



HAL
open science

Rôle des multicopper oxydases dans l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*

Alexis Brun

► **To cite this version:**

Alexis Brun. Rôle des multicopper oxydases dans l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences agricoles. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONG030 . tel-04041447

HAL Id: tel-04041447

<https://theses.hal.science/tel-04041447>

Submitted on 22 Mar 2023

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 L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

École doctorale GAIA

Unité de recherche UMR5004 Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes

Rôle des Multicopper oxidases dans l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*

Présentée par Alexis BRUN
Le 08 09 2022

Sous la direction de Stéphane MARI

Devant le jury composé de

Sébastien Thomine, DR, I2BC Paris-Saclay

Jacques Bourguignon, DR, CEA, LPCV, Grenoble

Christian Dubos, DR, IPSIM-INRAE Montpellier

Laurence Marquès, M^{le} conférence, IPSIM-Université de Montpellier

Thierry Desnos, DR, CEA Cadarache St-Paul-les-Durance

Stéphane Mari, DR, IPSIM-INRAE Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Président du jury

Examinatrice

Examineur

Direction de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Ces quatre années de thèse ont été pour moi plus qu'une simple formation à la recherche. J'ai plus appris ces deux dernières années que les dix précédentes, autant sur le plan professionnel que personnel et humain. Cette expérience qui m'a profondément marqué, influencera toute ma vie future. Dire qu'il y a eu des hauts et des bas est un euphémisme mais malgré les difficultés, le bilan est positif et c'est ce que je retiens.

Je tiens bien évidemment à remercier mon encadrant de thèse, Stéphane Mari, pour toutes ces années, son temps, son expérience de la recherche et de la vie. J'ai appris auprès de lui à gérer la frustration, le désarroi du découragement lorsque rien ne va comme on l'entends. A voir le positif même lorsqu'on a envie de tout balancer aux orties, à demander de l'aide quand on est dans une impasse. Et toutes ces choses qui peuvent paraître triviales mais qui sont le fondement du passage de l'étudiant vers l'esprit mature.

Je remercie tous les membres de l'équipe MeMo, pour leur disponibilité, leur aide, leur regard, la plus-value énorme qu'ils ont su apporter à mon travail de thèse. Merci à Carine Alcon pour son expertise, son accompagnement sans faille, sa gentillesse. Merci à Tou Cheu Xiong pour son aide, son regard critique qui encourage la remise en question et l'observation de l'essentiel. Merci à Léon Dirick pour son appui et son ouverture mais surtout pour sa constante bonne humeur et les chocolats qui sauvent les mauvais jours. Merci à Catherine Curie d'avoir pu m'aider pour la prolongation de thèse, sans laquelle je n'aurais pu rien terminer. Son expérience, ses conseils, et son analyse m'ont à maintes reprises permis de suivre la meilleure stratégie possible. Merci à Sandrine Chay pour son immense gentillesse, sa patience, son indéfectible assistance, et les rigolades dans le labo.

Je remercie tout particulièrement mes compagnons de bureau qui m'ont supporté pendant quatre ans et qui sont désormais mes amis. Thibault Kosuth pour son amitié, son humour, les soirées arrosées, sa loyauté. Nul doute qu'il saura relever avec brio les défis qu'il rencontrera (et a rencontré) pendant sa thèse. Loren Castaings pour tout son savoir, elle a dépassé pour moi les limites de sa patience qui n'a d'égal que sa sémillance. Son esprit brillant n'est en rien étranger à ma transformation. Merci pour son soutien moral, les après-midi à la plage et les barbecues. Merci à Amélie Emanuel, à Morgan Maillard, Lucille Gorgues et Thibaut Bontpart

pour leur amitié, les parties de cartes endiablées, les randonnées et tout ce qui a rendu ma vie bien plus agréable.

Je remercie tous les membres d'IPSIM qui forment une véritable famille étendue, j'ai toujours été étonné de l'ambiance qui règne dans cet institut. Ces membres ont créé un environnement convivial, où il fait bon vivre, en plus de loger certaines des personnes les plus intelligentes que je connaisse. Les étudiants ne se rendent peut-être pas assez compte de la qualité de ce qui leur est transmis à IPSIM et ils ont la chance de bénéficier de cet environnement idéal, tant au niveau technique que humain.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont accompagné pendant ces quatre années, mes amis, ma famille, qui ont pu voir mon évolution, qui m'ont apportées leur soutien. Je regarde par-dessus mon épaule tout le chemin parcouru, merci à vous toutes et tous, je peux me concentrer sur l'avenir, je suis serein mais enthousiaste de ce que le futur me réserve grâce à vous.

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION.....	22
1.2	L'oxygène photosynthétique – une pollution innovante.....	24
1.3	Les Multicopper oxidases, des protéines à cuivre remarquables	28
1.3.1	Structure des MCOs.....	30
1.4	Les principales MCOs et leur fonction (connue).....	32
1.4.1	Les laccases.....	32
1.4.2	Les ascorbate oxidases	34
1.4.3	Les metallo-oxidases et les ferroxydases	34
1.4.4	Les ferroxydases sont « toutes » des MCOs.....	36
1.5	La réponse à la carence chez les plantes supérieures.....	38
1.5.1	Acquérir le fer.....	38
1.5.2	Transport à longue distance du fer	42
1.5.3	Régulation de la réponse à la carence.....	44
1.5.4	Perception de la carence	48
1.6	La réponse à l'excès de fer chez les plantes supérieures	56
1.6.1	Occurrences de l'excès de fer.....	56
1.6.2	Réponse à l'excès de fer	58
1.6.3	Régulation de la réponse à l'excès de fer.....	62
1.6.4	Récapitulatif sur la régulation de l'homéostasie du fer	64
1.7	Conclusion sur les réponses à la carence et l'excès de fer.....	66
1.8	Métabolisme du fer chez les modèles aérobies.....	68
1.8.1	L'entérocyte humain	68
1.8.2	La levure	70
1.8.3	L'algue verte	70
1.8.4	La ferroxydation est nécessaire.....	72
1.8.5	La fonction de la ferroxydation dans l'homéostasie du fer.....	72
1.9	Des ferroxydases chez les plantes supérieures ?.....	74
1.9.1	Des MCOs ferroxydases connues chez les plantes.....	74
1.9.2	L'homéostasie du fer chez les plantes – le paradigme de la carence	76
1.9.3	Où chercher des ferroxydases ?	76

1.9.4	Les Multicoppers oxidases chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
1.10	Une sous famille de Laccase-like MCOs – Données préliminaires.....	84
1.10.1	Trois MCOs proches de FET3.....	84
1.10.2	Récapitulatif des AtMCOs et objectifs de la thèse	88
2	RESULTATS	90
2.1	Une ferroxidase parmi les AtMCOs.....	92
2.1.1	Complémentation du mutant <i>fet3/fet4</i>	92
2.1.2	Activité ferroxidase.....	98
2.1.3	Conclusion sur l'activité de MCO3.....	104
2.2	Localisation subcellulaire des AtMCOs	106
2.2.1	Les MCOs sont membranaires ou extracellulaires	106
2.2.2	Localisation subcellulaire de MCO3	110
2.2.3	Localisation subcellulaire de MCO1	112
2.3	<i>mco1,2,3</i> en excès de fer	114
2.4	Phénotypage du triple mutant <i>mco</i>	114
2.4.1	Les AtMCOs et l'homeostasie du fer	114
2.4.2	Dosage du fer et du cuivre	116
2.4.3	Coloration du fer dans les rosettes par Perls et intensification au DAB	118
2.4.4	Expression de gènes marqueurs de l'excès de fer et de cuivre	120
2.4.5	Coloration histochimique du fer par Perls/DAB.....	126
2.4.6	Détection du fer par des sondes spécifiques du Fe ²⁺ ou du Fe ³⁺	128
2.4.7	Un phénotype lié aux stress redox ?	130
3	DISCUSSION	136
3.1	MCO3 est-elle une ferroxidase ?	138
3.1.1	MCO1 et MCO3 des MCOs apoplastiques.....	138
3.1.2	MCO3 peut remplacer FET3 chez la levure	142
3.1.3	MCO3 peut réduire de l'O ₂ en présence de fer.....	144
3.1.4	Réflexions sur la structure de FET3 et MCO3.....	148
3.2	Quel rôle pour les AtMCOs ?	150
3.2.1	Un phénotype en excès de fer	150
3.2.2	Réaction de l'homéostasie du fer cellulaire.....	154
3.2.3	Les AtMCOs sont annotées comme L-Ascorbate oxydases.....	158
3.3	Proposition d'un modèle du rôle des AtMCOs.....	162

3.3.1	Ferroxyder pour mieux controler	162
3.3.2	De nouvelles candidates pour une activité ferroxydase	166
3.3.3	Une autre barrière contre l'excès de fer	168
4	MATERIEL ET METHODES	178
4.1	Données préliminaires	180
4.1.1	Territoire d'expression de MCO1 et MCO3.....	180
4.1.2	RT-qPCR d' <i>AtMCO1</i> et <i>AtMCO3</i>	180
4.2	Arbre phylogénétique des laccases-like multicopper oxydases.....	182
4.2.1	Liste des séquences protéiques.....	182
4.2.2	L'arbre phylogénétique	186
4.3	Complémentation du mutant <i>fet3/fet4</i>	186
4.3.1	Lignées cellulaires.....	186
4.3.2	Vecteurs et transformation.....	186
4.3.3	Tests gouttes	190
4.3.4	Activité ferroxydase.....	190
4.4	Génération de <i>mco1,2,3</i>	194
4.4.1	Vecteurs.....	194
4.4.2	Transformation des Arabidopsis sauvages.....	194
4.5	Phénotypage	196
4.5.1	Mesure élémentaire du fer et du cuivre	196
4.5.2	Coloration histochimique du fer par Perls/DAB.....	196
4.5.3	Détection du fer avec des sondes spécifiques	200
4.5.4	Coloration au Nitro-bleu de Tétrazolium (NBT)	200
4.6	Localisation de <i>AtMCO3</i> et <i>AtMCO1</i>	202
4.6.1	Vecteurs.....	202
4.6.2	Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	202
4.6.3	Transformation transitoire en tabac.....	202
4.6.4	Acquisition en microscopie confocale.....	204
4.6.5	Immunoblotting anti-RFP	Erreur ! Signet non défini.
4.7	RT-qPCR.....	204
4.7.1	Extraction d'ARN totaux et Transcription inverse.....	204
4.7.2	Primers utilisés pour les qPCR.....	204
4.8	Analyses statistiques et graphiques.....	206

4.8.1	Tests Anova et post-hoc TukeyHSD.....	206
4.8.2	Test t-student	206
4.8.3	Version et packages utilisés pour générer les graphiques	206
5	REFERENCES.....	208

Abréviations

2dMCO : Two-domain Multicopper oxidase
3dMCO : Three-domain Multicopper oxidase
6dMCO : Six-domain Multicopper oxidase
AAO : Acid ascorbic oxidase
ACT2 : Actin 2
AH : Acide ascorbique
AHA2 : Arabidopsis H⁺-ATPase 2
AMA : Antimycine
AO : Ascorbate oxidase = Acid ascorbic oxidase
ARF : Auxin response factor
bHLH : basic-helix-loop-helix transcription factors
BPDS : Bathophenanthroline di-sodium
BTS : BRUTUS
Col0 : Colombia Arabidopsis thaliana accession
COPT : Copper Transporter
Cp : Céruloplasmine
CRISPR/Cas9 :
CSD1 : Cu/Zn Super Oxide Dismutase 1
CTAB : Cetyltrimethylammonium Bromide
DAB : Diaminobenzidine
DCTYB : Duodenal cytochrome B
DMA : 2'-deoxymugineic acid
DMT1 : Divalent Metal Transporter 1

EDTA : Éthylène-diamine-tétra-acétique (ou acide éthylène-diamine-tétra-acétique)

EIL1 : EIN3-LIKE

EIN3 : Ethylene Insensitive

EtOH : Ethanol

FBXL : F-box/LRR-repeat protein

FER1 : Ferritin-1

FET3 : Ferrous Transport 3

FET4 : Ferrous Transport 4

FIT : FER-Like Iron Deficiency Induced Transcription Factor

FOX1 : Ferroxidase 1 de *C.reinhardtii*

FPN1 : Ferroportin 1

FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching

FRD3 : Ferric Reductase Defective 3

FRE1 : Ferric Reductase 1

FRO2 : Ferric Reduction Oxidase 2

FT : Facteur de Transcription

FTR1 : Ferric Transporter 1

GAP : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GSH/GSSG : Reduced glutathione / Oxidized glutathione

HHE : Hémérythrine domain

Hp : Hephaestine

HRZ : Haemerythrin motif-containing Ring- and Zinc-finger

IDEF : Iron DEFiciency

IMA : IronMan Peptides

IRE/IRP : Iron regulatory proteins / Iron Responsive Elements

IRO : Iron related Transcription factor

IRT1 : Iron Transporter 1

KO : Knock-Down

LACC : Laccase

LPR1 : Low Phosphate Response 1

MA : Mugineic acid

MATE : Multi-Drug and Toxic Efflux

MCO : Multicopper oxidases

MDHA : Monodehydroascorbate

MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer

MetOH : Méthanol

MS/2 : Half Murashige and Skoog medium

MTP1 : Metal Tolerance Protein 1

MYB : Myeloblastosis transcription factor family

NA : Nicotianamine

NAS : Nicotianamine synthase

NBT : Nitro-Blue Tetrazolium

NO : Nitric oxide

NRAMP : Natural resistance-associated macrophage proteins

OPT3 : Oligopeptide Transporter 3

PM-Apo : Plasma Membrane – Apoplaste

PS : Phytosidérophore

PYE : Popeye

QTL : Quantitative Trait Loci

RFP : Red Fluorescent Protein

ROS : Reactive Oxygen Species

SCFFBXL : Skp, Cullin, F-box containing complex - F-box/LRR-repeat protein

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulphate, Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SOD : Super Oxide Dismutase

T1, T2, T3 : Copper Center T1, 2, 3

TBS-T : Tris-Buffered Saline – Tween buffer

Tf (TIR) : Transferrine

TNC : Tri-nuclear center (Copper center)

TOM1 : TOBamovirus Multiplication 1

TT10 : TESTA 10

URA : Uracile

VIT : Vacuolar Iron Transporter

VTL : Vacuolar Transporter Like

YNB : Yeast Nitrogen Base medium

YPD : YEPD medium : Yeast Extract Peptone Dextrose

YS1 : Yellow Stripe 1

YSL : Yellow Stripe-Like

1 INTRODUCTION

Au cours des ères géologiques, les modifications de la composition des océans primordiaux, dues au volcanisme, à l'activité climatique et aux êtres vivants eux-mêmes, eurent un impact sur la disponibilité des métaux de transition. Parmi eux, le fer et le cuivre se distinguent par leur implication dans des processus majeurs du métabolisme de tous les êtres vivants.

Le fer est un élément quasi ubiquitaire pour la vie. Ses propriétés redox en ont fait très tôt un cofacteur important et il intervient dans de nombreuses réactions de transfert d'électron, dans la respiration, la photosynthèse etc... Il présentait également le double avantage de son abondance dans l'océan primordial très réducteur. De fait, le seul organisme connu n'acquérant pas de fer depuis le milieu – et ne nécessitant pas non plus de fer venant de son hôte –, est la bactérie pathogène responsable de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi* [1].

1.2 L'oxygène photosynthétique – une pollution innovante

Avec l'apparition de la photosynthèse, le milieu s'est enrichi en dioxygène. L'oxygène en tant que sous-produit de l'activité photosynthétique a été libéré dans le milieu. Dans un premier temps, cet oxygène a été consommé par la formation d'oxydes de fer existant aujourd'hui dans les dépôts de minerai de fer [2], [3] et ne s'est accumulé dans l'atmosphère que plus tard. La présence d'oxygène dans l'atmosphère a avantaagé la diversification de la vie sur au moins trois points : 1) la formation de la couche protectrice d'ozone stratosphérique contre le rayonnement solaire, 2) L'oxygène en tant qu'accepteur d'électron a un bilan énergétique supérieur à tous les autres accepteurs connus [4, p. 90], 3) la diminution de la concentration en fer des océans, devenu une menace en présence d'oxygène. L'oxygénation du milieu a ainsi permis la colonisation des terres émergées.

Cependant, cette même oxygénation a été source de nouvelles contraintes pour le développement de la vie. L'oxygène, très oxydant, a modifié le statut redox de l'océan et les métaux de transition ont été impactés par cette oxygénation globale du milieu (ou Great Oxydation Event). Le fer, alors majoritairement sous forme ferreuse (Fe^{2+}) libre, forme des oxydes et se dépose dans les fonds marins, induisant une diminution de la concentration en fer disponible (Figure 1). Les ions Fe^{2+} deviennent toxiques en présence d'oxygène car ils catalysent la

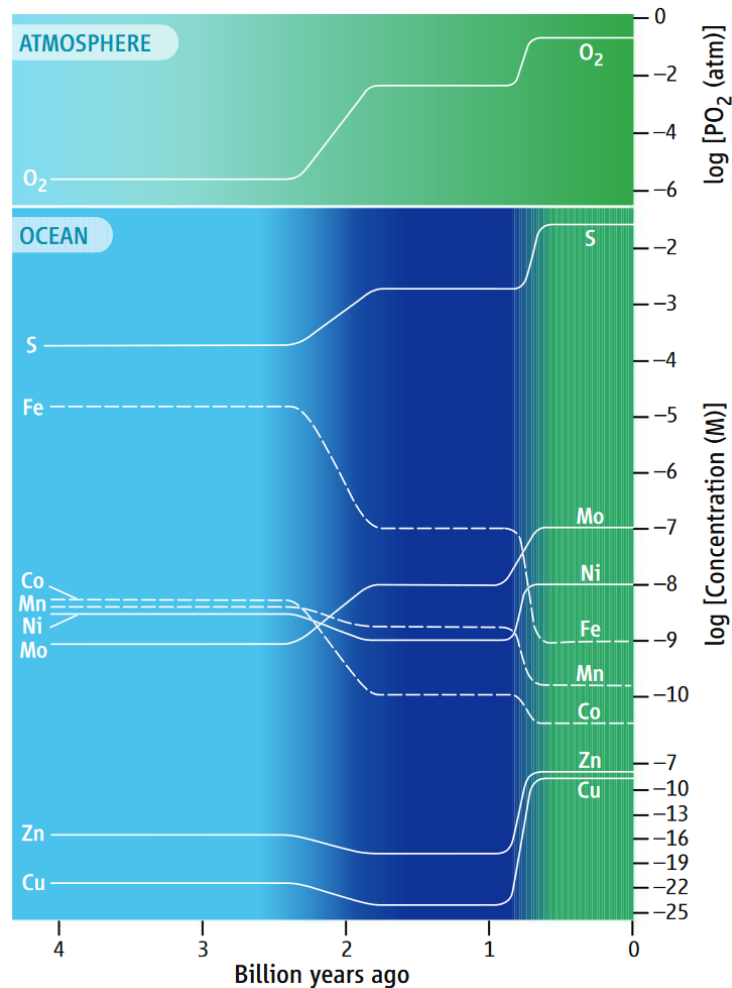


Figure 1. Modification de l'abondance des éléments solubles dans l'océan au cours du temps

Le tracé de ces variations est approximatif, basé sur des modèles géochimiques simples et des inférences à partir de l'analyse d'anciens sédiments. Il est assumé une expansion des zones riche en H₂S dans l'océan après -2,4 milliards d'années (Canfield 2005). Les couleurs indiquent la transition d'un milieu anoxique, pauvre en S avant -2,4 milliards d'années (bleu clair), à un milieu riche en H₂S entre -1,8 milliards d'années et -800 millions d'années (bleu foncé) ; jusqu'à oxygénation complète actuelle du milieu (en vert). Les tirets indiquent des concentrations qui diminuent, les lignes, celles qui augmentent. Cette figure est adaptée de Anbar, oceans, science vol 322, 2008 et Zerkle *et al* 2005.

génération d'ions hydroxyles, des radicaux libres du dioxygène (ROS) très réactifs (réaction de Fenton) [5]. Ainsi, en plus de générer des ROS, l'oxygène a rendu toxique cet élément abondant et nécessaire. La baisse de sa concentration a sélectionné dans le vivant des systèmes d'acquisition du fer, probablement rudimentaire jusqu'alors (*ie* les transporteurs de Fe^{2+} de basse affinité tel que FET4 chez *Saccharomyces*).

L'oxygénation globale a aussi eu un impact positif sur un autre métal de transition et débloqua des opportunités pour la vie. L'augmentation du potentiel redox de l'océan a induit la dissolution de composés soufrés jusqu'alors insolubles. Parmi ces composés, des sulfates de cuivre qui libèrent ce dernier dans le milieu [6]. Le cuivre est donc considéré comme un atome « récent » dans les systèmes biologiques et il n'est devenu disponible qu'après la génération de dioxygène produit par l'activité photosynthétique.

Le cuivre est un métal capable de catalyser des réactions de Fenton, à l'instar du fer, et génère des radicaux libres du dioxygène (ROS) en milieu aérobie. Le cuivre présente des caractéristiques qui font de lui un excellent oxydo-réducteur et représentait probablement une alternative au fer au fur et à mesure que celui-ci devenait moins disponible. Et la vie a associé ce métal à des protéines pour exploiter ces capacités redox au lieu de seulement le séquestrer pour éviter sa toxicité. Aujourd'hui nous connaissons de très nombreuses protéines à cuivre et la majorité de celles-ci catalysent des réactions de transfert d'électron. La diversité des potentiels accessibles grâce aux différents sites de liaison du cuivre en font un co-facteur essentiel aujourd'hui au maintien de la vie et aurait participé à sa diversification en milieu aérobie [7].

Aujourd'hui, les protéines à cuivre représentent le plus grand groupe de protéine. Parmi les protéines à cuivre, une famille en particulier est responsable des réactions de transfert d'électron : les « blue copper proteins » ou protéines à cuivre bleues. Les blue copper proteins sont classées en quatre groupes [8] :

- I. Les « cupredoxin single-domain » ou, possédant un seul domaine de liaison du cuivre et comptant parmi elles des protéines connues telles que l'azurine, la plastocyanine, l'amycianine, les phytocyanines, la seconde sous-unité de la cytochrome c oxidase etc...
- II. Les « Multicopper blue proteins » possédant plusieurs domaines de liaison du cuivre, représentés par les Multicopper oxidases et la nitrite réductase.
- III. Une troisième classe regroupant les protéines formant une séquence de domaines de liaison du cuivre. Elles sont uniquement présentes chez les plantes et sont une des familles de protéines les plus grandes et chez Arabidopsis (42 membres), très conservée avec une redondance limitant fortement les investigations quant à leur fonction.
- IV. Enfin un dernier groupe représenté par des protéines montrant une similarité structurelle importante avec les trois autres mais ne liant pas d'atome de cuivre.

1.3 Les Multicopper oxidases, des protéines à cuivre remarquables

Au sein des « Multicopper blue proteins » qui seraient le résultat de la diversification des « single-domain cupredoxins » après de multiples duplications, perte et gain d'atomes de cuivres, se trouve une sous-famille très particulière : les Multicopper oxidases (MCOs). Les MCOs sont particulièrement intéressantes car elles présentent un ou plusieurs domaines dont la configuration permet la liaison de quatre atomes de cuivre, cette structure rendant possible la réduction du dioxygène en molécule d'eau en une seule réaction, sans libération d'un intermédiaire ROS. Elles sont dites « Oxydases terminales » car elles « terminent » la réduction de l'O₂ [9], [10]. Cette réduction se fait par le transfert de quatre électrons issus d'un large spectre de substrats, faisant d'elles des protéines à cuivre « optimales », en cela qu'elles utilisent les propriétés redox du cuivre pour catalyser des réactions nécessitant des potentiels élevés en milieu aérobie en diminuant la pression partielle en dioxygène [11], [12]. Ceci en liant des atomes de cuivre qui présentent un risque, lorsqu'ils sont libres dans la cellule. Le cuivre lié aux MCOs devient ainsi une partie de la solution au problème qu'il pose en présence de dioxygène. Il existe de fait une forte corrélation entre la diversification des protéines à cuivre et l'oxygénation du milieu [7], les MCOs sont ainsi largement distribuées chez tous les organismes aérobies connus, qu'ils soient eucaryotes unicellulaires, multicellulaires, ou procaryotes.

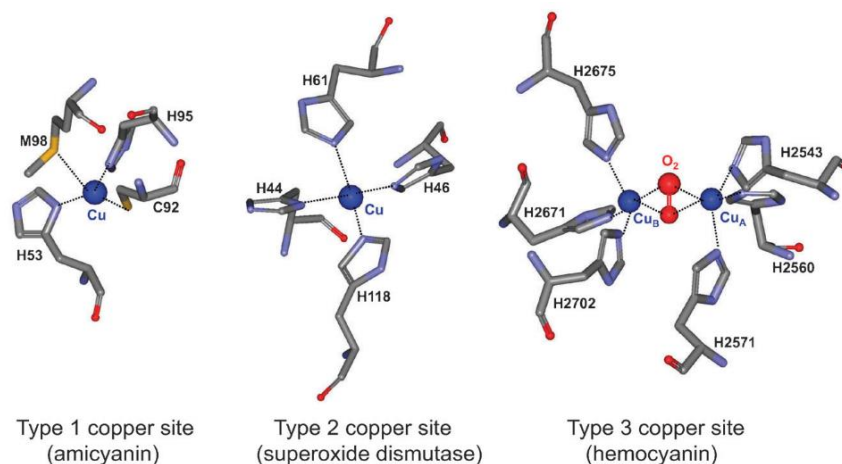


Fig. 1 Examples of the three major classes of copper-binding sites in proteins. The structures were drawn using the structure coordinates from PDB files for the type 1 copper center of amicyanin from *Paracoccus denitrificans* (PDB code 2OV0), the type 2 copper center of Cu,Zn-superoxide dismutase from human bovine erythrocytes (PDB code 2SOD) and the type 3 copper center of hemocyanin from *Octopus dofleini* (PDB code 1JS8). The structures are presented as sticks colored gray for carbon, red for oxygen, blue for nitrogen and yellow for sulfur. The copper is displayed as a dark blue sphere.

Figure 2. Représentation des trois centres à cuivre (canoniques), présents chez les MCOs.

Figure issue de Choi & Davidson 2011

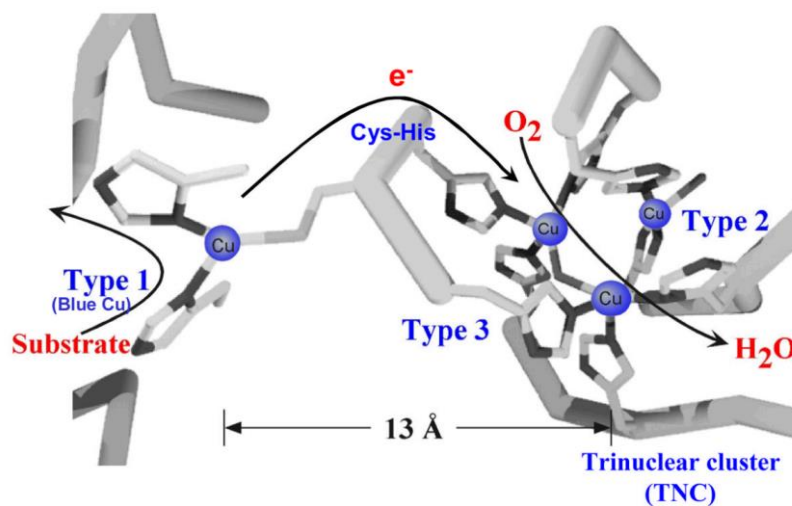


Figure 3. Structure des trois centres à cuivre des MCOs

Les flèches représentent les flux des substrats, des électrons et du dioxygène.

Figure issue de Solomon *et al* 2008

1.3.1 Structure des MCOs

Retrouvées chez des organismes très éloignés, les MCOs ont donc une histoire évolutive ancienne. Il est admis qu'elles sont le résultat de la duplication puis de la diversification de domaines cupredoxines ou « small single-domain cupredoxin » (plastocyanine, azurine, rusticyanine etc...). Ces protéines à cuivre de 100-150 résidus possèdent une configuration caractéristique en « clé grecque » qui consiste en 7 à 8 feuillets- β avec un centre à cuivre T1 (absorbant à 600nm et donc responsable de leur couleur bleu). Ce domaine est très souvent retrouvé sous la dénomination de « blue copper-binding domain » (BCB) dans la littérature. Les MCOs se présentent sous la forme de trois ou six unités cupredoxines en une seule chaîne peptidique (respectivement, 3dMCO et 6dMCO). Les 3dMCOs ou 6dMCOs possèdent toutes au moins un domaine avec ces trois centres à cuivre [13]–[15]. Cette configuration permet la réduction terminale du dioxygène et est une condition essentielle pour qu'une protéine à cuivre puisse être classée en tant que Multicopper oxidases [16]. Il existe des protéines à cuivre présentant deux domaines cupredoxines (dîtes 2dMCOs) mais aucune ne possède d'activité MCO seule et elles doivent s'associer en homotrimères pour catalyser la réduction terminale de l'oxygène [17], [18].

Au fil des duplications et de l'évolution des nouveaux domaines, les MCOs ont acquis deux autres centres à cuivres, T2 et T3 liant respectivement, 1 et 2 atomes de cuivre (formant un centre trinuécléaire ou TNC pour « tri-nuclear center ») en plus du centre T1. Le TNC est formé de l'association d'un centre T2 et d'un centre T3. Ensemble, ils lient 3 atomes de cuivres qui accueillent le dioxygène [9] (Figure 2). Le site du centre T1 détermine la spécificité de substrat et correspond à la zone de transfert de la sphère externe où les quatre substrats vont céder un électron. Les électrons sont transférés du centre T1 par une voie Cys-His jusqu'au TNC. C'est là que la réduction dans la sphère interne du dioxygène en deux molécules d'eau se produit [9], [10]. Chez FET3p de *Saccharomyces cerevisiae*, le T1 et le TNC sont séparés de 13Å, une distance conséquente qui permet la bi-fonctionnalité caractéristique des MCOs (oxydation à un site pour réduire à un autre)(**Figure 3**).

Du point de vue plus large de la structure tertiaire des MCOs, les études phylogénétiques [14], [19] suggèrent qu'un premier évènement de duplication du domaine cupredoxine a eu lieu, avec pour argument que les blue copper binding proteins peuvent être classées en deux groupes d'après la similarité des domaines cupredoxines qui les composent [13]. Les 6dMCO comme la céruloplasmine seraient le résultat d'une triplification de cet ancêtre dupliqué, les sites de

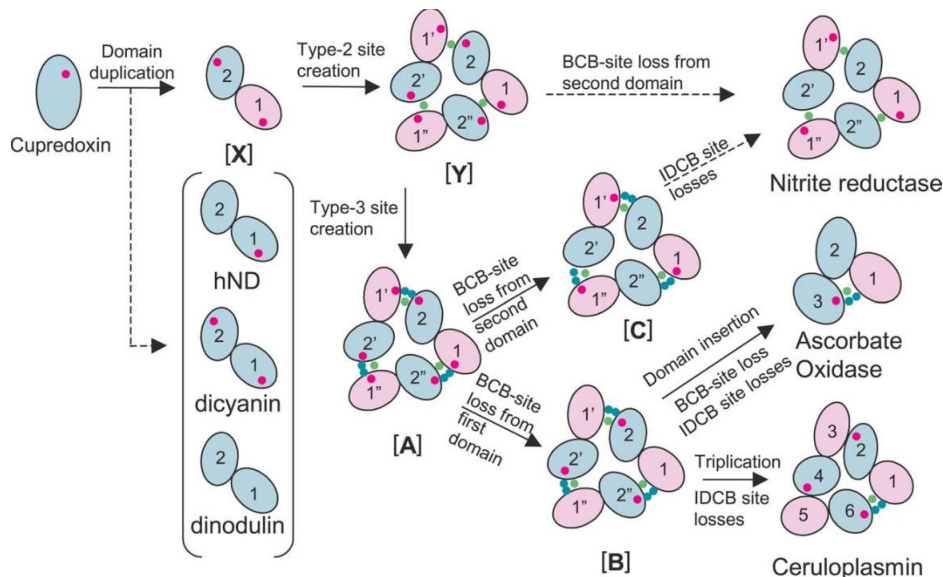


Fig. 2. Schematic representation of domain organizations of the multi-copper blue proteins and their hypothetical common ancestors. An oval shape indicates a cupredoxin or multi-copper blue protein domain. Pink and blue colors show the domain class (classes IV and V, respectively). Red, green, and blue dots indicate type 1, type 2, and type 3 coppers, respectively. Solid arrows indicate postulated pathways and dotted arrows indicate alternative pathways. Conventional multi-copper blue proteins are shown in the right-most column. Five hypothetical proteins are shown with bracketed labels. Three of them ([X], [Y] and [A]) have BCB sites in both domains, whereas [B] and [C] have a BCB site only in the first and second domain, respectively. The hypothetical proteins [A], [B] and [C] have trinuclear IDCBC sites, whereas [Y] has mononuclear IDCBC sites, and [X] has no IDCBC site. Doubled BCB domain proteins are shown in parentheses underneath [X].

Figure 4. Schéma des étapes clés de l'évolution des MCOs.

Une première duplication d'un domaine cupredoxine suivi d'une triplification. Les sites à cuivres ont ensuite été modifiés, ou perdus au cours du temps.

Figure issue de Nakamura *et al* 2005

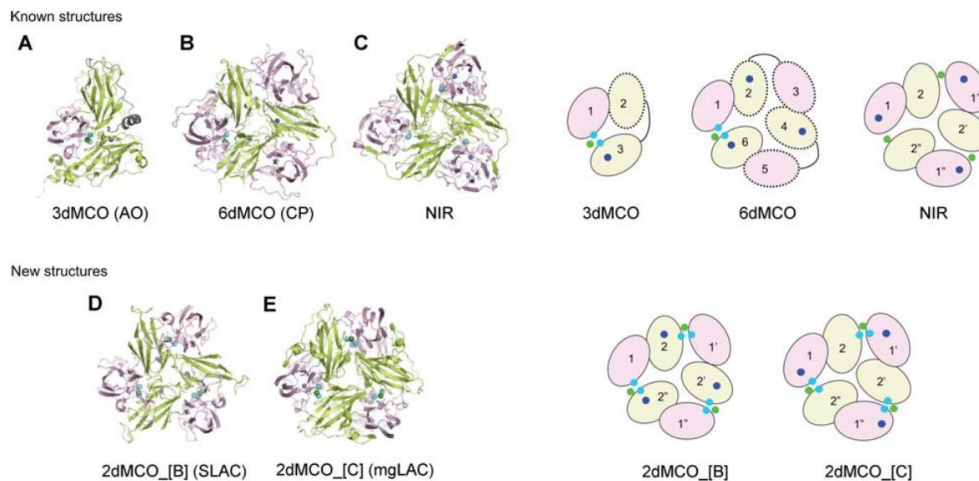


Figure 3 Overall structure of multicopper blue proteins, 3dMCO (AO) (A), 6dMCO (CP) (B), NIR (C), 2dMCO_[B] (SLAC) (D), and 2dMCO_[C] (mgLAC) (E).

The first (Class IV) and second (Class V) domains are shown in pink and light green, respectively. 3dMCO and 6dMCO are single chain proteins. NIR and 2dMCOs are trimers of two consecutive domains. Type I coppers are indicated by blue circles. The Type II and Type III coppers in MCOs are shown in green and cyan circles, respectively. The Type II coppers in NIR are shown in cyan circles. The figures were prepared by the PyMOL program, using coordinates from PDB files 2BW4 (NIR from *Achromobacter cycloclastes*), 1AOZ (AO from *Cucurbita pepo* var. *meloepo*), and 2J5W (CP from human).

Figure 5. Représentation des 5 structures tertiaires connues chez les MCOs

Figure issue de Komori *et al* 2010

liaison du cuivre se modifiant progressivement [14]. Les 3dMCOs seraient, elles, le résultat de l'ajout d'un domaine supplémentaire à l'ancêtre à deux domaines. La figure 4 schématise l'hypothèse qui fait consensus sur l'évolution des formes des MCOs, la figure 5 représente les plus connues des formes de MCOs actuelles.

La diversité des formes des MCOs se reflète dans celle de leur activité et les différents types de MCOs (3d ou 6d) n'oxydent pas les mêmes substrats. Les 3dMCOs regroupent les laccases et les ascorbate oxidases majoritairement. Les 6dMCOs des metallo-oxidases notamment chez les mammifères mais il existe des ferroxidases qui sont des 3dMCOs (e.g. ScFET3p).

1.4 Les principales MCOs et leur fonction (connue)

Les MCOs ont pour substrat un donneur d'électron et le dioxygène qui les accepte. Elles ont été classées naturellement en fonction du type de substrat source d'électron. Nous connaissons trois sous-familles de MCOs : les laccases, les metallo-oxidases et les ascorbate oxidases.

