le stress induit par la déshydratation (Y. Liu et al. 2018).

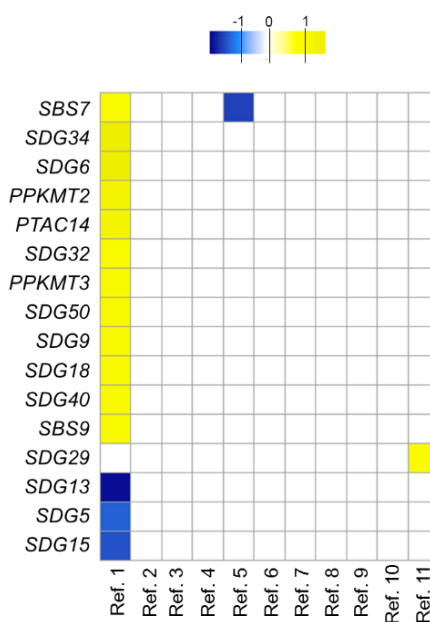


Figure 56. Heatmap représentant les gènes codant pour des protéines lysine méthyltransférases dont l'expression est modulée en réponse au cadmium chez *A. thaliana*. Les données ont été extraites de Ref.1 : Li *et al.* (2010). Ref. 2, 6 : Weber *et al.* (2006). Ref. 3, 4, 5, 7, 8 et 9 : Herbette *et al.* (2006). Ref. 10 : Fischer *et al.* (2017). Ref. 11 : Khare *et al.* 2016. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée (lorsque les données sont disponibles) entre les répliques en condition contrôle et les répliques en condition Cd grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 2 fois ont été sélectionnés (\log_2 de 1 ou -1). L'échelle est exprimée en base \log_2 . Les conditions d'études liées aux différentes publications sont présentées dans le Tableau 8.

En ce qui concerne les KDM, seul le gène *JMJ22* voit son expression diminuée par 2 après 30 heures de stress induit par 50 μM de Cd (données non présentées). Le rôle de la protéine *JMJ22* est redondant avec celui de la protéine *JMJ20*. Ces 2 protéines sont impliquées dans les processus épigénétiques qui contrôlent la germination à la lumière. Les graines du double mutant *jmj20/jmj22* présentent des défauts de germination à la lumière. Cette activation est dépendante de la détection de la lumière par le phytochrome B. L'action du phytochrome permet l'activation de *JMJ20* et *JMJ22* qui déméthylent l'arginine 3 des histones H4 et permet la transcription des gènes liés à la signalisation des gibbérellines (Cho *et al.* 2012). Le rôle de la répression du gène *JMJ22* dans la réponse à un stress induit par le Cd est donc difficile à expliquer. Néanmoins, Zhu *et al.* (2012) rapportent que l'addition de gibbérellines de façon exogène permet de limiter la toxicité du Cd.

En mettant de côté les données de Li *et al.* (2010), aucune PKMT n'a son expression modulée à la fois lors d'un stress induit par le Cd et un stress induit par l'U. La réponse transcriptionnelle précoce des PKMT et KDM à des stress induits par des ETM est donc très restreinte et semble être métal spécifique.

c) Études de l'expression des gènes liés aux phénomènes de méthylation des lysines chez 2 populations métallicoles d'*A. halleri* exposées au cadmium

Pour aller plus loin dans cette étude, nous avons eu l'opportunité d'étudier l'expression des gènes de 2 populations d'*A. halleri* en réponse à un stress induit par le Cd (Corso *et al.* 2018). Ces analyses ont été réalisées dans le cadre de notre collaboration avec Massimiliano Corso et Nathalie Verbruggen au Laboratoire de Physiologie et de Génétique Moléculaire des Plantes (Bruxelles, Belgique). Des graines des populations I16 et PL22 d'*A. halleri* ont été mises à germer sur de la vermiculite. Après 4 semaines, les plantes ont été transférées en milieu hydroponique. Après 4 autres semaines, les plantes ont été transférées dans un milieu de culture contenant ou non 5 μM de sulfate de Cd. Les plantes ont été traitées pendant 10 jours avant de récolter séparément les feuilles et les racines pour l'extraction des ARN (Corso *et al.* 2018). L'expression des gènes a été étudiée grâce à une analyse de type RNA-seq. Cette analyse a permis d'étudier une réponse transcriptionnelle tardive (10 jours) et, potentiellement, de mettre en évidence de nouveaux acteurs dans l'adaptation des plantes à un stress induit par le Cd.

Par rapport aux analyses transcriptomiques réalisées avec les données d'*A. thaliana*, nous avons baissé le seuil de sélection des DEG (ratio Cd vs. CM) de 1 à 0,5 en base Log_2 , en accord avec les analyses de Corso *et al.* (2018). Les données ont ensuite été traitées de la

même manière que décrit précédemment à l'exception que les données sont représentées par un nombre de reads sur 3 réplicas biologiques et non des intensités de fluorescence.

Nous avons identifié 68 gènes homologues chez *A. halleri* à partir de la liste de 59 PKMT d'*A. thaliana*. Dans un premier temps nous avons conduit une analyse en composantes principales (ACP) afin de déterminer si le traitement et/ou l'origine géographique de la population, de façon globale, avait un effet sur l'expression des gènes codant pour des protéines kinases (Figure 57A). Dans les racines et les feuilles, la variable population explique la majeure partie des différences de la réponse transcriptionnelle des plantes à un stress induit par le Cd (feuilles : 65,19 % et racines : 52,09 %). La variable stress est quant à elle plus marquée dans les racines (34 %) que dans les feuilles (19 %).

Étant donné que la majeure partie de la variabilité est expliquée par la variable population, nous avons comparé l'expression de l'ensemble des gènes codant pour des PKMT dans la population PL22 *versus* la population I16 (Figure 57B). Ce type de représentation nous permet de mettre en avant l'effet origine géographique entre les 2 populations. Sans prendre en compte la notion de condition CM ou Cd, il est possible d'identifier 2 grands groupes de gènes : ceux surexprimés chez I16 par rapport à PL22 et ceux réprimés. Ces résultats montrent que l'expression basale des gènes entre les 2 populations est différente, ce qui pourrait refléter leur évolution indépendante sur des sites géographiques différents.

Si l'on s'intéresse aux gènes différentiellement exprimés en réponse au stress, seuls des gènes de la population PL22 sont retrouvés (Figure 57C). On retrouve 3 PKMT de type SBS (*SBS2*, *SBS5*, *SBS9*) et une de type SET domain (*SDG52*). *SBS2* et *SBS9* sont surexprimés dans les racines de PL22 tandis que *SBS5* est réprimé. *SDG52* est la seule PKMT dont l'expression est régulée dans les feuilles. Ces enzymes sont toutes des PKMT dont la fonction est inconnue, tout comme leurs substrats, vraisemblablement de nature non-histone.

En ce qui concerne l'expression des KDM, les ACP montrent des profils de distribution similaires à ceux observés pour l'expression des PKMT (Figure 58). Aucun des gènes codant pour les KDM étudiées ne voit son expression modulée en réponse à un stress induit par le Cd.

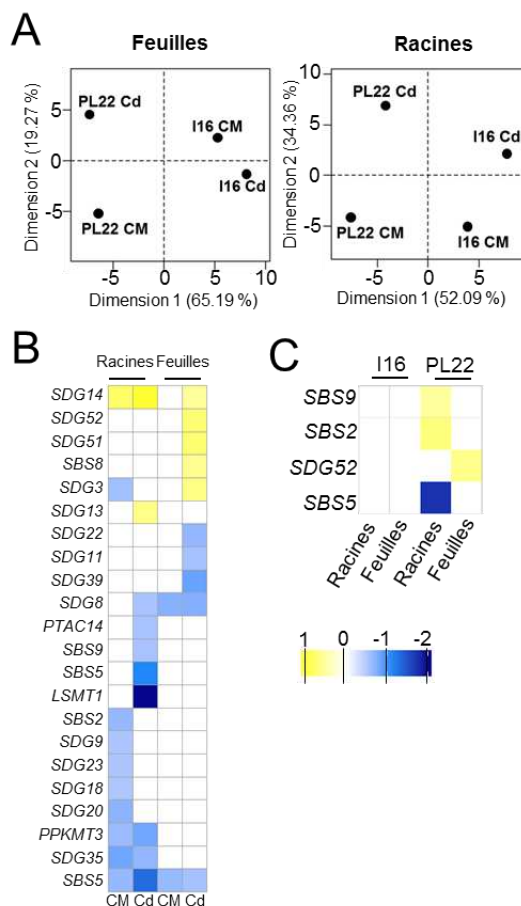


Figure 57. Expression des gènes codant des protéines lysine méthyltransférases dont l'expression est modulée en réponse au cadmium dans les populations métallicoles PL22 et I16 d'*A. halleri*. Les données ont été obtenues à partir d'une analyse de RNA-seq avec des plantes d'*A. halleri* traitées +/- 5 µM de sulfate de Cd pendant 10 jours (Corso *et al.* 2018). (A) Analyse en composantes principales de l'expression des gènes dans les feuilles et les racines. (B) Gènes différemment exprimés en fonction de la population (ratio PL22/I16) dans toutes les conditions (feuilles +/- Cd et racines +/- Cd). L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas de PL22 et les 3 réplicas de I16 grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). (C) Gènes différemment exprimés en fonction de la condition (ratio Cd/CM) dans les racines et les feuilles des populations PL22 et I16. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas en condition contrôle et les 3 réplicas en condition contenant du Cd (5 µM Cd 10 jours) grâce à un test de Student non-paramétrique. En accord avec les analyses de Corso *et al.* (2018), seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 1,4 fois ont été sélectionnés (log2 de 0,5 ou -0,5). L'échelle est exprimée en base Log₂.

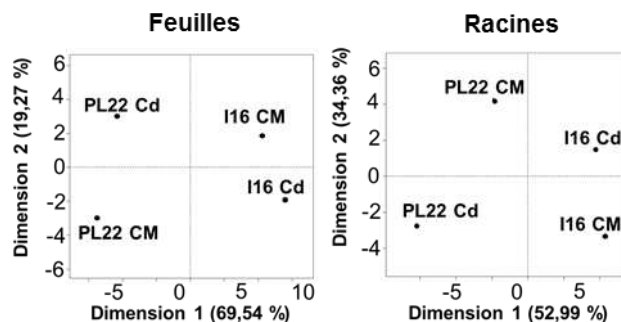


Figure 58. Expression des gènes codant des protéines déméthylases dont l'expression est modulée en réponse au cadmium dans les populations métallicoles PL22 et I16 d'*A. halleri*. Les données ont été obtenues à partir d'une analyse de RNA-seq avec des plantes d'*A. halleri* traitées +/- 5 µM de sulfate de Cd pendant 10 jours (Corso *et al.* 2018). Analyse en composantes principales de l'expression des gènes codant des déméthylases dans les feuilles et les racines.

B. Rôle des PKMT dans la réponse à un stress induit par un élément trace métallique

Les analyses transcriptomiques nous ont permis d'identifier un nombre restreint gènes codant pour des PKMT dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par l'U ou le Cd (Figure 57 et 62). Ces résultats sont appuyés par les analyses immunologiques qui montrent que les patterns de méthylation des lysines fluctuent suite à une exposition des plantes à ces 2 éléments (Figure 52 et 54). Afin de caractériser le rôle de certaines de ces PKMT, nous avons sélectionné des lignées mutées pour ces gènes chez *A. thaliana* et déterminé leur tolérance à un stress métallique.

À ce jour aucune KDM n'a été caractérisée comme déméthylant un substrat de type non-histone chez les végétaux. De plus, une seule KDM voit son expression modulée en réponse à un stress induit par un ETM, que ce soit chez *A. thaliana* ou *A. halleri*. C'est pourquoi nous avons concentré nos efforts sur l'étude des PKMT pour l'identification de nouveaux acteurs de la réponse et de la tolérance aux ETM.

1. Création d'une collection de mutants de PKMT

Les PKMT impliquées dans la modification de substrats non-histone sont peu étudiées chez les plantes. Sur les 48 enzymes de type SET identifiées chez *A. thaliana*, 33 protéines (classe I à V) sont connues ou prédites pour avoir des protéines de type histone comme substrats. Leur étude ne fait pas partie de ce projet de thèse. Nous nous sommes donc focalisés sur les 15 méthyltransférases de type SDG de classe VI et VII qui ont ou auraient des substrats de nature non-histone. De plus, les 11 méthyltransférases de type SBS identifiées chez *A. thaliana* ont été incluses notre analyse (Serre *et al.* 2018, Tableau 10). Comme décrit précédemment, ces enzymes ont été identifiées grâce aux annotations de génome et à des comparaisons de séquences en utilisant comme requête des protéines méthyltransférases ayant une organisation structurale de type SBS dont le couple enzyme/substrat est connu chez l'Homme, la levure ou les bactéries. La fonction de la plupart ces enzymes dans la modification de substrats protéiques reste hypothétique car certains membres de la super-famille des méthyltransférases SBS sont également capables de méthyler des métabolites ou des acides nucléiques (Falnes *et al.* 2016). Néanmoins, les enzymes PrmA (Mazzoleni *et al.* 2015) et CAMKMT1 (Banerjee *et al.* 2013 ; Viridi *et al.* 2015) sont connues pour catalyser des réactions de méthylation sur des résidus lysine de substrats protéiques.

Les graines de 25 mutants d'insertion de T-DNA sur les 26 PKMT sélectionnées (15 SDG et 11 SBS) ont été obtenues à partir de différentes banques d'*A. thaliana* (Salk Institute, Syngenta et GaBI-Kat, Tableau 5). Le mutant *sbs4* n'était pas disponible lors de la création de la banque de mutants en 2015. Certaines banques de graines fournissent directement des graines avec l'allèle muté à l'état homozygote. La présence de l'insertion dans ces lignées a été vérifiée par PCR et séquençage (Tableau 5). En ce qui concerne les banques qui fournissent les graines avec une insertion à l'état hétérozygote, les plantes ont été reproduites et sélectionnées jusqu'à l'obtention de lignées portant l'allèle muté, et donc l'insertion, de façon homozygote. Pour la lignée *sdg37* il a été impossible d'obtenir des individus porteurs de la mutation à l'état homozygote (amplification impossible de l'insertion par PCR). Vingt-quatre lignées homozygotes portant une insertion dans un gène codant pour une PKMT ont donc été obtenues. Néanmoins, la mutation dans le gène *PTAC14* (AT4G20130) est létale en conditions photoautotrophes (Gao *et al.* 2012 ; Grübler *et al.* 2017). La méthyltransférase *PTAC14* fait partie d'un complexe impliqué dans la transcription du génome chloroplastique et est essentielle au développement du chloroplaste. La nature du substrat de la protéine *PTAC14* est toujours inconnue. La lignée *ptac14* n'a pas été engagée au criblage de tolérance au Cd car celui-ci a été réalisé dans des conditions de photoautotrophie (absence de sucre dans le milieu de culture). Vingt-trois lignées mutantes homozygotes portant une insertion de T-DNA dans un gène codant pour une PKMT ont donc été utilisées dans cette étude.

2. Criblage de mutants de protéines lysine méthyltransférases pour leur tolérance à des éléments traces métalliques

Les analyses transcriptomiques ont principalement mis en évidence des PKMT dont l'expression était modulée dans les racines (Figure 55 et 57). De plus, les analyses immunologiques sur des échantillons issus de tissus racinaires (Figure 50 Figure 52) montrent des profils de méthylation différents entre les différents traitements. Or, le système racinaire est le premier organe en contact avec les éléments toxiques présents dans les sols. Dans le but d'identifier de nouveaux acteurs de la réponse et de la tolérance aux ETM, il est donc préférable, dans un premier temps, de s'intéresser au système racinaire. C'est pour cette raison que nous avons décidé de mettre en place un criblage racinaire de la tolérance aux ETM des mutants de PKMT. Pour cela, nous avons utilisé un test d'inhibition de croissance racinaire *in vitro* sur milieu de culture gélosé. Les milieux $\frac{1}{2}$ Murashige et Skoog (MS) n'ont pas été supplémentés en saccharose afin de ne pas masquer le phénotype racinaire d'un mutant dont le gène serait impliqué dans le métabolisme carboné.

a) Limitations dans la mise en place d'un criblage pour l'analyse de la tolérance à l'uranium

Lors d'essais pour la mise en place d'un criblage racinaire sur milieu de culture gélosé ($\frac{1}{2}$ MS, agar 0,8%) contenant du nitrate d'uranyle, nous n'avons observé aucun ralentissement de la croissance racinaire pour des concentrations allant de 5 à 50 μM d'U (Figure 59). Seule une forte concentration de nitrate d'uranyle (250 μM) dans un milieu appauvri en phosphate (Low Phosphate, LP, 30 μM Pi) permet d'observer un effet toxique de l'U. Ce résultat semble être directement lié à la chimie de l'U qui peut former des complexes avec les fonctions hydroxyles des sucres de l'agar ou encore se lier aux phosphates résiduels présents dans les agents gélifiants commerciaux (Jain *et al.* 2009). Ces interactions rendent le métal non biodisponible et ne permettent pas de réaliser un criblage fiable et reproductible. Afin d'essayer de contourner ce problème, nous nous sommes tournés vers d'autres gélifiants comme l'agarose (Figure 59). Ce milieu nous a permis d'observer un ralentissement drastique de l'élongation racinaire à 250 μM d'U mais les plantes en conditions contrôles présentaient également une croissance très ralentie, des apex racinaires plus épais et un développement anormal des poils absorbants. En raison de ces nombreux artefacts liés aux agents gélifiants, la mise en place d'un criblage des 23 mutants de PKMT pour leur tolérance à l'U n'a pas été poursuivie.

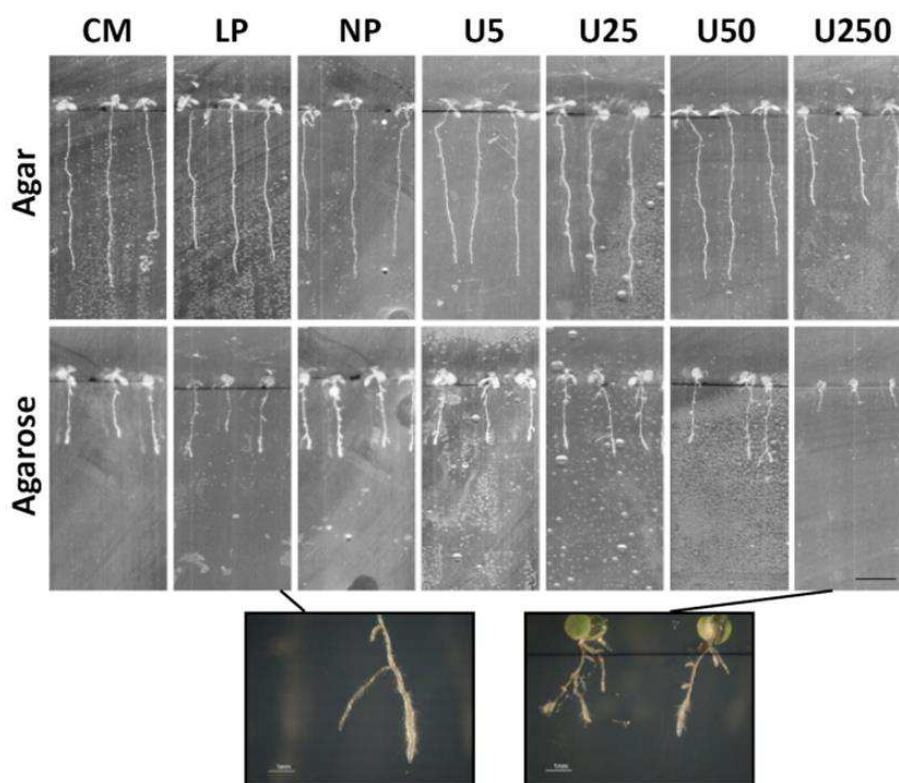


Figure 59. Influence des milieux gélosés sur la toxicité de l'uranium sur des plantules d'*A. thaliana*. Photographies de plantules d'*A. thaliana* Col0 prises à 6 jours de croissance sur milieu $\frac{1}{2}$ MS agar 0,8% (m/v) ou milieu $\frac{1}{2}$ MS agarose 0,6% (m/v) en condition contrôle (CM, 600 μM Pi), low phosphate (LP, 30 μM Pi), no phosphate (NP, 0 μM Pi) et low phosphate additionné de 5, 25, 50, ou 250 μM U (U5 à U250). Milieux non supplémentés en saccharose. Barre = 1cm.

b) Criblage de mutants de PKMT pour leur tolérance au cadmium : méthode par semis direct sur milieu sélectif

Conformément aux méthodes de criblage racinaire utilisées pour les plantes d'*A. thaliana* dans la littérature nous avons fait germer des graines de la lignée sauvage Col0 et de 16 mutants de PKMT sur un milieu gélosé ½ MS (agar 0,8 %) contenant ou non 20 µM de sulfate de Cd. Ces expériences ont été reproduites 2 fois et ont permis de mettre en évidence 2 mutants plus sensibles au Cd (*prma* et *ppkmt1*) et 2 mutants plus tolérants au Cd (*sdg51* et *sdg52*). Néanmoins, les résultats obtenus pour toutes les lignées, y compris le sauvage Col0, présentaient une forte variabilité inter- et intra-expérience. En effet, outre les 4 mutants ayant une tolérance différente de celle du sauvage, nous avons observé des problèmes de reproductibilité chez les autres mutants. De plus, les taux de germination sur le milieu contenant du Cd étaient plus faibles que ceux en condition contrôle. Ce phénomène peut être expliqué car la germination est un processus développemental qui peut être très fortement impacté par la présence d'ETM (W. Li *et al.* 2005). Afin de pallier à ces problèmes, nous avons adapté les conditions de criblage de nos mutants (voir paragraphe d). Nous avons en parallèle poursuivi la caractérisation du mutant *ppkmt1* identifié par cette première méthode de criblage.

c) Caractérisation du mutant *ppkmt1*

Le criblage par semis direct sur milieu sélectif nous a permis de mettre en évidence le mutant affecté dans le gène *PPKMT1* qui code pour une PKMT déjà étudiée dans l'équipe (Mininno *et al.* 2012 ; Alban *et al.* 2014). Dans ces conditions d'étude, le mutant *ppkmt1* est plus sensible au Cd avec une longueur racinaire plus petite que celle du contrôle Col0 après 10 jours de croissance dans un milieu contenant 20 µM de sulfate de Cd. Nous avons tenté de caractériser plus en détails ce mutant. Avant d'étudier plus en détails les conséquences de la mutation du gène *PPKMT1*, nous avons souhaité confirmer la sensibilité du mutant en l'exposant à des doses croissantes de Cd (0, 5, 10, 20 µM de sulfate de Cd, Figure 60A). La croissance du mutant par rapport à celle du sauvage n'est affectée qu'à la concentration de 20 µM de Cd, concentration utilisée lors du criblage.

Pour étudier plus en détails les conséquences de la mutation de *PPKMT1* dans la réponse au stress induit par le Cd, une étude en hydroponie a été conduite sur des plantes plus âgées. Des plantes cultivées en hydroponie pendant 3 semaines ont été transférées dans un milieu contenant ou non 5 µM de sulfate de Cd pendant 10 jours. À la fin du traitement, plusieurs paramètres liés à l'efficacité photosynthétique ont été mesurés. L'inhibition de la croissance foliaire induite par le Cd ne semble pas affecter différemment les plantes *ppkmt1* et le sauvage Col0 (Figure 60B) et ce résultat se reflète sur les mesures d'efficacité

photosynthétique. En effet, les mesures de vitesse de transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique n'ont pas mis en évidence de différence statistiquement significative entre le sauvage et le mutant ayant subi un stress induit par le Cd (Figure 60C).

La protéine PPKMT1 est une PKMT à domaine SET localisée dans le chloroplaste avec un substrat de nature inconnue (Alban *et al.* 2014). Néanmoins, cette enzyme est référencée comme interagissant physiquement (expérience en double hybride) avec la protéine thiorédoxine TRXm1 (base de données thebiogrid.org). TRXm1 est une protéine essentielle dans les processus de régulation redox de la photosynthèse. Le stress induit par le Cd est connu pour avoir une influence sur la photosynthèse (Parmar *et al.* 2013) en interagissant de façon covalente avec les fonctions thiols, empêchant ainsi la formation de ponts disulfures dans les protéines comme les thiorédoxines (Pearson 1963 ; Gill and Tuteja 2011 ; Wójcik and Tukiendorf 2011). Nous avons souhaité savoir si TRXm1 était le substrat de l'enzyme PPKMT1. Nous avons à disposition l'enzyme recombinante PPKMT1 précédemment produite et purifiée dans notre équipe (Mininno *et al.* 2012).

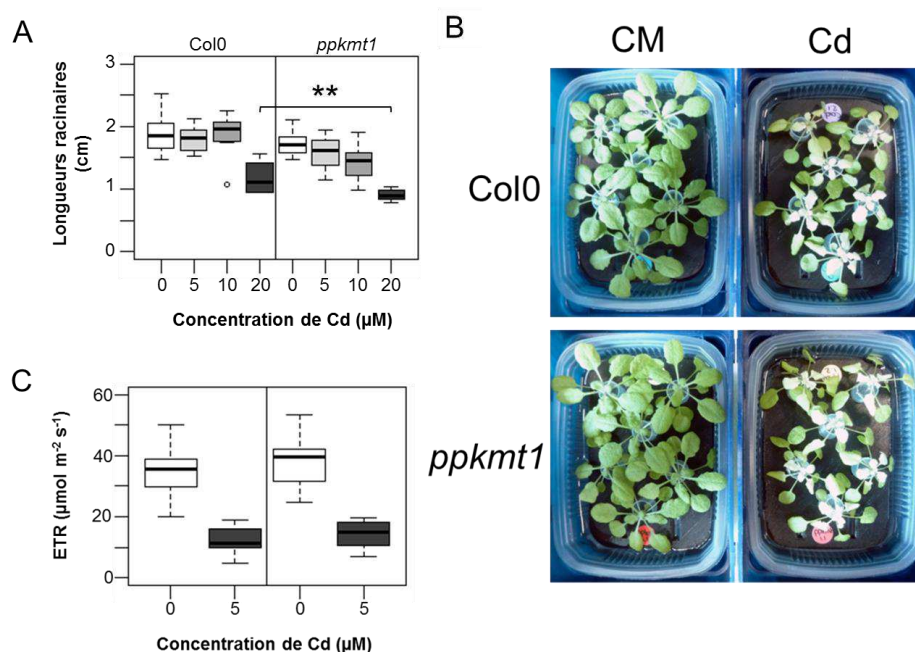


Figure 60. Caractérisation du mutant *ppkmt1* pour sa tolérance au Cd. (A) Les longueurs racinaires primaires de plantules de 4 jours d'*Arabidopsis thaliana* écotype Col0 et du mutant *ppkmt1* ont été mesurées sur milieu ½ MS Agar 0,8 % après 10 jours de traitement +/- 20 µM de nitrate de Cd. n = 10 plantules. **: Différence statistique par rapport à la valeur du contrôle Col0 dans la même condition déterminée par un test de Dunnett (pvalue < 0,005). (B) et (C) Plantes d'*Arabidopsis thaliana* écotype Col0 et du mutant *ppkmt1* âgées de 3 semaines en hydroponie après 10 jours en condition contrôle (CM) ou de traitement avec 5 µM de nitrate de Cd (Cd). (B) Montage photographique des appareils foliaires observés après 10 jours de traitement. (C) Mesures de l'Electron Transfer Rate (ETR en µmol d'électrons m⁻² s⁻¹) sur des plantes adaptées à l'obscurité pendant 15 min.

Nous avons produit la protéine recombinante TRXm1 de façon similaire à la production de l'enzyme PPKMT1. L'ADNc codant la protéine TRXm1 a été amplifié à partir d'ARN d'*A. thaliana* écotype Col0 reverse transcrits et inséré dans le vecteur bactérien pET28a+ afin que la protéine possède une étiquette de 6 histidines en N-terminal. La construction pET28a+-TRXm1 a été introduite dans la souche d'*E. coli* Rosetta afin de produire la protéine recombinante. Finalement, l'étiquette 6-His nous a permis de purifier la protéine de l'extrait soluble bactérien sur colonne de nickel (Ni-Sepharose, Figure 61). En effet, l'étiquette 6-His permet à la protéine recombinante d'être retenue sur la colonne par interaction avec les ions nickel. Pour éluer la protéine de la colonne nous avons utilisé des concentrations croissantes d'imidazole (30, 50 et 250 mM). L'élution avec 50 mM d'imidazole nous a permis d'obtenir la protéine recombinante TRXm1 purifiée (Figure 61).

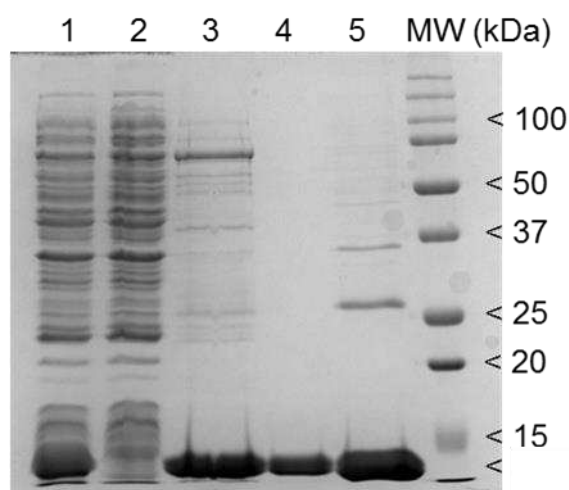


Figure 61. Analyse SDS-PAGE illustrant la purification de la protéine TRXm1 recombinante. La protéine recombinante TRXm1 a été produite par la bactérie *E. coli* Rosetta après induction à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 18 °C. Les extraits protéiques bactériens totaux ont été obtenus après induction (1) ou sans induction (2). La protéine a été purifiée sur colonne de Ni-Sepharose et éluee avec un gradient d'imidazole : 30 mM (3), 50 mM (4) et 250 mM (5). Les extraits protéiques ont été résolus par électrophorèse en gel de polyacrylamide 15% SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie. 1 : extrait bactérien avec induction à l'IPTG. 2 : extrait bactérien sans induction. 3 : élution avec 30 mM d'imidazole. 4 : élution avec 50 mM d'imidazole. 5 : élution avec 250 mM d'imidazole. MW : Masses moléculaires en kDa. Trente μ g de protéines par puits.

Plusieurs tests de méthylation ont été mis en place afin de déterminer si l'enzyme PPKMT1 était capable de méthyler le substrat TRXm1. Ces expériences consistent à mettre en présence une méthyltransférase purifiée (ou un extrait protéique contenant la méthyltransférase), un substrat potentiel purifié (ou un extrait protéique contenant ce substrat), et le donneur de méthyle S-adénosylméthionine tritié ($[^3\text{H}]\text{AdoMet}$). Grâce à ce donneur radioactif nous sommes en mesure de suivre l'incorporation du radical méthyle par autoradiographie ou par comptage de la radioactivité incorporée aux protéines.

Nous avons tout d'abord réalisé un test de méthylation en présence des protéines recombinantes purifiées PPKMT1 et TRXm1. Ce test n'a pas donné lieu à l'incorporation de

radical méthyle tritié détectable par autoradiographie (données non présentées). Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'une ou les 2 protéines recombinantes soient purifiées dans une mauvaise conformation, la nécessité de cofacteur(s), les conditions redox ou simplement par le fait que TRXm1 n'est pas le substrat de PPKMT1. Afin d'explorer ces hypothèses, nous avons mis en place plusieurs tests de méthylation en conditions oxydantes ou réductrices. En effet, la protéine TRXm1 est capable de former des ponts disulfures en fonction des conditions redox du milieu. L'état d'oxydation de cette protéine influence sa conformation (Prinz et al. 1997) et pourrait donc modifier sa capacité à être méthylée. Plusieurs sources d'enzymes ont été utilisées pour méthyler le substrat TRXm1 en conditions oxydante ou réductrice. Nous avons utilisé l'enzyme PPKMT1 recombinante purifiée ou des extraits protéiques de stroma de chloroplastes de plantes sauvage Col0 et de 2 mutants d'insertion différents *ppkmt1.1* et *ppkmt1.2*, la protéine PPKMT1 native étant présente dans le stroma des chloroplastes (Figure 62). Aucune des conditions testées ne nous a permis de mettre en évidence une incorporation de méthyle dans la protéine TRXm1 recombinante (Figure 62).

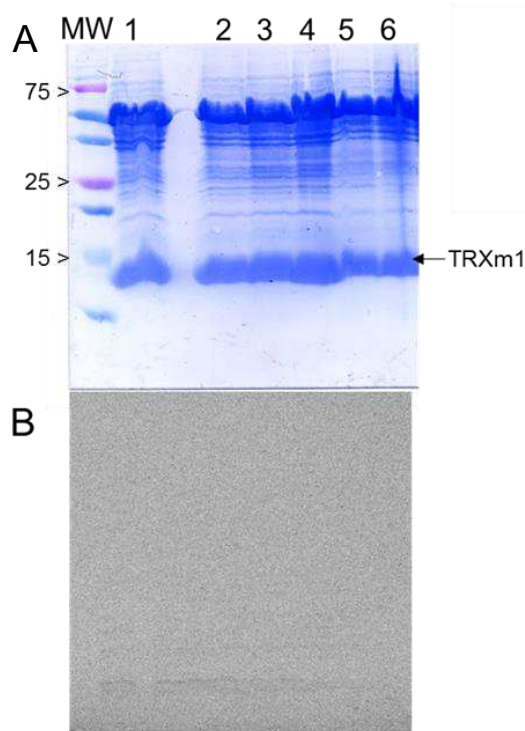


Figure 62. Test de méthylation *in vitro* de la protéine TRXm1 par du stroma de chloroplaste. La protéine recombinante TRXm1 placée en condition réductrice ou oxydante afin de moduler sa conformation tridimensionnelle, a été mise en présence de plusieurs sources d'enzymes potentielles : extraits protéiques solubles de stroma de Col0 et des mutants *ppkmt1.1* et *ppkmt1.2*. Après incubation dans un milieu réactionnel contenant de la S-adénosylméthionine tritiée. Les différents tests ont ensuite migré en gel de polyacrylamide 15% SDS-PAGE et été transférés sur membrane de PVDF (A). La membrane a ensuite été autoradiographiée pendant 7 jours (B). 1, 2, 3 : conditions réductrices. 4, 5, 6 : conditions oxydantes. 1 et 4: Stroma de Col0 + TRXm1. 2 et 5: Stroma de *ppkmt1.1* + TRXm1. 3 et 6: Stroma de *ppkmt1.2* + TRXm1.

Nous avons alors décidé de mettre en place une autre approche consistant en une co-transformation bactérienne afin d'exprimer à la fois le substrat hypothétique TRXm1 et l'enzyme PPKMT1 dans les cellules Rosetta. Après incubation de l'extrait protéique soluble

des bactéries co-transformées avec le donneur de méthyle, un Western blot a été réalisé avec les anticorps anti triméthyl-lysine. Seul le signal lié à la protéine soluble bactérienne RPL11 connue pour être méthylée (Mazzoleni *et al.* 2015) a été détecté (données non présentées).

Les différents tests réalisés n'ont pas permis de mettre en évidence une méthylation de TRXm1 par PPKMT1. En conséquence, nous avons choisi de ne pas poursuivre l'étude de cette méthyltransférase.

d) Criblage de mutant de PKMT pour leur tolérance au cadmium : méthode par transfert sur milieu sélectif

Mise au point des conditions de criblage

Afin d'écartier de possibles biais de criblage dus à la germination des graines sur un milieu contenant du Cd, nous avons adapté les conditions de criblage des mutants de PKMT. Les graines ont été mises à germer et croître pendant 4 jours dans un milieu ½ MS. Les plantules ont ensuite été repiquées soit en condition contrôle, soit sur un milieu contenant du nitrate de Cd. La croissance racinaire a ainsi été suivie pendant 10 jours. Les longueurs racinaires des plantules ont été mesurées au cours du temps dans le but de calculer les vitesses d'élongation racinaire moyenne (cm/jours).

Nous avons testé plusieurs doses de nitrate de Cd dans ces conditions afin de déterminer la dose la plus adaptée. Nous avons également étudié le mutant *cad2.1* dans ces conditions. Cette lignée est mutée pour l'expression de l'enzyme gamma-glutamylcystéine synthetase qui permet de synthétiser du glutathion, un métabolite essentiel, entre autre, à la synthèse des phytochélatines et la détoxification du Cd (Cobbett *et al.* 1998 ; Tennstedt *et al.* 2008). Ce mutant constitue une lignée hypersensible au Cd pour déterminer la concentration de l'élément toxique adaptée à notre étude.

Tout d'abord, l'étude de la croissance racinaire des plantules sauvages d'*A. thaliana* écotype Col0 et du mutant *cad2.1* nous a permis de définir la dose de 20 µM de sulfate de Cd comme étant la plus adaptée à la mise en place du criblage. En effet, c'est la première dose qui permet i) de réduire de moitié la croissance racinaire des 2 lignées par rapport au milieu contrôle et ii) d'aisément distinguer la réponse racinaire de la lignée sauvage d'une lignée sensible au Cd (Figure 63A).

Ensuite, sur une représentation linéaire de la croissance racinaire au cours du temps (Figure 63B) on peut voir que la croissance racinaire est limitée durant des 3 premiers jours après repiquage. Sur cette durée, la plantule se remet certainement du stress mécanique lié au transfert physique d'un milieu à un autre. D'autre part, après 8 jours de traitement, la croissance dans un milieu contenant 20 µM de sulfate de Cd commence à ralentir pour le mutant *cad2.1* (Figure 63B). Pour ces raisons, nous avons décidé de comparer la longueur

racinaire de chaque mutant avec celle de la plante sauvage à 8 jours de traitement et de comparer les vitesses d'élongation moyenne entre 3 et 8 jours.

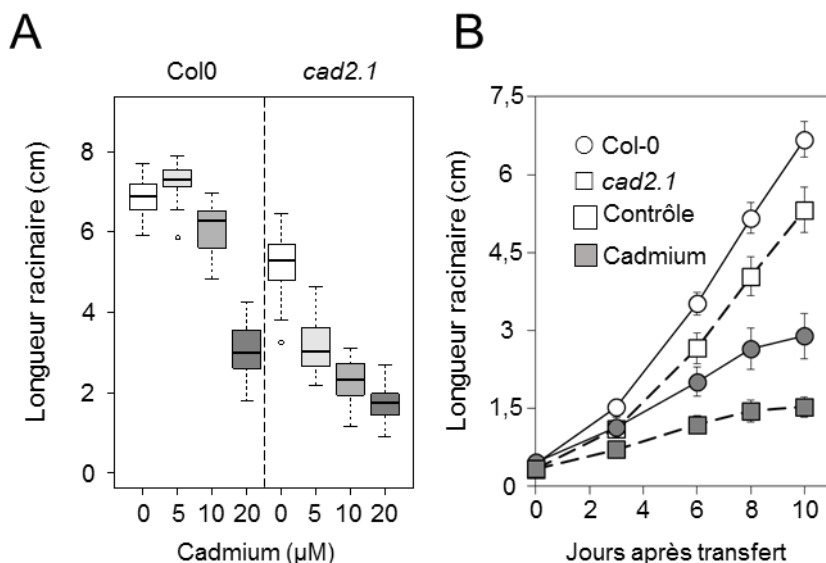


Figure 63. Tests d'élongation racinaire *in vitro* du sauvage Col0 et du mutant *cad2.1* dans des milieux contenant du cadmium. Des graines d'*A. thaliana* écotype Col0 et du mutant *cad2.1* ont été mises à germer en milieu gélosé ½ MS, agar 0,8% pendant 4 jours. Les plantules ont ensuite été transférées sur milieu contrôle ½ MS +/- 5, 10 ou 20 µM de nitrate de Cd. (A) Représentation statistique des médianes des longueurs racinaires après 10 jours de traitement avec 0, 5, 10 ou 20 µM de Cd. (B) Représentation linéaire des moyennes des longueurs racinaires au cours du temps après l'application du traitement +/- 20 µM de Cd. n = 20 plantules.

Lors d'expériences préliminaires au criblage de mutants de PKMT pour leur tolérance au Cd, nous avons observé que certains mutants avaient une longueur racinaire et/ou une vitesse d'élongation différente de celle du sauvage en condition contrôle. Afin d'écartier de possibles biais d'interprétation relatives à ces différences intrinsèques à certaines lignées, nous avons introduit d'autres paramètres de comparaison : les index de tolérance (TI). Ces derniers permettent de juger de la tolérance au Cd d'un mutant de façon indépendante de la croissance du sauvage. En effet, seuls les paramètres propres à la lignée mutante entrent en jeu dans le calcul. Les TI sont calculés en divisant la valeur d'un paramètre (longueur ou vitesse) en condition Cd par sa valeur en condition contrôle. Plus la valeur du TI est élevée, plus la plantule est tolérante au Cd. Ces TI sont appliqués aux paramètres précédemment sélectionnés, longueur racinaire à 8 jours et vitesse d'élongation entre 3 et 8 jours. Chacun des paramètres (longueur racinaire, vitesse d'élongation racinaire et T.I.) défini pour un mutant a été comparé aux paramètres du sauvage Col0 afin de déterminer s'il existe des différences statistiquement significatives par un test de Student non-paramétrique (package nparcomp, Konietzschke *et al.* 2015). Les TI représentent la moyenne de 100 TI calculés. Ces résultats ont été regroupés sous la forme d'une heatmap (Figure 64).

Résultats du criblage

Le criblage basé sur les TI nous a permis de mettre en évidence 3 groupes de mutants qui diffèrent dans leur sensibilité au Cd (Figure 64). Le premier groupe comprend 14 mutants dont le TI n'est pas différent du sauvage. Ensuite, nous avons observé un groupe de 5 mutants plus tolérants au Cd que le sauvage. Ce groupe est subdivisé entre 1/ le mutant *sdg52* pour lequel tous les paramètres mesurés sont plus grands que le sauvage, 2/ *sdg51*, *sbs7* et *sbs9* pour lesquels les paramètres sont plus petits en condition contrôle mais similaires au sauvage en condition Cd, et 3/ le mutant *camkmt1* pour lequel les paramètres sont plus grands que le sauvage seulement en présence de Cd. Le dernier groupe est représenté par 4 mutants plus sensibles au Cd que le sauvage. Ce groupe est subdivisé en 1/ les mutants *sdg50*, *sbs6* et *sbs8* pour lesquels la croissance et l'élongation racinaire sont plus faibles que celles du sauvage en condition contrôle, et 2/ le mutant *sbs2* qui présente un phénotype seulement en condition de stress (Figure 64).

Pour résumer, 9 mutants de PKMT sur 23 ont une sensibilité au Cd différente du sauvage Col0. Les réactions de méthylation catalysées par ces enzymes ont donc un rôle dans la tolérance des plantes à cet ETM dans nos conditions expérimentales. Même si les analyses transcriptomiques n'ont révélé que 3 gènes codant des PKMT dont l'expression est modulée en réponse au Cd (Figure 55), ce criblage nous a montré que de nombreuses PKMT sont impliquées dans la tolérance au Cd.

Nous avons fait le choix de nous concentrer sur les 2 mutants dont les paramètres n'étaient pas différents du sauvage en condition contrôle, le mutant *camkmt1* et le mutant *sbs2*. Le premier mutant est plus tolérant au Cd (longueur racinaire, vitesse d'élongation et TI plus grands que le sauvage en condition Cd) tandis que le second est plus sensible que le sauvage (tous les paramètres plus petits que le sauvage en condition Cd).

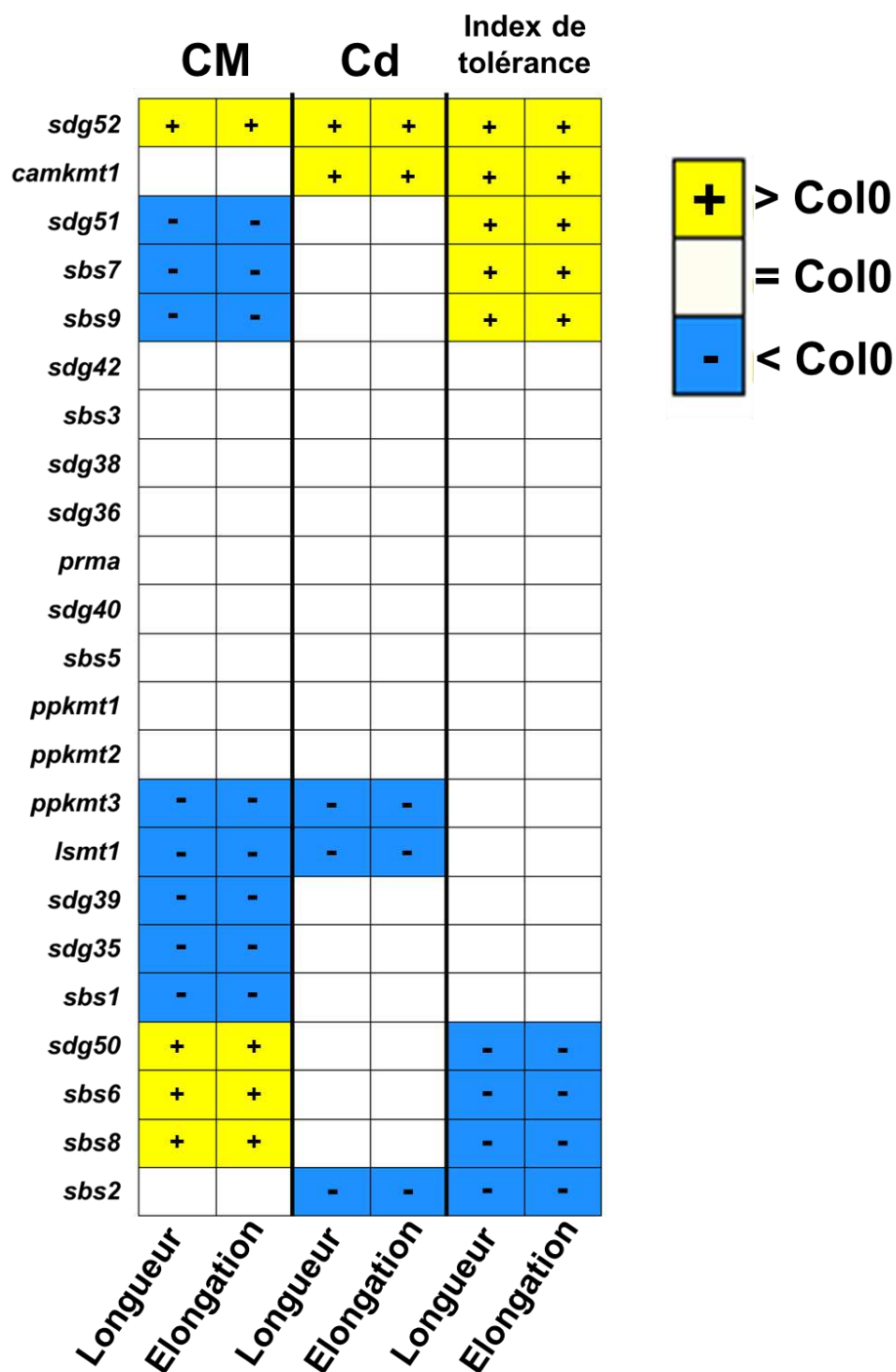


Figure 64. Heatmap présentant le bilan du criblage des mutants de PKMT en présence de cadmium. Des graines d'*A. thaliana* écotype Col0 sauvage et de 23 mutants de protéines lysine méthyltransférases ont été mise à germer en milieu gélosé ½ MS, agar 0,8% pendant 4 jours. Les plantules ont ensuite été transférées sur milieu contrôle ½ MS +/- 20 µM de nitrate de Cd. Les longueurs à 8 jours de traitement et les vitesses d'élongation entre 3 et 8 jours de traitement de chaque mutant ont été comparées à la longueur et à la vitesse d'élongation du contrôle Col0 en condition contrôle (CM) et en milieu contenant 20 µM de nitrate de Cd. Les index de tolérance (TI) ont été calculés en effectuant 100 tirages aléatoires entre un jeu de données en condition Cd et CM pour effectuer le calcul : TI paramètre = paramètre (Cd) / paramètre (CM). Les tests statistiques permettant de définir si un mutant a une longueur, une vitesse d'élongation ou un TI statistiquement différent du contrôle Col0 ont été menés avec le logiciel R en utilisant un test de Dunnett issu du package « nparcomp » ($p < 0,05$). < Col0 : statistiquement plus petit que la valeur médiane de Col0. > Col0 : statistiquement plus grand que la valeur médiane de Col0. = Col0 : statistiquement non différent de la valeur médiane de Col0. n = 20 plantules.

3. Caractérisation du mutant *camkmt1*

Le premier mutant identifié par notre criblage est le mutant *camkmt1*. Ce mutant est plus tolérant au Cd que le sauvage Col0 en termes de croissance racinaire (Figure 64). La protéine CaMKMT1 (Calmoduline lysine méthyltransferase 1) est une PKMT du type SBS connue pour transférer 3 groupes méthyles sur la lysine 115 de la calmoduline (CaM) (Magnani *et al.* 2010). Cette petite protéine de 16,8 kDa est très bien conservée dans l'arbre du vivant et joue un rôle dans la signalisation calcique (Magnani *et al.* 2010). La plus grande tolérance de *camkmt1* à un stress induit par le Cd a été confirmée en réalisant une expérience de croissance racinaire dans les mêmes conditions que notre criblage mais avec des doses croissantes de Cd (0, 5, 10 et 20 μ M de nitrate de Cd). Nous avons mesuré les longueurs racinaires (Figure 65A) et pesé individuellement les plantules après 8 jours de traitement (Figure 65B). Au niveau de la croissance racinaire, seule la dose de 20 μ M (celle du criblage) permet de significativement faire la différence entre la longueur racinaire du sauvage et celle de *camkmt1* (Figure 65A). Au niveau de la masse fraîche des plantules, la plus grande tolérance de *camkmt1* à un stress induit par le Cd est visible dès 10 μ M (Figure 65B).

L'enzyme CaMKMT1 méthyle la CaM qui est un senseur de Ca (Magnani *et al.* 2010). Or le Ca permet de significativement baisser la toxicité du Cd sur la croissance (Suzuki 2005). Nous avons alors souhaité analyser l'effet du Ca sur la tolérance au Cd du mutant *camkmt1*. Pour cela, nous avons mesuré les longueurs racinaires et les masses fraîches en faisant varier la dose de Ca dans le milieu $\frac{1}{2}$ MS du criblage (en présence de 0,5 mM, 1 mM et 1,5 mM de Ca, dose originale de Ca dans le milieu $\frac{1}{2}$ MS) en présence de +/- 20 μ M de Cd (Figure 65C et D). De façon générale, l'effet du Cd sur la croissance racinaire et la biomasse est inversement corrélé aux concentrations de Ca alors que les changements de concentrations en Ca n'affectent pas la croissance en absence de Cd. Le mutant *camkmt1* montre une croissance racinaire et une biomasse plus importante que le sauvage et ceci quelle que soit la dose de Ca (Figure 65C et D).

La méthyltransferase CaMKMT1 a déjà été caractérisée comme participant à la réponse aux stress salin et thermique (Banerjee *et al.* 2013). En effet, l'étude de Banerjee *et al.* (2013) montre que le mutant *camkmt1* que nous avons utilisé lors du criblage a une croissance racinaire plus élevée que le sauvage Col0 en conditions de stress. Ce dernier résultat a été confirmé par 2 autres lignées dont l'expression du gène *CAMKMT1* a été supprimée par ARN interférence. De plus, des lignées surexprimant le gène *CAMKMT1* montrent une croissance plus faible que le sauvage en conditions de stress salin. De façon intéressante, l'expression racinaire du gène est localisée au niveau de l'apex racinaire, zone qui contrôle le développement racinaire.

Nos résultats permettent de confirmer que CaMKMT1 est une protéine importante dans la réponse aux stress (salin, température et Cd). L'identification du mutant *camkmt1* lors du criblage de la sensibilité au Cd permet également de valider notre approche. Etant donné que la caractérisation de la protéine CaMKMT1 a été largement décrite dans l'étude de Banerjee *et al.* (2015) nous n'avons pas poursuivi l'étude du mutant *camkmt1*.