1.4.1 Les laccases

Les laccases, EC 1.10.3.2, (3dMCOs) représentent le groupe le plus diversifié des Multicopper oxidases. Elles catalysent l'oxydation de polyphenols et sont très étudiées chez les champignons car elles jouent un rôle essentiel dans la dégradation de la lignine. Chez les plantes paradoxalement, elles sont impliquées dans la biosynthèse de la lignine en oxydant des monolignols [20]–[22]. Les laccases sont le groupe le plus divers mais aussi le premier à avoir été découvert : le terme « laccase » vient de « lacquer » en anglais signifiant laque et venant lui-même du portugais « lacre » (également usité en français) servant à désigner des substances hydrophobes comme les cires à cacheter. La première « laccase » a été identifiée par Gabriel Bertrand en 1894 à partir du latex de *Toxicodendron vernicifluum* (premièrement *Rhus verniciflua* ou Chinese lacquer tree) ingrédient principal de laques.

Cependant, c'est chez les champignons que les laccases montrent toute leur diversité. Tous les champignons en possèdent autant constitutivement que des inductibles. Principalement impliquées dans la dégradation de la lignine et le développement. Elles catalysent l'oxydation de tous les substrats présentant un groupement *p*-diphénol. Chez les plantes supérieures, les laccases seraient impliquées dans la formation de la paroi et la lignification, et comme pour les champignons, dans certaines voies de pigmentation : notamment la pigmentation de la graine

chez *Arabidopsis* par TT10, une laccase oxydant des flavonoïdes, ce qui conduit à leur condensation dans les vacuoles et ainsi à la coloration brune du tégument [23]. Il existe des laccases chez les animaux qui sont très peu connues car présentant un intérêt moindre que les laccases fongiques et végétales.

1.4.2 Les ascorbate oxidases

Les ascorbate oxidases (AO) EC 1.10.3.3, (3dMCOs) représentent le deuxième sous-groupe de MCOs. Uniquement présentes chez les champignons et les plantes [24], et ont pour substrat donneur d'électron, l'acide ascorbique. Elles sont principalement étudiées chez les Cucurbitacées qui les produisent en quantité et sont les organismes sources en industrie pour la purification des AOs. L'acide ascorbique est un composé bien connu mais ses fonctions chez la plante sont encore à approfondir : il jouerait un rôle dans l'élongation cellulaire, la gestion des stress redox à différents niveaux, et très probablement dans l'homéostasie du fer des plantes et des mammifères car il peut réduire le Fe^{3+} de façon directe et être exporté dans l'apoplaste [25], [26]. Les AOs participeraient à la défense contre l'herbivorie [27] chez certaines plantes domestiquées. Chez le tabac, la surexpression d'une AO augmente l'élongation cellulaire et la sous-expression à une croissance inférieure [28]. *Arabidopsis* possède trois AO putatives (annotées comme AO) et les simples mutants montrent un impact sur le développement comme un retard de floraison [29]. La suppression de la famille entière éclaircirait la fonction des AOs qui reste encore à déterminer.

1.4.3 Les metallo-oxidases et les ferroxydases

Le dernier sous-groupe de MCOs est représenté par les metallo-oxidases, des MCOs dont le donneur d'électron est un métal divalent : Fe^{2+} , Cu^+ , Mn^{2+} etc... Les ferroxydases (EC 1.16.3.1) (3dMCOs ou 6dMCOs) sont de loin les plus étudiées des metallo-oxidases, car découvertes très tôt chez les mammifères et associées à des enjeux de santé humaine (nutritionnels, pathologies héréditaires...). Elles sont présentes chez les animaux, les plantes, les champignons, les procaryotes etc... Leur fonction est bien connue chez les animaux et les champignons, mais quasiment inconnues chez les plantes.

1.4.4 Les ferroxydases sont « toutes » des MCOs

Nous ne connaissons que deux protéines capables d'oxyder le Fe^{2+} , un domaine MCO dont le substrat est le Fe^{2+} et le centre bi-nucléaire de la ferritine (à deux atomes de fer). La ferritine est une protéine importante de stockage/tampon du fer localisée dans le chloroplaste (chez les plantes) et dans le cytoplasme (chez les animaux). Le site de liaison du Fe^{2+} permet de catalyser l'oxydation du fer pour minéraliser en grande quantité du fer au centre d'un homomultimère (24 ferritines) [30], [31]. A part ce seul site de liaison de la ferritine, appelé parfois « centre ferroxydase », nous ne connaissons que les MCOs assurant une telle fonction. Une hypothèse intéressante pour expliquer ce fait est liée aux contraintes d'un milieu aérobie oxydant, imposées au vivant depuis l'apparition de l'activité photosynthétique. Comme le cuivre, le fer présente plusieurs contraintes liées à l'enrichissement du milieu en dioxygène. La forme majoritaire, le Fe^{3+} est peu disponible car sous la forme d'oxydes de fer fortement insolubles dans les milieux aqueux. La forme Fe^{2+} est très soluble mais peut réagir en milieu aérobie et produire des ROS. Ce micro-élément doit être finement régulé, depuis son acquisition jusqu'à son transport à longue-distance et son utilisation. Un peu moins toxique que le cuivre (maintenu dans le cytoplasme à une concentration inférieure à 10^{-15} M), le fer représente un danger, libre dans la cellule. Fait remarquable, chez tous les modèles aérobies de l'homéostasie du fer, la ou les étapes d'oxydation de cet élément est/sont assurée(s) par une MCO. Chez ces modèles, elles montrent un triple avantage : (1) elles séquestrent du cuivre et exploitent ses propriétés redox, (2) elles limitent la présence de Fe^{2+} libre, et (3) elles diminuent la concentration en dioxygène en tant qu'oxydases terminales. Le dioxygène étant la cause des contraintes contemporaines de gestion des métaux divalents.

Nous décrirons plus en détails la fonction des ferroxydases chez les modèles aérobies. En premier lieu nous devons présenter le métabolisme du fer chez les plantes supérieures afin de pouvoir faire le parallèle avec ces modèles et développer les arguments et idées qui ont amené à s'intéresser à la place de l'activité ferroxydase dans l'homéostasie du fer des végétaux.

1.5 La réponse à la carence chez les plantes supérieures

Bien que le quatrième élément présent dans la croûte terrestre en terme de quantité, le fer n'est pas disponible pour la plante car sous la forme d'oxydes de fer. Sa disponibilité chute encore dans les milieux alcalins et calcaires qui représentent environ 30% des surfaces cultivées [32, p. 641] pour atteindre des concentrations en fer soluble de l'ordre de 10^{-10} M [33]. L'intervalle de concentration en fer disponible pour une croissance optimale se situant entre 10^{-9} et 10^{-4} M [34]. L'acquisition du fer est donc un processus actif nécessaire à la survie des plantes qui ont été sélectionnées en fonction de leur efficacité à extraire le précieux métal. Ainsi, chez les plantes supérieures, nous pouvons distinguer deux stratégies principales pour acquérir le fer, correspondant à peu près aux groupes des plantes graminées et non-graminées [35].

1.5.1 Acquérir le fer

1.5.1.1 Stratégie I

La première stratégie est basée sur la mobilisation du fer par réduction et se déroule en trois étapes : (1) acidifier le milieu pour faciliter la libération du Fe^{3+} des complexes argilo-humiques tout en créant des conditions favorables pour la réduction du fer, (2) réduire le Fe^{3+} libre en Fe^{2+} , (3) transporter le Fe^{2+} dans la cellule racinaire. Chez *Arabidopsis*, l'acidification du milieu se fait par la libération de protons par des ATPases transmembranaires du plasmalemme (codées par la famille AHA)[36]. Cette acidification induit la protonation de la liaison des hydroxydes de Fer et libère le Fe^{3+} [37]. La diminution d'une unité de pH augmentant 1000 fois la solubilité du fer [38]. Puis le Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} par l'action d'une réductase transmembranaire, FRO2 (Ferric Reduction Oxidase 2) [39]. Le Fe^{2+} est alors transporté dans la cellule épidermique de la racine par IRT1 (Iron Regulated Transporter 1)[40], [41]. IRT1 est également capable de transporter d'autres métaux divalents comme le zinc, le manganèse, le cadmium et le cobalt [41]. FRO2, AHA2 et IRT1 sont induites à pH inférieur à 5,5 (un peu moins à pH 7,5) mais leur induction dépend principalement du déficit en fer [36]. Ces trois acteurs agiraient de concert sous la forme d'un complexe à la membrane plasmique, en effet l'acidification est essentielle à la mobilisation du fer mais le résultat de l'activité d'AHA2 restant très local, l'optimisation de l'acquisition du fer nécessiterait un rapprochement strict de la réductase, du transporteur et de la pompe à proton [42].

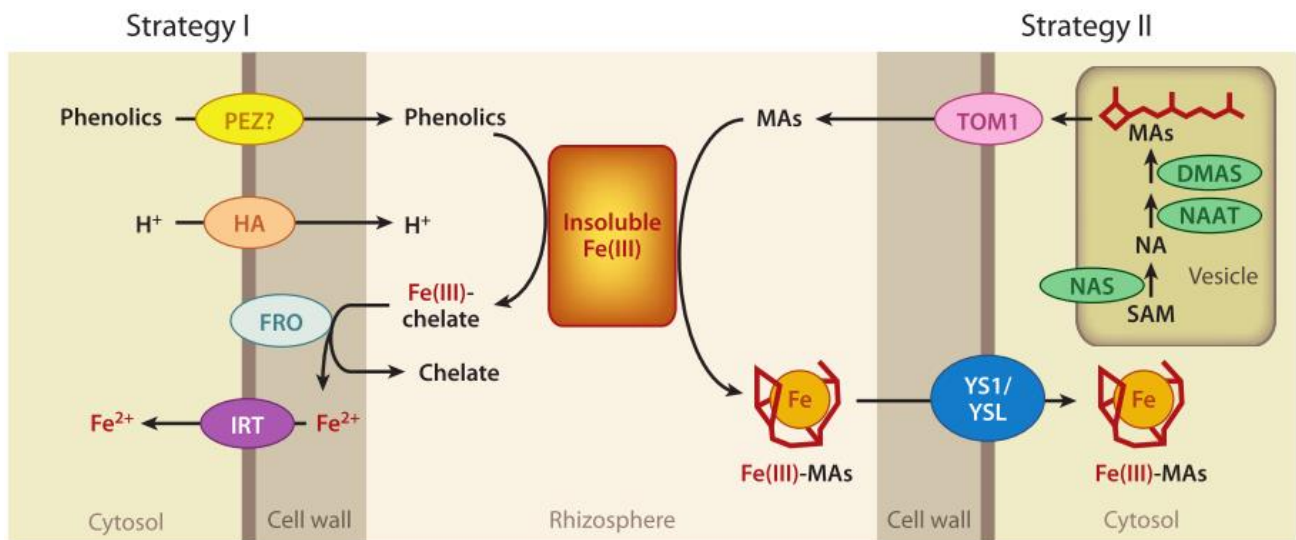


Figure 6. Stratégies d'acquisition du fer

La stratégie I chez les non-graminées (gauche) et la stratégie II chez les graminées (droite). Les ovales représentent les transporteurs et les enzymes jouant un rôle principal dans ces stratégies, tous sont induits en déficit en fer. Abréviations: **DMAS**, deoxymugineic acid synthase; **FRO**, ferric-chelate reductase oxidase; **HA**, H⁺-ATPase; **IRT**, iron-regulated transporter; **MAs**, mugineic acid family phytosiderophores ; **NA**, nicotianamine; **NAAT**, nicotianamine aminotransferase; **NAS**, nicotianamine synthase; **PEZ**, PHENOLICS EFFLUX ZERO ; **SAM**, S-adenosyl-L-methionine; **TOM1**, transporter of mugineic acid family phytosiderophores 1; **YS1/YSL**, YELLOW STRIPE 1/YELLOW STRIPE 1-like.

Figure provenant de la revue de Kobayashi & Nishizawa 2012.

1.5.1.2 Stratégie II

La seconde stratégie est basée sur la mobilisation du fer par chélation. Cette stratégie est bien connue chez les Poacées (maïs, riz, orge etc...) qui sécrètent des phytosidérophores (PS), définis comme étant de petites molécules organiques ayant une très grande affinité pour le Fe^{3+} [43]. Chez le riz et l'orge, les PS sont synthétisés à partir de nicotianamine [44], l'acide 2'deoxymugineique (MA) étant le plus abondant des PS sécrété dans la rhizosphère, exporté par TOM1 (Transporter Of Mugineic acid 1). Les phytosidérophores peuvent solubiliser le Fe^{3+} et forment des complexes chargés en Fe^{3+} [45]. Les complexes PS- Fe^{3+} sont ensuite transportés dans la cellule épidermique de la racine par YS1 (Yellow Stripe 1, par extension, la famille « Yellow Stripe-Like », YSL) caractérisé d'abord chez le maïs [46] puis chez le riz [47]. La figure 6 présente les deux stratégies d'acquisition du fer.

1.5.1.3 Remarques sur ces stratégies

Les deux stratégies sont classiquement circonscrites aux dicotylédones et monocotylédones (respectivement stratégie I et stratégie II). Cependant, la capacité d'exsuder les molécules importantes pour l'acquisition du fer n'est pas exclusive des plantes de la stratégie II. En effet, il a été montré que des plantes représentantes de la stratégie I sécrètent des composés phénoliques, des flavonoïdes et des acides aminés dans la rhizosphère en condition de déficit en fer, parmi ces composés, les coumarines [48] participent notamment à la remobilisation du fer présent dans le milieu à des gammes de pH où FRO2/IRT1/AHA2 sont moins présents [48]–[51]. Par ailleurs, le riz, une plante représentante de la stratégie II, possède un homologue de IRT1 (OsIRT1) transportant également le Fe^{2+} , exprimé en condition d'anoxie lorsque la plante est immergée (cohérent avec une adaptation en milieu inondé où le Fe^{2+} est plus présent) [52] ce qui nuance encore plus l'idée de deux stratégies distinctes et indépendantes pour l'absorption du fer chez les plantes. Les bactéries possèdent également les deux types d'absorption du Fe^{2+} et des chélats chargés en Fe^{3+} [53] : qu'un même organisme possède les deux voies de récupération du fer dans le milieu semble être partagé dans le vivant. (Voir Figure 6).

Acquérir le fer est la première étape de l'approvisionnement. La plante doit encore l'acheminer à destination des organes. Et ce en contrôlant le flux de fer par différentes stratégies afin d'éviter les effets délétères du fer libre dans les cellules.

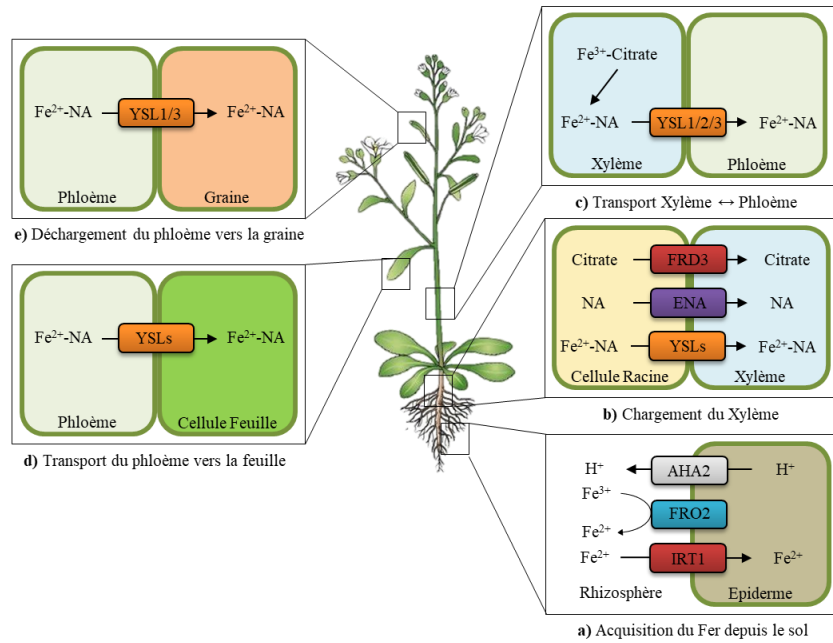


Figure 7. Acquisition du fer et son Transport chez les non-graminées.

(a) L'acidification due à **AHA2** augmente la solubilité du fer (Fe^{3+}) dans la rhizosphère, et **FRO2** réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} , transporté par **IRT1** dans les cellules de l'épiderme de la racine. (b) Le transporteur d'efflux **FRD3** charge le citrate dans le xylème. (c–e) Le complexe Fe^{3+} - Citrate est transporté dans les parties aériennes grâce à la Transpiration. Le Citrate chélate le fer dans le xylème et le Nicotianamine (**NA**) le chélate dans le phloème. Le fer est relargué du phloème vers les feuilles et les graines par la famille de transporteurs Yellow Stripe-Like (**YSL**).

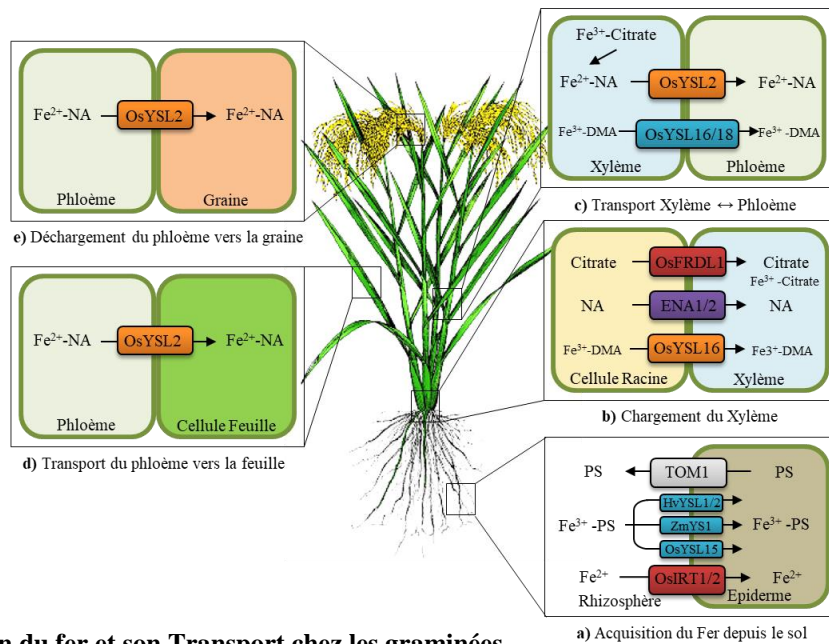


Figure 8. Acquisition du fer et son Transport chez les graminées.

(a) Le Fe^{3+} est complexé par des phytosidérophores (**PS**) et le complexe est importé par des transporteurs de la famille **YSL** dans la cellule d'épiderme de la racine. Le Fe^{2+} peut également être importé par **OsIRT1** chez le riz. (b) Le transporteur d'efflux **FRDL1** charge le citrate dans le xylème où il chélate le Fe^{3+} , pour être transporté dans le reste de la plante. (c–e) Le Citrate chélate le fer dans le xylème et le Nicotianamine (**NA**) le chélate dans le phloème. La famille **YSL** importe et exporte les complexes de fer du xylème vers le phloème et les tissus.

Les Fig 7 et 8 sont adaptées des Fig 1 et 2 de Weng & Guerinot 2016

1.5.2 Transport à longue distance du fer

Le fer entrant dans le symplasme de la cellule épidermique de la racine, doit être protégé de l'oxygène pour éviter sa précipitation et/ou la génération de radicaux de l'oxygène. Le transport du fer de l'épiderme racinaire vers le xylème prend la forme d'un complexe Fe^{2+} -NA. La nicotianamine (NA) est un acide aminé non-protéino-génique ubiquitaire chez les plantes [54], intermédiaire dans la biosynthèse des PS chez les plantes de la stratégie II notamment. Les deux formes Fe^{2+} et Fe^{3+} peuvent se complexer avec la NA [55] (avec une affinité plus grande pour le Fe^{2+}). Ce complexe possède une masse moléculaire de 356 g.mol^{-1} et peut facilement circuler à travers la voie symplastique jusqu'au xylème. Une fois dans le xylème, où le pH est aux alentours de 5,5 à 6, le fer se complexe principalement avec deux acides organiques, le citrate et le malate (Fe^{3+} -citrate/malate) [56], [57]. Le gène FRD3 (ferric Reductase Defective 3) code un exporteur de la famille des MATes (Multidrug And Toxin Efflux) transportant le citrate dans l'apoplaste des cellules du cylindre central et dans le xylème [58], [59]. Le mécanisme permettant l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} avant son passage dans le xylème est mal connu [56]. Il existerait une ferroxidase qui oxyderait le fer dans l'apoplasme du péricycle, LAC12 dont les mutants présentent un phénotype similaire à *frd3*, avec une accumulation de fer au niveau de la stèle (le long de la racine) [60].

Le Fe^{3+} arrivant par le xylème sous forme de Fe^{3+} -Citrate-malate est réduit en Fe^{2+} probablement par la famille de gènes *FROs* [61]. Il est transporté dans les organes puits sous forme de Fe^{2+} -NA. Le fer se retrouvera principalement dans les chloroplastes et les mitochondries. La famille des *YSLs* (Yellow Stripe-Like) code pour des transporteurs de complexes de nicotianamine avec les métaux. Des transporteurs de complexes de fer, AtYSL1, AtYSL2 et AtYSL3 présents au niveau des systèmes vasculaires des racines et des feuilles, participeraient au chargement des métaux (Fe, Zn, Cu) dans les vaisseaux, depuis les organes sources jusqu'aux organes reproducteurs et aux graines.[62]–[66]. Chez *Arabidopsis thaliana*, un autre transporteur OPT3 (Oligopeptide Transporter 3) serait nécessaire au chargement du fer dans le phloème et jouerait également un rôle dans la redistribution de celui-ci entre les tissus matures et les tissus plus jeunes, en développement [67].

Pour récapituler, le fer absorbé par la racine est déplacé à travers les tissus par chélation avec des phytosidérophores (Fe^{3+}) ou la nicotianamine (Fe^{2+}). Au niveau du xylème, un échange de ligand doit avoir lieu car le fer est alors pris en charge par des acides organiques tels que le

citrate et le malate. Dans les parties aériennes, le Fe^{3+} est vraisemblablement re-réduit (FROs) et transporté sous forme de Fe^{2+} -NA jusqu'aux organites. Des échanges de fer entre le xylème et le phloème ont lieu par l'intermédiaire de transporteurs de la famille des YSLs et des OPTs afin d'alimenter les tissus en développement comme les jeunes feuilles par exemple qui sont principalement alimentées par le phloème.

Les stratégies de réponse à la carence permettent l'entrée et l'acheminement du fer à travers l'organisme. La toxicité du fer impose une régulation fine de cette réponse. De la perception de la carence, sa mise en place et jusqu'à sa répression, des acteurs moléculaires clés contrôlent l'expression de cette réponse qui ne doit pas générer de déséquilibre.

1.5.3 Régulation de la réponse à la carence

1.5.3.1 Régulation transcriptionnelle

Les acteurs moléculaires de la réponse à la carence en fer sont principalement régulés au niveau transcriptionnel, à quelques exceptions près : exemple de l'internalisation d'IRT1 [68].

Chez *Arabidopsis*, FIT (Fe-deficiency Induced Transcription Factor) un facteur de transcription clé de la classe III de la famille des basic helix-loop-helix (bHLH) régule positivement la transcription de gènes impliqués dans la stratégie I d'acquisition du fer (FRO2 et IRT1 entre autres) [69], [70], et est induit transcriptionnellement en carence de fer. FIT nécessite sa dimérisation avec d'autres bHLH [71]–[73]. FIT est également régulé par des hormones, l'éthylène notamment, interagissant avec EIN3 et EIL1 induisant la dégradation de FIT par le protéasome 26-S [74], ainsi que DELLA, un répresseur lié aux gibbérellines qui inhibe l'activité de FIT et peut interagir avec bHLH38 et 39 [75]. FIT active la transcription des facteurs MYB10 et 72 et régule positivement l'expression de NAS4, un gène codant pour une nicotianamine synthase. La nicotianamine jouant un rôle important dans l'homéostasie du fer en tant que chélateur du Fe^{2+} dans le cytoplasme et le phloème pour son transport [76].

Chez *Arabidopsis*, indépendamment de FIT, il existe une autre bHLH (IVb) régulant négativement un autre groupe de gène de réponse à la carence : POPEYE (PYE). Le mutant *ppe-1* est pourtant plus sensible à la carence en fer que le sauvage suggérant un rôle plus complexe de PYE. Il permettrait de contrôler plus finement la réponse à la carence en fer [77]. BRUTUS (BTS) une ubiquitine E3 ligase induite en carence et formant un hétérodimère avec des bHLH et PYE, induisant la dégradation de PYE et de protéines PYE-like. BTS possède

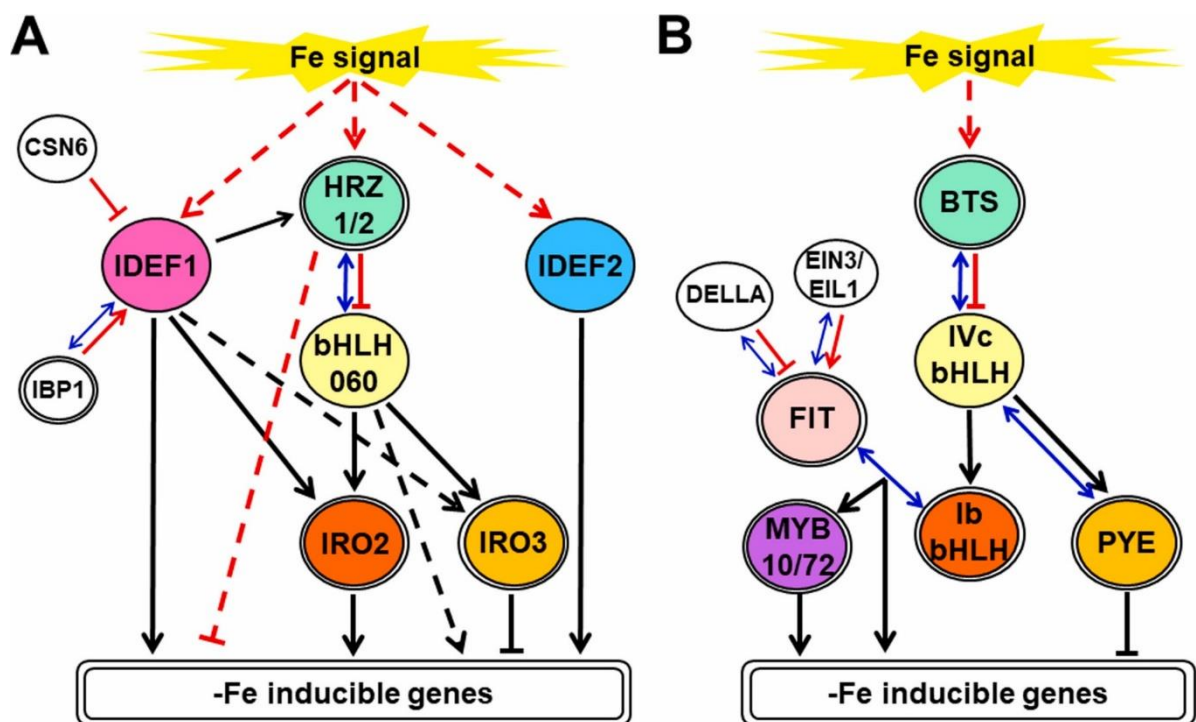


Figure 9. Schéma du réseau de régulation de la réponse à la carence en fer

A. Acteurs de la réponse chez le riz

B. Acteurs de la réponse chez *Arabidopsis thaliana*

Figure issue de Kobayashi *et al* 2019

trois domaines hémérythrine (HHE) et peut lier du fer et du zinc qui a pour effet de déstabiliser BTS. De plus les IMA peuvent interagir avec BTS et cette interaction réprime BTS [78] Il existe donc une régulation post-traductionnelle d'acteurs du réseau de contrôle transcriptionnel des gènes de réponse à la carence en fer [79].

Chez le riz, il existe des régulateurs spécifiques des gènes de réponse à la carence mais aussi des composantes partagées avec les plantes non-graminée/stratégie II comme Arabidopsis. IDEF1, IDEF2 et OsIRO2 régulent positivement l'expression des gènes ayant un rôle dans la sécrétion et le transport des acides 2-déoxymuginéiques (DMA) (voir stratégie II), et d'autres chélateurs comme la nicotianamine. La surexpression de OsIRO2 augmente la sécrétion de DMA et améliore la tolérance à la carence [80]. IDEF1 et IDEF2 sont des facteurs de transcription de la famille des ABI3/VP1 et NAC (NAM, ATAF et CUC) respectivement. La surexpression et la répression de IDEF1 révèle une forte corrélation entre son expression et la tolérance précoce à la carence mais pas lors d'un déficit prolongé [81]. La sous-expression de IDEF2 induit une distribution du fer perturbée entre les feuilles et les racines mais pas IDEF1 [82]. OsIRO3 régulerait négativement des gènes majeurs de la réponse à la carence notamment des homologues NAS, YSL, IRT et NRAMPs [83].

Il existe deux homologues de BRUTUS chez le riz, OsHRZ1 (*Oryza sativa* Haemerythrin motif-containing Really Interesting New Gene (RING)- and Zinc-finger protein 1) et OsHRZ2 qui régulent négativement de très nombreux gènes impliqués dans la réponse à la carence [84]. La bHLH060 (OsPRI1) interagit avec OsHRZ1 et induit sa dégradation, favorisant la transcription des gènes réprimés par OsHRZ1. Parmi ces gènes se trouvent entre autres OsIRO2 et OsIRO3 [85], (Voir Figure 9).

Chez ces deux organismes, la réponse à la carence en fer consiste en une cascade de signalisation dépendant de nombreuses bHLH [86], la variété des acteurs de cette voie intègrent les signaux du statut en fer du milieu et dans la plante. Cette cascade lui permet de s'adapter à des concentrations en fer changeantes dans le milieu, oscillant entre le déficit et l'excès.

1.5.3.2 Régulation post-traductionnelle

La régulation de la réponse à la carence n'est pas essentiellement transcriptionnelle, une composante principale de cette réponse possède une régulation post-traductionnelle. IRT1, le transporteur de Fe²⁺ peut être internalisé pour être retiré rapidement de la membrane plasmique. Premièrement pour limiter une entrée trop brutale de fer mais surtout pour éviter l'entrée de

métaux divalents toxiques. En effet IRT1 transporte le fer, mais aussi le manganèse, le cobalt, le zinc et le cadmium. Il a été montré que IRT1 pouvait être ubiquitiné par IDF1 (IRT1 Degradation Factor1), et endocyté [87], [88]. La présence de ces autres métaux influence l'internalisation d'IRT1 par ubiquitination également [89]. En carence de fer, l'induction du système IRT1/FRO2 (pour la réduction du Fe^{3+})/AHA2 (pour la protonation) permet la récupération du fer. Cependant IRT1 peut provoquer une entrée massive d'autres métaux toxiques ; ce cycle d'endocytose et polarisation à la membrane optimise la récupération du fer en limitant cette entrée indésirable de métaux divalents [90].

1.5.4 Perception de la carence

Les mécanismes par lesquels la carence en fer est perçue puis l'information transmise à toute la plante ne sont pas encore clairement définis et plusieurs voies probables fonctionneraient en parallèle.

1.5.4.1 Communication longue distance

Les feuilles sont les organes les plus susceptibles de subir la carence en premier ayant la demande la plus importante due à l'activité photosynthétique exigeant beaucoup de fer. Il est attendu que le signal de la carence soit transmis des feuilles aux racines. Chez Arabidopsis, les YSLs transportent le complexe Fer-Nicotianamine (Fe-NA) et sont exprimés dans les tissus vasculaires. Malgré une faible concentration de fer dans les feuilles et les racines, le mutant *ysl1ysl3* ne régule plus les gènes de réponse à la carence et le fer s'accumule dans le phloème. *ysl1ysl3* ne transmet plus le signal de la carence aux racines [91] mais la NA ne semble pas être l'avatar du signal de carence, les mutants manquant de NA (*chloronerva* chez la tomate ou le quadruple mutant *nas* d'Arabidopsis) transmettent constitutivement le signal de carence et accumule du fer en excès dans les racines [92], [93]. Le mutant *opt3* présente un phénotype opposé à *ysl1ysl3*, et induit l'expression des gènes de réponse à la carence de façon constitutive, avec une concentration importante de fer dans les feuilles [94]. *OPT3* est induit en carence alors que YSL1 et YSL3 sont réprimés. *OPT3* transporte le Fe-NA [67] et son activité chez *ysl1ysl3* entraînerait une accumulation de fer dans le phloème, accumulation qui indiquerait que les feuilles contiennent assez de fer [91], empêchant l'induction des gènes de réponse à la carence.

Le fer total lui-même a été proposé comme signal réprimant les gènes de réponse à la carence, cependant le mutant *frd3* présentant peu de fer dans les feuilles et l'accumulant dans les racines,

induit toujours les gènes d'acquisition du fer. Au regard du phénotype des mutants *frd3*, *opt3*, *chl* etc... le pool de fer dans les racines n'est donc pas un indicateur clé du signal de carence en fer. Chez ces mêmes mutants, l'activité de transport du fer dans le phloème est affectée, directement ou indirectement, suggérant que le pool de fer du phloème est déterminant dans la perception de la carence en fer [95].

Des hormones ou de petites molécules interviennent également dans la signalisation de la carence en fer. L'éthylène et l'oxyde nitrique (NO) peuvent induire les gènes de réponse à la carence chez des plantes cultivées avec peu de fer (ou sans fer) mais pas chez les plantes cultivées avec suffisamment de fer [96]. Le pool de fer du phloème réprimant l'activation par l'éthylène et le NO.

L'auxine a un effet sur l'expression des gènes de réponse à la carence qui induit la synthèse d'auxine, induisant *FIT* et *FRO2* [97]. Le dépôt de fer en surface de la racine induit l'expression de *AUX-1*, codant un transporteur de l'auxine, modifiant la distribution de celle-ci et provoquant la formation de racines latérales [98]. Chez le riz, les mécanismes par lesquels l'auxine influencerait l'architecture de la racine en réponse à la carence sont peu caractérisés. Il existerait un facteur de transcription *OsARF12* induisant l'expression de *OsDR5* (un récepteur de l'auxine) qui jouerait un rôle dans la réponse à la carence en fer. Le mutant *osarf12* est insensible à l'auxine et présente une architecture racinaire altérée. Mais surtout, *OsIRT1* est moins exprimé et les plantes contiennent moins de fer comparé au sauvage [99].

L'éthylène induit l'expression de *FIT* chez *Arabidopsis* (Stratégie I) et de *OsIRO2* chez le riz, activant la transcription des gènes de types stratégie I (*OsIRO2*, *OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsYSL15*, *OsIRT1*) chez cette plante de la stratégie II (faisant du riz une exception parmi les graminées). Chez l'orge, un autre modèle de la stratégie II, l'éthylène n'induit pas ces gènes de réponses à la carence [100].

L'oxyde nitrique est impliqué dans de nombreuses voies de développement et de régulation de stress (biotiques et abiotiques) [101], il induit la croissance des racines latérales comme l'auxine car il agit en aval de celle-ci qui induit sa production [97]. Il ne semble pas jouer un rôle déterminant dans ces voies mais accentue plutôt les réponses. Dans la réponse à la carence en fer il aurait une influence avec l'éthylène et l'auxine dans l'induction des gènes. Chez la tomate, la limitation en fer provoque l'accumulation de NO [102], et agit positivement sur l'acquisition du fer en induisant *FRO1*, *IRT1* et *FER* (homologue de *FIT* chez la tomate). Chez

le maïs, l'ajout de NO fait disparaître les symptômes de chlorose chez les mutants présentant une acquisition du fer altérée [103]. Le NO stabiliserait directement FIT par nitrosylation, limitant sa dégradation par le protéasome comme c'est le cas dans la transmission des signaux « NO » pour d'autres voies [104].

D'autres hormones ont un effet sur la réponse à la carence en fer, le jasmonate et la cytokinine par exemple en sont des régulateurs négatifs. Les cytokinines, connues pour leur rôle dans le développement cellulaire, et la mobilisation des nutriments, ont un impact négatif sur la réponse à la carence en fer, comme pour d'autres nutriments tels que le phosphate, ou le nitrate. L'ajout de cytokinine réprime l'expression de *FIT*, *FRO2* et *IRT1* chez *Arabidopsis* mais cette répression ne dépend pas de FIT : chez *fit1*, l'ajout de cytokinine réprime également l'expression de *FRO2* et *IRT1* [105].

Le jasmonate, connu pour son rôle dans la régulation de stress biotiques [106] et dans le développement [107], est également un régulateur de la réponse à la carence en fer. L'application de méthyl-jasmonate réprime l'expression de *FRO2*, *IRT1* et *FIT*. Similaire à la cytokinine, l'action du jasmonate ne semble pas lié à FIT, cependant contrairement à la cytokinine, la participation du jasmonate à la réponse à la carence en fer semble ne pas être systématique [108].

Les relations entre toutes ces voies hormonales ne sont pas encore bien comprises et la réponse à la carence en fer est le résultat de l'intégration de tous ces signaux physiologiques, hormonaux etc... La régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition et le transport du fer doit être fine et les déviations présentent un risque, le fer ne pouvant manquer à la machinerie photosynthétique et ni se retrouver libre dans la cellule. Il est intéressant de noter que la réponse à la carence implique l'expression de régulateurs positifs mais simultanément des facteurs de transcriptions négatifs afin de prévenir l'entrée brutale du fer. Ceci est vrai pour tous les nutriments, c'est la nature de l'Homéostasie.

1.5.4.2 *Senseurs potentiels*

Nous n'avons pas encore identifié les acteurs majeurs de la perception du statut nutritionnel du fer chez les plantes. La perception de la carence pourrait être effectuée par ces régulateurs HRZ et BTS (Respectivement chez le riz et *Arabidopsis*). Ces candidats prometteurs sont capables de lier le Fe^{2+} et d'autres divalents comme le Zn^{2+} [84] et régulent négativement

l'expression des gènes de réponse à la carence. Ils partagent avec FBXL5 (*F-box/LRR-repeat protein 5*), une E3 ubiquitine ligase à domaine hémérythrine chez les animaux qui joue le rôle de senseur du fer et dont la liaison du fer stabilise la structure. Le complexe SCF^{FBXL5} ubiquitine IRP2, un régulateur majeur de la réponse à la carence en fer chez les animaux. Contrairement à FBXL5, lorsqu'il lie un atome de fer, BTS est déstabilisé [79]. Les preuves d'un rôle de senseur du fer pour HRZ/BTS sont insuffisantes et la diversité des autres domaines de ces protéines (trois domaines doigts de zinc, un domaine rubredoxin-like [84]) suggèrerait une intégration de signaux qui rend difficile pour l'instant la détermination de la fonction de ces régulateurs dans la nutrition du fer.

IDEF1 chez le riz est un autre candidat prometteur de la perception de la carence. Il s'agit d'un facteur de transcription régulant positivement les gènes de réponses à la carence. Il se lie aux séquences CATGC de l'élément *cis* IDE1 du promoteur de ces gènes [109]. Il possède des sites de liaisons de métaux divalents (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} et Ni^{2+}) [110] et est connu pour jouer un rôle dans l'homéostasie du fer.

Des candidats prometteurs du sensing de la carence en fer sont les peptides IMA (Ironman Peptides) qui sont de petites protéines conservées chez les angiospermes de ~40 à 70 résidus, dont seulement la partie C-terminale présente un motif consensus d'une quinzaine de résidus et riche en résidus aspartate. Le reste de leur séquence est extrêmement variable. Les IMAs sont capables de lier les métaux divalents (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , et Cu^{+}) *in vitro*, et sont exprimés dans le phloème : site déjà suspecté de jouer un rôle majeur dans la perception du statut en fer de la plante. Les IMA induisent des gènes de réponse à la carence et notamment des bHLH du groupe Ib, ainsi que *FRO2*, *IRT1*, *NAS1* et 2, *FRD3* et deux gènes codant pour les ferritines, *FER1* et 3 sont induits chez les surexprimeurs des IMAs. La surexpression des IMAs induit la réponse à la carence et donc l'accumulation des métaux dans les feuilles [111].

1.6 La réponse à l'excès de fer chez les plantes supérieures

1.6.1 Occurrences de l'excès de fer

1.6.1.1 Excès environnementaux

Les contraintes liées à la présence d'oxygène, favorisent essentiellement des situations de carence en fer auxquelles les plantes doivent faire face. Cependant les plantes rencontrent également de nombreuses situations où le précieux microélément se trouve concentré et/ou sous forme réduite et dont l'entrée brutale dans l'organisme présente un risque. Le fer est certes majoritairement présent sous forme d'oxydes de fer (Fe^{3+}), cause des conditions de carence, et l'écart de solubilité entre les deux ions à partir d'oxydes est extrême. ($K_{sp} = [\text{Fe}^{3+}] [\text{OH}^-]^3 = 1 \times 10^{-36}$; $K_{sp} = [\text{Fe}^{2+}] [\text{OH}^-]^2 = 8 \times 10^{-16}$) [112]. La solubilité du Fe^{3+} et Fe^{2+} est bien sûr influencée par le pH, une diminution du pH favorise la forme Fe^{2+} (1 unité en moins augmente mille fois sa solubilité [38]).

C'est particulièrement le cas dans les milieux acides et riches en sulfates qui contiennent une grande quantité de fer (de 10 à 2000mg/kg) [113]. Leur pH inférieur à 5 déplace l'équilibre $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ vers le Fe^{2+} , et dans ce type de milieu, la solubilité du Fe^{3+} gravite autour de $\sim 1 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹ alors que celle du Fe^{2+} atteindrait une valeur de ~ 800 mol.L⁻¹ [113], [114]. L'intoxication par le fer est un enjeu agronomique dans les pays cultivant du riz dans des sols inondés en plaine aux concentrations en fer élevées et à la rhizosphère pauvre en oxygène. Dans des sols aérés, la simple hétérogénéité de la composition du sol peut également mener la racine à rencontrer des zones plus concentrées localement surtout si elles sont riches en matière organique. La concentration en fer suivrait également un gradient croissant avec la profondeur des couches du sol. Ainsi les plantes en explorant leur substrat peuvent rencontrer localement des situations d'excès de fer lié à la nature du sol : la composition brute en oxydes de fer, les pH acides, les milieux favorisant le fer ferreux (Fe^{2+}) tels que les milieux immergés et anoxiques même pour une courte période (les fortes pluies favorisant la réduction du fer).

1.6.1.2 Excès physiologiques

Nous nommons ici excès physiologiques, des situations où la plante au niveau tissulaire ou cellulaire pourrait expérimenter un excès de fer ou une augmentation du flux en fer qui n'est pas directement lié à la nature du sol. L'activité photosynthétique est l'activité principale

influençant la demande en atome de fer chez les plantes. Le chloroplaste contient de fait une part élevée du fer total de la plante (68,5% du fer total des feuilles dans les chloroplasts [115]). C'est également là que se trouvent les ferritines, des protéines très importantes dans la gestion de l'excès de fer qui seront décrites plus en détail ci-après. Le fer peut être réduit directement par la lumière, c'est la photo-réduction du fer. La quantité de lumière captée par le chloroplaste peut être à l'origine de la libération de fer photo-réduit dans la lumière du thylakoïde et le stress oxydant dû au dépassement des capacités photosynthétiques endommage ces systèmes libérant du fer. En l'absence de lumière, le turn-over des systèmes photosynthétiques ralentit et induit la dégradation des protéines à fer qui peut provoquer un excès au niveau cellulaire. Le phénomène d'étiolation/dé-étiolation pourrait résulter également en un excès de fer qui est mobilisé brutalement par la plantule depuis ses réserves lorsqu'elle est réexposée à la lumière.

La disponibilité conjuguée de différents nutriments influence l'accumulation du fer par la plante. Chez Arabidopsis, lors d'une carence combinée d'azote, de phosphore, de potassium et de soufre, la plante accumule énormément de fer (jusqu'à 2,5mg/g de feuille – masse sèche). Les conditions de carence en phosphore induisent une augmentation de la concentration en fer disponible dans le milieu. En effet le fer forme des complexes avec le phosphate, limitant sa disponibilité pour la plante. La plante semble prioriser l'adaptation de son architecture racinaire (arrêt de la croissance primaire) en fonction de la carence en phosphore même lors de carences combinées d'autres nutriments. Probablement en cause l'accumulation de fer et donc sa toxicité [116].

1.6.2 Réponse à l'excès de fer

Le fer ne peut rester libre dans la cellule. Sa toxicité impose une régulation fine de son statut redox. Dès sa mobilisation dans le sol, la plante doit contrôler son état redox et/ou le complexer puis tout au long de son transport, depuis son acquisition jusqu'aux organes puits, ainsi que dans la cellule entre les différentes localisations subcellulaires du fer, sa forme doit être constamment adaptée aux conditions locales pour éviter la génération de ROS en présence d'oxygène. Nous avons présenté la panoplie d'acteurs participant à la régulation de la réponse à la carence en fer, enjeu prioritaire pour la plante (et pour l'agronomie). Mais la régulation d'un éventuel excès est tout autant nécessaire.

1.6.2.1 Les ferritines

Les ferritines jouent un rôle essentiel dans la gestion de l'excès de fer chez les plantes. Ces protéines sont retrouvées dans presque tout l'arbre du vivant (excepté chez les levures) [117]–[119] et s'assemblent toujours en un multimère de sous-unités identiques formant une sphère creuse accueillant de grandes quantités de fer. Leur fonction diffère entre les procaryotes, les animaux et les plantes. Elles peuvent être classées en trois familles suivant le règne dont elles proviennent, et peuvent contenir des hèmes à fer (cas des bacterio-ferritines).

Les ferritines forment un multimère de 24 sous-unités et peuvent contenir plusieurs milliers d'atomes de fer. Le fer est oxydé par la sphère à son entrée par un site de ferroxidation consistant en un centre bi-nucléaire à deux atomes de fer [117]. Les atomes de fer ferrique sont générés en utilisant le pouvoir oxydant de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène [117]. Il s'agit du seul centre connu, possédant une activité ferroxidase avec les Multicopper oxidases. Le fer ferrique se retrouve sous la forme d'oxydes purs ou mélangé avec du phosphate (avec un ratio P/Fe de 1/3) [120], [121]. Les ferritines sont régulées au niveau transcriptionnel et l'expression de leurs gènes chez *Arabidopsis* répond de façon linéaire à la concentration en fer dans le milieu [122] et sont parfois décrites comme des « rhéostats » de l'excès de fer. L'oxyde nitrique peut aussi induire l'expression des gènes des ferritines, le NO intervenant dans la carence et aussi dans l'excès (par des mécanismes séparés) [123]. Malgré leur capacité de séquestration du fer remarquable, les ferritines d'*Arabidopsis* joueraient un rôle de tampon du flux de fer lors d'un excès, plutôt que celui de stockage, afin de limiter le stress oxydant. Pour argument l'augmentation de la quantité de ROS chez *Atfer1-3-4*, le mutant KO de trois gènes majeurs codant pour les ferritines chez *Arabidopsis* [124]. Elles ne joueraient pas de rôle essentiel dans le développement contrairement à celles du pois, et chez cette espèce, elles sont également impliquées dans le chargement en fer de la graine [125]. Cependant, elles restent essentielles à la gestion d'une entrée importante de fer et limitent la génération de ROS par le fer libre [124].

1.6.2.2 Séquestrer le fer libre

Il existe peu de données transcriptomiques concernant la réponse à l'excès de fer. Cette réponse à l'excès a surtout été approfondie chez le riz cultivé en zone inondée. Ainsi l'excès de fer induit chez le riz *OsNAS3*, codant pour une nicotianamine synthase, le transporteur vacuolaire *OsVIT2*, et les gènes *OsFER1* et *OsFER2*, codant des ferritines [126]–[128]. Ces gènes participeraient à la détoxification du fer en chélatant (nicotianamine), séquestrant

(ferritines) et stockant dans la vacuole (VIT2), le fer libre dans la cellule. De plus les gènes de réponse à la carence impliqués dans l'acquisition et le transport sont réprimés dans la racine, mais pas dans les feuilles [129], il a été suggéré que le degré de conservation entre les réponses à la carence et à l'excès diffère entre les organes [130].

1.6.2.3 La plaque racinaire

Un mécanisme d'adaptation à l'excès de fer remarquable est la formation de la plaque ferrique racinaire chez le riz cultivé dans les zones inondées. Grâce à des aérochymes diffusant de l'oxygène capté depuis les parties aériennes, le Fe^{2+} du milieu s'oxyde et se dépose autour des racines, formant une plaque d'oxydes de fer limitant la diffusion de fer réduit vers la racine. La formation des aérochymes est induite en anoxie et par l'éthylène [131]. Ce phénomène de plaque est efficace et elle peut chez certains cultivars représenter 10% de la masse sèche de racine, soit ~500kg d'oxydes de fer par hectare cultivé [132]. Il n'existe pas de plaque ferrique racinaire chez Arabidopsis, mais jusqu'à présent, rien ne s'oppose à un mécanisme hypothétique d'oxydation du fer, au niveau racinaire ou même apoplastique, sachant qu'il peut subir de grandes variations de pH est que celles-ci influencent le statut redox du fer [133].

1.6.3 Régulation de la réponse à l'excès de fer

1.6.3.1 Perception de l'excès

Nos connaissances sur le « sensing » et la régulation de l'excès de fer sont très parcellaires. Il existe des régulateurs négatifs des acteurs de la réponse à la carence en fer, les HRZ/BTS. Ils sont de bon candidats pour réguler la réponse à l'excès par répression de la réponse à la carence, cependant, les HRZ/BTS sont induit en carence [77], [84] chez Arabidopsis, l'accumulation de BTS est inhibée en présence de fer [79]. La dé-répression des gènes de réponse à la carence est plus forte en présence de fer comparé à la carence chez les mutants *bts* et *hrz* [84]. Ces ubiquitine ligases seraient impliqués dans la canalisation de la réponse à la carence pour prévenir une entrée trop importante de fer dans l'organisme à cause de la levée de la répression des gènes d'acquisition du fer. Levée de répression induite par la perception d'une carence. Plutôt que dans la gestion d'un excès de fer sur le long terme. Chez Arabidopsis, il existe de plus, des paralogues de BTS (BTSL1 et 2) qui seraient impliqués dans la répression de la réponse à la carence lors de la supplémentation en fer [134]. Les gènes codant pour les ferritines sont des acteurs majeurs de la réponse à l'excès de fer. Leur promoteur contient des élément *cis*

IDRS (Iron-Dependent Regulatory Sequence) important pour leur répression [135]. Lors d'un excès de fer, le promoteur de *AtFER1* est déréprimé et nous ne connaissons pas de facteurs de transcription qui contrôlent l'induction d'*AtFER1*, mais il existe une bHLH, ILR3, impliquée dans la répression d'*AtFER1* en condition standard. ET qui joue le rôle d'activateur de gènes de la réponse à la carence de fer. Dimérisé avec PYE, ILR3 réprimerait d'autres gènes de réponse à la carence [136]. ILR3 en tant qu'activateur et répresseur de l'expression de gènes de réponse à la carence et à l'excès, jouerait un rôle dans l'acquisition et la gestion du fer dans un contexte de fluctuation importante de la concentration en fer dans le substrat.

1.6.4 Récapitulatif sur la régulation de l'homéostasie du fer

1.6.4.1 *Arabidopsis*

FIT est un facteur de transcription (FT) régulant positivement l'expression du set de gènes de réponse à la carence contenant *FRO2* et *IRT1*, il est induit en carence. PYE est un FT régulant négativement l'expression de gènes de réponse différents de FIT. Ces deux FTs font partie de la famille des bHLH. BTS est une E3 ubiquitine ligase interagissant avec des bHLH et PYE (induisant sa dégradation) et est un régulateur négatif de la réponse à la carence en fer. Côté hormones, l'éthylène et l'oxyde nitrique induisent FIT, et l'auxine régule positivement la réponse à la carence. Le jasmonate et les cytokinines sont des régulateurs négatifs de la réponse.

1.6.4.2 *Oriza sativa*

Chez le riz nous trouvons *IDEF1*, *IDEF2* et *OsIRO2*, des bHLH induisant l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des acides 2-déoxymuginéiques et de leurs transporteurs : les acteurs caractéristiques de la stratégie II chez cette graminée possédant aussi une composante de la stratégie I. *OsIRO3* est une bHLH régulant négativement l'expression de cette composante (les *NASs*, *YSLs*, *NRAMPs* et *IRTs*). Il existe également deux homologues de BTS, *OsHRZ1* et *OsHRZ2*, régulant aussi négativement les gènes de réponse au déficit en fer.

1.6.4.3 *Perception*

Le pool de fer présent dans le phloème jouerait un rôle déterminant dans la perception de la carence en fer dans les tissus aériens. Les BTS/HRZs sont des candidats probables pour le sensing de la carence et ou de l'excès de fer par leur action sur les acteurs des réponses et de leur capacité à se lier au fer avec changement de conformation.

1.7 Conclusion sur les réponses à la carence et l'excès de fer

Le contrôle du fer est primordial. Les plantes supérieures mettent en place des stratégies efficaces, réduction, chélation, séquestration pour l'acquisition et le transport, et une régulation fine des systèmes impliqués dans la gestion du fer (expression de FTs positifs et simultanément de régulateurs négatifs). C'est particulièrement le cas si l'on prend l'exemple d'IRT1, induit en carence de fer avec un pic d'expression à 6 jours mais dès que le milieu est re-supplémenté en fer IRT1 est réprimé en 12h pour éviter l'entrée brutale de fer mais surtout d'autres métaux toxiques comme le manganèse ou le cadmium [137]. Ce contrôle permet à la plante de surmonter les contraintes imposées par l'oxygénation du milieu pour utiliser le fer. Il reste de nombreuses zones d'ombres notamment sur la perception du statut en fer et la physiologie de l'excès de fer. Nous connaissons mieux d'autres modèles aérobies qui sont assujettis aux mêmes contraintes que les plantes supérieures.

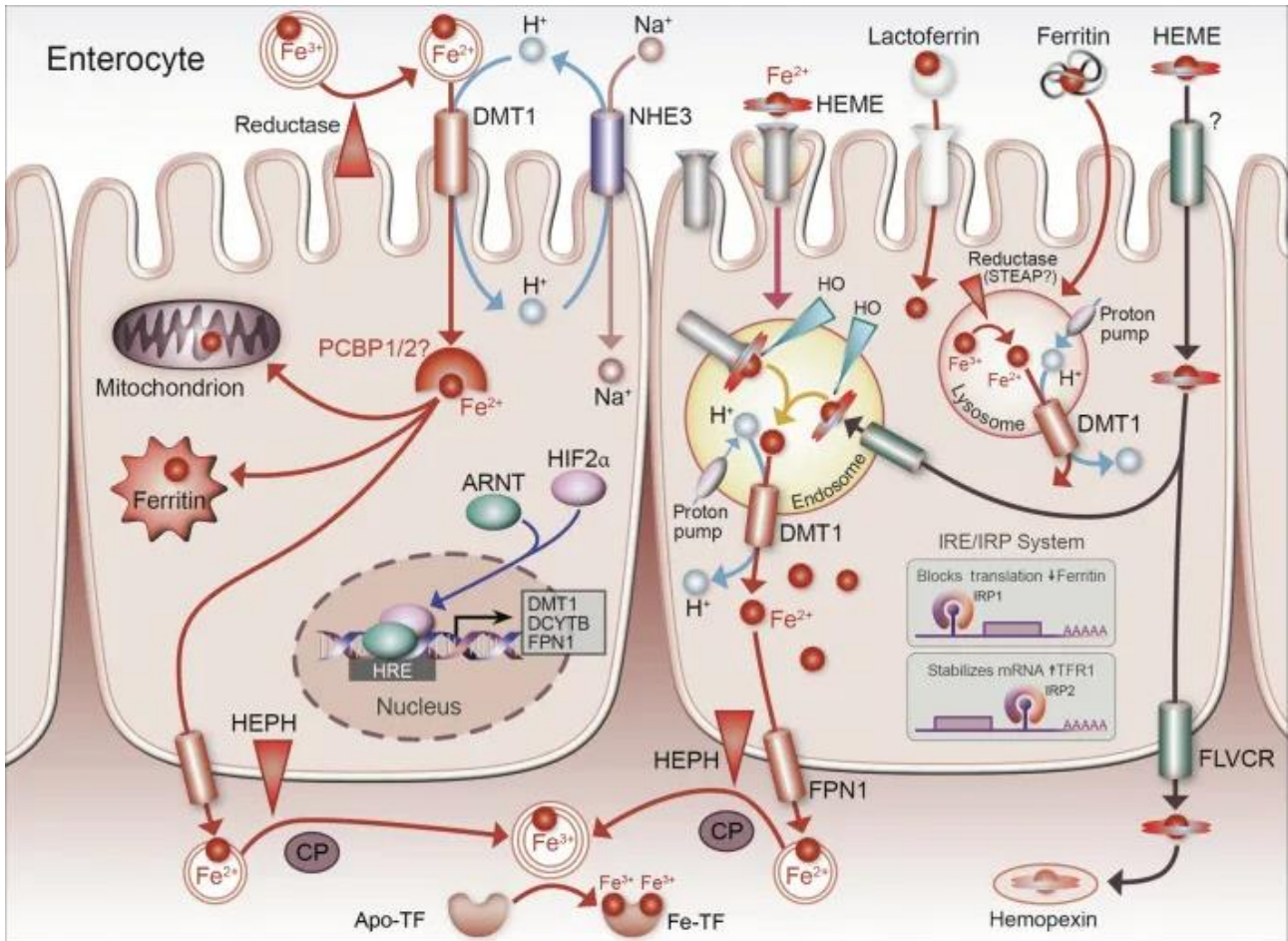


Figure 10. Parcours du fer de l'acquisition au transport chez les mammifères

La cellule de gauche représente l'absorption du fer libre (Fe³⁺), la cellule de droite, l'absorption de fer complexé, ex : fer-hème.

Figure issue du site web abdominalkey : <https://abdominalkey.com/mechanisms-and-regulation-of-intestinal-iron-transport/> Page consultée le 15 août 2021

1.8 Métabolisme du fer chez les modèles aérobies

Les plantes évoluent dans un milieu riche en oxygène. Les contraintes qu'il génère pour l'homéostasie du fer ont sélectionnées chez les végétaux des stratégies de gestion du fer consistant en l'acidification et réduction active et/ou la chélation pour son acquisition puis une chélation quasi-systématique à travers l'organisme, la séquestration, et l'activation des défenses contre les stress oxydants pour se prémunir du Fe^{2+} libre. Les autres organismes vivant dans les milieux aérobies dont l'homéostasie du fer est bien documentée sont l'être humain (et d'autres mammifères, rats, porcs etc...), la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.8.1 L'entérocyte humain

1.8.1.1 Acquisition du fer

L'homéostasie du fer de l'être humain est bien connue, anthropocentrisme faisant loi. Mais l'homéostasie du fer est très conservée chez les mammifères. Le Fe^{3+} arrivant à la surface de l'entérocyte est réduit par une ferriréductase membranaire DCTYB (duodenal cytochrome b) [138] pour mobiliser le fer dans la lumière de l'intestin. DMT1 (divalent metal ion transporter 1), un transporteur de Fe^{2+} fait entrer le fer dans la cellule [139]. Une ferroportine (FPN1 ou IREG1 ou encore MTP1, transportant le Fe^{2+}) transporte ensuite le fer à l'extérieur de l'entérocyte, côté basal [140], et le fer est immédiatement oxydé par une ferroxidase membranaire, l'hephaestine (Hp) [141]. Le fer oxydé est pris en charge par la transferrine (Tf) à travers le flux sanguin [142]. Le complexe Fe^{3+} -Tf est la source de fer non-hème de toutes les autres cellules de l'organisme. Afin de maintenir le fer qui se serait retrouvé libre dans le sang, il existe une protéine proche de l'Hp, qui oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} qui sera repris en charge par la Tf : la céruloplasmine (Cp). La prise en charge du fer à cette interface est totale avec l'Hp, FPN1 et le récepteur à Tf (TfR) qui colocalisent à la membrane baso-latérale de l'entérocyte [143] (Figure 10). La Cp et l'Hp sont des multicopper oxidases ferroxidases. Bien que le fer ferreux puisse s'oxyder spontanément en présence d'oxygène, les besoins en oxydation du fer dans le sang chez les mammifères sont importants (1025 μmoles par jour, soit un turn over de 30 à 40mg bien que l'on absorbe en moyenne 1 à 3mg de fer). L'oxydation spontanée du fer n'est pas suffisante : la céruloplasmine oxyderait environ 11 fois plus de fer par jour que l'oxydation spontanée [144].

1.8.1.2 Régulation chez les vertébrés

Chez les vertébrés, le système IRE/IRPs contrôle l'homéostasie du fer au niveau post-transcriptionnel. Les IREs (Iron-Responsive-Elements) sont des éléments *cis* de 25 à 30 nucléotides reconnues par les IRPs (Iron Regulatory Proteins), IRP1 et IRP2 [145] et formant des structures en « hair-pin ». Les IRPs se lient aux ARNm portant ces IREs hairpins, la position des IRPs détermine l'effet sur la stabilité de l'ARNm. En 5'UTR, les IRPs inhibent la traduction, en 3'UTR, elles stabilisent l'ARNm qui est traduit [146]. Les ARNm d'acteurs déterminants de l'homéostasie du fer possèdent des IREs, tels que les gènes codant pour les sous-unités H et L des ferritines, les récepteurs à la transferrine (TIRs) pour ne citer qu'eux [146]. En présence de fer, les IRPs lient un cluster-fer soufre (4Fe-4S, qui confère une activité aconitase) et ne sont plus actives pour la liaison à l'ARN. En carence, les IRPs perdent ce cluster et changent de conformation pour reconnaître les IREs.

1.8.2 La levure

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été le modèle eucaryote par excellence pour l'étude de l'homéostasie du fer. En carence de fer, elle exprime une ferriréductase et un système de transport de haute affinité. La ferriréductase FRE1 permet la mobilisation du fer oxydé dans le milieu [39] puis le couple FET3/FTR1 le prends en charge. FET3 est une ferroxidase [147] et transmet à FTR1, un transporteur de Fe^{3+} [148], le fer oxydé directement grâce à leur interaction forte ; l'ion n'est pas relargué par FET3 puis récupéré par FTR1 mais bien transmit par un canal entre FET3 et FTR1 [149]. Cette activité de ferroxidation assurée par FET3 est essentielle à l'acquisition du fer en carence, l'interaction forte de FET3 avec FTR1 garantit l'acquisition du Fe^{3+} qui précipite rapidement et forme des oxydes de fer. L'activité de FET3 est essentielle pour l'acquisition du fer chez la levure [150]. Il s'agit d'une MCO à trois domaines (ou 3dMCO) [151]. *Saccharomyces* possède également un système de transport de basse affinité du Fe^{2+} , FET4 [152], [153].

1.8.3 L'algue verte

Un modèle plus proche des plantes supérieures, *Chlamydomonas reinhardtii* possède également une ferriréductase et un système de haute affinité pour acquérir le fer. Fre1 est

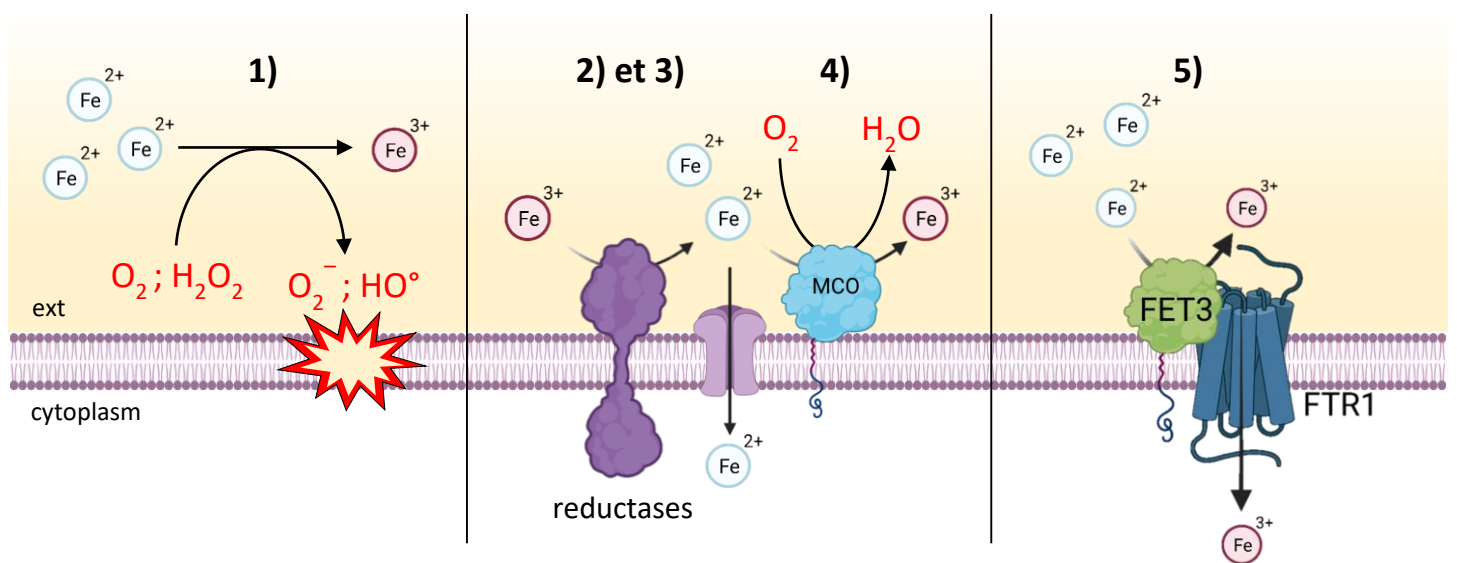


Figure 11. Schéma des trois arguments en faveur d'une fonction de régulateur du flux de Fe^{2+} aux membranes biologiques.

- 1) Le fer en s'oxydant catalyse la génération d'ion super oxyde et de radical hydroxyle en présence d'oxygène et/ou de peroxyde d'hydrogène. Ces ROS peuvent endommager les membranes.
- 2) L'activité de réductases produit du Fe^{2+} et ce flux de Fe^{2+} peut représenter un risque, sachant 1).
- 3) L'activité des réductases est essentielle à l'acquisition du fer et retrouvée chez tous les modèles, même les plantes supérieures (FROs). La forme Fe^{2+} est la forme privilégiée pour traverser les membranes (le Fe^{2+} est plus soluble que le Fe^{3+})
- 4) Les MCOs sont des oxydases terminales, elles oxydent un substrat en réduisant le dioxygène avec $4e^-$ en H_2O , limitant 1) en retirant les deux réactifs, le Fe^{2+} et l' O_2 .
- 5) Il existe des MCOs ferroxidases associées à des transporteurs de fer, systèmes qui réduisent le 1) et le 2) tout en permettant l'acquisition du fer (FET3/FTR1, Hp/FPN1, FOX1/FTR1)

l'homologue de ScFre1 et réduit le fer pour le mobiliser. FOX1 est une ferroxidase, partageant une grande similarité avec l'Hp (et Cp), elle a une conformation en 6dMCO [154]–[156]. FOX1 aurait une fonction similaire à l'Hp et permet l'oxydation du fer avant son transport par un homologue de ScFTR1 chez *C.reinhardtii* co-induit en carence avec FOX1 [157] et dont l'interaction permet également le channelling du fer pour son transport comme le couple FET3/FTR1 chez *Saccharomyces* [154]. Chez ce modèle aussi, l'oxydation du fer joue un rôle important dans l'acquisition du fer.

1.8.4 La ferroxidation est nécessaire

Pour acquérir le fer, les trois modèles aérobies présentés plus haut nécessitent une activité de ferroxidation active. Cette ferroxidation est toujours assurée par une multicopper oxidase (3dMCO ou 6dMCO). Les ferroxidases sont ancrées à la membrane, comme l'Hp, FET3 et FOX1, ou bien sécrétées et libres comme la Cp. Les trois premières sont essentielles pour le transport du fer (efflux ou influx) et la dernière pour le maintien de l'oxydation du fer pour le complexe Fe^{3+} -Tf. Elles auraient été sélectionnées avec l'oxydation globale du milieu et permettent d'éviter la toxicité du Fe^{2+} (généré par l'activité des réductases à des fins de mobilisation chez *Saccharomyces*). Chez le couple FET3/FTR1, l'interaction forte entre la ferroxidase et le transporteur permet le channelling immédiat du Fe^{3+} , susceptible de précipiter en oxyde si de l'oxygène se trouve à proximité. FOX1 a une fonction identique à FET3. Une activité de ferroxidation active du Fe^{2+} en Fe^{3+} est ainsi essentielle à l'homéostasie de ces modèles, au moins à une interface.

1.8.5 La fonction de la ferroxidation dans l'homéostasie du fer

Plusieurs arguments soutiennent la présence d'une MCO ferroxidase dans la gestion du fer

- 1) Le couple $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ à pH neutre réduit le dioxygène (transfert d'un e^-) en ion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle (OH°).
- 2) Les organismes aérobies n'ont pu survivre qu'au prix du développement de système de défenses contre les stress oxydants. Pour exemple le système GSH/GSSG dont le ratio dans le cytoplasme d'une cellule atteint 100:1 pour éviter toute toxicité lié à l'oxygène. Le Fe^{2+} peut générer des ROS ; l'oxyder limite la part du fer dans ces stress oxydants.

- 3) Pour traverser les membranes, le fer est soit sous la forme Fe^{2+} , soit subit une réduction préalable [158], [159] par des ferriréductases (FREs, DCYTB etc...). L'activité de ces réductases est essentielle dans un environnement oxydant pour mobiliser le fer. L'oxydation du fer à cette étape diminuerait le risque lié à sa forme réduite, dans le souci de respecter le 2).
- 4) Les MCOs sont des oxydases terminales, elles oxydent leur substrat en réduisant le dioxygène sans passer par des réductions successives un électron à la fois, générant des ROS. Elles joueraient alors un rôle de régulateur du stress oxydant lié au fer à la surface des cellules.
- 5) Le couple FET3/FTR1 est le résultat de l'adaptation des organismes aérobies pour compenser la génération de Fe^{2+} par FRE1, de plus FTR1 ne transporte que le Fe^{3+} . Chez le couple Hp/FPN, l'Hp colocalise avec FPN mais ne compense pas l'activité d'une éventuelle réductase car FPN est un transporteur d'efflux de Fe^{2+} uniquement. Ici l'Hp oxyde le Fe^{2+} sortant pour le « neutraliser ». De fait Hp/FPN colocalisent avec la transferrine qui se lie au Fe^{3+} et empêche sa diffusion libre pour son transport longue-distance. Le rôle d'une ferroxidase va encore plus loin pour ce modèle où l'absence de ferroxidase à la membrane induit l'internalisation de FPN pour empêcher l'accumulation de Fe^{2+} extracellulaire [160]. Ces deux systèmes (FET3/FTR1 chez *S.cerevisiae* et Hp/FPN chez les mammifères) partageant la même fonction : contrôler le trafic du fer ferreux à la membrane grâce à la ferroxidation.

1.9 Des ferroxidases chez les plantes supérieures ?

1.9.1 Des MCOs ferroxidases connues chez les plantes.

Chez les plantes supérieures, on ne connaît que deux ferroxidases putatives. LACC2.2 chez *Liriodendron tulipifera* et LPR1, LPR2 (Low Phosphate Response 1) chez *Arabidopsis thaliana*. Les trois sont des 3dMCOs. LtLACC2.2, exprimée en tabac et purifiée partiellement, montre une activité ferroxidase *in vitro* mais sa localisation et sa fonction ne sont pas connues ; son rôle dans l'homéostasie du fer supposée n'est soutenu que par son activité *in vitro* et son homologie avec FET3p [161]. AtLPR1,2 sont des protéines sécrétées dans l'apoplaste de la pointe racinaire lors d'une carence en phosphate. Dans le milieu, le phosphate a tendance à complexer le Fe et former des précipités insolubles. Une forte diminution de la concentration

en phosphate provoque localement un excès de fer libre. La racine est capable de percevoir cet excès de fer induit par la carence de phosphate et va inhiber la croissance de la racine primaire. L'oxydation du fer apoplastique par LPR1 limiterait son entrée, le Fe^{3+} formant des oxydes insolubles en présence d'oxygène dans la rhizosphère et participerait à la rigidification de la paroi des cellules de la pointe racinaire via des dépôts de callose [162]. Comme pour LtLACC2.2, l'activité ferroxidase de LPR1 n'a été montrée que *in vitro*. Mis à part ces deux exemples, l'existence et le rôle de ferroxidases chez les plantes supérieures n'a jamais été investigué dans la littérature. Cependant les plantes, à l'instar des autres modèles aérobies, évoluent dans un milieu riche en oxygène, et font face aux mêmes contraintes liées à l'extraction et au transport du fer. Chez ces modèles, la présence d'une ferroxidase MCO est systématique. Pour quelle raison la question d'une ferroxidase impliquée dans l'homéostasie du fer chez les plantes n'a été posée que très récemment ?

1.9.2 L'homéostasie du fer chez les plantes – le paradigme de la carence

L'homéostasie du fer chez les plantes a premièrement été étudiée avec un regard d'agronome dont l'intérêt premier est essentiellement la lutte contre la carence en fer. De fait nous connaissons bien les stratégies d'acquisition du fer en carence et la régulation de leurs acteurs mais assez peu le contrôle fin du statut redox du fer, ou bien encore la régulation d'un potentiel excès de fer. Lors d'une carence en fer, le souci principal est la mobilisation du métal, mobilisation qui nécessite la réduction du fer et/ou la sécrétion de chélateurs. Ainsi une activité d'oxydation, qui ralentirait le flux du fer dans l'organisme, puisque le Fe^{3+} est très peu soluble et forme rapidement des oxydes, irait à l'encontre d'une mobilisation efficace d'après ce que nous connaissons des acteurs de la réponse à la carence. Il faudrait à nouveau réduire/chélater le fer pour le remettre en circulation. Chez les plantes, se pencher sur une activité d'oxydation du fer est *a priori* contre-intuitive dans un souci de mobilisation et de transport du fer : mais pas contradictoire. Le déplacement du fer à travers la plante est dynamique et montre plusieurs situations ou localisations spécifiques dans l'organisme qui seraient compatibles avec une telle activité.