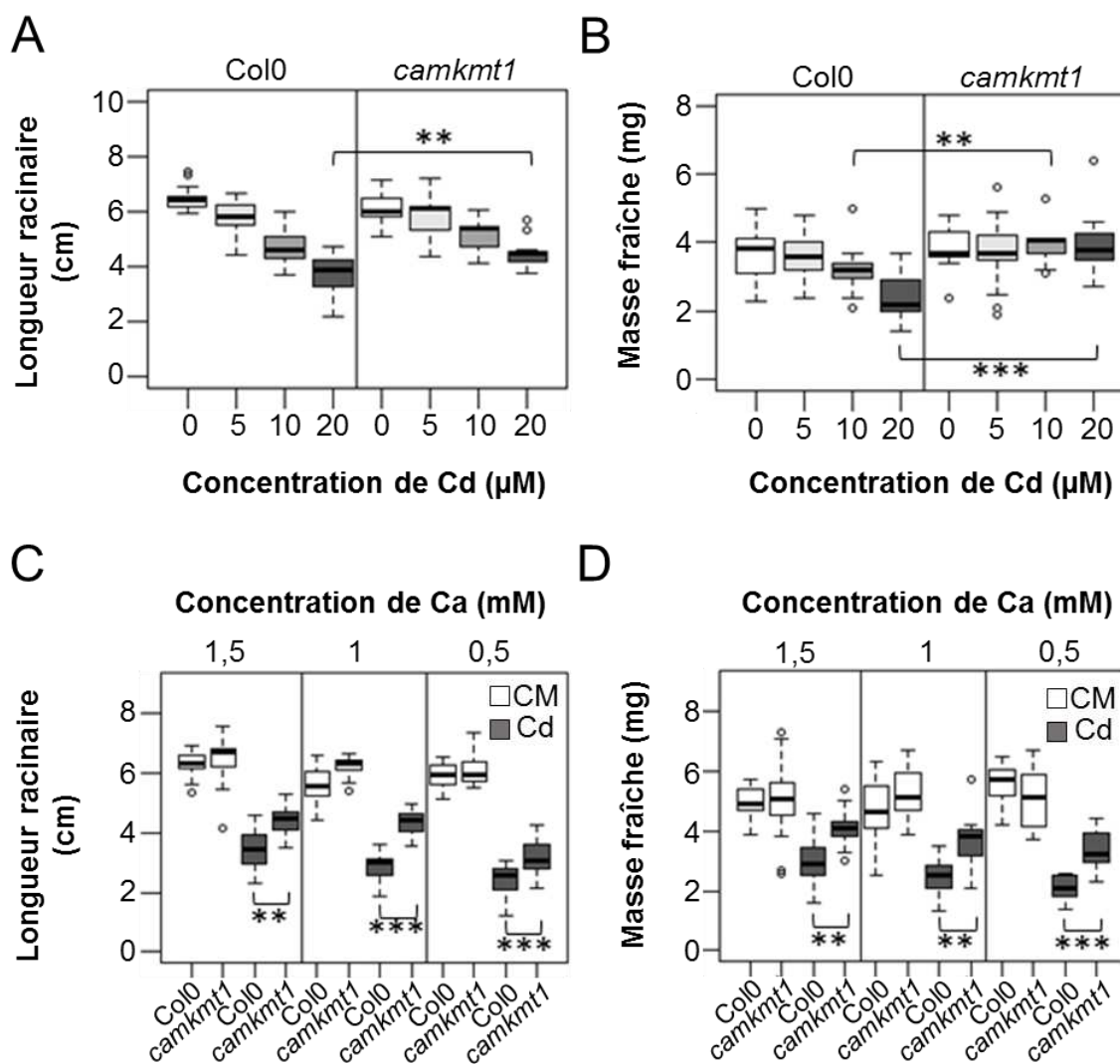


Figure 65. Tolérance au Cd du mutant *camkmt1*. Des graines d'*A. thaliana* écotype *Col0* sauvage et du mutant *camkmt1* ont été mises à germer en milieu gélosé $\frac{1}{2}$ MS, agar 0,8% pendant 4 jours. Les plantules ont ensuite été transférées sur milieu contrôle $\frac{1}{2}$ MS +/- 5, 10 ou 20 μM de nitrate de Cd. Longueurs racinaires primaires (A et C) et les biomasses (B et D) ont été mesurées après 8 jours de traitement. (A) et (B) traitements avec 0, 5, 10 ou 20 μM de nitrate de Cd. (C) et (D) Traitements +/- 20 μM de nitrate de Cd en présence de 0,5, 1 ou 1,5 mM de Ca. La dernière concentration de Ca est la concentration présente dans le $\frac{1}{2}$ MS. n = 20 plantules. Différence statistique par rapport à la valeur du contrôle *Col0* dans la même condition déterminée par un test de Dunnett (pvalue < * : 0,05, ** : 0,005, *** : 0,0005).

4. Caractérisation de la méthyltransférase SBS2

a) Validation de la sensibilité au Cd associée à la mutation du gène *SBS2*

Le deuxième mutant que nous avons identifié par criblage est le mutant *sbs2* pour lequel la croissance racinaire est plus sensible à la présence de Cd que le sauvage Col0 (Figure 64). Pour confirmer cette sensibilité, nous avons conduit la même expérience d'effet dose que pour le mutant *camkmt1*. Que ce soit au niveau des longueurs racinaires (Figure 66A) ou de la biomasse des plantules (Figure 66B), le mutant *sbs2* est plus sensible que le sauvage dès 5 μM de Cd.

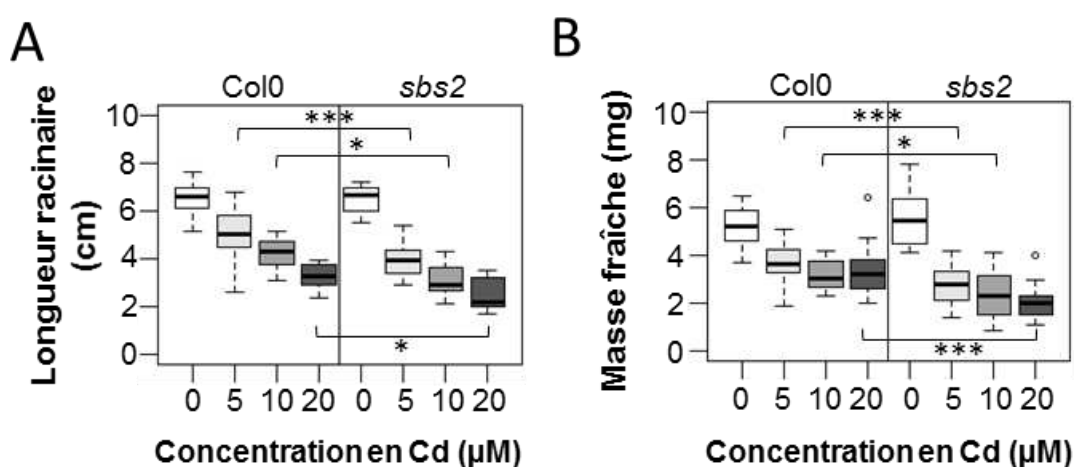


Figure 66. Tolérance au Cd du mutant *sbs2*. Des graines d'*A. thaliana* écotype Col0 sauvage et du mutant *sbs2* ont été mises à germer en milieu gélosé $\frac{1}{2}$ MS, agar 0,8% pendant 4 jours. Les plantules ont ensuite été transférées sur milieu contrôle $\frac{1}{2}$ MS +/- 5, 10 ou 20 μM de nitrate de Cd. Les longueurs racinaires primaires (A) et les biomasses (B) ont été mesurées sur milieu 8 jours de traitement. n = 20 plantules. Différence statistique par rapport à la valeur du contrôle Col0 dans la même condition déterminée par un test de Dunnett (pvalue < * : 0,05, *** : 0,0005).

Afin de vérifier que l'inactivation du gène *SBS2* est directement responsable du phénotype du mutant *sbs2*, nous avons obtenu un deuxième mutant que nous avons appelé *sbs2b* (lignée SALK_037552). La croissance racinaire de ce mutant a été comparée à celle du sauvage Col0 sur un milieu gélosé $\frac{1}{2}$ MS contenant 20 μM de nitrate de Cd. Ce deuxième mutant est également plus sensible à une dose de 20 μM de Cd (Figure 67) et confirme que la protéine SBS2 est impliquée dans la réponse du système racinaire à un stress induit par le Cd.

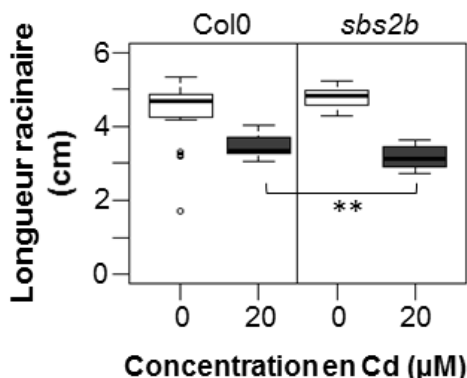


Figure 67. Tolérance au Cd du mutant *sbs2b*. Des graines d'*A. thaliana* écotype Col0 sauvage et du mutant *sbs2b* ont été mise à germer en milieu gélosé ½ MS, agar 0,8% pendant 4 jours. Les plantules ont ensuite été transférées sur milieu contrôle ½ MS +/- 20 µM de nitrate de Cd. Les longueurs racinaires primaires ont été mesurées sur milieu 8 jours de traitement. n = 20 plantules. Différence statistique par rapport à la valeur du contrôle Col0 dans la même condition déterminée par un test de Dunnett (pvalue < ** : 0,005).

Les seules informations disponibles dans la littérature et les bases de données d'*A. thaliana* sur le gène *SBS2* sont la prédiction des transcrits alternatifs produits à partir du gène. *SBS2* serait exprimé sous la forme de 6 transcrits alternatifs présentant une extrémité 5' commune et des variations dans l'extrémité 3' suite à des évènements d'épissages alternatifs (*Arabidopsis.org*, Figure 68).

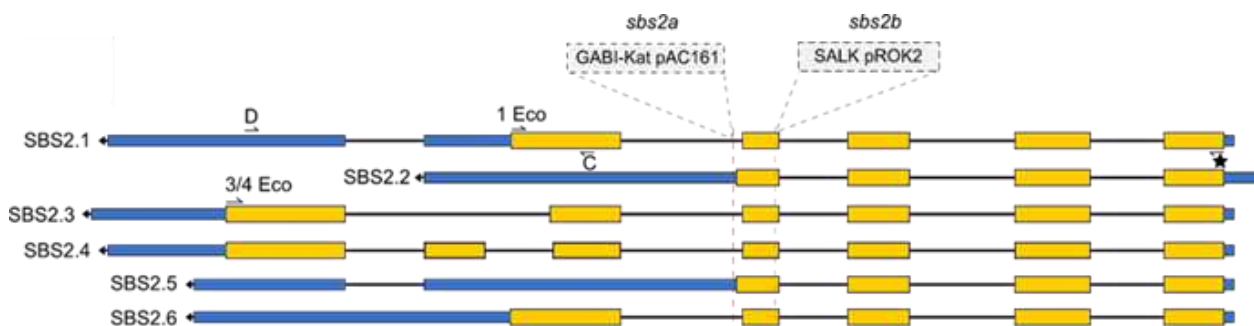


Figure 68. Organisation du gène *SBS2*. Les différents transcrits alternatifs du gène *SBS2* sont présentés ainsi que les emplacements des 2 insertions de T-DNA liées aux mutants *sbs2* et *sbs2b* (pointillés rouges). Les fines lignes noires représentent les régions non traduites. Les boîtes jaunes représentent les exons et les boîtes bleues les régions 5' et 3' non codantes.

Nous avons vérifié que les différents transcrits du gène *SBS2* ne sont pas exprimés dans les 2 mutants *sbs2*. Les ARN ont été extraits de plantules de Col0 et des 2 mutants âgées de 7 jours. Après retro-transcription et amplification des transcrits *SBS2* en utilisant des primers communs aux différents transcrits alternatifs (* et D, Figure 68) les produits de PCR ont été analysés en gel d'agarose. On retrouve 2 à 3 transcrits principaux chez le sauvage Col0 tandis qu'aucun transcrit n'a été observé chez les 2 mutants (Figure 69). Ce résultat confirme que le gène *SBS2* est bien invalidé chez les mutants *sbs2* et *sbs2b*.

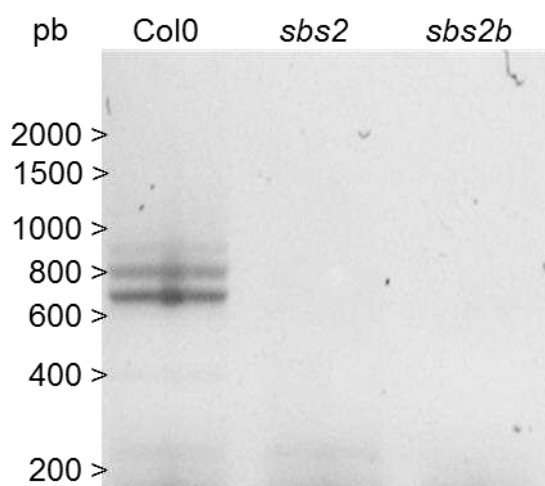


Figure 69. Amplification des transcrits *SBS2* chez le sauvage Col0 et les lignées mutantes *sbs2* et *sbs2b*. Les ARN ont été extraits de plantules d'*Arabidopsis thaliana* écotype Col0 et des lignées mutantes *sbs2* et *sbs2b* cultivées en hydroponie pendant 7 jours. Après retro-transcription et amplification par PCR avec les amorces A et D, communes aux différents transcrits alternatifs (Figure 68, cf. Matériels et Méthodes), les produits PCR ont migré en gel d'agarose.

b) Caractérisation du mutant *sbs2*

Nous avons confirmé que la protéine SBS2 était impliquée dans la réponse du système racinaire à un traitement au Cd. Pour vérifier si cette observation s'applique également à l'appareil foliaire, nous avons analysé des plantes de 4 semaines d'*A. thaliana* sauvages écotype Col0 et du mutant *sbs2* ayant poussé en hydroponie (Figure 70). Les plantes ont été traitées avec 0, 0,2, 1 ou 5 μM de sulfate de Cd. Après 7 jours de traitement, les surfaces foliaires ont été mesurées. Les rosettes des mutants *sbs2* sont significativement plus petites que celles de la lignée sauvage Col0 lors d'un stress induit par 0,2 μM de sulfate de Cd (Figure 70B). Lors de la récolte des appareils foliaires, nous avons remarqué qu'à la concentration de 5 μM de Cd les jeunes feuilles du mutant semblaient plus chlorotiques que celles du sauvage. Afin de quantifier cette observation nous avons dosé les chlorophylles. Ces mesures ont été effectuées par spectrophotométrie dans les jeunes feuilles du mutant et du sauvage après extraction des pigments chlorophylliens au N,N-diméthylformamide. Après 9 jours de traitement avec 5 μM de Cd, les résultats ont effectivement montré que les jeunes feuilles du mutant *sbs2* présentaient moins de chlorophylles que celles du sauvage (Figure 70C). La chlorose est généralement corrélée à une baisse de l'efficacité photosynthétique (Xue *et al.* 2013). Pour le confirmer, nous avons mesuré le transfert d'électrons (ETR) dans les jeunes feuilles des 2 lignées après 7 jours de traitement. L'ETR du mutant *sbs2* est significativement plus faible que celui des jeunes feuilles de la lignée sauvage en condition contrôle et à 0,2 μM de Cd. Dans ces conditions les mesures d'ETR ne sont donc pas corrélées aux quantités de

chlorophylles. Ce dernier résultat a été observé dans plusieurs expériences indépendantes et nous n'avons pas trouvé d'explication à ce phénomène.

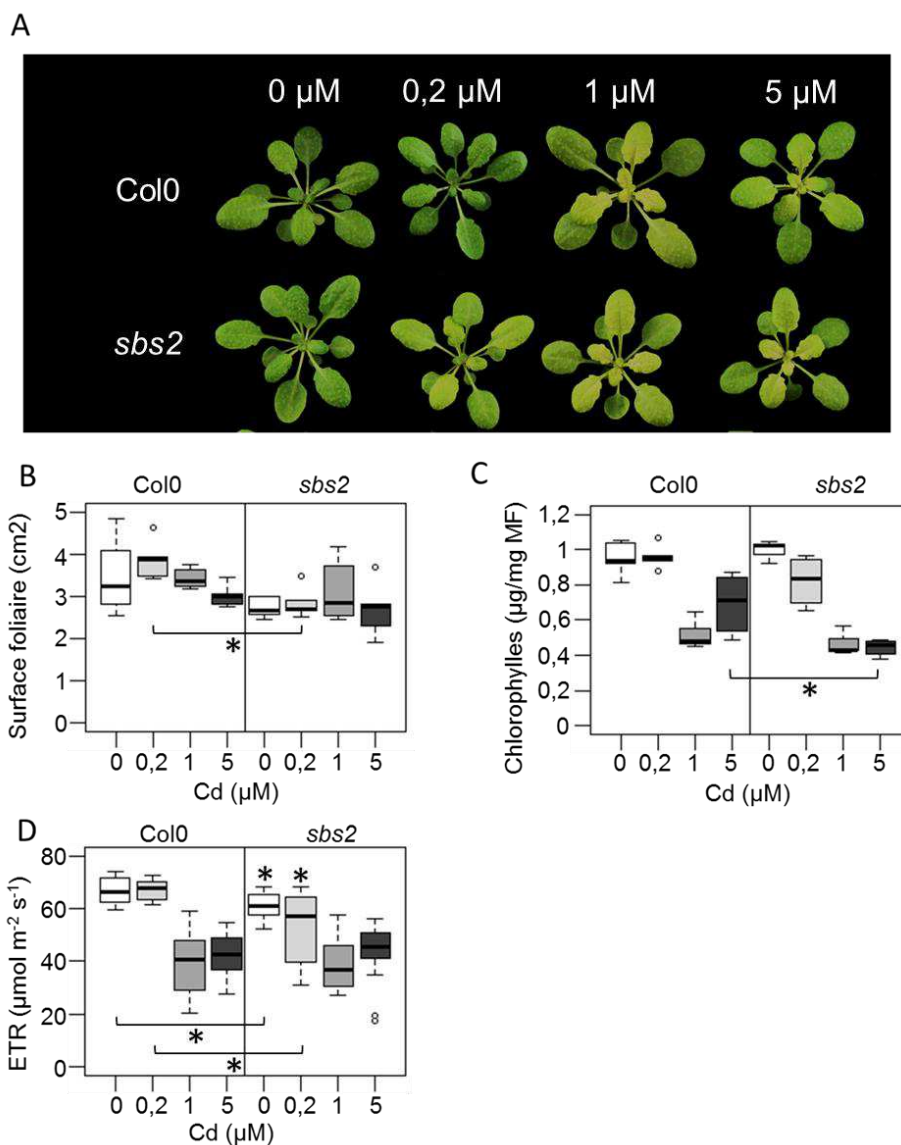


Figure 70. Effets du cadmium sur le système aérien du mutant *sbs2*. (A) Montage photographique des plantes d'*A. thaliana* sauvage Col0 et du mutant *sbs2* âgées de 4 semaines en hydroponie après 7 jours de traitement +/- 5 µM de Cd. (B) Mesures des surfaces foliaires (cm²) après 7 jours de traitement. n = 5 individus. (C) Quantification du contenu en chlorophylles A et B (µg/mg de masse fraîche) après extraction au N,N-diméthylformamide et dosage au spectrophotomètre. n = 5 jeunes feuilles sur 5 individus. (D) Mesures du taux de transfert d'électrons de la chaîne photosynthétique sur des plantes adaptées à l'obscurité pendant 15 min. n = 3 jeunes feuilles sur 5 individus. * : Valeur statistiquement différente de la valeur contrôle (pvalue < 0,05) d'après un test de Dunnett. MF : Masse fraîche.

En fonction des conditions et du paramètre foliaire mesuré, le mutant *sbs2* peut donc avoir une sensibilité accrue au Cd par rapport à la lignée sauvage Col0. Or, une des principales adaptations mise en place par les plantes pour lutter contre la toxicité des ions Cd est la translocation du métal des racines vers les feuilles. Celui-ci est ensuite rendu non toxique par chélation, par exemple avec des phytochélatines, et stocké principalement dans la vacuole (Sarry et al. 2006). Afin de savoir si la protéine SBS2 joue un rôle dans l'accumulation et/ou la

translocation du Cd des racines vers les feuilles nous avons quantifié l'élément toxique par ICP-MS dans des plantes exposées à différentes concentrations de sulfate de Cd (Figure 71). Aucune différence significative n'a été observée entre le contenu en Cd du sauvage Col0 et du mutant *sbs2*, que ce soit au niveau des feuilles (Figure 71A) ou des racines (Figure 71B). La protéine SBS2 n'a donc pas de rôle dans l'absorption ou l'accumulation du métal toxique.

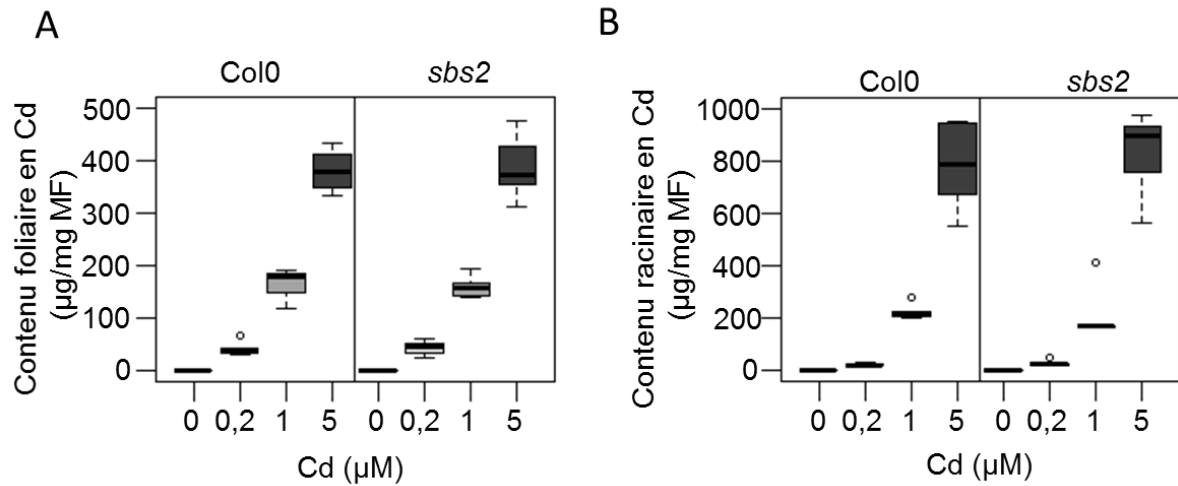


Figure 71. Accumulation de cadmium dans les feuilles et racines du mutant *sbs2*. Plantes d'*A. thaliana* sauvage Col0 et du mutant *sbs2* âgées de 4 semaines en hydroponie après 7 jours de traitement +/- 5 µM de Cd. Le contenu (A) foliaire et (B) racinaire en Cd a été quantifié par ICP-MS après minéralisation des échantillons à l'acide nitrique. Systèmes racinaires ou foliaires issus de n = 6 plantes individuelles sur 2 expériences indépendantes.

c) Caractérisation de la protéine SBS2

Les 6 transcrits du gène *SBS2* (Figure 69) codent pour 4 protéines prédites, SBS2.1 à SBS2.4, qui partagent la même extrémité N-terminale mais diffèrent par leurs extrémités C-terminales. La structure tridimensionnelle de ces 4 protéines a été modélisée à l'aide du serveur Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) à partir de la structure de la protéine méthyltransferase-like protein 21C (METTL21C) cristallisée par Hong *et al.* (2013) (Figure 83). La fonction de cette enzyme n'a encore jamais été caractérisée mais elle présente la structure typique des PKMT de type SBS avec 7 feuillets beta. Les modèles 3D suggèrent que la protéine la plus courte SBS2.2 (12,3 kDa, Figure 83C) n'a pas le site actif prédit complet qui lui permettrait de lier le donneur de méthyle AdoMet. SBS2.1 (17,7 kDa, Figure 83B) est prédite pour posséder le site actif mais pas les 7 feuillets bêta caractéristiques de cette famille de PKMT. Au contraire, les protéines SBS2.3 (21,6 kDa, Figure 83D) et SBS2.4 (24,7 kDa, Figure 83E) qui contiennent à la fois le site actif et les 7 feuillets bêta pourraient être des PKMT fonctionnelles.

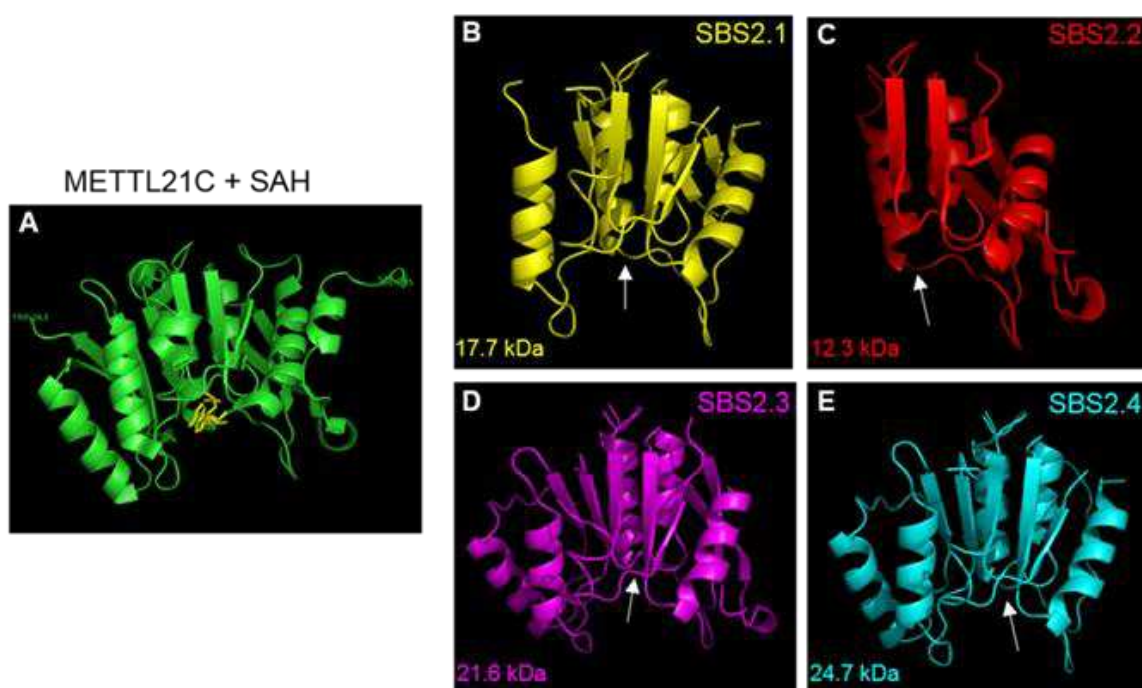


Figure 72. Modèles tridimensionnels de l'organisation de la protéine SBS2. Les 4 protéines SBS2 prédites ont été modélisées en utilisant le serveur Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). La protéine humaine méthyltransferase-like protein 21C (METTL21C) a été utilisée comme référence. (A) Structure 3D de la protéine humaine METTL21C cristallisée avec le produit de réaction *S*-adénosyl-L-homocystéine (en jaune) par Hong *et al.* (2013). (B-E) Modèles 3D des différentes protéines SBS2. Le site actif putatif est indiqué par une flèche blanche. Les masses moléculaires sont indiquées en kilo Dalton (kDa).

Pour aller plus loin et étudier la protéine SBS2 dans des plantes exposées à des stress induits par des ETM, nous avons produit un anticorps polyclonal dirigé contre l'isoforme SBS2.2. Pour ceci nous avons exprimé la protéine recombinante SBS2.2 dans *E. coli*. L'ADN codant cette isoforme a été inséré dans le vecteur pET28 afin que la protéine produite possède une étiquette de 6-His en C-terminal. Ce vecteur a ensuite été inséré dans la souche *E. coli* Rosetta (Figure 73A). Après induction de la production, la protéine a été extraite et purifiée sur colonne de Ni-Sepharose (fraction éluee à 250 mM, Figure 73B) et enfin purifiée sur gel. L'anticorps a ensuite été produit en inoculant la protéine chez un lapin (Covalab, Villeurbanne).

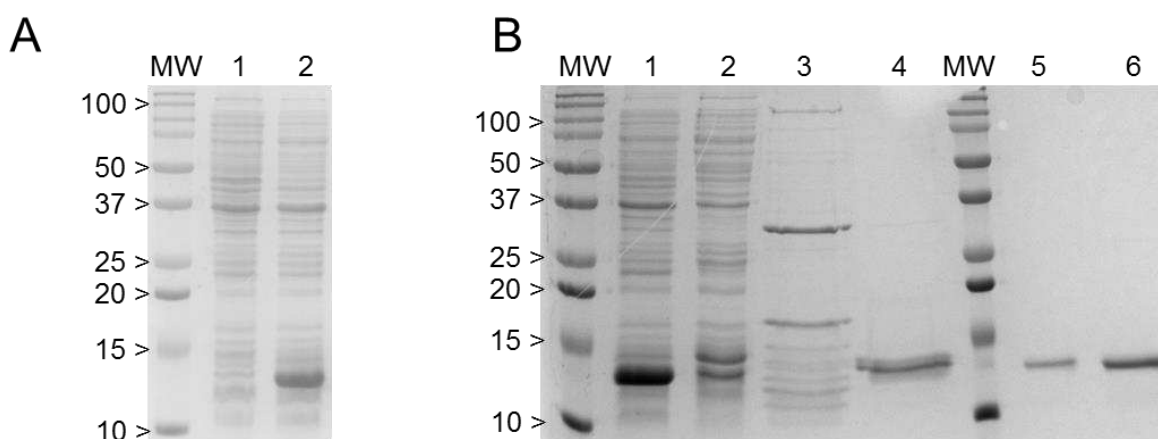


Figure 73. Production bactérienne et purification de la protéine recombinante SBS2.2. La protéine recombinante SBS2.2 a été produite par la bactérie *E. coli* Rosetta après induction à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 18°C et a été purifiée de l'extrait protéique bactérien total sur colonne de Ni-Sepharose et éluee avec un gradient d'imidazole : 10 mM, 30 mM, 50 mM et 250 mM. (A) Les extraits protéiques bactériens totaux et (B) les différentes fractions de la purification ont été résolues par électrophorèse en gel de polyacrylamide 15% SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie. MW : Masses moléculaires en kDa. (A) 1 : extrait bactérien non induit. 2 : extrait bactérien induit à l'IPTG. Trente μ g de protéines (B) 1 : extrait bactérien induit à l'IPTG, 30 μ g de protéines. 2 : Run-off colonne de Ni-Sepharose, 30 μ g de protéines. 3 : élution à 10 mM d'imidazole, 10 μ g de protéines. 4 : élution à 30 mM d'imidazole, 10 μ g de protéines. 5 : élution à 50 mM d'imidazole, 2 μ g de protéines. 6 : élution à 250 mM d'imidazole, 5 μ g de protéines.

Nous avons ensuite testé la spécificité des anticorps contre la protéine recombinante SBS2.2 purifiée et des extraits protéiques solubles foliaires et racinaires d'*A. thaliana* écotype sauvage Col0 et du mutant *sbs2*. Bien que l'anticorps soit capable de reconnaître moins de 10 ng de protéine SBS2 recombinante (Figure 74A) aucun signal n'est observé sur des extraits protéiques solubles de feuilles ou de racines (Figure 74B). Ce résultat implique que la protéine SBS2 est très peu abondante dans ces organes. Il est possible que l'expression du gène SBS2 soit restreinte à certains stades de développement et/ou à certains tissus très particuliers, comme c'est le cas pour le gène *CAMKMT1* dont l'expression dans les racines est restreinte à l'apex racinaire (Banerjee *et al.* 2013).

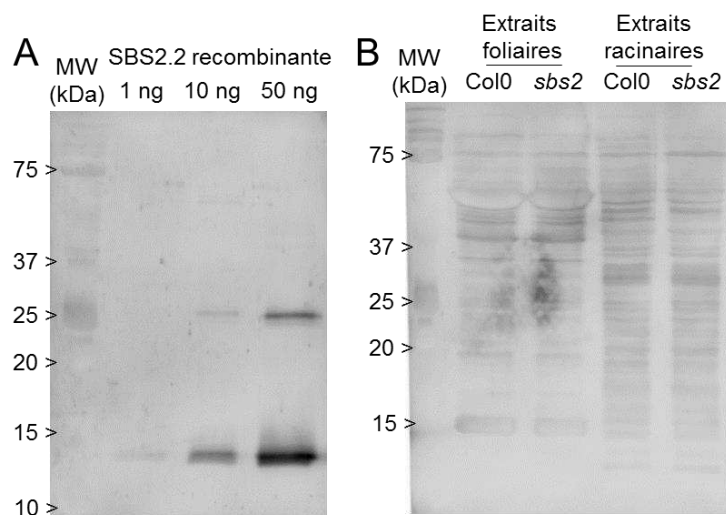


Figure 74. Test de l'anticorps dirigé contre la protéine SBS2.2. L'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine SBS2.2 a été testé sur (A) 1, 10 et 50 ng de la protéine SBS2.2 recombinante et (B) sur 30 µg de protéines solubles extraites de feuilles et de racines de plantes de 4 semaines cultivées en hydroponie d'*Arabidopsis thaliana* écotype sauvage Col0 et du mutant *sbs2*. Les extraits protéiques ont été résolus par électrophorèse en gel de polyacrylamide 15 % SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose pour immunoblot. Dilution de l'anticorps 1 : 1000. MW : Masses moléculaires en kDa.

D'autre part, pour étudier l'activité méthyltransférase de la protéine SBS2, nous avons choisi de produire la protéine recombinante correspondant à la forme la plus longue SBS2.4 car elle possède à la fois le site actif prédit et les 7 feuillets beta caractéristiques des PKMT de type SBS (Figure 72E). Pour ceci l'ADN codant cette isoforme a été inséré dans le vecteur bactérien pET23a+ afin que la protéine produite possède une étiquette 6-His en N-terminal. Ce vecteur a été inséré dans la souche *E. coli* Rosetta. Après induction de la production, la protéine a été extraite et purifiée de l'extrait protéique bactérien soluble sur colonne de Ni-Sepharose (Figure 75).

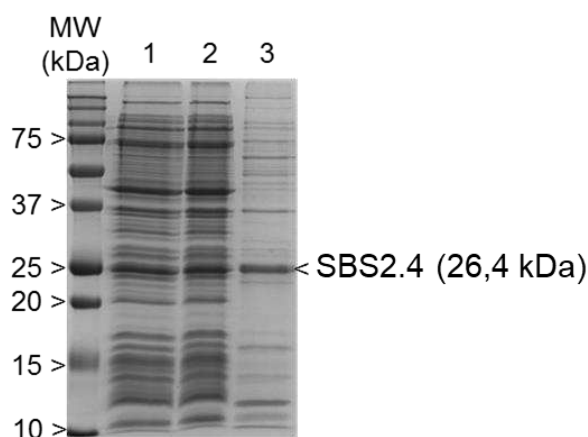


Figure 75. Production bactérienne et purification de la protéine recombinante SBS2.4. La protéine recombinante SBS2.4 a été produite par la bactérie *E. coli* Rosetta après induction à l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 18°C. La protéine a été purifiée de l'extrait protéique bactérien soluble sur colonne de Ni-Sepharose et éluée avec un gradient d'imidazole. Les extraits protéiques ont été résolus par électrophorèse sur gel d'acrylamide 15% SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie. 1 : extrait bactérien total induit à l'IPTG. 2 : extrait bactérien soluble induit à l'IPTG. 3 : élution à 250 mM d'imidazole MW : Masses moléculaires en kDa. Trente µg de protéines par puits.

Au vu des nombreux contaminants présents dans l'extrait purifié de SBS2.4, d'autres étapes de purification, telles qu'une étape de gel filtration ou une colonne échangeuse d'ions, seront nécessaires avant d'effectuer des tests de méthylation similaires à ceux décrits pour la méthyltransférase PPKMT1.

5. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence que la méthylation des lysines est un phénomène participant à la réponse des plantes aux stress métalliques. En effet, en utilisant la technique du Western blot et la spectrométrie de masse MS/MS nous avons mis en évidence que les patterns de méthylation des lysines pouvaient être influencés par des stress induits par des ETM. De plus, grâce à des analyses transcriptomiques nous avons montré que l'expression de certaines PKMT était modulée par un stress induit par le Cd ou par l'U. Finalement, un criblage de mutants d'insertion a révélé que 9 PKMT sur les 23 analysées étaient impliquées dans la tolérance au Cd.

Même si les effets de la mutation du gène *SBS2* sont encore peu clairs, la protéine est essentielle à la tolérance d'*A. thaliana* à un stress induit par le Cd et ce particulièrement au niveau du développement racinaire. Afin de compléter l'approche menée avec les mutants *sbs2* et *sbs2b*, nous avons créé des lignées *sbs2* exprimant le gène *SBS2* sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (*p35S::SBS2*). L'étude de la tolérance de ces lignées au Cd permettra de valider définitivement le rôle de *SBS2*. La construction *p35S::SBS2* a également été introduite dans le sauvage Col0 afin d'étudier les effets de la surexpression du gène *SBS2*. Ces plantes sont actuellement reproduites afin d'obtenir des lignées portant l'insertion à l'état homozygote.

La protéine SBS2.4 recombinante a été produite et purifiée. Malheureusement, l'étape de purification sur colonne de Ni-Sepharose n'a pas été suffisamment résolutive pour réduire les contaminants protéiques à un niveau où un test de méthylation est envisageable. L'amélioration des conditions d'expression de la protéine dans les bactéries Rosetta et des étapes de purification seront alors nécessaires afin d'essayer d'identifier le substrat de la méthyltransférase *SBS2*.

Malgré la spécificité de l'anticorps anti *SBS2* produit dans cette étude, il a été impossible de détecter la protéine dans des extraits solubles de racines ou de feuilles. Il est vraisemblable que la protéine soit peu abondante et exprimée seulement dans certains tissus. La mutation du gène *SBS2* a pour conséquence une croissance racinaire plus faible dans un milieu contenant du Cd. Il serait alors intéressant de reprendre l'approche de l'étude menée par Banerjee *et al.* (2013) qui, grâce à l'utilisation de plantes exprimant la construction

pCAMKMT1::GUS, ont montré que l'expression de *CAMKMT1* était restreinte, entre autres, à l'apex racinaire.

Pour aller plus loin, la tolérance du mutant *sbs2* à d'autres stress métalliques, voire à d'autres stress abiotiques ou biotiques pourrait être testée. Ceci permettrait de déterminer si la protéine est uniquement impliquée dans la réponse d'*A. thaliana* à un stress induit par le Cd ou si ce rôle peut être généralisé à un ensemble de stress environnementaux.

La majeure partie de l'étude de la protéine SBS2 a été conduite par Manon Sarthou durant son stage de Master 2 (janvier à juin 2018). Grâce à l'obtention d'un financement de thèse dans l'équipe, Manon Sarthou continuera le travail de caractérisation de la protéine SBS2.

C. Rôle de la phosphorylation des protéines

1. Étude des profils de phosphorylation des protéines

Afin d'identifier de nouveaux acteurs de la réponse et de l'adaptation des plantes aux ETM nous nous sommes intéressés aux phénomènes de phosphorylation des protéines. Cette modification post-traductionnelle s'inscrit dans des phénomènes très dynamiques. En effet, la phosphorylation des protéines participe aux cascades de signalisation liées à la réponse aux stress (pour revue, voir Cristina *et al.* 2010). Nous avons tout d'abord conduit une étude préliminaire consistant à observer les profils protéiques liés à la phosphorylation par des Western blots.

À notre connaissance, les phosphoprotéomes d'*A. thaliana* en réponse à un stress induit par le Cd, le Zn ou l'U n'ont jamais été caractérisés. Néanmoins, un grand nombre d'études ponctuelles montrent l'implication de certaines protéines kinases et protéines phosphatases dans la réponse des plantes à un stress induit par le Cd (Kulik *et al.* 2012 ; Zhu *et al.* 2016 ; Smeets *et al.* 2013) ou le Zn (Pavlíková *et al.* 2008). Nous avons donc souhaité étudier les profils d'expression des protéines phosphorylées dans les plantes du genre *Arabidopsis* exposées à ces 3 métaux. Pour cela nous avons cultivé, dans un milieu contrôle (CM), des plantes des 3 espèces en conditions hydroponiques pendant 5 semaines. Ces plantes ont ensuite été transférées dans des milieux contenant 5 µM de nitrate de Cd ou 150 µM de sulfate de Zn ainsi qu'en milieu carencé en phosphate (LP, 25 µM au lieu de 250 µM de Pi) en présence ou en absence 50 µM de nitrate d'uranyle. Les plantes ont été récoltées aux temps 0,5, 1, 24, 48 heures et 9 jours après traitement. Ce grand éventail de durées de traitement avec ces différents ETM nous permet d'avoir accès à des données correspondant à des phénomènes de réponse rapide aux stress (moins de 48 heures) ou à des phénomènes plus longs d'acclimatation (9 jours).

Nous avons ensuite extrait les fractions protéiques solubles de feuilles et de racines des 3 espèces correspondant à ces différentes conditions de traitement et de durée d'exposition. Il est important de noter que les conditions d'extraction utilisées permettent de limiter l'extraction de protéines histones (cf. matériel et méthodes).

Les phosphorylations des protéines végétales sont portées à 85 % par des sérines, à 10 % par des thréonines et à 5 % par des tyrosines (Chapitre I-D3). Nous disposons d'anticorps anti-thréonine phosphorylée (Cell Signaling Technology, référence : 9381) et anti-sérine phosphorylée (Invitrogen, référence : 61-8100). Nous avons également utilisé le Phostag™ (Fujifilm Wako Chemical), une molécule qui reconnaît spécifiquement les sites phosphorylés, quel que soit le résidu modifié. Nos expériences mettent en évidence que les anticorps anti-sérine phosphorylée ne permettent pas d'obtenir une résolution satisfaisante pour notre étude.

En effet, le nombre de protéines portant des sérines phosphorylées, la qualité des anticorps et la complexité d'un extrait protéique soluble produisent un fort signal ne permettant pas l'observation de différences par Western blot (données non montrées). Nous avons donc conduit notre étude uniquement avec des anticorps anti-thréonine phosphorylée et le PhostagTM (Figure 76).

L'utilisation de l'anticorps dirigé contre les thréonines phosphorylées met en évidence un grand nombre de protéines marquées, dont plusieurs sont différenciellement phosphorylées entre 15 et 25 kDa (Figure 76A). Ce résultat est en accord avec les milliers de sites phosphorylés sur des thréonines rapportés chez *A. thaliana* par la base de données Phosphat (<http://phosphat.uni-hohenheim.de>).

L'outil de détection PhostagTM a mis en évidence des patterns très riches qui présentent des signaux bien définis. Malheureusement, aucune différence n'a été observée entre des plantes d'*A. thaliana* traitées pendant 9 jours avec du Cd et des plantes non traitées (Figure 76B). Le PhostagTM consiste en une molécule portant une fonction biotine qui permet sa révélation par des peroxydases couplées à la streptavidine. Nous avons réalisé un Western blot de contrôle pour détecter les protéines biotinylées dans les extraits protéiques en incubant la membrane dans une solution contenant de la streptavidine (Figure 76C). Nous nous sommes alors rendus compte que 2 signaux identiques étaient retrouvés sur les 2 membranes et ce, quel que soit le traitement (Figure 76C et B). La protéine à 74 kDa correspond à la méthylcrotonoyl coA carboxylase (MCCase) qui est biotinylée et qui participe au catabolisme de la leucine (Aubert *et al.* 1996). L'autre protéine biotinylée est la Biotin Carboxylase Carrier Protein (BCCP), sous unité de l'acétyl coA carboxylase qui joue un rôle dans la synthèse des acides gras (Alban *et al.* 1995). Ce dernier résultat remet en question la capacité du PhostagTM à ne détecter que les protéines phosphorylées puisque les principaux signaux observés sont des protéines biotinylées.

Nous avons cependant souhaité utiliser le PhostagTM sur des échantillons protéiques solubles de feuilles extraites de plantes d'*A. thaliana* traitées avec du Cd pour un temps à 48 heures. Tout en ayant conscience des limitations liées à cet outil, cette expérience pourrait nous permettre d'identifier la meilleure fenêtre d'étude pour l'analyse du phosphoprotéome en réponse à un stress induit par le Cd. Ces dernières analyses n'ont pas permis d'observer de profils de phosphorylation différents en réponse au Cd et ceci quel que soit le temps d'exposition (données non présentées).

Nous avons alors décidé de ne pas poursuivre l'aspect phosphoprotéome de cette étude car les outils à notre disposition se sont révélés inadaptés pour la mise en évidence de changements dans l'expression de protéines phosphorylées au cours d'un stress induit par le Cd. Ce constat rend impossible le choix de conditions d'étude (concentration/durée du stress)

pour l'étude du phosphoprotéome par spectrométrie de masse. De plus, à la suite de discussions avec des experts en protéomique et de la phosphorylation des protéines, nous avons conclu que l'identification de nouveaux acteurs spécifiques de la réponse et de l'adaptation des plantes aux ETM était peu probable. En effet, les conditions d'extraction, la durée du stress et le fort dynamisme de cette PTM influent rapidement les profils observables. L'utilisation de la spectrométrie de masse ne pourrait alors conduire qu'à l'identification de sites de phosphorylation très stables, déjà identifiés, et dont le rôle ne serait pas spécifique au métal considéré.

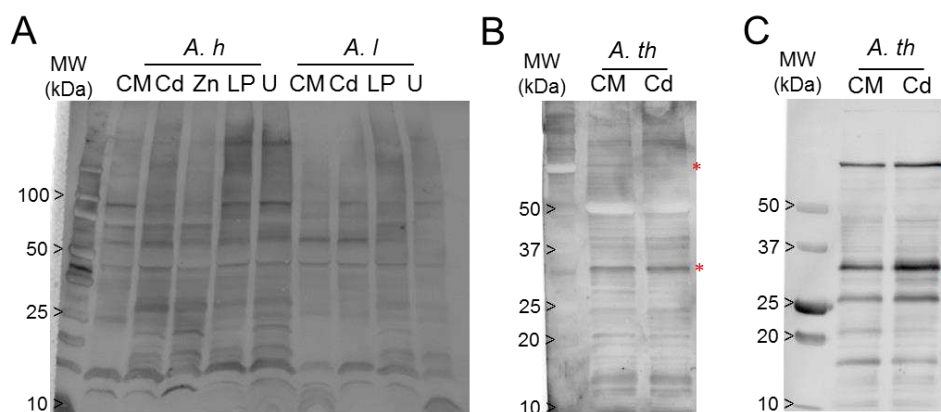


Figure 76. Etude par Western blot des protéines phosphorylées chez *Arabidopsis* lors de stress induits par différents éléments traces métalliques. (A) Les fractions protéiques foliaires solubles d'*A. lyrata* et d'*A. halleri* ont été extraites après 10 jours de traitement en conditions contrôles (CM), 5 μM de nitrate de Cd, 150 μM de sulfate de Zn et Low phosphate (25 μM Pi, LP) +/- 50 μM de nitrate d'uranyle. Ces fractions ont ensuite migré sur gel SDS-PAGE 4-20% et ont été transférées sur membrane de nitrocellulose puis analysées par Western blot avec un anticorps anti thréonine phosphorylée (Cell Signaling Technology, dilution 1 :1000). (B) et (C) Les fractions protéiques foliaires solubles d'*A. thaliana* ont été extraites après 10 jours de traitement en présence de 5 μM de nitrate de Cd en hydroponie. Ces fractions ont ensuite migré sur gel SDS-PAGE 12% et ont été transférées sur membrane de PVDF puis analysées par Western blot avec (B) du Phostag (Fujifilm Wako Chemical), une molécule spécifique des phosphorylations et (C) de la streptavidine qui reconnaît les fonctions biotine. MW : Molecular Weight. Trente μg de protéines par puits.

2. Étude de l'expression des gènes liés à la phosphorylation

Nous venons de voir que l'étude des profils de protéines phosphorylées était complexe et que nos conditions d'études ne nous permettaient pas d'identifier clairement de nouveaux acteurs de la réponse et de l'adaptation aux ETM. Nous avons donc conduit la même étude transcriptomique que celle présentée pour les PKMT et les KDM (partie A3) mais cette fois-ci avec les gènes codant pour des protéines kinases et des protéines phosphatases. Les 2 listes des gènes codant pour les 983 protéines kinases et 131 protéines phosphatases répertoriées chez *A. thaliana* ont été récupérées à partir de la base de données PhosphAt (<http://phosphat.uni-hohenheim.de>). L'expression des gènes codant ces enzymes a été étudiée en utilisant les mêmes données de transcriptomique que pour l'étude de l'expression des gènes codant des enzymes liées à la méthylation des protéines.

a) Etude de l'expression des gènes liés à la phosphorylation chez *Arabidopsis thaliana* lors de stress induits par le cadmium ou l'uranium

(1) Expression des gènes en réponse à un stress induit par l'uranium

Expression des gènes codants pour des protéines kinases

Sur les 987 gènes codant pour des protéines kinases, 141 (14 %) voient leur expression modulée en réponse à l'U. L'expression de ces gènes est modulée de façon quasi équivalente entre répression et surexpression (45 % de gènes réprimés et 55 % de gènes surexprimés). La différence majeure réside dans la différence de réponse observée entre les racines et les feuilles. En effet, 128 DEG sont retrouvés dans les racines (Figure 77) et seulement 13 dans les feuilles (données non montrées).

Nous avons souhaité réduire la liste de 128 protéines kinases qui pourraient constituer des candidats dans l'identification de nouveaux acteurs dans la réponse aux stress métalliques. Pour ceci, nous nous sommes intéressés aux gènes dont l'expression est modulée à la fois après 2, 6 et 30 heures de traitement. Sur les 128 DEG retrouvés dans les racines, seuls 21 gènes sont communs à tous les temps de traitement. Dix sont réprimés et 11 sont surexprimés. Parmi ces 21 gènes, seuls 7 DEG codent pour des protéines kinases dont la fonction est décrite dans la littérature. Les caractéristiques de ces gènes sont présentées ci-dessous et dans le Tableau 13. Les autres gènes sont présentés en Annexe II.

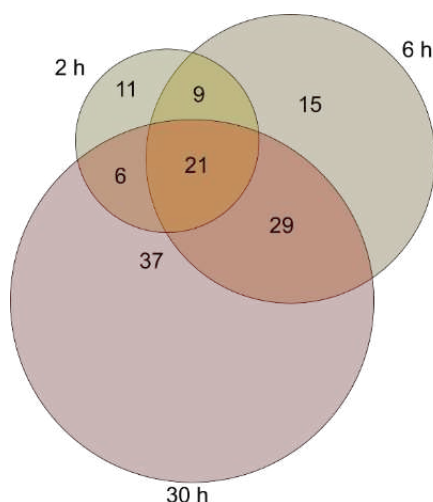


Figure 77. Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant pour des protéines kinases dont l'expression est modulée au cours du temps lors d'un stress induit par l'uranium chez *A. thaliana*. Les données ont été extraites de Doustaly *et al.* (2014). Des plantes de 7 semaines cultivées en hydroponie ont été transférées dans de l'eau +/- 50 µM de nitrate d'uranyle. Les racines et les feuilles ont été récoltées séparément pour extraction d'ARN et hybridation sur puce à ADN après 2, 6 et 30 heures de traitement. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas en condition contrôle (eau) et les 3 réplicas en condition U (eau + 50 µM U) grâce à un test de Student non-paramétrique (Konietschke *et al.* 2015, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression est surexprimée ou réprimée plus de 2 fois ont été sélectionnés ($\log_2 > 1$ ou < -1).

Le gène *PID* code pour une protéine kinase impliquée dans le transport de l'auxine (Friml *et al.* 2004). Lorsque le gène est muté, le transporteur d'auxine PIN2 subit, au niveau des racines, un changement de polarité cellulaire de la position apicale à basale (Friml *et al.* 2004). Au contraire, lorsque le gène est surexprimé, PIN2 passe du côté basal à apical de la cellule et la racine primaire montre un phénomène de collapsus (Friml *et al.* 2004 ; Benjamins *et al.* 2001). *PID* permet de réguler la quantité d'auxine dans les apex racinaires et donc de contrôler la croissance racinaire (Benjamins *et al.* 2001).

Le gène *OXI1* code pour une protéine kinase ayant un rôle essentiel dans la signalisation du stress oxydatif (Ren *et al.* 2015) et la mort cellulaire associée (Shumbe *et al.* 2016). En effet, lorsque le gène est muté, la signalisation par un burst de ROS ne se fait pas car les cibles d'*OXI1* ne sont pas activées par phosphorylation (Rentel *et al.* 2004). D'ailleurs, l'accumulation des transcrits *OXI1* est corrélée et dépendante de l'accumulation de ROS (Priller *et al.* 2016).

Le gène *CIPK14* code pour une protéine kinase jouant un rôle dans la réponse de la plante au stress salin et à l'ABA. Lorsque le gène est muté, les plantes sont plus sensibles aux effets inhibiteurs de l'ABA et du chlorure de sodium provoquant une baisse d'élongation racinaire (Qin *et al.* 2008). La protéine est liée à la signalisation du Ca intracellulaire par le biais de la voie Salt Over Sensitive (SOS), une voie importante dans la réponse au stress salin. En effet, cette voie constituée de plusieurs acteurs et *CIPK14* phosphoryle SOS3-Like, un senseur de Ca, provoquant l'inactivation des pompes à protons nécessaire à l'action des transporteurs antiports H⁺/Na⁺ (Lin *et al.* 2014).

Le gène *STY46* code pour une protéine kinase qui phosphoryle des protéines impliquées dans la différenciation du chloroplaste (Martin *et al.* 2006 ; Lamberti *et al.* 2011). Nous n'avons pas d'explication quant à son rôle dans la réponse des racines à un stress induit par l'U.

Le gène *PSY1R* code pour le récepteur kinase de la protéine PSY1 qui induit l'expansion et la différenciation cellulaire au niveau de la zone d'élongation racinaire. L'action de PSY1 est dépendante de son récepteur PSY1R qui déclenche une cascade de signalisation menant à l'élongation cellulaire (Mahmood *et al.* 2014). Cette régulation semble être possible par l'interaction entre PSY1R et AHA, une pompe à protons nécessaire à l'acidification de la paroi et à l'expansion cellulaire (Fuglsang *et al.* 2014).

Le gène *WAK4* code pour une protéine kinase de la paroi qui possède un rôle dans l'architecture et la croissance racinaire. Lorsque le gène est muté, le développement des racines latérales et l'élongation cellulaire sont arrêtés (Lally *et al.* 2001).

Le gène *IOS1* code pour une protéine kinase essentielle dans les processus de résistance aux pathogènes (C.-W. Chen *et al.* 2014 ; Yeh *et al.* 2016 ; Hok *et al.* 2014). Le

mutant est hypersensible à l'ABA mais présente une élongation racinaire plus importante que le sauvage (Hok *et al.* 2014).

Pour résumer, l'U induit, entre autres, l'expression de 3 protéines kinases impliquées dans l'inhibition de la croissance racinaire et la mort cellulaire. L'U entraîne la répression de l'expression de 2 gènes impliqués dans l'expansion cellulaire et la régulation négative de l'ABA qui inhibe la croissance racinaire (Thole *et al.* 2014). L'U provoque donc une réponse transcriptionnelle des protéines kinases qui tendent à inhiber la croissance du système racinaire, un effet connu de ce métal (Misson *et al.* 2009). Les conséquences physiologiques et cellulaire de l'U sur le développement du système racinaire sont étudiées en détails dans le chapitre IV.

Tableau 13. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est connue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par l'uranium chez *A. thaliana*. Les gènes différentiellement exprimés codant pour des protéines kinases dont la fonction biologique est connue dans la littérature sont compilés. Les données ont été extraites de Doustaly *et al.* (2014). L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas en condition contrôle (eau) et les trois réplicas en condition U (eau + 50 μ M U) grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était surexprimée ou réprimée plus 2 fois ont été sélectionnés (\log_2 de 1 ou -1). L'expression est exprimée en base \log_2 .

Identifiant	Gène	Log ₂ U/CM			Fonction biologique
		2 h	6 h	30 h	
AT2G34650	<i>PINOID (PID)</i>	1,23	2,02	1,53	Inversion de la polarité cellulaire du transporteur d'auxine PIN2
AT3G25250	<i>OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1 (OXI1)</i>	1,07	1,97	1,67	Signalisation du stress oxydatif Mort cellulaire
AT5G01820	<i>CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 14 (CIPK14)</i>	1,13	1,01	1,18	Signalisation du Ca Réponse à l'ABA Réponse au stress salin
AT4G38470	<i>SERINE/THREONINE TYROSINE KINASE 46 (STY46)</i>	1,07	1,11	1,18	Différentiation du chloroplaste
AT1G72300	<i>PSY1 RECEPTOR (PSY1R)</i>	-1,08	-1,06	-1,18	Prolifération et expansion cellulaire
AT1G21210	<i>WALL ASSOCIATED KINASE (WAK4)</i>	-1,27	-1,05	-1,03	Senseur de la paroi Élongation cellulaire Développement des racines latérales
AT1G51800	<i>IMPAIRED OOMYCETE SUSCEPTIBILITY 1 (IOS1)</i>	-1,7	-1,18	-1,89	Réponse aux stress biotiques Régule négativement la signalisation de l'ABA

Treize DEG sont retrouvés dans les feuilles (données non présentées). Aucun gène n'est différentiellement exprimé avant 6 heures de traitement et seulement 1 DEG est retrouvé entre 6 et 30 heures de traitement. Ce dernier code pour une protéine kinase putative dont la fonction et le substrat sont inconnus. Après 30 heures de stress induit par l'U, 12 gènes codant pour des protéines kinases voient leur expression modulée (9 sont surexprimés et 3 réprimés). Cette observation est compatible avec le fait que peu d'U est transloqué des racines aux feuilles (Laurette *et al.* 2012a ; Laurette *et al.* 2012b) et au temps de transduction nécessaire à la signalisation du stress des racines vers les feuilles (Shabala *et al.* 2016). Les 12 protéines kinases codées par ces gènes n'ont pas de fonctions et/ou de substrats connus.

Expression des gènes codants pour des protéines phosphatases

Sur les 131 gènes codant des protéines phosphatases, 21 (16%) voient leur expression modulée en réponse à l'U. Là encore, la différence de réponse majeure est celle retrouvée entre les racines et les feuilles. En effet, on retrouve 16 DEG dans les racines et seulement 5 dans les feuilles. Comme dans le cas de l'étude de l'expression des gènes codant pour des protéines kinases, nous nous sommes intéressés aux gènes dont l'expression est modulée aux 3 temps d'exposition (Figure 78), condition seulement remplie dans les racines. Sur les 16 DEG retrouvés dans les racines, seuls 2 gènes sont communs à tous les temps de traitement. Ces 2 gènes codent pour des protéines phosphatases de type Protein Phosphatase 2C. L'expression d'AT3G55050 est réprimée tandis que celle d'AT3G62260 est surexprimée. Cette famille de protéines phosphatases est connue pour être impliquée dans la signalisation des stress (Schweighofer *et al.* 2004).

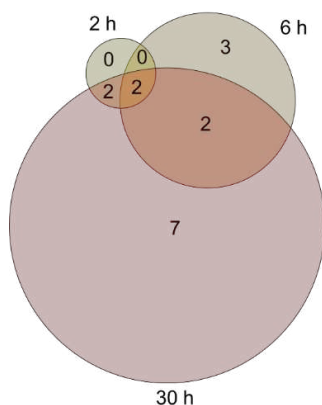


Figure 78. Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant pour des protéines phosphatases dont l'expression est modulée au cours du temps lors d'un stress induit par l'uranium chez *A. thaliana*. Les données ont été extraites de Doustaly *et al.* (2014). Des plantes de 7 semaines cultivées en hydroponie ont été transférées dans de l'eau +/- 50 µM de nitrate d'uranyle. Les racines et les feuilles ont été récoltées séparément pour extraction d'ARN et hybridation sur puce à ADN après 2, 6 et 30 heures de traitements. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 répliques en condition contrôle (eau) et les trois répliques en condition U (eau + 50 µM U) grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 2 fois ont été sélectionnés ($\log_2 > 1$ ou < -1).

(2) Expression des gènes en réponse à un stress induit par le cadmium

Les données de la réponse transcriptionnelle d'*A. thaliana* au Cd ont été traitées de façon similaire à l'analyse de l'expression des gènes en réponse à un stress induit par L'U.

Expression des gènes codants pour des protéines kinases

La Figure 78 montre qu'il y a peu d'homogénéité dans l'expression des gènes en réponse au Cd entre les différentes études sélectionnées, que ce soit pour l'expression des gènes codant pour des protéines kinases (Figure 79A) ou phosphatases (Figure 79B). La plupart des gènes dont l'expression est modulée sont extraits de l'étude de Li *et al.* 2010 où les plantes ont été exposées à 200 µM de Cd. Ces conditions sont drastiques pour *A. thaliana*. Par exemple, sur les 987 gènes codant pour des protéines kinases, 240 (24%) voient leur expression modulée dans cette étude. De plus, la majorité des gènes communs à plusieurs conditions expérimentales sont issus de la même publication. Ces différences sont donc plus inhérentes aux conditions expérimentales qu'au traitement par le Cd. Néanmoins, un petit nombre de gènes s'avèrent être communs entre les études. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux études de Weber *et al.* 2006 et Herbette *et al.* 2006 qui présentent des similitudes dans les concentrations de Cd utilisées et les temps d'exposition. Sur les 987 gènes codant pour des protéines kinases, 23 (2 %) sont régulés dans les 2 études (tous paramètres confondus, Figure 80). De ces DEG seulement 8 ont un rôle et/ou un substrat caractérisé dans la littérature (Tableau 14). Les autres gènes sont présentés en Annexe III.

Le gène *RIPK1* code pour une protéine kinase qui joue un rôle dans la mise en place de l'immunité innée chez les végétaux par la phosphorylation et l'activation de la protéine RIN4 (J. Liu *et al.* 2011).

Le rôle du produit du gène *PID* a été décrit précédemment car il est différentiellement exprimé en réponse à un stress induit par l'U.

Le gène *PSKR1* code pour une protéine kinase qui contrôle positivement l'action de l'hormone peptide phytosulfikine. Cette hormone contrôle, de façon Ca et calmoduline dépendante (Hartmann *et al.* 2014), l'élongation racinaire et ce principalement via le contrôle de la taille des cellules dans la zone mature (Kutschmar *et al.* 2009). Lorsque ce gène est muté, les rosettes d'*A. thaliana* sont de taille réduite (Matsubayashi, Shinohara, and Ogawa 2006).

Le gène *HLERCK* code pour une protéine kinase qui régule de façon négative la résistance aux bactéries *Pectobacterium carotovorum* (Arnaud, Desclos-Theveniau, and Zimmerli 2012) et *Pseudomonas syringae* (Desclos-Theveniau *et al.* 2012).

Le gène *CPK4* code pour une protéine kinase qui régule la transduction du signal de l'ABA en phosphorylant 2 facteurs de transcription de réponse à l'hormone (ABI1 et ABI4) mais

le rôle de la phosphorylation est inconnu (Zhu *et al.* 2007). D'autre part, cette protéine kinase participe à l'inhibition de la croissance du système racinaire en maintenant la stabilité d'ACS6, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'éthylène (Luo *et al.* 2014).

Le gène *MKK2* code pour une protéine kinase qui induit la rigidification des membranes en réponse au froid de façon Ca dépendante (Furuya *et al.* 2014). Une redondance fonctionnelle est observée avec la protéine kinase MKK2. En effet, seul le double mutant *mkk1 mkk2* présente un phénotype. Lorsque les 2 gènes sont mutés, les plantules meurent après germination. Ce phénomène semble s'expliquer par une accumulation importante d'H₂O₂ et par l'activation de la réponse immunitaire innée (M. Gao *et al.* 2008).

Le gène *ATSK12* code pour une protéine kinase qui régule la croissance via les brassinostéroïdes. Les plantes mutées pour ce gène montrent un phénotype dit « nain » (Youn *et al.* 2013).

Le gène *BSK3* code pour une protéine kinase qui joue un rôle redondant avec les protéines BSK1 à BSK8 dans la transduction du signal lié aux brassinostéroïdes. Des triples et quadruples mutations de différentes BSK produisent une baisse de croissance foliaire et une augmentation de la croissance racinaire couplées à une altération de l'expression des gènes de réponse aux brassinostéroïdes (Sreeramulu *et al.* 2013).

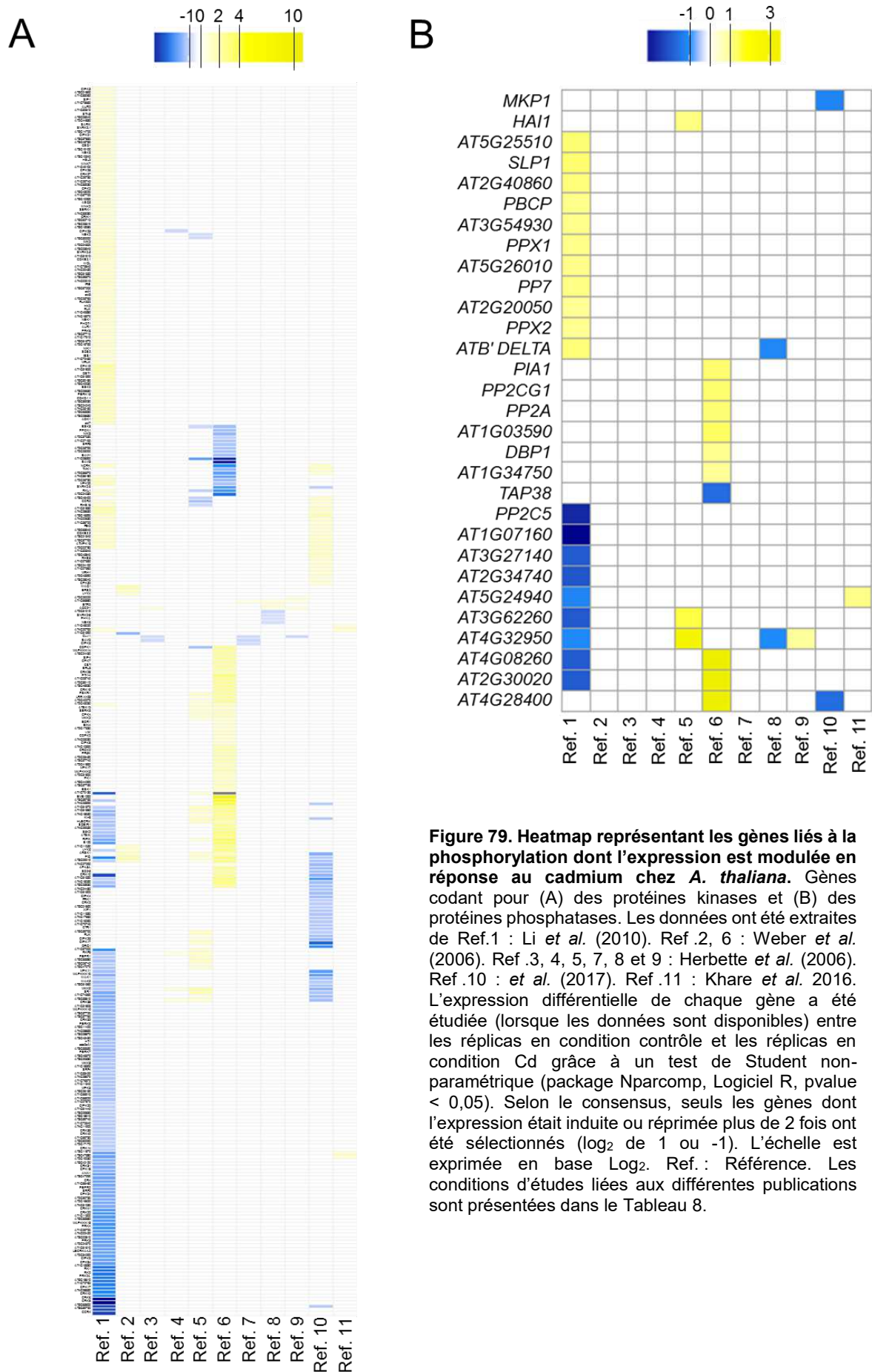


Figure 79. Heatmap représentant les gènes liés à la phosphorylation dont l'expression est modulée en réponse au cadmium chez *A. thaliana*. Gènes codant pour (A) des protéines kinases et (B) des protéines phosphatases. Les données ont été extraites de Ref.1 : Li *et al.* (2010). Ref.2, 6 : Weber *et al.* (2006). Ref.3, 4, 5, 7, 8 et 9 : Herbertte *et al.* (2006). Ref.10 : *et al.* (2017). Ref.11 : Khare *et al.* 2016. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée (lorsque les données sont disponibles) entre les répliques en condition contrôle et les répliques en condition Cd grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 2 fois ont été sélectionnés (\log_2 de 1 ou -1). L'échelle est exprimée en base \log_2 . Ref. : Référence. Les conditions d'études liées aux différentes publications sont présentées dans le Tableau 8.

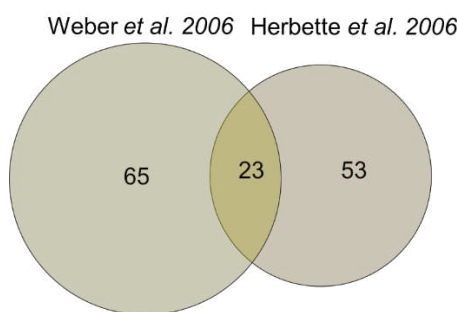


Figure 80. Diagramme de Venn représentant les gènes liés à la phosphorylation des protéines dont l'expression est modulée lors d'un stress induit par le cadmium chez *A. thaliana*. Les listes DEG issus des publications Weber *et al.* (2006) et Herbette *et al.* (2006) ont été confrontées afin de mettre en évidence les gènes différentiellement exprimés en réponse à un stress induit par le Cd communs aux 2 études. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les répliques en condition contrôle et les répliques en condition Cd grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 2 fois ont été sélectionnés ($\log_2 > 1$ ou < -1).

Tableau 14. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est connue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par le cadmium chez *A. thaliana*. Les gènes différentiellement exprimés codant pour des protéines kinases dont la fonction biologique est connue dans la littérature sont compilés. Les résultats de Weber *et al.* (2006) ont été compilés et représentent l'expression des gènes dans des racines de plantes âgées de 3 semaines en hydroponie après 2 heures de traitement avec 10 ou 50 μM de sel de Cd non spécifié. Les résultats d'Herbette *et al.* (2006) ont été compilés et représentent l'expression des gènes dans des racines de plantes âgées de 4 semaines en hydroponie après 2, 6 et 30 heures de traitement avec 5 ou 50 μM de sulfate de Cd. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les répliques en condition contrôle et les répliques en condition Cd grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 2 fois ont été sélectionnés ($\log_2 > 1$ ou < -1). L'expression est exprimée en base \log_2 .

Identifiant	Gène	\log_2 Cd/CM		Fonction biologique
		Weber <i>et al.</i> 2006	Herbette <i>et al.</i> 2006	
AT2G05940	<i>RPM1-INDUCED PROTEIN KINASE (RIPK)</i>	1,05	4,03	Activation de l'immunité innée
AT2G34650	<i>PINOID (PID)</i>	2,14	3,42	Inversion de la polarité cellulaire du transporteur d'auxine PIN2
AT2G02220	<i>PHYTOSULFOKIN RECEPTOR 1 (PSKR1)</i>	1,54	2,53	Croissance racinaire
AT3G59700	<i>LECTIN-RECEPTOR KINASE 5 (LecRK-V)</i>	1,71	2,17	Régulateur négatif de la résistance aux pathogènes
AT4G09570	<i>CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 4 (CPK4)</i>	1,21	1,43	Régulation de la signalisation de l'ABA Régulateur positif de la synthèse d'éthylène Régulateur négatif de la croissance racinaire
AT4G29810	<i>MAP KINASE KINASE 2 (MKK2)</i>	1,05	1,38	Rôle dans la réponse au froid Rôle dans la réponse au stress oxydatif Régulateur négatif de l'immunité innée
AT3G05840	<i>SHAGGY-RELATED PROTEIN KINASE 12 (ATSK12)</i>	1,09	1,07	Régulateur positif de la croissance
AT4G00710	<i>BRASSINOSTEROIDS-SIGNALING KINASE 3 (BSK3)</i>	-1,08	-1,39	Elongation racinaire Régulation de la signalisation des brassinostéroïdes

Pour résumer, la réponse transcriptionnelle des gènes codant pour des protéines kinases en réponse à un stress Cd induit des réponses précédemment caractérisées comme participant à la mise en place de l'immunité innée et de la réponse aux pathogènes. De façon intéressante, le seul gène réprimé de notre liste est le gène codant la protéine BSK3 qui participe à l'élongation racinaire. Or, un stress induit par le Cd est connu pour fortement inhiber la croissance racinaire (Hong-Mei Yuan and Huang 2016).

Expression des gènes codants pour des protéines phosphatases

Sur les 131 gènes codant des protéines phosphatases, 30 (23 %) voient leur expression modulée en réponse au Cd dans les différentes expériences. De façon similaire à l'expression des gènes codant pour les protéines kinases en réponse à un stress induit par le Cd, la majorité des DEG est retrouvée dans les données de Li *et al.* 2010 (20/30 DEG). Seuls 4 DEG sont retrouvés dans au moins 2 conditions issues de 2 publications différentes (*ATP' DELTA*, AT3G62260, AT4G32950 et AT4G28400). *ATP' DELTA* code pour une protéine phosphatase du type PP2A, une famille connue pour participer à la signalisation des ROS dans les plantes (Rahikainen *et al.* 2016). Les 3 autres gènes codent pour des protéines phosphatases de type PP2C et n'ont pas de fonction et/ou de substrat connus.

b) Étude de l'expression des gènes liés à la phosphorylation chez deux populations métallicoles d'*A. halleri* exposées au Cd

En suivant le même raisonnement que pour l'étude de l'expression des gènes codant pour des PKMT et des KDM, nous avons souhaité étudier la réponse transcriptionnelle à long terme des gènes codant pour des protéines kinases et des protéines phosphatases chez *A. halleri*.

Expression des gènes codants pour des protéines kinases

Les kinases et phosphatases chez *A. halleri* ont été identifiées par homologie de séquence avec les gènes d'*A. thaliana* utilisés plus haut. 1021 kinases et 135 phosphatases homologues ont été identifiées à partir des 987 kinases et 131 phosphatases d'*A. thaliana* répertoriées sur le site PhosphAt.

Une ACP conduite sur les données de RNAseq indique que la variable population explique la majeure partie des différences de la réponse transcriptionnelle des plantes à un stress induit par le Cd (feuilles : 59 % et racines : 57 %) (Figure 81A). De façon intéressante, les effets liés au traitement sont opposés entre racines et feuilles. En effet, la variable condition (CM vs Cd) est plus marquée dans les feuilles de PL22 et plus marquée dans les racines de I16. Or, la population italienne I16 est caractérisée par sa capacité à exclure les métaux, peu de Cd et de Zn sont donc accumulés dans les feuilles (Meyer *et al.* 2015 ; Corso *et al.* 2018 ; Hanikenne *et al.* 2018). La population polonaise PL22 est quant à elle une hyperaccumulatrice de Cd et de Zn, il est donc logique que l'effet majeur du Cd sur l'expression des gènes se retrouve principalement au niveau des feuilles. Cet effet a déjà été mis en avant dans l'analyse globale du transcriptome menée par Corso *et al.* (2018).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la variable traitement (Cd *versus* CM). Nous avons cherché à savoir quels gènes voyaient leur expression modulée par le Cd dans les racines et les feuilles des 2 populations (Figure 81C). Aucun des 1021 gènes homologues d'*A. thaliana* codant pour des protéines kinases ne voit son expression modulée par le traitement avec du Cd chez I16. Chez PL22, 46 gènes ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés en réponse au stress induit par le Cd. Sur ces 46 DEG codant des protéines kinases dans les feuilles et les racines de PL22 en réponse à un stress induit par le Cd, seuls 11 gènes ont une fonction et/ou un substrat répertorié dans la littérature (Figure 81). Les autres gènes sont présentés en Annexe IV.

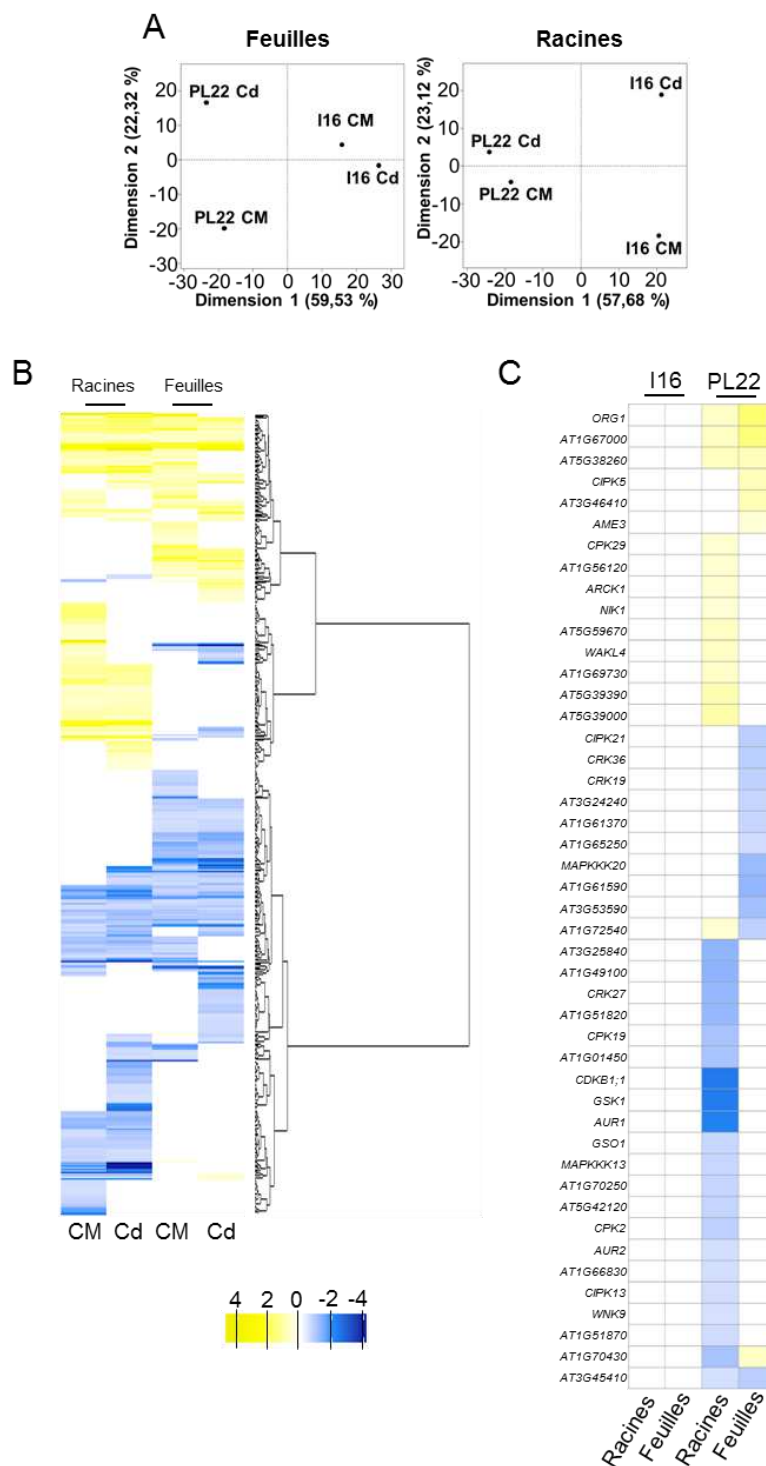


Figure 81. Expression des gènes codant des protéines kinases dont l'expression est modulée en réponse au Cd dans les populations métallicoles d'*A. halleri* PL22 et I16. Les données ont été obtenues à partir d'une analyse de RNA-seq avec des plantes d'*A. halleri* traitées +/- 5 µM sulfate de Cd pendant 10 jours (Corso *et al.* 2018). (A) Analyses en composantes principales de l'expression des gènes dans les feuilles et les racines. (B) Gènes différentiellement exprimés en fonction de la population (ratio PL22/I16) dans toutes les conditions (feuilles +/- Cd et racine +/- Cd). L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas de PL22 et les 3 réplicas de I16 grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). (C) Gènes différentiellement exprimés en fonction de la condition (ratio Cd/CM) dans les racines et les feuilles des population PL22 et I16. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas en condition contrôle et les 3 réplicas en condition Cd (5 µM de sulfate de Cd, 10 jours) grâce à un test de Student non-paramétrique. En accord avec les analyses de Corso *et al.* (2018), seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 1,4 fois ont été sélectionnés (log₂ de 0,5 ou -0,5). L'échelle est exprimée en base Log₂.

Le gène *WNK9* code pour une protéine kinase impliquée dans la signalisation de l'ABA. En effet, lorsque le gène est muté la plante est plus sensible à l'application exogène d'ABA et à un stress du type sécheresse. Au contraire, la surexpression de *WNK9* augmente la résistance à la sécheresse mais induit l'inhibition de l'élongation de la racine primaire (Xie *et al.* 2014).

Le gène *MAPKKK20* code pour une protéine kinase qui régule l'activité de MKP6, une protéine importante dans la réponse au stress salin, froid et oxydatif. Lorsque le gène est muté, la plante accumule de grande quantité de ROS en condition de stress salin, elle est donc plus sensible à la présence de fortes concentrations de chlorure de sodium (J.-M. Kim *et al.* 2012).

Le gène *GSO1* code pour une protéine kinase qui joue un rôle dans la synthèse des bandes de Caspari au niveau de l'endoderme (Pfister *et al.* 2014). La fonction de la protéine GSO1 est redondante avec la protéine GSO2 et le double mutant *gso1gso2* montre un développement racinaire anormal avec des problèmes de différenciation cellulaire (Racolta *et al.* 2014).

Le gène *GSK1* code pour une protéine kinase qui interagit avec les protéines BSK et qui participe à la régulation de la signalisation liée aux brassinostéroïdes (Sreeramulu *et al.* 2013). Lorsqu'un inhibiteur spécifique de l'activité de GSK1 est appliqué, une forte différenciation des cellules en cellules du xylème est observée (Kondo *et al.* 2014, 3). Son substrat est la protéine SNRK2.3. La phosphorylation inhibe l'activité de cette deuxième protéine kinase qui joue un rôle dans la signalisation de l'ABA (Cai *et al.* 2014) et la réponse des plantes aux stress abiotiques (Anna Kulik *et al.* 2011).

Les gènes *AUR1* et *AUR2* codent pour des protéines kinases localisées dans l'enveloppe nucléaire (Kawabe *et al.* 2005). La double mutation de ces gènes provoque des défauts d'orientation du plan de division cellulaire et une initiation incontrôlée des racines latérales (Van Damme *et al.* 2011). Une autre étude a aussi mis en évidence que ces enzymes sont des acteurs dans le maintien de l'activité méristématique (Petrovská *et al.* 2012). L'enzyme AUR1 phosphoryle la sérine 10 de l'histone H3 et participe donc à la régulation transcriptionnelle de type épigénétique (Demidov *et al.* 2009).

Le gène *CRK36* code pour une protéine kinase membranaire qui, lorsqu'elle est surexprimée, induit une forte accumulation de callose et de ROS lors de stress biotiques (Yeh *et al.* 2015). Lorsque le gène est muté, on observe une surexpression des gènes de réponse à l'ABA. De façon intéressante, l'expression de *CRK36* a déjà été montrée comme étant coréglée avec le gène *ARCK1* (Tanaka *et al.* 2012), ce qui est aussi le cas dans notre étude. *CRK36* phosphoryle *ARCK1* (*in vitro*) ce qui suggère que les 2 protéines forment un complexe qui régule négativement la signalisation de l'ABA et le stress osmotique.

Tableau 15. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est connue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par le cadmium dans la population d'*A. halleri* PL22.

Les gènes différentiellement exprimés codant pour des protéines kinases dont la fonction biologique est connue dans la littérature sont compilés. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les réplicas en condition contrôle et les réplicas en condition Cd grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 1,4 fois ont été sélectionnés ($\log_2 > 0,5$ ou $< -0,5$). L'expression est exprimée en base \log_2 .

Homologue d'<i>A. thaliana</i>	Gène	Organe	Log₂ Cd/CM	Fonction biologique
AT1G16150	<i>WALL ASSOCIATED KINASE-LIKE 4 (WAKL4)</i>	Racine	0,72	Homéostasie minérale
AT4G11890	<i>ABA AND OSMOTIC STRESS INDUCIBLE RECEPTOR LIKE CYTOSOLIC KINASE1 (ARCK1)</i>	Racine	0,59	Régulation négative de la signalisation de l'ABA
AT5G16000	<i>NSP-INTERACTING KINASE 1 (NIK1)</i>	Racine	0,53	Immunité virale
AT5G28080	<i>WNK9</i>	Racine	-0,50	Rôle dans la réponse au stress osmotique Régulateur négatif de la signalisation de l'ABA
AT4G20140	<i>GASSHO1 (GSO1)</i>	Racine	-0,69	Formation des bandes de Caspari Identité des cellules souches Différentiation cellulaire Prolifération cellulaire
AT4G32830	<i>AURORA1 (AUR1)</i>	Racine	-2,26	Maintien de l'activité méristématique
AT2G25880	<i>AURORA2 (AUR2)</i>	Racine	-0,55	Division cellulaire Contrôle de l'initiation des racines latérales
AT1G06390	<i>SHAGGY-LIKE PROTEIN KINASE 1 (GSK1)</i>	Racine	-2,34	Signalisation des brassinostéroïdes Signalisation de l'ABA Contrôle de la différenciation des cellules du xylème
AT5G57630	<i>CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 21 (CIPK21)</i>	Feuille	-0,84	Réponse au stress salin Homéostasie ionique / Vacuole
AT4G04490	<i>CYSTEINE RICH RECEPTOR LIKE PROTEIN KINASE 36 (CRK36)</i>	Feuille	-0,84	Régulation négative de la signalisation de l'ABA Synthèse de callose
AT3G50310	<i>MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 20 (MAPKKK20)</i>	Feuille	-1,18	Rôle dans la réponse au stress osmotique

Le gène *CIPK21* code pour une protéine kinase exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus et surexprimée en réponse à de nombreux stress. Le mutant *cipk21* est hypersensible au stress salin (Pandey *et al.* 2015).

Le gène *WAKL4* fait partie d'une famille de gènes qui codent pour des protéines kinases qui font un lien physique entre la paroi cellulaire et le cytoplasme. L'expression de *WAKL4* est induite par le sodium, le potassium, le cuivre, le nickel et le Zn. Lorsque que le gène est muté on observe une plus forte tolérance au nickel mais une faible accumulation de Zn dans les feuilles (Hou 2005).

Finalement, le gène *NIK1* code pour une protéine kinase dont la surexpression provoque la baisse de traduction des protéines. Ce mécanisme implique la protéine ribosomale RPL10 dont la traduction est réprimée par NIK1, entraînant le blocage des voies de traduction des protéines contrôlées par RPL10 (Zorzatto *et al.* 2015).

Pour résumer, la réponse transcriptionnelle de type acclimatation (stress induit sur 10 jours) en réponse à un stress induit par le Cd chez une espèce hyperaccumulatrice de Cd et de Zn concerne principalement la mise en place de la régulation de l'hormone ABA et la répression de gènes liés à la réponse aux stress et la croissance racinaire.

Expression des gènes codants pour des protéines phosphatases

En suivant le même raisonnement, nous avons analysé ces données pour la liste de gènes codants des protéines phosphatases (Figure 82). De la même manière, l'expression des gènes est majoritairement expliquée par la variable population (feuilles 65,19% et racines 52,09 %). Dans les feuilles la variabilité due au Cd est plus forte chez PL22 et inversement plus forte chez I16 dans les racines (Figure 82A). Cette forte variabilité liée à la variable population se retrouve sur la heatmap représentant l'expression des gènes de PL22 *versus* I16 avec deux grands groupes, les gènes surexprimés chez I16 et les gènes surexprimés chez PL22 (Figure 82B).

Encore une fois aucun gène ne voit son expression modulée par le Cd chez I16. Seuls 2 gènes codant des protéines phosphatases sont différenciellement exprimés chez PL22 entre la condition contrôle et la condition Cd (Figure 82C). Ces gènes codent pour une protéine phosphatase de la famille des PP2C de fonction inconnue et la protéine phosphatase SLP1. Cette dernière a un rôle inconnu chez les végétaux mais est prédite pour jouer un rôle dans la détection de l'homéostasie minérale chez l'Homme (Kutuzov and Andreeva 2012).

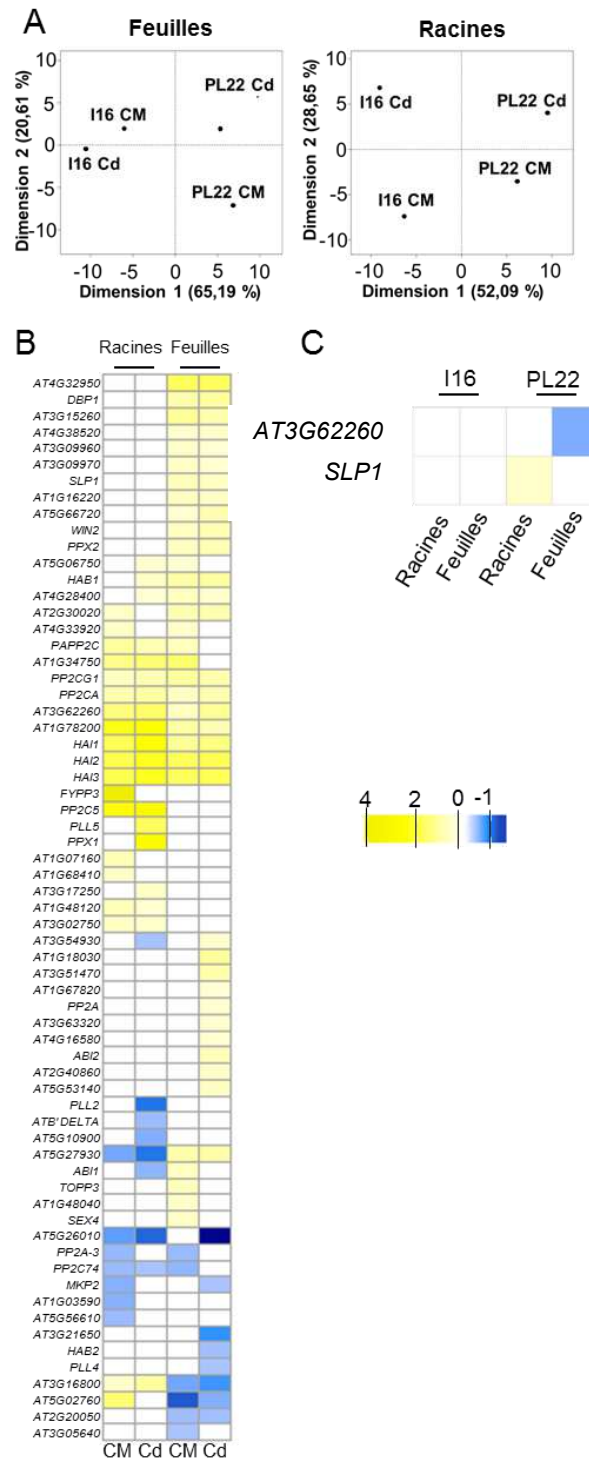


Figure 82. Expression des gènes codant de protéines phosphatases dont l'expression est modulée en réponse au cadmium dans les populations d'*A. halleri* métalliques PL22 et I16. Les données ont été obtenues à partir d'une analyse de RNA-seq avec des plantes d'*A. halleri* traitées +/- 5 µM sulfate de Cd pendant 10 jours (Corso *et al.* 2018). (A) Analyses en composantes principales de l'expression des gènes dans les feuilles et les racines. (B) Gènes différentiellement exprimés en fonction de la population (ratio PL22/I16) dans toutes les conditions (feuilles +/- Cd et racine +/- Cd). L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas de PL22 et les 3 réplicas de I16 grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). (C) Gènes différentiellement exprimés en fonction de la condition (ratio Cd/CM) dans les racines et les feuilles des population PL22 et I16. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 réplicas en condition contrôle et les 3 réplicas en condition Cd (5 µM de sulfate de Cd, 10 jours) grâce à un test de Student non-paramétrique. En accord avec les analyses de Corso *et al.* 2018, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus une fois ont été sélectionnés (log₂ de 0,5 ou -0,5). L'échelle est exprimée en base Log₂.

3. Conclusion

Cette étude de la réponse transcriptionnelle des gènes liés à la phosphorylation des protéines a mis en évidence de nombreux gènes dont la fonction et/ou le substrat sont inconnus et qui constituent donc des candidats pour l'identification de nouveaux acteurs dans la réponse, l'adaptation et la détoxification des ETM. En effet, en réponse à un stress induit par l'U chez *A. thaliana*, nous avons identifié 14 protéines kinases et 2 protéines phosphatases non caractérisées (Annexe II) ainsi que 7 protéines kinases dont le rôle est connu en dehors du contexte d'un stress métallique (Tableau 15). En réponse à un stress induit par le Cd nous avons mis en évidence 15 protéines kinases et 4 protéines phosphatases de nature inconnue (Annexe III) ainsi que 8 protéines kinases caractérisées dans des conditions ne mettant pas en jeu un stress métallique (Tableau 16).

Chez la population PL22 d'*A. halleri*, nous avons mis en évidence un grand nombre de gènes pour l'identification de candidats impliqués dans l'acclimatation à un stress induit par le Cd. Quarante-sept protéines kinases et 2 protéines phosphatases de nature inconnue (Annexe IV) ainsi que 11 protéines kinases caractérisées en dehors de la réponse à un stress métallique, à l'exception de WAKL4 (Tableau 17).

Ces analyses nous mènent à un total de 102 protéines kinases et 8 protéines phosphatases d'intérêt pour l'identification de nouveaux acteurs dans la réponse au stress induit par des ETM. Nous n'avons pas entrepris la caractérisation de ces gènes pour confirmer ou infirmer leur rôle dans la tolérance à un stress induit par les ETM. En effet, l'étude des lignées mutées dans des gènes codants pour des PKMT était déjà engagée (cf. partie A.) et l'ajout de nouveaux candidats n'était pas envisageable.

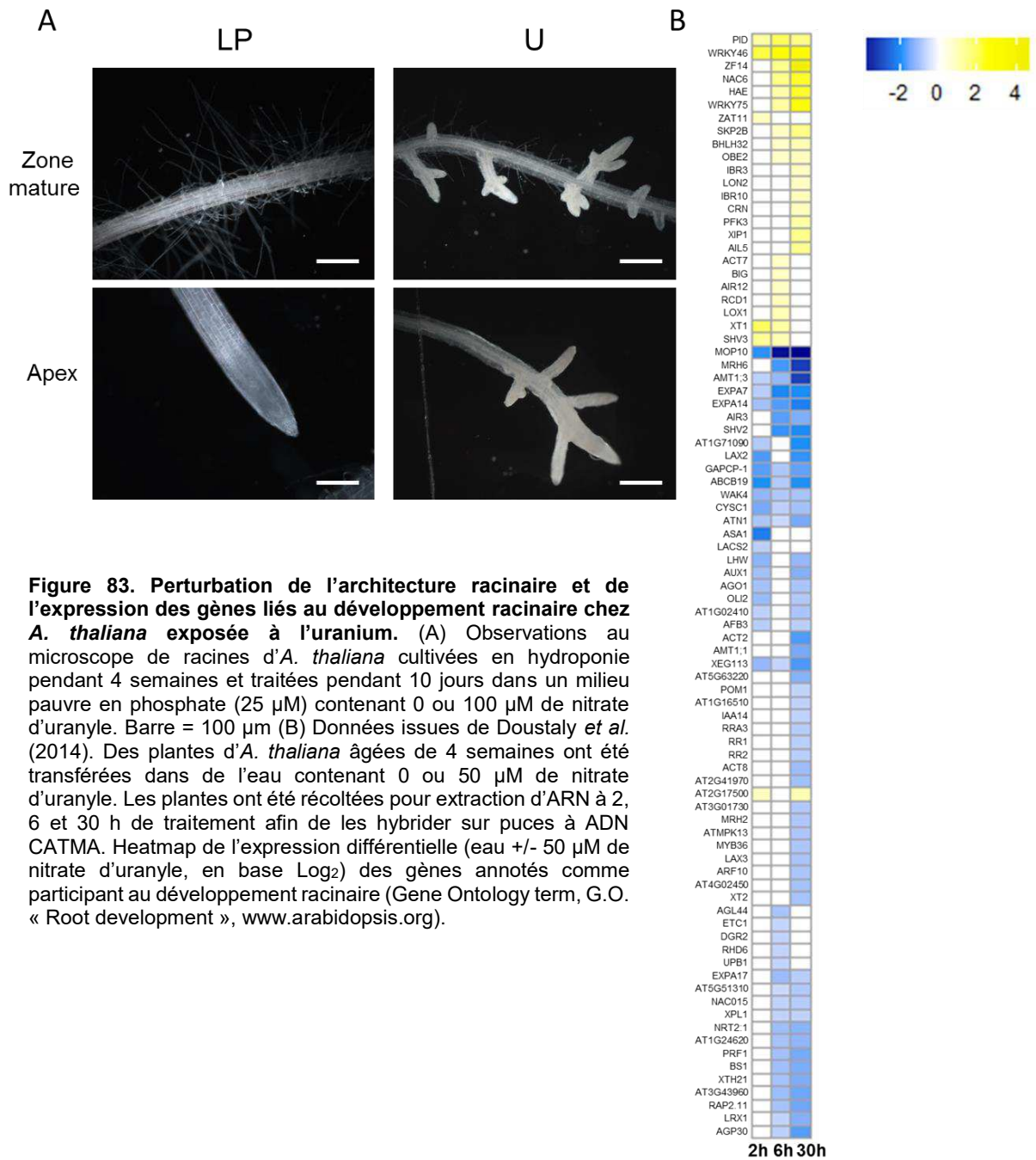
Chapitre IV

Caractérisation physiologique et
cellulaire des effets de l'uranium sur
l'architecture et le développement
racinaire d'*A. thaliana*

Les effets de l'U sur l'architecture et le développement du système racinaire d'*A. thaliana* ou d'autres espèces végétales n'ont jamais été étudiés en détails. Seules des observations sur l'inhibition de la croissance et la mort cellulaire de l'apex racinaire ont été décrites (Misson *et al.* 2009). Au cours d'expériences préliminaires nous avons montré que le système racinaire d'*A. thaliana* est fortement impacté par l'U. En effet, une exposition de plantules au radionucléide provoque un développement anormal des racines latérales caractérisé par un grand nombre de branchements. Ces ramifications sont aussi observées au niveau de l'apex (Figure 83A). Pour supporter ces observations, l'analyse de données de puces à ADN CATMA de plante d'*A. thaliana* traitées à l'U (Doustaly *et al.* 2014) a mis en évidence que l'U perturbe un grand nombre de gènes annotés comme participant au développement racinaire (Figure 83B). Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation des poils absorbants (MOP10, Boron *et al.* 2014), plusieurs protéines impliquées dans l'expansion cellulaire (expansines, Lee *et al.* 2001 et WAK4, Lally *et al.* 2001), ainsi que des protéines liées à l'auxine, une hormone essentielle au développement racinaire (AUX1, Bennett *et al.* 1996 ; PID, Benjamins *et al.* 2001 ; IAA14, López-Bucio *et al.* 2015 ; LOX1, Vellosillo *et al.* 2007 ; LOX2, Bainbridge *et al.* 2008 ; LOX3, Mellor *et al.* 2015). C'est pour ces raisons que caractériser l'effet de l'U sur l'architecture et le développement racinaire d'*A. thaliana* nous a semblé important.

A. Mise au point des conditions d'étude

La principale difficulté de ce type d'étude est directement liée à la chimie de l'U. En effet, l'U est un acide dur selon la classification des acides/bases de Pearson qui peut former des complexes avec un grand nombre de composés tels que les phosphates, les sulfates, les acides organiques ou encore les fonctions hydroxyles. De ce fait, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il est compliqué d'étudier le stress induit par l'U sur des milieux de culture gélosés. De plus, il a été montré qu'il peut y avoir, dans ces milieux, des concentrations résiduelles de phosphates jusqu'à 300 μM (Jain *et al.* 2009), rendant les expériences en milieux gélosés peu fiables et peu reproductibles car l'U n'est peu ou pas biodisponible dans ces conditions.



Pour contrer ce problème, nous avons montré que la croissance de plantules en milieu liquide (hydroponie) limitait ces biais, en permettant d'avoir des quantités d'U biodisponibles plus importantes. De plus, cette technique de culture permet d'observer des différences de phénotype en relation avec le stress induit par le radionucléide dès 20 μM de nitrate d'uranyle (dans un milieu de culture contenant 25 μM de Pi).

Étant donné que les effets de l'U sur le système racinaire des végétaux n'ont jamais été décrits en détails, nous avons été amenés à développer une approche globale pour observer plusieurs paramètres physiologiques et cellulaires. Cette approche regroupe plusieurs méthodes de coloration afin de suivre la viabilité cellulaire, l'accumulation de molécules comme les ROS ou encore la synthèse de polymères de défense. Cette approche a été complétée par l'observation de lignées transgéniques d'*A. thaliana* Col0 exprimant des protéines ou des promoteurs clés du développement racinaire fusionnées à des molécules rapporteuses (GFP et GUS). Certaines de ces techniques ont préalablement été utilisées pour étudier d'autres stress métalliques comme ceux induit par l'aluminium (Shen *et al.* 2008; Hossain *et al.* 2005), le cuivre (Lequeux *et al.* 2010) ou encore le chrome (Eleftheriou *et al.* 2015).

Nous nous sommes concentrés sur l'apex racinaire primaire, siège de la division, de la différenciation et de l'élongation cellulaire racinaire primaire. Cette zone est sous le contrôle de mécanismes finement régulés (gradient hormonaux, signaux intercellulaires...) et est donc facilement et rapidement perturbée par les stress (Dinneny *et al.* 2008).

1. Développement d'un système hydroponique adapté à l'étude de plantules : μPonics

Dans notre équipe, la culture en hydroponie est habituellement utilisée pour étudier des plantes d'*A. thaliana* âgées de plusieurs semaines et ayant développé des systèmes foliaires et racinaires importants. Afin de nous permettre d'étudier l'apex racinaire primaire et de bien distinguer l'architecture racinaire (distinction aisée des racines primaire/secondaire, zones de division/élongation/maturation), nous avons développé un système d'hydroponie, nommé « μPonics », nous permettant d'obtenir des plantules de petite taille. Ce système consiste en une plaque imprimée en 3D qui flotte à la surface du milieu de culture. Les plaques contiennent 36 ou 100 trous de forme conique remplis d'agar 0,65 % (m/v) (Figure 84). Une graine est déposée dans chaque trou. Après six jours de croissance dans un milieu de culture complet (milieu « Bruxelles » contenant 250 μM Pi) (Meyer *et al.* 2015) la racine primaire mesure environ 0,5 cm de longueur. Les plantes sont alors prêtes à être traitées. Lors du traitement la plaque est simplement transférée d'un milieu à un autre.

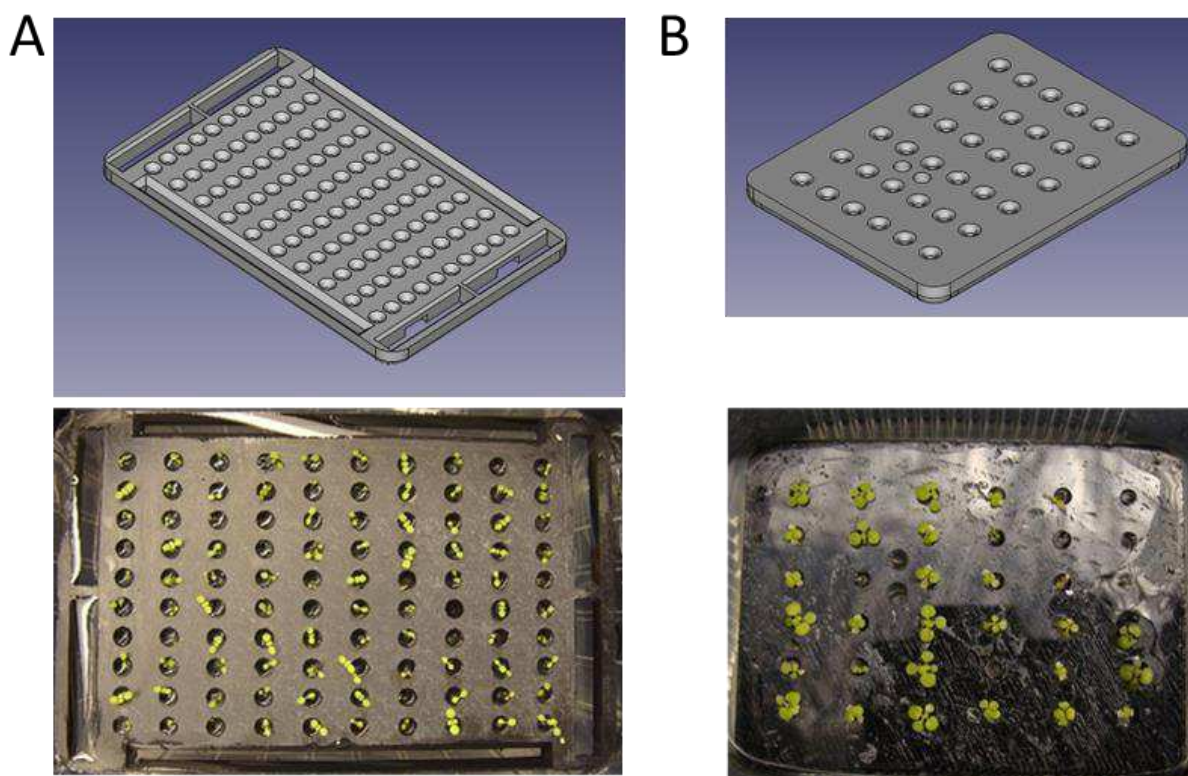


Figure 84. Système de croissance hydroponique μ Ponics. Le système de culture hydroponique nommé μ Ponics consiste en une plaque flottant à la surface du milieu de culture. Les plaques contiennent 100 ou 36 trous de forme conique remplis avec de l'agar 0,65 % (m/v) ; une graine est déposée dans chaque trou. La plaque a été modélisée en utilisant le logiciel FreeCad (www.freecadweb.org, v 0.15) et imprimée en plastique Acrylonitrile butadiène styrène (ABS) avec une imprimante 3D Ultimaker 2 (Ultimaker).