1.9.3 Où chercher des ferroxidases ?

Comme décrit plus haut, la ferroxidation contrôle le trafic du Fe^{2+} à la membrane au moins chez les modèles aérobies eucaryotes. Nous pouvons attendre une fonction similaire chez les

plantes supérieures soumises aux mêmes contraintes vis-à-vis du fer. Si nous reprenons le trajet du fer, depuis son acquisition, jusqu'aux organes puits, nous pouvons proposer des zones où la présence d'une ferroxidase est le plus plausible pour répondre à cette fonction de contrôleur du flux de Fe^{2+} .

1.9.3.1 *Changement de ligand*

Le fer entre dans la cellule racinaire sous la forme de Fe^{2+} libre ou complexé avec un PS (respectivement Stratégie I et Stratégie II). Dans le premier cas, il est complexé avec la nicotianamine (NA) qui a une plus grande affinité pour le Fe^{2+} ; dans les deux cas le fer doit emprunter la voie symplastique jusqu'au xylème. Ici, les ligands principaux sont le citrate et le malate dont l'affinité est plus grande pour le Fe^{3+} : et c'est la forme de fer qui est retrouvé dans le xylème. FRD3 permet le chargement du xylème en citrate mais nous ne connaissons pas le mécanisme par lequel le fer est oxydé pour être lié aux acides organiques [56]. L'oxydation à ce point de changement de ligand pourrait être assurée par une multicopper oxidase. Nous connaissons LAC12 qui est une très bonne candidate [60]. Nous pouvons même imaginer un système similaire au couple Hp/FPN, avec un transporteur de Fe^{2+} chargeant en Fe^{2+} le xylème, et une MCO l'oxydant en Fe^{3+} , pour former les complexes Fe^{3+} -citrate/malate.

1.9.3.2 *Stocker le fer dans la vacuole*

Lors du chargement du fer dans la graine, ou pour éviter un excès de fer, la cellule peut charger la vacuole en fer. Chez Arabidopsis, il existe un transporteur tonoplastique de Fe^{2+} , VIT1. Cependant, dans la vacuole, le fer est stocké sous la forme Fe^{3+} [163]. De la même manière que pour le chargement du xylème, nous pouvons imaginer une MCO agissant à cette localisation pour oxyder le fer.

1.9.3.3 *Les conditions d'excès de fer en général*

N'importe quel type d'excès de fer augmente le risque que du Fe^{2+} se concentre localement. C'est particulièrement le cas lorsque l'intensité lumineuse augmente et que les chloroplastes sont stressés. Le stress oxydant généré par la lumière provoque la libération de fer (le chloroplaste étant l'organite le plus chargé en fer). De plus la lumière peut réduire directement le Fe^{3+} par photoréduction. Lorsque les défenses contre les stress oxydant sont induites, de l'acide ascorbique est sécrété par les cellules et cet acide ascorbique est capable de réduire

Table 1. Les Laccase-like Multicopper Oxidases chez *Arabidopsis thaliana*

Famille enzymatique	Acronyme	Locus	n° Accession Genbank	Function connue ou putative
Laccase	LAC1	At1g18140	AAF78389	
EC 1.10.3.2	LAC2	At2g29130	AC005315	Lignification racine
	LAC3	At2g30210	AC004165	
	LAC4, IRX12	At2g38080	AC003028	Lignification tige
	LAC5	At2g40370	AC007020	
	LAC6	At2g46570	AC006418	
	LAC7	At3g09220	AB005240	Abscission feuille
	LAC8	At5g01040	AED90291	
	LAC9	At5g01050	AED90292	
	LAC10	At5g01190	AAT41838	
	LAC11	At5g03260	AB005240	Lignification tige et racine
	LAC12	At5g05390	AB010692	
	LAC13	At5g07130	AL163652	
	LAC14	At5g09360	AL391712	
	LAC15, TT10	At5g48100	AB017064	Brunissement graine
	LAC16	At5g58910	AB016885	
	LAC17	At5g60020	AB015475	Lignification tige
Ascorbate Oxidases	MCO1	At4g39830	AAU95421	
EC 1.10.3.3	MCO2, AAO	At5g21100	AED92931	Tolérance stress salin
	MCO3	At5g21105	AED92932	

directement le fer [25], risquant d'ajouter à la part de stress oxydant lié au fer [164]. Le Fe^{2+} peut représenter un risque à la surface des cellules et une MCO remplirait parfaitement le rôle de régulateur de ce flux en oxydant ce fer et à la fois en réduisant l' O_2 en eau, diminuant encore le risque du stress oxydant lié à la présence de ce métal. Une accumulation de Fe^{3+} dans l'apoplaste serait une autre manière de limiter l'entrée du fer dans les cellules du mésophylle.

1.9.4 Les Multicoppers oxidases chez *Arabidopsis thaliana*.

Chez les plantes supérieures, les homéostasies du fer les plus décrites sont celles du riz, du maïs et bien sûr d'*Arabidopsis*. Tant au niveau de l'acquisition (Stratégies I et II), du transport (avec les familles de transporteurs Yellow Stripe et Yellow Stripe-like), des régulations transcriptionnelles etc... L'homéostasie du fer d'*Arabidopsis* est la mieux décrite de ces modèles pour tous les niveaux cités plus haut. De fait, elle est le modèle qui représente une excellente option pour déterminer la présence, et caractériser la fonction, de MCOs candidates pour une activité ferroxidase. De plus *Arabidopsis* possède un petit « arsenal » de MCOs très peu voire pas du tout caractérisées (**Table 1**). La conservation forte des sites de liaison du cuivre, ces motifs riches en résidus histidine caractéristiques et définissant la famille des MCOs, a influencé la classification de tous ses membres dans les groupes enzymatiques des laccases EC 1.10.3.2 (les premières activités caractérisées chez les MCOs), et les ascorbates oxidases EC 1.10.3.3. Dans la littérature, beaucoup de laccases sont placées dans un groupe bâtard par manque d'indice quant à leur activité : les laccase-like multicopper oxidases (LMCOs). Ainsi *Arabidopsis* possède au moins 20 laccase-like MCOs, dont 17 laccases et 3 ascorbate oxidases putatives. Parmi ces laccases, LAC15 ou TT10 est impliquée dans le brunissement de la graine [23]. LAC4 (IRX12) et LAC17 joueraient un rôle dans la synthèse de la paroi secondaire dans la tige [22], [165]. LAC11 participerait également au dépôt de la lignine dans la tige et même dans la racine, notamment chez le triple mutant *lac4,11,17*. LAC2 régulerait la lignification de la racine pendant un déficit en phosphate ou en eau [166]. LAC7 et LAC15 pourraient être impliquées dans l'abscission des feuilles, leur gène étant exprimés précisément dans la zone d'abscission ; cependant depuis 2018 aucune nouvelle donnée fonctionnelle n'indique leur très probable rôle dans la lignification des cellules de cette zone [167].

Chez ces laccase-like d'*Arabidopsis* se trouvent un petit groupe annoté en tant que L-ascorbate oxidase. Une seule étude présente un possible lien entre une AAO putative (At5g21100) et la tolérance à un stress salin, le mutant étant plus tolérant. Mais la même étude

conclue par le manque de données pour affirmer une quelconque fonction précise de cette ascorbate oxidase putative [29].

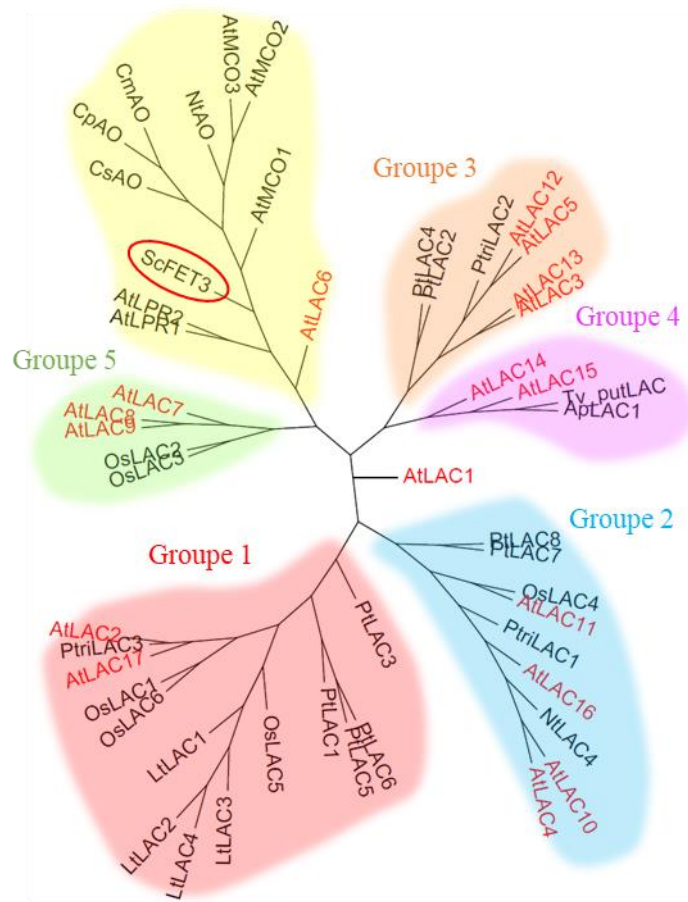


Figure 12 . Arbre phylogénétique – Laccases et Laccase-likes MCOs de plantes supérieures

L'arbre a été produit avec le programme Seaview (alignement clustal puis arbre construit avec la méthode du maximum de parsimonie avec 100 bootstrap). Voir N° accession en **Annexe**. Les groupes de laccases représentés correspondent à ceux de l'arbre phylogénétique d'après McCaig *et al* 2005 (neighbor-joining unrooted method). Le cercle rouge indique la position de FET3 de la levure. Le Groupe jaune regroupe les AtMCOs et des ascorbates oxydases connues. Les laccases d'*Arabidopsis* sont écrites en rouge. Ap, *Acer pseudoplatanus*; At, *Arabidopsis thaliana*; Lt, *Liriodendron tulipifera*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Ps, *Pisum sativum*; Pt, *Pinus taeda*; Ptri, *Populus trichocarpa*; Cm, *Cucurbita maxima*; Cp, *Cucurbita pepo*; Cs, *Cucurbita sativa*.

1.10 Une sous famille de Laccase-like MCOs – Données préliminaires

1.10.1 Trois MCOs proches de FET3

1.10.1.1 *Similarité des AtMCOs et des laccases*

Parmi toutes les Multicopper oxydases d'*A.thaliana*, trois protéines partagent une identité de plus de 26% avec FET3. Ces protéines se distinguent légèrement de la famille des 20 laccases annotées chez *Arabidopsis* et sont annotées comme L-ascorbate oxydase. Leur proximité avec les ascorbates oxydase est certaine. Ce type de MCO est principalement connu chez les plantes mais ces trois AtMCOs sont plus proche de FET3 que 16 laccases d'*Arabidopsis* qui forment 5 groupes distincts d'après Turlapati *et al* 2011 [168] (Voir l'arbre phylogénétique ci-après, **Figure 12**). Elles partagent plus de 26% d'identité avec FET3, comme la plupart des Laccases (31,1% pour MCO1, 27,5% pour MCO2 et 29,6% pour MCO3), MCO1 et MCO3 sont les deux protéines avec le plus haut pourcentage d'identité avec FET3 parmi les AtMCOs et parmi le set de laccases et d'ascorbate oxydases utilisées pour la **Figure 12** et l'étude de Turlapati *et al* 2011. MCO2 et MCO3 sont plus proches entre elles qu'avec MCO1 (MCO2-MCO3 : 71% et MCO2/MCO3 – MCO1 : 45 – 48%). Elles forment un petit groupe avec FET3 et les ascorbates oxydases mais reste légèrement isolées de ces dernières. Trois des ascorbate oxydases choisies viennent d'organismes proches (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo* et *Cucurbita sativa*), la dernière du tabac.

1.10.1.2 *Les AtMCOs sont proches de FET3 et des Ascorbates oxydases*

Dans l'étude de McCaig *et al* 2005 [169] qui montre la similarité des laccases, les auteurs concluent que les laccases sont largement dispersées chez les plantes supérieures avec de nombreuses duplications (les organismes sélectionnés sont *A. pseudoplatanus*, *A. thaliana*, *N. tabacum*, *P. taeda*, *P. trichocarpa*, *R. vernicifera* et *O. sativa*.). Il existe de nombreuses laccases chez les bactéries, les levures et les champignons suggérant une apparition ancienne de cette famille. Le maintien d'anciennes et de récentes duplications des gènes de laccases indiqueraient une force de sélection importante et une autre favorisant la diversification. Toujours d'après cette étude, les laccases ont ainsi potentiellement d'autres rôles que la polymérisation de la lignine chez les plantes supérieures. Ils observent 5 groupes distincts avec un outlier (AtLAC1) qui forme son propre groupe. Afin de mieux comprendre les connections qu'il peut y avoir entre les laccases, les ascorbates oxydases et les trois AtMCOs, nous avons récupéré les

séquences protéiques des accessions utilisées dans l'étude de McCaig *et al* 2005, auxquelles nous avons ajouté les séquences des LPR1 et 2 d'Arabidopsis, des ascorbates oxydases caractérisées chez certaines cucurbitacées et le tabac, ainsi que les séquences des AtMCOs et de FET3 de la levure. Nous avons généré un arbre phylogénétique suivant la méthode du maximum de parcimonie (avec 100 bootstrap) grâce au logiciel SeaView [170]. Avant de créer l'arbre, les séquences ont été alignées par le programme clustal omega avec SeaView. Nous retrouvons bien cinq groupes de laccases distincts correspondant à ceux de McCaig *et al* 2005. Les 17 laccases d'Arabidopsis utilisées se répartissent à travers tous les groupes. Nous observons un groupe supplémentaire qui rassemble les ascorbates oxydases, les LPR1 et 2, FET3 ainsi que les trois AtMCOs. Nous retrouvons bien MCO1 séparée de MCO2 et 3, plus proche de FET3. LPR1 qui présente une activité ferroxidase est également proche de la ferroxidase de Saccharomyces, ainsi que LAC6, une autre ascorbate oxydase ou ferroxidase potentielle ? Malgré la distance entre la levure et les plantes, il est notable que FET3 se retrouve proche des AOs et nettement séparé des autres laccases.

1.10.1.3 Loci des AtMCOs

Les gènes codant pour ces AtMCOs se trouvent à des positions différentes dans le génome d'Arabidopsis. Le premier de ces gènes, *MCO1* (At4g39830) se trouve sur le chromosome 4, *MCO2* et *MCO3* en tandem sur le chromosome 5 (respectivement At5g21100 et At5g21105). Ces deux derniers sont probablement le résultat d'une duplication plus récente. *MCO3* est plus exprimés que *MCO2* en valeur absolue quand interrogées avec leur AGI sur le site Arabidopsis eFP-Browser [171]. De fait, avec *MCO1* qui est plus induite dans la racine, et *MCO3* principalement foliaire, *MCO1* et *MCO3* ont focalisé l'attention de l'équipe.

1.10.1.4 Le domaine d'expression des AtMCOs

Marija Smokvarska, lors de son stage de Master, a déterminé le domaine d'expression des *AtMCOs*, avec une construction gène rapporteur GUS sous le contrôle des promoteurs des *AtMCOs*. La **Figure 13** montre le domaine d'expression de ces gènes en fonction de la concentration en fer. En absence de fer, *MCO1* serait réprimé. *MCO3* ne l'est pas. En augmentant la concentration en fer, d'abord à 50µM, *MCO1* serait induit dans les cotylédons, *MCO3* également. A 250µM de Fe, une condition d'excès de fer, *MCO1* est induit le long de la racine primaire et à l'apex, ainsi que dans les cotylédons où la coloration GUS s'intensifie. Du côté de *MCO3*, il serait induit encore plus dans les cotylédons à 250µM de Fe (**Figure 13 A**).

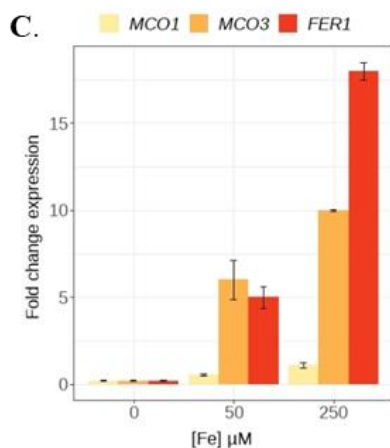
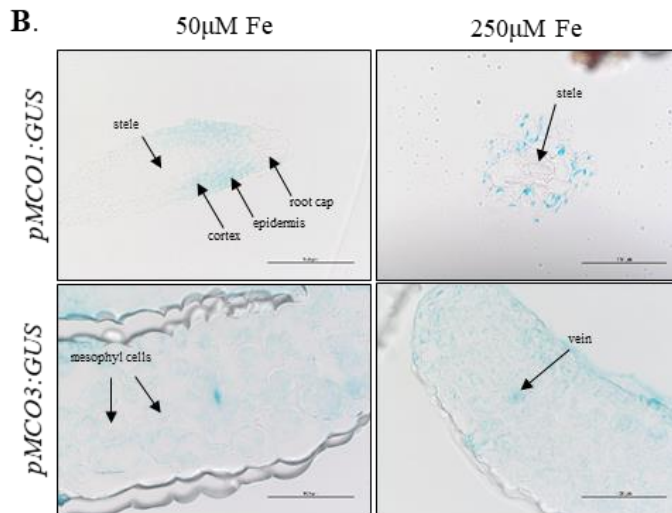
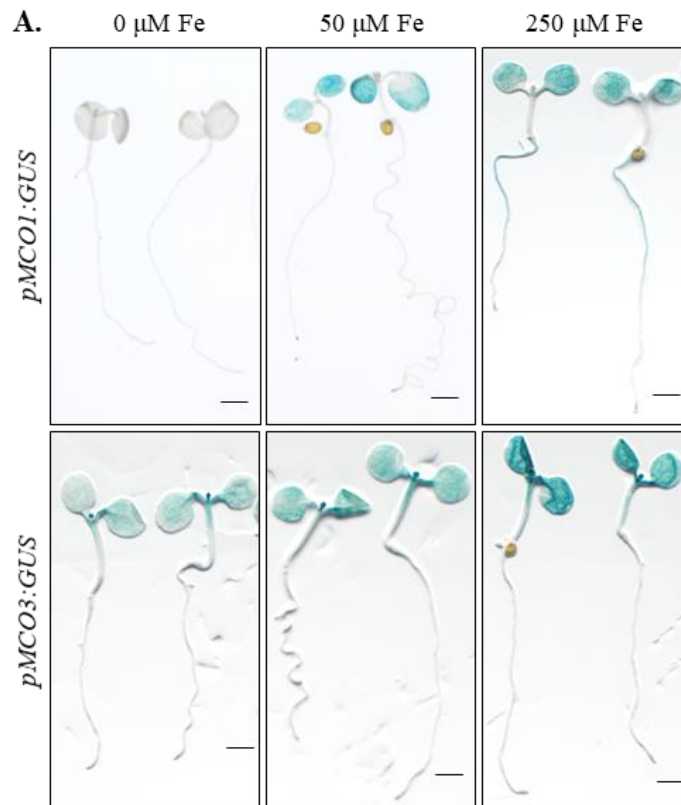


Figure 13. Expression domain of *MCO1* and *MCO3* depending on iron condition.

- A. Histochemical staining of GUS activity in Arabidopsis transformed with *proMCO1:GUS* and *proMCO3:GUS* in 50 μM BPDS (0 μM Fe), 50 μM Fe and 250 μM Fe.
- B. Cross sections of roots in *ProMCO1:GUS* and cotyledons in *proMCO3:GUS* lines growing in 2 different conditions. Data are from one representative experiment ($n < 10$). Scale bars indicate 2mm (A) and 100 μm (B). Arrows in (A) point to stained root tips.
- C. Fold change of relative expression to *ACT2* of *MCO1*, *MCO3* and *FER1* in iron excess

Sur des coupes histologiques de racine et de cotylédons, la coloration GUS indique que *MCO1* serait exprimé plus spécifiquement au niveau du cortex de la racine et *MCO3* de façon plus homogène à travers les cotylédons, avec une intensité plus importante autour des vaisseaux (**Figure 13 B**). *MCO1* et *MCO3* sont induits transcriptionnellement avec l'excès de fer, comme *FER1* un gène codant pour les ferritines et répondant aussi à l'excès de fer (**Figure 13 C**).

1.10.2 Récapitulatif des AtMCOs et objectifs de la thèse

Il existe donc des Multicopper oxydases, proches des ascorbates oxydases et de FET3, la ferroxidase modèle. Elles se distinguent de par leur séquence protéique des autres laccases. *MCO1* est exprimé dans la feuille et la racine (cortex), *MCO3* est exprimé dans les feuilles, de façon homogène dans tout le tissu foliaire. Au moins deux des gènes des AtMCOs sont induits en excès de fer. Chez *Arabidopsis*, nous connaissons LPR1 qui présente une activité ferroxidase *in vitro*. LPR1 et LPR2 sont induites en carence en phosphate et sont incluses dans le groupe AO-FET3, séparé des laccases. Les AtMCOs sont d'autres candidates pour une activité ferroxidase impliquées dans l'homéostasie du fer.

Les objectifs de la thèse s'articulent autour de trois approches, 1) Une approche biochimique avec la complémentation du mutant *fet3fet4* de levure et la mesure d'activité ferroxidase de *MCO3*. La complémentation de ce mutant en carence de fer serait un fort argument en faveur d'une activité ferroxidase. La consommation en O₂ en présence de Fe²⁺ serait la preuve directe d'une telle activité. 2) La localisation subcellulaire de *MCO3* et *MCO1* chez *Nicotiana tabacum* par microscopie confocale. 3) Le phénotypage des simples mutants et du triple mutant *mco1,2,3* pour mesurer leur statut global en fer, par dosage par spectrométrie d'émission de plasma, coloration Perls/DAB sur rosettes et sur coupes histologiques, évaluation du statut redox de *mco1,2,3* (coloration NBT), ainsi que l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques du Fe²⁺ et du Fe³⁺.

2 RESULTATS

2.1 Une ferroxidase parmi les AtMCOs

2.1.1 Complémentation du mutant *fet3fet4*

2.1.1.1 Un mutant pour étudier le transport du fer et l'activité des ferroxidases

FET3 est la mieux décrite des ferroxidases. Elle permet l'oxydation du fer pour son transport par FTR1 avec laquelle elle interagit fortement et dont l'absence maintient la forme apoprotéique de FET3 [147], [148]. L'interaction étroite est nécessaire pour l'acquisition du Fe^{3+} qui précipite rapidement en oxyde de fer, l'ion est transféré à FTR1 dès son oxydation [149]. Il existe un transporteur de Fe^{2+} de faible affinité chez *Saccharomyces* : FET4 dont l'expression est induite également en carence mais plutôt en anaérobiose [153], [172]. Le double mutant *fet3/fet4* ne peut pas survivre en carence de fer, faisant de lui un bon outil pour étudier les transports putatifs du fer. Chez *Arabidopsis*, IRT1, et IRT2, deux transporteurs de haute affinité du Fe^{2+} [173], [174], les transporteurs de fer au tonoplaste NRAMP3 et NRAMP4 [175], certains transporteurs YSLs [62], [64], [176] complètent le mutant *fet3/fet4*. Parmi les ferroxidases connues, l'héphaestine est capable de compléter *fet3/fet4* [177]. FET3 est une ferroxidase et non un transporteur de fer mais sa présence est essentielle à celui-ci. Ce mutant est un bon outil pour interroger une possible activité ferroxidase chez les AtMCOs.

2.1.1.2 MCO3 est-elle une ferroxidase ?

Des trois AtMCOs, MCO3 est la plus induite pendant un excès de fer (**Figure 14 D**). Pour tester sa capacité à compléter *fet3/fet4*, de premiers essais ont été effectués avec un vecteur multi-copie (pDR195) en 2019 par Marija Smokvarska alors en deuxième année de master. Que ce soit en tests goutte ou bien par cinétique de croissance en présence de BPDS (Bathophenanthroline disulfonic acid) un chélateur fort du fer, MCO3 ne complétait pas *fet3fet4*. Pour éviter tout effet de toxicité ou de contre sélection chez la levure nous nous sommes orientés vers un vecteur intégratif. L'intérêt étant de limiter à une seule copie du cDNA de MCO3 insérée dans le génome de la levure sous le promoteur fort constitutif de la GAP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Le mutant *fet3/fet4* a été transformé par Lithium/Acétate après linéarisation

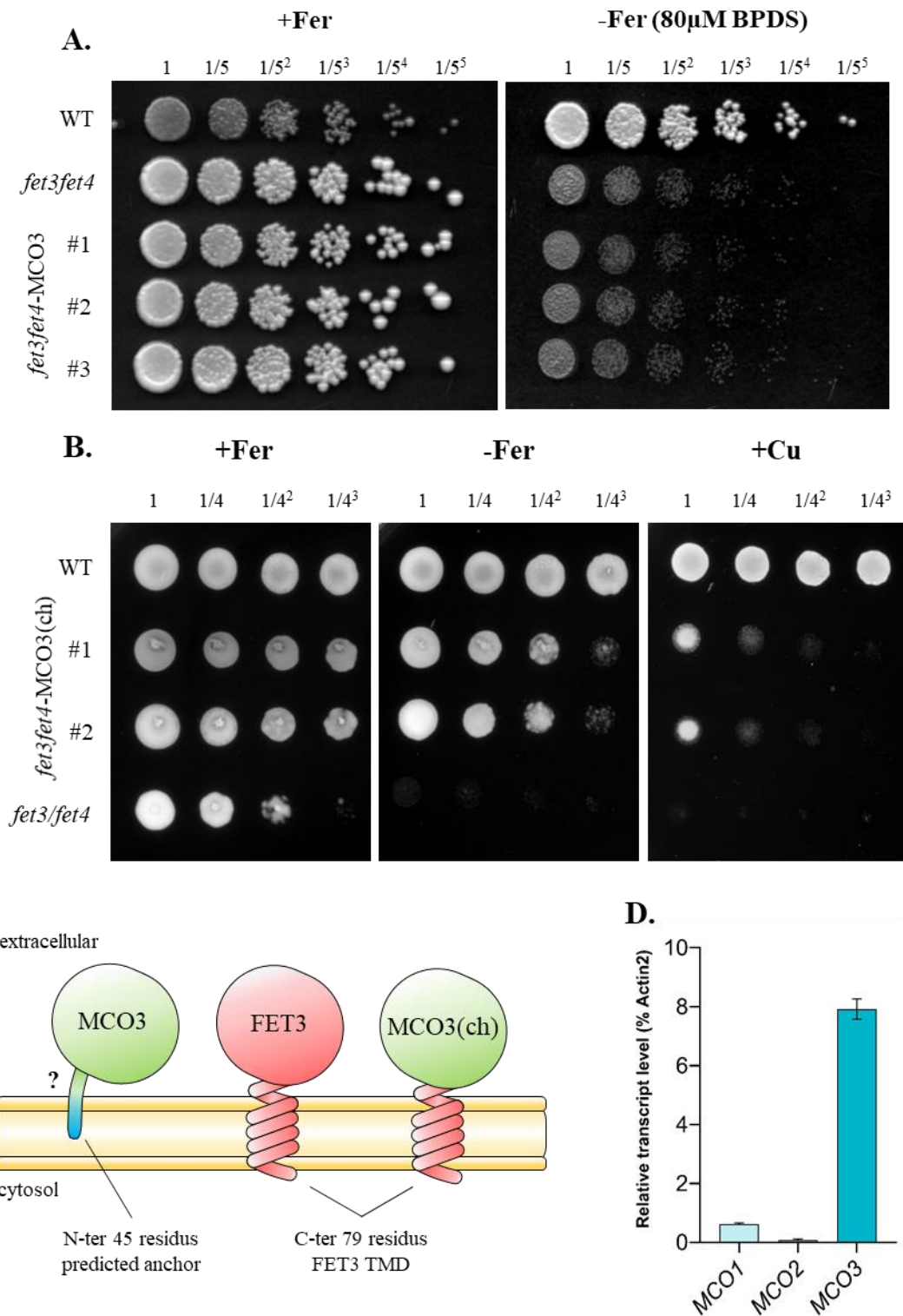


Figure 14. Mesure de la consommation en dioxygène en présence de Fe²⁺.

A. Complémentation de *fet3fet4* par MCO3. *Saccharomyces cerevisiae* sauvage (WT) comme contrôle positif. #1-#2-#3 : trois clones recombinants indépendants (pDR195 vecteur multicopie). +Fer : YPD + 2% glucose, -Fe : YPD + 2% glucose + 80µM de BPDS. Photos après 5 jours d'incubation 30°C.

B. Complémentation de *fet3fet4* par la MCO3 chimérique possédant le domaine d'ancrage de FET3 (MCO3(ch)). *Saccharomyces cerevisiae* sauvage (WT) comme contrôle positif. #1-#2 : deux clones recombinants indépendants (pAG306 vecteur intégratif). +Fer : YNB + 2% glucose, +2µg/mL uracile +200µM FeCl₃ ; -Fe : YNB + 2% glucose, +2µg/mL uracile +5µM FeCl₃ ; +Cu : YNB + 2% glucose, +2µg/mL uracile +200µM FeCl₃ + 800µM CuSO₄. Photos après 3 jours d'incubation.

C. Schéma de la modification de MCO3 en chimère MCO3-domaine transmembranaire FET3 (MCO3(ch))

D. Expression relative (% *ACT2*) des *AtMCOs* en condition standard de fer (50µM Fe-EDTA), plantes entières 7 jrs.

du vecteur recombinant dans la séquence du gène URA pour insérer par recombinaison le vecteur dans le génome de *fet3fet4*. Plusieurs clones positifs indépendants ont été sélectionnés sur un milieu – URA, et cultivés pour des tests gouttes en carence de fer. Les gouttes (7µL) des précultures calibrés sont déposées sur du YPD contenant ou non 80µM de BPDS pour carencer le milieu d'après Askwith *et al* 1994 [150]. Les photos des boîtes prises après 5 jours d'incubation à 30°C (**Figure 14 A**). En condition de fer normale, toutes les lignées poussent correctement, y compris le mutant *fet3fet4*. En carence de fer (YPD + 80µM de BPDS), *fet3fet4* se développe très lentement, par comparaison au sauvage et les clones exprimant MCO3 ne se développent pas mieux.

L'interaction entre FET3 et le transporteur FTR1 est très étroite. Le doute que le fer potentiellement oxydé par MCO3 ne se retrouve pas assez proche de FTR1 pour qu'il l'acquière reste présent. L'intérêt d'utiliser un vecteur multi-copie pour exprimer un transporteur hétérologue chez *fet3fet4* est que bien que l'adressage chez l'organisme d'origine peut être différent (ex : les transporteurs NRAMP3 et 4 qui sont adressés au tonoplaste), la sur-sollicitation des mécanismes de traduction permet un certain degré d'erreur d'adressage à la membrane plasmique. Pour preuve la complémentation de *fet3fet4* par les NRAMPs qui est significative mais pas non plus très efficace (voir [175]). Dans ces premiers essais, nous exprimons une protéine (avec une seule insertion du vecteur) pour observer si son expression hétérologue sauve le phénotype de carence d'un mutant qui est très sensible à la carence en fer ; et dont l'activité du transporteur de haute affinité de Fe³⁺ nécessite une oxydation proche de lui. Pour être certain de ne pas passer à côté d'une complémentation possible chez ce mutant du fait de la distance entre le lieu de l'oxydation et le site de l'acquisition, nous avons optimisé le domaine catalytique MCO de MCO3 pour favoriser un ancrage à la membrane plasmique. La séquence du cDNA de MCO3 a été modifiée pour coder une MCO3 chimérique possédant le domaine d'ancrage à la membrane plasmique de FET3. De plus, dans la séquence de MCO3, ce trouve un peptide signal prédit *in silico*. Pour limiter la sécrétion possible de MCO3 dans le milieu par la levure, nous avons retiré la séquence prédite comme peptide signal.

Ainsi, malgré le moindre nombre de copies à cause du vecteur intégratif (comparé aux vecteurs multi-copie), ce domaine devrait favoriser le maintien de celle-ci le plus proche possible de FTR1, au niveau de la membrane plasmique. Ce domaine est placé à l'extrémité C-ter de MCO3, comme pour FET3. La synthèse du cDNA codant pour

cette MCO3 chimérique a été commandée chez la société Twist Bioscience[®] qui a fourni ce dernier dans un vecteur compatible Gateway. Nous avons cloné ensuite ce cDNA dans un vecteur pAG306 (intégratif). De plus, pour augmenter nos chances de compléter *fet3fet4*, le pH du milieu est tamponné à 5,5 avec 50mM de MES, pH optimal pour l'activité des ferroxidases de la famille de FET3 [178]. Enfin, pour éliminer la compétition entre le BPDS (qui est un chélateur fort du Fe²⁺) et la ferroxidase putative, nous avons utilisé un milieu minimum YNB dont on contrôle la concentration en fer plutôt qu'un milieu riche comme le YPD. Nous utilisons le FeCl₃ comme source de fer. Un autre test goutte est mis en place avec des dépôts de 5µL.

Après 3 jours d'incubation à 30°C, en condition +Fer (200µM de FeCl₃), toutes les lignées se développent normalement, *fet3fet4* un peu moins (**Figure 14 B**). En carence de fer (5µM de FeCl₃), le sauvage se développe bien mais *fet3fet4* ne se développe plus, la carence est trop forte. Les clones de *fet3fet4* exprimant la MCO3 chimérique se développent bien mieux que *fet3fet4*, un peu moins que le sauvage mais la différence entre le contrôle négatif et les clones recombinants est largement significative. La MCO3 chimérique améliore grandement la survie de *fet3fet4* en carence de fer et complète son phénotype. L'amélioration est visible dès 24h d'incubation et *fet3fet4* ne se développe pas du tout même après 6 jours d'incubation. Ce résultat a été répété dans trois expériences indépendantes avec deux répliqués par expérience.

2.1.1.3 MCO3 peut-elle oxyder du cuivre comme FET3 ?

FET3 est aussi impliquée dans la régulation du statut redox du cuivre. Elle est capable d'oxyder du cuivre lors d'un excès. Le mutant *fet3* ne survit pas en excès de cuivre même en présence de fer [179], [180]. La forme Cu⁺ est beaucoup plus réactive que le fer et sa durée de vie dans un milieu aérobie plus courte [181]. La sensibilité de *S. cerevisiae* au cuivre est principalement due à l'activité de ferroxidases membranaires, telles que FRE1, essentielles à la mobilisation du fer mais leur activité peut générer du Cu⁺ bien plus réactif que le Fe²⁺. En présence de fer, le Fe³⁺ et le Cu²⁺ sont en compétition pour FRE1, cependant à concentration équivalentes, la réactivité du Fe³⁺ est ~70% plus grande que le Cu²⁺ [182], limitant la réduction du cuivre par FRE1 (*fet3fre1*) [179]. En absence de FET3, la levure est très sensible à l'excès de cuivre, faisant de cette métal-oxydase une composante importante de l'évitement de l'excès de cuivre, limitant la réduction par FRE1 [179]. MCO3 pourrait éventuellement oxyder du cuivre comme FET3. Pour déterminer si MCO3 en est capable, nous avons testé les clones *fet3fet4* exprimant la MCO3 chimérique en

test goutte en excès de cuivre et en présence de fer (**Figure 14 B**). Après trois jours de culture, en présence de 800µM de cuivre dans le milieu (et 200µM de fer), *fet3fet4* ne se développe pas du tout dès la première dilution. Le sauvage (WT) se développe sans aucun problème. Les clones *fet3fet4*-MCO3(ch) supportent l'excès de cuivre que *fet3fet4* mais se développe moins que le sauvage. La complémentation en excès de cuivre est moins spectaculaire que pour la carence en fer. Cependant elle reste significative, suggérant une activité plus orientée métal-oxydase que strictement ferroxidase, similaire à FET3.

2.1.2 Activité ferroxidase

2.1.2.1 Le dioxygène, un autre moyen d'étudier l'activité de MCO3

La complémentation de *fet3fet4* est un argument fort en faveur d'une activité ferroxidase pour MCO3. Nous avons décidé d'analyser plus en profondeur l'activité enzymatique de MCO3. Le suivi de la consommation en Fe²⁺ ou d'apparition de Fe³⁺ dans une réaction enzymatique exige de prendre des précautions, en effet le fer change facilement d'état de transition en présence d'oxygène. Le fer est oxydé par le peroxyde d'hydrogène ou réduit par les ions super-oxydes ou la lumière [183]. Cependant, une des spécificités de la réaction catalysée par les MCO est d'utiliser le dioxygène (co-substrat) comme accepteur final d'électrons. Nous pouvons alors suivre non pas la disparition du Fe²⁺, ou l'apparition du Fe³⁺, sujets tous deux à des changements de forme rapides mais plutôt la consommation du dioxygène. Ce substrat est bien plus simple à mesurer, directement avec une électrode de Clark, la seule contrainte est de mesurer dans un environnement fermé pour éviter les échanges de dioxygène qui biaiseraient les mesures. L'activité ferroxidase de FET3 a ainsi été mesurée en suivant sa consommation en dioxygène en 1995 [147] en utilisant un mutant *fet3* exprimant FET3 de façon inductible et en mesurant la variation en temps réel de la concentration en dioxygène, après injection de FeSO₄ dans le milieu.