2. Effet de l'uranium sur la viabilité cellulaire

Afin de déterminer quelles concentrations d'U étaient adaptées à notre système de culture et à l'âge des plantules, nous avons réalisé une expérience d'effet dose sur une durée de 9 jours. Les plantules cultivées pendant 6 jours dans un milieu contenant 250 μ M de Pi ont été transférées dans un milieu de culture contenant 25 μ M de Pi (Low Phosphate, LP) +/- nitrate d'uranyle ou dans un milieu sans Pi (No Phosphate, NP). Nous avons testé des doses de nitrate d'uranyle allant de 0 à 50 μ M par incréments de 10 μ M. L'effet toxique de l'U a été visualisé en réalisant un test de viabilité cellulaire. Ce dernier consiste en une double coloration : la fluorescéine diacétate (FDA) verte pour marquer les cellules vivantes et l'iodure de propidium (PI) rouge pour marquer les cellules mortes (K. Jones *et al.* 2016). Les membranes des cellules vivantes sont perméables à la FDA qui, une fois incorporée, est transformée en fluorescéine verte (Saruyama *et al.* 2013). Les membranes dont l'intégrité n'est pas compromise ne sont pas perméables au PI. C'est un marqueur de la paroi de toutes les cellules et du noyau des cellules mortes (J. Chen *et al.* 2006).

Dans un premier temps, nous observons que les conditions LP et NP n'affectent pas la viabilité cellulaire au cours du temps (Figure 85). Ensuite, lorsque l'on traite les plantes avec de l'U dans le milieu LP, le métal n'affecte la viabilité cellulaire qu'à partir de 20 μM (condition U20). Néanmoins, cet effet toxique est faible et n'est observable qu'à 2 jours d'exposition. L'observation après 9 jours montre un gonflement de l'apex (Figure 85, U20, 9 jours) sans que cela n'ait d'effet sur la viabilité cellulaire.

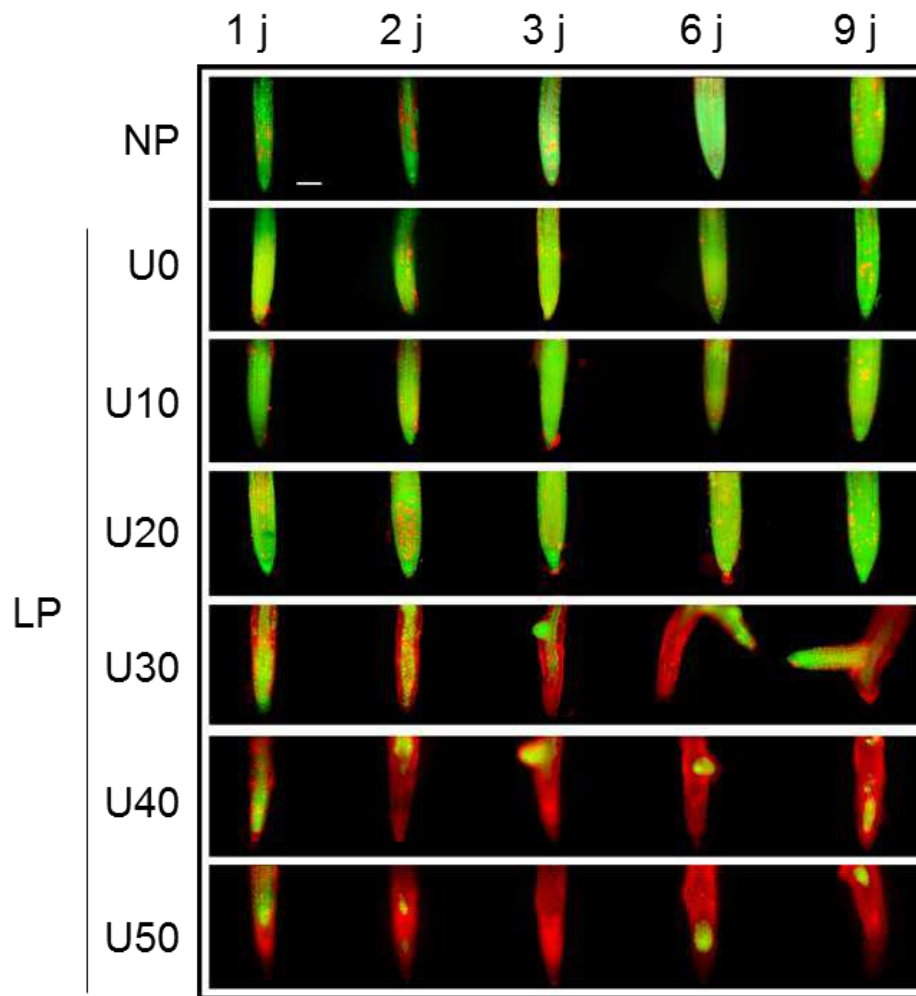


Figure 85. Effet de doses croissantes d'uranium sur la viabilité cellulaire de l'apex racinaire primaire d'*A. thaliana* au cours du temps. Coloration de la viabilité cellulaire des apex racinaires primaires de plantules Col0 après 1, 2, 3, 6 et 9 jours de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 μM Pi) ou Low Phosphate (LP, 25 μM Pi) +/- 10, 20, 30, 40 ou 50 μM de nitrate d'uranyle. La FDA colore en vert les cellules viables (membrane plasmique intacte) et le PI colore en rouge les parois cellulaires et les cellules mortes (membrane plasmique endommagée). Observations effectuées à l'objectif x20 sur un microscope à épifluorescence. Le signal FDA a été observé avec un filtre FITC et le signal PI avec un filtre Texas red. Images représentatives de n = 8 plantules. Barre = 100 μm .

La dose d'U devient létale pour l'apex primaire à partir de 30 μM (condition U30). Les effets sur la viabilité cellulaire sont visibles dès 24 heures de traitement et après 3 jours presque toutes les cellules de l'apex primaire sont mortes (Figure 85). Aux doses supérieures à 30 μM , l'U provoque la mort de l'apex primaire en 24 à 48 heures. Cette mort de l'apex primaire est associée au développement de racines latérales vivantes très proches de l'apex (Figure 85). Au vu de ces résultats nous avons décidé de continuer cette étude avec les deux conditions contrôles LP et NP, la dose sub-toxique U20 et la dose toxique U30.

3. Caractérisation des milieux de culture : dosages du Pi et de l'U

L'U est connu pour former avec le Pi des complexes qui ont tendance à précipiter (Grindler 1962), rendant ce dernier non biodisponible pour la plante et pouvant mener à une carence en Pi. Dans ce contexte, nous avons décidé de suivre l'évolution de la teneur en Pi et en U dans les différents milieux de culture utilisés. Pour ceci, nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique au vert de malachite pour quantifier le Pi et des dosages par ICP-MS pour quantifier l'U (Figure 86). Les aliquotes des milieux ont été prélevées en surface, au niveau de la zone de d'absorption des racines.

Nous avons observé que lorsque le milieu LP contient de l'U, la concentration en Pi diminue de 60 % dans la zone d'absorption des racines après 24 heures (Figure 86A). Après 3 jours, les quantités de Pi biodisponibles sont extrêmement faibles et se rapprochent d'un milieu ne contenant pas de Pi (NP). En l'absence d'U, la quantité de Pi disponible pour les racines dans le milieu LP diminue après 3 jours de traitement (38 % de réduction, Figure 86A).

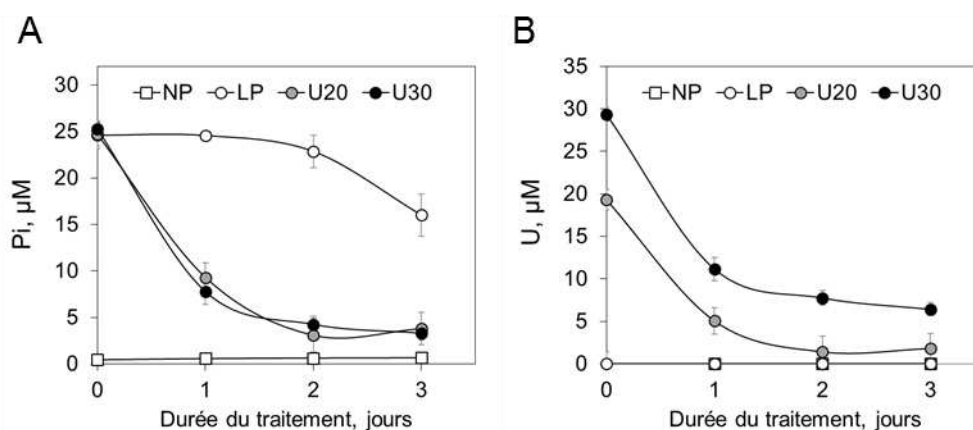


Figure 86. Quantification du phosphate et de l'uranium biodisponibles dans les milieux de culture au cours du temps. L'évolution des concentrations de Pi et U a été déterminée après 0, 1, 2 et 3 jours de traitement dans les milieux No phosphate (NP, 0 μM Pi) et Low Phosphate (LP, 25 μM Pi) +/- 20 ou 30 μM de nitrate d'uranyle. Les aliquotes de milieux ont été prélevées à la surface, au niveau de la zone d'absorption des racines. (A) Concentration de Pi dans les milieux de culture en fonction du temps. Les dosages ont été effectués avec la technique spectrophotométrique au vert de malachite à $\lambda = 610$ nm ($n = 6$ milieux). (B) Concentration d'U dans les milieux de culture en fonction du temps. Les dosages ont été effectués par ICP-MS ($n = 6$ milieux).

Ensuite, nous avons quantifié l'U dans ces mêmes échantillons de milieu de culture. Les quantités d'U disponible pour les plantules diminuent également de façon drastique dans les premières 24 heures dans les milieux U20 et U30 (respectivement, 5,6 μM et 11,5 μM d'U restant, Figure 86B). Ces résultats appuient l'hypothèse que les baisses de Pi et d'U biodisponibles sont majoritairement dues à la formation de complexes U-Pi et à leur précipitation.

Cette hypothèse est renforcée par les simulations de spéciation chimique effectuées pour les différents milieux. Ces simulations, réalisées avec le logiciel Geochem-EZ (Shaff *et al.* 2010), prédisent que dans les milieux U20 et U30, plus de 99 % des ions PO_4^{3-} sont complexés par l'U alors qu'ils sont pour plus de 90 % sous forme protonnée dans le milieu LP sans U (Tableau 16). L'ion UO_2^{2+} peut complexer jusqu'à 2 ions PO_4^{2-} en fonction de plusieurs facteurs tel que le pH ou la présence de polyphosphates (Markovic and Pavkovic 1983 ; Reitz *et al.* 2014 ; Vazquez *et al.* 2007). Il est donc normal que 99 % des ions PO_4^{3-} soient complexés par UO_2^{2+} tandis que seulement 62,96 % et 42,06 % des ions UO_2^{2+} sont complexés par PO_4^{3-} (respectivement, dans les milieux U20 et U30, Tableau 16). Il est aussi intéressant de noter que les quantités d'ions uranyles prédites libres sont très faibles dans les milieux U20 et U30 (respectivement, 0,62 μM et 0,86 μM). Lorsqu'il n'est pas libre ou complexé au Pi, l'ion uranyle est majoritairement complexé par des fonctions hydroxyle (Tableau 16).

Tableau 16. Simulation de la spéciation du phosphate et de l'uranium dans les milieux de culture. Les interactions ioniques sont prédites par Geochem-EZ (Shaff *et al.* 2010). Le tableau présente les proportions d'association (en %) des ions PO_4^{3-} et UO_2^{2+} avec les autres ions du milieu. LP : Low Phosphate (25 μM Pi). NA : Non applicable.

Milieu	Ions	PO_4^{3-}	UO_2^{2+}	Ca^{2+}	H^+	EDTA	SO_4^{2-}	OH^-	Mg^{2+}	Fe^{2+}	Libres
LP	PO_4^{3-}	NA	NA	4,85 %	92,77 %	0 %	0 %	0 %	1,64 %	0,73 %	0 %
U20	PO_4^{3-}	NA	99,72 %	0,01 %	0,26 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	UO_2^{2+}	62,96 %	NA	0 %	0 %	0,79 %	1,34 %	31,79 %	0 %	0 %	3,12 %
U30	PO_4^{3-}	NA	99,76 %	0,01 %	0,22 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	UO_2^{2+}	42,06 %	NA	0 %	0 %	0,94 %	1,23 %	52,89 %	0 %	0 %	2,88 %

Ces expériences montrent que la présence de l'U dans les milieux provoque la précipitation du Pi. Les 2 éléments ne sont alors que très peu disponibles pour les racines. Il est donc indispensable de poursuivre l'étude de la toxicité de l'U sur le système racinaire en incluant le milieu contrôle sans Pi (NP) et ceci afin de distinguer les effets de la carence en Pi de ceux induit par la toxicité de l'U.

2) Effets de l'uranium sur l'architecture racinaire

L'élongation de la racine primaire est modulée en réponse à l'environnement (pour revues, voir Potters *et al.* 2007 ; Giehl *et al.* 2014) et il a déjà été montré que la croissance de la racine primaire pouvait être stimulée ou inhibée en fonction de la concentration d'U utilisée (Misson *et al.* 2009).

Nous avons mesuré la longueur de la racine primaire au cours des 9 jours de traitement dans les conditions sélectionnées (Figure 87) : LP, NP, U20 et U30. Dans le milieu NP, la croissance racinaire est légèrement plus faible que le contrôle LP dès les premières 24 heures de traitement et jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 87B et C). Les racines sont significativement plus longues dans le milieu U20 que celles du contrôle en milieu LP. Cette stimulation de la croissance racinaire primaire prend effet entre 3 et 6 jours après le début du traitement (Figure 87B et C), ce qui correspond au moment où il n'y a pratiquement plus d'U biodisponible dans le milieu (Figure 86B) mais une forte quantité du radionucléide a été absorbée au niveau racinaire (Figure 91A). Finalement, à U30 l'élongation de la racine primaire est complètement inhibée dès les premières 24 heures de traitement.

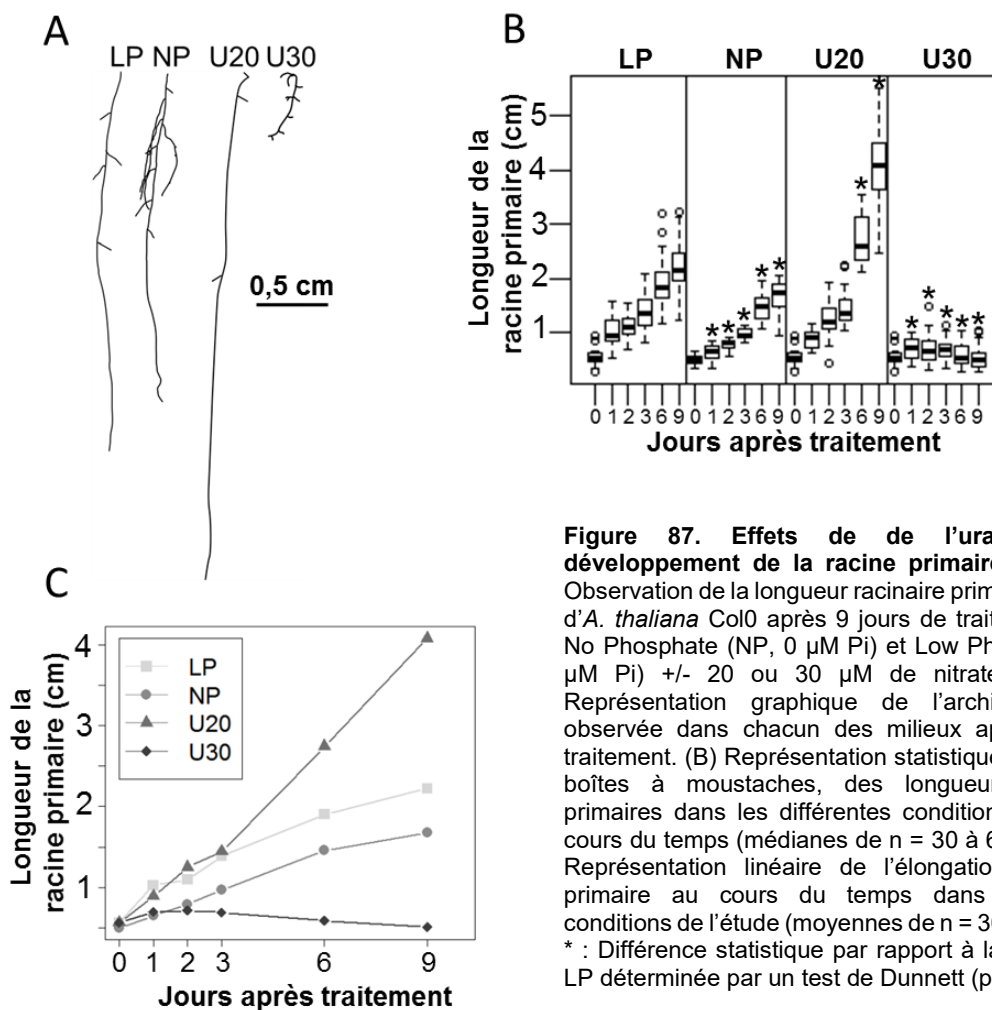


Figure 87. Effets de de l'uranium sur le développement de la racine primaire d'*A. thaliana*. Observation de la longueur racinaire primaire de plantules d'*A. thaliana* Col0 après 9 jours de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 μ M Pi) et Low Phosphate (LP, 25 μ M Pi) +/- 20 ou 30 μ M de nitrate d'uranyle. (A) Représentation graphique de l'architecture typique observée dans chacun des milieux après 9 jours de traitement. (B) Représentation statistique, sous forme de boîtes à moustaches, des longueurs des racines primaires dans les différentes conditions de culture au cours du temps (médianes de n = 30 à 60 plantules). (C) Représentation linéaire de l'élongation de la racine primaire au cours du temps dans les différentes conditions de l'étude (moyennes de n = 30 à 60 plantules). * : Différence statistique par rapport à la valeur contrôle LP déterminée par un test de Dunnett (pvalue < 0,05).

Nous avons mis en évidence que les conditions NP et U30 provoquaient respectivement une diminution et un arrêt de croissance de la racine primaire. Or, la carence en Pi est connue pour provoquer une réduction de croissance de la racine primaire couplée à une stimulation de l'initiation et du développement des racines latérales (Péret *et al.* 2011). Nous avons alors dénombré les racines latérales présentes sur chaque plantule. Dans les conditions NP et U30, cas où l'élongation racinaire est inhibée, le nombre de racines latérales est significativement plus grand que dans le contrôle LP. Au contraire, dans la condition U20, la stimulation de la croissance de la racine primaire est corrélée avec une inhibition très marquée de l'initiation des racines latérales (Figure 88).

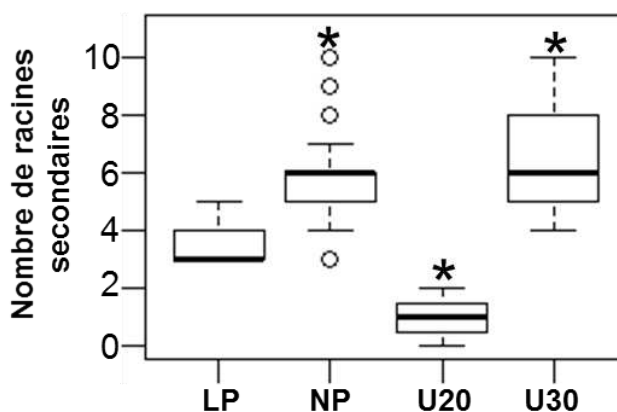


Figure 88. Effet de l'uranium sur l'initiation des racines latérales d'*A. thaliana*. Nombre de racines latérales secondaires dans des plantules d'*A. thaliana* Col0 après 9 jours de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 μ M Pi) et Low Phosphate (LP, 25 μ M Pi) +/- 20 ou 30 μ M de nitrate d'uranyle. Les racines latérales ont été dénombrées à la fin du traitement dans les différentes condition (n = 12 à 35 plantules).* : Différence statistique par rapport à la valeur contrôle LP déterminée par un test de Dunnett (pvalue < 0,05).

L'U induit une déplétion en phosphate dans le milieu (Figure 86). Or, les conditions U20 et U30 provoquent des phénotypes différents du milieu NP. Ces observations montrent que la toxicité de l'U implique d'autres effets qu'une déplétion du milieu en Pi.

Sur la Figure 85, on remarque que l'apex racinaire primaire est légèrement gonflé en fin de traitement dans la condition U20. Le gonflement de l'apex racinaire est un phénomène déjà observé dans plusieurs stress (salin : Feng *et al.* 2018, oxydant : Potters *et al.* 2007, radiatif : Nagata, Todoriki, and Kikuchi 2004, aluminium : Kopittke *et al.* 2015; D. L. Jones *et al.* 2006), ainsi que lors d'une carence en Pi (Cubero *et al.* 2009). Nous avons donc souhaité savoir si cet effet pouvait aussi être induit par l'U. Pour cela, les parois cellulaires des apex primaires ont été colorées à l'iodure de propidium (Figure 89A) afin de pouvoir mesurer le diamètre de l'apex (Figure 89B) ainsi que l'épaisseur des couches externes de la racine, constituées des cellules de l'épiderme (Figure 89C) et du cortex (Figure 89D). Le diamètre de l'apex et des cellules a été mesuré au niveau du début de la zone de maturation. Après compilation des résultats, il s'avère que les apex dans le milieu U20, mais aussi dans le milieu

NP, sont respectivement plus larges de 10 à 20 μm par rapport au milieu LP (Figure 89B). Ce résultat s'explique facilement car dans les deux conditions les cellules du cortex et de l'épiderme sont plus épaisses de quelques μm (Figure 89C et D). De façon intéressante, les cellules de l'épiderme et du cortex des plantes cultivées en milieu U30 sont aussi plus épaisses mais il n'y a pas d'augmentation du diamètre de la racine. Ce dernier résultat impliquerait que les lignées cellulaires internes (endodermes et/ou stèle centrale), non mesurées, ont collapsé (Figure 89A). Cette dernière hypothèse pourrait être liée à une perte de turgescence engendrée par la mort cellulaire observée au niveau de l'apex racinaire primaire dans la condition U30 (Figure 85).

Ces résultats suggèrent que le gonflement de l'apex racinaire primaire n'est que la conséquence d'une forte carence en P_i , que ce soit dans la condition NP ou dans les milieux contenant de l'U, le radionucléide entraînant une diminution du P_i biodisponible pour les plantules (Figure 86).

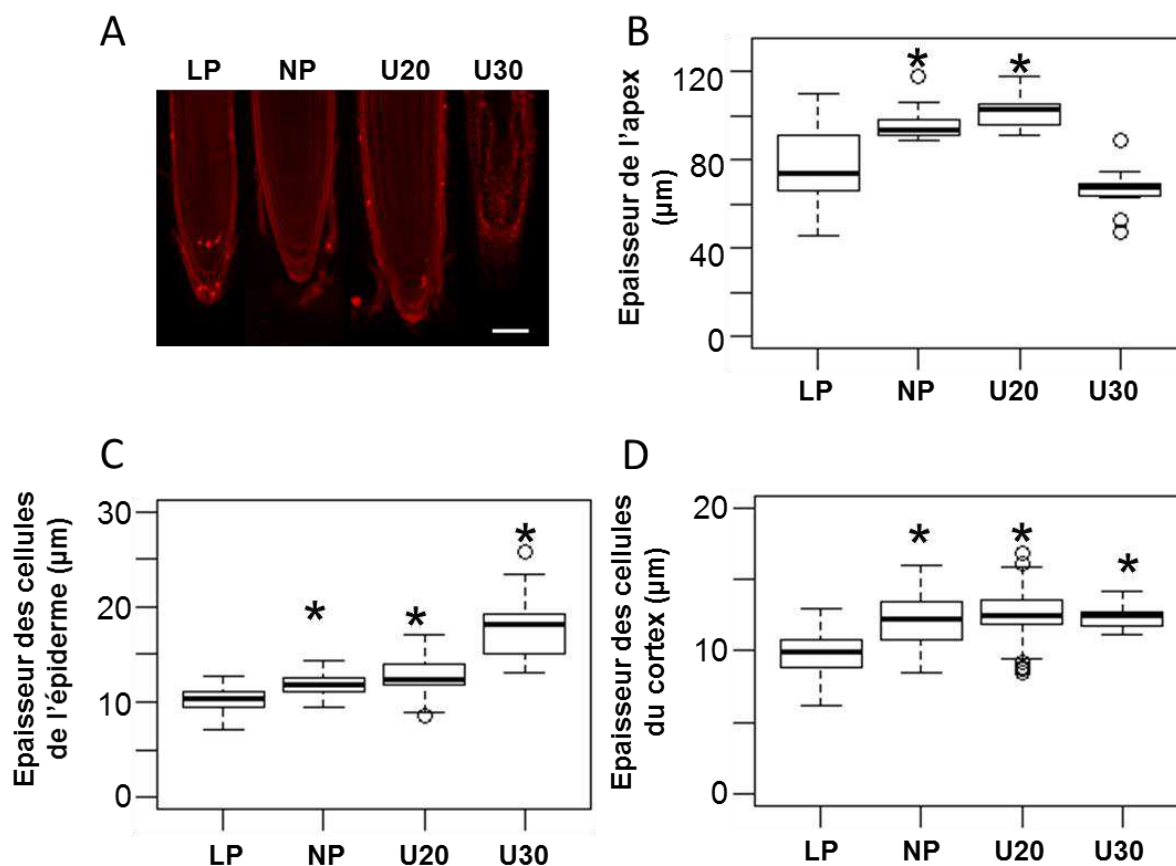


Figure 89. Effet de l'uranium sur le diamètre de l'apex, de l'épiderme et du cortex des racines d'*A. thaliana*. Les parois de plantules d'*A. thaliana* Col0 ont été colorées à l'iodure de propidium après 9 jours de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 μM P_i) et Low Phosphate (LP, 25 μM P_i) +/- 20 ou 30 μM de nitrate d'uranyle. (A) Observations effectuées à l'objectif x20 avec un Apotome (Zeiss) sous filtre Texas Red. Images représentatives de $n = 6$ plantules. (B) Mesures du diamètre de l'apex au niveau de la zone de maturation ($n = 6$ plantules). Mesures de l'épaisseur des cellules de l'épiderme (C) et du cortex (D). ($n = 24$ cellules issues de 6 plantules individuelles). Barre = 50 μm . * : Différence statistique par rapport à la valeur contrôle LP déterminée par un test de Dunnett ($p\text{value} < 0,05$).

B. Effet de l'uranium sur le cycle cellulaire

Nous avons souhaité étudier plus en détails les raisons entraînant la stimulation, dans le milieu U20, et les inhibitions, en conditions NP et U30, de la croissance racinaire (Figure 87). Pour cela, nous avons utilisé des plantes d'*A. thaliana* transgéniques exprimant la construction transcriptionnelle entre le promoteur *CyclineB1* et le gène rapporteur *GUS* (pCycB1::GUS). La cycline B1 est une protéine entrant en jeu dans le cycle cellulaire et essentielle à l'entrée en mitose (pour revue, voir De Veylder, Beeckman, and Inzé 2007). Suivre l'activité du promoteur *pCycB1* permet d'estimer l'activité mitotique et donc la division cellulaire, ici à l'apex racinaire de plantules traitées à l'U (Figure 90). Afin de valider l'utilisation de cette approche nous avons vérifié que l'U n'influçait pas l'activité de la β -glucuronidase (*GUS*) dans des plantules exprimant l'enzyme sous le contrôle du promoteur 35S (p35S::GUS) (données non présentées).

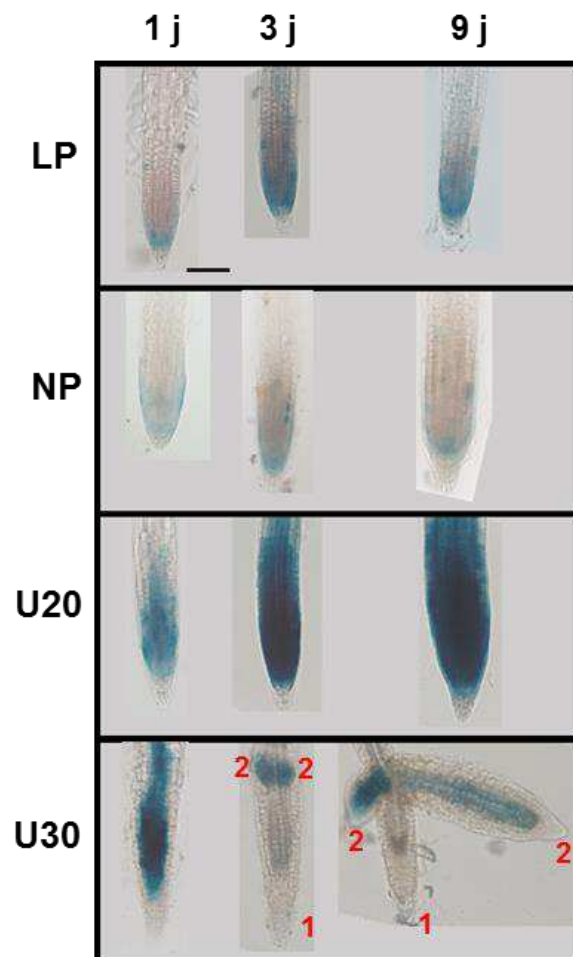


Figure 90. Effet de l'uranium sur l'activité mitotique des apex racinaires d'*A. thaliana*. Observation des apex racinaires primaires de plantules d'*A. thaliana* Col0 exprimant la construction transcriptionnelle pCycB1::GUS après 1, 3 et 9 jours de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 µM Pi) et Low Phosphate (LP, 25 µM Pi) +/- 20 ou 30 µM de nitrate d'uranyle. Observations effectuées à l'objectif x20 au microscope optique sous lumière blanche avec un filtre DIC. Images représentatives de n = 10 plantules. Barre = 100 µm. Pour simplifier l'interprétation, les apex primaires (1) et secondaires (2) ont été annotés dans certains cas.

Les observations effectuées avec la construction *pCycB1::GUS* mettent en évidence que la division cellulaire au niveau de l'apex primaire est fortement stimulée, et ceci durant les 9 jours de traitement à 20 μM de nitrate d'uranyle (Figure 90). Cette stimulation est également observée dans le milieu U30 mais uniquement de façon transitoire après 24 heures de traitement. A partir du troisième jour d'exposition à U30 l'apex primaire ne présente plus aucune activité mitotique détectable, en accord avec les marquages de viabilité cellulaires qui indiquent une importante mort cellulaire de ce territoire (Figure 85). A ce stade du traitement une activité mitotique est détectée dans les apex secondaires (Figure 90).

Les plantules dans la condition NP ont une élévation racinaire diminuée par rapport au milieu contrôle LP et ce résultat se reflète sur la division cellulaire. En effet, l'apex primaire en condition NP présente un signal GUS plus faible que le contrôle tout au long de l'expérience. Cet effet a déjà été observé lors d'une carence en phosphate (Svistoonoff *et al.* 2007 ; Miura *et al.* 2011).

C. Effet de l'uranium sur l'homéostasie du phosphore et du fer

Plusieurs travaux effectués montrent que l'U perturbe l'homéostasie du fer et du Pi au niveau de l'appareil foliaire et racinaire (Doustaly *et al.* 2014 ; Berthet *et al.* 2018 ; Misson *et al.* 2009) ont, quant à eux, montré que le Pi était important dans l'immobilisation de l'U dans les tissus. Nous avons donc quantifié le P, le Fe et l'U dans les racines afin de mieux comprendre la toxicité de l'U. Les mesures ont été effectuées à 3 jours de traitement, c'est à dire au dernier jour précédant la mort de l'apex dans la condition U30.

1. Homéostasie de l'uranium et du phosphore

Nous avons d'abord quantifié les teneurs en U par ICP-MS après minéralisation des échantillons à l'acide nitrique. De façon logique, seules les racines des plantules traitées dans les milieux U20 et U30 ont accumulé de l'U (Figure 91A). Dans le milieu U30 les racines accumulent environ 3 fois plus d'U que celles dans le milieu U20. Cette dernière observation peut expliquer les différences drastiques de phénotypes racinaires observées précédemment (Figure 87Figure 88).

Nous avons ensuite quantifié le P total par ICP-MS après minéralisation des échantillons racinaires dans de l'acide nitrique (Figure 91B). Les dosages montrent que les conditions NP et U20 induisent une réduction de l'ordre de 15 à 25 % du contenu racinaire en P par rapport à la condition contrôle LP (Figure 91B). La carence en P est significativement plus marquée dans la condition U30, avec une diminution de moitié du pool de P par rapport à la condition LP. Ces résultats montrent que l'U provoque une carence en P dans les racines

des plantules et que celle-ci est d'une intensité au moins similaire à celle provoquée par une croissance dans un milieu totalement dépourvu de Pi.

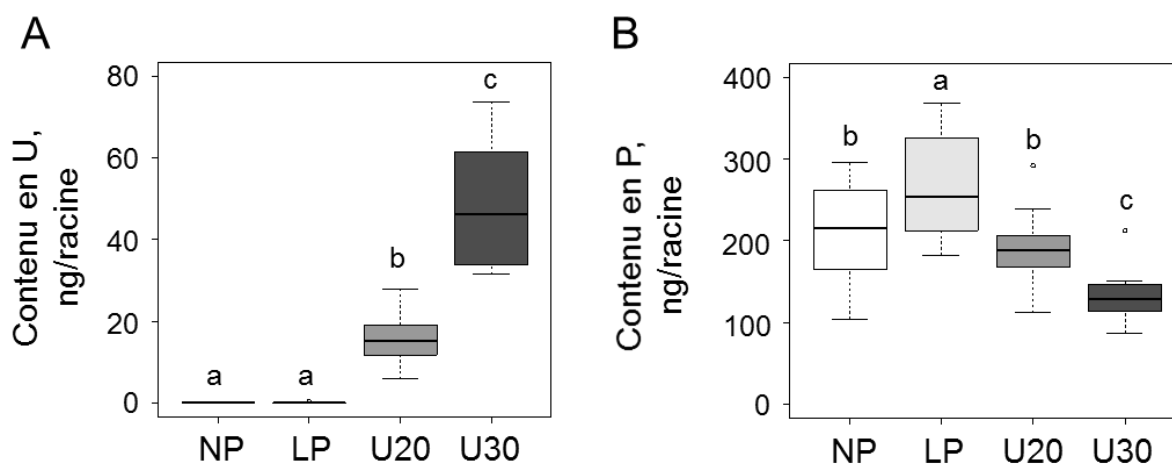


Figure 91. Quantification de l'uranium et du phosphore chez *A. thaliana* exposée à des doses croissantes d'uranium. Contenus en U et P de racines de plantules d'*A. thaliana* Col0 après 3 jours de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 μM Pi) et Low Phosphate (LP, 25 μM Pi) +/- 20 ou 30 μM de nitrate d'uranyle. (A) Contenu en U par racine. (B) Contenu en P par racine. Les dosages ont été effectués par ICP-MS sur des échantillons racinaires minéralisés dans de l'acide nitrique (n = 7 à 15 racines issues de 2 expériences indépendantes). Les lettres indiquent les différences statistiquement significatives entre groupes de valeurs suite à un test de Dunnett (pvalue < 0,05).

2. Homéostasie du fer

Les gènes codant pour les protéines régulant le transport et l'homéostasie du Fe, tels que *IRT1* et *FRO2*, sont fortement réprimés dans des plantes exposées à de fortes concentrations d'U (Doustaly *et al.* 2014). De plus, l'U semble induire une redistribution du Fe des parois et vacuoles vers les chloroplastes par la compétition de l'U et du Fe pour la complexation avec le Pi (Berthet *et al.* 2018).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au contenu total en Fe des racines en réalisant des dosages par ICP-MS après minéralisation. Ces dosages montrent que le contenu racinaire en Fe est similaire dans les plantules traitées en milieux LP, NP, et U30 (Figure 92A). Néanmoins, dans la condition U20 le niveau de Fe dans les racines est réduit de 40 % par rapport à la condition contrôle (Figure 92A).

Par la suite, nous avons observé le Fe au niveau de l'apex racinaire primaire en réalisant une coloration histologique par la méthode du Perls-DAB sur des plantules après 3 jours de traitement. Cette méthode repose sur l'interaction des ions ferriques avec le ferrocyanure de potassium et le DAB et permet de mettre en évidence le Fe sous la forme d'un précipité noir (Roschztardt *et al.* 2009 ; Brumbarova and Ivanov 2016). Dans la condition de référence LP le Fe est détecté au niveau des cellules souches de la zone méristématique ainsi que dans la zone d'élongation (Figure 92B). La distribution du Fe dans les racines de plantules

cultivées dans les conditions NP et U20 est similaire à celle de la condition LP avec toutefois un marquage un peu plus intense du Fe au niveau de la zone de transition (Figure 92B). En ce qui concerne les plantules traitées avec 30 μM d'U, une très forte coloration noire est observée, représentative d'une forte concentration de Fe sous forme labile (non hémique). De plus, ce burst de Fe est observé sur toute la longueur de la racine (Figure 92B). Ce phénomène a déjà été observé dans les 20 premières heures d'une forte carence en Pi (Müller *et al.* 2015).

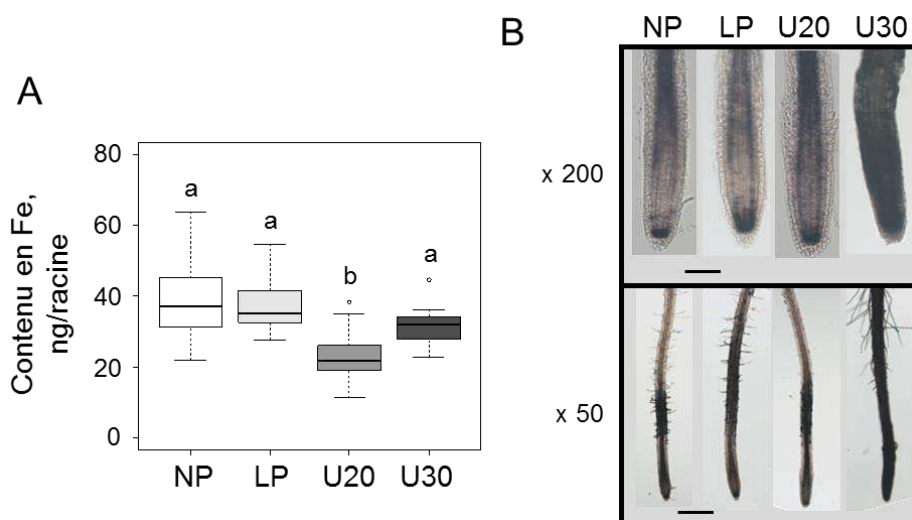


Figure 92. Effet de l'uranium sur l'homéostasie du fer chez *A. thaliana*. (A) Contenu en Fer dans les racines. Les dosages ont été effectués par ICP-MS sur des échantillons racinaires minéralisés dans de l'acide nitrique ($n = 7$ à 15 racines issues de 2 expériences indépendantes). Les lettres indiquent les différences statistiquement significatives entre groupes de valeurs suite à un test de Dunnett (p value < 0,05). (B) Observation des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} dans les apex racinaires primaires de plantules d'*A. thaliana* Col0 après coloration au Perls-DAB à 3 jours de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 μM Pi) et Low Phosphate (LP, 25 μM Pi) +/- 20 ou 30 μM de nitrate d'uranyle. Observations aux grossissements x200 et x50 au microscope optique sous lumière blanche avec un filtre DIC. Barre = 50 μm pour x200 et 100 μm pour x 50. Images représentatives de $n = 4$ plantules.

Les résultats obtenus par coloration au Perls-DAB et par dosages ICP-MS du Fe semblent contradictoires. En effet, la diminution du pool de Fe dans la condition U20 n'est pas corrélée à une diminution du signal obtenu en Perls-DAB. Egalement, le très fort marquage de la totalité du cylindre racinaire en condition U30 n'est pas associé à une augmentation du pool de Fe total (Figure 92A). Ces disparités peuvent s'expliquer par le fait que la coloration Perls-DAB ne détecte que Fe non hémique alors que les mesures effectuées par ICP-MS représentent la totalité du pool de Fe racinaire (labile et chélaté) après digestion complète du tissu dans de l'acide nitrique. Les importantes différences morphologiques des racines dans les 4 conditions expérimentales (Figure 87) et le fait que les résultats d'ICP-MS soient exprimés par racine (Figure 92A) peuvent également compliquer l'interprétation des 2 types d'analyses.

D. Effet de l'uranium sur la synthèse et l'accumulation d'espèce réactives de l'oxygène et d'oxyde nitrique

Nous venons de voir qu'une concentration de 30 μM de nitrate d'uranyle provoquait un burst de Fe ionique tout le long de la racine. Or, la présence d'une forte concentration de Fe sous forme ionique peut induire la formation de ROS par réaction de Fenton (pour revue, voir Mittler 2017). De plus, la production et l'accumulation de ROS sont des conséquence répandues dans la réponse aux stress (Baxter *et al.* 2014; Chan *et al.* 2017). Le stress oxydatif permet la modulation de l'architecture racinaire afin que la plante puisse s'adapter aux contraintes environnementales (Mittler 2017; Potters *et al.* 2009). Pour finir, l'U est connu pour induire l'expression des enzymes liées à la détoxification des ROS telles la Superoxyde dismutase et les Catalases (Vanhoudt *et al.* 2011b).

Pour étudier la distribution spatiale et temporelle des ROS en réponse à l'U dans nos conditions expérimentales nous avons utilisé le rapporteur fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) qui, lorsqu'il est oxydé dans le cytosol, ne traverse plus les membranes et fluoresce en vert. Nos résultats montrent que les conditions LP et NP ne présentent aucune fluorescence spécifique en dehors de la fluorescence basale, tandis que les traitements U provoquent une accumulation de ROS (Figure 93A). Dans le milieu U20, cette accumulation est très localisée dans le temps, callose visible principalement à 24 heures de traitement, et l'espace avec un marquage de la zone d'élongation, en particulier des files cellulaires périphériques. En présence de 30 μM d'U, l'accumulation de ROS est plus rapide, dès 6 heures de traitement, et beaucoup plus forte qu'en condition U20 (Figure 93A). Les ROS s'accumulent dans un premier temps dans la zone d'élongation (temps 6 heures) puis envahissent la totalité de l'apex racinaire (temps 24 heures). Après 3 jours de traitement le signal lié aux ROS disparaît, ce qui est corrélé à la mort cellulaire de l'apex (Figure 85).

L'oxyde nitrique (NO) est connu pour jouer le rôle de messenger secondaire dans les plantes exposées aux stress (pour revue, voir Simontacchi *et al.* 2015). De plus, il a été rapporté qu'il est synthétisé et accumulé en réponse à de nombreux métaux lourds, incluant l'aluminium (Illes *et al.* 2006) et l'U (Tewari *et al.* 2015).

Comme pour l'observation des ROS, nous avons suivi l'accumulation de NO au niveau de l'apex primaire après 6, 24 et 72 heures de traitement (Figure 93B). Nous avons également utilisé une fluorescéine modifiée, la 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA), qui est estérifiée et transformée par le NO dans la cellule pour former le 4,5-diaminofluorescein triazole qui émet une fluorescence verte. Dans les conditions LP, NP et U20, nous n'avons observé aucune augmentation de la fluorescence basale. Par contre, un fort signal est observé

dans la totalité de l'apex racinaire dès 6 heures de traitement dans la condition U30. Cette accumulation de NO finit par décroître entre 6 et 24 heures et disparaît après 72 heures. Afin de vérifier que le signal observé est bien dû au NO, nous avons conduit cette même expérience avec du bleu de méthylène ajouté au milieu afin d'inhiber la synthèse de NO (Mayer *et al.* 1993). Aucune fluorescence verte n'a été observée durant l'expérience à U30, confirmant la synthèse et l'accumulation de NO en réponse à une dose toxique d'U (données non présentées).

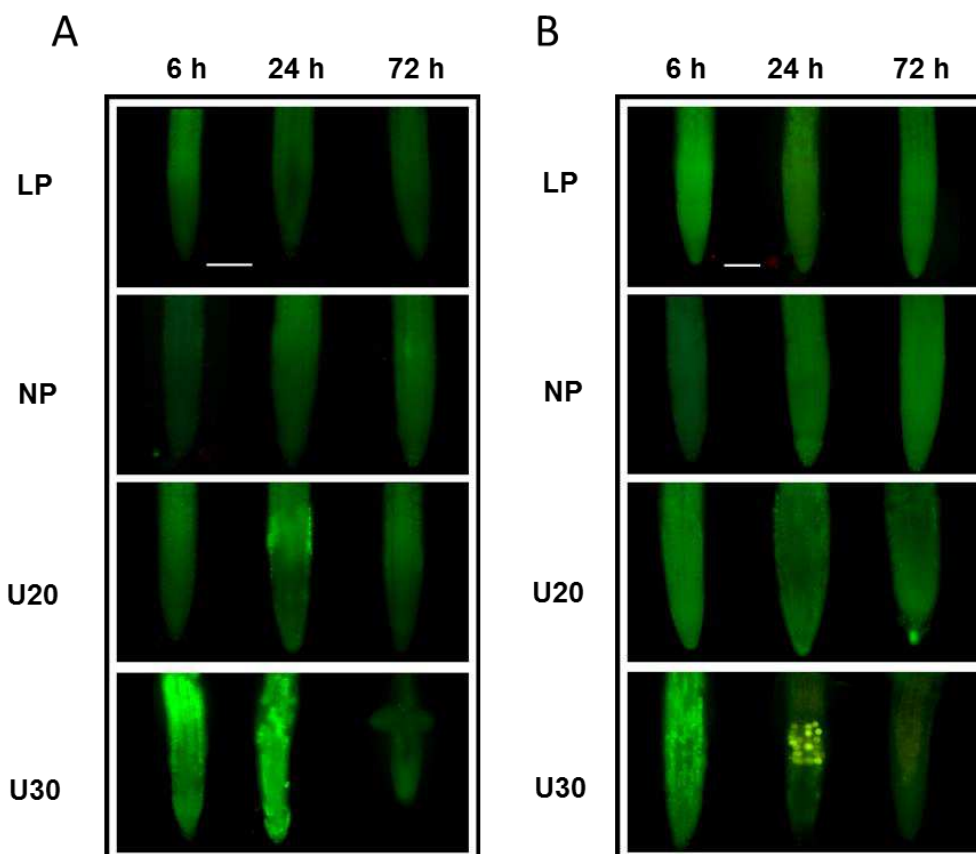


Figure 93. Effet de l'uranium sur l'accumulation de ROS et de NO au niveau de l'apex racinaire d'*A. thaliana*. (A) Colorations des ROS à la H₂DCFDA et (B) du NO à la DAF-2DA dans les apex racinaires primaires de plantules Col0 après 6, 24 et 72 heures de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 μM Pi) Low Phosphate (LP, 25 μM Pi) +/- 20 ou 30 μM de nitrate d'uranyle. Observations effectuées à l'objectif x20 sur un microscope à épifluorescence avec un filtre FITC. Images représentatives de n = 4 à 20 plantules. Barre = 100 μm. Le même temps d'exposition a été conservé pour tous les réplicas (120 ms).

Pour résumer, dans la condition sub-toxique U20, l'apex racinaire subit un stress oxydatif faible et très bref qui semble être localisé au niveau de la zone d'élongation et seulement à 24 heures de traitement (Figure 93A). Aucun signal lié à l'accumulation de NO n'a été détecté dans la condition U20 (Figure 93B). La condition toxique U30 provoque une forte accumulation de ROS et de NO dans les 6 premières heures de traitement. Ces accumulations sont moins localisées que dans la condition U20 et semblent concerner la coiffe racinaire ainsi que les zones méristématique, de transition et d'élongation.

E. Effet de l'uranium sur la synthèse et accumulation de polymères de défense : callose et lignine

Certains stress dont ceux induits par certains métaux lourds sont connus pour stimuler la synthèse de polymères de défenses. Il a été rapporté que le stress oxydatif induit par l'excès de fer dans la carence en phosphate (Abel 2017), la présence d'aluminium (Jones *et al.* 2006) ou de chrome (Eleftheriou *et al.* 2015) provoque une synthèse de callose. D'un autre côté l'aluminium induit l'accumulation de lignine chez le maïs (Vardar *et al.* 2011) et le blé (Hossain *et al.* 2005). Il a été proposé que ce polymère permettrait de réduire l'absorption et donc la toxicité du Cd (Parrotta 2015; Loix *et al.* 2017).

La callose est un β -1,3-glucane qui s'accumule au niveau des connections symplasmiques entre les cellules, les plasmodesmes. Elle permet de jouer sur l'ouverture de ces canaux et ainsi de réguler les échanges symplasmiques intercellulaires (pour revue, voir Nedukha 2015). Par exemple, ce polymère permet d'empêcher le passage du facteur de transcription SHORTROOT du centre quiescent vers les cellules adjacentes lors d'une carence en Pi (Müller *et al.* 2015). Ce phénomène entraîne le phénotype typique d'une carence en Pi, représenté par l'inhibition de la croissance de la racine primaire et le développement des racines latérales (Péret *et al.* 2011).

Pour observer la synthèse et l'accumulation de callose, nous avons utilisé le bleu d'aniline comme rapporteur qui fluoresce sous ultra-violet. Une forte fluorescence a été observée en réponse à l'U (Figure 94A). Dans la condition U20 le signal est très localisé dans le temps et l'espace car restreint aux premières 24 heures et à la zone d'élongation. Dans la condition U30 le signal est plus fort et principalement localisé au niveau de la zone méristématique et de la coiffe. Les signaux disparaissent après 3 jours de traitement et l'accumulation/dégradation de la callose suit exactement les mêmes patterns spatio-temporels que ceux observés dans l'accumulation/détoxication des ROS (Figure 93A).

Etant donné que la racine fluoresce naturellement sous ultra-violet en raison de la présence de nombreux polyphénols dans les parois (subérine et lignine), nous avons réalisé une expérience témoin où les racines ont été observées dans les mêmes conditions mais sans coloration au bleu d'aniline. Les témoins négatifs ne montrent aucune fluorescence spécifique et confirment donc l'accumulation de callose au niveau de l'apex primaire en réponse à l'U (données non présentées).

La lignine est un polymère très complexe qui joue un rôle dans l'imperméabilisation des vaisseaux du xylème et de l'endoderme (pour revue, voir Somssich *et al.* 2016). Ce

polymère renforce aussi les parois secondaires des cellules mortes afin de garder une fonction de maintien mécanique et non plus biologique (Pennell and Lamb 1997). Or, les apex primaires des plantules dans le milieu U30 sont morts entre 3 et 6 jours de traitement. Nous nous sommes donc demandé si l'U induisait la synthèse de lignine. Pour ceci, nous avons coloré les plantules avec une solution de Wiesner (Phloroglucinol - HCl - éthanol) qui produit un précipité rouge lorsqu'il se fixe sur les fonctions coniferaldéhydes présentes dans certains types de lignine (Nakano and Meshitsuka 1992). Aucun précipité rouge n'a été observé dans les conditions LP, NP et U20 (Figure 94B). Par contre, dans la condition U30 un précipité rouge est observé dès 24 heures. Ce dernier s'intensifie au cours du temps et semble être localisé au niveau de la zone de différenciation des cellules en xylème et en phloème (Figure 94B). Dans la condition U30 l'accumulation de lignine est corrélée avec la disparition de la callose (Figure 94A) et la baisse de viabilité cellulaire (Figure 85).

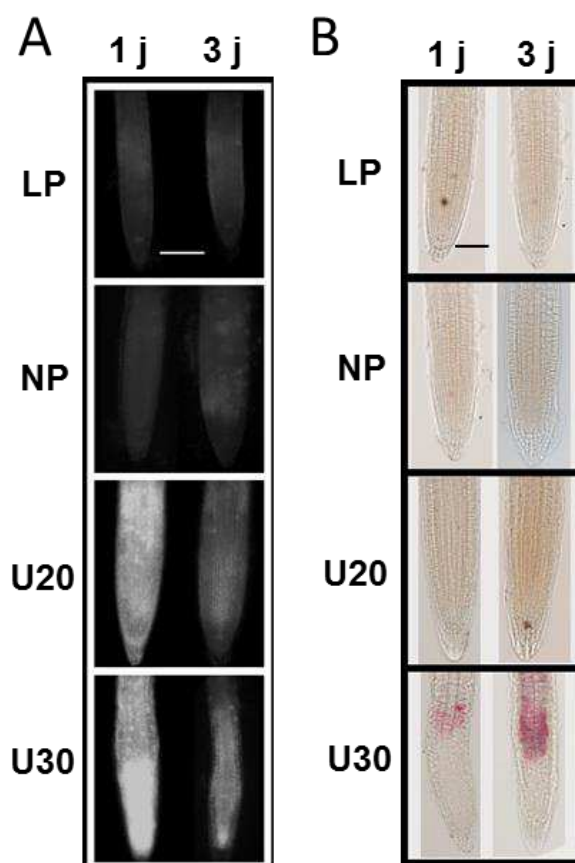


Figure 94. Effet de l'uranium sur la synthèse et l'accumulation de polymères de défense au niveau des parois cellulaires de l'apex racinaire d'*A. thaliana*. Colorations de la callose au bleu d'aniline (A) et de la lignine à la solution de Wiesner (B) dans les apex racinaires primaires de plantules Col0 après 1 et 3 jours de traitement en milieu No Phosphate (NP, 0 μM Pi) Low Phosphate (LP, 25 μM Pi) +/- 20 ou 30 μM de nitrate d'uranyle. (A) Le bleu d'aniline émet une fluorescence bleue sous UV lorsqu'il se fixe sur la callose. Observations effectuées sous microscope à épifluorescence avec un filtre DAPI. Le même temps d'exposition a été conservé pour tous les réplicas (200 ms). Images représentatives de n = 7 à 20 plantules. (B) La solution de Wiesner (phloroglucinol - HCl - éthanol) produit un précipité rouge/marron lorsqu'elle rentre en contact avec de la lignine. Observations effectuées à l'objectif x20 au microscope sous lumière blanche avec un filtre DIC. Images représentatives de n = 5 à 10 plantules. Barre = 100 μm .

F. Perturbation de l'homéostasie de l'auxine par l'uranium

Comme mentionné précédemment, l'U perturbe grandement l'architecture racinaire (Figure 83) et l'expression des gènes liés au développement racinaire (Figure 83), y compris ceux régulant le transport de l'auxine tels que *AUX1* et *PID*. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'auxine et à ses transporteurs dans la racine. L'auxine est une hormone essentielle au développement et à la réponse aux stress chez les végétaux. Elle joue principalement un rôle dans la division et la différenciation cellulaire, permettant par exemple de maintenir les cellules du centre quiescent et les initiales indifférenciées (cellules souches) et ceci grâce à un gradient hormonal orchestré par ses transporteurs (pour revue, voir Overvoorde, Fukaki, and Beeckman 2010). Parmi les transporteurs d'auxine, on trouve les transporteurs PIN-FORMED (PIN) qui permettent de faire sortir l'auxine des cellules (pour revue, voir Křeček *et al.* 2009). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux transporteurs PIN1 et PIN2. Le premier permet de faire descendre l'hormone vers l'apex au niveau du cylindre central et de maintenir un maximum d'hormone au niveau du centre quiescent, tandis que le second permet de faire remonter l'auxine en excès vers les racines latérales et les feuilles par le cortex et l'épiderme. Ce mécanisme est appelé fontaine inversée (Overvoorde, Fukaki, and Beeckman 2010).

Pour étudier la répartition de l'auxine dans l'apex racinaire nous avons utilisé des lignées d'*A. thaliana* exprimant la fusion transcriptionnelle *DR5::GFP*. DR5 est un promoteur rapporteur synthétique constitué de 7 copies du promoteur AuxRe, un promoteur sensible aux ARF, les facteurs de transcription liés à l'auxine (Ulmasov 1997). Ce rapporteur permet d'estimer la quantité d'auxine présente dans la racine en observant le signal GFP lié à l'activation de ce promoteur. L'observation des racines exprimant le rapporteur montre que dans les conditions LP, NP et U20 le signal est similaire et restreint aux cellules souches méristématiques et à la coiffe (Figure 95A). Seule la dose toxique U30 provoque une baisse de signal durant les premières 24 heures de traitement. Cette baisse est suivie d'une disparition complète de signal GFP après 2 jours (Figure 95A).

Pour étudier la localisation du transporteur PIN2, nous avons utilisé des plantules d'*A. thaliana* exprimant la fusion traductionnelle *PIN2::PIN2-GFP*. Le transporteur PIN2 s'exprime dans les cellules de l'épiderme et du cortex (Petrasek and Friml 2009). Dans les conditions LP, NP et U20 le signal GFP est bien observé dans ces deux files cellulaires tout le long de l'expérience (Figure 95B). Dans la condition U30 le signal GFP est aussi correctement localisé après 1 jour de traitement mais ce dernier est très faible. Après 2 jours le signal épidermique reste peu détectable et le signal cortical a totalement disparu (Figure 95B).

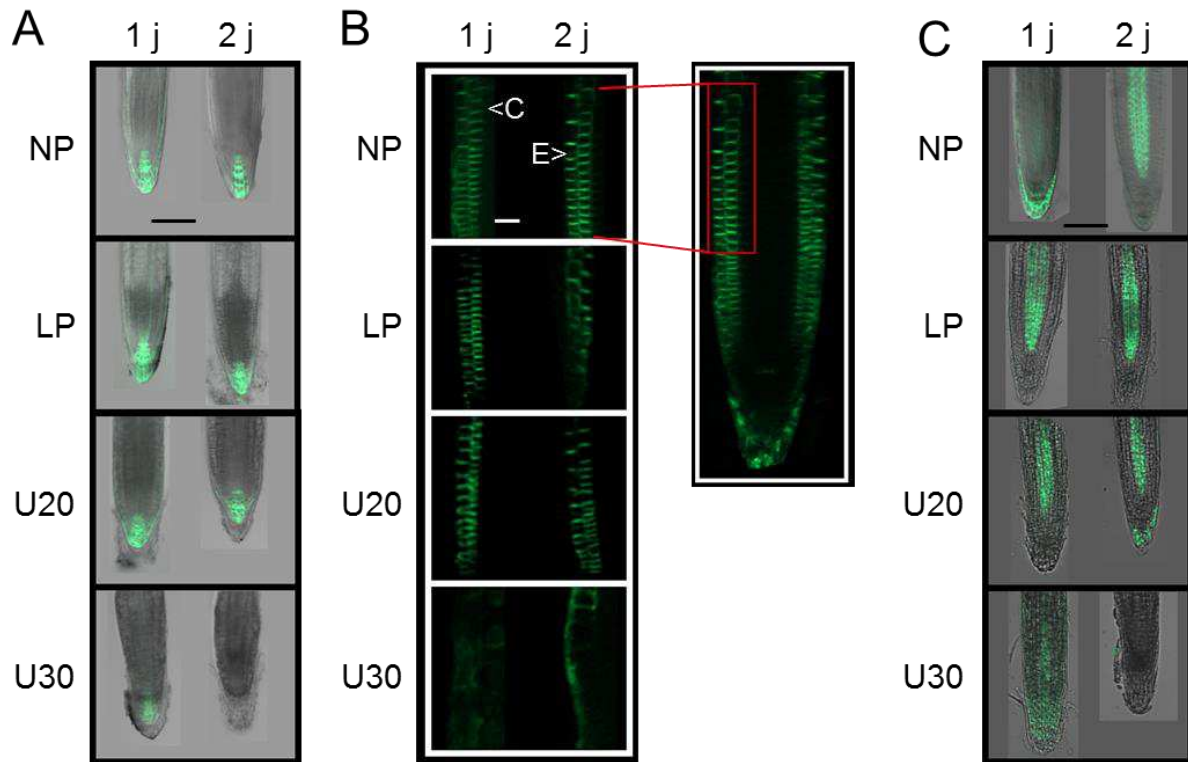


Figure 95. Effet de l'uranium sur la distribution et le transport de l'auxine chez *A. thaliana*. Observations des apex racinaires primaires de plantules d'*A. thaliana Col0* exprimant les constructions (A) DR5::GFP, (B) PIN2::PIN2-GFP et (C) PIN1::PIN1-GFP après 1 et 3 jours de traitement en milieu No phosphate (NP, 0 μM Pi) et Low Phosphate (LP, 25 μM Pi) +/- 20 ou 30 μM de nitrate d'uranyle. (A) Le promoteur DR5 est un promoteur de réponse à l'auxine et permet d'estimer la distribution de l'hormone. Observations effectuées à l'objectif x20 avec un Apotome (Zeiss) sous lumière blanche et avec filtre GFP. Images représentatives de n = 6 à 12 plantules. Barre = 100 μm . (B) Le transporteur PIN2 est un transporteur d'efflux de l'auxine et permet de faire remonter l'auxine. Les cellules de l'épiderme (E) et du cortex (C) sont indiquées. Observations effectuées à l'objectif x20 avec un Apotome (Zeiss) avec filtre GFP. Images représentatives de n = 6 à 10 plantules. Barre = 25 μm . (C) Le transporteur PIN1 est un transporteur d'efflux de l'auxine et permet de faire descendre l'auxine vers le méristème. Observations effectuées à l'objectif x20 avec un Apotome (Zeiss) sous lumière blanche et avec filtre GFP. Images représentatives de n = 6 à 10 plantules. Barre = 100 μm .

Pour étudier la localisation du transporteur PIN1, nous avons utilisé des plantules d'*A. thaliana* exprimant la fusion traductionnelle *PIN1::PIN1-GFP*. Le transporteur PIN1 s'exprime au niveau de la stèle centrale de l'apex racinaire (Petrasek and Friml 2009). Le signal PIN1-GFP observé dans les conditions LP et U20 après 1 ou 2 jours de traitement est cohérent avec cette localisation dans la stèle (Figure 95C). Après 24 heures de traitement dans la condition U30 le signal GFP est faible et localisé dans la partie distale de la stèle et dans la zone méristématique. Après 2 jours le transporteur PIN1 n'est plus détectable dans la condition U30. La baisse du signal DR5 (Figure 95A) est donc temporellement corrélée à la baisse du signal lié au transporteur PIN1 qui fait descendre l'auxine vers l'apex. Ce résultat est similaire à ceux obtenus par (Yuan *et al.* 2013) avec un traitement au Cu. Le patron d'expression du rapporteur *PIN1::PIN1-GFP* est surprenant dans la condition NP. En effet, après 24 heures de

culture dans ce milieu le marquage GFP est restreint à la coiffe alors qu'il est localisé de façon classique dans la stèle après 2 jours de traitement (Figure 95C).

Pour résumer, aucun effet de l'U sur l'homéostasie de l'auxine n'a été observé en présence d'une dose sub-toxique du radionucléide. A une concentration toxique (U30), les signaux *DR5::GFP*, *PIN1::PIN1-GFP* et *PIN2::PIN2-GFP* sont plus faibles dès le premier jour d'exposition et finissent par être quasiment non détectables après 2 jours (Figure 95). Ces baisses de fluorescence étant corrélées avec la baisse de la viabilité cellulaire (Figure 85), il est difficile de distinguer si la disparition des signaux est liée à la mort cellulaire ou à un phénomène de signalisation du stress. Cependant, il a déjà été rapporté que certains métaux lourds provoquaient la disparition du signal lié à l'activité du promoteur DR5 (Lequeux *et al.* 2010; R. Wang *et al.* 2015). Enfin, dans la condition de carence en Pi (NP), la distribution atypique du transporteur PIN1 dans la coiffe au lieu de la stèle à 1 jour de traitement, pourrait provoquer une baisse du gradient d'auxine au niveau de l'apex primaire. Or, il n'y pas d'effet sur le signal *DR5::GFP*. À notre connaissance, aucune étude n'a caractérisé l'effet d'une carence en Pi sur le transporteur PIN1 et nous n'avons donc aucune explication quant à cette disparition temporaire du signal PIN1-GFP.

G. Discussion et conclusion

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence certains processus physiologiques et cellulaires résultant du stress induit par l'U sur le système racinaire de plantules d'*A. thaliana*. Puisque le développement racinaire et la biodisponibilité sont tous les deux influencés par un grand nombre de paramètres environnementaux, incluant les propriétés physico-chimiques et la composition minérale de la rhizosphère, nous avons mis en œuvre des conditions expérimentales nous permettant d'analyser spécifiquement la toxicité du U. Dans ce but, les plantes ont été transférées d'un milieu suffisant en Pi (250 μM) à un milieu carencé en Pi (25 μM) pour réaliser les traitements à l'U. Ces conditions limitantes sont du même ordre de grandeur que les concentrations biodisponibles de Pi dans le sol (10 μM ; Abel 2017) et permettent de limiter la formation de complexes de phosphate d'uranyle qui réduisent la biodisponibilité et donc la toxicité du U (Vanhoudt *et al.* 2008; Misson *et al.* 2009c; Laurette, Larue, Mariet, *et al.* 2012c; Doustaly *et al.* 2014; Berthet *et al.* 2018). Dans ces conditions l'étude de la viabilité cellulaire des apex racinaires primaires a permis d'identifier 2 concentrations de nitrate d'uranyle induisant des réponses contrastées (Figure 85).

A la concentration initiale de 20 μM de nitrate d'uranyle dans le milieu, l'U modifie de façon significative l'architecture racinaire avec une stimulation de la croissance de la racine primaire, une inhibition de l'initiation des racines latérales secondaires et un épaississement de l'apex (Figure 87Figure 88Figure 89). La stimulation de la croissance de la racine primaire

est corrélée avec une très forte stimulation de l'activité mitotique et ce dès 24 heures de traitement (Figure 90). Un effet positif de type induit par un élément toxique appliqué à faible concentration est appelé hormèse (pour revues, voir Poschenrieder *et al.* 2013). Ce type d'effet en réponse à l'U a déjà été rapporté chez *A. thaliana* (Misson *et al.* 2009, Vanhoudt *et al.* 2011). Ce phénomène pourrait être la conséquence d'une surcompensation du stress oxydatif induit par l'U avec une mise en place de mécanismes antioxydants disproportionnés au stress réel, provoquant ainsi un effet bénéfique sur la croissance (Poschenrieder *et al.* 2013).

La toxicité de l'U est révélée à partir de la concentration de 30 μM de nitrate d'uranyle avec un arrêt de la croissance de la racine primaire dès 24 heures de traitement (Figure 87) et une mort cellulaire qui se répand à tout l'apex après 3 jours de traitement (Figure 85). La condition U30 est également caractérisée par la stimulation de l'initiation et de la croissance des racines latérales et des poils absorbants (Figure 88 Figure 92).

La modulation de l'architecture racinaire en réponse à l'U et à la carence en Pi (NP) n'est pas identique mais il existe certains points communs qui suggèrent une relation entre ces 2 stress. Cette hypothèse a été confirmée en quantifiant le P racinaire dans les plantules. En effet, la déplétion du milieu en Pi (condition NP) et une concentration de 20 μM d'U (condition U20) montrent une carence en P similaire (Figure 91). En ce qui concerne la condition U30, la carence est légèrement plus forte, en accord avec une incorporation d'U plus importante par rapport aux plantules dans le milieu U20 (Figure 91).

Les différentes carences en P observées sont corrélées à une déplétion du milieu en Pi au cours du temps (Figure 86), probablement causée par la formation de complexes U-Pi ayant tendance à précipiter, mais aussi à l'interaction du U avec l'homéostasie du Pi dans les cellules. En effet, il a été précédemment démontré que l'U provoquait une forte déplétion de la réserve de Pi cytosolique et des métabolites phosphorylés (Berthet *et al.*, 2018).

Les mécanismes de détection du Pi à l'extérieur et à l'intérieur des cellules durant le développement racinaire ont été décryptés récemment (revue dans Abel, 2017). Les différents paramètres physiologiques et cellulaires analysés au cours de notre étude ont montré que, lors d'un stress induit par l'U, les racines présentent une partie des effets associés à une carence en Pi. En effet, un traitement avec une dose sub-toxique d'U (Figure 92) ou une carence en Pi (Müller *et al.*, 2015) induisent l'accumulation de Fe au niveau de la zone de transition entre la zone d'élongation et la zone méristématique. De plus, le profil d'accumulation du Fe est corrélé avec les sites de production de ROS et du dépôt de callose lors d'une carence en Pi (Müller *et al.*, 2015). Nous avons observé une relation similaire entre le Fe (Figure 92), les ROS (Figure 93) et le dépôt de callose (Figure 94) dans les apex

racinaires de plantules traitées avec de l'U. Lors d'une carence en Pi, le dépôt de callose dans les parois cellulaires au niveau des plasmodesmes inhibe la communication symplasmique entre les cellules et provoque la modulation de l'activité méristématique (Müller *et al.*, 2015). Or, dans la condition U20, les plantules n'accumulent que de façon très transitoire et très localisée ce polymère, résultant en une stimulation de l'activité mitotique. Dans le cas d'un traitement à l'U, le dépôt de callose et l'inhibition de la communication intercellulaire qui en découle serait un moyen de prévenir la diffusion du radionucléide au reste de la plante, comme rapporté pour d'autres ETM (revue par Krzesłowska, 2011). Cette stratégie est potentiellement suffisante pour limiter les effets néfastes de l'U à une dose de 20 µM. Néanmoins, à la concentration de 30 µM, nous avons observé à la fois une accumulation plus forte de callose mais aussi le dépôt de lignine au niveau de la stèle centrale (Figure 94). Le dépôt de lignine dans les parois cellulaires participe à une imperméabilisation des cellules mais pourrait également permettre la fixation des ions uranyles grâce à ses nombreuses fonctions carboxyles et hydroxyles. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'U a tendance à se déposer dans les parois des cellules racinaires (Misson *et al.*, 2009 ; Laurette *et al.*, 2012a). La lignine pourrait ainsi jouer un rôle important dans la limitation de la diffusion de l'U au reste de la plante (Figure 94), rôle déjà démontré pour d'autres ETM (Lequeux *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2018).

Les ROS et le NO sont certainement impliqués dans la signalisation du stress induit par l'U au niveau de l'apex racinaire (Figure 93). En effet, nos résultats montrent qu'à la fois les ROS et le NO s'accumulent dès 6 heures de traitement avec la dose toxique de 30 µM d'U (Figure 93). Ces observations sont en accord avec une publication précédente montrant que le NO est produit dans des plantes d'*A. thaliana* exposées à l'U et que la toxicité du radionucléide est modulée en ajoutant des donneurs ou inhibiteurs de la synthèse de NO (Tewari *et al.*, 2015). Le rôle du NO en tant que molécule signal durant le stress induit par l'U est également supporté par la démonstration que (i) un excès de Fe réduit la croissance racinaire par le biais d'un mécanisme lié au NO (Lin Zhang *et al.* 2018), (ii) la lignine est synthétisée en réponse à de fortes concentrations de NO (Böhm *et al.* 2010), et (iii) le NO est capable d'influencer le cycle cellulaire de façon dose dépendante, de la stimulation à l'inhibition (Novikova *et al.* 2017).

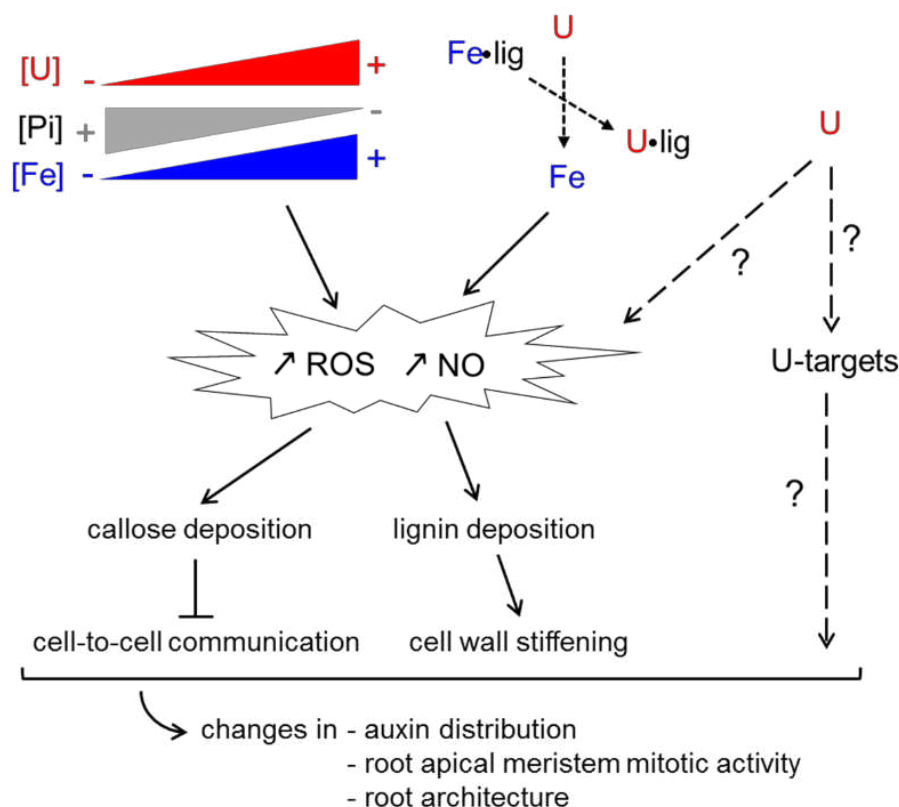


Figure 96. Modèle de la réponse du système racinaire à un stress induit par l'uranium chez *A. thaliana*. L'U induit une carence en Pi qui entraîne une redistribution du Fe dans les tissus racinaires, une production de ROS et un dépôt de callose. Ces événements sont similaires à ceux décrits pour la cascade de signalisation liée à la détection de la carence en Pi dans les racines. En parallèle, l'U et le Fe rentrent en compétition pour la formation de complexes (Pi, acide organique, composants de la paroi, protéines...), phénomène qui participerait au relargage de Fe et à l'induction d'un stress oxydant qui amplifierait les effets de la carence en Pi. Finalement, U pourrait directement affecter la croissance et l'architecture racinaire en interagissant directement avec des acteurs de nature encore inconnus.

Comme expliqué ci-dessus, les effets physiologiques et cellulaires de l'U dépendent en partie de la cascade d'évènements associée à la signalisation d'une carence en Pi (accumulation de ROS dépendante du Fe et dépôt de callose). Le fait que le stress induit par l'U et la carence en Pi ne provoquent pas les mêmes symptômes indique que le radionucléide a un effet toxique direct dans les cellules et/ou qu'il est capable d'amplifier fortement la carence en Pi (Figure 91). La première hypothèse n'est pas supportée par des preuves expérimentales car aucune cible de l'uranyle n'a été identifiée chez les végétaux à ce jour. Néanmoins, l'amplification de la carence en Pi provoquée par la formation de complexes U-Pi peut s'expliquer par l'interaction de l'U avec le Fe. En effet, l'U est à même de rentrer en compétition avec le Fe pour la formation de complexes avec le Pi (Berthet *et al.*, 2018) et/ou pour la complexation avec des molécules de différente nature (acides organiques, protéines...) pouvant à terme relâcher des ions Fe^{3+} (Figure 92). L'ion ferrique peut alors rapidement devenir toxique pour les cellules à travers la formation de ROS *via* la réaction de Fenton. Aucune protéine fixant l'U n'est actuellement connue chez les plantes. Toutefois, la ferritine,

protéine qui contrôle le stress oxydatif lié au Fe (Briat *et al.* 2010; Reyt *et al.* 2015) est une bonne candidate. En effet l'interaction *in vitro* de l'U avec la ferritine humaine (Michon *et al.* 2010) et le remplacement du Fe par de l'U dans des ferritines bactériennes (Cvetkovic *et al.* 2010) ont été décrits. La ferritine n'est pas la seule candidate pour la fixation du radionucléide étant donné que, chez l'homme, l'U peut remplacer le Fe³⁺ de quelques protéines comme les transferrines du sérum, impliquées dans le transport du Fe (Vidaud *et al.* 2007). L'identification de protéines de plante capables de fixer l'U est un des projets actuellement développé dans l'équipe 'Plantes, stress et métaux' du laboratoire PCV. L'identification des cibles de l'U contribuera à améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité de l'U.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans le journal *Environmental and Experimental Botany*.

Serre, Nelson B.C., Claude Alban, Jacques Bourguignon, et Stéphane Ravanel. 2019. « Uncovering the Physiological and Cellular Effects of Uranium on the Root System of *Arabidopsis Thaliana* ». *Environmental and Experimental Botany* 157 (septembre): 121-30. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.004>.

Annexes

Annexe I. *Arabidopsis halleri* est-elle une hyperaccumulatrice d'U ?

Plusieurs publications couvrent l'accumulation d'U chez *A. thaliana* (Berthet *et al.* 2018; Vanhoudt *et al.* 2011; Misson *et al.* 2009). En ce qui concerne l'espèce *A. halleri*, une seule étude a été publiée (Viehweger and Geipel 2010). Cette publication rapporte qu'une population d'*A. halleri* isolée sur un ancien site minier pollué à l'U serait capable d'accumuler en moyenne 50 µg d'U par g de matière sèche dans les racines et entre 4 et 12 µg d'U par g de matière sèche dans les feuilles en condition *in vitro*. Les valeurs racinaires sont dans l'ordre de grandeurs des valeurs d'accumulation racinaire rapportées par Vanhoudt *et al.* (2011) pour des plantes d'*A. thaliana* en culture hydroponique (concentrations d'U similaires). Néanmoins, au niveau de l'accumulation foliaire Viehweger and Geipel (2010) rapportent des valeurs 10 fois plus élevées, ce qui indiquerait que *A. halleri* pourrait hyperaccumuler de l'U. Pour finir, l'effet d'un stress induit par l'U chez l'espèce *A. lyrata* n'a, à notre connaissance, jamais été caractérisé. Nous avons donc souhaité étudier les 3 espèces du genre *Arabidopsis* dans des conditions expérimentales similaires afin de déterminer si les mécanismes impliqués dans l'hyperaccumulation et la tolérance au Cd et au Zn peuvent également s'appliquer à l'U.

Nous avons conduit plusieurs expériences où des plantes de 4 semaines cultivées dans des conditions hydroponiques ont été traitées pendant 10 jours dans un milieu carencé en phosphate (LP, 25 µM de Pi) contenant ou non 50 µM de nitrate d'uranyle (Figure 1). Le traitement U a provoqué un arrêt total de la croissance des feuilles d'*A. thaliana*, un résultat corroboré par la stagnation de la biomasse et de la surface foliaire (Figure 1A et B). Pour les 2 autres espèces, nous n'avons pas observé de différences au niveau des biomasses, bien que les croissances foliaires soient fortement ralenties par le métal. Ce résultat paradoxal peut s'expliquer de plusieurs façons : i) par un épaississement de la feuille ii) et/ou une augmentation de la teneur en eau iii) et/ou par l'architecture foliaire des deux espèces présentant de longs et fins pétioles qui participent peu à la surface foliaire mais participent de façon significative à la biomasse. Au niveau de la photosynthèse, aucune différence significative n'a été détectée sur la durée de l'expérience (données non montrées), que ce soit entre espèces ou en fonction du traitement appliqué.

Lors de la récolte des pétioles et des feuilles des 3 espèces, nous avons observé que ces organes présentaient une pigmentation de couleur rouge à violette (Figure 2A). Or, les anthocyanes sont des pigments rouges à bleus (selon le pH) dont la production est modulée en conditions de stress chez les végétaux (Akula and Ravishankar 2011). De plus, il a déjà été rapporté qu'elles étaient synthétisées et accumulées en réponse à l'U (Doustaly *et al.* 2014; Berthet *et al.* 2018). Nous avons extrait et quantifié ces pigments par spectrophotométrie et avons montré que les 3 espèces accumulent des anthocyanes en réponse à une exposition à l'U (Figure 2D). Des 3 espèces, *A. thaliana* est celle qui accumule le plus d'anthocyanes

(Figure 2D). *A. lyrata* montre des niveaux d'accumulation faibles dans les feuilles, ce qui s'explique par le fait que le pigment semble principalement s'accumuler dans les pétioles (Figure 2A).

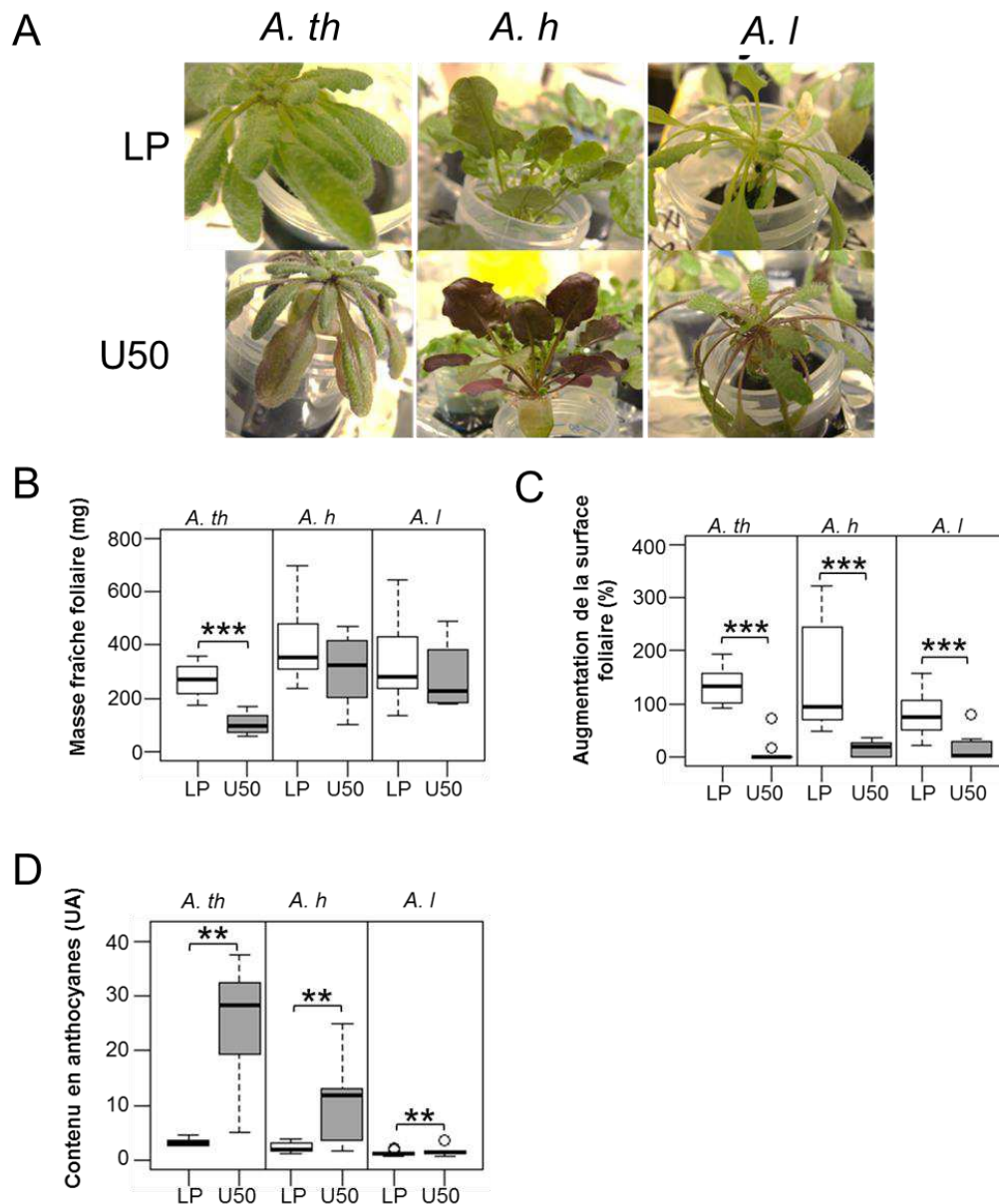


Figure 1. Effet de l'uranium sur le système aérien des 3 espèces du genre *Arabidopsis*. Plantes d'*A. thaliana*, *A. halleri* et *A. lyrata* âgées de 4 semaines en hydroponie. Observation réalisées après 10 jours de traitement +/- 50 μ M de nitrate d'uranyle en milieu carencé en phosphate (LP, 25 μ M de Pi). (A) Montage photographique des appareils foliaires après 10 jours de traitement. (B) Masses fraîches foliaires à la fin du traitement. (C) Augmentation de la surface foliaire en % (valeur Jour 10 / valeur Jour 0) x100 sur la durée du traitement. (D) Quantification par spectrophotométrie du contenu en anthocyanes. UA : Unité arbitraire. * : Valeur statistiquement différente de la valeur contrôle (** : pvalue < 0,005 ; ** : pvalue < 0,005) d'après un test de Dunnett. *A. th.* : *Arabidopsis thaliana* écotype Col0. *A. h.* : *Arabidopsis halleri* population Auby. *A. l.* : *Arabidopsis lyrata* sous espèce *petraea*.. n = 9 plantes.

Pour déterminer si les mécanismes d'accumulation de l'espèce *A. halleri* sont communs entre le Cd, le Zn et l'U, nous avons mesuré les concentrations racinaires et foliaires de l'élément toxique dans des plantes exposées à 50 μ M de nitrate d'uranyle en conditions

hydroponiques. Ces mesures ont été effectuées après minéralisation à l'acide nitrique et dosages ICP-MS. La quantification de l'U dans les tissus racinaires (Figure 3A) montre qu'*A. lyrata* accumule plus d'U qu'*A. thaliana* au niveau des racines. Les quantités d'U entre *A. thaliana* et *A. halleri* sont similaires. La quantité d'U transportée vers l'appareil foliaire est faible et similaire pour les 3 espèces d'*Arabidopsis* (Figure 3B), ce qui se reflète sur les taux de translocation qui ne sont pas différents d'une espèce à l'autre (Figure 3C).

Ce constat suggère que les mécanismes liés à l'hyperaccumulation de Cd, tel que la triplification du transporteur HMA4, ne sont pas liés à l'accumulation d'U. Ce résultat n'est pas surprenant d'un point de vue chimique étant donné la nature de ces 2 métaux, l'U étant un métal dur et le Cd, un métal mou. Étant donné que la population utilisée dans la publication de Viehweger and Geipel (2010) provient d'un sol métallicole contaminé à l'U, il se peut que celle-ci est développée de façon indépendante des mécanismes d'hyperaccumulation d'U. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les mécanismes de tolérance au Cd et au Zn peuvent être différents entre les populations d'*A. halleri*. C'est par exemple le cas entre la population PL22, qui est une hyperaccumulatrice de Cd et de Zn et la population I16 qui exclue le métal de ces tissus (Schvartzman *et al.* 2018 ; Corso *et al.* 2018).

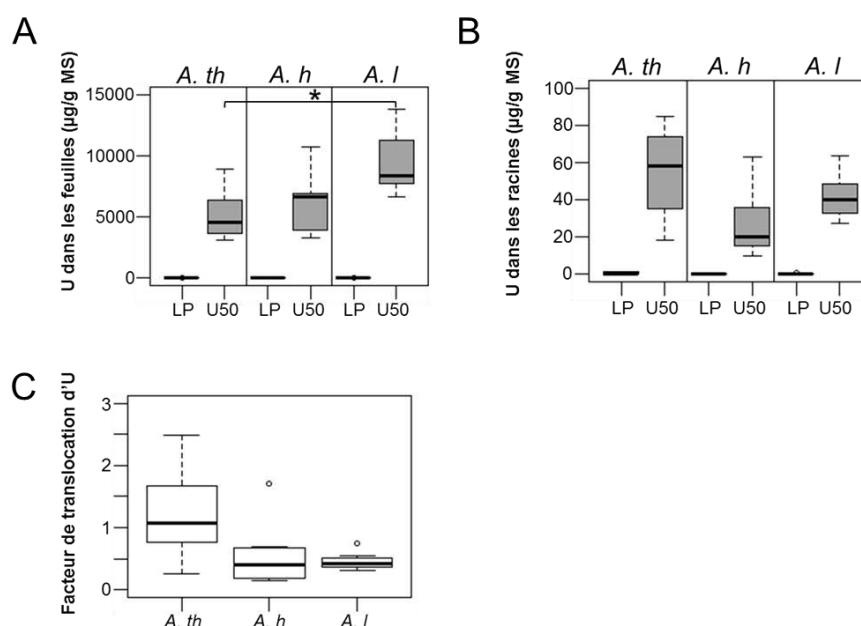


Figure 3. Accumulation et translocation de l'uranium chez les 3 espèces du genre *Arabidopsis*. Dosage du contenu en U dans des plantes d'*A. thaliana*, *A. halleri* et *A. lyrata* âgées de 4 semaines en hydroponie et 10 jours de traitements +/- 50 µM de nitrate d'uranyle en milieu carencé en phosphate (LP, 25 µM de Pi). (A) Contenus en U dans l'appareil racinaire et (B) dans l'appareil foliaire déterminés par ICP-MS après minéralisation à l'acide nitrique. (C) Facteur de translocation de l'U des racines vers les feuilles. * : Valeur statistiquement différente (pvalue < 0,05) d'après un test de Dunnett. n = 5 plantes individuelles. A. th. : *Arabidopsis thaliana* écotype Col0. A. h : *Arabidopsis halleri* population Auby. A. l : *Arabidopsis lyrata* sous espèce *petraea*.

Annexe II. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est inconnue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par l'uranium chez *A. thaliana*.

Les gènes différentiellement exprimés codant pour des protéines kinases dont la fonction biologique est connue dans la littérature sont compilés. Les données ont été extraites de Doustaly et al. 2014. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les 3 répliques en condition contrôle (eau) et les trois répliques en condition U (eau + 50 μ M U) grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était surexprimée ou réprimée plus 2 fois ont été sélectionnés (log2 de 1 ou -1). L'expression est exprimée en base log2.

AT	Nom	Nom complet	Expression racinaire log ₂ U/CM		
			2 h	6 h	30 h
AT1G03740	AT1G03740	Protein kinase superfamily protein	-1,23	-1,1	-1,16
AT1G05700	AT1G05700	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase protein	-1,08	-1,17	-1,15
AT1G66880	AT1G66880	Protein kinase superfamily protein	1,04	1,53	1,83
AT2G17220	Kin3	Protein kinase superfamily protein	1,07	1,23	1,4
AT2G30040	MAPKKK14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	1,01	1,47	1,61
AT2G42880	MPK20	MAP kinase 20	-1,65	-1,11	-1,46
AT3G17510	CIPK1	CBL-interacting protein kinase 1	1,03	1,02	2,15
AT3G27560	ATN1	Protein kinase superfamily protein	-1	-1	-1,5
AT3G56050	AT3G56050	Protein kinase family protein	-1,46	-0,73	-1,32
AT3G59350	AT3G59350	Protein kinase superfamily protein	1,64	1,66	1,08
AT4G36950	MAPKKK21	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 21	1,7	1,78	1,57
AT5G16590	AT5G16590	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	-1,09	-1,2	-1,49
AT5G47070	AT5G47070	Protein kinase superfamily protein	1,2	1,66	1
AT5G59680	AT5G59680	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	-1,22	-1,05	-1,08

Annexe III. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est inconnue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par le cadmium chez *A. thaliana*.

Les gènes différentiellement exprimés codant pour des protéines kinases dont la fonction biologique est connue dans la littérature sont compilés. Les résultats de Weber *et al.*(2006) ont été compilés et représentent l'expression des gènes dans des racines de plantes âgées de 3 semaines en hydroponie après 2 heures de traitement avec 10 ou 50 μM de sel de Cd non spécifié. Les résultats d'Herbette *et al.* (2006) ont été compilés et représentent l'expression des gènes dans des racines de plantes âgées de 4 semaines en hydroponie après 2, 6 et 30 heures de traitement avec 5 ou 50 μM de sulfate de Cd. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les réplicas en condition contrôle et les réplicas en condition Cd grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, $p\text{value} < 0,05$). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 2 fois ont été sélectionnés ($\log_2 > 1$ ou < -1). L'expression est exprimée en base \log_2 .

AT	Nom	Nom complet	Expression racinaire \log_2 Cd/CM	
			Weber <i>et al.</i> 2006	Herbette <i>et al.</i> 2006
AT1G08590	AT1G08590	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	-2,11	-2,11
AT1G18890	CDPK1	calcium-dependent protein kinase 1	1,43	-1,32
AT1G48480	RKL1	receptor-like kinase 1	-1,26	-1,03
AT1G61360	AT1G61360	S-locus lectin protein kinase family protein	1,58	1,39
AT1G61370	AT1G61370	S-locus lectin protein kinase family protein	1,72	1,65
AT1G70130	AT1G70130	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	3,35	1,2
AT2G13800	SERK5	somatic embryogenesis receptor-like kinase 5	0,74	1,07
AT2G17220	Kin3	Protein kinase superfamily protein	1,44	1,54
AT2G26290	ARSK1	root-specific kinase 1	0,97	1,42
AT2G40270	AT2G40270	Protein kinase family protein	1,48	1,1
AT2G43230	AT2G43230	Protein kinase superfamily protein	0,82	1,05
AT3G09010	AT3G09010	Protein kinase superfamily protein	1,70	1,03
AT4G09570	CPK4	calcium-dependent protein kinase 4	0,52	1,21
AT4G18250	AT4G18250	receptor Serine/Threonine kinase-like protein	1,74	1,22
AT4G18950	AT4G18950	Integrin-linked protein kinase family	1,60	1,02

Annexe IV. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est inconnue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par le cadmium dans la population d'*A. halleri* PL22.

Les gènes différentiellement exprimés codant pour des protéines kinases dont la fonction biologique est connue dans la littérature sont compilés. L'expression différentielle de chaque gène a été étudiée entre les répliques en condition contrôle et les répliques en condition Cd grâce à un test de Student non-paramétrique (package Nparcomp, Logiciel R, pvalue < 0,05). Selon le consensus, seuls les gènes dont l'expression était induite ou réprimée plus de 1,4 fois ont été sélectionnés ($\log_2 > 0,5$ ou $< -0,5$). L'expression est exprimée en base \log_2 .

		Expression \log_2 Cd/CM	
			Feuilles Racines
AT1G01450	AT1G01450	Protein kinase superfamily protein	0,00 -1,02
AT1G07150	MAPKKK13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	0,00 -0,69
AT1G49100	AT1G49100	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,00 -1,31
AT1G51820	AT1G51820	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,00 -1,22
AT1G51870	AT1G51870	protein kinase family protein	0,00 -0,60
AT1G56120	AT1G56120	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	0,00 0,59
AT1G61370	AT1G61370	S-locus lectin protein kinase family protein	-0,69 0,00
AT1G61590	AT1G61590	Protein kinase superfamily protein	-1,27 0,00
AT1G61950	CPK19	calcium-dependent protein kinase 19	0,00 -1,04
AT1G65250	AT1G65250	Protein kinase superfamily protein	-0,59 0,00
AT1G66830	AT1G66830	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,00 -0,55
AT1G67000	AT1G67000	Protein kinase superfamily protein	1,56 0,75
AT1G69730	AT1G69730	Wall-associated kinase family protein	0,00 0,67
AT1G70250	AT1G70250	receptor serine/threonine kinase	0,00 -0,70
AT1G70430	AT1G70430	Protein kinase superfamily protein	0,69 -1,05
AT1G72540	AT1G72540	Protein kinase superfamily protein	-0,80 0,55
AT1G76040	CPK29	calcium-dependent protein kinase 29	0,00 0,59
AT2G34180	CIPK13	CBL-interacting protein kinase 13	0,00 -0,56
AT3G10660	CPK2	calmodulin-domain protein kinase cdpk isoform 2	0,00 -0,81
AT3G24240	AT3G24240	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	-0,72 0,00
AT3G25840	AT3G25840	Protein kinase superfamily protein	0,00 -1,29
AT3G45410	AT3G45410	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	-0,85 -0,54
AT3G46410	AT3G46410	Protein kinase superfamily protein	0,92 0,00
AT3G53590	AT3G53590	LRR receptor-like Serine/Threonine-kinase	-1,08 0,00
AT3G54180	CDKB1;1	cyclin-dependent kinase B1;1	0,00 -2,40
AT4G21230	CRK27	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 27	0,00 -1,22
AT4G23270	CRK19	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 19	-0,80 0,00
AT4G32660	AME3	Protein kinase superfamily protein	0,51 0,00
AT5G10930	CIPK5	CBL-interacting protein kinase 5	0,83 0,00
AT5G38260	AT5G38260	Protein kinase superfamily protein	0,83 0,80
AT5G39000	AT5G39000	Malectin/receptor-like protein kinase family protein	0,00 1,05
AT5G39390	AT5G39390	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,00 0,93
AT5G42120	AT5G42120	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,00 -0,72
AT5G53450	ORG1	OBP3-responsive protein 1	1,67 0,69
AT5G59670	AT5G59670	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,00 0,73

Table des figures

Figure 1. Liens entre spéciation, biodisponibilité et activité biologique d'un élément trace métallique. .	5
Figure 2. Spéciation de l'U et bioaccumulation.	6
Figure 3. Absorption des nutriments et paroi cellulaire.	7
Figure 4. Transport des éléments dans les racines et vers les feuilles..	8
Figure 5. Tolérance au cadmium de différentes espèces du genre Arabidopsis.	11
Figure 6. Réponse séquentielle des plantes au stress.	13
Figure 7. Implication du fer ionique dans la production d'espèces réactives de l'oxygène.	14
Figure 8. Schéma du stress oxydatif et de ses conséquences chez les végétaux.	15
Figure 9. Les principaux systèmes enzymatiques de détoxication des ROS chez les végétaux.	16
Figure 10. Perturbation du pool de glutathion et de détoxication des ROS par le Cd..	17
Figure 11. Croissance, ions métalliques et hormèse.	19
Figure 12. Différents acteurs de la réponse aux stress abiotiques.	20
Figure 13. Exemple de cascade de signalisation impliquant les Mitogen Activated Protein Kinases...	21
Figure 14. Expression du gène <i>IRT1</i> au cours du temps lors d'un stress induit par l'U.	23
Figure 15. Schéma simplifié illustrant la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes.....	24
Figure 16. Illustration des différents types d'épissage alternatif.	25
Figure 17. Produits et rôle de l'épissage alternatif chez les végétaux.	26
Figure 18. Du génome aux modifications post-traductionnelles.	31
Figure 19. Illustration de la diversité des PTM et de leurs effets sur les protéines cibles.....	32
Figure 20. Structure des acides aminés phosphorylés sur leurs chaînes latérales.	33
Figure 21. Structure et activation des CDPK.....	34
Figure 22. Structure des protéines kinases SnRK2.	35
Figure 23. La voie Salt Over Sensitive dans la réponse à un stress induit par le sodium..	36
Figure 24. Modèle de la fonction des kinases de type WAK dans la détection de la dégradation de la pectine.	37
Figure 25. Régulation du cycle cellulaire.....	38
Figure 26. Rôle de BIN2 dans la signalisation des brassinostéroïdes.....	39
Figure 27. Structures et domaines des Phosphoprotéines Phosphatases.	40

Figure 28. Activation des pompes à protons et ouverture des stomates.	41
Figure 29. Régulation de la polarité du transporteur d'auxine PIN1 par phosphorylation..	42
Figure 30. Rôle d'ABI1 et ABI2 dans la signalisation de l'acide abscissique.....	43
Figure 31. Système de réception des brassinostéroïdes.....	44
Figure 32. Modèle de la signalisation des cytokinines.....	45
Figure 33. Représentation schématique de la méthylation d'une protéine cible par une protéine méthyltransférase (PMT).....	46
Figure 34. Représentation des 4 classes de réactions de méthylation (N-, O-, C- et S-méthylation) intervenant sur différents acides aminés.....	48
Figure 35. Classification des méthyltransférases AdoMet dépendantes en 5 classes structurales.. ...	50
Figure 36. Illustration de la diversité des réactions de méthylation des protéines et de leur implication dans divers processus cellulaires.....	51
Figure 37. Formation de différents résidus arginines méthylés par les PRMT.....	52
Figure 38. Déméthylation des résidus Arg diméthylés par JMJD6.....	56
Figure 39. Déimination des résidus Arg non méthylés (A) et monométhylés (B) par PADI4.....	56
Figures revue "An outlook on lysine methylation of non-histone proteins in plants"	
Figure 1. The biochemical mechanisms of protein lysine methylation and demethylation.....	58
Figure 2. Phylogenetic analysis of protein lysine methyltransferases from the SBS superfamily.	61
Figure 3. The protein lysine methylation map of the cell.....	63
Figure 40. Organisation de la racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
Figure 41. Différentes zones de l'apex racinaire.....	74
Figure 42. Organisation du méristème apical racinaire d' <i>A. thaliana</i>	75
Figure 43. Signalisation de l'auxine par la voie SCF/TIR1.....	77
Figure 44. Transport polarisé et gradient d'accumulation de l'auxine.....	78
Figure 45. Modulation de l'élongation des cellules végétale par l'auxine.....	78
Figure 46. Modulation de l'architecture racinaire en réponse à une carence en phosphate.....	80
Figure 47. Réponse du système racinaire à une carence en phosphate.....	80
Figure 48. Les trois espèces du genre <i>Arabidopsis</i> étudiées au cours de ce travail.....	82
Figure 49. Représentation schématique du vecteur pFP101 (A) et observation de graines d' <i>Arabidopsis</i> issues d'une plante transformée par pFP101-SBS2 (B).....	91

Figure 50. Etude par Western blot des protéines triméthylées sur des résidus lysines chez <i>Arabidopsis</i> lors d'un stress induit par le Cd.	100
Figure 51. Etude par Western blot des protéines triméthylées sur des résidus lysines chez deux populations d' <i>A. halleri</i> lors d'un stress induit par le Cd.....	101
Figure 52. Etude par Western blot des protéines méthylées sur des résidus lysine chez <i>Arabidopsis</i> lors d'un stress induit par l'uranium.....	102
Figure 53. Gels d'électrophorèse utilisés pour l'identification de protéines triméthylées par spectrométrie de masse.....	103
Figure 54. Analyse phylogénétique des protéines lysine méthyltransférases de la famille des seven-beta-strand (SBS) chez <i>A. thaliana</i>	109
Figure 55. Heatmap représentant les gènes codant des protéines lysines méthyltransférases dont l'expression est modulée en réponse à l'uranium chez <i>A. thaliana</i>	115
Figure 56. Heatmap représentant les gènes codant pour des protéines lysine méthyltransférases dont l'expression est modulée en réponse au cadmium chez <i>A. thaliana</i>	116
Figure 57. Expression des gènes codant des protéines lysine méthyltransférases dont l'expression est modulée en réponse au cadmium dans les populations métallicoles PL22 et I16 d' <i>A. halleri</i>	119
Figure 58. Expression des gènes codant des protéines déméthylases dont l'expression est modulée en réponse au cadmium dans les populations métallicoles PL22 et I16 d' <i>A. halleri</i>	119
Figure 59. Influence des milieux gélosés sur la toxicité de l'uranium sur des plantules d' <i>A. thaliana</i> ..	122
Figure 60. Caractérisation du mutant <i>ppkmt1</i> pour sa tolérance au Cd..	124
Figure 61. Analyse SDS-PAGE illustrant la purification de la protéine TRXm1 recombinante.....	125
Figure 62. Test de méthylation <i>in vitro</i> de la protéine TRXm1 par du stroma de chloroplaste.....	126
Figure 63. Tests d'élongation racinaire <i>in vitro</i> du sauvage Col0 et du mutant <i>cad2.1</i> dans des milieux contenant du cadmium..	128
Figure 64. Heatmap présentant le bilan du criblage des mutants de PKMT en présence de cadmium..	130
Figure 65. Tolérance au Cd du mutant <i>camkmt1</i>	132
Figure 66. Tolérance au Cd du mutant <i>sbs2</i>	133
Figure 67. Tolérance au Cd du mutant <i>sbs2b</i>	134