Dans un premier temps, nous souhaitons analyser l'activité de MCO3 à partir d'extrait de protéines produites et purifiées avec *Pichia pastoris*. Ce système d'expression a plusieurs avantages : il permet la glycosylation de la protéine recombinante solubles (toutes les MCOs sont grandement glycosylés) et l'optimisation de sa production/purification grâce à un vecteur inductible possédant un peptide signal afin de produire beaucoup en peu de temps et dans le surnageant de culture. La production d'une protéine potentiellement membranaire chez *E.coli*

risquait d'absorber beaucoup de temps et de ressources, d'où notre choix de ce système de production. Malgré ces précautions, la production de MCO3 ne fonctionnant pas après plusieurs tentatives, nous avons modifié notre approche en utilisant non pas un extrait de MCO3 plus ou moins purifié mais les des cellules entières du mutant de levure *fet3fet4* exprimant la MCO3 chimérique.

2.1.2.2 L'activité ferroxidase de MCO3

Pour étudier l'activité ferroxidase de MCO3, nous avons une approche qui imite les conditions de l'étude de Da Silva *et al* 1995 pour l'activité de FET3 [147]. Pour mesurer la consommation en dioxygène, nous avons à disposition des oxygraphes de la société Oroboros Instruments[®] et nous avons bénéficié de l'expertise technique et théorique de l'équipe DMEM (Dynamique Du Muscle et Métabolisme), propriétaire des oxygraphes. Ces machines possèdent deux chambres de 2mL, empêchant les échanges gazeux et dans lesquelles il est possible d'injecter de petits volumes. La température des chambres est contrôlée, et la concentration en O₂ (μM) mesurée par des électrodes de Clark : ainsi qu'un autre paramètre, le « flux » d'O₂, calculé à partir des variations de pente de la concentration en O₂ en temps réel. Les chambres étant isolées, ce flux mesuré correspond à la disparition d'O₂ dans la chambre, il est mesuré en pmol.s⁻¹.mL⁻¹.

Contrairement à cette étude de De Silva *et al*, les clones *fet3fet4* exprimant MCO3 ne sont pas inductibles, il s'agit de lignées stables exprimant constitutivement la MCO. Le domaine FET3 de la MCO3 chimérique devrait maintenir la protéine à la membrane plasmique, nous devrions pouvoir mesurer une consommation en dioxygène, lié à l'activité de MCO3 La variation de la concentration en temps réel dans cet équipement est suivie par des électrodes de Clark, avec un système d'agitation et de maintien de la température (ici 30°C). Afin de cibler l'activité des oxydases à la surface de la cellule de levure, nous avons utilisé un inhibiteur de la respiration mitochondriale : l'antimycine (Cette molécule inhibe le complexe IV de la chaîne respiratoire, ne laissant active que les oxydases membranaires et élimine la consommation liée à la respiration de la levure. La présence de glucose à 4% permet d'inhiber la respiration en favorisant la fermentation de la levure (Contre-effet Pasteur) [184].

Les lignées sauvages et MCO3(ch) sont cultivées dans des conditions de carence de fer pour induire FTR1, *fet3fet4* ne supportant pas la carence de fer est lui cultivé dans un milieu riche

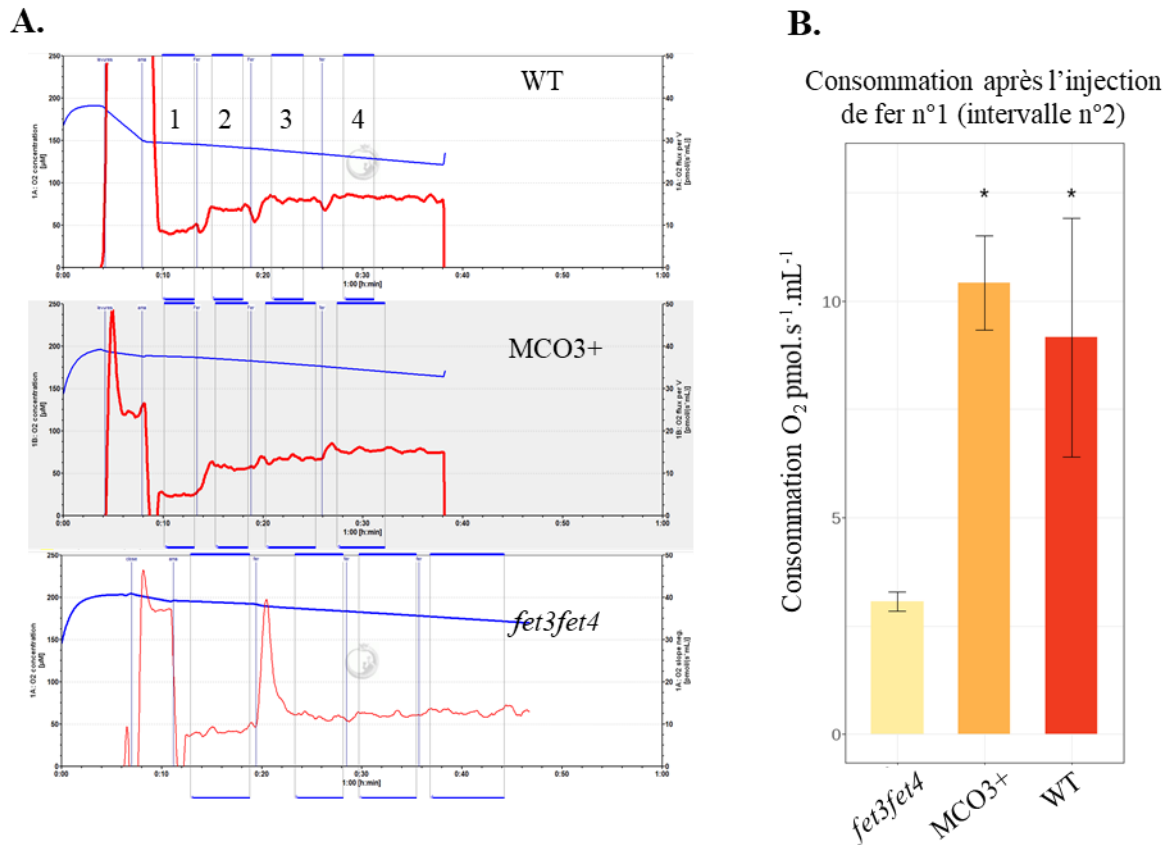


Figure 15. Mesure de la consommation en dioxygène en présence de Fe^{2+} .

A. Profil des mesures de la consommation en temps réel

En rouge le flux de dioxygène correspondant à la consommation dans la chambre ($pmol.s^{-1}.mL^{-1}$). En bleu la concentration en dioxygène (μM). Les intervalles sont ceux utilisés pour mesurer la moyenne de la consommation. 1. Plateau de consommation après injection d'antimycine. 2. Première injection de fer. 3. Deuxième injection de fer. 4. Troisième injection de fer.

B. Représentation des moyennes sur 5min d'acquisition en temps réel après injection d'antimycine puis de $FeSO_4$ ($100\mu M$ final en chambre). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur 3 mesures indépendante de trois cultures indépendantes. Les astérisques * représentent une différence significative par rapport au contrôle négatif *fet3fet4*. ($n=3$ cultures indépendantes, test anova et test post-hoc tukeyHSD $p.value < 0,05$) (\pm écart-type).

Table 2. Comparaison des données de De Silva *et al* 1995

	Consommation en O2	
	De Silva <i>et al</i> 1995	données MCO3+
Ferroxydase + (ou induit)	0,87	10,4
Ferroxydase - (ou non induit)	0,23	3,06
unité	$\mu M/min$	$pmol/s/mL$
	Valeurs converties	
Ferroxydase + (ou induit)	5,22	5
Ferroxydase - (ou non induit)	1,38	1,47
unité	$\mu mol/min$	$\mu mol/min$
paramètres	De Silva <i>et al</i> 1995	MCO3+
Volume chambre	3 mL	2 mL
Nombre de cellules	$5,0.10^8$	$2,5.10^8$
température	temp. ambiante	30°C

D. M. De Silva, C. C. Askwith, D. Eide, and J. Kaplan, "The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 3. pp. 1098–1101, 1995.

(respectivement du YPD + glucose + BPDS et YPD + glucose sans BPDS). Les cultures sont calibrées pour une DO_{600nm} de 0,5 et le milieu remplacé par du tampon sodium acétate 100mM à pH 5,5 contenant 4% de glucose. Chaque évènement dans la chambre nécessite quelques minutes de stabilisation. L'antimycine est injectée pour éteindre la respiration et mesurer le niveau de base de l'activité des oxydases. Puis 3 trois injections successives (une toutes les 3-5 min) de $FeSO_4$ sont opérées dans les chambres, afin de mesurer la consommation liée à la présence de MCO3 (ou de FET3 pour le cas du sauvage contrôle positif). Des contrôles avec du tampon seul avec injections d'antimycine et de fer ont été effectués en amont pour éviter tout biais lié à la réactivité éventuelle de l'acétate avec l'oxygène ainsi que le profil de l'oxydation spontanée du fer.

Après quelques essais de mise au point, nous avons mesuré la consommation de cultures de 250 millions de cellules dans les chambres. Les profils types acquis sont présentés en **Figure 15 A**. Après ajout de la culture, nous observons une consommation non négligeable mesurée par l'électrode ($>200 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$), après ajout d'antimycine, cette consommation chute et atteint une valeur moyenne de $10,29 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$. Après stabilisation, nous ajoutons la première injection de $FeSO_4$ à une concentration saturante d'après De Silva *et al* 1995 ($100\mu\text{M}$ final dans la chambre). Nous mesurons l'augmentation de la consommation puis nous injectons une deuxième fois la même quantité de fer que précédemment. Après stabilisation enfin une troisième injection est opérée dans la chambre. Ces deux injections supplémentaires nous servent de vérification que nous saturons bien le système en Fe^{2+} . Une augmentation linéaire de la consommation en fonction des injections indiquerait un effet seul de l'oxydation spontanée du fer. Nous observons une légère augmentation de consommation pour ces deux injections pour le sauvage et MCO3+ (MCO3ch), mais bien absente chez *fet3fet4* confirmant bien que la variation est due à la consommation des lignées et non pas à l'oxydation spontanée du fer.

En **Figure 15 B**, nous représentons la différence de consommation entre le plateau après la première injection de fer et le plateau après ajout d'ama (intervalle 2 – intervalle 1) en $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour chacune des trois lignées. Nous mesurons une différence significative de la consommation entre MCO3+ et *fet3fet4* ($n=3$ cultures indépendantes, test anova et test post-hoc tukeyHSD $p.\text{value}<0,05$) (\pm écart type). La différence est également significative entre le contrôle positif sauvage (WT) et le mutant *fet3fet4*. La MCO3 a une activité ferroxidase mesurable dans notre système. De plus, la valeur d'activité ferroxidase mesurée est du même

ordre de grandeur que celle observée en 1995 (**voir Table 2**), si nous convertissons bien toutes les valeurs en $\mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cellules}$ pour les deux études. De Silva *et al* 1995 mesurent en $\mu\text{M}/\text{min}$, nous obtenons pour FET3 (« induced ») $5,22 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cellules}$ et pour leur contrôle négatif (« uninduced ») $1,38 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cellules}$. Avec notre système et en convertissant de la même manière nos données, nous obtenons $5,00 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cellules}$ pour MCO3+ et $1,47 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cellules}$ pour le mutant *fet3fet4*. Nous mesurons donc une consommation de dioxygène très proche de celles mesurées pour FET3. Cette augmentation de la consommation en O_2 est liée à la présence de fer. Le domaine MCO de MCO3 est capable d'oxyder du fer en réduisant du dioxygène dans nos conditions.

Concernant la composante cuivre-oxidase de MCO3, le cuivre est apporté dans toutes nos expérimentations sous la forme de CuSO_4 . Dans ce sel, le cuivre est sous la forme de Cu^{2+} , la forme oxydée du cuivre en milieu aérobie. La forme Cu^+ est beaucoup plus réactive que le fer et sa durée de vie dans un milieu aérobie plus courte. Les réductases membranaires de *S.cerevisiae* réduisent aussi le cuivre.

2.1.3 Conclusion sur l'activité de MCO3

MCO3 peut compléter le phénotype de *fet3fet4* en carence de fer lorsque la protéine est proche de FTR1. Comme je le rappelle en introduction et dans la mise en contexte de cette série d'expériences, *fet3fet4* a surtout été utilisé pour étudier la fonction de transporteur de fer, et ce parce que FET3 fait partie du système de haute affinité de transport du fer chez la levure. Le couple FET3/FTR1 (ferroxydase/transporteur) est formé par une interaction forte et l'absence de la ferroxydase inhibe fortement l'activité de FTR1. En exprimant un transporteur de fer (par exemple IRT1) nous récupérons la capacité de la levure d'acquérir le fer ; nous essayons de remplacer l'activité de FTR1. Mais dans le cas de l'expression d'une ferroxydase, l'aspect d'interaction entre la ferroxydase hétérologue et FTR1 entre en jeu. Il ne faut pas seulement avoir une activité ferroxydase mais une protéine capable d'interagir physiquement avec FTR1. Il s'agirait de la principale explication pour l'échec de nos premières tentatives en exprimant le cDNA de MCO3 tel quel. En favorisant un ancrage à la membrane, l'activité de MCO3 à la surface des cellules doit être suffisante pour permettre à FTR1 d'acquérir du fer. Je rappelle que la seule ferroxydase avérée à compléter *fet3fet4* est l'hephaestine des mammifères qui possède un domaine transmembranaire [177].

En ce qui concerne la partie mesure de la consommation en O₂, pendant la mise au point des acquisitions, la différence de consommation nous semblait dérisoire comparée aux représentations de ruptures de pente mesurée chez De Silva *et al* en 1995. C'était sans compter sur les différences d'unité de mesure et du système inductible qu'il avait à disposition. En convertissant toutes les valeurs en µmol/min/millions de cellules, nous devons constater que nous mesurons les mêmes amplitudes de consommation qu'à l'époque, nous confortant, avec la complémentation en milieu solide, dans l'idée d'une activité ferroxidase opérée par MCO3.

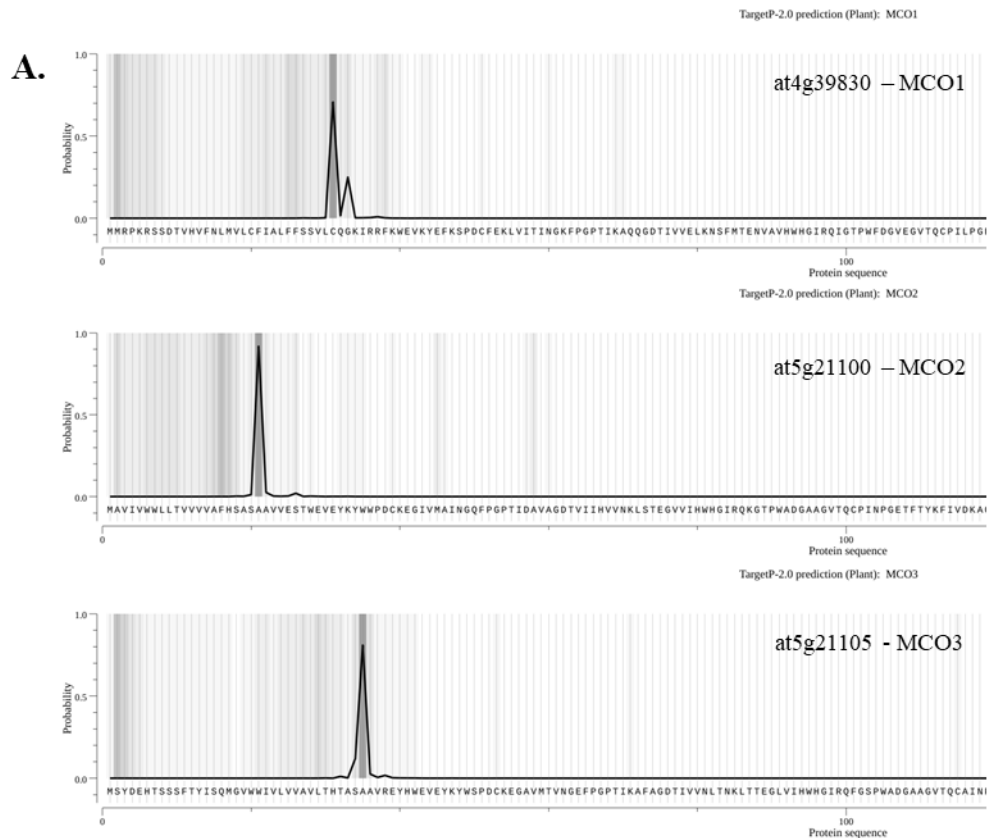
Parmi le pool de protéines annotées comme ascorbate oxydase chez Arabidopsis, MCO3 est capable dans nos conditions expérimentales de « ferroxider » du fer et très probablement du cuivre comme FET3 de la levure. Reste à déterminer si cette activité peut jouer un rôle dans l'homéostasie du fer chez la plante.

2.2 Localisation subcellulaire des AtMCOs

2.2.1 Les MCOs sont membranaires ou extracellulaires

D'après Daniel Kosman dans sa revue de 2017 sur les Multicopper oxydases (*Multicopper Oxidase Assembly*), la synthèse des chaînes polypeptidiques de toutes les MCOs connues se font dans le réticulum endoplasmique, et jamais dans le cytoplasme. Ainsi les multicopper oxydases ne peuvent être que des protéines transmembranaires extra- ou intra-cellulaires, ou sécrétées. Cet état, souligne-t-il, suggère que le stress à l'origine de la pression de sélection qui s'est exercée et a abouti à la duplication du premier gène des cupredoxines, amenant au précurseur des MCOs, devait être évité par une réponse extracellulaire [185]. Les laccases et ascorbates oxydases connues (chez les Cucurbitaceae) [186] sont extracellulaires. Parmi les ferroxidases, la céruloplasmine est extracellulaire, l'hephaestine a un domaine transmembranaire, son homologue chez l'algue, FOX1, possède également un domaine transmembranaire. FET3 non des moindres présente un domaine transmembranaire. Les ferroxidases membranaires co-localisent avec un transporteur à la membrane plasmique, voire ont une interaction étroite avec ce dernier (Hp-FPN1, FET3-FTR1, très probablement FOX1 et un homologue de FTR1).

Nous pouvons attendre des laccases et des ascorbates oxydases d'Arabidopsis une localisation à la surface de la cellule ou dans le milieu extracellulaire. LAC4 et LAC17 sont adressées à la



B. Sequence

Prediction: Signal Peptide (Sec/SPI)

Cleavage site between pos. 35 and 36. Probability 0.970291

Protein type	Other	Signal Peptide (Sec/SPI)
Likelihood	0.0008	0.9991

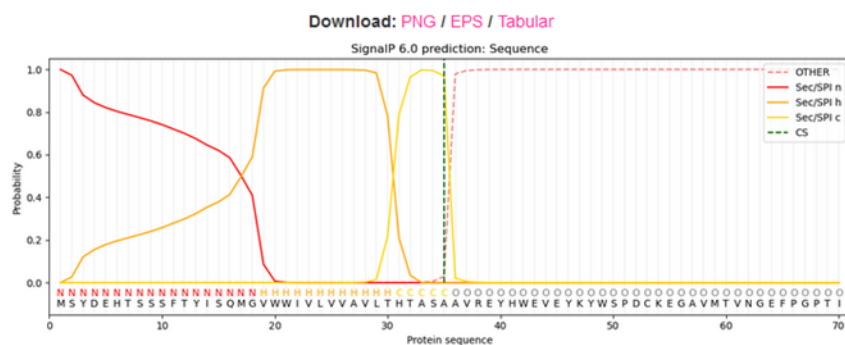


Figure 16. Prédiction de la présence d'un peptide signal des Plant L-ascorbate oxidases d'Arabidopsis

A. Les trois protéines présentent un score $> 0,85$ pour la présence d'un peptide signal, respectivement pour MCO1, MCO2, et MCO3, 0,8922, 1, et 0,9785.

Prédictions effectuées avec l'outil TargetP 2.0, à partir des séquences protéiques des AtMCOs.

Requête effectuée en 2022 sur <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>

B. La séquence protéique de MCO3 a été déposée en requête sur l'outil de prédiction SignalP hébergé par le DTU (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>). SignalP prédit un site de clivage à la position 35 – 36.

paroi du xylème [187]. A partir des séquences de ces laccases, les prédictions indiqueraient un adressage par sécrétion sauf pour LAC16 [168]. Les trois AtMCOs présentent également un peptide signal prédit avec TargetP 2.0 (service en ligne de la Technical University of Denmark, DTU), avec un score supérieur à 0,85 (**Figure 16**).

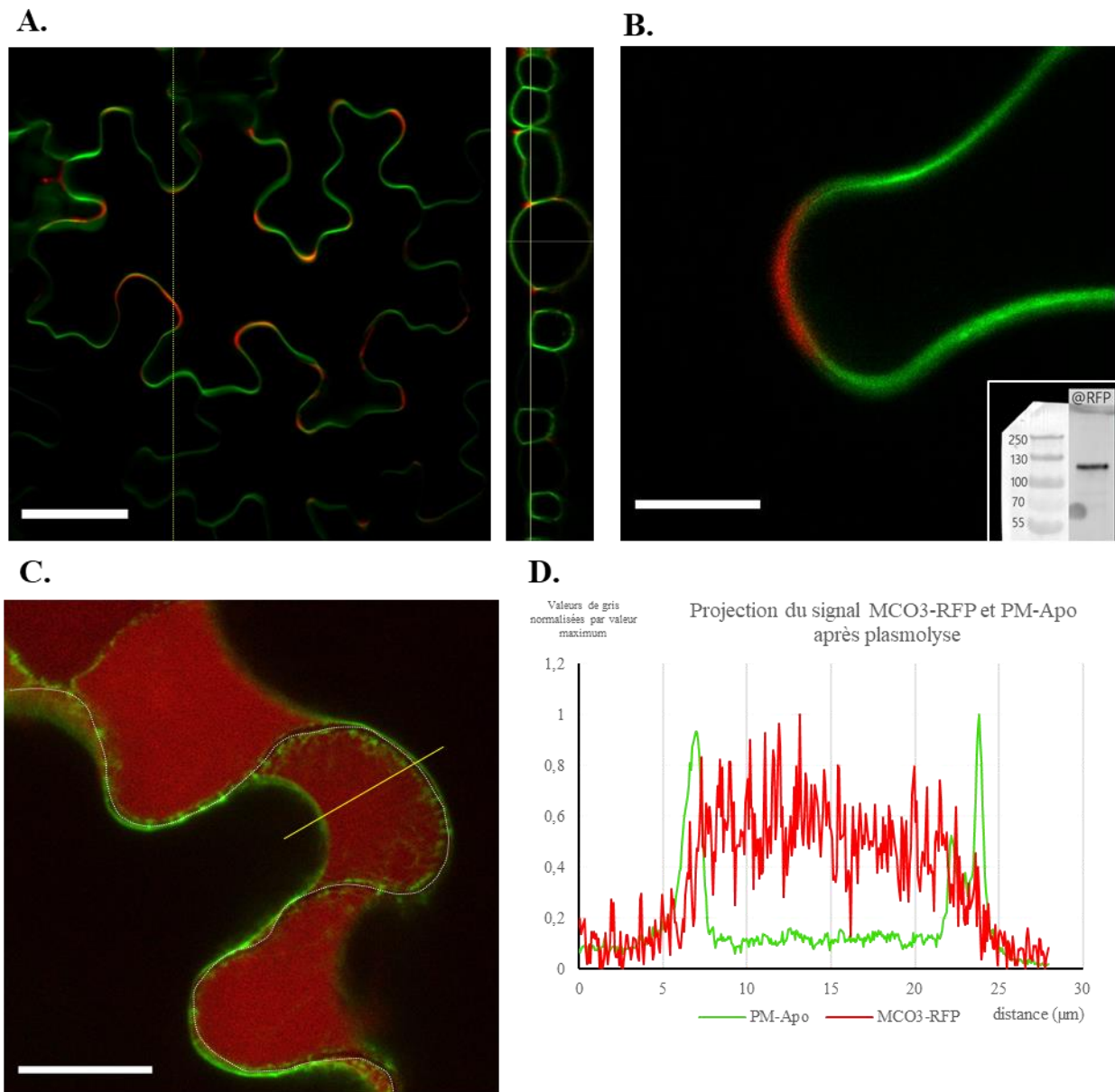


Figure 17. Expression transitoire de MCO3-RFP chez *N. tabacum*

A. Panneau de gauche : Cellule de tabac exprimant les constructions MCO3:RFP et PM:Apo, Echelle 50µm. Panneau de droite : vue orthogonale suivant l'axe jaune.

B. Zoom sur une zone de concentration du signal MCO3:RFP. Echelle 10µm. Encart en bas à droite : western blot anti-RFP à partir d'extrait de protéines totales de tabacs transformé. La taille coorespond à MCO3+RFP+glycosylations.

C. Plasmolyse de 15min avec 0,5M Mannitol. Image composite de la somme des signaux de 21 images de 6µm de profondeur chacune. En jaune l'axe de projection du graphe en D. Echelle : 20µm, Pointillés blancs : contour de la cellule avant plasmolyse.

D. Projection des valeurs des signaux MCO3:RFP et PM:Apo suivant l'axe de projection jaune en B. Les valeurs sont normalisées par la valeur maximum.

2.2.2 Localisation subcellulaire de MCO3

Pour localiser MCO3 au niveau subcellulaire, nous avons transformé transitoirement des tabacs (*Nicotiana tabacum*) avec une construction MCO3 fusionnée avec la RFP (Red Fluorescent Protein) en C-terminal. Ce vecteur permet l'expression de la fusion MCO3:RFP sous le promoteur du gène de l'ubiquitine 10 (pUbC vecteur Gateway® [188]). Le signal RFP est observé au microscope confocal après 48h. Les tabacs sont co-infiltrés avec des agrobactéries recombinantes pour un vecteur exprimant une construction adressée à la membrane plasmique nommée PM:Apo (Apo car elle possède un domaine contenant une pFluorine côté extracellulaire, PM car ce domaine est fusionné avec un domaine transmembranaire). La PM-Apo nous sert ici de contrôle du plasmalemmes [189].

Le signal de la PM:Apo (vert) suit bien le contour de la cellule (**Figure 17 A**). Le signal de la MCO3:RFP se concentre dans les courbes des jonctions entre les cellules (**Figure 17 B**). Sur la vue orthogonale de la cellule présentée, on observe que ce signal se concentre dans les méas et ne semble pas co-localiser avec le signal de la PM:Apo joignant les deux cellules plus en profondeur dans les plans d'acquisition. MCO3 ne serait pas membranaire mais serait apoplastique. Cette localisation apoplastique correspond à ce que nous connaissons de la localisation des MCOs chez Arabidopsis. Pour décrire un peu plus cette localisation apoplastique, nous avons plasmolysé des morceaux de feuilles de tabac transformés transitoirement avec un bain de 15min de mannitol à 0,5M. Ce traitement permet la rétractation de la membrane plasmique au fur et à mesure que l'eau s'échappe du cytoplasme vers l'extérieur, augmentant l'espace occupé par l'apoplasme. Après un tel traitement, le signal PM:Apo montre bien la rétractation de la membrane plasmique (**Figure 17 C**). Le signal RFP se diffuse dans l'espace nouvellement créé pour l'apoplasme. Si nous représentons les valeurs des signaux PM:Apo et MCO3:RFP sur un axe traversant cet espace (**Figure 17 D**) (projection de l'axe en Y) nous pouvons mieux distinguer les deux fronts de membrane plasmique (en vert) en deux pics entourant le signal RFP à l'intérieur des deux pics, dans l'apoplasme. Les valeurs sont normalisées par la valeur maximum pour mieux faire ressortir le signal RFP sur le graphe. Le signal RFP ne co-localise pas avec les pics de la PM:Apo. MCO3 possède un peptide signal prédit avec un score important (**Figure 16**), sous un promoteur ubiquitine10, elle est adressée à l'apoplaste en tabac.

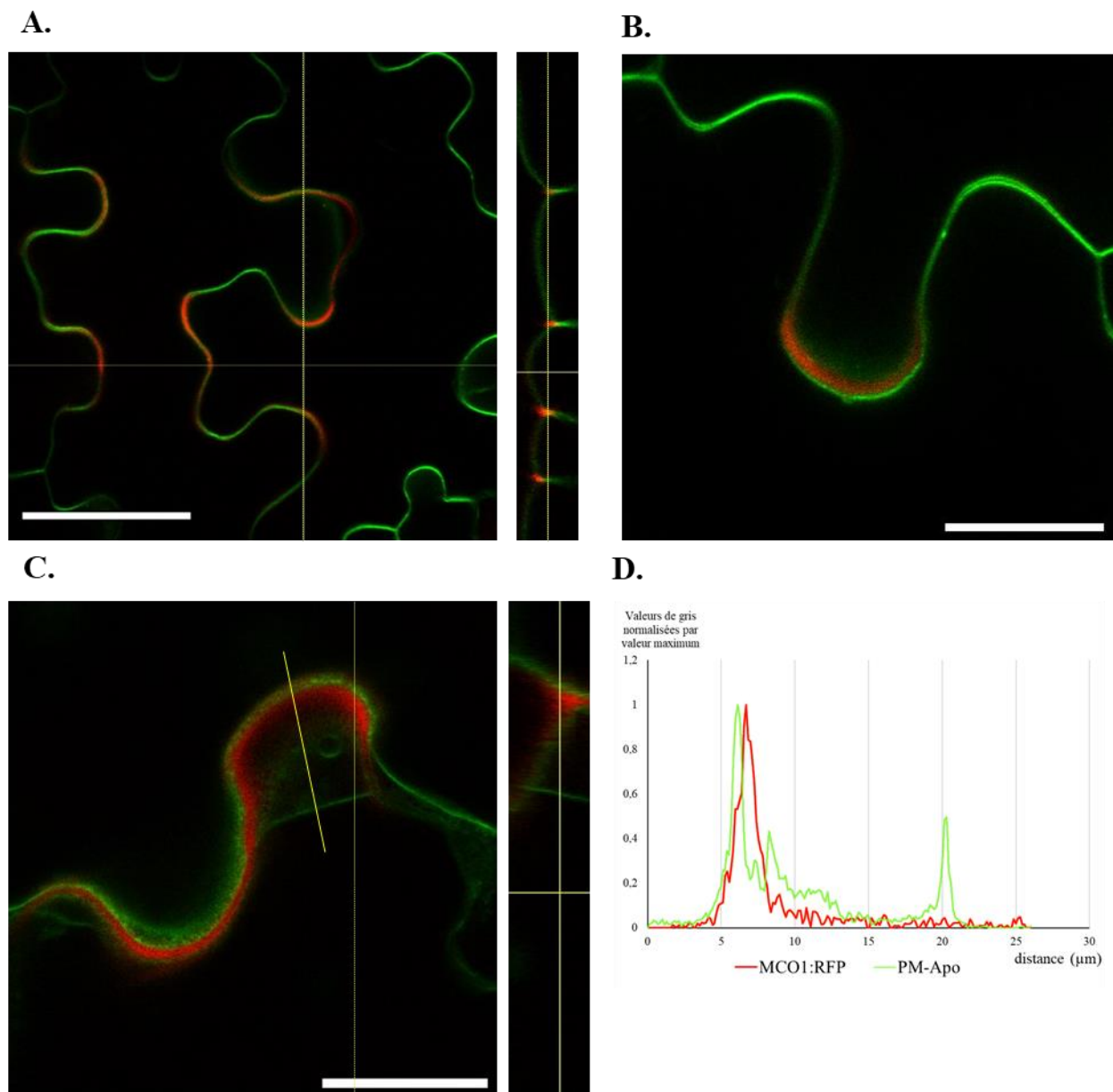


Figure 18. Expression transitoire de MCO1-RFP chez *N. tabacum*

A. Panneau de gauche : Cellule de tabac exprimant les constructions MCO1:RFP et PM:Apo, Echelle 50µm. Panneau de droite : vue orthogonale à travers suivant l'axe jaune.

B. Représentation de la structure 3D du domaine transmembranaire prédit de MCO1 (bleu) et MCO3 (violet). PyMOL software.

C. Panneau de gauche : Plasmolyse de 15min avec 0,5M Mannitol. En jaune l'axe de projection du graphe en D. Echelle : 20µm, Pointillés blancs : contour de la cellule avant plasmolyse. Panneau de droite : vue orthogonale

D. Projection des valeurs des signaux MCO1:RFP et PM:Apo suivant l'axe de projection jaune en B. Les valeurs sont normalisées par la valeur maximum.

2.2.3 Localisation subcellulaire de MCO1

Pour déterminer la localisation subcellulaire de MCO1, nous avons procédé de la même manière que MCO3. Nous avons exprimé une construction MCO1:RFP chez *N.tabacum* par agro-infiltration et co-transformé les tabacs avec une construction exprimant la PM-Apo. La **Figure 18** montre le profil du signal observé par microscopie confocale. Le signal RFP comme pour la construction MCO3:RFP se concentre aux jonctions cellulaires, suggérant une localisation membranaire dans un premier temps. Sur une vue orthogonale de la cellule le signal se trouve uniquement dans les méas à ces jonctions cellulaires, des zones où l'apoplaste est le plus volumineux. Le signal RFP indique une localisation proche de celle de MCO3:RFP. Dans le même esprit que précédemment, nous avons plasmolysé le disque foliaire avec une solution de 0,5M de mannitol. Après plasmolyse, le signal RFP ne se diffuse pas autant que MCO3:RFP et semble rester proche de la paroi. Quoi qu'il en soit, le signal RFP ne colocalise jamais avec le signal de la PM-Apo. Néanmoins, par comparaison avec MCO3, MCO1 est beaucoup moins mobile dans l'apoplaste, suite à une plasmolyse, suggérant une interaction plus étroite avec le plasmalemme que MCO3. Il faut noter que MCO1 aussi possède un peptide signal prédit avec une probabilité très significative.