Figure 68. Organisation du gène <i>SBS2</i>	134
Figure 69. Amplification des transcrits <i>SBS2</i> chez le sauvage Col0 et les lignées mutantes <i>sbs2</i> et <i>sbs2b</i>	135
Figure 70. Effets du cadmium sur le système aérien du mutant <i>sbs2</i>	136
Figure 71. Accumulation de cadmium dans les feuilles et racines du mutant <i>sbs2</i>	137
Figure 72. Modèles tridimensionnels de l'organisation de la protéine <i>SBS2</i>	138
Figure 73. Production bactérienne et purification de la protéine recombinante <i>SBS2.2</i>	139
Figure 74. Test de l'anticorps dirigé contre la protéine <i>SBS2.2</i>	140
Figure 75. Production bactérienne et purification de la protéine recombinante <i>SBS2.4</i>	140
Figure 76. Etude par Western blot des protéines phosphorylées chez <i>Arabidopsis</i> lors de stress induits par différents éléments traces métalliques.....	145
Figure 77. Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant pour des protéines kinases dont l'expression est modulée au cours du temps lors d'un stress induit par l'uranium chez <i>A. thaliana</i>	146
Figure 78. Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant pour des protéines phosphatases dont l'expression est modulée au cours du temps lors d'un stress induit par l'uranium chez <i>A. thaliana</i>	149
Figure 83. Heatmap représentant les gènes liés à la phosphorylation dont l'expression est modulée en réponse au cadmium chez <i>A. thaliana</i>	152
Figure 80. Diagramme de Venn représentant les gènes liés à la phosphorylation des protéines dont l'expression est modulée lors d'un stress induit par le cadmium chez <i>A. thaliana</i>	153
Figure 81. Expression des gènes codant des protéines kinases dont l'expression est modulée en réponse au Cd dans les populations métallicoles d' <i>A. halleri</i> PL22 et I16.....	156
Figure 82. Expression des gènes codant des protéines phosphatases dont l'expression est modulée en réponse au cadmium dans les populations d' <i>A. halleri</i> métallicoles PL22 et I16.....	160
Figure 85. Perturbation de l'architecture racinaire et de l'expression des gènes liés au développement racinaire chez <i>A. thaliana</i> exposée à l'uranium.....	163
Figure 84. Système de croissance hydroponique μ Ponics.....	165
Figure 85. Effet de doses croissantes d'uranium sur la viabilité cellulaire de l'apex racinaire primaire d' <i>A. thaliana</i> au cours du temps.....	166

Figure 86. Quantification du phosphate et de l'uranium biodisponibles dans les milieux de culture au cours du temps..	167
Figure 89. Effets de de l'uranium sur le développement de la racine primaire d' <i>A. thaliana</i>	169
Figure 88. Effet de l'uranium sur l'initiation des racines latérales d' <i>A. thaliana</i> .	170
Figure 89. Effet de l'uranium sur le diamètre de l'apex, de l'épiderme et du cortex des racines d' <i>A. thaliana</i> .	171
Figure 90. Effet de l'uranium sur l'activité mitotique des apex racinaires d' <i>A. thaliana</i> .	172
Figure 91. Quantification de l'uranium et du phosphore chez <i>A. thaliana</i> exposée à des doses croissantes d'uranium.....	174
Figure 92. Effet de l'uranium sur l'homéostasie du fer chez <i>A. thaliana</i> .	175
Figure 93. Effet de l'uranium sur l'accumulation de ROS et de NO au niveau de l'apex racinaire d' <i>A. thaliana</i>	177
Figure 94. Effet de l'uranium sur la synthèse et l'accumulation de polymères de défense au niveau des parois cellulaires de l'apex racinaire d' <i>A. thaliana</i> .	179
Figure 95. Effet de l'uranium sur la distribution et le transport de l'auxine chez <i>A. thaliana</i>	181
Figure 96. Modèle de la réponse du système racinaire à un stress induit par l'uranium chez <i>A. thaliana</i>	185

Table des tableaux

Tableau 1. Liste et classification des nutriments essentiels chez les végétaux.....	1
Tableau 2. Classification des acides et bases de Lewis selon Pearson.....	4
Tableau 3. Exemple d'espèces hyperaccumulatrices de métaux.....	12
Tableau 4. Méthylation des arginines chez <i>A. thaliana</i> : enzymes, substrats et processus cellulaires impactés.....	55
Tableaux de la revue "An outlook on lysine methylation of non-histone in plants"	
Table 1. Lysine methylated non-histone proteins in land plants.....	64
Table 2. The emerging protein lysine methyltransferases-substrates network in plants.....	67
Tableau 5. Caractéristiques des mutants d'insertion d' <i>A. thaliana</i> dans des gènes codant des protéines lysine méthyltransférases.....	89
Tableau 6. Séquences des amorces utilisées pour l'étude du gène <i>SBS2</i> d' <i>A. thaliana</i>	90
Tableau 7. Amorces et vecteurs utilisés pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes.....	92
Tableau 8. Identification de peptides triméthylés sur des lysines par MS/MS dans le genre <i>Arabidopsis</i> en réponse à un stress induit par le Cd.....	106
Tableau 9. Liste des gènes codant pour les protéines lysine méthyltransférases à domaine SET utilisées dans l'étude.....	108
Tableau 10. Liste des gènes codant pour les protéines lysine méthyltransférases à domaine seven beta stands utilisées dans l'étude.....	110
Tableau 11. Liste des gènes codant pour les protéines déméthylases utilisées dans l'étude.....	111
Tableau 12. Description des études sélectionnées pour étudier l'expression des gènes liés aux modifications post-traductionnelles lors d'un stress induit par le Cd chez <i>A. thaliana</i>	113
Tableau 13. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est connue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par l'uranium chez <i>A. thaliana</i>	148
Tableau 14. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est connue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par le cadmium chez <i>A. thaliana</i>	153
Tableau 15. Liste des gènes codant pour des protéines kinases dont la fonction est connue et dont l'expression est modulée en réponse à un stress induit par le cadmium dans la population d' <i>A. halleri</i> PL22.....	158
Tableau 16. Simulation de la spéciation du phosphate et de l'uranium dans les milieux de culture.....	168

Références

Références

- Abel, Steffen. 2017. "Phosphate Scouting by Root Tips." *Current Opinion in Plant Biology* 39 (October): 168–77. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.016>.
- Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (France), Martine Ramel, Nadine Duesco, and Valérie 8. 2015. *Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués: état de l'art et guide de mise en oeuvre*. Les Ulis (Essonne): EDP sciences.
- Agius, F., A. Kapoor, and J.-K. Zhu. 2006. "Role of the Arabidopsis DNA Glycosylase/lyase ROS1 in Active DNA Demethylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (31): 11796–801. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603563103>.
- Ahmed, Golam J., Xiao-Jian Xia, Xin Li, Kai Shi, Jing-Quan Yu, and Yan-Hong Zhou. 2015. "Role of Brassinosteroid in Plant Adaptation to Abiotic Stresses and Its Interplay with Other Hormones." *Current Protein & Peptide Science* 16 (5): 462–73.
- Ahmad, Ayaz, and Xiaofeng Cao. 2012. "Plant PRMTs Broaden the Scope of Arginine Methylation." *Journal of Genetics and Genomics* 39 (5): 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.001>.
- Ahmad, Ayaz, Yuzhu Dong, and Xiaofeng Cao. 2011. "Characterization of the PRMT Gene Family in Rice Reveals Conservation of Arginine Methylation." *PLoS One* 6 (8): e22664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022664>.
- Akula, Ramakrishna, and Gokare Aswathanarayana Ravishankar. 2011. "Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants." *Plant Signaling & Behavior* 6 (11): 1720–31. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>.
- Alban, C., J. Jullien, D. Job, and R. Douce. 1995. "Isolation and Characterization of Biotin Carboxylase from Pea Chloroplasts." *Plant Physiology* 109 (3): 927–35. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.927>.
- Alban, Claude, Dominique Job, and Roland Douce. 2000. "B IOTIN M ETABOLISM IN P LANTS." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51 (1): 17–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.17>.
- Alban, Claude, Marianne Tardif, Morgane Mininno, Sabine Brugière, Annabelle Gilgen, Sheng Ma, Meryl Mazzoleni, et al. 2014. "Uncovering the Protein Lysine and Arginine Methylation Network in Arabidopsis Chloroplasts." Edited by Albert Jeltsch. *PLoS ONE* 9 (4): e95512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095512>.
- Alia, and P. Pardha Saradhi. 1991. "Proline Accumulation Under Heavy Metal Stress." *Journal of Plant Physiology* 138 (5): 554–58. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80240-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80240-3).
- Allorent, Guillaume, Sonia Osorio, Joseph Ly Vu, Denis Falconet, Juliette Jouhet, Marcel Kuntz, Alisdair R. Fernie, et al. 2015. "Adjustments of Embryonic Photosynthetic Activity Modulate Seed Fitness in *Arabidopsis Thaliana*." *New Phytologist* 205 (2): 707–19. <https://doi.org/10.1111/nph.13044>.
- Allorent, Guillaume, Ryutaro Tokutsu, Thomas Roach, Graham Peers, Pierre Cardol, Jacqueline Girard-Bascou, Daphné Seigneurin-Berny, et al. 2013. "A Dual Strategy to Cope with High Light in *Chlamydomonas Reinhardtii*." *The Plant Cell* 25 (2): 545–57. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108274>.
- Álvarez-Fernández, Ana, Pablo D'az-Benito, Anunciación Abad-a, Ana-Flor López-Millán, and Javier Abad-a. 2014. "Metal Species Involved in Long Distance Metal Transport in Plants." *Frontiers in Plant Science* 5 (March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00105>.
- Alvarez-Venegas, Raúl. 2014. "Bacterial SET Domain Proteins and Their Role in Eukaryotic Chromatin Modification." *Frontiers in Genetics* 5: 65. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00065>.
- Alves, Murilo S., Silvana P. Dadalto, Amanda B. Gonçalves, Gilza B. De Souza, Vanessa A. Barros, and Luciano G. Fietto. 2013. "Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4): 7815–28. <https://doi.org/10.3390/ijms14047815>.
- Andersen, Tonni Grube, Marie Barberon, and Niko Geldner. 2015. "Suberization?the Second Life of an Endodermal Cell." *Current Opinion in Plant Biology* 28 (December): 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.004>.
- Anke, M., O. Seeber, R. Müller, U. Schäfer, and J. Zerull. 2009. "Uranium Transfer in the Food Chain from Soil to Plants, Animals and Man." *Chemie Der Erde - Geochemistry* 69 (February): 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2007.12.001>.
- Aquea, F., A. Vega, T. Timmermann, M. J. Poupin, and P. Arce-Johnson. 2011. "Genome-Wide Analysis of the SET DOMAIN GROUP Family in Grapevine." *Plant Cell Rep* 30 (6): 1087–97. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1015-0>.
- Aranjuelo, Iker, Fany Doustaly, Jana Cela, Rosa Porcel, Maren Müller, Ricardo Aroca, Sergi Munné-Bosch, and Jacques Bourguignon. 2014. "Glutathione and Transpiration as Key Factors Conditioning Oxidative Stress in Arabidopsis Thaliana Exposed to Uranium." *Planta* 239 (4): 817–30. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2014-x>.
- Arıkan, Burcu, Sibel Özden, and Neslihan Turgut-Kara. 2018. "DNA Methylation Related Gene Expression and Morphophysiological Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis Thaliana." *Environmental and Experimental Botany* 149 (May): 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.01.011>.
- Arnaud, Dominique, Marie Desclos-Theveniau, and Laurent Zimmerli. 2012. "Disease Resistance to Pectobacterium Carotovorum Is Negatively Modulated by the Arabidopsis Lectin Receptor Kinase LecRK-V.5." *Plant Signaling & Behavior* 7 (9): 1070–72. <https://doi.org/10.4161/psb.21013>.
- Ashtiyani, Raheleh Karimi, Ali Mohammad Banaei Moghaddam, Veit Schubert, Twan Rutten, Jörg Fuchs, Dmitri Demidov, Frank R. Blattner, and Andreas Houben. 2011. "AtHaspin Phosphorylates Histone H3 at Threonine 3 during Mitosis and Contributes to Embryonic Patterning in Arabidopsis: Arabidopsis Haspin-like Kinase." *The Plant Journal* 68 (3): 443–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04699.x>.
- ATSDR. 2017. "ATSDR's Substance Priority List." 2017. <https://www.atsdr.cdc.gov>.
- Aubert, Serge, Claude Alban, Richard Bligny, and Roland Douce. 1996. "Induction of B-Methylcrotonyl-Coenzyme A Carboxylase in Higher Plant Cells during Carbohydrate Starvation: Evidence for a Role of MCCase in Leucine Catabolism." *FEBS Letters* 383 (3): 175–80.
- Azpeitia, Eugenio, Nathan Weinstein, Mariana Benítez, Luis Mendoza, and Elena R. Alvarez-Buylla. 2013. "Finding Missing Interactions of the Arabidopsis Thaliana Root Stem Cell Niche Gene Regulatory Network." *Frontiers in Plant Science* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00110>.
- Bachand, François. 2007. "Protein Arginine Methyltransferases: From Unicellular Eukaryotes to Humans." *Eukaryotic Cell* 6 (6): 889–98. <https://doi.org/10.1128/EC.00099-07>.
- Bachand, François, and Pamela A. Silver. 2004. "PRMT3 Is a Ribosomal Protein Methyltransferase That Affects the Cellular Levels of Ribosomal Subunits." *The EMBO Journal* 23 (13): 2641–50. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600265>.
- Bailly, Christophe, and Christophe Bailly. 2004. "Active Oxygen Species and Antioxidants in Seed Biology." *Seed Science Research* 14 (2): 93–107. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>.
- Bainbridge, K., S. Guyomarc'h, E. Bayer, R. Swarup, M. Bennett, T. Mandel, and C. Kuhlemeier. 2008. "Auxin Influx Carriers Stabilize Phyllotactic Patterning." *Genes & Development* 22 (6): 810–23. <https://doi.org/10.1101/gad.462608>.

Références

- Bakshi, Madhunita, and Ralf Oelmüller. 2014. "WRKY Transcription Factors: Jack of Many Trades in Plants." *Plant Signaling & Behavior* 9 (2): e27700. <https://doi.org/10.4161/psb.27700>.
- Baliardini, Cecilia, Claire-Lise Meyer, Pietrino Salis, Pierre Saumitou-Laprade, and Nathalie Verbruggen. 2015. "CATION EXCHANGER1 Cosegregates with Cadmium Tolerance in the Metal Hyperaccumulator *Arabidopsis Halleri* and Plays a Role in Limiting Oxidative Stress in *Arabidopsis* Spp." *Plant Physiology* 169 (1): 549–59. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01037>.
- Balzergue, Coline, Thibault Dartevelle, Christian Godon, Edith Laugier, Claudia Meisrimler, Jean-Marie Teulon, Audrey Creff, et al. 2017. "Low Phosphate Activates STOP1-ALMT1 to Rapidly Inhibit Root Cell Elongation." *Nature Communications* 8 (May): 15300. <https://doi.org/10.1038/ncomms15300>.
- Band, L. R., D. M. Wells, A. Larrieu, J. Sun, A. M. Middleton, A. P. French, G. Brunoud, et al. 2012. "Root Gravitropism Is Regulated by a Transient Lateral Auxin Gradient Controlled by a Tipping-Point Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (12): 4668–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201498109>.
- Banerjee, J., R. Magnani, M. Nair, L. M. Dirk, S. DeBolt, I. B. Maiti, and R. L. Houtz. 2013. "Calmodulin-Mediated Signal Transduction Pathways in *Arabidopsis* Are Fine-Tuned by Methylation." *The Plant Cell* 25 (11): 4493–4511. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119115>.
- Bannister, Andrew J., and Tony Kouzarides. 2005. "Reversing Histone Methylation." *Nature* 436 (7054): 1103–6. <https://doi.org/10.1038/nature04048>.
- Barbazuk, W. B., Y. Fu, and K. M. McGinnis. 2008. "Genome-Wide Analyses of Alternative Splicing in Plants: Opportunities and Challenges." *Genome Research* 18 (9): 1381–92. <https://doi.org/10.1101/gr.053678.106>.
- Barberon, M., G. Dubeaux, C. Kolb, E. Isono, E. Zelazny, and G. Vert. 2014. "Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the Plant-Soil Interface Plays Crucial Role in Metal Homeostasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (22): 8293–98. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402262111>.
- Baxter, A., R. Mittler, and N. Suzuki. 2014. "ROS as Key Players in Plant Stress Signalling." *Journal of Experimental Botany* 65 (5): 1229–40. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>.
- Baxter, Ivan, Christian Hermans, Brett Lahner, Elena Yakubova, Marina Tikhonova, Nathalie Verbruggen, Dai-yin Chao, and David E. Salt. 2012. "Biodiversity of Mineral Nutrient and Trace Element Accumulation in *Arabidopsis Thaliana*." Edited by Patrick Degryse. *PLoS ONE* 7 (4): e35121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035121>.
- Bedford, Mark T., and Steven G. Clarke. 2009. "Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why." *Molecular Cell* 33 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.013>.
- Benjamins, René, A. B. Quint, Dolf Weijers, Paul Hooykaas, and Remko Offringa. 2001. "The PINOID Protein Kinase Regulates Organ Development in *Arabidopsis* by Enhancing Polar Auxin Transport." *Development* 128 (20): 4057–67.
- Bennett, M. J., A. Marchant, H. G. Green, S. T. May, S. P. Ward, P. A. Millner, A. R. Walker, B. Schulz, and K. A. Feldmann. 1996. "Arabidopsis AUX1 Gene: A Permease-like Regulator of Root Gravitropism." *Science (New York, N.Y.)* 273 (5277): 948–50.
- Bensmihen, Sandra, Alexandra To, Guillaume Lambert, Thomas Kroj, Jérôme Giraudat, and François Parcy. 2004. "Analysis of an Activated *ABI5* Allele Using a New Selection Method for Transgenic *Arabidopsis* Seeds." *FEBS Letters* 561 (1-3): 127–31. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00148-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00148-6).
- Berg, Claudia Van den, Viola Willemsen, Giel Hendriks, Peter Weisbeek, and Ben Scheres. 1997. "Short-Range Control of Cell Differentiation in the *Arabidopsis* Root Meristem." *Nature* 390 (6657): 287–89.
- Berthet, Serge, Florent Villiers, Claude Alban, Nelson B. C. Serre, Jacqueline Martin-Laffon, Sylvie Figuet, Anne-Marie Boisson, et al. 2018. "Arabidopsis *Thaliana* Plants Challenged with Uranium Reveal New Insights into Iron and Phosphate Homeostasis." *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.14865>.
- Bigalke, Moritz, Lorenz Schwab, Agnes Rehmus, Patrick Tondo, and Markus Flisch. 2018. "Uranium in Agricultural Soils and Drinking Water Wells on the Swiss Plateau." *Environmental Pollution* 233 (February): 943–51. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.061>.
- Biggar, Kyle K., and Shawn S.-C. Li. 2014. "Non-Histone Protein Methylation as a Regulator of Cellular Signalling and Function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (1): 5–17. <https://doi.org/10.1038/nrm3915>.
- Blilou, Ikram, Jian Xu, Marjolein Wildwater, Viola Willemsen, Ivan Paponov, Jiří Friml, Renze Heidstra, Mitsuhiro Aida, Klaus Palme, and Ben Scheres. 2005. "The PIN Auxin Efflux Facilitator Network Controls Growth and Patterning in *Arabidopsis* Roots." *Nature* 433 (7021): 39.
- Bobadilla, Roberto, and Alexandre Berr. 2016. "Histone Methylation - A Cornerstone for Plant Responses to Environmental Stresses?" In *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, edited by Arun K. Shanker and Chitra Shanker. InTech. <http://www.intechopen.com/books/abiotic-and-biotic-stress-in-plants-recent-advances-and-future-perspectives/histone-methylation-a-cornerstone-for-plant-responses-to-environmental-stresses>.
- Böhm, Franciele Mara Lucca Zanardo, Maria de Lourdes Lucio Ferrarese, Daniele Iara Lucca Zanardo, Jose Ronaldo Magalhaes, and Osvaldo Ferrarese-Filho. 2010. "Nitric Oxide Affecting Root Growth, Lignification and Related Enzymes in Soybean Seedlings." *Acta Physiologiae Plantarum* 32 (6): 1039–46. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0494-x>.
- Boron, A. K., J. Van Orden, M. Nektarios Markakis, G. Mouille, D. Adriaensen, J.-P. Verbelen, H. Hofte, and K. Vissenberg. 2014. "Proline-Rich Protein-like PRPL1 Controls Elongation of Root Hairs in *Arabidopsis Thaliana*." *Journal of Experimental Botany* 65 (18): 5485–95. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru308>.
- Bortesi, Luisa, and Rainer Fischer. 2015. "The CRISPR/Cas9 System for Plant Genome Editing and beyond." *Biotechnology Advances* 33 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>.
- Bradshaw, R. A., W. W. Brickley, and K. W. Walker. 1998. "N-Terminal Processing: The Methionine Aminopeptidase and N Alpha-Acetyl Transferase Families." *Trends in Biochemical Sciences* 23 (7): 263–67.
- Bremang, M., A. Cuomo, A. M. Agresta, M. Stugiewicz, V. Spadotto, and T. Bonaldi. 2013. "Mass Spectrometry-Based Identification and Characterisation of Lysine and Arginine Methylation in the Human Proteome." *Mol Biosyst* 9 (9): 2231–47. <https://doi.org/10.1039/c3mb00009e>.
- Briat, Jean-Francois, Karl Ravet, Nicolas Arnaud, Céline Duc, Jossia Boucherez, Brigitte Touraine, Françoise Cellier, and Frederic Gaymard. 2010. "New Insights into Ferritin Synthesis and Function Highlight a Link between Iron Homeostasis and Oxidative Stress in Plants." *Annals of Botany* 105 (5): 811–22. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp128>.
- Brooks, Robert R., Michael F Chambers, Larry J Nicks, and Brett H Robinson. 1998. "Phytomining." *Trends in Plant Science* 3 (9): 359–62. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01283-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01283-7).
- Brumbarova, Tzvetina, and Rumen Ivanov. 2016. "Perls Staining for Histochemical Detection of Iron in Plant Samples," November. <http://www.bio-protocol.org/e1245>.
- Cabello, Julieta V, Anabella F Lodeyro, and Matias D Zurbriggen. 2014. "Novel Perspectives for the Engineering of Abiotic Stress Tolerance in Plants." *Current Opinion in Biotechnology* 26 (April): 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.011>.

- Cai, Zhenying, Jingjing Liu, Haijiao Wang, Cangjing Yang, Yuxiao Chen, Yongchi Li, Shanjin Pan, et al. 2014. "GSK3-like Kinases Positively Modulate Abscisic Acid Signaling through Phosphorylating Subgroup III SnRK2s in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (26): 9651–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316717111>.
- Calabrese, Edward J., and Robyn B. Blain. 2009. "Hormesis and Plant Biology." *Environmental Pollution* 157 (1): 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.028>.
- Cameron, D. M., S. T. Gregory, J. Thompson, M. J. Suh, P. A. Limbach, and A. E. Dahlberg. 2004. "Thermus Thermophilus L11 Methyltransferase, PrmA, Is Dispensable for Growth and Preferentially Modifies Free Ribosomal Protein L11 prior to Ribosome Assembly." *J Bacteriol* 186 (17): 5819–25.
- Cao, Xing-Jun, Anna M. Arnaudo, and Benjamin A. Garcia. 2013. "Large-Scale Global Identification of Protein Lysine Methylation in Vivo." *Epigenetics* 8 (5): 477–85. <https://doi.org/10.4161/epi.24547>.
- Carroll, Adam J., Joshua L. Heazlewood, Jun Ito, and A. Harvey Millar. 2008. "Analysis of the *Arabidopsis* Cytosolic Ribosome Proteome Provides Detailed Insights into Its Components and Their Post-Translational Modification." *Molecular & Cellular Proteomics* 7 (2): 347–69. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700052-MCP200>.
- Carvalho, Raquel F., Carolina V. Feijão, and Paula Duque. 2013. "On the Physiological Significance of Alternative Splicing Events in Higher Plants." *Protoplasma* 250 (3): 639–50. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0448-9>.
- Casado-Vela, J., B. Muries, M. Carvajal, I. Iloro, F. Elortza, and M. C. Martínez-Ballesta. 2010. "Analysis of Root Plasma Membrane Aquaporins from Brassica Oleracea: Post-Translational Modifications, de Novo Sequencing and Detection of Isoforms by High Resolution Mass Spectrometry." *J Proteome Res* 9 (7): 3479–94. <https://doi.org/10.1021/pr901150g>.
- Caslavka Zempel, Katelyn E., Ajay A. Vashisht, William D. Barshop, James A. Wohlschlegel, and Steven G. Clarke. 2016. "Determining the Mitochondrial Methyl Proteome in *Saccharomyces Cerevisiae* Using Heavy Methyl SILAC." *Journal of Proteome Research* 15 (12): 4436–51. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00521>.
- Castro, Randy Ortiz, Miguel Martínez Trujillo, José López Bucio, Carlos Cervantes, and Joseph Dubrovsky. 2007. "Effects of Dichromate on Growth and Root System Architecture of *Arabidopsis Thaliana* Seedlings." *Plant Science* 172 (4): 684–91. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.004>.
- Černý, Martin, Jan Skalák, Hana Cerna, and Břetislav Brzobohatý. 2013. "Advances in Purification and Separation of Posttranslationally Modified Proteins." *Journal of Proteomics* 92 (October): 2–27. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.040>.
- Chang, Bingsheng, Yue Chen, Yingming Zhao, and Richard K. Bruick. 2007. "JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase." *Science (New York, N.Y.)* 318 (5849): 444–47. <https://doi.org/10.1126/science.1145801>.
- Chan, Zhulong, Chun-Peng Song, Woe Yeon Kim, and Ken Yokawa, eds. 2017. *ROS Regulation during Plant Abiotic Stress Responses*. Frontiers Research Topics. Frontiers Media SA. http://www.frontiersin.org/books/ROS_Regulation_during_Plant_Abiotic_Stress_Responses/1121.
- Charrier, B. 2002. "Expression Profiling of the Whole *Arabidopsis* Shaggy-Like Kinase Multigene Family by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction." *PLANT PHYSIOLOGY* 130 (2): 577–90. <https://doi.org/10.1104/pp.009175>.
- Chen, Ching-Wei, Dario Panzeri, Yu-Hung Yeh, Yasuhiro Kadota, Pin-Yao Huang, Chia-Nan Tao, Milena Roux, et al. 2014. "RETRACTED: The *Arabidopsis* Malectin-Like Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase IOS1 Associates with the Pattern Recognition Receptors FLS2 and EFR and Is Critical for Priming of Pattern-Triggered Immunity." *The Plant Cell* 26 (7): 3201–19. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125682>.
- Chen, Hui, Curtis G. Wilkerson, Jason A. Kuchar, Brett S. Phinney, and Gregg A. Howe. 2005. "Jasmonate-Inducible Plant Enzymes Degrade Essential Amino Acids in the Herbivore Midgut." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (52): 19237–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509026102>.
- Chen, Jianxin, Dawn E. Hall, Jun Murata, and Vincenzo De Luca. 2006. "L-Alanine Induces Programmed Cell Death in *V. Labrusca* Cell Suspension Cultures." *Plant Science* 171 (6): 734–44. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.07.003>.
- Chen, Yi-Fang, Li-Qin Li, Qian Xu, You-Han Kong, Hui Wang, and Wei-Hua Wu. 2009. "The WRKY6 Transcription Factor Modulates PHOSPHATE1 Expression in Response to Low Pi Stress in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 21 (11): 3554–66. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064980>.
- Chevalier, David, and John C. Walker. 2005. "Functional Genomics of Protein Kinases in Plants." *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 3 (4): 362–71.
- Choi, W.-G., M. Toyota, S.-H. Kim, R. Hilleary, and S. Gilroy. 2014. "Salt Stress-Induced Ca²⁺ Waves Are Associated with Rapid, Long-Distance Root-to-Shoot Signaling in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (17): 6497–6502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319951111>.
- Cho, Jung-Nam, Jee-Youn Ryu, Young-Min Jeong, Jihye Park, Ji-Joon Song, Richard M. Amasino, Bosl Noh, and Yoo-Sun Noh. 2012. "Control of Seed Germination by Light-Induced Histone Arginine Demethylation Activity." *Developmental Cell* 22 (4): 736–48. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.01.024>.
- Clemens, Stephan, and Jian Feng Ma. 2016. "Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods." *Annual Review of Plant Biology* 67 (1): 489–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112301>.
- Cloutier, Philippe, Mathieu Lavallée-Adam, Denis Faubert, Mathieu Blanchette, and Benoit Coulombe. 2013. "A Newly Uncovered Group of Distantly Related Lysine Methyltransferases Preferentially Interact with Molecular Chaperones to Regulate Their Activity." Edited by Gregory S. Barsh. *PLoS Genetics* 9 (1): e1003210. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003210>.
- Cobbett, C. S., M. J. May, R. Howden, and B. Rolfs. 1998. "The Glutathione-Deficient, Cadmium-Sensitive Mutant, cad2-1, of *Arabidopsis Thaliana* Is Deficient in Gamma-Glutamylcysteine Synthetase." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 16 (1): 73–78.
- Colcombet, Jean, and Herbert Hirt. 2008. "*Arabidopsis* MAPKs: A Complex Signalling Network Involved in Multiple Biological Processes." *Biochemical Journal* 413 (2): 217–26. <https://doi.org/10.1042/BJ20080625>.
- Corso, Massimiliano, M. Sol Schwartzman, Flavia Guzzo, Florence Souard, Eugeniusz Malkowski, Marc Hanikenne, and Nathalie Verbruggen. 2018. "Contrasting Cadmium Resistance Strategies in Two Metallicolous Populations of *Arabidopsis Halleri*." *New Phytologist*, January. <https://doi.org/10.1111/nph.14948>.
- Cosio, C. 2004. "Hyperaccumulation of Cadmium and Zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis Halleri* at the Leaf Cellular Level." *PLANT PHYSIOLOGY* 134 (2): 716–25. <https://doi.org/10.1104/pp.103.031948>.
- Couttas, Timothy A., Mark J. Raftery, Matthew P. Padula, Ben R. Herbert, and Marc R. Wilkins. 2012. "Methylation of Translation-Associated Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae*: Identification of Methylated Lysines and Their Methyltransferases." *PROTEOMICS* 12 (7): 960–72. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100570>.

- Coyte, Rachel M., Ratan C. Jain, Sudhir K. Srivastava, Kailash C. Sharma, Abedalrazq Khalil, Lin Ma, and Avner Vengosh. 2018. "Large-Scale Uranium Contamination of Groundwater Resources in India." *Environmental Science & Technology Letters*, May. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00215>.
- Crane, Yan Ma, and Stanton B. Gelvin. 2007. "RNAi-Mediated Gene Silencing Reveals Involvement of Arabidopsis Chromatin-Related Genes in Agrobacterium-Mediated Root Transformation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (38): 15156–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706986104>.
- Cristina, Maria, Morten Petersen, and John Mundy. 2010. "Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants." *Annual Review of Plant Biology* 61 (1): 621–49. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112252>.
- Cubero, Beatriz, Yuko Nakagawa, Xing-Yu Jiang, Ken-Ji Miura, Fang Li, Kashchandra G. Raghothama, Ray A. Bressan, Paul M. Hasegawa, and José M. Pardo. 2009. "The Phosphate Transporter PHT4;6 Is a Determinant of Salt Tolerance That Is Localized to the Golgi Apparatus of Arabidopsis." *Molecular Plant* 2 (3): 535–52. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp013>.
- Cunningham, S. D., J. R. Shann, David E. Crowley, and Todd A. Anderson. 1997. "Phytoremediation of Contaminated Water and Soil." In *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, edited by Ellen L. Kruger, Todd A. Anderson, and Joel R. Coats, 664:2–17. Washington, DC: American Chemical Society. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1997-0664.ch001>.
- Cvetkovic, Aleksandar, Angeli Lal Menon, Michael P. Thorgersen, Joseph W. Scott, Farris L. Poole II, Francis E. Jenney Jr, W. Andrew Lancaster, et al. 2010. "Microbial Metalloproteomes Are Largely Uncharacterized." *Nature* 466 (7307): 779–82. <https://doi.org/10.1038/nature09265>.
- Dai, Mingqiu, Chen Zhang, Urszula Kania, Fang Chen, Qin Xue, Tyra Mccray, Gang Li, et al. 2012. "A PP6-Type Phosphatase Holoenzyme Directly Regulates PIN Phosphorylation and Auxin Efflux in Arabidopsis." *The Plant Cell* 24 (6): 2497–2514. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098905>.
- Dai, M., Q. Xue, T. Mccray, K. Margavage, F. Chen, J.-H. Lee, C. D. Nezames, et al. 2013. "The PP6 Phosphatase Regulates ABI5 Phosphorylation and Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis." *The Plant Cell* 25 (2): 517–34. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105767>.
- Damme, Daniël Van, Bert De Rybel, Gustavo Gudesblat, Dmitri Demidov, Wim Grunewald, Ive De Smet, Andreas Houben, Tom Beeckman, and Eugenia Russinova. 2011. "Arabidopsis A Aurora Kinases Function in Formative Cell Division Plane Orientation." *The Plant Cell* 23 (11): 4013–24. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089565>.
- Davydova, Erna, Angela Y. Ho, Jędrzej Malecki, Anders Moen, Jorrit M. Enserink, Magnus E. Jakobsson, Christoph Loenarz, and Pål Ø. Falnes. 2014. "Identification and Characterization of a Novel Evolutionarily Conserved Lysine-Specific Methyltransferase Targeting Eukaryotic Translation Elongation Factor 2 (eEF2)." *Journal of Biological Chemistry* 289 (44): 30499–510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.601658>.
- Decottignies, P., P. Le Marechal, J. P. Jacquot, J. M. Schmitter, and P. Gadal. 1995. "Primary Structure and Post-Translational Modification of Ferredoxin-NADP Reductase from Chlamydomonas Reinhardtii." *Arch Biochem Biophys* 316 (1): 249–59.
- DeLange, R. J., A. N. Glazer, and E. L. Smith. 1969. "Presence and Location of an Unusual Amino Acid, Epsilon-N-Trimethyllysine, in Cytochrome c of Wheat Germ and Neurospora." *J Biol Chem* 244 (5): 1385–88.
- Demidov, Dmitri, Susann Hesse, Annegret Tewes, Twan Rutten, Jörg Fuchs, Raheleh Karimi Ashtiyani, Sandro Lein, Andreas Fischer, Gunter Reuter, and Andreas Houben. 2009. "Aurora1 Phosphorylation Activity on Histone H3 and Its Cross-Talk with Other Post-Translational Histone Modifications in Arabidopsis." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 59 (2): 221–30.
- Demirci, Hasan, Steven T. Gregory, Albert E. Dahlberg, and Gerwald Jögl. 2008. "Multiple-Site Trimethylation of Ribosomal Protein L11 by the Pma Methyltransferase." *Structure* 16 (7): 1059–66. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.03.016>.
- Desclos-Theveniau, Marie, Dominique Arnaud, Ting-Yu Huang, Grace Jui-Chih Lin, Wei-Yen Chen, Yi-Chia Lin, and Laurent Zimmerli. 2012. "The Arabidopsis Lectin Receptor Kinase LecRK-V.5 Represses Stomatal Immunity Induced by Pseudomonas Syringae Pv. Tomato DC3000." *PLoS Pathogens* 8 (2): e1002513. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002513>.
- Dinneny, J. R., T. A. Long, J. Y. Wang, J. W. Jung, D. Mace, S. Pointer, C. Barron, S. M. Brady, J. Schiefelbein, and P. N. Benfey. 2008. "Cell Identity Mediates the Response of Arabidopsis Roots to Abiotic Stress." *Science* 320 (5878): 942–45. <https://doi.org/10.1126/science.1153795>.
- Dirk, L. M., R. C. Trievel, and R. L. Houtz. 2006. "Non-Histone Protein Lysine Methyltransferases: Structure and Catalytic Roles." In *The Enzymes*, edited by F. Tamanoi and S. Clarke, XXIV:179–228. Burlington, MA: Elsevier Academic Press.
- Doble, B. W. 2003. "GSK-3: Tricks of the Trade for a Multi-Tasking Kinase." *Journal of Cell Science* 116 (7): 1175–86. <https://doi.org/10.1242/jcs.00384>.
- Dognin, M. J., and B. Wittmann-Liebold. 1980. "Purification and Primary Structure Determination of the N-Terminal Blocked Protein, L11, from Escherichia Coli Ribosomes." *Eur J Biochem* 112 (1): 131–51.
- Domingos, Patricia, Ana Margarida Prado, Aloysius Wong, Christoph Gehring, and Jose A. Feijo. 2015. "Nitric Oxide: A Multitasked Signaling Gas in Plants." *Molecular Plant* 8 (4): 506–20. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.010>.
- Doustaly, Fany, Florence Combes, Julie B. Fiévet, Serge Berthet, Véronique Hugouvieux, Olivier Bastien, Iker Aranjuelo, et al. 2014a. "Uranium Perturbs Signaling and Iron Uptake Response in Arabidopsis Thaliana Roots." *Metallomics* 6 (4): 809. <https://doi.org/10.1039/c4mt00005f>.
- Dushenkov, Slavik, Dev Vasudev, Yoram Kapulnik, Doloressa Gleba, David Fleisher, K. C. Ting, and Burt Ensley. 1997. "Removal of Uranium from Water Using Terrestrial Plants." *Environmental Science & Technology* 31 (12): 3468–74. <https://doi.org/10.1021/es970220l>.
- Edwards, K., C. Johnstone, and C. Thompson. 1991. "A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis." *Nucleic Acids Research* 19 (6): 1349.
- Eitzinger, Nicole, Volker Wagner, Wolfram Weisheit, Stefan Geimer, David Boness, Georg Kreimer, and Maria Mittag. 2015. "Proteomic Analysis of a Fraction with Intact Eyespots of Chlamydomonas Reinhardtii and Assignment of Protein Methylation." *Frontiers in Plant Science* 6 (December). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01085>.
- Eleftheriou, Eleftherios, Ioannis-Dimosthenis Adamakis, Emmanuel Panteris, and Maria Fatsiou. 2015. "Chromium-Induced Ultrastructural Changes and Oxidative Stress in Roots of Arabidopsis Thaliana." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7): 15852–71. <https://doi.org/10.3390/ijms160715852>.
- Epstein, Armona L., Christopher D. Gussman, Michael J. Blaylock, Uri Yermiyahu, Jianwei W. Huang, Yoram Kapulnik, and Cindy S. Orser. 1999. "EDTA and Pb—EDTA Accumulation in Brassica Juncea Grown in Pb—amended Soil." *Plant and Soil* 208 (1): 87–94.
- Erales, J., L. Avilan, S. Lebreton, and B. Gontero. 2008. "Exploring CP12 Binding Proteins Revealed Aldolase as a New Partner for the Phosphoribulokinase/glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase/CP12 Complex—Purification and Kinetic

- Characterization of This Enzyme from *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Febs J* 275 (6): 1248–59. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06284.x>.
- Erce, M. A., C. N. Pang, G. Hart-Smith, and M. R. Wilkins. 2012. "The Methylproteome and the Intracellular Methylation Network." *Proteomics* 12 (4-5): 564–86. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100397>.
- Eshel, Amram, and Tom Beeckman. 2013. *Plant Roots: The Hidden Half*. CRC Press. <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=SkDNBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=%22M.+Wieckowski+and+John%22+%22III+regulation+of+root%22+%22IV+Soil+resource%22+%22Danjon,+Alexia+Stokes,+and+Mark+R.%22+%222013+by+Taylor+%26+Francis+Group,%22+%22Watt,+Anton+P.+Wasson,+and+Vincent%22+&ots=AFfEgJnORn&sig=Pgz-4dcZn5Q3WibvelrCnz1leHg>.
- Eulgem, T., P. J. Rushton, S. Robatzek, and I. E. Somssich. 2000. "The WRKY Superfamily of Plant Transcription Factors." *Trends in Plant Science* 5 (5): 199–206.
- Falb, Michaela, Michalis Aivaliotis, Carolina Garcia-Rizo, Birgit Bisle, Andreas Tebbe, Christian Klein, Kosta Konstantinidis, Frank Siedler, Friedhelm Pfeiffer, and Dieter Oesterhelt. 2006. "Archaeal N-Terminal Protein Maturation Commonly Involves N-Terminal Acetylation: A Large-Scale Proteomics Survey." *Journal of Molecular Biology* 362 (5): 915–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.086>.
- Falnes, P. O., M. E. Jakobsen, E. Davydova, A. Ho, and J. Ma ecki. 2016. "Protein Lysine Methylation by Seven- -Strand Methyltransferases." *Biochemical Journal* 473 (14): 1995–2009. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160117>.
- Feng, Wei, Daniel Kita, Alexis Peaucelle, Heather N. Cartwright, Vinh Doan, Qiaohong Duan, Ming-Che Liu, et al. 2018. "The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca²⁺ Signaling." *Current Biology* 28 (5): 666–75.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.023>.
- Feng, You, Ranjan Maity, Julian P. Whitelegge, Andrea Hadjikyriacou, Ziwei Li, Cecilia Zurita-Lopez, Qais Al-Hadid, et al. 2013. "Mammalian Protein Arginine Methyltransferase 7 (PRMT7) Specifically Targets R X R Sites in Lysine- and Arginine-Rich Regions." *Journal of Biological Chemistry* 288 (52): 37010–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525345>.
- Fernandez-Marcos, M., L. Sanz, D. R. Lewis, G. K. Muday, and O. Lorenzo. 2011. "Nitric Oxide Causes Root Apical Meristem Defects and Growth Inhibition While Reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-Dependent Acropetal Auxin Transport." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (45): 18506–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108644108>.
- Ferro, M., S. Brugiere, D. Salvi, D. Seigneurin-Berny, M. Court, L. Moyet, C. Ramus, et al. 2010. "AT_CHLORO, a Comprehensive Chloroplast Proteome Database with Subplastidial Localization and Curated Information on Envelope Proteins." *Mol Cell Proteomics* 9 (6): 1063–84. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900325-MCP200>.
- Fischer, Sina, Thomas Spielau, and Stephan Clemens. 2017. "Natural Variation in Arabidopsis Thaliana Cd Responses and the Detection of Quantitative Trait Loci Affecting Cd Tolerance." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03540-z>.
- Floris, Maina, Hany Mahgoub, Elodie Lanet, Christophe Robaglia, and Benoît Menand. 2009. "Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression in Plants during Abiotic Stress." *International Journal of Molecular Sciences* 10 (7): 3168–85. <https://doi.org/10.3390/ijms10073168>.
- Foyer, Christine H., and Graham Noctor. 2005. "Oxidant and Antioxidant Signalling in Plants: A Re-Evaluation of the Concept of Oxidative Stress in a Physiological Context." *Plant, Cell & Environment* 28 (8): 1056–71.
- . 2013. "Redox Signaling in Plants." *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (16): 2087–90. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5278>.
- Friml, Jiří, Xiong Yang, Marta Michniewicz, Dolf Weijers, Ab Quint, Olaf Tietz, René Benjamins, et al. 2004. "A PINOID-Dependent Binary Switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting Directs Auxin Efflux." *Science* 306 (5697): 862–65.
- Frottin, Frédéric, Aude Martinez, Philippe Peynot, Sanghamitra Mitra, Richard C. Holz, Carmela Giglione, and Thierry Meinzel. 2006. "The Proteomics of N-Terminal Methionine Cleavage." *Molecular & Cellular Proteomics* 5 (12): 2336–49. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600225-MCP200>.
- Fuchs, Stefan, Erwin Grill, Irute Meskiene, and Alois Schweighofer. 2013. "Type 2C Protein Phosphatases in Plants: PP2Cs." *FEBS Journal* 280 (2): 681–93. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x>.
- Fuente van Bentem, S. de la. 2003. "The Subcellular Localization of Plant Protein Phosphatase 5 Isoforms Is Determined by Alternative Splicing." *PLANT PHYSIOLOGY* 133 (2): 702–12. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026617>.
- Fuglsang, Anja T., Astrid Kristensen, Tracey A. Cui, Waltraud X. Schulze, Jörgen Persson, Kristina H. Thuesen, Cecilie K. Ytting, et al. 2014. "Receptor Kinase-Mediated Control of Primary Active Proton Pumping at the Plasma Membrane." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 80 (6): 951–64. <https://doi.org/10.1111/tpj.12680>.
- Furuya, Tomoyuki, Daisuke Matsuoka, and Takashi Nanmori. 2014. "Membrane Rigidification Functions Upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 Cascade during Cold Acclimation in *Arabidopsis Thaliana*." *FEBS Letters* 588 (11): 2025–30. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.032>.
- Gao, Minghui, Jinman Liu, Dongling Bi, Zhibin Zhang, Fang Cheng, Sanfeng Chen, and Yuelin Zhang. 2008. "MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 Function Together in a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade to Regulate Innate Immunity in Plants." *Cell Research* 18 (12): 1190–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.300>.
- Gao, Zhi-Ping, Guo-Xiang Chen, and Zhong-Nan Yang. 2012. "Regulatory Role of Arabidopsis pTAC14 in Chloroplast Development and Plastid Gene Expression." *Plant Signaling & Behavior* 7 (10): 1354–56. <https://doi.org/10.4161/psb.21618>.
- Gao, Z.-P., Q.-B. Yu, T.-T. Zhao, Q. Ma, G.-X. Chen, and Z.-N. Yang. 2011. "A Functional Component of the Transcriptionally Active Chromosome Complex, Arabidopsis pTAC14, Interacts with pTAC12/HEMERA and Regulates Plastid Gene Expression." *PLANT PHYSIOLOGY* 157 (4): 1733–45. <https://doi.org/10.1104/pp.111.184762>.
- Giehl, R. F. H., B. D. Gruber, and N. von Wiren. 2014. "It's Time to Make Changes: Modulation of Root System Architecture by Nutrient Signals." *Journal of Experimental Botany* 65 (3): 769–78. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert421>.
- Gill, Sarvajeet Singh, and Narendra Tuteja. 2010. "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (12): 909–30. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.
- . 2011. "Cadmium Stress Tolerance in Crop Plants: Probing the Role of Sulfur." *Plant Signaling & Behavior* 6 (2): 215–22.
- Godt, Johannes, Franziska Scheidig, Christian Grosse-Siestrup, Vera Esche, Paul Brandenburg, Andrea Reich, and David A. Groneberg. 2006. "The Toxicity of Cadmium and Resulting Hazards for Human Health." *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 1 (1): 22.
- Grindler, J. E. 1962. *The Radiochemistry of Uranium*. Subcommittee on Radiochemistry, National Academy of Sciences-National Research Council; available from the Office of Technical Services, Department of Commerce. <https://books.google.fr/books?id=wpMrAAAAYAAJ>.

- Grübler, Björn, Livia Merendino, Sven O. Twardziok, Morgane Mininno, Guillaume Allorent, Fabien Chevalier, Monique Liebers, et al. 2017. "Light and Plastid Signals Regulate Different Sets of Genes in the Albino Mutant pap7-1." *Plant Physiology*, September. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00982>.
- Guerra, Davide, Cristina Crosatti, Hamid H. Khoshro, Anna M. Mastrangelo, Erica Mica, and Elisabetta Mazzucotelli. 2015. "Post-Transcriptional and Post-Translational Regulations of Drought and Heat Response in Plants: A Spiderâ€™s Web of Mechanisms." *Frontiers in Plant Science* 6 (February). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00057>.
- Guleria, Praveen, Monika Mahajan, Jyoti Bhardwaj, and Sudesh Kumar Yadav. 2011. "Plant Small RNAs: Biogenesis, Mode of Action and Their Roles in Abiotic Stresses." *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 9 (6): 183–99. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(11\)60022-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(11)60022-3).
- Guo, Ailan, Hongbo Gu, Jing Zhou, Daniel Mulhern, Yi Wang, Kimberly A. Lee, Vicky Yang, et al. 2014. "Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation." *Molecular & Cellular Proteomics* 13 (1): 372–87. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.027870>.
- Gupta, Dharmendra K., Francisco J. Corpas, and José M. Palma, eds. 2013. *Heavy Metal Stress in Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38469-1>.
- Halliwell, Barry, and John M. C. Gutteridge. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fifth edition. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Hamburger, Dirk, Enea Rezzonico, Jean MacDonald-Comber Petétot, Chris Somerville, and Yves Poirier. 2002. "Identification and Characterization of the Arabidopsis PHO1 Gene Involved in Phosphate Loading to the Xylem." *The Plant Cell* 14 (4): 889–902.
- Hamey, J. J., and M. R. Wilkins. 2018. "Methylation of Elongation Factor 1A: Where, Who, and Why?" *Trends Biochem Sci* 43 (3): 211–23. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.01.004>.
- Hamey, Joshua J., Daniel L. Winter, Daniel Yagoub, Christopher M. Overall, Gene Hart-Smith, and Marc R. Wilkins. 2016. "Novel N-Terminal and Lysine Methyltransferases That Target Translation Elongation Factor 1A in Yeast and Human." *Molecular & Cellular Proteomics* 15 (1): 164–76. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052449>.
- Hancock, John T., and Matthew Whiteman. 2016. "Alone NO Longer." In *Advances in Botanical Research*, 77:1–14. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006522961500083X>.
- Handrkova, Helena, Jiri Petrak, Petr Halada, Dagmar Pospisilova, and Radek Cmejla. 2011. "Tyrosine 87 Is Vital for the Activity of Human Protein Arginine Methyltransferase 3 (PRMT3)." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1814 (2): 277–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.10.011>.
- Hang, Runlai, Chunyan Liu, Ayaz Ahmad, Yong Zhang, Falong Lu, and Xiaofeng Cao. 2014. "Arabidopsis Protein Arginine Methyltransferase 3 Is Required for Ribosome Biogenesis by Affecting Precursor Ribosomal RNA Processing." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (45): 16190–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412697111>.
- Hanikenne, Marc, Ina N. Talke, Michael J. Haydon, Christa Lanz, Andrea Nolte, Patrick Motte, Juergen Kroymann, Detlef Weigel, and Ute Krämer. 2008. "Evolution of Metal Hyperaccumulation Required Cis-Regulatory Changes and Triplication of HMA4." *Nature* 453 (7193): 391–95. <https://doi.org/10.1038/nature06877>.
- Hardie, D. G. 1999. "PLANT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES: Classification and Functions." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50 (1): 97–131. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.97>.
- Hartmann, Jens, Cornelia Fischer, Petra Dietrich, and Margret Sauter. 2014. "Kinase Activity and Calmodulin Binding Are Essential for Growth Signaling by the Phytosulfokine Receptor PSKR1." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 78 (2): 192–202. <https://doi.org/10.1111/tpj.12460>.
- Hart-Smith, Gene, Daniel Yagoub, Aidan P. Tay, Russell Pickford, and Marc R. Wilkins. 2016. "Large Scale Mass Spectrometry-Based Identifications of Enzyme-Mediated Protein Methylation Are Subject to High False Discovery Rates." *Molecular & Cellular Proteomics* 15 (3): 989–1006. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.055384>.
- Haydon, M. J., L. J. Bell, and A. A. R. Webb. 2011. "Interactions between Plant Circadian Clocks and Solute Transport." *Journal of Experimental Botany* 62 (7): 2333–48. <https://doi.org/10.1093/jxb/err040>.
- He, Fei, Qingquan Liu, Li Zheng, Yaqiong Cui, Zhenguo Shen, and Luqing Zheng. 2015. "RNA-Seq Analysis of Rice Roots Reveals the Involvement of Post-Transcriptional Regulation in Response to Cadmium Stress." *Frontiers in Plant Science* 6 (December). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01136>.
- Herbette, S., L. Taconnat, V. Hugouvieux, L. Piette, M.-L.M. Magniette, S. Cuine, P. Auroy, et al. 2006. "Genome-Wide Transcriptome Profiling of the Early Cadmium Response of Arabidopsis Roots and Shoots." *Biochimie* 88 (11): 1751–65. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.04.018>.
- Hernández, Luis E., Juan Sobrino-Plata, M. Belén Montero-Palmero, Sandra Carrasco-Gil, M. Laura Flores-Cáceres, Cristina Ortega-Villasante, and Carolina Escobar. 2015. "Contribution of Glutathione to the Control of Cellular Redox Homeostasis under Toxic Metal and Metalloid Stress." *Journal of Experimental Botany* 66 (10): 2901–11. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv063>.
- Herrmann, Frank, Peter Pably, Carmen Eckerich, Mark T. Bedford, and Frank O. Fackelmayer. 2009. "Human Protein Arginine Methyltransferases in Vivo—Distinct Properties of Eight Canonical Members of the PRMT Family." *Journal of Cell Science* 122 (Pt 5): 667–77. <https://doi.org/10.1242/jcs.039933>.
- Heyno, Eiri, Cornelia Klose, and Anja Krieger-Liszakay. 2008. "Origin of Cadmium-Induced Reactive Oxygen Species Production: Mitochondrial Electron Transfer versus Plasma Membrane NADPH Oxidase." *New Phytologist* 179 (3): 687–99. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02512.x>.
- Hok, Sophie, Valérie Allasia, Emilie Andrio, Elodie Naessens, Elsa Ribes, Franck Panabières, Agnès Attard, et al. 2014. "The Receptor Kinase IMPAIRED OOMYCETE SUSCEPTIBILITY1 Attenuates Abscisic Acid Responses in Arabidopsis." *Plant Physiology* 166 (3): 1506–18. <https://doi.org/10.1104/pp.114.248518>.
- Hossain, M. Alamgir, A. K. M. Zakir Hossain, Tomonori Kihara, Hiroyuki Koyama, and Tetsuo Hara. 2005. "Aluminum-Induced Lipid Peroxidation and Lignin Deposition Are Associated with an Increase in H₂O₂ Generation in Wheat Seedlings." *Soil Science and Plant Nutrition* 51 (2): 223–30. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2005.tb00026.x>.
- Houben, Andreas, Dmitri Demidov, Ana D. Caperta, Raheleh Karimi, Francesco Agueci, and Liudmila Vlasenko. 2007. "Phosphorylation of Histone H3 in plants—A Dynamic Affair." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1769 (5-6): 308–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.01.002>.
- Houtz, R. L., R. Magnani, N. R. Nayak, and L. M. Dirk. 2008. "Co- and Post-Translational Modifications in Rubisco: Unanswered Questions." *J Exp Bot* 59 (7): 1635–45.
- Houtz, R. L., L. Poneleit, S. B. Jones, M. Royer, and J. T. Stults. 1992. "Posttranslational Modifications in the Amino-Terminal Region of the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Several Plant Species." *Plant Physiol* 98 (3): 1170–74.

Références

- Houtz, R. L., J. T. Stults, R. M. Mulligan, and N. E. Tolbert. 1989. "Post-Translational Modifications in the Large Subunit of Ribulose Biphosphate Carboxylase/oxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (6): 1855–59.
- Hou, X. 2005. "Involvement of a Cell Wall-Associated Kinase, WAKL4, in Arabidopsis Mineral Responses." *PLANT PHYSIOLOGY* 139 (4): 1704–16. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066910>.
- Hrabak, E. M. 2003. "The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases." *PLANT PHYSIOLOGY* 132 (2): 666–80. <https://doi.org/10.1104/pp.102.011999>.
- Huang, Yong, Yijia Mo, Pengyun Chen, Xiaoling Yuan, Funing Meng, Shengwei Zhu, and Zhi Liu. 2016. "Identification of SET Domain-Containing Proteins in Gossypium Raimondii and Their Response to High Temperature Stress." *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep32729>.
- Hu, Tina T, Pedro Pattyn, Erica G Bakker, Jun Cao, Jan-Fang Cheng, Richard M Clark, Noah Fahlgren, et al. 2011. "The Arabidopsis Lyrata Genome Sequence and the Basis of Rapid Genome Size Change." *Nature Genetics* 43 (5): 476–81. <https://doi.org/10.1038/ng.807>.
- Illes, P., M. Schlicht, J. Pavlovkin, I. Lichtscheidl, F. Baluska, and M. Ovecka. 2006. "Aluminium Toxicity in Plants: Internalization of Aluminium into Cells of the Transition Zone in Arabidopsis Root Apices Related to Changes in Plasma Membrane Potential, Endosomal Behaviour, and Nitric Oxide Production." *Journal of Experimental Botany* 57 (15): 4201–13. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl197>.
- Inoue, Shin-ichiro, and Toshinori Kinoshita. 2017. "Blue Light Regulation of Stomatal Opening and the Plasma Membrane H⁺-ATPase." *Plant Physiology* 174 (2): 531–38. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00166>.
- Jacob, Y., S. Feng, C. A. LeBlanc, Y. V. Bernatavichute, H. Stroud, S. Cokus, L. M. Johnson, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen, and S. D. Michaels. 2009. "ATXR5 and ATXR6 Are H3K27 Monomethyltransferases Required for Chromatin Structure and Gene Silencing." *Nat Struct Mol Biol* 16 (7): 763–68. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1611>.
- Jain, A., M. D. Poling, A. P. Smith, V. K. Nagarajan, B. Lahner, R. B. Meagher, and K. G. Raghothama. 2009a. "Variations in the Composition of Gelling Agents Affect Morphophysiological and Molecular Responses to Deficiencies of Phosphate and Other Nutrients." *PLANT PHYSIOLOGY* 150 (2): 1033–49. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136184>.
- Jaisson, S., and P. Gillery. 2010. "Evaluation of Nonenzymatic Posttranslational Modification-Derived Products as Biomarkers of Molecular Aging of Proteins." *Clinical Chemistry* 56 (9): 1401–12. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.145201>.
- Jakobsson, Magnus E., Jędrzej Malecki, Benedikt S. Nilges, Anders Moen, Sebastian A. Leidel, and Pål Ø. Falnes. 2017. "Methylation of Human Eukaryotic Elongation Factor Alpha (eEF1A) by a Member of a Novel Protein Lysine Methyltransferase Family Modulates mRNA Translation." *Nucleic Acids Research* 45 (14): 8239–54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx432>.
- Jakobsson, M. E., E. Davydova, J. Malecki, A. Moen, and P. O. Falnes. 2015. "Saccharomyces Cerevisiae Eukaryotic Elongation Factor 1A (eEF1A) Is Methylated at Lys-390 by a METTL21-Like Methyltransferase." *PLoS One* 10 (6): e0131426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131426>.
- Jakobsson, M. E., J. Malecki, B. S. Nilges, A. Moen, S. A. Leidel, and P. O. Falnes. 2017. "Methylation of Human Eukaryotic Elongation Factor Alpha (eEF1A) by a Member of a Novel Protein Lysine Methyltransferase Family Modulates mRNA Translation." *Nucleic Acids Res* 45 (14): 8239–54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx432>.
- Jakobsson, M. E., A. Moen, L. Bousset, W. Egge-Jacobsen, S. Kernstock, R. Melki, and P. O. Falnes. 2013. "Identification and Characterization of a Novel Human Methyltransferase Modulating Hsp70 Protein Function through Lysine Methylation." *J Biol Chem* 288 (39): 27752–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.483248>.
- Jian, Hongju, Bo Yang, Aoxiang Zhang, Jinqi Ma, Yiran Ding, Zhiyou Chen, Jiana Li, Xinfu Xu, and Liezhao Liu. 2018. "Genome-Wide Identification of MicroRNAs in Response to Cadmium Stress in Oilseed Rape (Brassica Napus L.) Using High-Throughput Sequencing." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (5): 1431. <https://doi.org/10.3390/ijms19051431>.
- Ji, Hongtao, José M. Pardo, Giorgia Batelli, Michael J. Van Oosten, Ray A. Bressan, and Xia Li. 2013. "The Salt Overly Sensitive (SOS) Pathway: Established and Emerging Roles." *Molecular Plant* 6 (2): 275–86. <https://doi.org/10.1093/mp/ss017>.
- Jonassen, Else Müller, Behzad Heidari, Dugassa Nemie-Feyissa, Polina Matre, and Cathrine Lillo. 2011. "Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunits Are Starting to Reveal Their Functions in Plant Metabolism and Development." *Plant Signaling & Behavior* 6 (8): 1216–18. <https://doi.org/10.4161/psb.6.8.16180>.
- Jones, D. L., E. B. Blancaflor, L. V. Kochian, and S. Gilroy. 2006. "Spatial Coordination of Aluminium Uptake, Production of Reactive Oxygen Species, Callose Production and Wall Rigidity in Maize Roots." *Plant, Cell and Environment* 29 (7): 1309–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01509.x>.
- Jones, Kiersun, Dong Won Kim, Jean S. Park, and Chang Hyun Khang. 2016. "Live-Cell Fluorescence Imaging to Investigate the Dynamics of Plant Cell Death during Infection by the Rice Blast Fungus Magnaporthe Oryzae." *BMC Plant Biology* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0756-x>.
- Juven-Gershon, Tamar, Jer-Yuan Hsu, Joshua Wm Theisen, and James T. Kadonaga. 2008. "The RNA Polymerase II Core Promoter - the Gateway to Transcription." *Current Opinion in Cell Biology* 20 (3): 253–59. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.003>.
- Kane, L. A., and J. E. Van Eyk. 2009. "Post-Translational Modifications of ATP Synthase in the Heart: Biology and Function." *J Bioenerg Biomembr* 41 (2): 145–50. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9218-6>.
- Kang, Joohyun, Youngsook Lee, Hitoshi Sakakibara, and Enrico Martinoia. 2017. "Cytokinin Transporters: GO and STOP in Signaling." *Trends in Plant Science* 22 (6): 455–61. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.03.003>.
- Kanno, Satomi, Laura Cuyas, Hélène Javot, Richard Bligny, Elisabeth Gout, Thibault Darteville, Mohamed Hanchi, Tomoko M. Nakanishi, Marie-Christine Thibaud, and Laurent Nussaume. 2016. "Performance and Limitations of Phosphate Quantification: Guidelines for Plant Biologists." *Plant and Cell Physiology* 57 (4): 690–706. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv208>.
- Katz, Jonathan E., Mensur Dlakić, and Steven Clarke. 2003. "Automated Identification of Putative Methyltransferases from Genomic Open Reading Frames." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 2 (8): 525–40. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300037-MCP200>.
- Kawabe, Akira, Sachihiro Matsunaga, Katsuyuki Nakagawa, Daisuke Kurihara, Arata Yoneda, Seiichi Hasezawa, Susumu Uchiyama, and Kiichi Fukui. 2005. "Characterization of Plant Aurora Kinases during Mitosis." *Plant Molecular Biology* 58 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-3454-x>.
- Kazan, Kemal. 2013. "Auxin and the Integration of Environmental Signals into Plant Root Development." *Annals of Botany* 112 (9): 1655–65. <https://doi.org/10.1093/aob/mct229>.
- Keeling, S. M., R. B. Stewart, C. W. N. Anderson, and B. H. Robinson. 2003. "Nickel and Cobalt Phytoextraction by the Hyperaccumulator *Berkheya Coddii*: Implications for Polymetallic Phytomining and Phytoremediation." *International Journal of Phytoremediation* 5 (3): 235–44. <https://doi.org/10.1080/13779223>.

- Kerk, D., G. Templeton, and G. B.G. Moorhead. 2007. "Evolutionary Radiation Pattern of Novel Protein Phosphatases Revealed by Analysis of Protein Data from the Completely Sequenced Genomes of Humans, Green Algae, and Higher Plants." *PLANT PHYSIOLOGY* 146 (2): 351–67. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111393>.
- Kernstock, Stefan, Erna Davydova, Magnus Jakobsson, Anders Moen, Solveig Pettersen, Gunhild M. Mælandsmo, Wolfgang Egge-Jacobsen, and Pål Ø. Falnes. 2012. "Lysine Methylation of VCP by a Member of a Novel Human Protein Methyltransferase Family." *Nature Communications* 3 (September): 1038. <https://doi.org/10.1038/ncomms2041>.
- Khare, Deepa, Nobukata Mitsuda, Seungchul Lee, Won-Yong Song, Daehee Hwang, Masaru Ohme-Takagi, Enrico Martinoia, Youngsook Lee, and Jae-Ung Hwang. 2016. "Root Avoidance of Toxic Metals Requires the GeBP-LIKE 4 Transcription Factor in *Arabidopsis Thaliana*." *New Phytologist*, October. <https://doi.org/10.1111/nph.14242>.
- Kim, Jae-Min, Dong-Hyuk Woo, Sun-Ho Kim, Sun-Young Lee, Hee-Yeon Park, Hye-Yeon Seok, Woo Sik Chung, and Yong-Hwan Moon. 2012. "Arabidopsis MKKK20 Is Involved in Osmotic Stress Response via Regulation of MPK6 Activity." *Plant Cell Reports* 31 (1): 217–24. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1157-0>.
- Kim, Sun A., and Mary Lou Guerinot. 2007. "Mining Iron: Iron Uptake and Transport in Plants." *FEBS Letters* 581 (12): 2273–80. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.043>.
- Kirkby, Ernest. 2012. "Introduction, Definition and Classification of Nutrients." In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3–5. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849052000017>.
- Kitsios, Georgios, and John H. Doonan. 2011. "Cyclin Dependent Protein Kinases and Stress Responses in Plants." *Plant Signaling & Behavior* 6 (2): 204–9. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14835>.
- Klein, R. R., and R. L. Houtz. 1995. "Cloning and Developmental Expression of Pea Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/oxygenase Large Subunit N-Methyltransferase." *Plant Mol Biol* 27 (2): 249–61.
- Knox, Anna Sophia, R.L. Brigmon, D.I. Kaplan, and M.H. Paller. 2008. "Interactions among Phosphate Amendments, Microbes and Uranium Mobility in Contaminated Sediments." *Science of The Total Environment* 395 (2-3): 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.01.061>.
- Kohorn, Bruce D., and Susan L. Kohorn. 2012. "The Cell Wall-Associated Kinases, WAKs, as Pectin Receptors." *Frontiers in Plant Science* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00088>.
- Kondo, Yuki, Tasuku Ito, Hirofumi Nakagami, Yuki Hirakawa, Masato Saito, Takayuki Tamaki, Ken Shirasu, and Hiroo Fukuda. 2014. "Plant GSK3 Proteins Regulate Xylem Cell Differentiation Downstream of TDIF–TDR Signalling." *Nature Communications* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms4504>.
- Konietschke, Frank, Marius Placzek, Frank Schaarschmidt, and Ludwig A. Hothorn. 2015. "Nparcomp: An R Software Package for Nonparametric Multiple Comparisons and Simultaneous Confidence Intervals." *Journal of Statistical Software* 64 (9). <https://doi.org/10.18637/jss.v064.i09>.
- Kopittke, Peter M., Katie L. Moore, Enzo Lombi, Alessandra Gianoncelli, Brett J. Ferguson, F. Pax C. Blamey, Neal W. Menzies, et al. 2015. "Identification of the Primary Lesion of Toxic Aluminum in Plant Roots." *Plant Physiology* 167 (4): 1402–11. <https://doi.org/10.1104/pp.114.253229>.
- Korshunova, Yulia O., David Eide, W. Gregg Clark, Mary Lou Guerinot, and Himadri B. Pakrasi. 1999. "The IRT1 Protein from *Arabidopsis Thaliana* Is a Metal Transporter with a Broad Substrate Range." *Plant Molecular Biology* 40 (1): 37–44.
- Korver, Ruud A., Iko T. Koevoets, and Christa Testerink. 2018. "Out of Shape During Stress: A Key Role for Auxin." *Trends in Plant Science*, June. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.011>.
- Kosová, Klára, Pavel Vítámvás, Ilja Tom Prášil, and Jenny Renaut. 2011. "Plant Proteome Changes under Abiotic Stress — Contribution of Proteomics Studies to Understanding Plant Stress Response." *Journal of Proteomics* 74 (8): 1301–22. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.006>.
- Kranner, Ilse, Farida V. Minibayeva, Richard P. Beckett, and Charlotte E. Seal. 2010. "What Is Stress? Concepts, Definitions and Applications in Seed Science: Tansley Review." *New Phytologist* 188 (3): 655–73. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>.
- Křeček, Pavel, Petr Skůpa, Jiří Libus, Satoshi Naramoto, Ricardo Tejos, Jiří Friml, and Eva Zažímalová. 2009. "The PIN-FORMED (PIN) Protein Family of Auxin Transporters." *Genome Biology* 10 (12): 1.
- Kruger, Ellen L., Todd A. Anderson, Joel R. Coats, American Chemical Society, American Chemical Society, and American Chemical Society, eds. 1997. *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. ACS Symposium Series 664. Washington, DC: American Chemical Society.
- Krzyszowska, Magdalena. 2011. "The Cell Wall in Plant Cell Response to Trace Metals: Polysaccharide Remodeling and Its Role in Defense Strategy." *Acta Physiologiae Plantarum* 33 (1): 35–51. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0581-z>.
- Kulik, A., A. Anielska-Mazur, M. Bucholc, E. Koen, K. Szymanska, A. Zmienko, E. Krzywinska, et al. 2012. "SNF1-Related Protein Kinases Type 2 Are Involved in Plant Responses to Cadmium Stress." *PLANT PHYSIOLOGY* 160 (2): 868–83. <https://doi.org/10.1104/pp.112.194472>.
- Kulik, Anna, Izabela Wawer, Ewa Krzywińska, Maria Bucholc, and Grażyna Dobrowolska. 2011. "SnRK2 Protein Kinases—Key Regulators of Plant Response to Abiotic Stresses." *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 15 (12): 859–72. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0091>.
- Kumpf, Robert P., and Moritz K. Nowack. 2015. "The Root Cap: A Short Story of Life and Death." *Journal of Experimental Botany* 66 (19): 5651–62. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv295>.
- Kurihara, Daisuke, Sachihiro Matsunaga, Akira Kawabe, Satoru Fujimoto, Masanori Noda, Susumu Uchiyama, and Kiichi Fukui. 2006. "Aurora Kinase Is Required for Chromosome Segregation in Tobacco BY-2 Cells." *The Plant Journal* 48 (4): 572–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02893.x>.
- Kutschmar, Anke, Guillaume Rzewuski, Nils Stührwohldt, Gerrit T. S. Beemster, Dirk Inzé, and Margret Sauter. 2009. "PSK-A Promotes Root Growth in *Arabidopsis*." *New Phytologist* 181 (4): 820–31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02710.x>.
- Lally, David, Peter Ingmire, Hong-Yun Tong, and Zheng-Hui He. 2001. "Antisense Expression of a Cell Wall-associated Protein Kinase, WAK4, Inhibits Cell Elongation and Alters Morphology." *The Plant Cell* 13 (6): 1317–32.
- Lamberti, Giorgia, Irene L. Gügel, Jörg Meurer, Jürgen Soll, and Serena Schwenkert. 2011. "The Cytosolic Kinases STY8, STY17, and STY46 Are Involved in Chloroplast Differentiation in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 157 (1): 70–85. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182774>.
- Lane, T. W., and F. M. M. Morel. 2000. "A Biological Function for Cadmium in Marine Diatoms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (9): 4627–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.090091397>.
- Lanouette, S., V. Mongeon, D. Figeys, and J.-F. Couture. 2014. "The Functional Diversity of Protein Lysine Methylation." *Molecular Systems Biology* 10 (4): 724–724. <https://doi.org/10.1002/msb.134974>.
- Study." *Environmental and Experimental Botany* 77 (April): 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.11.005>.

Références

- Laurette, Julien, Camille Larue, Clarisse Mariet, François Brisset, Hicham Khodja, Jacques Bourguignon, and Marie Carrière. 2012a. "Influence of Uranium Speciation on Its Accumulation and Translocation in Three Plant Species: Oilseed Rape, Sunflower and Wheat." *Environmental and Experimental Botany* 77 (April): 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.11.007>.
- . 2012b. "Influence of Uranium Speciation on Its Accumulation and Translocation in Three Plant Species: Oilseed Rape, Sunflower and Wheat." *Environmental and Experimental Botany* 77 (April): 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.11.007>.
- Le, D. D., and D. G. Fujimori. 2012. "Protein and Nucleic Acid Methylating Enzymes: Mechanisms and Regulation." *Curr Opin Chem Biol* 16 (5-6): 507–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.09.014>.
- Lee, Yuree, Maria C. Rubio, Julien Alassimone, and Niko Geldner. 2013. "A Mechanism for Localized Lignin Deposition in the Endodermis." *Cell* 153 (2): 402–12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.045>.
- Lehtimäki, N., M. M. Koskela, K. M. Dahlstrom, E. Pakula, M. Lintala, M. Scholz, M. Hippler, et al. 2014. "Posttranslational Modifications of FERREDOXIN-NADP+ OXIDOREDUCTASE in Arabidopsis Chloroplasts." *Plant Physiol* 166 (4): 1764–76. <https://doi.org/10.1104/pp.114.249094>.
- Lehti-Shiu, M. D., and S.-H. Shiu. 2012. "Diversity, Classification and Function of the Plant Protein Kinase Superfamily." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1602): 2619–39. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0003>.
- Lequeux, Héliène, Christian Hermans, Stanley Lutts, and Nathalie Verbruggen. 2010a. "Response to Copper Excess in Arabidopsis Thaliana: Impact on the Root System Architecture, Hormone Distribution, Lignin Accumulation and Mineral Profile." *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (8): 673–82. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.05.005>.
- Lichtenthaler, Hartmut K. 1998. "The Stress Concept in Plants: An Introduction." *Annals of the New York Academy of Sciences* 851 (1): 187–98.
- Lieser, Scot A., Brandon E. Aubol, Lilly Wong, Patricia A. Jennings, and Joseph A. Adams. 2005. "Coupling Phosphoryl Transfer and Substrate Interactions in Protein Kinases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1754 (1-2): 191–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.024>.
- Li, J.-Y., Y.-L. Fu, S. M. Pike, J. Bao, W. Tian, Y. Zhang, C.-Z. Chen, et al. 2010. "The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.8 Functions in Nitrate Removal from the Xylem Sap and Mediates Cadmium Tolerance." *THE PLANT CELL ONLINE* 22 (5): 1633–46. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075242>.
- Lin, H., W. Du, Y. Yang, K. S. Schumaker, and Y. Guo. 2014. "A Calcium-Independent Activation of the Arabidopsis SOS2-Like Protein Kinase24 by Its Interacting SOS3-Like Calcium Binding Protein1." *PLANT PHYSIOLOGY* 164 (4): 2197–2206. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232272>.
- Lin, Wen-Yong, Daisuke Matsuoka, Daisuke Sasayama, and Takashi Nanmori. 2010. "A Splice Variant of Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase and Its Regulatory Function in the MKK6–MPK13 Pathway." *Plant Science* 178 (3): 245–50. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.01.006>.
- Lipson, Rebecca S., Kristofor J. Webb, and Steven G. Clarke. 2010. "Two Novel Methyltransferases Acting upon Eukaryotic Elongation Factor 1A in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500 (2): 137–43. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.023>.
- Li, Qiuling, Yan Zhao, Minghui Yue, Yongbiao Xue, and Shilai Bao. 2016. "The Protein Arginine Methylase 5 (PRMT5/SKB1) Gene Is Required for the Maintenance of Root Stem Cells in Response to DNA Damage." *Journal of Genetics and Genomics* 43 (4): 187–97. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.02.007>.
- Liu, Chunyan, Falong Lu, Xia Cui, and Xiaofeng Cao. 2010. "Histone Methylation in Higher Plants." *Annual Review of Plant Biology* 61 (1): 395–420. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091939>.
- Liu, Jun, James Mitch Elmore, Zuh-Jyh Daniel Lin, and Gitta Coaker. 2011. "A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Phosphorylates the Host Target RIN4, Leading to the Activation of a Plant Innate Immune Receptor." *Cell Host & Microbe* 9 (2): 137–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.010>.
- Liu, Xiao-Min, Kyung Eun Kim, Kang-Chang Kim, Xuan Canh Nguyen, Hay Ju Han, Mi Soon Jung, Ho Soo Kim, et al. 2010. "Cadmium Activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via Accumulation of Reactive Oxygen Species." *Phytochemistry* 71 (5-6): 614–18. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.01.005>.
- Liu, Yutong, Ai Zhang, Hao Yin, Qingxiang Meng, Xiaoming Yu, Shuangzhan Huang, Jie Wang, Rafiq Ahmad, Bao Liu, and Zheng-Yi Xu. 2018. "Trithorax-Group Proteins ARABIDOPSIS TRITHORAX4 (ATX4) and ATX5 Function in Abscisic Acid and Dehydration Stress Responses." *New Phytologist* 217 (4): 1582–97. <https://doi.org/10.1111/nph.14933>.
- Li, Weiqiang, Mohammad A. Khan, Shinjiro Yamaguchi, and Yuji Kamiya. 2005. "Effects of Heavy Metals on Seed Germination and Early Seedling Growth of Arabidopsis Thaliana." *Plant Growth Regulation* 46 (1): 45–50. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-6324-2>.
- Li, Zhaoling, Zhihong Liu, Ruijuan Chen, Xiaojun Li, Peidong Tai, Zongqiang Gong, Chunyun Jia, and Wan Liu. 2015. "DNA Damage and Genetic Methylation Changes Caused by Cd in Arabidopsis Thaliana Seedlings: DNA Damage and Genetic Methylation Changes as a Result of Cd." *Environmental Toxicology and Chemistry* 34 (9): 2095–2103. <https://doi.org/10.1002/etc.3033>.
- Ljung, K. 2005. "Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in Arabidopsis Roots." *THE PLANT CELL ONLINE* 17 (4): 1090–1104. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029272>.
- Loix, Christophe, Michiel Huybrechts, Jaco Vangronsveld, Marijke Gielen, Els Keunen, and Ann Cuypers. 2017. "Reciprocal Interactions between Cadmium-Induced Cell Wall Responses and Oxidative Stress in Plants." *Frontiers in Plant Science* 8 (October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01867>.
- Loizeau, K., B. Gambonnet, G.-F. Zhang, G. Curien, S. Jabrin, D. Van Der Straeten, W. E. Lambert, F. Rebeille, and S. Ravel. 2007. "Regulation of One-Carbon Metabolism in Arabidopsis: The N-Terminal Regulatory Domain of Cystathionine - Synthase Is Cleaved in Response to Folate Starvation." *PLANT PHYSIOLOGY* 145 (2): 491–503. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105379>.
- López-Bucio, Jesús Salvador, Javier Raya-González, Gustavo Ravelo-Ortega, León Francisco Ruiz-Herrera, Maricela Ramos-Vega, Patricia León, José López-Bucio, and Ángel Arturo Guevara-García. 2018. "Mitogen Activated Protein Kinase 6 and MAP Kinase Phosphatase 1 Are Involved in the Response of Arabidopsis Roots to L-Glutamate." *Plant Molecular Biology* 96 (4-5): 339–51. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0699-8>.
- López-Bucio, José, Randy Ortiz-Castro, León Francisco Ruiz-Herrera, Consuelo Vargas Juárez, Fátima Hernández-Madrigal, Yazmín Carreón-Abud, and Miguel Martínez-Trujillo. 2015. "Chromate Induces Adventitious Root Formation via Auxin Signalling and SOLITARY-ROOT/IAA14 Gene Function in Arabidopsis Thaliana." *BioMetals* 28 (2): 353–65. <https://doi.org/10.1007/s10534-015-9838-8>.

Références

- Lopez-Valenzuela, J. A., B. C. Gibbon, P. A. Hughes, T. W. Dreher, and B. A. Larkins. 2003. "eEF1A Isoforms Change in Abundance and Actin-Binding Activity during Maize Endosperm Development." *Plant Physiol* 133 (3): 1285–95. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027854>.
- Luan, Sheng. 2003. "P ROTEIN P HOSPHATASES IN P LANTS." *Annual Review of Plant Biology* 54 (1): 63–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134743>.
- Lukas, T. J., D. B. Iverson, M. Schleicher, and D. M. Watterson. 1984. "Structural Characterization of a Higher Plant Calmodulin : Spinacia Oleracea." *Plant Physiol* 75 (3): 788–95.
- Luo, Xingju, Zhizhong Chen, Junping Gao, and Zhizhong Gong. 2014. "Abscisic Acid Inhibits Root Growth in Arabidopsis through Ethylene Biosynthesis." *The Plant Journal* 79 (1): 44–55. <https://doi.org/10.1111/tpj.12534>.
- Lv, De-Kang, Xi Bai, Yong Li, Xiao-Dong Ding, Ying Ge, Hua Cai, Wei Ji, Nalahu Wu, and Yan-Ming Zhu. 2010. "Profiling of Cold-Stress-Responsive miRNAs in Rice by Microarrays." *Gene* 459 (1-2): 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.03.011>.
- Macho, Alberto P., Rosa Lozano-Durán, and Cyril Zipfel. 2015. "Importance of Tyrosine Phosphorylation in Receptor Kinase Complexes." *Trends in Plant Science* 20 (5): 269–72. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.02.005>.
- Magnani, R., B. Chaffin, E. Dick, M. L. Bricken, R. L. Houtz, and L. H. Bradley. 2012. "Utilization of a Calmodulin Lysine Methyltransferase Co-Expression System for the Generation of a Combinatorial Library of Post-Translationally Modified Proteins." *Protein Expr Purif* 86 (2): 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.012>.
- Magnani, Roberta, Lynnette M.A. Dirk, Raymond C. Trievel, and Robert L. Houtz. 2010. "Calmodulin Methyltransferase Is an Evolutionarily Conserved Enzyme That Trimethylates Lys-115 in Calmodulin." *Nature Communications* 1 (4): 1–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms1044>.
- Mahmood, Khalid, Rubini Kannangara, Kirsten Jørgensen, and Anja T Fuglsang. 2014. "Analysis of Peptide PSY1 Responding Transcripts in the Two Arabidopsis Plant Lines: Wild Type and psy1r Receptor Mutant." *BMC Genomics* 15 (1): 441. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-441>.
- Mähönen, Ari Pekka, Masayuki Higuchi, Kirsi Törmäkangas, Kaori Miyawaki, Melissa S. Pischke, Michael R. Sussman, Ykä Helariutta, and Tatsuo Kakimoto. 2006. "Cytokinins Regulate a Bidirectional Phosphorelay Network in Arabidopsis." *Current Biology* 16 (11): 1116–22. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.030>.
- Malecki, J., V. K. Aileni, A. Y. Y. Ho, J. Schwarz, A. Moen, V. Sorensen, B. S. Nilges, M. E. Jakobsson, S. A. Leidel, and P. O. Falnes. 2017. "The Novel Lysine Specific Methyltransferase METTL21B Affects mRNA Translation through Inducible and Dynamic Methylation of Lys-165 in Human Eukaryotic Elongation Factor 1 Alpha (eEF1A)." *Nucleic Acids Res* 45 (8): 4370–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx002>.
- Malecki, J., A. Y. Ho, A. Moen, H. A. Dahl, and P. O. Falnes. 2015. "Human METTL20 Is a Mitochondrial Lysine Methyltransferase That Targets the Beta Subunit of Electron Transfer Flavoprotein (ETFbeta) and Modulates Its Activity." *J Biol Chem* 290 (1): 423–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.614115>.
- Malecki, J., M. E. Jakobsson, A. Y. Y. Ho, A. Moen, A. C. Rustan, and P. O. Falnes. 2017. "Uncovering Human METTL12 as a Mitochondrial Methyltransferase That Modulates Citrate Synthase Activity through Metabolite-Sensitive Lysine Methylation." *J Biol Chem* 292 (43): 17950–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.808451>.
- Mambro, Riccardo Di, Micol De Ruvo, Elena Pacifici, Elena Salvi, Rosangela Sozzani, Philip N. Benfey, Wolfgang Busch, et al. 2017. "Auxin Minimum Triggers the Developmental Switch from Cell Division to Cell Differentiation in the Arabidopsis Root." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (36): E7641–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705833114>.
- Markovic, Milenko, and Nevenka Pavkovic. 1983. "Solubility and Equilibrium Constants of uranyl(2+) in Phosphate Solutions." *Inorganic Chemistry* 22 (6): 978–82. <https://doi.org/10.1021/ic00148a027>.
- Martin, Torsten, Rita Sharma, Claudia Sippel, Karin Waegemann, Jürgen Soll, and Ute C. Vothknecht. 2006. "A Protein Kinase Family in Arabidopsis Phosphorylates Chloroplast Precursor Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 281 (52): 40216–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606580200>.
- Mastrangelo, Anna M., Daniela Marone, Giovanni Laidò, Anna M. De Leonardis, and Pasquale De Vita. 2012. "Alternative Splicing: Enhancing Ability to Cope with Stress via Transcriptome Plasticity." *Plant Science* 185-186 (April): 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.09.006>.
- Matsubayashi, Yoshikatsu, Hidefumi Shinohara, and Mari Ogawa. 2006. "Identification and Functional Characterization of Phytosulfokine Receptor Using a Ligand-Based Approach." *The Chemical Record* 6 (6): 356–64. <https://doi.org/10.1002/tcr.20090>.
- Mayer, B., F. Brunner, and K. Schmidt. 1993. "Inhibition of Nitric Oxide Synthesis by Methylene Blue." *Biochemical Pharmacology* 45 (2): 367–74.
- Ma, Y., S. V. Pollock, Y. Xiao, K. Cunnusamy, and J. V. Moroney. 2011. "Identification of a Novel Gene, CIA6, Required for Normal Pyrenoid Formation in Chlamydomonas Reinhardtii." *Plant Physiol* 156 (2): 884–96. <https://doi.org/10.1104/pp.111.173922>.
- Mazzoleni, Mery, Sylvie Figueat, Jacqueline Martin-Laffon, Morgane Mininno, Annabelle Gilgen, Mélanie Leroux, Sabine Brugière, Marianne Tardif, Claude Alban, and Stéphane Ravanel. 2015. "Dual Targeting of the Protein Methyltransferase PrmA Contributes to Both Chloroplastic and Mitochondrial Ribosomal Protein L11 Methylation in Arabidopsis." *Plant and Cell Physiology* 56 (9): 1697–1710.
- Meinke, D. W. 1998. "Arabidopsis Thaliana: A Model Plant for Genome Analysis." *Science* 282 (5389): 662–82. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>.
- Mellor, Nathan, Benjamin Péret, Silvana Porco, Ilkka Sairanen, Karin Ljung, Malcolm Bennett, and John King. 2015. "Modelling of Arabidopsis LAX3 Expression Suggests Auxin Homeostasis." *Journal of Theoretical Biology* 366 (February): 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.11.003>.
- Menager, Marie-Thérèse, Jacqueline Garnier-Laplace, and Max Goyffon. 2009. *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*. Paris; Cachan: Éditions Tec & Doc : Lavoisier ; Éditions médicales internationales.
- Mendoza-Cózatl, David G, Timothy O Jobe, Felix Hauser, and Julian I Schroeder. 2011. "Long-Distance Transport, Vacuolar Sequestration, Tolerance, and Transcriptional Responses Induced by Cadmium and Arsenic." *Current Opinion in Plant Biology* 14 (5): 554–62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.004>.
- Mendoza-Soto, Ana B., Federico Sánchez, and Georgina Hernández. 2012. "MicroRNAs as Regulators in Plant Metal Toxicity Response." *Frontiers in Plant Science* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00105>.
- Merlot, Sylvain, Françoise Gosti, Danièle Guerrier, Alain Vavasseur, and Jérôme Giraudat. 2001. "The ABI1 and ABI2 Protein Phosphatases 2C Act in a Negative Feedback Regulatory Loop of the Abscisic Acid Signalling Pathway: ABI2 Is a

Références

- Negative Regulator of ABA Signalling." *The Plant Journal* 25 (3): 295–303. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00965.x>.
- Meyer, C.-L., M. Juraniec, S. Huguët, E. Chaves-Rodriguez, P. Salis, M.-P. Isaure, E. Goormaghtigh, and N. Verbruggen. 2015a. "Intraspecific Variability of Cadmium Tolerance and Accumulation, and Cadmium-Induced Cell Wall Modifications in the Metal Hyperaccumulator *Arabidopsis Halleri*." *Journal of Experimental Botany* 66 (11): 3215–27. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv144>.
- Michniewicz, Marta, Marcelo K. Zago, Lindy Abas, Dolf Weijers, Alois Schweighofer, Irute Meskiene, Marcus G. Heisler, et al. 2007. "Antagonistic Regulation of PIN Phosphorylation by PP2A and PINOID Directs Auxin Flux." *Cell* 130 (6): 1044–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.033>.
- Michon, Jérôme, Sandrine Frelon, Cédric Garnier, and Frédéric Coppin. 2010. "Determinations of Uranium(VI) Binding Properties with Some Metalloproteins (Transferrin, Albumin, Metallothionein and Ferritin) by Fluorescence Quenching." *Journal of Fluorescence* 20 (2): 581–90. <https://doi.org/10.1007/s10895-009-0587-3>.
- Millar, A. Harvey, Jim Whelan, and Ian Small. 2006. "Recent Surprises in Protein Targeting to Mitochondria and Plastids." *Current Opinion in Plant Biology* 9 (6): 610–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.002>.
- Miller, G., K. Schlauch, R. Tam, D. Cortes, M. A. Torres, V. Shulaev, J. L. Dangl, and R. Mittler. 2009. "The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli." *Science Signaling* 2 (84): ra45–ra45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000448>.
- Mininno, M., S. Brugiére, V. Pautre, A. Gilgen, S. Ma, M. Ferro, M. Tardif, C. Alban, and S. Ravanel. 2012. "Characterization of Chloroplastic Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolases as Lysine-Methylated Proteins in Plants." *Journal of Biological Chemistry* 287 (25): 21034–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.35976>.
- Mironov, V. 1999. "Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants The Nexus." *THE PLANT CELL ONLINE* 11 (4): 509–22. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.509>.
- Misson, Julie, Pascale Henner, Marcel Morello, Magali Floriani, Ting-Di Wu, Jean-Luc Guerquin-Kern, and Laureline Février. 2009. "Use of Phosphate to Avoid Uranium Toxicity in *Arabidopsis Thaliana* Leads to Alterations of Morphological and Physiological Responses Regulated by Phosphate Availability." *Environmental and Experimental Botany* 67 (2): 353–62. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.09.001>.
- Mittler, Ron. 2017. "ROS Are Good." *Trends in Plant Science* 22 (1): 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.
- Mittler, Ron, Sandy Vanderauwera, Martin Gollery, and Frank Van Breusegem. 2004. "Reactive Oxygen Gene Network of Plants." *Trends in Plant Science* 9 (10): 490–98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>.
- Mittler, Ron, Sandy Vanderauwera, Nobuhiro Suzuki, Gad Miller, Vanesa B. Tognetti, Klaas Vandepoele, Marty Gollery, Vladimir Shulaev, and Frank Van Breusegem. 2011. "ROS Signaling: The New Wave?" *Trends in Plant Science* 16 (6): 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>.
- Miura, K., J. Lee, Q. Gong, S. Ma, J. B. Jin, C. Y. Yoo, T. Miura, A. Sato, H. J. Bohnert, and P. M. Hasegawa. 2011. "SIZ1 Regulation of Phosphate Starvation-Induced Root Architecture Remodeling Involves the Control of Auxin Accumulation." *PLANT PHYSIOLOGY* 155 (2): 1000–1012. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165191>.
- Møller, Ian M. 2001. "P ITC M XIDATIVE S TRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52 (1): 561–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.561>.
- Moore, K. E., and O. Gozani. 2014. "An Unexpected Journey: Lysine Methylation across the Proteome." *Biochim Biophys Acta* 1839 (12): 1395–1403. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.008>.
- Mosammaparast, Nima, and Yang Shi. 2010a. "Reversal of Histone Methylation: Biochemical and Molecular Mechanisms of Histone Demethylases." *Annual Review of Biochemistry* 79: 155–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.103946>.
- Motojima, K., and K. Sakaguchi. 1982. "Part of the Lysyl Residues in Wheat Alpha-Amylase Is Methylated as N-Epsilon-Trimethyl Lysine." *Plant and Cell Physiology* 23 (4): 709–12.
- Müller, Jens, Theresa Toev, Marcus Heisters, Janine Teller, Katie L. Moore, Gerd Hause, Dhurvas Chandrasekaran Dinesh, Katharina Bürstenbinder, and Steffen Abel. 2015. "Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability." *Developmental Cell* 33 (2): 216–30. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.007>.
- Murn, J., and Y. Shi. 2017. "The Winding Path of Protein Methylation Research: Milestones and New Frontiers." *Nat Rev Mol Cell Biol* 18 (8): 517–27. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.35>.
- Mustilli, A.-C. 2002. "Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production." *THE PLANT CELL ONLINE* 14 (12): 3089–99. <https://doi.org/10.1105/tpc.007906>.
- Nagata, Toshifumi, Setsuko Todoriki, and Shoshi Kikuchi. 2004. "Radial Expansion of Root Cells and Elongation of Root Hairs of *Arabidopsis Thaliana* Induced by Massive Doses of Gamma Irradiation." *Plant and Cell Physiology* 45 (11): 1557–65.
- Nakano, J., and G. Meshitsuka. 1992. "The Detection of Lignin." In *Methods in Lignin Chemistry*, edited by Stephen Y. Lin and Carlton W. Dence, 23–32. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-74065-7_2.
- Nakashima, Kazuo, Hironori Takasaki, Junya Mizoi, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. 2012. "NAC Transcription Factors in Plant Abiotic Stress Responses." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1819 (2): 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.005>.
- Ndamukong, I., H. Lapko, R. L. Cerny, and Z. Avramova. 2011. "A Cytoplasm-Specific Activity Encoded by the Trithorax-like ATX1 Gene." *Nucleic Acids Res* 39 (11): 4709–18. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1300>.
- Nedukha, O. M. 2015. "Callose: Localization, Functions, and Synthesis in Plant Cells." *Cytology and Genetics* 49 (1): 49–57. <https://doi.org/10.3103/S0095452715010090>.
- Ng, Danny W-K, Tao Wang, Mahesh B. Chandrasekharan, Rodolfo Aramayo, Sunee Kertbundit, and Timothy C. Hall. 2007. "Plant SET Domain-Containing Proteins: Structure, Function and Regulation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1769 (5-6): 316–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.04.003>.
- Nguyen, Anh Tram, and Yi Zhang. 2011. "The Diverse Functions of Dot1 and H3K79 Methylation." *Genes & Development* 25 (13): 1345–58. <https://doi.org/10.1101/gad.2057811>.
- Niu, Lifang, Falong Lu, Yanxi Pei, Chunyan Liu, and Xiaofeng Cao. 2007. "Regulation of Flowering Time by the Protein Arginine Methyltransferase AtPRMT10." *EMBO Reports* 8 (12): 1190–95. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401111>.

Références

- Niu, L., Y. Zhang, Y. Pei, C. Liu, and X. Cao. 2008. "Redundant Requirement for a Pair of PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE4 Homologs for the Proper Regulation of Arabidopsis Flowering Time." *PLANT PHYSIOLOGY* 148 (1): 490–503. <https://doi.org/10.1104/pp.108.124727>.
- Nongpiur, Ramsong, Praveen Soni, Ratna Karan, Sneha Singla-Pareek, and Ashwani Pareek. 2012. "Histidine Kinases in Plants: Cross Talk between Hormone and Stress Responses." *Plant Signaling & Behavior* 7 (10): 1230–37. <https://doi.org/10.4161/psb.21516>.
- Novikova, Galina V., Luis A. J. Mur, Alexander V. Nosov, Artem A. Fomenkov, Kirill S. Mironov, Anna S. Mamaeva, Evgeny S. Shilov, Victor Y. Rakitin, and Michael A. Hall. 2017. "Nitric Oxide Has a Concentration-Dependent Effect on the Cell Cycle Acting via EIN2 in Arabidopsis Thaliana Cultured Cells." *Frontiers in Physiology* 8 (March). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00142>.
- Ogawa, Daisuke, Kiyomi Abe, Akio Miyao, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Megumi Mizutani, Haruka Morita, et al. 2011. "RSS1 Regulates the Cell Cycle and Maintains Meristematic Activity under Stress Conditions in Rice." *Nature Communications* 2 (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1279>.
- Oge, L., G. Bourdais, J. Bove, B. Collet, B. Godin, F. Granier, J.-P. Boutin, D. Job, M. Jullien, and P. Grappin. 2008. "Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase1 Is Involved in Both Seed Longevity and Germination Vigor in Arabidopsis." *THE PLANT CELL ONLINE* 20 (11): 3022–37. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058479>.
- Oh, M.-H., X. Wang, U. Kota, M. B. Goshe, S. D. Clouse, and S. C. Huber. 2009. "Tyrosine Phosphorylation of the BRI1 Receptor Kinase Emerges as a Component of Brassinosteroid Signaling in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (2): 658–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810249106>.
- Oh, S. H., and D. M. Roberts. 1990. "Analysis of the State of Posttranslational Calmodulin Methylation in Developing Pea Plants." *Plant Physiol* 93 (3): 880–87.
- Ong, Shao-En, Gerhard Mittler, and Matthias Mann. 2004. "Identifying and Quantifying in Vivo Methylation Sites by Heavy Methyl SILAC." *Nature Methods* 1 (2): 119–26. <https://doi.org/10.1038/nmeth715>.
- Overvoorde, P., H. Fukaki, and T. Beeckman. 2010. "Auxin Control of Root Development." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (6): a001537–a001537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>.
- Pahlisch, Steffen, Rouzanna P. Zakaryan, and Heinz Gehring. 2006. "Protein Arginine Methylation: Cellular Functions and Methods of Analysis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1764 (12): 1890–1903. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.08.008>.
- Pak, Magnolia L., Ted M. Lakowski, Dylan Thomas, Mynol I. Vhuyian, Kristina Hüsecken, and Adam Frankel. 2011. "A Protein Arginine N-Methyltransferase 1 (PRMT1) and 2 Heteromeric Interaction Increases PRMT1 Enzymatic Activity." *Biochemistry* 50 (38): 8226–40. <https://doi.org/10.1021/bi200644c>.
- Pandey, Girdhar K., Poonam Kanwar, Amarjeet Singh, Leonie Steinhörst, Amita Pandey, Akhilesh K. Yadav, Indu Tokas, et al. 2015. "Calcineurin B-Like Protein-Interacting Protein Kinase CIPK21 Regulates Osmotic and Salt Stress Responses in Arabidopsis." *Plant Physiology* 169 (1): 780–92. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00623>.
- Parrotta, Luigi. 2015. "Target or Barrier? The Cell Wall of Early- and Later-Diverging Plants vs Cadmium Toxicity: Differences in the Response Mechanisms." *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00133>.
- Passardi, F., C. Penel, and C. Dunand. 2004. "Performing the Paradoxical: How Plant Peroxidases Modify the Cell Wall." *Trends in Plant Science* 9 (11): 534–40. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.002>.
- Pavliková, Daniela, Milan Pavlík, Ludmila Staszková, Václav Motyka, Jiřina Száková, Pavel Tlustoš, and Jiří Balík. 2008. "Glutamate Kinase as a Potential Biomarker of Heavy Metal Stress in Plants." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70 (2): 223–30. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.07.006>.
- Pearson, Ralph G. 1963. "Hard and Soft Acids and Bases." *Journal of the American Chemical Society* 85 (22): 3533–39.
- . 1969. "Hard and Soft Acids and Bases." In *Survey of Progress in Chemistry*, 5:1–52. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123957061500078>.
- Pei, Y., L. Niu, F. Lu, C. Liu, J. Zhai, X. Kong, and X. Cao. 2007. "Mutations in the Type II Protein Arginine Methyltransferase AtPRMT5 Result in Pleiotropic Developmental Defects in Arabidopsis." *PLANT PHYSIOLOGY* 144 (4): 1913–23. <https://doi.org/10.1104/pp.107.099531>.
- Pennell, Roger I., and Chris Lamb. 1997. "Programmed Cell Death in Plants." *The Plant Cell* 9 (7): 1157.
- Péret, Benjamin, Mathilde Clément, Laurent Nussaume, and Thierry Desnos. 2011. "Root Developmental Adaptation to Phosphate Starvation: Better Suffer than Sorry." *Trends in Plant Science* 16 (8): 442–50. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.05.006>.
- Peti, Wolfgang, Angus C. Nairn, and Rebecca Page. 2013. "Structural Basis for Protein Phosphatase 1 Regulation and Specificity: Protein Phosphatase 1 Regulation and Specificity." *FEBS Journal* 280 (2): 596–611. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08509.x>.
- Petrásek, J., and J. Friml. 2009. "Auxin Transport Routes in Plant Development." *Development* 136 (16): 2675–88. <https://doi.org/10.1242/dev.030353>.
- Petrossian, T. C., and S. G. Clarke. 2011. "Uncovering the Human Methyltransferasome." *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (1): M110.000976–M110.000976. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000976>.
- Petrovská, Beáta, Věra Cenklová, Žaneta Pochylová, Hana Kourová, Anna Doskočilová, Ondřej Plíhal, Lenka Binarová, and Pavla Binarová. 2012. "Plant Aurora Kinases Play a Role in Maintenance of Primary Meristems and Control of Endoreduplication." *New Phytologist* 193 (3): 590–604.
- Petrov, Veselin, Jacques Hille, Bernd Mueller-Roeber, and Tsanko S. Gechev. 2015. "ROS-Mediated Abiotic Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants." *Frontiers in Plant Science* 6 (February). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00069>.
- Pfister, Alexandre, Marie Barberon, Julien Alassimone, Lothar Kalmbach, Yuree Lee, Joop EM Vermeer, Misako Yamazaki, et al. 2014. "A Receptor-like Kinase Mutant with Absent Endodermal Diffusion Barrier Displays Selective Nutrient Homeostasis Defects." *eLife* 3 (September). <https://doi.org/10.7554/eLife.03115>.
- Pikaard, C. S., and O. Mittelsten Scheid. 2014. "Epigenetic Regulation in Plants." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (12): a019315–a019315. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019315>.
- Poschenrieder, Charlotte, Catalina Cabot, Soledad Martos, Berta Gallego, and Juan Barceló. 2013a. "Do Toxic Ions Induce Hormesis in Plants?" *Plant Science* 212 (November): 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.012>.
- Potters, Geert, Taras P. Pasternak, Yves Guisez, and Marcel A. K. Jansen. 2009. "Different Stresses, Similar Morphogenic Responses: Integrating a Plethora of Pathways." *Plant, Cell & Environment* 32 (2): 158–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01908.x>.
- Potters, Geert, Taras P. Pasternak, Yves Guisez, Klaus J. Palme, and Marcel A.K. Jansen. 2007. "Stress-Induced Morphogenic Responses: Growing out of Trouble?" *Trends in Plant Science* 12 (3): 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.004>.