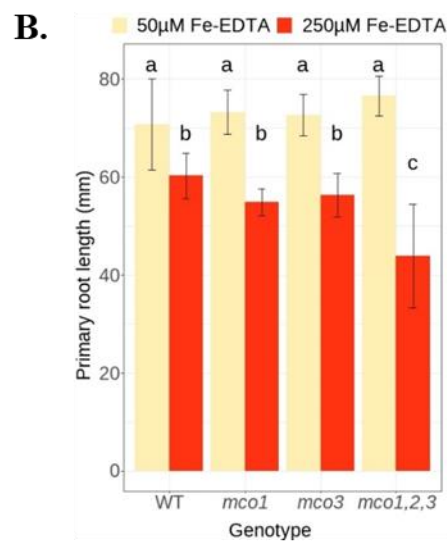
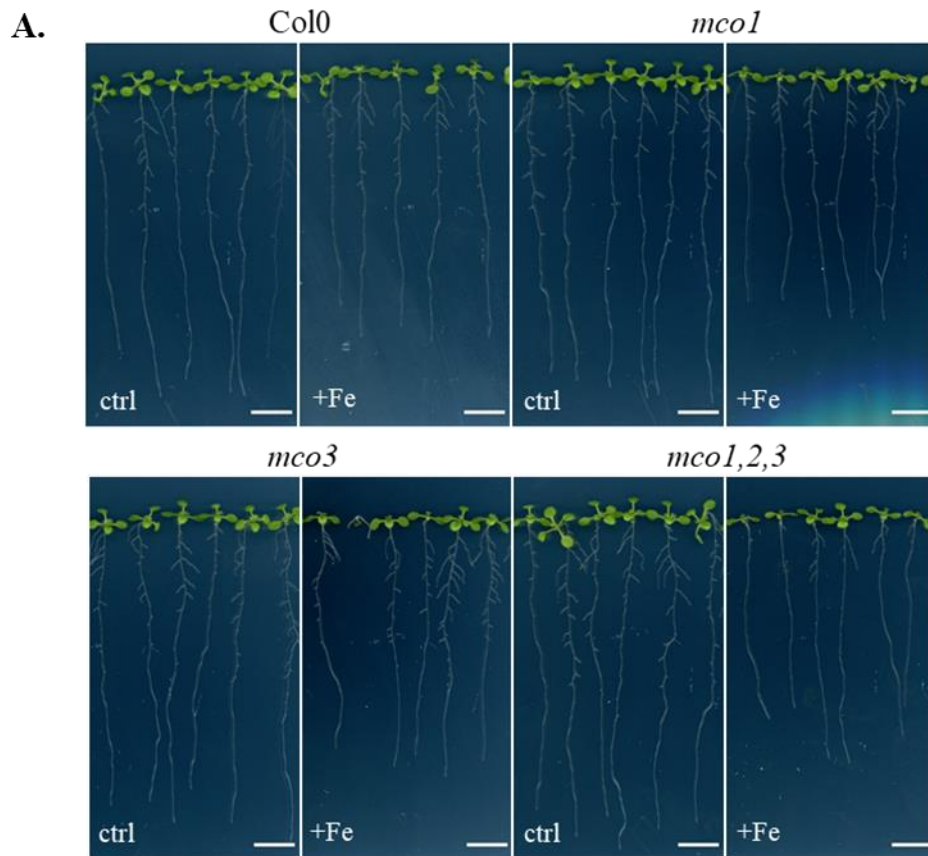


Figure 19. Phénotype de *mco1*, *mco3* et *mco1,2,3* en excès de fer

- A. Semis de deux semaines semés sur MS/2 Agar +50µM de Fe-EDTA (ctrl) ou +250µM Fe-EDTA (+Fe). Echelle : 10mm
- B. Longueur de la racine primaire des semis en excès de fer, barres d'erreur = ±SD (n=12), statistiques = Anova et TukeyHSD post-hoc, test réalisé avec R 4.1.2 (p.value<0.01)

2.3 *mco1,2,3* en excès de fer

Les simples mutants *mco1* et *mco3* ne présentent pas de phénotype en excès de fer comparé au sauvage (**Figure 19**). Nous observons le même effet de l'excès chez le sauvage et les simples mutants. Cette absence de phénotype macroscopique suggérait un risque important de redondance fonctionnelle. Nous avons généré un triple mutant de cette sous famille à partir du simple mutant *mco1* grâce à la technique CRISPR/Cas9. Les gènes codant pour *MCO2* et *MCO3* sont en tandem sur le chromosome 5, avec des ARN guides ciblant à la fois dans la séquence de *MCO2* et de *MCO3*, nous créons une délétion recouvrant les deux gènes (voir Matériel et Méthode). Après deux semaines de culture sur MS/2 Agar avec 50µM de Fe-EDTA (ctrl) ou 250µM de Fe-EDTA (+Fe) le mutant *mco1,2,3*, a une racine primaire légèrement plus courte que les simples mutants et le sauvage. Cette différence est relativement faible mais significative. L'excès de fer induit l'arrêt de la croissance de la racine primaire [190].

2.4 Phénotypage du triple mutant *mco*

2.4.1 Les AtMCOs et l'homeostasie du fer

2.4.1.1 Une ferroxidase chez *Arabidopsis*

D'après les résultats présentés ci-dessus, MCO3 est capable de compléter *fet3fet4*, un mutant qui nécessite soit un transporteur de fer, soit une ferroxidase pour survivre en carence de fer. Elle est capable d'oxyder du fer dans nos conditions expérimentales, ou du moins sa consommation en dioxygène augmente en présence de fer. MCO3 est également localisée dans l'apoplaste, une localisation cohérente avec l'état des connaissances de l'activité des ferroxidases, toujours présente à la surface de la membrane plasmique ou sécrétée. L'étape suivante de la caractérisation de l'implication des AtMCOs dans l'homéostasie du fer.

2.4.1.2 Un phénotype chez le triple mutant *mco1,2,3*

Pour éviter la possible redondance fonctionnelle qui expliquerait cette absence, nous avons généré un triple mutant de cette sous-famille par CRISPR/Cas9 en insérant une délétion qui

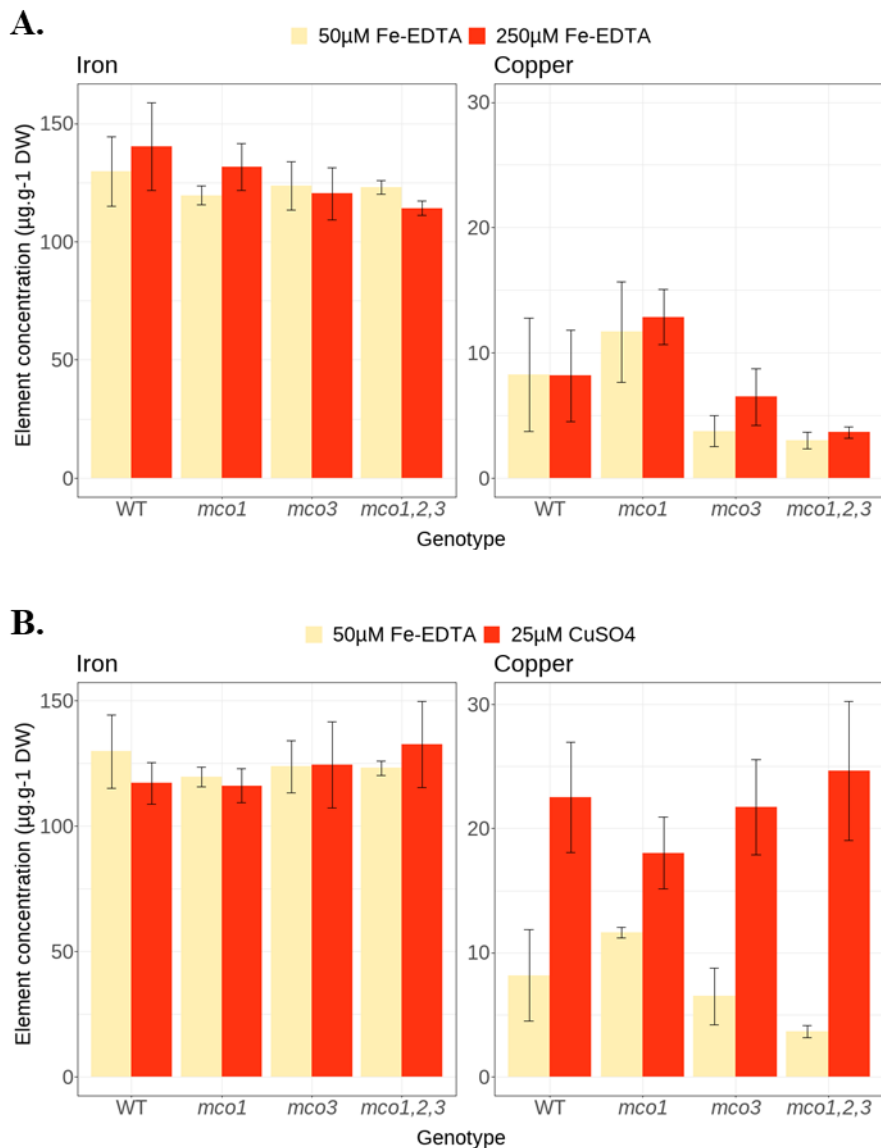


Figure 20. Concentration en fer et en cuivre dans la masse sèche des plantules

Mesures de la concentration de fer total dans la masse sèche par MP-AES (Plasma Micro-Ondes – Spectroscopie d’Émission Atomique) à partir de plantes entières âgés de deux semaines Normal : 50µM Fe-EDTA, Excès de fer : 250µM Fe-EDTA ou Excès de cuivre : 25µM CuSO₄. Les barres d’erreur sont l’écart-type de trois répliquas biologiques indépendants.

recouvre les gènes *MCO2* et *MCO3* (en tandem sur le chromosome 5) dans un fond génétique *mco1* (lignée salk insertionnelle T-DNA).

2.4.2 Dosage du fer et du cuivre

2.4.2.1 *Excès de fer et Excès de cuivre*

En plus d'une condition d'excès de fer, les ferroxidases pourraient répondre à un excès de cuivre. En effet les ferroxidases connues, telles que FET3 ou la céruloplasmine, sont aussi l'objet de travaux en lien avec l'homéostasie du cuivre. Les ferroxidases sont associées à quatre atomes de cuivre (comme toutes les MCOs). La céruloplasmine serait la principale protéine de stockage du cuivre chez les mammifères (95% du cuivre dans le plasma [191]). FET3 est capable d'oxyder du cuivre et est induite en excès de cuivre, elle joue un rôle dans la détoxification du Cu^+ à la membrane plasmique [179]. La céruloplasmine a également une activité d'oxydation du cuivre comme FET3 [180]. En plus des conditions normale et d'excès de fer, le *mco1,2,3* pourrait présenter un phénotype en excès de cuivre. La concentration en fer et en cuivre a été dosée après des conditions de culture en excès de fer et en excès de cuivre.

2.4.2.2 *Dosage des métaux par MP-AES*

2.4.2.2.1 *Effet de l'excès de fer sur la quantité de fer et de cuivre*

En condition standard de fer, nous n'observons pas de différence en concentration totale de fer (plantule entière) entre tous les génotypes ($\sim 130\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de fer). L'excès de fer à $250\mu\text{M}$ de Fe-EDTA n'a pas d'effet sur cette concentration totale. Concernant la concentration en cuivre, En condition standard de fer, *mco3* et *mco1,2,3* contiennent moins de fer que le sauvage et *mco1*, cependant cette différence n'est pas significative. L'excès de fer n'a pas non plus d'effet sur la concentration globale de cuivre dans les plantules entières tous génotypes confondus.

2.4.2.2.2 *Effet de l'excès de cuivre sur la quantité de fer et de cuivre*

En condition standard de cuivre, nous n'observons pas de différence en concentration totale de fer entre tous les génotypes ($\sim 130\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de fer). Lors d'un excès de cuivre ($25\mu\text{M}$ de CuSO_4), la concentration en fer total dans les plantules n'est pas modifiée. Concernant le cuivre, l'excès de cuivre est visible sur la concentration totale en cuivre des plantules qui passe d'environ ~ 7 -

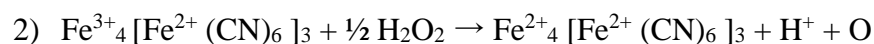
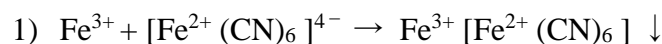
11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cuivre à $\sim 20\text{-}25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Toutefois, l'absence des AtMCOs ne modifie pas cette accumulation comparée au sauvage (**Figure 20**).

Les ferroxydases sont des protéines extracellulaires ou ancrées à la membrane plasmique avec leur domaine MCO orienté du côté extracellulaire ; n'ayant manifestement pas d'influence sur la concentration totale en fer ou en cuivre, en condition normale pour ces métaux ou pendant un excès. Elles pourraient être impliquées dans la distribution du fer dans le tissu à défaut d'agir sur la quantité totale dans l'organisme. Nous pouvons évaluer cet impact par coloration Perls/DAB des rosettes.

2.4.3 Coloration du fer dans les rosettes par Perls et intensification au DAB

2.4.3.1 La coloration Perls/DAB

Le principe de coloration du fer présenté est une coloration en deux étapes : 1) une première réaction chimique avec du Ferrocyanure de potassium (réactif de Perls) avec le fer générant un pigment bleu (le bleu de prusse) ; 2) une intensification de cette coloration avec du 3,3'diaminobenzidine (DAB), du peroxyde d'hydrogène et du chlorure de cobalt, générant une coloration noire [163].



Cette technique est spécifique du fer, simple, rapide, peut s'appliquer à de nombreux types de tissus, et permet également une résolution subcellulaire en coupe histologiques. L'intensification au DAB est nécessaire pour augmenter le seuil de détection de la coloration Perls qui est faible au regard des concentrations en fer rencontrées dans les tissus végétaux. L'intensification est une réaction couplée de la dégradation du peroxyde d'hydrogène par le bleu de prusse en présence de DAB, provoquant sa polymérisation en une coloration brune-noire [192]. L'intensification au DAB améliore la sensibilité de la détection du fer mais perd l'aspect quantitatif du Perls seul. Cette intensification permet ici de nous indiquer s'il y a une grande différence de la quantité ou de la répartition du fer dans les tissus aériens, organes puits du fer.

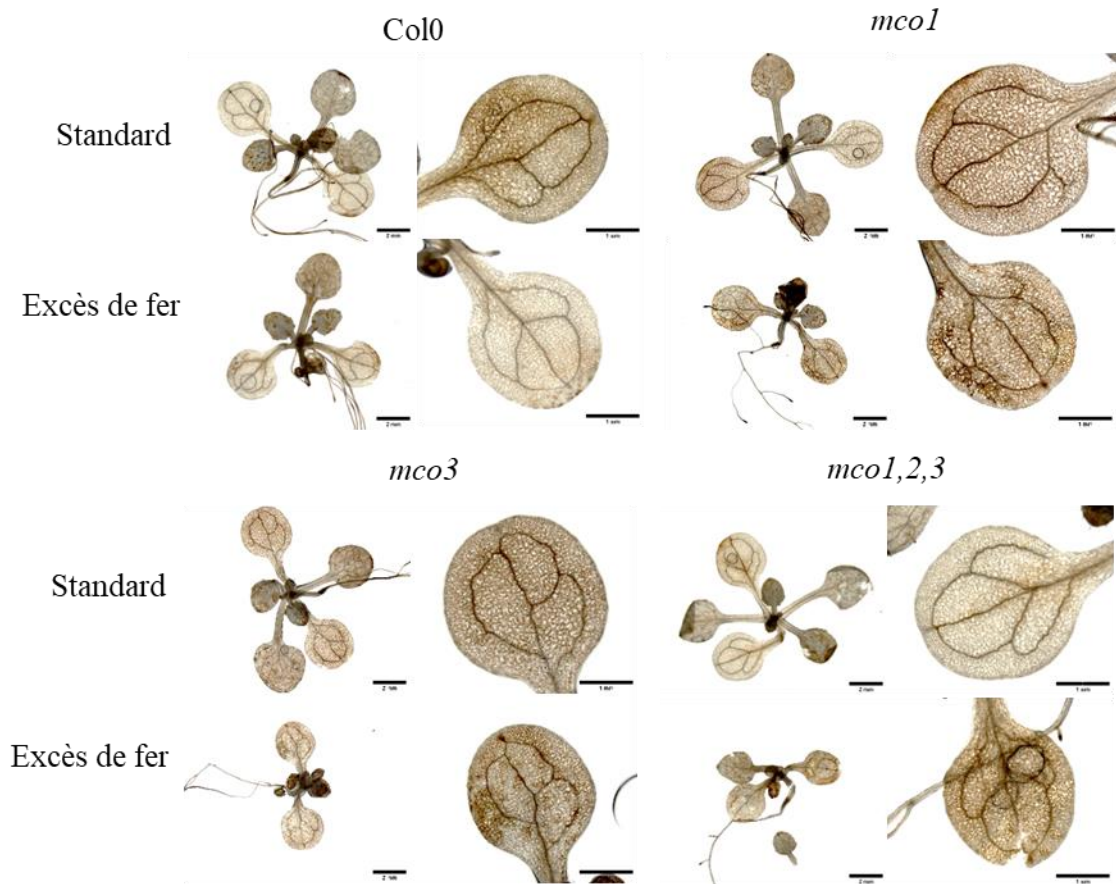


Figure 21. Coloration Perls/DAB sur des plantules de 15 jours

Les plantes ont été cultivées deux semaines sur MS/2 contenant 50 μ M ou 200 μ M Fe-EDTA. La barre d'échelle mesure 2 mm pour les rosettes et 1 mm pour les cotylédons.

2.4.3.2 Coloration du fer par Perls/DAB sur rosettes d'*Arabidopsis*

Des plantules de Col-0 et de triple mutant *mco1,2,3* ont été cultivées sur MS/2 Agar avec 50µM de Fe-EDTA (standard), 250µM de Fe-EDTA (excès de fer pendant 15 jours). Les rosettes ont été colorées par Perls/DAB pour mettre en évidence une différence de statut global de fer dans les cotylédons de Col0 de *mco1*, *mco3* et *mco1,2,3*. La **Figure 21** présente les résultats de la coloration des rosettes.

En condition normale, nous n'observons pas de différence de coloration entre le sauvage et les mutants. En excès de fer, nous observons une tendance à la hausse de la coloration, avec un léger retard des dernières feuilles comparé au sauvage, mais ces différences restent plutôt des tendances et ne nous permettent pas d'affirmer un effet de l'absence des MCOs sur le statut global du fer ou sa répartition à cette échelle. Nous arrivons à observer parfois une plus forte intensité dans les vaisseaux : par exemple chez le sauvage en condition normale ou chez *mco1,2,3* en excès de fer, mais cette coloration varie d'une plante à l'autre.

Une composante importante de l'évitement de l'excès de fer chez les plantes est l'induction des ferritines. Les ferritines sont des protéines capables d'engranger d'importantes quantités de fer oxydé en formant des multimères de 24 unités (voir Introduction p37). L'expression de *FER1*, le gène principal codant pour les ferritines dans les feuilles peut nous montrer si le triple mutant *mco1,2,3* évite l'excès de fer en produisant des ferritines, et si cette induction est plus importante. La capacité de tampon des ferritines lors d'un excès de fer chez *Arabidopsis* est importante ; chez le tabac, des lignées transgéniques surexprimant les ferritines accumulent deux à trois fois plus de fer dans les feuilles [193]. La surexpression des ferritines chez *mco1,2,3* pourrait limiter l'impact de l'absence des MCOs en excès de fer.

2.4.4 Expression de gènes marqueurs de l'excès de fer et de cuivre

2.4.4.1 Les ferritines et les SOD à cuivre

L'excès de fer induit l'expression des gènes codant pour les ferritines (dont *Fer1*), l'excès inhibe également l'expression de *Nramp4*, un transporteur de fer tonoplastique (vers cytoplasme). *Nramp4* est surtout induit lors de la germination et du développement de la jeune plantule pour mobiliser les réserves de fer dans la vacuole, et également lors d'une carence en fer [175]. Une différence d'expression de *FER1* et *NRAMP4* peut montrer une éventuelle

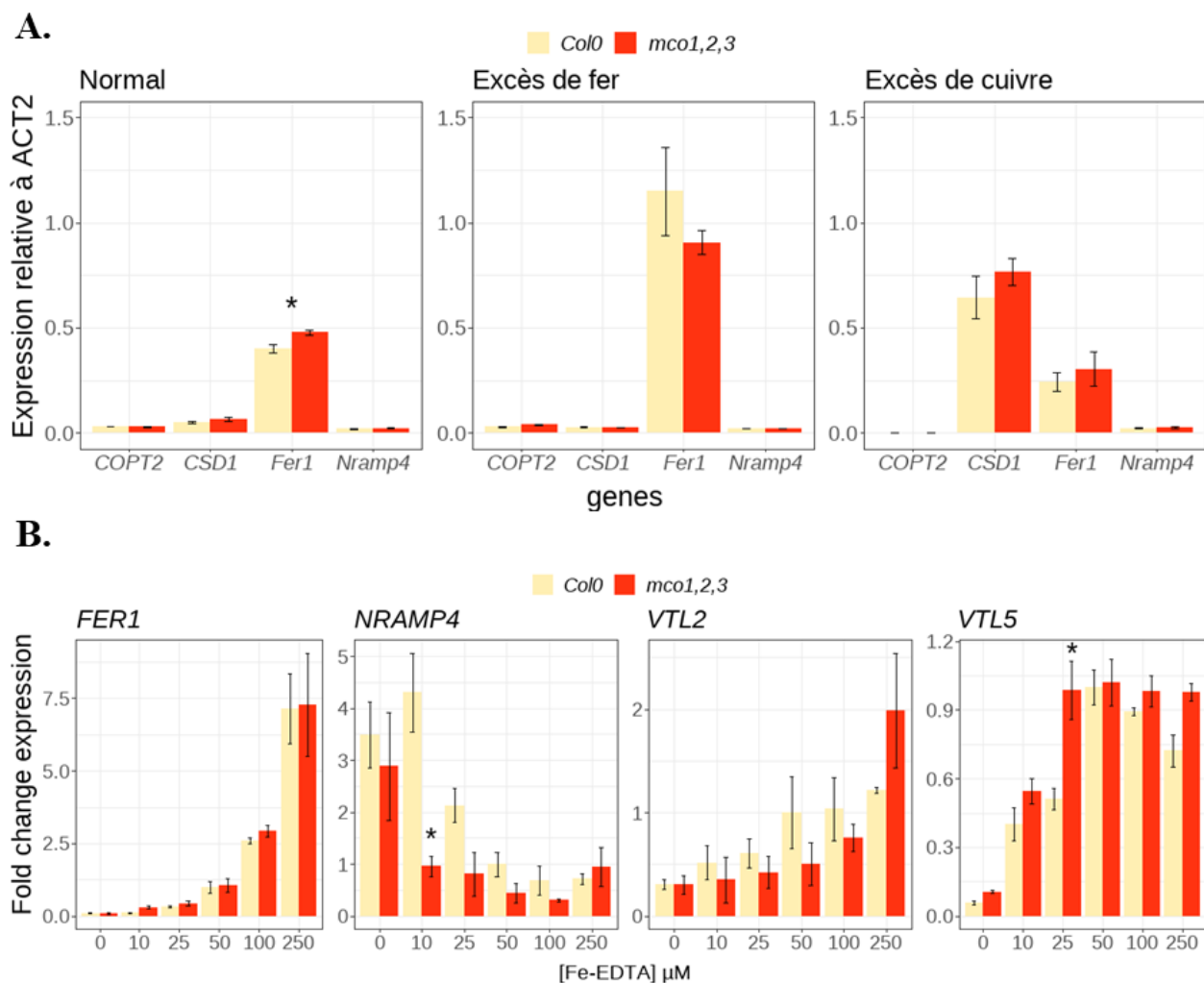


Figure 22. Effet de l'absence des AtMCOs sur l'expression de gènes liés à la réponse au fer

- A. Histogramme représentant l'expression relative de l'*ACT2* (gène de ménage) des gènes marqueurs de l'excès de fer et de cuivre.
- B. Histogramme représentant les ratios d'expression par rapport à la condition 50 μ M de Fe-EDTA, relatif à celle d'*ACT2* (gène de ménage) pour les gènes : *Fer1* *Nramp4*, *VTL2* et *VTL5* sous différentes concentrations en fer.

Les barres d'erreur sont l'écart-type de trois répliquas biologiques indépendants.

Les astérisques représentent une différence significative avec une p-value inférieure à 0,05 - t.test (échantillons non appariés).

accentuation de la sensibilité à l'excès de fer chez *mco1,2,3*, étant donné l'absence de phénotype de développement ou de statut en fer global. Toujours dans l'idée d'explorer l'interaction des homéostasies fer/cuivre chez *mco1,2,3*, nous avons également mesuré l'expression d'un transporteur de cuivre, COPT2 (de la famille des COPTs pour COPper Transporters), ainsi que de CSD1, une des deux Super Oxide Dismutase à cuivre/zinc d'Arabidopsis. CSD1 est cytosolique et fait partie de la batterie des mécanismes de régulation des stress redox. Elle réduit les ions superoxide en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène (Dismutation) pour diminuer le pouvoir toxique de ce radical de l'oxygène [194], [195]. Une augmentation de l'expression de CSD1 indiquerait une plus forte sensibilité à l'excès de cuivre, générateur de radicaux de l'oxygène. De plus, comme les multicopper oxidases, les SOD à Cu/Zn ont pour co-facteur le cuivre.

2.4.4.2 RT-qPCR en excès de fer ou de cuivre

Les ARNs totaux ont été extraits de plantules entières, (entre 50 et 100mg) par point, cultivées pendant 7 jours sur MS/2 Agar avec 50µM de Fe-EDTA (normal), 250µM de Fe-EDTA (excès de fer), ou 50µM de Fe-EDTA + 25µM de CuSO₄ (excès de cuivre). La **Figure 22A** présente les niveaux d'expression mesurés par RT-qPCR pour les gènes *COPT2*, *CSD1*, *FER1* et *NRAMP4*. L'histogramme montre la moyenne de l'expression relative au gène ACT2 des ΔCt. Les barres d'erreurs sont l'écart type sur 3 points de mesure correspondant à trois réplicas biologiques.

2.4.4.2.1 COPT2 et CSD1

Dans nos trois conditions de culture, *COPT2* ne montre pas de différence d'expression chez *mco1,2,3* comparé au sauvage. Les milieux de la condition standard de fer et d'excès de fer, contiennent la même quantité de cuivre (0,1µM), l'excès de fer ne modifie pas l'expression de ce gène codant pour un transporteur localisé à la membrane plasmique. En excès de cuivre, son expression est totalement inhibée. Chez le sauvage, même profil pour *CSD1* en condition normale de fer et en excès que pour *COPT2*. Son expression est induite en excès de cuivre, indiquant que la plante subit bien un excès de cuivre. Cependant, ce gène codant pour une SOD à Cu/Zn cytoplasmique ne montre pas de différence d'expression entre le sauvage et *mco1,2,3*.

Dans nos conditions de culture, nous ne montrons pas d'effet de l'absence des MCOs sur l'expression de *COPT2* et *CSD1* lors d'un excès de fer ou de cuivre.

2.4.4.2.2 FER1 et NRAMP4

En condition standard de fer, chez Col0, *FER1* est induit, la plante produit déjà des ferritines à 50µM de Fe-EDTA. En excès de fer, l'induction est environ trois fois plus importante. En excès de cuivre, l'expression de *FER1* diminue par rapport à l'excès de fer, mais celle-ci reste supérieure à la condition standard, l'excès de cuivre induit *FER1*. Chez *mco1,2,3*, en condition normale de fer, *FER1* est légèrement plus induit, et cette différence est significative. En excès de fer et de cuivre, *FER1* est induit de la même manière que le sauvage. Concernant *NRAMP4*, son expression est déjà réprimée à 50µM de Fe-EDTA et l'excès de fer ou de cuivre ne modifie celle-ci.

La différence d'expression de *FER1* observée en condition standard de fer est faible mais significative. Le mutant *mco1,2,3* compenserait un peu plus la présence de fer dès 50µM de Fe-EDTA dans le milieu. La différence s'effaçant en augmentant la concentration de fer à 250µM de Fe-EDTA. L'excès de fer est probablement trop fort pour que la sensibilité de *mco1,2,3* à l'excès se manifeste par une plus forte induction de *FER1*.

2.4.4.3 *Expression de FER1, NRAMP4, VTL2 et VTL5 en fonction de la quantité de fer*

La **Figure 22B** présente les ratios d'expression de *FER1*, *NRAMP4*, *VTL2* et *VTL5*. Les plantes utilisées ont été cultivées 7 jours sur MS/2 Agar contenant des concentrations croissantes en fer (0 à 250µM de Fe-EDTA). Les plantules entières ont servi pour l'extraction d'ARN. Dans tous les histogrammes, la condition Col0 50µM de fer nous sert de condition de référence.

2.4.4.3.1 FER1 et NRAMP4

Chez le sauvage, de 0 à 10µM de fer, *FER1* n'est pas ou très peu exprimé. A partir de 25µM de fer, son expression augmente pour atteindre une moyenne de ~7,5 fois plus d'expression qu'à 50µM. Chez *mco1,2,3* l'expression de *FER1* n'est pas significativement différente du sauvage dans toutes les conditions de fer. Chez le sauvage, *NRAMP4* est exprimé de 0 à 10µM de fer, puis commence à être réprimé à partir de 25µM (2 fois moins) et atteint son minimum à 50µM de fer. Chez *mco1,2,3*, *NRAMP4* est exprimé à 0µM de fer puis est réprimé dès 10µM de fer de façon significative (4 fois moins) pour atteindre un niveau équivalent au sauvage à 50µM.

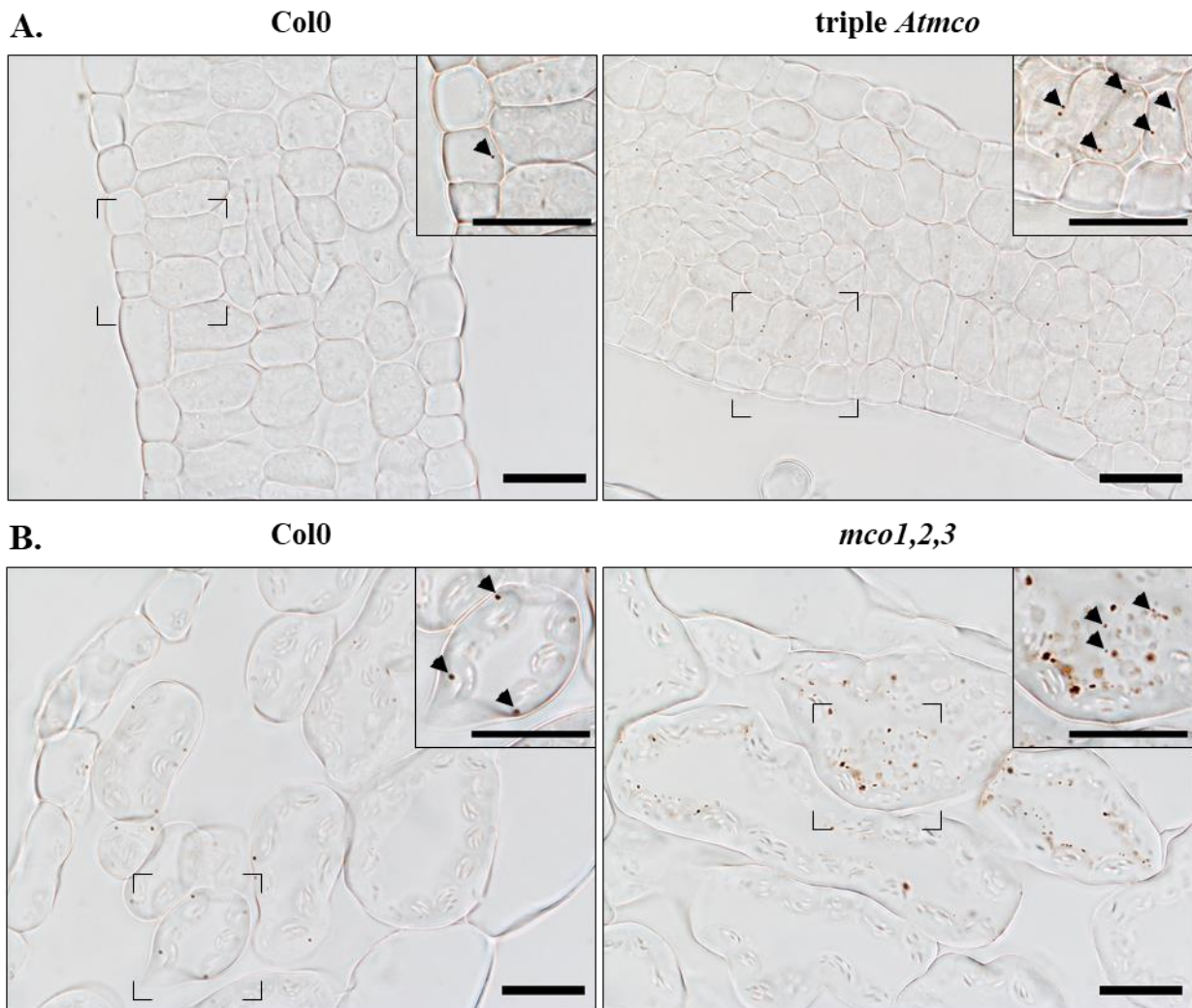


Figure 23. Coloration histochimique du fer par Perls/DAB en condition normale ou en excès de fer

- A. Coupes histologiques (6 μ m) de vraies feuilles de plantules cultivées en condition normal de fer (50 μ M Fe-EDTA).
- B. Coupes histologiques (6 μ m) de cotylédons de plantules cultivées en excès de fer (250 μ M Fe-EDTA). Toutes les plantules sont âgées d'une semaine avant l'inclusion.
- Les flèches noires sont des grains de ferritine chargés de fer (voir Roschztardt et al., 2013). Toutes les échelles mesures 50 μ m.

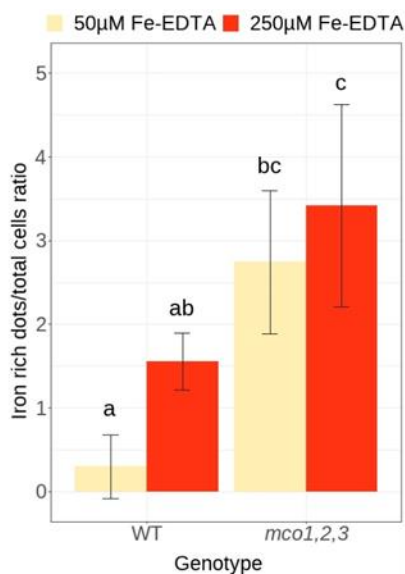


Figure 24. Quantification des structures colorées des coupes de cotylédons colorées par Perls/DAB

L'histogramme représente le ratio du nombre moyen de structures colorées chargées en fer et du nombre de cellules totales présentes sur la coupe. Les barres d'erreur sont l'écart-type sur 3 à 6 coupes indépendantes de deux réplica biologiques. Les astérisques représentent une significativité inférieure à 0,05 avec un test de student (p.value = 0,0079)

2.4.4.3.2 VTL2

Chez le sauvage, *VTL2* voit son expression induite progressivement à partir de 10µM de fer et a quadruplé à 250µM (par rapport à 0µM). Chez *mco1,2,3*, l'expression de *VTL2* augmente aussi progressivement avec la concentration en fer, mais sans différence significative avec le sauvage. A 250µM de fer, *VTL2* est plus exprimé chez le mutant (0,7 fois plus).

2.4.4.3.3 VTL5

A 0µM de fer, *VTL5* est peu exprimé chez les deux génotypes, mais l'expression est supérieure chez le mutant. A 10µM de fer, l'expression de *VTL5* augmente chez les deux génotypes (0,6 fois) avec toujours plus d'expression chez le mutant (0,2 fois plus). A 25µM de fer, l'expression de *VTL5* augmente légèrement chez le sauvage mais atteint un maximum chez le mutant (2 fois plus chez le mutant que chez le sauvage), maximum qui est maintenu ensuite jusqu'à 250µM. Chez le sauvage, ce niveau d'expression est atteint à 50µM, diminue peu à 100µM et 250µM (0,1 à 0,3 fois).

2.4.4.3.4 Synthèse

Nous n'observons pas de différence d'expression chez le mutant pour *FER1* comparé au sauvage. L'expression de *NRAMP4* est réprimée chez le mutant (à 10µM) à un niveau atteint par le sauvage à une concentration en fer 5 fois supérieure (50µM). *VTL2* est plus exprimé chez le mutant à 250µM de fer (~70% de plus que Col0). *VTL5* est 2 fois plus exprimé chez le mutant que le sauvage à 25µM de fer (niveau maximum jusqu'à 250µM).

2.4.5 **Coloration histochimique du fer par Perls/DAB**

Des plantules de 7 jours ont été cultivées sur MS/2 Agar avec 50µM de Fe-EDTA (condition normale) et 250µM de Fe-EDTA (excès de fer). Après inclusion en résine Technovit7100[®], des coupes de 6µm d'épaisseur ont été découpées au microtome puis coloré par Perls/DAB. La **Figure 23** montre les profils représentatifs de coloration du fer. La coloration Perls/DAB fait ressortir les ferritines chargées en fer, seules structures où le fer se concentre assez à 50µM de Fe-EDTA pour être visible. Les ferritines sont adressées au chloroplaste et se chargent de fer dans cet organite [196]. Les coupes de feuille de sauvage en condition standard, présentent quelques grains de ferritines chargés en fer dans des cellules isolées (flèches noires). A 50µM de Fe-EDTA, *mco1,2,3* montre plus de grains de ferritines que le sauvage, particulièrement

autour des vaisseaux. En excès de fer, le nombre de grains de ferritines chargés augmente chez le sauvage, chez *mco1,2,3* le nombre de grains de ferritines chargés est plus important qu'à 50µM de Fe-EDTA et est supérieur au nombre observé chez le sauvage. Cette différence observée est significative à 50µM de Fe-EDTA (condition standard) si nous calculons le ratio des structures colorées sur le nombre de cellules mesurées sur chaque photo de coupe de cotylédons (**Figure 24**). De plus, en excès de fer, la coloration Perls/DAB montre des structures riches en fer accumulées dans les vacuoles, ces structures étant absentes chez le sauvage. Il semblerait donc que chez le triple mutant, en condition d'excès de fer, la distribution intracellulaire du fer soit perturbée, avec une plus grande accumulation de structures riches en fer visibles dans les chloroplastes (ferritines) et dans les vacuoles. Ces observations sont en accord avec les analyses d'expression de gènes, qui montraient une surexpression de *VTL2* et *VTL5* chez le triple mutant (plus de stockage de fer vacuolaire) et une répression de *NRAMP4* (moins de remobilisation du fer depuis la vacuole).

2.4.6 Détection du fer par des sondes spécifiques du Fe²⁺ ou du Fe³⁺

2.4.6.1 Les sondes à fer

Dans les milieux aérobies, les formes principales du fer en solution sont le Fe²⁺ et le Fe³⁺. La coloration Perls/DAB en histologie ne nous permet pas de mettre en lumière le fer libre, seulement le fer qui est fortement lié à des complexes, comme les sphères de ferritines. Notre équipe développe actuellement des outils de microscopie, afin de détecter mais surtout de discriminer les formes de fer libre. Ces sondes sont développées par Carine Alcon et Tou Cheu Xiong et devrait être rapidement intégrées au panel d'outils pour étudier la répartition du fer et ses états redox *in vivo* dans la plante. Ces sondes peuvent donc nous apporter une information sur l'impact de l'absence des AtMCOs sur la répartition et la forme du fer. En effet, si MCO3 est capable d'oxyder du Fe²⁺ en Fe³⁺, nous pourrions éventuellement observer une différence de forme de fer chez *les Atmco*. Pour cette dernière expérimentation, nous nous sommes focalisés sur le triple mutant *mco1,2,3*.

Une première sonde peut lier le Fe³⁺ avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 480 – 509nm respectivement ; la deuxième sonde est spécifique du Fe²⁺ avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 650 – 673nm.

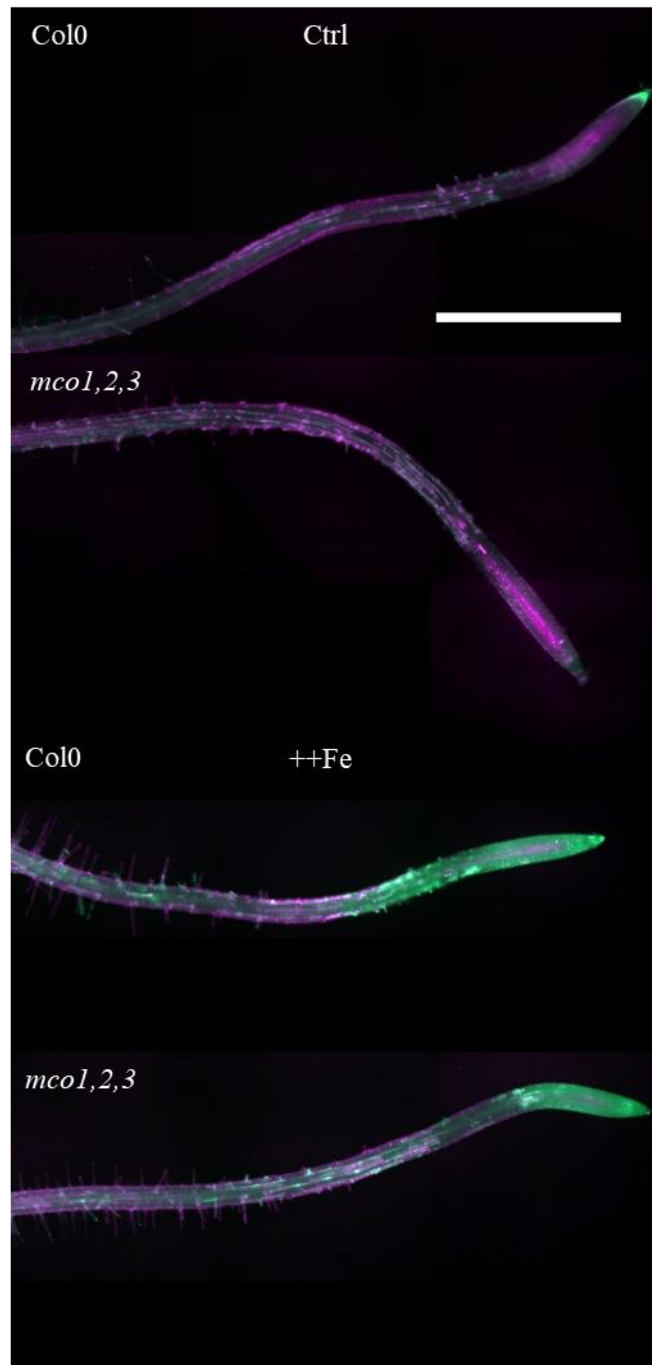


Figure 25. Répartition du fer à l'extrémité de la racine grâce aux sondes fluorescentes spécifiques du Fe^{2+} et du Fe^{3+} -- Extrémité de la racine

Les images sont une projection orthogonale des valeurs maximales des signaux de sondes fluorescentes spécifiques au fer (II) et au fer (III) à l'extrémité de la racine. Le signal violet est une sonde fluorescente spécifique au Fe^{2+} . Le signal vert est celui de la sonde fluorescente spécifique du Fe^{3+} . Ctrl : condition normale de fer $50\mu M$ Fe-EDTA. ++Fe: $500\mu M$ Fe-EDTA. Les plantes ont été cultivées *in vitro* sur un milieu MS/2 agar normal avec $50\mu M$ de Fe-EDTA pendant 6 jours, puis transférées sur un milieu MS/2 contenant $50\mu M$ ou $500\mu M$ de fer, 24h avant l'acquisition. La barre d'échelle mesure 1 mm. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes.

Des plantules de 7 jours ont été cultivées sur MS/2 Agar avec 50µM de Fe-EDTA. Au sixième jour de culture, les plantules sont transférées, soit sur un milieu identique, soit sur un milieu contenant 500µM de Fe-EDTA. Les racines des plantules sont observées après 3h d'incubation avec les deux sondes. La **Figure 25** montre le signal des deux sondes chez le sauvage et *mco1,2,3* en condition standard de fer et d'excès après transfert à l'extrémité des racines. En condition normale, chez le sauvage, le fer se répartit à la surface des cellules épidermiques sous forme de Fe²⁺ (violet) et dans l'endoderme / xylème et à l'intérieur des trichoblastes sous forme Fe³⁺ (vert). Chez *mco1,2,3* nous n'observons pas de différence notable avec le sauvage mis à part moins de signal Fe³⁺ à l'apex. En excès de fer, la forme prépondérante à l'apex est le Fe³⁺ jusque dans les cellules épidermiques, puis le Fe²⁺ est plus présent avec toujours cette répartition épiderme/Fe²⁺ et cortex-endoderme/Fe³⁺. Chez *mco1,2,3*, les signaux des sondes sont répartis de façon très similaire au sauvage sauf pour la zone d'élongation qui présente moins de signal spécifique du Fe³⁺. En excès de fer, nous attendions plutôt une diminution du signal de la sonde spécifique du Fe³⁺. Il est difficile de conclure quant à un impact de l'absence des AtMCOs sur la forme et la répartition du fer. Ces expérimentations préliminaires mériteraient plus de temps et d'optimisation, et pourquoi pas observer le signal des sondes par microscopie confocale. Ces sondes souffrent encore de beaucoup de biais, notamment vis-à-vis de leur affinité avec le fer lorsque sont présent des chélateurs. Sachant que le fer est rarement libre dans la plante, nous observons ici le fruit d'un équilibre entre les sondes et les chélateurs, ne renseignant pas vraiment sur la forme principale de fer libre. La source de fer lors de la culture des plantules est une solution de Fe-EDTA, qui n'est peut-être pas la source idéale pour mettre en lumière un effet sur la répartition des formes du fer dans la racine.

2.4.7 Un phénotype lié aux stress redox ?

2.4.7.1 Les MCOs sont des oxydases terminales

Une autre piste intéressante pour explorer le/les rôle/s des multicopper oxydases chez *Arabidopsis*, est la régulation des stress oxydants. En effet, le co-substrat commun de toutes les MCO est le dioxygène qui est réduit en deux molécules d'eau en une seule réaction, sans produire de radical libre. Cette particularité pourrait jouer un rôle dans la gestion de stress redox en diminuant la présence d'O₂ ou en limitant le Fe²⁺, forme du fer la plus réactive.

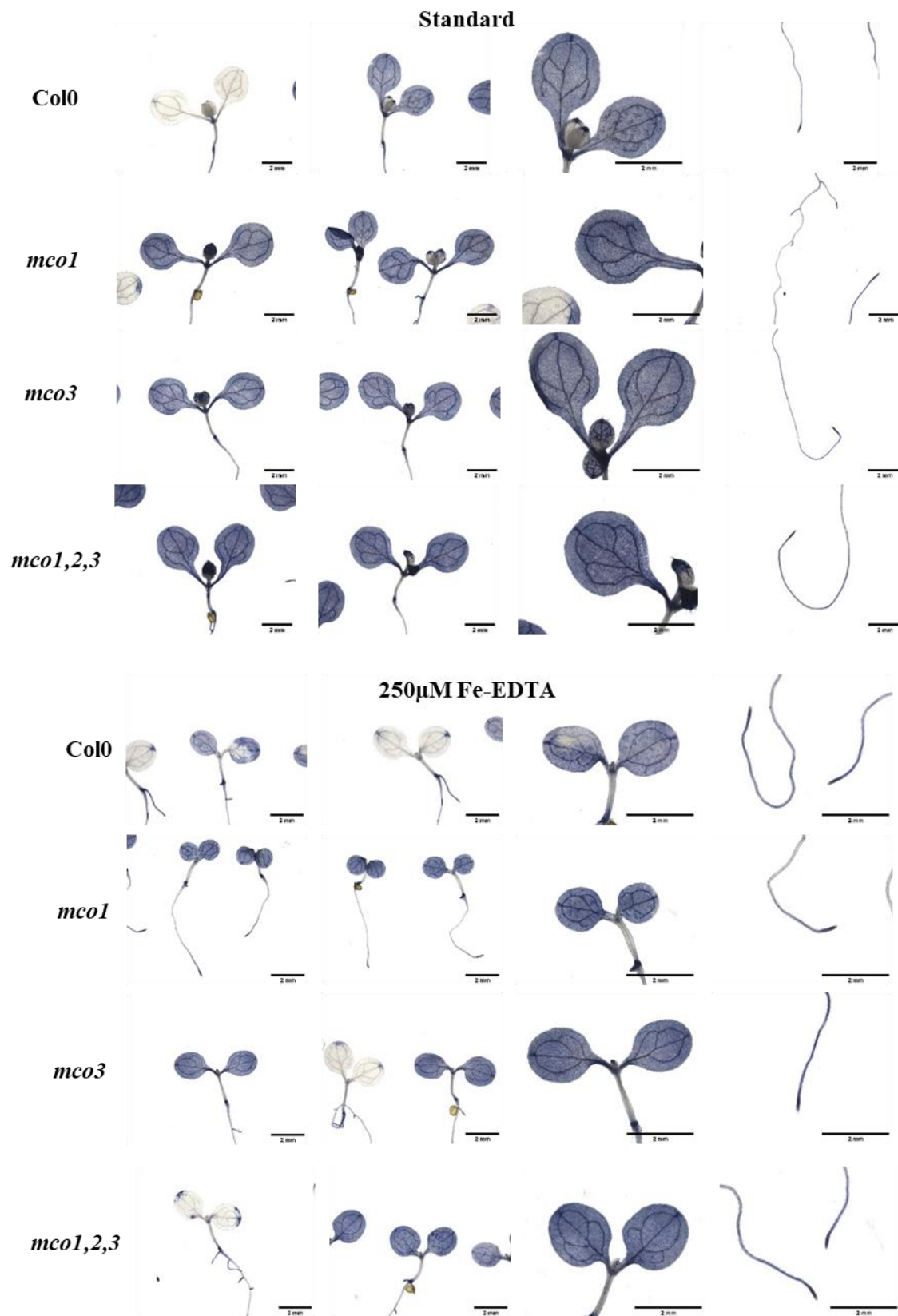


Figure 26. Coloration NBT sur des plantules de 7 jours

Les plantes sont âgées d'une semaine et cultivées sur MS/2 Agar 50µM (normal) ou 250 Fe-EDTA. La barre d'échelle mesure 2mm.

2.4.7.2 Coloration au Nitro-Blue Tetrazolium

Les ions super oxide peuvent réduire le NBT (Nitroblue tetrazolium) en diformazan, un précipité blue-sombre. Le NBT est utilisé ici pour révéler un état de stress général de la plante à un instant t. Sachant que les ions superoxyde ont une durée de vie très courte, le formazan insoluble et stable, permet de révéler la production de ces ions superoxyde.

2.4.7.2.1 Plantules de sept jours

Des plantules ont été cultivées sur MS/2 Agar contenant 50µM de Fe-EDTA (condition standard de fer) ou 250µM de Fe-EDTA (excès de fer) pendant 7 jours. Les plantules ont été colorées au NBT pendant 24h et décolorées. La **Figure 26** présente les profils de coloration obtenus pour le sauvage et les mutants *mco*.

En condition standard de fer, le sauvage présente une coloration bleue dans les cotylédons. Certaines plantes ne montraient aucune coloration (première image). L'apex racinaire est légèrement coloré. Les mutants *mco1* et *mco3* montrent une coloration des cotylédons et à l'apex racinaire. La différence n'est pas spectaculaire mais la coloration semble plus intense que chez le sauvage dans les cotylédons et moins de plantes présentaient une absence de coloration comme chez le sauvage. Le mutant *mco1,2,3* présente aussi une coloration bleue dans les cotylédons, qui semble plus intense que le sauvage et même que les simples mutants. Au niveau de la racine, l'apex et une partie de la racine mature sont colorés.

En excès de fer, le sauvage montre aussi une coloration des cotylédons avec une intensification de celle-ci dans la racine. Avec toujours une certaine hétérogénéité entre les plantules (des plantules sont soit colorées, soit très peu). Chez *mco1* et *mco3*, ainsi que *mco1,2,3* les cotylédons sont colorés et celle-ci est légèrement plus intense que chez le sauvage. La coloration dans la racine est plus intense chez les mutants qu'en condition normale de fer, mais pas différente du sauvage.

2.4.7.2.2 Plantules de quinze jours

Pour essayer d'accentuer la différence observée à 50µM de Fe-EDTA, des plantules de 15 jours ont été colorées après avoir été cultivées sur MS/2 Agar contenant 50µM de Fe-EDTA. Les plantules ont été colorées au NBT pendant 24h et décolorées. La **Figure 27** présente les profils de coloration obtenus pour le sauvage et *mco1,2,3*.

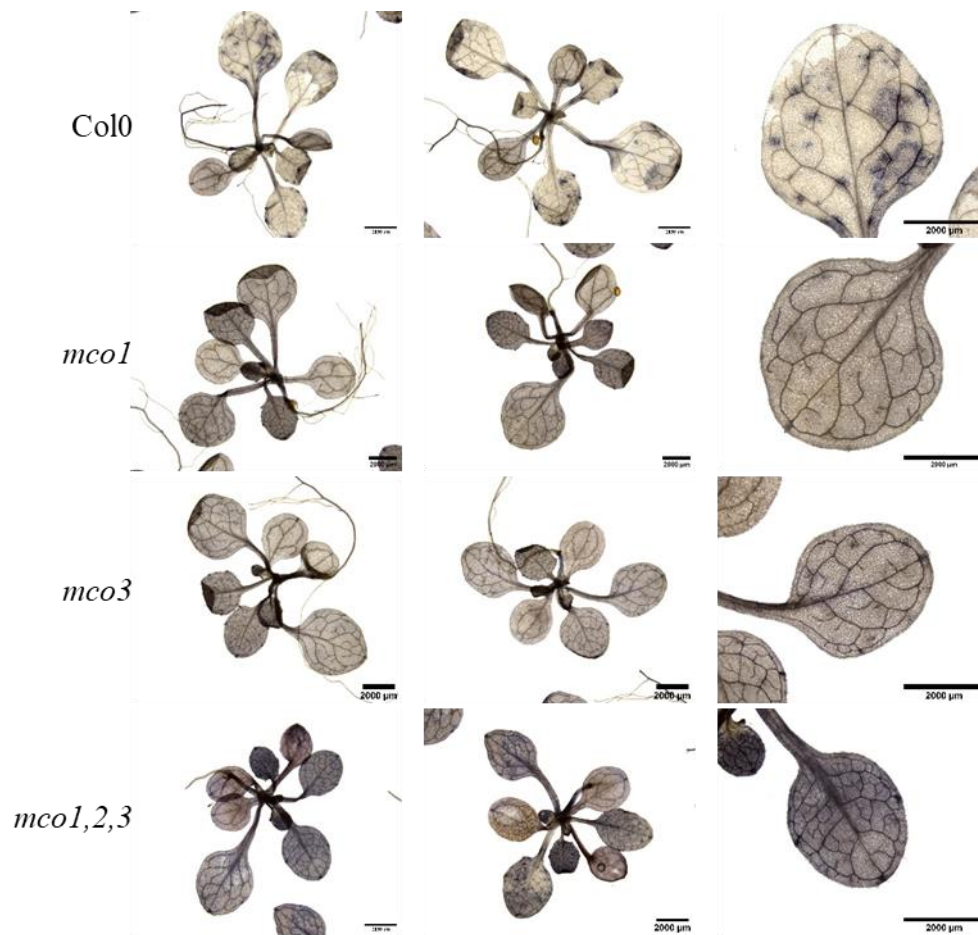


Figure 27. Coloration NBT sur des plantules de 15 jours

Les plantules sont âgées de deux semaines et cultivées sur MS/2 Agar avec 50µM de Fe-EDTA. La barre d'échelle mesure 2mm.

Chez les plantules plus âgées, le sauvage montre une coloration en patch sur certaines feuilles. Chez les simples mutants, la coloration est plus homogène dans toute la feuille. Chez *mco1,2,3* la coloration est plus importante que chez les simples mutants et surtout du sauvage.

2.4.7.3 Récapitulatif des colorations au NBT

Le mutant *mco1,2,3* à 7 jours ou à 15 jours montre une coloration NBT plus importante que le sauvage. Cette différence s'accroît à un stade plus tardif à 50µM de Fe-EDTA. Chez les simples mutants, la coloration semble plus importante que chez le sauvage mais la différence est plus faible que chez *mco1,2,3*. L'absence des AtMCOs induirait un état de stress oxydatif plus important. La coloration NBT permet de révéler la présence d'ions superoxyde à un instant t et dans nos conditions, renseigne de l'état de stress redox général de la plante. Au regard des colorations, *mco1,2,3* serait plus stressé que le sauvage.

3 DISCUSSION

3.1 MCO3 est-elle une ferroxidase ?

3.1.1 MCO1 et MCO3 des MCOs apoplastiques

Nous avons concentré nos efforts sur MCO3, l'AtMCO qui est exprimée dans toute la feuille et en plus grande quantité que MCO1 et MCO2. En expression transitoire en tabac, la construction MCO3::RFP est adressée à l'apoplaste. La plasmolyse des disques foliaires suggère que la localisation de MCO3 est essentiellement apoplastique comme le signal RFP s'éloigne du signal de la PM-Apo (contrôle de membrane plasmique) après le traitement au mannitol. De plus des peptides spécifiques de MCO3 sont détectés dans un protéome de protéines de paroi [197], nous confortant avec une localisation extracellulaire.

Les Multicopper oxydases sont des protéines dont la présence et l'activité est exocytoplasmique, tous règnes confondus [185]. Elles sont traduites par des ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et en fonction de la présence d'un site de clivage dans la séquence, les MCOs sont des protéines transmembranaires de type I ou bien des protéines solubles extracellulaires. MCO3 est adressée à l'apoplaste. L'outil SignalP 6.0 prédit un peptide signal avec une probabilité de 0,9991 ainsi qu'un site de clivage à la position 35 – 36 (**Figure 28**). L'adressage subcellulaire à l'apoplaste est observé chez *N.tabacum* avec la fusion MCO3::RFP sous un promoteur Ubiquitine10. L'intérêt de ce promoteur est de limiter le risque de silencing que peut induire l'insertion multiple de p35S. Cependant, parfois le niveau d'expression avec un pUBI est plus faible. Le signal RFP observé reste relativement faible, comparé au contrôle PM-Apo. Le signal RFP de la même construction dans des lignées stables d'*Arabidopsis* est trop faible pour pouvoir confirmer les résultats en tabac, même par microscopie confocale. Il serait judicieux de reproduire les résultats avec un promoteur fort pour augmenter le signal ce qui permettrait la mise en place de nouvelles expérimentations pour explorer l'adressage de MCO3 dans le futur. Notamment l'utilisation de drogues comme le nocodazole ou la cytochalasine D pour inhiber la sécrétion et observer une extinction du signal RFP dans l'apoplaste par exemple. Nous avons tenté également quelques essais de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) sur des *Arabidopsis* exprimant MCO3::RFP. Cette technique permet d'observer le rétablissement (ou non) du signal après un choc laser. La

vitesse du rétablissement peut renseigner sur la localisation de la protéine cible : une récupération très rapide indique une localisation cytosolique ou apoplastique (suivant le compartiment ciblé) ou bien membranaire, si celui-ci est plus long. Le signal RFP mesuré étant trop faible dès le départ, nous n'avons pas pu conclure quant à un adressage apoplastique de MCO3 avec cette technique. Un essai avec une construction p35S-MCO3::RFP serait plus efficace.

Quoi qu'il en soit, la localisation apoplastique de MCO3 est cohérente avec la littérature des MCOs. Concernant les MCOs ayant une activité ferroxidase, que ce soit chez les 3d-MCOs ou les 6d-MCOs (MCO3 étant une 3d-MCO), nous retrouvons des localisations membranaires de type I (un seul domaine transmembranaire) avec un ecto-domaine extracellulaire et des MCOs soluble mais sécrétées (Toutes les Cp des mammifères). C'est aussi le cas chez les laccases où il existe ces deux types de localisation. La localisation de MCO3 ne va pas à l'encontre d'une activité ferroxidase, par exemple la Céruloplasmine est une ferroxidase sécrétée. Chez les plantes supérieures, le premier front de l'excès de fer libre dans la cellule est vraisemblablement dans l'apoplaste, à la surface de la membrane plasmique. La présence d'une ferroxidase dans l'apoplaste permettrait de limiter la présence de Fe^{2+} libre à la surface de la cellule, le temps de compenser l'excès par la sécrétion de chélateurs et d'acides organiques par exemple. En oxydant le fer, elle réduit le dioxygène en H_2O , limitant aussi la production potentielle de radicaux libres. Parmi les MCOs, les ascorbates oxydases connues sont principalement des protéines apoplastiques [198], [199]. Les MCOs ont un large spectre de co-substrat, elles ont toutes une activité phénol oxydase, les ferroxidases font partie des métallo-oxydases mais leur spécificité n'est pas stricte et elles oxydent souvent d'autres métaux. La Cp et FET3 oxydent le cuivre par exemple, les laccases en général ont une multitude de substrats différents à la fois. MCO3 pourrait éventuellement avoir plus d'un substrat et sa localisation est la même que les MCOs ayant une activité d'oxydation de l'ascorbate. Nous ne pouvons donc pas exclure que MCO3 (ainsi que MCO1 et MCO2) soit également capable d'oxyder le pool d'ascorbate apoplastique. D'un point de vue du statut redox du fer, la conséquence est la même : si les MCO oxydent l'ascorbate, alors le potentiel redox de l'apoplaste devient moins réducteur, déplaçant ainsi l'équilibre Fe^{2+}/Fe^{3+} vers la forme oxydée, Fe^{3+} , de manière indirecte.

La localisation de MCO1 est extracellulaire, comme MCO3, très probablement dans l'apoplaste également. Cependant, après plasmolyse, le signal ne se diffuse pas comme MCO3. Pour cette dernière, le signal étant relativement faible avant plasmolyse, perd de son intensité

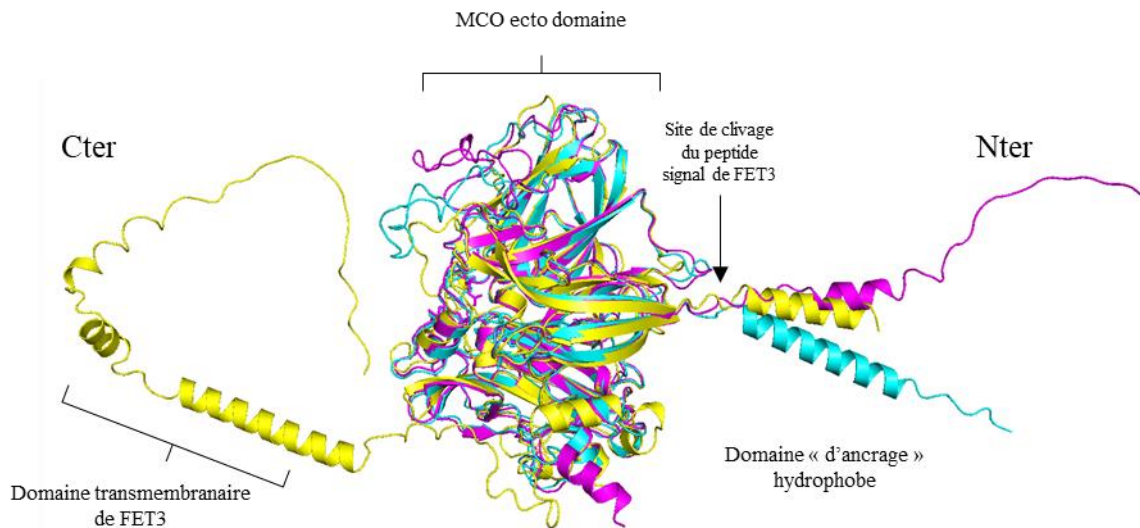


Figure 29. Superposition de FET3, MCO1 et MCO3, vue des domaines transmembranaires

Jaune : FET3 avec domaine transmembranaire (obtenu grâce à l'algorithme AlphaFold2 de Mirdita *et al* 2021 à partir de la séquence protéique : <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>)
 Bleu : MCO1, Violet : MCO3

En Nter sont représentés les domaines d'ancrages à la membrane avant les sites de clivages des peptides signal. Chez FET3, ce peptide est bien clivé, le domaine transmembranaire s'intégrant à la membrane. MCO1 et MCO3 ne présentent pas d'autre domaine d'ancrage ou de domaine transmembranaire. Leur localisation apoplastique suggère un clivage de cette séquence comme chez FET3 (Hasset *et al* 1994). Les sites de clivage sont prédit dans cette zone par SignalP.

après plasmolyse, signe que les protéines se dispersent dans le volume créé. Dans le cas de MCO1, le signal RFP diffuse très peu. Cette observation n'est pas liée à une mauvaise plasmolyse, et a été observée avec plusieurs cellules et sur différents disques foliaires. Le signal ne colocalise pas exactement avec la membrane plasmique (avant ou après plasmolyse), mais la proximité des deux signaux nous permet néanmoins d'imaginer une interaction avec la membrane qui retiendrait la protéine au fur et à mesure que la membrane plasmique se rétracte. Cette hypothèse nécessite une vérification avec une protéine spécifique de la paroi comme contrôle (en fusion avec une protéine fluorescente autre que la RFP ou la GFP qui est sensible aux pH acides de l'apoplaste). L'hypothèse d'une interaction avec la membrane est corroborée par le fait que les protéines MCO2 et MCO3 ont été identifiées dans un protéome d'extraits apoplastiques [197] mais pas MCO1.

D'un point de vue structurel, MCO3 et MCO1 n'ont pas un domaine d'ancrage à la membrane de même taille, il est trois fois plus grand chez MCO1 et cette différence de taille d'hélice hydrophobe peut expliquer que MCO1 reste plus associé à la membrane plasmique que MCO3 lors d'une plasmolyse à cause d'un ancrage qui serait plus de « surface » plutôt que traversant celle-ci (**Figure 29**).

Des trois AtMCOs, MCO3 est la plus abondante. D'après l'expression du gène GUS sous le promoteur de MCO3, celle-ci est exprimée dans tout le tissu foliaire de façon homogène. Nous nous sommes focalisés sur cette protéine pour essayer de compléter le mutant *fet3fet4* et mesurer une éventuelle activité ferroxidase.

3.1.2 MCO3 peut remplacer FET3 chez la levure

La complémentation du mutant *fet3fet4* n'est pas simple. De fait *fet3fet4* est très sensible à la carence en fer, et même l'expression de transporteur de fer ne rétablit que très peu sa capacité à croître en carence. Ce mutant n'a plus de système de transport de haute affinité du fer (FET3/FTR1) fonctionnel, ni de transporteur de Fe^{2+} . L'activité de FTR1 nécessite l'oxydation du fer en Fe^{3+} au niveau du transporteur (forme transportée) car il forme rapidement des oxydes de fer dans un milieu aérobie et précipite. Cette contrainte a conduit la sélection d'un mécanisme de canalisation du Fe^{3+} de FET3 vers FTR1 pour limiter la formation d'oxyde avec l' O_2 . Le Fe^{3+} doit donc se trouver près de FTR1 au moment de sa formation, ceci est d'autant plus vrai, FTR1 étant incapable de récupérer du Fe^{3+} depuis un complexe ou même libre [149].

MCO3 ayant un peptide signal et étant très probablement sécrétée également chez la levure, la raison principale de l'échec de la complémentation de *fet3fet4* avec MCO3 serait une oxydation du fer insuffisante à la surface de la membrane plasmique permettant à FTR1 d'importer le précieux métal. La stratégie adoptée fut de modifier MCO3 pour ajouter le domaine transmembranaire de FET3 à MCO3 pour maintenir l'ecto-domaine du côté extracellulaire et favoriser l'oxydation du fer le plus près possible de FTR1. La MCO3 chimérique (MCO3(ch)) exprimée chez *fet3fet4* complémente le mutant et récupère aussi bien le phénotype du mutant qu'avec des transporteurs de fer (NRAMPs, IRTs, YSLs ...). Dans nos conditions, la présence de MCO3 à la membrane plasmique est suffisante pour maintenir un transport de fer et complémente *fet3fet4*. Ceci est d'autant plus remarquable qu'elle implique que l'oxydation du fer doit avoir lieu au plus proche de FTR1 afin qu'il puisse récupérer le Fe³⁺ immédiatement oxydé et donc que très vraisemblablement les deux protéines interagissent physiquement.

3.1.3 MCO3 peut réduire de l'O₂ en présence de fer

Pour mieux caractériser l'activité de MCO3 et apporter un argument supplémentaire pour affirmer que MCO3 est capable d'oxyder du fer, nous avons adopté la stratégie suivante : mesurer non pas la consommation de Fe²⁺, ni l'apparition de Fe³⁺ – le Fe²⁺ s'oxyde rapidement en Fe³⁺ et cette oxydation spontanée peut rapidement biaiser l'expérimentation en occultant la part d'oxydation liée à MCO3 – mais la consommation du co-substrat de la réaction : le dioxygène.

Après plusieurs tentatives infructueuses de production de MCO3 (glycosylée) avec *Pichia pastoris*, et dans le souci de perdre le moins de temps possible, nous nous sommes dirigés vers une approche utilisant les outils à notre disposition qui avaient fait leurs preuves : les lignées *fet3fet4* exprimant MCO3(ch). L'idée était de mesurer la consommation en dioxygène de levures exprimant à leur surface l'ecto-domaine de MCO3, après injection de fer dans le milieu. Puis de comparer cette consommation à celle du mutant *fet3fet4*, sans ferroxidase de surface, et à celle de la levure sauvage, présentant une ferroxidase de surface. Nous observons une consommation de dioxygène lié à la présence de MCO3, indépendamment de la respiration mitochondriale, du même ordre de grandeur que notre contrôle positif sauvage et que FET3 chez De Silva *et al* en 1995 [147]. Avant d'obtenir ces résultats nous avons dû optimiser nos conditions de culture. Pour induire FET3 chez le sauvage, il doit être cultivé en déficit de fer.

Dans un souci de limiter les biais, *fet3fet4*-MCO3(ch) est cultivée dans les mêmes conditions. Cependant le mutant *fet3fet4* étant très capricieux dès que la concentration en fer est limitée, et pour que la culture du mutant soit la plus active possible, il a été cultivé en présence de suffisamment de fer. Ainsi les cultures de *fet3fet4* utilisées comme contrôle négatif n'ont pas été traitées de la même manière que le reste de nos lignées. Pour éliminer tout doute quant au lien entre la consommation en dioxygène liée à MCO3(ch)/FET3, un contrôle positif consistant en *fet3fet4* exprimant FET3 est plus judicieux.

La levure est un organisme aérobie, qui consomme du dioxygène pour sa respiration. Elle est aussi capable de fermentation alcoolique. La respiration est induite par la présence de dioxygène, ayant un bilan énergétique plus intéressant que la fermentation. Il est possible d'induire la fermentation alcoolique en ajoutant du glucose dans le milieu [200], [201]. Pour limiter la respiration des cultures nous cultivons les lignées avec 2% de glucose dans des tubes à vis pour empêcher les échanges d'oxygène, puis nous maintenons une concentration en glucose de 4% dans le tampon de mesure pour réprimer la fermentation au maximum. Sans cette précaution, la quantité de départ en O₂ dans la chambre (~200µM soit 0,4µmol) est consommée en moins de deux minutes par la culture, occultant totalement la consommation de MCO3 ou de FET3. En présence de glucose, nous diminuons drastiquement la respiration mais nous ne la réprimons jamais entièrement, nécessitant l'usage d'un inhibiteur de la respiration, l'antimycine (ama). Ainsi en diminuant la respiration au départ, nous avons le temps de stabiliser la mesure et d'arrêter complètement la respiration avec l'ama après quelques minutes pour conserver une concentration en dioxygène importante pour effectuer toutes les injections de substrats. Dans ces conditions, MCO3(ch) montre une consommation en O₂ significativement supérieure à *fet3fet4* après injection de fer dans le milieu. La consommation observée est la somme de toutes les réactions consommant du dioxygène, la respiration résiduelle, et l'activité des oxydases de surfaces (dont MCO3 et FET3) etc... Nous nous mettons dans les meilleures conditions pour obtenir une réponse mesurable reliée à la présence de MCO3(ch). L'activité de FET3 a été caractérisée d'une manière similaire par De Silva *et al* en 1995 [147] avec un système inductible. Ils ont mesuré la consommation de cultures induites après avoir été cultivées en carence de fer (souche sauvage DY1451 [150]). Après injection de fer, ils ont mesuré la concentration en O₂ avec une électrode de Clark. Leurs conditions expérimentales sont légèrement différentes des nôtres, notamment l'unité de mesure de la concentration en dioxygène (µM.min⁻¹) ou le volume de culture (3mL). Cependant, en convertissant leurs

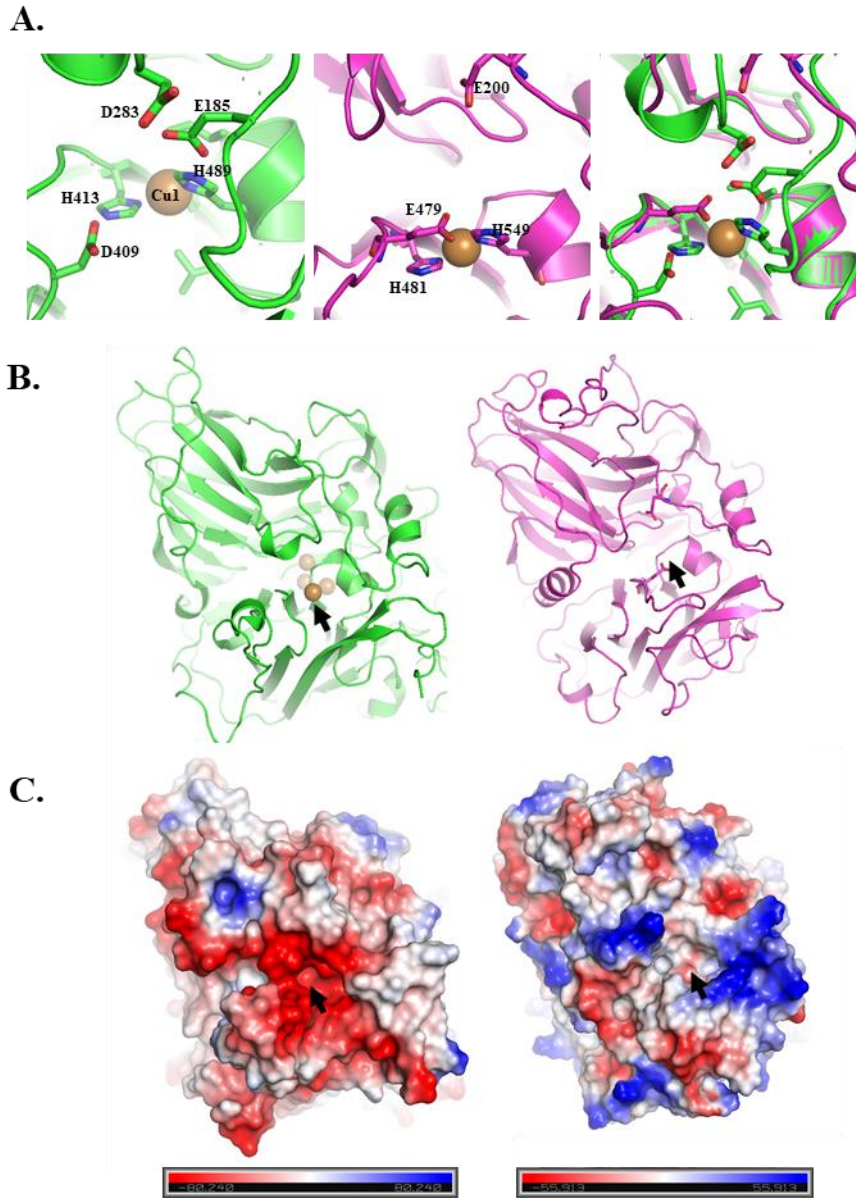


Figure 30. Structures 3D de FET3 et MCO3, vue du site de liaison du fer

- A. Zoom sur le site de liaison du fer de FET3 (gauche), la sphère orange représente l'atome de cuivre du centre T1 lié par deux résidus H413 et H489. Les résidus E185, D283 et D409 sont essentiels à la liaison du fer d'après Taylor *et al* 2005. Au milieu, la même zone chez MCO3 avec un résidu E200 et D479 les plus proches du site putatif de liaison du fer de FET3. A droite, la superposition des deux sites
- B. Les structures sont représentées avec le logiciel PyMOL. La structure de FET3 (vert) avec les quatre cuivres, la structure de MCO3 (violet) toutes deux orientées pour présenter le cuivre du centre T1 (oxydant le fer) au premier plan.
- C. Représentation qualitative de la répartition des charges électrostatiques de surface de FET3 (gauche) et MCO3 (droite). Rouge : charge négative, Bleu : charge positive. La flèche noire indique la position du cuivre du centre T1.

acquisitions et les nôtres en $\mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cellules}$, nous obtenons des valeurs très proches, nous confortant dans l'association de l'augmentation de la consommation en O_2 que nous observons avec la présence de MCO3 (ou FET3 pour le sauvage), en présence de FeSO_4 . Enfin l'interaction de la ferroxidase avec FTR1 est un prérequis pour la récupération de *fet3fet4*, puisque celui-ci ne possède pas d'autre transporteur du fer à la membrane plasmique (Fet4) pouvant compenser.