Références

- Poulard, Coralie, Laura Corbo, and Muriel Le Romancer. 2016. "Protein Arginine Methylation/demethylation and Cancer." *Oncotarget* 7 (41). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11376>.
- Pozo, Juan Carlos del, M. Angeles Lopez-Matas, Elena Ramirez-Parra, and Crisanto Gutierrez. 2005. "Hormonal Control of the Plant Cell Cycle." *Physiologia Plantarum* 123 (2): 173–83. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00420.x>.
- Pradhan Mitra, Prajakta, and Dominique Loqué. 2014. "Histochemical Staining of Arabidopsis Thaliana Secondary Cell Wall Elements." *Journal of Visualized Experiments*, no. 87 (May). <https://doi.org/10.3791/51381>.
- Priller, Johannes Peter Roman, Stephen Reid, Patrick Konein, Petra Dietrich, and Sophia Sonnewald. 2016. "The Xanthomonas Campestris Pv. Vesicatoria Type-3 Effector XopB Inhibits Plant Defence Responses by Interfering with ROS Production." Edited by Keith R. Davis. *PLOS ONE* 11 (7): e0159107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159107>.
- Prinz, William A., Fredrik \AAslund, Arne Holmgren, and Jon Beckwith. 1997. "The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the Escherichia coli Cytoplasm." *Journal of Biological Chemistry* 272 (25): 15661–67.
- Qian, C., and M.-M. Zhou. 2006. "SET Domain Protein Lysine Methyltransferases: Structure, Specificity and Catalysis." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63 (23): 2755–63. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6274-5>.
- Qin, YuZhi, Xu Li, Ming Guo, KeQin Deng, JianZhong Lin, DongYing Tang, XinHong Guo, and XuanMing Liu. 2008. "Regulation of Salt and ABA Responses by CIPK14, a Calcium Sensor Interacting Protein Kinase in Arabidopsis." *Science in China Series C: Life Sciences* 51 (5): 391–401. <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0059-z>.
- Racolta, Adriana, Anthony C. Bryan, and Frans E. Tax. 2014. "The Receptor-like Kinases GSO1 and GSO2 Together Regulate Root Growth in Arabidopsis through Control of Cell Division and Cell Fate Specification." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 243 (2): 257–78. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24066>.
- Rahikainen, Moona, Jesús Pascual, Sara Alegre, Guido Durian, and Saijalliisa Kangasjärvi. 2016. "PP2A Phosphatase as a Regulator of ROS Signaling in Plants." *Antioxidants* 5 (1): 8. <https://doi.org/10.3390/antiox5010008>.
- Ravel, S., B. Gakière, D. Job, and R. Douce. 1998. "The Specific Features of Methionine Biosynthesis and Metabolism in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (13): 7805–12.
- Raynaud, Cécile, Rosangela Sozzani, Nathalie Glab, Séverine Domenichini, Claudette Perennes, Rino Cella, Eva Kondorosi, and Catherine Bergounioux. 2006. "Two Cell-Cycle Regulated SET-Domain Proteins Interact with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Arabidopsis." *The Plant Journal* 47 (3): 395–407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02799.x>.
- R Core Team. 2017. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (version 3.3.2). Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.
- Rébeillé, Fabrice, Claude Alban, Jacques Bourguignon, Stéphane Ravel, and Roland Douce. 2007. "The Role of Plant Mitochondria in the Biosynthesis of Coenzymes." *Photosynthesis Research* 92 (2): 149–62. <https://doi.org/10.1007/s1120-007-9167-z>.
- Reddy, Anireddy S.N. 2007. "Alternative Splicing of Pre-Messenger RNAs in Plants in the Genomic Era." *Annual Review of Plant Biology* 58 (1): 267–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103754>.
- Reitz, Thomas, Andre Rossberg, Astrid Barkleit, Sonja Selenska-Pobell, and Mohamed L. Merroun. 2014. "Decrease of U(VI) Immobilization Capability of the Facultative Anaerobic Strain Paenibacillus Sp. JG-TB8 under Anoxic Conditions Due to Strongly Reduced Phosphatase Activity." Edited by Maxim I. Boyanov. *PLoS ONE* 9 (8): e102447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102447>.
- Ren, Li, Di Zhang, Guan-qun Chen, Barbara M. Reed, Xiao-hui Shen, and Huo-ying Chen. 2015. "Transcriptomic Profiling Revealed the Regulatory Mechanism of Arabidopsis Seedlings Response to Oxidative Stress from Cryopreservation." *Plant Cell Reports* 34 (12): 2161–78. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1859-9>.
- Rentel, Maike C., David Lecourieux, Fatma Ouaked, Sarah L. Usher, Lindsay Petersen, Haruko Okamoto, Heather Knight, et al. 2004. "OX1 Kinase Is Necessary for Oxidative Burst-Mediated Signalling in Arabidopsis." *Nature* 427 (6977): 858–61. <https://doi.org/10.1038/nature02353>.
- Reyt, Guilhem, Soukaina Boudouf, Jossia Boucherez, Frédéric Gaymard, and Jean-Francois Briat. 2015. "Iron- and Ferritin-Dependent Reactive Oxygen Species Distribution: Impact on Arabidopsis Root System Architecture." *Molecular Plant* 8 (3): 439–53. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.014>.
- Rhein, V. F., J. Carroll, S. Ding, I. M. Fearnley, and J. E. Walker. 2017. "Human METTL12 Is a Mitochondrial Methyltransferase That Modifies Citrate Synthase." *FEBS Lett* 591 (12): 1641–52. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12649>.
- Rhein, V. F., J. Carroll, J. He, S. Ding, I. M. Fearnley, and J. E. Walker. 2014. "Human METTL20 Methylates Lysine Residues Adjacent to the Recognition Loop of the Electron Transfer Flavoprotein in Mitochondria." *J Biol Chem* 289 (35): 24640–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.580464>.
- Río, Luis A. del. 2011. "Peroxisomes as a Cellular Source of Reactive Nitrogen Species Signal Molecules." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 506 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.10.022>.
- . 2015. "ROS and RNS in Plant Physiology: An Overview." *Journal of Experimental Botany* 66 (10): 2827–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>.
- Roberts, D. M., P. M. Rowe, F. L. Siegel, T. J. Lukas, and D. M. Watterson. 1986. "Trimethyllysine and Protein Function. Effect of Methylation and Mutagenesis of Lysine 115 of Calmodulin on NAD Kinase Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 261 (4): 1491–94.
- Rodriguez-Serrano, M., M. C. Romero-Puertas, D. M. Pazmino, P. S. Testillano, M. C. Risueno, L. A. del Rio, and L. M. Sandalio. 2009. "Cellular Response of Pea Plants to Cadmium Toxicity: Cross Talk between Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, and Calcium." *PLANT PHYSIOLOGY* 150 (1): 229–43. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131524>.
- Roschzttardt, Hannelz, Geneviève Conéjéro, Catherine Curie, and Stéphane Mari. 2009. "Identification of the Endodermal Vacuole as the Iron Storage Compartment in the Arabidopsis Embryo." *Plant Physiology* 151 (3): 1329–38. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144444>.
- Roschzttardt, H., G. Conejero, C. Curie, and S. Mari. 2009. "Identification of the Endodermal Vacuole as the Iron Storage Compartment in the Arabidopsis Embryo." *PLANT PHYSIOLOGY* 151 (3): 1329–38. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144444>.
- Ross, K. E., H. Huang, J. Ren, C. N. Arighi, G. Li, C. O. Tudor, M. Lv, et al. 2017. "iPTMnet: Integrative Bioinformatics for Studying PTM Networks." *Methods Mol Biol* 1558: 333–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6783-4_16.
- Rothbart, Scott B., and Brian D. Strahl. 2014. "Interpreting the Language of Histone and DNA Modifications." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1839 (8): 627–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>.
- Roy, Sujit. 2016. "Function of MYB Domain Transcription Factors in Abiotic Stress and Epigenetic Control of Stress Response in Plant Genome." *Plant Signaling & Behavior* 11 (1): e1117723. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1117723>.

Références

- Ruyskensvelde, Valerie Van, Frank Van Breusegem, and Katrien Van Der Kelen. 2018. "Post-Transcriptional Regulation of the Oxidative Stress Response in Plants." *Free Radical Biology and Medicine*, March. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.032>.
- Ryšlavá, Helena, Veronika Doubnerová, Daniel Kavan, and Ondřej Vaněk. 2013. "Effect of Posttranslational Modifications on Enzyme Function and Assembly." *Journal of Proteomics* 92 (October): 80–109. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.025>.
- Sahr, Tobias, Thibaud Adam, Cécile Fizames, Christophe Maurel, and Véronique Santoni. 2010. "O-Carboxyl- and N-Methyltransferases Active on Plant Aquaporins." *Plant and Cell Physiology* 51 (12): 2092–2104. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq171>.
- Saidi, Younousse, Timothy J. Hearn, and Juliet C. Coates. 2012. "Function and Evolution of 'green' GSK3/Shaggy-like Kinases." *Trends in Plant Science* 17 (1): 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.002>.
- Saini, Shivani, Isha Sharma, Navdeep Kaur, and Pratap Kumar Pati. 2013. "Auxin: A Master Regulator in Plant Root Development." *Plant Cell Reports* 32 (6): 741–57. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1430-5>.
- Sánchez-Calderón, Lenin, José López-Bucio, Alejandra Chacón-López, Alfredo Cruz-Ramírez, Fernanda Nieto-Jacobo, Joseph G. Dubrovsky, and Luis Herrera-Estrella. 2005. "Phosphate Starvation Induces a Determinate Developmental Program in the Roots of Arabidopsis Thaliana." *Plant and Cell Physiology* 46 (1): 174–84. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci011>.
- Sanchez-Calderon, L., M.E. Ibarra-Cortes, and I. Zepeda-Jazo. 2013. "Root Development and Abiotic Stress Adaptation." In *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*, edited by Kourosh Vahdati. InTech. <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-plant-responses-and-applications-in-agriculture/root-development-and-abiotic-stress-adaptation>.
- Sanchez, Sabrina E., Ezequiel Petrillo, Esteban J. Beckwith, Xu Zhang, Matias L. Rugnone, C. Esteban Hernando, Juan C. Cuevas, et al. 2010. "A Methyl Transferase Links the Circadian Clock to the Regulation of Alternative Splicing." *Nature* 468 (7320): 112–16. <https://doi.org/10.1038/nature09470>.
- Santoni, Véronique, Lionel Verdoucq, Nicolas Sommerer, Joëlle Vinh, Delphine Pflieger, and Christophe Maurel. 2006. "Methylation of Aquaporins in Plant Plasma Membrane." *Biochemical Journal* 400 (1): 189–97. <https://doi.org/10.1042/BJ20060569>.
- Sanz, L., M. Fernandez-Marcos, A. Modrego, D. R. Lewis, G. K. Muday, S. Pollmann, M. Duenas, C. Santos-Buelga, and O. Lorenzo. 2014. "Nitric Oxide Plays a Role in Stem Cell Niche Homeostasis through Its Interaction with Auxin." *PLANT PHYSIOLOGY* 166 (4): 1972–84. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247445>.
- Saritz, R. 2005. "Phytoextraction of Uranium and Thorium by Native Trees in a Contaminated Wetland." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 264 (2): 417–22. <https://doi.org/10.1007/s10967-005-0731-8>.
- Sarry, Jean-Emmanuel, Lauriane Kuhn, Céline Ducruix, Alexandra Lafaye, Christophe Junot, Véronique Hugouvieux, Agnès Jourdain, et al. 2006. "The Early Responses of Arabidopsis Thaliana Cells to Cadmium Exposure Explored by Protein and Metabolite Profiling Analyses." *PROTEOMICS* 6 (7): 2180–98. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500543>.
- Saruyama, Naoko, Yurina Sakakura, Tomoya Asano, Takumi Nishiuchi, Hamako Sasamoto, and Hiroaki Kodama. 2013. "Quantification of Metabolic Activity of Cultured Plant Cells by Vital Staining with Fluorescein Diacetate." *Analytical Biochemistry* 441 (1): 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.06.005>.
- Scebbia, Francesca, Morena De Bastiani, Giovanni Bernacchia, Andrea Andreucci, Alvaro Galli, and Letizia Pitto. 2007. "PRMT11: A New Arabidopsis MBD7 Protein Partner with Arginine Methyltransferase Activity: PRMT11 Is a Novel AtMBD7 Protein Partner." *The Plant Journal* 52 (2): 210–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03238.x>.
- Schenk, Sebastian T., and Adam Schikora. 2016. "Staining of Callose Depositions in Root and Leaf Tissues," May. https://www.researchgate.net/profile/Adam_Schikora/publication/274714786_Staining_of_Callose_Depositions_in_Root_and_Leaf_Tissues/links/552792e00cf2e486ae4110d9.pdf.
- Schepetilnikov, Mikhail, Maria Dimitrova, Eder Mancera-Martinez, Angèle Geldreich, Mario Keller, and Lyubov A Ryabova. 2013. "TOR and S6K1 Promote Translation Reinitiation of uORF-Containing mRNAs via Phosphorylation of eIF3h." *The EMBO Journal* 32 (8): 1087–1102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61>.
- Schiefelbein, J. W. 1991. "The Development of Plant Roots: New Approaches to Underground Problems." *THE PLANT CELL ONLINE* 3 (11): 1147–54. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.11.1147>.
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, and Kevin W. Eliceiri. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis." *Nature Methods* 9 (7): 671.
- Schnug, Ewald, and Bernd G. Lottemoser. 2013. "Fertilizer-Derived Uranium and Its Threat to Human Health." *Environmental Science & Technology* 47 (6): 2433–34. <https://doi.org/10.1021/es4002357>.
- Schubert, Heidi L, Robert M Blumenthal, and Xiaodong Cheng. 2003. "Many Paths to Methyltransfer: A Chronicle of Convergence." *Trends in Biochemical Sciences* 28 (6): 329–35. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00090-2).
- Schulz, P., M. Herde, and T. Romeis. 2013. "Calcium-Dependent Protein Kinases: Hubs in Plant Stress Signaling and Development." *PLANT PHYSIOLOGY* 163 (2): 523–30. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222539>.
- Schvartzman, M. Sol, Massimiliano Corso, Nazeer Fataftah, Maxime Scheepers, Cécile Nouet, Bernard Bosman, Monique Carnol, Patrick Motte, Nathalie Verbruggen, and Marc Hanikenne. 2018. "Adaptation to High Zinc Depends on Distinct Mechanisms in Metallicolous Populations of Arabidopsis Halleri." *New Phytologist*, January. <https://doi.org/10.1111/nph.14949>.
- Schweighofer, Alois, Heribert Hirt, and Irute Meskiene. 2004a. "Plant PP2C Phosphatases: Emerging Functions in Stress Signaling." *Trends in Plant Science* 9 (5): 236–43. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.007>.
- Serre, Nelson B C, Claude Alban, Jacques Bourguignon, and Stéphane Ravanel. 2018. "An Outlook on Lysine Methylation of Non-Histone Proteins in Plants." *Journal of Experimental Botany*, June. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery231>.
- Serre, Nelson B.C., Claude Alban, Jacques Bourguignon, et Stéphane Ravanel. 2018. « Uncovering the Physiological and Cellular Effects of Uranium on the Root System of Arabidopsis Thaliana ». *Environmental and Experimental Botany* 157 (septembre): 121-30. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.004>.
- Sesma, Ane, Carmen Castresana, and M. Mar Castellano. 2017. "Regulation of Translation by TOR, eIF4E and eIF2α in Plants: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives." *Frontiers in Plant Science* 8 (April). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00644>.
- Shabala, Sergey, Rosemary G. White, Michael A. Djordjevic, Yong-Ling Ruan, and Ulrike Mathesius. 2016. "Root-to-Shoot Signalling: Integration of Diverse Molecules, Pathways and Functions." *Functional Plant Biology* 43 (2): 87. <https://doi.org/10.1071/FP15252>.
- Shaff, Jon E., Benjamin A. Schultz, Eric J. Craft, Randy T. Clark, and Leon V. Kochian. 2010. "GEOCHEM-EZ: A Chemical Speciation Program with Greater Power and Flexibility." *Plant and Soil* 330 (1-2): 207–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0193-9>.

- Shechter, David, Holger L Dormann, C David Allis, and Sandra B Hake. 2007. "Extraction, Purification and Analysis of Histones." *Nature Protocols* 2 (6): 1445–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.202>.
- Shen, Hong, NingYan Hou, Markus Schlicht, YingLang Wan, Stefano Mancuso, and Frantisek Baluska. 2008. "Aluminium Toxicity Targets PIN2 in Arabidopsis Root Apices: Effects on PIN2 Endocytosis, Vesicular Recycling, and Polar Auxin Transport." *Science Bulletin* 53 (16): 2480–87. <https://doi.org/10.1007/s11434-008-0332-3>.
- Shi, Mao-gong, Li Li, and Yu-qing Sui. 2004. "[One case of acute dimethyl formamide poisoning-induced subacute liver necrosis]." *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi = Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi = Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases* 22 (3): 234.
- Shiu, S.-H., and A. B. Bleeker. 2001. "Receptor-like Kinases from Arabidopsis Form a Monophyletic Gene Family Related to Animal Receptor Kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (19): 10763–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.181141598>.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole, and R. A. Casero. 2004. "Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1." *Cell* 119 (7): 941–53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>.
- Shumbe, Leonard, Anne Chevalier, Bertrand Legeret, Ludivine Tacconat, Fabien Monnet, and Michel Havaux. 2016. "Singlet Oxygen-Induced Cell Death in Arabidopsis under High Light Stress Is Controlled by OX11 Kinase." *Plant Physiology*, January, pp.01546.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01546>.
- Silva Lobato, Allan Klynger da, Emily Juliane Alvino Lima, Elaine Maria Silva Guedes Lobato, Gabriel Mascarenhas Maciel, and Douglas José Marques. 2016. "Tolerance of Plants to Toxicity Induced by Micronutrients." In *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, edited by Arun K. Shanker and Chitra Shanker. InTech. <http://www.intechopen.com/books/abiotic-and-biotic-stress-in-plants-recent-advances-and-future-perspectives/tolerance-of-plants-to-toxicity-induced-by-micronutrients>.
- Simontacchi, Marcela, Andrea Galatro, Facundo Ramos-Artuso, and Guillermo E. Santa-María. 2015. "Plant Survival in a Changing Environment: The Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Abiotic Stress." *Frontiers in Plant Science* 6 (November). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>.
- Singh, Neena, Swati Haldar, Ajai K. Tripathi, Katharine Horback, Joseph Wong, Deepak Sharma, Amber Beserra, et al. 2014. "Brain Iron Homeostasis: From Molecular Mechanisms To Clinical Significance and Therapeutic Opportunities." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (8): 1324–63. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4931>.
- Smeets, Karen, Kelly Opendakker, Tony Remans, Celine Forzani, Heribert Hirt, Jaco Vangronsveld, and Ann Cuypers. 2013. "The Role of the Kinase OX11 in Cadmium- and Copper-Induced Molecular Responses in *Arabidopsis Thaliana*: The Role of OX11 in Metal Stress." *Plant, Cell & Environment* 36 (6): 1228–38. <https://doi.org/10.1111/pce.12056>.
- Smékalová, Veronika, Anna Doskočilová, George Komis, and Jozef Šamaj. 2014. "Crosstalk between Secondary Messengers, Hormones and MAPK Modules during Abiotic Stress Signalling in Plants." *Biotechnology Advances* 32 (1): 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.009>.
- Sofia, Ana, Andre Martinho de Almeida, Anabela Bernardes da Silva, Jorge Marques da Silva, Ana Paula, Dulce Santos, Pedro Fevereiro, and Susana de Sousa Araujo. 2013. "Abiotic Stress Responses in Plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive." In *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*, edited by Kourosh Vahdati. InTech. <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-plant-responses-and-applications-in-agriculture/abiotic-stress-responses-in-plants-unraveling-the-complexity-of-genes-and-networks-to-survive>.
- Somssich, Marc, Ghazanfar Abbas Khan, and Staffan Persson. 2016. "Cell Wall Heterogeneity in Root Development of Arabidopsis." *Frontiers in Plant Science* 07 (August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01242>.
- Song, Sang-Kee, and Steven E. Clark. 2005. "POL and Related Phosphatases Are Dosage-Sensitive Regulators of Meristem and Organ Development in Arabidopsis." *Developmental Biology* 285 (1): 272–84. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.020>.
- Soskić, Vukić, Karlfried Groebe, and André Schratzenholz. 2008. "Nonenzymatic Posttranslational Protein Modifications in Ageing." *Experimental Gerontology* 43 (4): 247–57. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.12.001>.
- Sreeramulu, Shivakumar, Yana Mostizky, Sukumaran Sunitha, Eilon Shani, Hadas Nahum, Dor Salomon, Liat Ben Hayun, et al. 2013. "BSKs Are Partially Redundant Positive Regulators of Brassinosteroid Signaling in Arabidopsis." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 74 (6): 905–19. <https://doi.org/10.1111/tpj.12175>.
- Stahl, Yvonne, Stephanie Grabowski, Andrea Bleckmann, Ralf Kühnemuth, Stefanie Weidtkamp-Peters, Karine Gustavo Pinto, Gwendolyn K. Kirschner, et al. 2013. "Moderation of Arabidopsis Root Stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 Receptor Kinase Complexes." *Current Biology* 23 (5): 362–71. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.045>.
- Steiner, S., Y. Schroter, J. Pfalz, and T. Pfannschmidt. 2011. "Identification of Essential Subunits in the Plastid-Encoded RNA Polymerase Complex Reveals Building Blocks for Proper Plastid Development." *Plant Physiol* 157 (3): 1043–55. <https://doi.org/10.1104/pp.111.184515>.
- Straczek, Anne, Lise Duquene, Dariusz Wegrzynek, Ernesto Chinea-Cano, Jean Wannijn, Jacques Navez, and Hildegarde Vandenhove. 2010. "Differences in U Root-to-Shoot Translocation between Plant Species Explained by U Distribution in Roots." *Journal of Environmental Radioactivity* 101 (3): 258–66. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2009.11.011>.
- Sugiyama, Naoyuki, Hirofumi Nakagami, Keiichi Mochida, Arsalan Daudi, Masaru Tomita, Ken Shirasu, and Yasushi Ishihama. 2008. "Large-Scale Phosphorylation Mapping Reveals the Extent of Tyrosine Phosphorylation in Arabidopsis." *Molecular Systems Biology* 4 (May). <https://doi.org/10.1038/msb.2008.32>.
- Sun, P., Q.-Y. Tian, J. Chen, and W.-H. Zhang. 2010. "Aluminium-Induced Inhibition of Root Elongation in Arabidopsis Is Mediated by Ethylene and Auxin." *Journal of Experimental Botany* 61 (2): 347–56. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp306>.
- Sun, Xiaodong, Xiaojun Kang, and Min Ni. 2012. "Hypersensitive to Red and Blue 1 and Its Modification by Protein Phosphatase 7 Are Implicated in the Control of Arabidopsis Stomatal Aperture." Edited by C. Robertson McClung. *PLoS Genetics* 8 (5): e1002674. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002674>.
- Suzuki, Nobuaki. 2005. "Alleviation by Calcium of Cadmium-Induced Root Growth Inhibition in Arabidopsis Seedlings." *Plant Biotechnology* 22 (1): 19–25. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.22.19>.
- Svistonoff, Sergio, Audrey Creff, Matthieu Reymond, Cécile Sigoillot-Claude, Lilian Ricaud, Aline Blanchet, Laurent Nussaume, and Thierry Desnos. 2007. "Root Tip Contact with Low-Phosphate Media Reprograms Plant Root Architecture." *Nature Genetics* 39 (6): 792–96. <https://doi.org/10.1038/ng2041>.
- Sweetlove, L. J., and A. R. Fernie. 2013. "The Spatial Organization of Metabolism within the Plant Cell." *Annu Rev Plant Biol* 64: 723–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120233>.
- Syed, Naeem H., Maria Kalyana, Yamile Marquez, Andrea Barta, and John W.S. Brown. 2012. "Alternative Splicing in Plants – Coming of Age." *Trends in Plant Science* 17 (10): 616–23. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.001>.

Références

- Takemiya, Atsushi, Shin-Ichiro Inoue, Michio Doi, Toshinori Kinoshita, and Ken-Ichiro Shimazaki. 2005. "Phototropins Promote Plant Growth in Response to Blue Light in Low Light Environments." *The Plant Cell* 17 (4): 1120–27. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.030049>.
- Takemiya, Atsushi, Shota Yamauchi, Takayuki Yano, Chie Ariyoshi, and Ken-ichiro Shimazaki. 2013. "Identification of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Which Mediates Blue Light Signaling for Stomatal Opening." *Plant and Cell Physiology* 54 (1): 24–35. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs073>.
- Tanaka, Hidenori, Yuriko Osakabe, Shogo Katsura, Shinji Mizuno, Kyonoshin Maruyama, Kazuya Kusakabe, Junya Mizoi, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. 2012. "Abiotic Stress-Inducible Receptor-like Kinases Negatively Control ABA Signaling in Arabidopsis: Receptor-like Kinases in ABA Signaling." *The Plant Journal* 70 (4): 599–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04901.x>.
- Templeton, George W., Mhairi Nimick, Nicholas Morrice, David Campbell, Marilyn Goudreault, Anne-Claude Gingras, Atsushi Takemiya, Ken-ichiro Shimazaki, and Greg B. G. Moorhead. 2011. "Identification and Characterization of Atl-2, an Arabidopsis Homologue of an Ancient Protein Phosphatase 1 (PP1) Regulatory Subunit." *Biochemical Journal* 435 (1): 73–83. <https://doi.org/10.1042/BJ20101035>.
- Teng, S. 2005. "Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75/PAP1 Gene." *PLANT PHYSIOLOGY* 139 (4): 1840–52. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066688>.
- Tennstedt, P., D. Peisker, C. Bottcher, A. Trampczynska, and S. Clemens. 2008. "Phytochelatin Synthesis Is Essential for the Detoxification of Excess Zinc and Contributes Significantly to the Accumulation of Zinc." *PLANT PHYSIOLOGY* 149 (2): 938–48. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127472>.
- Tewari, Rajesh, Nele Horemans, Robin Nauts, Jean Wannijn, May Van Hees, and Hildegard Vandenhove. 2015. "Uranium Exposure Induces Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Generation in Arabidopsis Thaliana." *Environmental and Experimental Botany* 120 (December): 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.08.004>.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. "Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant Arabidopsis Thaliana." *Nature* 408 (6814): 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>.
- Thiebault, C., M. Carriere, S. Milgram, A. Simon, L. Avoscan, and B. Gouget. 2007. "Uranium Induces Apoptosis and Is Genotoxic to Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cells." *Toxicological Sciences* 98 (2): 479–87. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm130>.
- Thole, Julie M., Erin R. Beisner, James Liu, Savina V. Venkova, and Lucia C. Strader. 2014. "Abscisic Acid Regulates Root Elongation Through the Activities of Auxin and Ethylene in Arabidopsis Thaliana." *G3 & Genes|Genomes|Genetics* 4 (7): 1259–74. <https://doi.org/10.1534/g3.114.011080>.
- Tóth, G., T. Hermann, M.R. Da Silva, and L. Montanarella. 2016. "Heavy Metals in Agricultural Soils of the European Union with Implications for Food Safety." *Environment International* 88 (March): 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.017>.
- Tournier, Benjamin B., Sandrine Frelon, Elie Tournalias, Laurence Agez, Olivia Delissen, Isabelle Dublineau, François Paquet, and Fabrice Petitot. 2009. "Role of the Olfactory Receptor Neurons in the Direct Transport of Inhaled Uranium to the Rat Brain." *Toxicology Letters* 190 (1): 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.022>.
- Toyooka, T., and H. Hori. 2007. "Differences in Substrate Selectivities of the SPOUT Superfamily of Methyltransferases." *Nucleic Acids Symposium Series* 51 (1): 445–46. <https://doi.org/10.1093/nass/nrm223>.
- Tripathy, Baishnab Charan, and Ralf Oelmüller. 2012. "Reactive Oxygen Species Generation and Signaling in Plants." *Plant Signaling & Behavior* 7 (12): 1621–33. <https://doi.org/10.4161/psb.22455>.
- Tusscher, Kirsten Hendrika ten, and Marta Laskowski. 2017. "Periodic Lateral Root Priming, What Makes It Tick." *The Plant Cell*, February, tpc.00638.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00638>.
- Tyczewska, Agata, Kamilla Bakowska-Zywicka, Joanna Gracz, and Tomasz Twardowski. 2016. "Stress Responsive Non-Protein Coding RNAs." In *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, edited by Arun K. Shanker and Chitra Shanker. InTech. <http://www.intechopen.com/books/abiotic-and-biotic-stress-in-plants-recent-advances-and-future-perspectives/stress-responsive-non-protein-coding-rnas>.
- Uhrig, R. Glen, Anne-Marie Labandera, and Greg B. Moorhead. 2013. "Arabidopsis PPP Family of Serine/threonine Protein Phosphatases: Many Targets but Few Engines." *Trends in Plant Science* 18 (9): 505–13. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.004>.
- Uhrig, R. G., and G. B. Moorhead. 2011. "Two Ancient Bacterial-like PPP Family Phosphatases from Arabidopsis Are Highly Conserved Plant Proteins That Possess Unique Properties." *PLANT PHYSIOLOGY* 157 (4): 1778–92. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182493>.
- Ulmasov, T. 1997. "Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements." *THE PLANT CELL ONLINE* 9 (11): 1963–71. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>.
- Vanet, A., J. A. Plumbridge, M. F. Guérin, and J. H. Alix. 1994. "Ribosomal Protein Methylation in Escherichia Coli: The Gene prmA, Encoding the Ribosomal Protein L11 Methyltransferase, Is Dispensable." *Molecular Microbiology* 14 (5): 947–58.
- Vanhoudt, Nathalie, Ann Cuypers, Nele Horemans, Tony Remans, Kelly Opendakker, Karen Smeets, Daniel Martinez Bello, et al. 2011a. "Unraveling Uranium Induced Oxidative Stress Related Responses in Arabidopsis Thaliana Seedlings. Part II: Responses in the Leaves and General Conclusions." *Journal of Environmental Radioactivity* 102 (6): 638–45. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2011.03.013>.
- Vanhoudt, Nathalie, Nele Horemans, Geert Biermans, Eline Saenen, Jean Wannijn, Robin Nauts, May Van Hees, and Hildegard Vandenhove. 2014. "Uranium Affects Photosynthetic Parameters in Arabidopsis Thaliana." *Environmental and Experimental Botany* 97 (January): 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.009>.
- Vanhoudt, Nathalie, Hildegard Vandenhove, Nele Horemans, Daniel Martinez Bello, May Van Hees, Jean Wannijn, Robert Carleer, Jaco Vangronsveld, and Ann Cuypers. 2011. "URANIUM INDUCED EFFECTS ON DEVELOPMENT AND MINERAL NUTRITION OF ARABIDOPSIS THALIANA." *Journal of Plant Nutrition* 34 (13): 1940–56. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.610482>.
- Vanhoudt, Nathalie, Hildegard Vandenhove, Nele Horemans, Tony Remans, Kelly Opendakker, Karen Smeets, Daniel Martinez Bello, et al. 2011. "Unraveling Uranium Induced Oxidative Stress Related Responses in Arabidopsis Thaliana Seedlings. Part I: Responses in the Roots." *Journal of Environmental Radioactivity* 102 (6): 630–37. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2011.03.015>.
- Vanhoudt, Nathalie, Hildegard Vandenhove, Karen Smeets, Tony Remans, May Van Hees, Jean Wannijn, Jaco Vangronsveld, and Ann Cuypers. 2008. "Effects of Uranium and Phosphate Concentrations on Oxidative Stress Related Responses Induced in Arabidopsis Thaliana." *Plant Physiology and Biochemistry: PPB* 46 (11): 987–96. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.003>.

Références

- Vanneste, Steffen, and Jiří Friml. 2009. "Auxin: A Trigger for Change in Plant Development." *Cell* 136 (6): 1005–16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>.
- Vardar, Filiz, İşıl İsmailoğlu, Deniz İnan, and Meral Ünal. 2011. "Determination of Stress Responses Induced by Aluminum in Maize (*Zea Mays*)." *Acta Biologica Hungarica* 62 (2): 156–70. <https://doi.org/10.1556/ABiol.62.2011.2.6>.
- Vazquez, Gustavo J., Cleveland J. Dodge, and Arokiasamy J. Francis. 2007. "Interactions of Uranium with Polyphosphate." *Chemosphere* 70 (2): 263–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.019>.
- Vellosillo, T., M. Martínez, M. A. Lopez, J. Vicente, T. Cascon, L. Dolan, M. Hamberg, and C. Castresana. 2007. "Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in Arabidopsis Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade." *THE PLANT CELL ONLINE* 19 (3): 831–46. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046052>.
- Verbruggen, Nathalie, and Christian Hermans. 2013. "Root Responses to Trace Metallic Elements." In *Plant Roots*, edited by Tom Beeckman, 34–1 – 34–30. CRC Press. <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b14550-40>.
- Verbruggen, Nathalie, Christian Hermans, and Henk Schat. 2009. "Molecular Mechanisms of Metal Hyperaccumulation in Plants: Tansley Review." *New Phytologist* 181 (4): 759–76. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x>.
- Veylder, Lieven De, Tom Beeckman, and Dirk Inzé. 2007. "The Ins and Outs of the Plant Cell Cycle." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (8): 655–65. <https://doi.org/10.1038/nrm2227>.
- Vicente-Vicente, Laura, Yaremi Quiros, Fernando Pérez-Barriocanal, José Miguel López-Novoa, Francisco José López-Hernández, and Ana Isabel Morales. 2010. "Nephrotoxicity of Uranium: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Perspectives." *Toxicological Sciences* 118 (2): 324–47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq178>.
- Vidaud, Claude, Damien Bourgeois, and Daniel Meyer. 2012. "Bone as Target Organ for Metals: The Case of F-Elements." *Chemical Research in Toxicology* 25 (6): 1161–75. <https://doi.org/10.1021/tx300064m>.
- Vidaud, Claude, Samuel Gourion-Arsiquaud, Françoise Rollin-Genetet, Caroline Torne-Celer, Sophie Plantevin, Olivier Pible, Catherine Berthomieu, and Eric Quéméneur. 2007. "Structural Consequences of Binding of UO₂²⁺ to Apotransferrin: Can This Protein Account for Entry of Uranium into Human Cells?." *Biochemistry* 46 (8): 2215–26. <https://doi.org/10.1021/bi061945h>.
- Viehweger, Katrin, and Gerhard Geipel. 2010. "Uranium Accumulation and Tolerance in Arabidopsis Halleri under Native versus Hydroponic Conditions." *Environmental and Experimental Botany* 69 (1): 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.03.001>.
- Villiers, Florent, Céline Ducruix, Véronique Hugouvieux, Nolwenn Jarno, Eric Ezan, Jérôme Garin, Christophe Junot, and Jacques Bourguignon. 2011. "Investigating the Plant Response to Cadmium Exposure by Proteomic and Metabolomic Approaches." *PROTEOMICS* 11 (9): 1650–63. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000645>.
- Virdi, Amardeep S., Supreet Singh, and Prabhjeet Singh. 2015. "Abiotic Stress Responses in Plants: Roles of Calmodulin-Regulated Proteins." *Frontiers in Plant Science* 6 (October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00809>.
- Walsh, Christopher T., Sylvie Garneau-Tsodikova, and Gregory J. Gatto. 2005. "Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications." *Angewandte Chemie International Edition* 44 (45): 7342–72. <https://doi.org/10.1002/anie.200501023>.
- Wang, H., Q. Qi, P. Schorr, A. J. Cutler, W. L. Crosby, and L. C. Fowke. 1998. "ICK1, a Cyclin-Dependent Protein Kinase Inhibitor from Arabidopsis Thaliana Interacts with Both Cdc2a and CycD3, and Its Expression Is Induced by Abscisic Acid." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 15 (4): 501–10.
- Wang, P., M. Royer, and R. L. Houtz. 1995. "Affinity Purification of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/oxygenase Large Subunit Epsilon N-Methyltransferase." *Protein Expression and Purification* 6 (4): 528–36.
- Wang, P., L. Xue, G. Batelli, S. Lee, Y.-J. Hou, M. J. Van Oosten, H. Zhang, W. A. Tao, and J.-K. Zhu. 2013. "Quantitative Phosphoproteomics Identifies SnRK2 Protein Kinase Substrates and Reveals the Effectors of Abscisic Acid Action." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (27): 11205–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308974110>.
- Wang, Qi, Keyun Wang, and Mingliang Ye. 2017. "Strategies for Large-Scale Analysis of Non-Histone Protein Methylation by LC-MS/MS." *The Analyst* 142 (19): 3536–48. <https://doi.org/10.1039/C7AN00954B>.
- Wang, Q., K. Wang, and M. Ye. 2017. "Strategies for Large-Scale Analysis of Non-Histone Protein Methylation by LC-MS/MS." *Analyst* 142 (19): 3536–48. <https://doi.org/10.1039/c7an00954b>.
- Wang, Rui, Jiehua Wang, Lin Zhao, Shaohui Yang, and Yingjin Song. 2015. "Impact of Heavy Metal Stresses on the Growth and Auxin Homeostasis of Arabidopsis Seedlings." *BioMetals* 28 (1): 123–32. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9808-6>.
- Watterson, D. M., D. B. Iverson, and L. J. Van Eldik. 1980. "Spinach Calmodulin: Isolation, Characterization, and Comparison with Vertebrate Calmodulins." *Biochemistry* 19 (25): 5762–68.
- Webb, K. J., Q. Al-Hadid, C. I. Zurita-Lopez, B. D. Young, R. S. Lipson, and S. G. Clarke. 2011. "The Ribosomal L1 Protuberance in Yeast Is Methylated on a Lysine Residue Catalyzed by a Seven-Beta-Strand Methyltransferase." *J Biol Chem* 286 (21): 18405–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.200410>.
- Webb, Kristofor J., Qais Al-Hadid, Cecilia I. Zurita-Lopez, Brian D. Young, Rebecca S. Lipson, and Steven G. Clarke. 2011. "The Ribosomal L1 Protuberance in Yeast Is Methylated on a Lysine Residue Catalyzed by a Seven-B-Strand Methyltransferase." *Journal of Biological Chemistry* 286 (21): 18405–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.200410>.
- Weber, Michael, Aleksandra Trampczynska, and Stephan Clemens. 2006. "Comparative Transcriptome Analysis of Toxic Metal Responses in Arabidopsis Thaliana and the Cd²⁺-Hypertolerant Facultative Metallophyte Arabidopsis Halleri." *Plant, Cell and Environment* 29 (5): 950–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01479.x>.
- Wellburn, Alan R. 1994. "The Spectral Determination of Chlorophylls a and B, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution." *Journal of Plant Physiology* 144 (3): 307–13. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- White, Philip J. 2012. "Ion Uptake Mechanisms of Individual Cells and Roots." In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 7–47. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849052000029>.
- Willscher, S., D. Mirgorodsky, L. Jablonski, D. Ollivier, D. Merten, G. Büchel, J. Wittig, and P. Werner. 2013. "Field Scale Phytoremediation Experiments on a Heavy Metal and Uranium Contaminated Site, and Further Utilization of the Plant Residues." *Hydrometallurgy* 131-132 (January): 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.08.012>.
- Wilson, Ian D., Steven J. Neill, and John T. Hancock. 2008. "Nitric Oxide Synthesis and Signalling in Plants." *Plant, Cell & Environment* 31 (5): 622–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01761.x>.
- Włodarski, Tomasz, Jan Kutner, Joanna Towpik, Lukasz Knizewski, Leszek Rychlewski, Andrzej Kudlicki, Maga Rowicka, Andrzej Dziembowski, and Krzysztof Ginalski. 2011. "Comprehensive Structural and Substrate Specificity Classification of the Saccharomyces Cerevisiae Methyltransferase." *PLoS One* 6 (8): e23168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023168>.

Références

- Wójcik, M., and A. Tukiendorf. 2011. "Glutathione in Adaptation of Arabidopsis Thaliana to Cadmium Stress." *Biologia Plantarum* 55 (1): 125–32.
- Wolf, S. 1991. "Plasmodesmatal Function Is Probed Using Transgenic Tobacco Plants That Express a Virus Movement Protein." *THE PLANT CELL ONLINE* 3 (6): 593–604. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.6.593>.
- Woodward, A. W. 2005. "A Receptor for Auxin." *THE PLANT CELL ONLINE* 17 (9): 2425–29. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036236>.
- Wu, Xiaolin, Fangping Gong, Di Cao, Xiuli Hu, and Wei Wang. 2016. "Advances in Crop Proteomics: PTMs of Proteins under Abiotic Stress." *PROTEOMICS* 16 (5): 847–65. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500301>.
- Wu, Z., Z. Cheng, M. Sun, X. Wan, P. Liu, T. He, M. Tan, and Y. Zhao. 2015. "A Chemical Proteomics Approach for Global Analysis of Lysine Monomethylome Profiling." *Mol Cell Proteomics* 14 (2): 329–39. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044255>.
- Xiao, J., U. S. Lee, and D. Wagner. 2016. "Tug of War: Adding and Removing Histone Lysine Methylation in Arabidopsis." *Curr Opin Plant Biol* 34 (December): 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.08.002>.
- Xie, Minmin, Dan Wu, Guifang Duan, Liqun Wang, Reqing He, Xiushan Li, Dongying Tang, Xiaoying Zhao, and Xuanming Liu. 2014. "AtWINK9 Is Regulated by ABA and Dehydration and Is Involved in Drought Tolerance in Arabidopsis." *Plant Physiology and Biochemistry: PPB* 77 (April): 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.022>.
- Xiong, Yan, and Jen Sheen. 2015. "Novel Links in the Plant TOR Kinase Signaling Network." *Current Opinion in Plant Biology* 28 (December): 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.006>.
- Xue, Z. -C., H. -Y. Gao, and L. -T. Zhang. 2013. "Effects of Cadmium on Growth, Photosynthetic Rate and Chlorophyll Content in Leaves of Soybean Seedlings." *Biologia Plantarum* 57 (3): 587–90. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0318-0>.
- Xu, Juan, Jie Meng, Xiangzong Meng, Yanting Zhao, Jianmin Liu, Tiefeng Sun, Yidong Liu, Qiaomei Wang, and Shuqun Zhang. 2016. "Pathogen-Responsive MPK3 and MPK6 Reprogram the Biosynthesis of Indole Glucosinolates and Their Derivatives in Arabidopsis Immunity." *The Plant Cell* 28 (5): 1144–62. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00871>.
- Yadav, Chandra Bhan, Mehanathan Muthamilarasan, Anand Dangi, Shweta Shweta, and Manoj Prasad. 2016. "Comprehensive Analysis of SET Domain Gene Family in Foxtail Millet Identifies the Putative Role of SiSET14 in Abiotic Stress Tolerance." *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep32621>.
- Yamaguchi, K., and A. R. Subramanian. 2000. "The Plastid Ribosomal Proteins. Identification of All the Proteins in the 50 S Subunit of an Organelle Ribosome (chloroplast)." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (37): 28466–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005012200>.
- Yang, Yang, Yichen Ge, Hongyuan Zeng, Xihong Zhou, Liang Peng, and Qingru Zeng. 2017. "Phytoextraction of Cadmium-Contaminated Soil and Potential of Regenerated Tobacco Biomass for Recovery of Cadmium." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05834-8>.
- Yeh, Yu-Hung, Yu-Hsien Chang, Pin-Yao Huang, Jing-Bo Huang, and Laurent Zimmerli. 2015. "Enhanced Arabidopsis Pattern-Triggered Immunity by Overexpression of Cysteine-Rich Receptor-like Kinases." *Frontiers in Plant Science* 6 (May). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00322>.
- Yeh, Yu-Hung, Dario Panzeri, Yasuhiro Kadota, Yi-Chun Huang, Pin-Yao Huang, Chia-Nan Tao, Milena Roux, et al. 2016. "The Arabidopsis Malectin-Like/LRR-RLK IOS1 Is Critical for BAK1-Dependent and BAK1-Independent Pattern-Triggered Immunity." *The Plant Cell*, June, tpc.00313.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00313>.
- Ye, Yun, Zhe Li, and Da Xing. 2013. "Nitric Oxide Promotes MPK6-Mediated Caspase-3-like Activation in Cadmium-Induced Arabidopsis Thaliana Programmed Cell Death: NO and MPK6 Regulate Cd²⁺-Induced PCD." *Plant, Cell & Environment* 36 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02543.x>.
- Young, Brian D., David I. Weiss, Cecilia I. Zurita-Lopez, Kristofor J. Webb, Steven G. Clarke, and Anne E. McBride. 2012. "Identification of Methylated Proteins in the Yeast Small Ribosomal Subunit: A Role for SPOUT Methyltransferases in Protein Arginine Methylation." *Biochemistry* 51 (25): 5091–5104. <https://doi.org/10.1021/bi300186g>.
- Youn, Ji-Hyun, Tae-Woo Kim, Eun-Ji Kim, Shuolei Bu, Seong-Ki Kim, Zhi-Yong Wang, and Tae-Wuk Kim. 2013. "Structural and Functional Characterization of Arabidopsis GSK3-like Kinase AtSK12." *Molecules and Cells* 36 (6): 564–70. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0266-8>.
- Ytterberg, A. Jimmy, and Ole N. Jensen. 2010. "Modification-Specific Proteomics in Plant Biology." *Journal of Proteomics* 73 (11): 2249–66. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.002>.
- Yuan, H.-M., H.-H. Xu, W.-C. Liu, and Y.-T. Lu. 2013. "Copper Regulates Primary Root Elongation Through PIN1-Mediated Auxin Redistribution." *Plant and Cell Physiology* 54 (5): 766–78. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct030>.
- Yuan, Hong-Mei, and Xi Huang. 2016. "Inhibition of Root Meristem Growth by Cadmium Involves Nitric Oxide-Mediated Repression of Auxin Accumulation and Signalling in Arabidopsis: Cadmium Stress Causes Root Defects via Nitric Oxide and Auxin." *Plant, Cell & Environment* 39 (1): 120–35. <https://doi.org/10.1111/pce.12597>.
- Zhang, Lin, Guangjie Li, Meng Wang, Dongwei Di, Li Sun, Herbert J. Kronzucker, and Weiming Shi. 2018. "Excess Iron Stress Reduces Root Tip Zone Growth through Nitric Oxide-Mediated Repression of Potassium Homeostasis in Arabidopsis." *New Phytologist*, April. <https://doi.org/10.1111/nph.15157>.
- Zhang, L., and H. Ma. 2012. "Complex Evolutionary History and Diverse Domain Organization of SET Proteins Suggest Divergent Regulatory Interactions." *New Phytol* 195 (1): 248–63. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04143.x>.
- Zhang, M., J. Y. Xu, H. Hu, B. C. Ye, and M. Tan. 2018. "Systematic Proteomic Analysis of Protein Methylation in Prokaryotes and Eukaryotes Revealed Distinct Substrate Specificity." *Proteomics* 18 (1). <https://doi.org/10.1002/pmic.201700300>.
- Zhang, Xiuren, Rossana Henriques, Shih-Shun Lin, Qi-Wen Niu, and Nam-Hai Chua. 2006. "Agrobacterium-Mediated Transformation of Arabidopsis Thaliana Using the Floral Dip Method." *Nature Protocols* 1 (2): 641–46. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>.
- Zhang, Zhaoliang, Shupeizhang, Ya Zhang, Xin Wang, Dan Li, Qiuling Li, Minghui Yue, et al. 2011. "Arabidopsis Floral Initiator SKB1 Confers High Salt Tolerance by Regulating Transcription and Pre-mRNA Splicing through Altering Histone H4R3 and Small Nuclear Ribonucleoprotein LSM4 Methylation." *The Plant Cell* 23 (1): 396–411. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081356>.
- Zhu, Jiang, Wen-Shu Wang, Dan Ma, Lin-Yu Zhang, Feng Ren, and Ting-Ting Yuan. 2016. "A Role for CK2 B Subunit 4 in the Regulation of Plant Growth, Cadmium Accumulation and H2O2 Content under Cadmium Stress in Arabidopsis Thaliana." *Plant Physiology and Biochemistry* 109 (December): 240–47. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.004>.
- Zhu, Xiao Fang, Tao Jiang, Zhi Wei Wang, Gui Jie Lei, Yuan Zhi Shi, Gui Xin Li, and Shao Jian Zheng. 2012. "Gibberellic Acid Alleviates Cadmium Toxicity by Reducing Nitric Oxide Accumulation and Expression of IRT1 in Arabidopsis Thaliana." *Journal of Hazardous Materials* 239-240 (November): 302–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.077>.

Références

- Zilberman, Daniel, Mary Gehring, Robert K. Tran, Tracy Ballinger, and Steven Henikoff. 2007. "Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Thaliana DNA Methylation Uncovers an Interdependence between Methylation and Transcription." *Nature Genetics* 39 (1): 61–69. <https://doi.org/10.1038/ng1929>.
- Zorzatto, Cristiane, João Paulo B. Machado, Kênia V. G. Lopes, Kelly J. T. Nascimento, Welison A. Pereira, Otávio J. B. Brustolini, Pedro A. B. Reis, et al. 2015. "NIK1-Mediated Translation Suppression Functions as a Plant Antiviral Immunity Mechanism." *Nature* 520 (7549): 679–82. <https://doi.org/10.1038/nature14171>.

Publications et présentations

Publications

Serre NBC, Alban C, Bourguignon J and Ravanel S. "Uncovering the physiological and cellular effects of uranium on the root system of *Arabidopsis thaliana*". *Environmental and Experimental Botany* 157 (2019):121-30. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.004>.

Serre NBC, Alban C, Bourguignon J and Ravanel S. "An outlook on lysine methylation of non-histone proteins in plant" *Journal of Experimental Botany* (2018), ery231

Berthet S, Villiers F, Alban C, Serre NBC, Martin-Laffon J, Figuet S, Boisson AM, Bligny R, Kuntz M, Giovanni F, Ravanel S and Bourguignon J. "*Arabidopsis thaliana* Plants Challenged with Uranium Reveal New Insights into Iron and Phosphate Homeostasis". *New Phytologist* (2018) 217.2, p. 657-670

Présentations des travaux

International Plant Molecular Biology 12th, Montpellier, France (5-10 août 2018), "Uncovering the physiological and cellular effects of uranium on the root system architecture and development of *Arabidopsis thaliana*". Poster

Séminaires de l'Institut des Métaux en Biologie de Grenoble, France (12-13 mars 2018). « The effect of uranium on *Arabidopsis thaliana* root architecture and development". Présentation orale.

Symposium of the Society of Experimental Biology, From Proteome to Phenotype: role of post-translational modifications, Edimbourg, Royaume-Uni (11-13 décembre 2017). "Lysine methylation of non-histone proteins is involved in the response to cadmium in the *Arabidopsis* genus". Poster.

Séminaire Jeunes Chercheurs, BIG, CEA, Grenoble, France (8 décembre 2017). "The effect of uranium on *Arabidopsis thaliana* root architecture and development". Présentation orale.

Journée de l'institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, France (14 novembre 2017). "The effect of uranium on *Arabidopsis thaliana* root architecture and development". Poster.

Séminaires Toxicologie du CEA, Perthuis, France (Janvier 2016, 2017 et 2018). Présentations orales des travaux de thèse.

Abstract

Plant response and adaptation to metal stress involve numerous mechanisms with the aim of limiting the deleterious effects of toxic elements. Although a large number of these mechanisms are well characterized, many processes still need to be identified in order to have a better understanding of the strategies involved in plant response to toxic metals.

First, we investigated the role of two post-translational modifications, methylation and phosphorylation of non-histone proteins, in response to stresses induced by two toxic metals, cadmium (Cd) and uranium (U). We analyzed the dynamic of these modifications in three species of *Arabidopsis*: *A. thaliana* and *A. lyrata*, two species that are sensitive to Cd, and *A. halleri*, a species which naturally tolerates and hyperaccumulates Cd in leaves. By using Western blot analyses and protein mass spectrometry, we showed that the pattern of protein lysine methylation was modified during metal stress. Next, we analyzed the expression of genes coding for enzymes involved in lysine methylation and phosphorylation processes in plants exposed to Cd or U. These analyses showed that the expression of numerous kinase genes was differentially regulated in response to metal stress. For protein lysine methyltransferases, only a few genes were differentially regulated by metals. Finally, we set up a genetic screening and identified two genes coding for protein lysine methyltransferases involved in the tolerance of *A. thaliana* to a stress induced by Cd.

Second, we studied the physiological and cellular processes involved in the response of the *A. thaliana* root system to U. Through the utilization of different staining procedures and reporter genes, we showed that the root architecture was strongly modulated in response to a stress induced by U. We showed that, at a sub-toxic dose, U stimulated the apex mitotic activity, resulting in improved primary root growth and reduced secondary root formation. At a toxic level, U arrested primary root growth and increased the formation of secondary and higher-order lateral roots. These effects were linked to the inhibition of the cell cycle and the synthesis and accumulation of reactive oxygen species and nitric oxide, which contribute to cell death in the root apex. These changes were associated with perturbations in auxin transport and distribution at the root apex, and were correlated to the deposition of defense polymers (callose and lignin) involved in cell wall stiffening. U stress was linked with a depletion of Pi and a redistribution of Fe in root tissues. These results showed that part of the radionuclide effects are linked with the signaling cascade of Pi sensing in the root apex. Other mechanisms involved in U toxicity are likely related to perturbations of Fe homeostasis and direct deleterious effects of U on root components.

Together, these results revealed new mechanisms involved in plant response and adaptation to metal trace elements through the fine-tuned regulation of protein function by post-translational modifications and the identification of cellular processes involved in the response to U toxicity in roots.

Résumé

La réponse et l'adaptation des plantes à un stress métallique mettent en jeu de nombreux mécanismes afin de limiter les effets néfastes des éléments toxiques. Bien que certains de ces mécanismes soient bien caractérisés, de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires restent à identifier pour mieux comprendre la diversité des stratégies mises en œuvre dans ces processus complexes et vitaux pour les plantes.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au rôle de deux modifications post-traductionnelles, la méthylation et la phosphorylation des protéines non-histone, dans la réponse à un stress induit par deux éléments non essentiels et toxiques, le cadmium (Cd) et l'uranium (U). Nous avons analysé la dynamique de ces modifications chez trois espèces du genre *Arabidopsis* : *A. thaliana* et *A. lyrata*, deux espèces sensibles au Cd, et *A. halleri*, espèce naturellement capable de tolérer et d'hyper-accumuler ce métal toxique dans ses feuilles. En utilisant une combinaison d'analyses par Western blot et par spectrométrie de masse nous avons montré que les patterns de méthylation des protéines changent au cours de stress métalliques. Puis, nous avons analysé l'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans les réactions de méthylation et de phosphorylation des protéines dans différentes conditions de stress. Ces analyses ont montré qu'un grand nombre de protéines kinases est régulé au niveau transcriptionnel par un stress métallique tandis que seuls quelques gènes codant des protéines méthyltransférases sont affectés. Pour finir, nous avons mis en place un criblage génétique de mutants d'*A. thaliana* et identifié deux gènes codant des protéines lysine méthyltransférases impliquées dans la tolérance au Cd.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les mécanismes cellulaires de la réponse du système racinaire d'*A. thaliana* lors d'une exposition à l'U. L'utilisation de différents systèmes rapporteurs et la mesure de différents paramètres physiologiques nous ont permis de mettre en évidence que l'architecture racinaire est fortement modulée en réponse à l'U et ceci de façon dose dépendante. Cet effet est lié à l'inhibition du cycle cellulaire et à la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène et d'oxyde nitrique dont l'accumulation provoque la mort cellulaire. Ces changements sont associés à une perturbation du transport et de la distribution de l'auxine dans les racines. Ces événements sont temporellement corrélés avec l'accumulation de polymères de défense (callose et lignine) impliqués dans l'imperméabilisation des parois cellulaires. Cette étude montre également que le stress U induit une carence en phosphate et une redistribution du fer dans les tissus racinaires. Ces résultats indiquent que la signalisation du stress U est liée en partie à la cascade de signalisation d'une carence en phosphate dans l'apex racinaire. D'autres mécanismes responsables de la toxicité de l'U sont vraisemblablement liés à des perturbations de l'homéostasie du fer et à des effets directs du radionucléide sur des cibles cellulaires.

Ce travail met en évidence des mécanismes de réponse et d'adaptation aux métaux toxiques à travers la régulation fine des phénomènes de méthylation des protéines non-histone et l'identification de processus cellulaires impliqués dans la réponse à la toxicité de l'U dans le système racinaire.