3.1.4 Réflexions sur la structure de FET3 et MCO3

FET3 et MCO3 sont des 3dMCOs (voir Structure des MCOs, page 30), dont le repliement dans l'espace de leur ectodomaine est très similaires. Les deux protéines conservent les motifs caractéristiques de liaisons des atomes de cuivre propres aux MCOs, la combinaison des centres à cuivres T1 et T2/T3. Plusieurs résidus de FET3 joueraient un rôle important dans la reconnaissance du fer, ils ont été déterminés par une approche de mutagénèse dirigée et de mesure d'activité ferroxidase. Les résidus E185, D283 et D409 seraient essentiels à la liaison du fer et formeraient un site de liaison du fer [151], proche de l'atome de cuivre du centre T1, cuivre qui transfère les électrons du substrat des MCOs vers le centre T2/T3. La **Figure 30A** montre le site de liaison du fer de FET3, la même zone chez MCO3 et la superposition des deux. Chez FET3, l'atome de cuivre du centre T1 est complexé par deux résidus H413 et H489. Chez MCO3 nous retrouvons à l'exacte position deux résidus H481 et H549. Autour de l'atome de cuivre du T1, chez FET3, nous pouvons voir les trois résidus avec une fonction acide carboxylique présentés par Taylor *et al* 2005. Chez MCO3, nous retrouvons au moins deux résidus avec la même fonction acide, E200 et E479, proches de E185 et D409. Avec cependant une distance plus grande entre le cuivre et le résidu E200 (comparé au E185 ou D283 chez FET3). Ces résidus pourraient être impliqués dans l'activité ferroxidase de MCO3. Les **Figures 30B et C** montrent le profil des deux protéines et la représentation qualitative des charges électrostatiques de surface. Le logiciel PyMOL ne permet pas d'effectuer une mesure précise des charges, ceci reste une grande approximation de la réalité. Les flèches noires indiquent la position du site de liaison du fer putatif. Chez FET3, l'environnement autour de ce site est majoritairement chargé négativement (rouge). Chez MCO3, l'environnement du site de liaison du fer est moins chargé négativement. Cette observation paraît contradictoire, mais FET3 est une protéine exprimée en carence de fer, en présence de réductases à la surface de la cellule. Le substrat de FET3 est un ion de Fe^{2+} libre, qu'elle transmet oxydé à FTR1. A la surface de la cellule végétale, à part à quelques zones précises dans l'organisme (surface de la racine, et

apoplaste jusqu'aux dépôts de subérine par exemple) le fer est très probablement chélaté, ainsi le substrat le plus efficace pour l'activité de MCO3 pourrait être un complexe Fe²⁺-Nicotianamine. De plus, les AtMCOs sont induites en excès de fer et non en carence comme chez FET3, MCO3 peut avoir une affinité plus faible que FET3 pour le fer. Enfin le complexe Fe²⁺-NA s'il s'agit du substrat de MCO3 pourrait nécessiter plus de place dans le site de liaison du fer, expliquant la distance plus grande du résidu E200 par rapport au T1. Il aurait donc été intéressant de tester le Fe²⁺-NA comme substrat, en jouant également sur la présence d'acides organiques ayant une plus forte affinité pour le Fe³⁺ ainsi généré.

3.2 Quel rôle pour les AtMCOs ?

3.2.1 Un phénotype en excès de fer

Le mutant *mco1,2,3* présente un phénotype de la croissance racinaire, et développe moins de racines latérales. L'excès de fer génère des ROS, induisant les réponses à l'excès : synthèse de ferritines, arrêt de la croissance racinaire, répression d'*IRT1* et *FRO2* etc... Si les AtMCOs participent à la régulation de l'état redox du fer, elles permettraient de limiter la génération de ROS en oxydant le Fe²⁺ en Fe³⁺ moins générateur de radicaux en présence d'oxygène. Chez *mco1,2,3*, la croissance de la racine primaire est ralentie, il subirait plus l'excès de fer que le sauvage. Chez les simples mutants, la redondance avec les autres AtMCOs, limiterait l'impact de l'excès. Et chez *mco1,2,3*, l'effet de l'excès n'est pas très impressionnant au premier abord. Cependant il existe peu de mutant avec un phénotype macroscopique en excès de fer. Le quadruple mutant *Atfer1,3,4* développe une plus petite rosette à 45 jours avec un très fort excès de fer (2mM) [124] ; ainsi que l'arrêt de la racine primaire après transfert sur un milieu contenant 500µM de fer [202]. Ces deux conditions sont violentes, ici nous utilisons 250µM de Fe-EDTA comme condition d'excès de fer.

En dosant le fer total dans les plantules, nous espérons montrer un effet sur la quantité totale de fer. L'oxydation du fer modifie la mobilité du fer, le Fe³⁺ est insoluble et forme des oxydes si du dioxygène est présent. MCO1 est principalement induite dans le cortex de la racine, et son activité pourrait limiter le transport du fer pendant un excès. Nous attendions au moins un impact chez *mco1* et *mco1,2,3*. L'effet sur le développement de la racine primaire de *mco1,2,3* est subtil, et nous n'observons pas de différence de quantité de fer total significative entre tous les génotypes, ni chez *mco1*, ni chez *mco1,2,3*. Les plantes sont cultivées du semi jusqu'à la

récolte sur le même milieu, il ne s'agit pas ici de plantes transférées d'un milieu normal vers un milieu en excès de fer. Chez les plantes en excès, les transporteurs de fer, tels que IRT1 sont fortement réprimés. C'est une des raisons qui nous a incité à choisir le Fe-EDTA comme source de fer parmi toutes les autres formes chélatées ou non (FeCl₃, FeSO₄, Fe-Citrate, Fe-Malate etc...). La répression des transporteurs de métaux à un stade précoce limite probablement l'effet de l'excès. Mesurer la quantité de fer non pas dans la plante entière mais dans les racines et les rosettes séparément serait plus informatif. La perception du statut en fer a lieu dans la rosette. Si *mco1,2,3* est plus sensible à l'excès de fer, il est susceptible de réagir plus tôt dans son développement pour limiter au maximum l'entrée de fer dans l'organisme, diminuant avec le temps nos chances d'observer une différence en quantité de fer total dans la plante entière. Dans ce cas de figure, nous pourrions éventuellement mesurer une augmentation de la quantité de fer dans la racine par rapport à la rosette. Et nous serions plus susceptible de voir un effet avec un transfert sur excès qui serait plus violent.

Sans différence de concentration en fer total, les AtMCOs pourraient réguler le flux de fer et le canaliser lors d'un excès en favorisant la forme la moins génératrice de ROS. L'activité des AtMCOs influencerait la distribution du fer entre apoplaste et cytosol, plutôt que sa concentration, sachant que *MCO3* est induit proche des vaisseaux, nous espérons une différence de la répartition du fer dans le tissu avec la coloration Perls/DAB. Manifestement, si différence au niveau de la répartition du fer dans le tissu il y a, elle reste trop subtile pour être visible à cette échelle par Perls/DAB. Le principe de l'intensification DAB est de diminuer fortement le seuil de détection du fer ; les concentrations faibles apparaissent plus intenses, mais nous perdons une grande partie de la linéarité de la coloration Perls lors de la polymérisation du DAB.

MCO3 étant apoplastique et induite dans tout le cotylédon, la différence de répartition pourrait se situer au niveau cellulaire plutôt que tissulaire. Aux endroits où le fer est présent, les MCOs limitent son entrée dans la cellule. La coloration Perls/DAB sur les coupes histologiques montre enfin une différence avec le sauvage à 50µM de fer en nombre de ferritines colorées qui augmente chez *mco1,2,3* et en excès en nombre de ferritines colorées ainsi que d'autres structures inconnues colorées par le Perls/DAB, suggérant une forte perturbation de la répartition du fer à l'échelle cellulaire. L'absence des AtMCOs induit une accumulation de fer plus importante dans les cellules du mésophylle. Cette accumulation doit rester soutenable pour la plante qui ne présente pas un phénotype macroscopique par rapport au sauvage en excès de

fer. En Introduction, nous rappelons les zones où nous attendons, si elle existe, une activité ferroxidase. Parmi elles, nous évoquons bien sûr la surface de la cellule du tissu foliaire qui peut faire face à différents types d'excès. Un excès dû à une augmentation du flux de fer venant du phloème et plus précisément un excès de Fe^{2+} généré par les ferriréductases telles que les FROs. Lors de l'exploration du sol par la racine, la plante peut rencontrer des zones plus riches en fer dont la répartition dans le sol est hétérogène. La répression de *FRO2* et d'*IRT1* chez *Arabidopsis* est observable 24h après transfert sur un milieu en excès, après 7 jours en carence [203]. La plante est susceptible d'expérimenter ce genre de condition, par exemple sur des sols calcaires où le fer est très peu disponible. L'internalisation rapide d'*IRT1* est principalement dirigée par l'excès d'autres métaux que le fer (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+}), la quantité de fer dans le milieu n'influe pas sur la demi-vie d'*IRT1* qui est constamment endocyté/ré-adressé pour éviter les autres métaux divalents [88], [203]. Le fer n'influencerait que la régulation transcriptionnelle de *IRT1*. Cette régulation transcriptionnelle par le fer et le maintien d'une demi-vie longue de la protéine (le fer n'influant pas sur l'ubiquitination d'*IRT1*) quel que soit le statut en fer, favorise les excès de fer lorsque la plante passe d'un milieu déficient vers un milieu riche en fer. Ou bien vers des sols plus acides ou encore immergés (les milieux réducteurs font pencher l'équilibre du fer vers la forme Fe^{2+} la plus mobile). Le flux de fer est canalisé, tamponné par les ferritines, spécialement lors du développement précoce de la plantule pour atteindre l'autotrophie. Les protéines impliquées dans la photosynthèse sont à l'origine de la majorité de la demande en fer de l'organisme. Environ 80% du fer total des feuilles se trouve dans les chloroplastes. Lors d'un stress lumineux, les systèmes photosynthétiques produisent des ROS. Cette génération de ROS endommage le chloroplaste et peut résulter en un relargage du fer contenu dans les protéines à fer de la chaîne photosynthétique. De plus, le fer peut être photo-réduit, la lumière générant du Fe^{2+} . MCO1 et MCO3 pourraient participer à la canalisation d'un excès de fer en détournant le pouvoir oxydant du dioxygène, pour maintenir le fer sous forme Fe^{3+} moins mobile et moins génératrice de ROS, et sans produire d'intermédiaire de l'oxygène.

3.2.2 Réaction de l'homéostasie du fer cellulaire

Pour mieux comprendre l'impact de l'absence des AtMCOs sur la répartition du fer dans la cellule, nous avons mesuré la réponse transcriptionnelle d'acteurs importants de l'homéostasie du fer. Le premier acteur, *FER1*, est le gène principal codant pour les ferritines dans tout l'organisme avec *FER3*, les autres gènes de la famille *FER*, *FER2* et 4, sont exprimés

respectivement dans la graine et dans les feuilles [204]. *NRAMP4*, code pour un transporteur de fer au tonoplaste qui transporte le fer de la vacuole vers le cytoplasme pour mobiliser les ressources de fer lors d'une carence ou lors du développement de la plantule [175]. Son expression reflète bien la perception d'une carence et donc un besoin de remobiliser les stocks de fer. Au contraire, sa répression indiquerait la perception d'un excès. *VTL2* et *VTL5* (vacuolar iron transporter-like 2 et 5), codent pour des homologues de *VIT1* (vacuolar iron transporter 1), codant pour un transporteur de fer du cytoplasme vers la vacuole [205]. Leur localisation cellulaire n'a pas été formellement caractérisée mais leur séquence protéique est très proche et *VTL2* et *VTL5* sont exprimés en présence de fer, expression qui augmente avec des concentrations croissantes en fer. Nous attendons donc que leur expression réponde de manière opposée à celle de *NRAMP4*.

Chez Col0, *FER1* est induit progressivement à mesure que la concentration en fer augmente. Chez *mco1,2,3*, nous n'observons pas de différence d'expression par rapport au sauvage. Nous attendions une expression accrue de la part du mutant au regard de la coloration Perls/DAB en histologie qui indique plus de ferritines chargées chez *mco1,2,3*. Cette observation n'est pas réhibitoire dans notre cas, premièrement, *FER1* n'est pas le seul gène codant pour les ferritines, *FER3*, un autre membre de la famille *FER* est également exprimé dans tout l'organisme (rosette et racines), est-ce que *FER3* lui est plus induit chez *mco1,2,3* ? Deuxièmement, la production des transcrits de *FER1* ne rend pas compte des éventuelles régulations post-transcriptionnelles et traductionnelles de *FER1*. Troisièmement, à 250µM de fer, la plante doit certainement mettre en place d'autres stratégies d'évitement de l'excès de fer, il serait très intéressant de mesurer la quantité de chélateurs du fer comme la nicotianamine par exemple. L'induction de *MCO1* et *MCO3* pourraient très bien être des acteurs de cet évitement lorsque les ferritines ne sont plus suffisantes, l'expression de *FER1* atteignant son maximum à 250µM, et la plante investissant plus de ressources ailleurs. Pour contenir un excès de flux de fer entrant ou de fer libre présent, nous connaissons actuellement peu de solutions que la cellule utilise.

Les ferritines sont localisées dans le chloroplaste, grosse réserve de fer dans la cellule. Les ferritines tamponnent ainsi une grande partie de la variation de la concentration en fer dans la cellule. Un autre lieu de stockage du fer est la vacuole. Dans l'homéostasie du fer, elle joue un rôle dans les stades précoces du développement normal de la plantule ; elle contient les réserves de fer de l'embryon qui vont être mobilisées dès la germination. *IRT1* ne prends le relais de

l'approvisionnement en fer qu'à partir du troisième jour de développement [175]. La cellule possède des transporteurs vacuolaires de fer comme *NRAMP3* et 4. *NRAMP4* est induit chez la jeune plantule et le double mutant *nramp3,4* est très ralenti dans les premiers jours de croissance [175]. La famille de VIT1 (les nodulin-like proteins) serait le pendant négatif des *NRAMP3-4*. VIT1 est adressé au tonoplaste et transporte le fer vers la vacuole. Dans cette famille, tous les gènes sont induits par l'excès de fer, dont *VTL2* et *VTL5* [205].

Chez *mco1,2,3* l'expression de *NRAMP4* est réprimée à 10µM, à un niveau atteint par le sauvage à une concentration en fer 5 fois supérieure (50µM). *VTL2* est plus exprimé chez le mutant à 250µM de fer (~70% de plus que Col0). *VTL5* est 2 fois plus exprimé chez le mutant que le sauvage à 25µM de fer (niveau maximum jusqu'à 250µM). Avec la concentration en fer qui augmente, la plante sauvage induit les ferritines pour canaliser le flux de fer. A 25µM de fer *NRAMP4* est réprimé et les *VTLs* induits ; traduisant une inversion du sens du flux de fer, de la vacuole vers le cytoplasme en un flux depuis le cytoplasme vers la vacuole pour tamponner l'excès fer de la cellule. A 50µM, *NRAMP4* atteint son minimum, nous supposons que le flux vacuole vers cytoplasme également. Concernant les *VTLs*, *VTL2* est presque à son maximum dans nos conditions et *VTL5* l'a atteint : le flux de fer est entièrement redirigé vers la vacuole. Chez *mco1,2,3* ce basculement du flux de fer vers la vacuole a lieu à des concentrations en fer plus faibles que le sauvage. Plus précisément, le flux vers le cytoplasme est fortement diminué à 10µM de fer et à 25µM de fer, le flux vers la vacuole est plus important (au moins pour l'expression de *VTL5*). Bien sûr, les expressions de *NRAMP4* et des *VTLs* ne se suffisent pas à elles-mêmes pour rendre compte de l'intensité absolue de ces flux, ce serait un raccourci risqué, mais elles indiquent une tendance générale de la plante à mobiliser ou à stocker du fer au niveau de la cellule. Les AtMCOs ont un impact sur la redistribution du fer au niveau de la cellule. Pour MCO3 au moins, nous pouvons déclarer qu'elle est capable de ferroxidation *in vitro*, ferroxidation qui influence directement la mobilité du fer (le Fe³⁺ étant moins soluble). MCO1 du point de vue de sa séquence protéique est la plus proche de FET3, nous pouvons nous attendre également à ce qu'elle puisse oxyder du fer. MCO2 est très similaire à MCO3 (71% d'identité) et leur duplication est probablement récente.

3.2.3 Les AtMCOs sont annotées comme L-Ascorbate oxydases

Les multicopper oxydases, sont des protéines avec un large spectre de substrats de manière générale. Certaines présentent une spécificité plus stricte pour une famille de substrats, c'est le

cas des MCOs oxydant des composés phénoliques par exemple. Dans le cas de MCO1 et MCO3, le site putatif de liaison du fer est légèrement différent de celui de FET3, du point de vue des résidus essentiels pour la liaison du fer, de l'espace disponible et des charges de surfaces ; bien qu'il faille garder à l'esprit qu'il ne s'agit que de prédiction de la structure pour les AtMCOs. Nous avons suggéré que leur substrat pouvait se présenter sous la forme d'un complexe fer-chélateur (forme majoritaire du fer dans l'organisme des plantes supérieures). Mais de par leur similarité avec les ascorbates oxydases, il n'est pas du tout incompatible qu'elles puissent oxyder également de l'ascorbate. Effectivement, ces protéines sont annotées en tant qu'ascorbate oxydase putative : chez les plantes, les ascorbates oxydases (AO) sont les MCOs les mieux caractérisées et les AtMCOs sont plus proches phylogénétiquement de ces AOs que de FET3, qui vient de la levure. Les motifs histidines des centres à cuivre des MCOs sont très bien conservés à travers toutes les MCOs, tous Règnes confondus. Ce degré de conservation et la proximité des MCOs des plantes supérieures entre elles pourraient être une explication de l'annotation des AtMCOs comme AOs. Nous n'avons pas pu mesurer l'activité ascorbate oxydase dans les conditions expérimentales utilisées pour mesurer la consommation d'oxygène de MCO3(ch). Ces mesures nécessiteraient plusieurs modifications et une optimisation, nous n'avons pas eu le temps malheureusement d'adapter notre protocole pour mesurer l'activité ascorbate oxydase par oxygraphie. Cependant une activité ascorbate oxydase de la part des AtMCOs n'est pas incompatible avec une régulation du statut redox du fer à la surface de la cellule.

L'ascorbate est présent dans l'apoplaste et à des concentrations de l'ordre du millimolaire [206], [207]. En effet cet ascorbate apoplastique jouerait un rôle dans la polymérisation des mono-lignols en lignine ainsi qu'un rôle de protecteur contre les stress oxydants : en tant que substrat des ascorbates oxydases et des ascorbates peroxydases, il réduit respectivement la concentration en O_2 et en H_2O_2 . Il est également la première barrière contre l'ozone [208], [209].

L'ascorbate est capable de réduire directement le fer ainsi que le cuivre [26], [181]. Cet antioxydant peut donc devenir pro-oxydant si la concentration en métaux divalents est importante. La réactivité de l'ascorbate pour ces métaux, dont le fer, est observé *in vitro* avec des ions libres. La réoxydation de ces ions en présence de dioxygène, génère ensuite d'autres radicaux (H_2O_2 , OH° , O_2^-).

Chez les plantes, le fer est très rarement présent libre dans l'organisme mais est chélaté par des acides organiques, la nicotianamine, en complexe avec du phosphate, des protéines comme les ferritines et en cofacteur dans les protéines à fer. Sa prise en charge systématique n'est pas le gage absolu de l'évitement de sa réactivité. Certaines formes complexant le fer génèrent toujours des radicaux hydroxyles à partir du peroxyde d'hydrogène, notamment les complexes fer-phosphate, et les ferritines. Le citrate, comme l'EDTA, lorsque liés au fer, en améliorant la mobilité du fer, seraient également de bon catalyseurs des réactions de Fenton [210].

Ainsi, l'influence de l'ascorbate sur l'état redox du fer dans l'apoplaste relierait indirectement une activité ascorbate oxydase, (limitant l'acide ascorbique au profit de monodéhydroascorbate) à une diminution de la réduction du fer. Si le fer en excès est moins susceptible d'être réduit, cela limiterait sa toxicité et sa mobilité. De plus, l'action indirecte sur la réduction du fer pourrait expliquer que les phénotypes observés chez les mutants ne sont pas aussi impressionnants que chez *Atfer1,3,4* en excès de fer par exemple ; l'action des AtMCOs sur le fer dépendant d'un autre paramètre : la quantité d'ascorbate présent dans l'apoplaste.

3.3 Proposition d'un modèle du rôle des AtMCOs

3.3.1 Ferroxyder pour mieux contrôler

Tous les êtres vivants ont développé au cours de l'évolution des stratégies de contrôle et de régulation de l'équilibre entre les états redox du fer, le Fe^{2+} et le Fe^{3+} . La régulation de cet équilibre est primordiale pour les systèmes biologiques, particulièrement pour les organismes aérobies subissant des contraintes supplémentaires pour l'acquisition et la toxicité du fer. Chez les plantes, et plus spécialement chez les dicotylédones, la ferriréduction a eu la part belle du fait de son rôle central dans la mobilisation du métal dans les sols, présent principalement dans des oxydes de fer. Chez *Arabidopsis*, le fer est réduit par une ferriréductase FRO2, couplé à une acidification active de l'environnement de la racine. Chez d'autres eucaryotes, la ferroxydation est également utilisée pour l'acquisition du fer, c'est le cas de la levure avec FET3 et de l'algue avec FOX1, ou pour le transport, dans le cas de la céruloplasmine et l'hephaestine chez les mammifères. Cet activité ferroxydase est systématiquement opérée par un membre de la famille des Multicopper oxydases et leur mutation induit de grande perturbation de leur homéostasie.

Le regard des biologistes ne s'est porté que très récemment sur l'existence d'une activité ferroxidase chez les plantes supérieures. Parmi toutes les MCO des plantes supérieures connues, il existe plusieurs candidates pour le rôle de ferroxidase impliquée dans l'homéostasie du fer. La première chronologiquement est LAC2.2 du Tulipier de virginie (*Liriodendron tulipifera*), une MCO présentant une activité ferroxidase *in vitro* [161]. Cependant la caractérisation de son rôle dans l'homéostasie du fer n'a pas été poursuivie. La candidate suivante est LPR1 chez Arabidopsis. Le gène codant pour LPR1 a été identifié par une approche QTL en recherchant des locus associés à la réponse à la carence en phosphate, à la racine primaire (arrêt de la croissance) [211], [212]. LPR1 est une MCO qui serait impliquée dans la perception du phosphate et déposition de callose pour stopper la croissance racinaire, par la génération de ROS. LPR1 présente également une activité ferroxidase [162]. LPR1 ne serait pas impliquée dans l'acquisition ou le transport du fer comme les autres ferroxidases modèles.

Il a été montré que la présence de LPR1 est nécessaire dans la perception de la carence en phosphate pour induire l'arrêt de la croissance racinaire. *lpr1lpr2* est « insensible », en carence en phosphate, la racine primaire continue sa croissance contrairement au sauvage. LPR1 colocalise avec les dépôts de fer apoplastiques lors de la carence et est induite dans les zones où s'accumule la callose en réponse à la carence. Cette accumulation participe à la régulation des flux des plasmodesmes notamment d'acteurs essentiels à la différenciation cellulaire du méristème apical racinaire et la croissance de celui-ci [213]. LPR1 colocalise également avec une accumulation de ROS (ions super oxydes) et il a été montré que les ROS induisent les dépôts de callose des plasmodesmes [214], [215]. Il y a donc un lien entre LPR1, une ferroxidase apoplastique, une accumulation de Fe^{3+} , et de ROS induisant le dépôt de callose contrôlant la signalisation symplastique aboutissant à la réponse à la carence en phosphate : l'arrêt de la croissance racinaire. L'origine du fer oxydé par LPR1 n'est pas encore élucidée, et il a été admis que l'accumulation du Fe^{3+} par LPR1 favorisait la génération de ROS. Les MCO comme LPR1 sont des oxydases terminales, elles ne produisent pas de ROS en réduisant le dioxygène. De plus, le Fe^{3+} n'est pas en tant que tel générateur d'espèces réactives. En effet, le Fe^{2+} quant à lui, est le plus générateur de ROS. Le Fe^{3+} forme des oxydes très insolubles en présence d'oxygène et limitant sa mobilité (raison pour laquelle ce n'est pas la forme transportée par les

membranes biologiques). Il peut également générer des ROS en présence de peroxyde d'hydrogène, comme le Fe^{2+} , cependant la génération d'ion hydroxyle par le Fe^{3+} a une constante de réaction environ 7000 fois plus faible que la génération d'ions hydroxyles par la réaction du Fe^{2+} avec le peroxyde d'hydrogène [216]. La génération de ROS par LPR1 n'est pas liée à la réactivité du Fe^{3+} , mais son accumulation pourrait former un pool de fer facilement réduit par d'autres mécanismes. L'oxydation du fer diminue sa mobilité et favorise l'accumulation localement, contrairement à la réduction.

Une autre candidate chez *Arabidopsis*, LAC12 une autre MCO, serait impliquée dans la connexion de l'homéostasie du fer et celle du cuivre, notamment pour la perception des besoins de cuivre pour le transport longue distance du fer vers les feuilles [60]. LAC12 est induite en carence de fer et complémente le mutant *fet3fet4*. En carence de fer, *lac12* présente plus de fer dans les racines et moins dans les feuilles, mais pas de différence en quantité totale. La coloration Perls/DAB des racine montre que *lac12* présente plus de fer dans la stèle que le sauvage en carence de fer suggérant que LAC12 participe à la répartition du fer des racines vers les feuilles, le phénotype étant similaire à *frd3*. LAC12 présente une activité ferroxidase *in vitro*. D'après ces résultats, LAC12 pourrait jouer un rôle actif dans l'oxydation du fer lors de son chargement dans le xylème, dans l'apoplaste des cellules du péricycle. FRD3 chargeant le citrate dans le xylème et LAC12 oxydant le fer pour se complexer avec le citrate. LAC12 n'a pas été localisé au niveau subcellulaire mais elle est très probablement membranaire ou apoplastique comme toutes les autres MCO connues. Il s'agirait là d'une MCO directement impliquée dans l'homéostasie du fer.

3.3.2 De nouvelles candidates pour une activité ferroxidase

Dans ces travaux de thèse, nous proposons au moins deux nouvelles MCOs impliquées dans la régulation du fer chez *Arabidopsis*. Elles font partie d'une petite famille de trois MCOs qui partagent une similarité importante avec FET3, la ferroxidase modèle. MCO3 montre une activité ferroxidase et complémente le mutant *fet3fet4*. Le triple mutant de la famille présente un léger phénotype de croissance racinaire mais surtout un phénotype de perturbation de la répartition du fer dans les cellules foliaires, accentué par l'excès de fer. L'absence des MCOs induit l'expression de transporteurs putatifs de fer vers la vacuole, et ce à des concentrations en fer qui ne sont pas considérées comme un excès (25 – 50 μM de fer). Ces MCOs sont localisées

à l'apoplaste chez le tabac et leur absence induit un stress redox plus important chez les mutants. Le fer est transporté à travers les membranes biologiques le plus souvent sous la forme de Fe^{2+} [217]. A la surface des cellules foliaires nous ne connaissons pas le mécanisme d'acquisition du fer, cependant il est vraisemblable que ce soit du fer Fe^{2+} qui soit transporté. Quoi qu'il en soit, la membrane plasmique est la première barrière que doit traverser le fer pour entrer dans la cellule : la présence d'une MCO oxydant du fer dans l'apoplaste est un avantage pour réguler l'entrée du fer. Le Fe^{3+} est moins mobile, moins susceptible de générer des ROS et tant qu'il n'est pas réduit, ne représente plus une menace. Si la forme principale transportée est le Fe^{2+} à la surface des cellules, l'oxyder limite automatiquement son entrée.

3.3.3 Une autre barrière contre l'excès de fer

La réponse physiologique à l'excès de fer présente encore beaucoup de zones d'ombres. L'homéostasie du fer n'est pas isolée de celle des autres métaux divalents. C'est particulièrement le cas pour le cuivre qui est lui aussi largement utilisé en tant que cofacteur pour les mêmes réactions que le fer (transfert d'électron). De plus l'acquisition du fer n'est jamais entièrement distincte de ces autres métaux chez Arabidopsis. Le transporteur IRT1, mais aussi les NRAMPs, peuvent transporter du manganèse, du cadmium, du zinc, du cobalt etc... Qui favorisent tout autant les stress redox et peuvent causer le phénomène de « mismétallation » des protéines à fer (remplacement des atomes de fer par d'autres métaux, rendant la protéine inactive). L'entrée du fer dans l'organisme pour provoquer un excès est plus difficile à mettre en œuvre qu'une carence. Les phénotypes en excès de fer qui n'impliquent pas un transporteur sont ainsi difficile à observer. La plante disposant de plusieurs stratégies d'évitement des excès de métaux et il faut rappeler que dans le contexte de son environnement, la plante est plus sujette à la carence en fer en milieu aérobie qu'à l'excès : qui reste donc un événement ponctuel et transitoire (milieux réducteur riche en eau, milieux acides...). C'est une des raisons qui nous a incité à utiliser le Fe-EDTA comme source de fer : l'EDTA favorise la forme Fe^{2+} , et la membrane plasmique est plus perméante au Fe-EDTA qu'à d'autres complexes. Les MCOs en oxydant le fer apoplastique, lors d'un excès lié à l'exploration du milieu, à sa modification (pH), pendant le développement précoce, pendant un stress lumineux, durant la dé-étiolation etc, limiteraient l'entrée du fer dans la cellule du mésophylle. 70% du fer foliaire se trouve dans les chloroplastes, les cellules du mésophylles subissent plus l'excès de fer. Lors d'un excès, la croissance racinaire est extrêmement ralentie et les rosettes d'Arabidopsis sont extrêmement

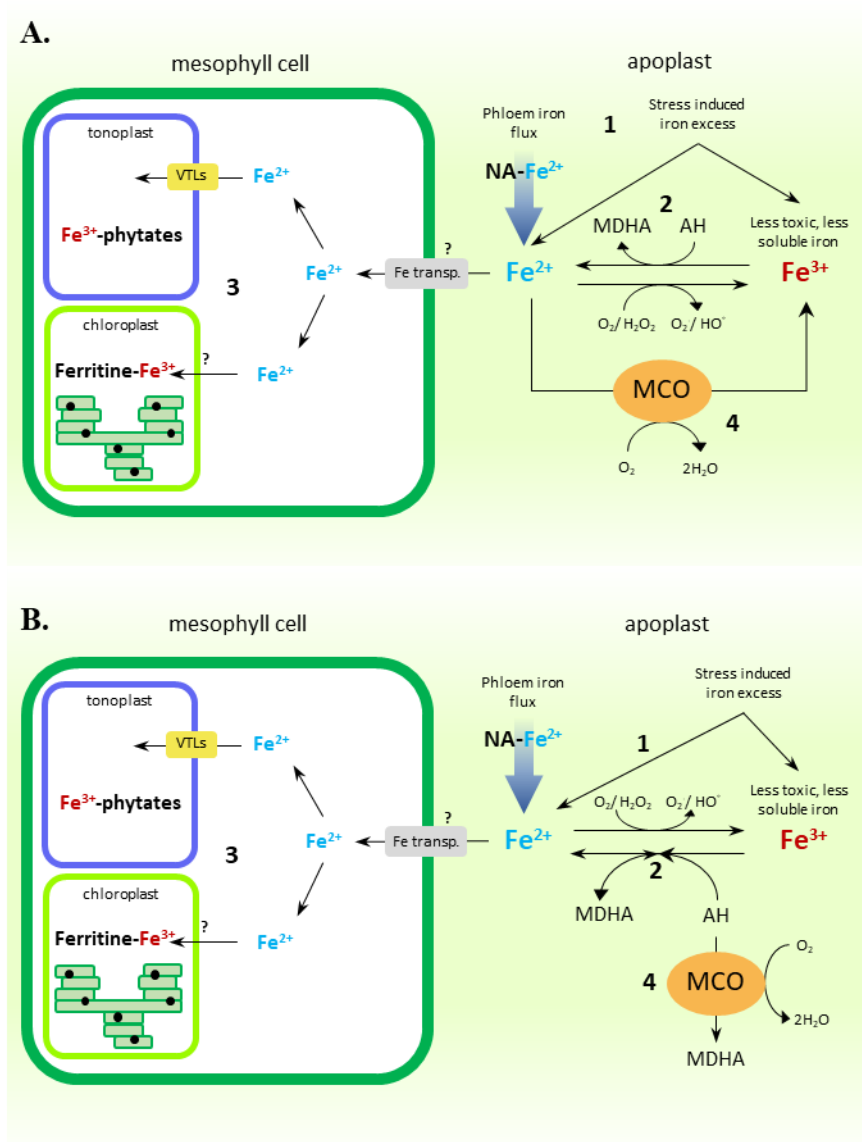


Figure 31. Proposed model for apoplastic AtMCOs role in apoplast

A. Mesophyll cells can experience iron excess (1) from normal iron route through phloem Fe-nicotianamine before iron uptake machinery is repressed or from another stress (light stress, wound, de-etiolation, early development etc...).

Into apoplast, significant amounts (at least 1mM) of ascorbic acid can be found, as anti-oxidant to protect cells from redox stress. (2) Ascorbic acid can reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ and is present in enough proportion to unbalance iron equilibrium to Fe²⁺.

Iron which could be taken up by the cell (3) can be either buffered by chloroplast ferritins or stored into the vacuole.

We propose here, that AtMCOs act as another iron buffering system into apoplast (4). They push back iron equilibrium to Fe³⁺ form which is less reactive with ROS. *mco1,2,3* mutant shows more iron loaded ferritins and *VTLs* induction at tonoplast, meaning *mco1,2,3* cells cope with a stronger iron flux than wildtype cells.

B. If AtMCOs are also ascorbate oxidases, they could limit ascorbic acid driven iron reduction by oxidizing it into dehydroascorbate, thus indirectly favoring Fe³⁺ form.

diminuées. Les AtMCOs réguleraient l'entrée du fer dans la cellule en l'oxydant à son passage dans l'apoplaste. La **Figure 31** montre le schéma du rôle que nous proposons pour les AtMCOs. Pendant un excès, le temps que les systèmes d'acquisition du fer soient réprimés, le fer peut arriver sous forme de Fe²⁺-Nicotianamine (Fe-NA) du phloème ou bien être libre en Fe²⁺. Dans les feuilles riches en O₂, il peut aussi se présenter sous forme de Fe³⁺.

La Figure 31 présente le modèle que je propose pour le rôle des AtMCOs. Dans l'apoplaste, l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène peuvent réagir avec le fer libre et générer des radicaux (1). Dans l'apoplaste, une quantité importante d'ascorbate est présente, en tant qu'antioxydant, il protège la cellule en réduisant activement de nombreuses cibles différentes. Mais ce même acide ascorbique peut réduire le Fe³⁺ et accentuer un stress redox induit par le fer (2). Le Fe²⁺ qui est récupéré par la cellule est soit tamponné par les ferritines du chloroplaste, soit stocké dans la vacuole (3). En plus de ces deux mécanismes d'évitement de ce Fe²⁺ libre, la sécrétion de MCO dans l'apoplaste serait un mécanisme additionnel, qui permettrait de limiter sa toxicité, le temps que la plante réprime toute la machinerie d'acquisition du fer (4). Si les AtMCOs sont également des ascorbate oxydases, l'oxydation active de l'acide ascorbique en monodéhydroascorbate limiterait la réduction du Fe³⁺ par l'acide ascorbique et donc *in fine* la toxicité de l'excès. L'action des AtMCOs seraient indirecte mais influencerait toujours le statut redox du fer apoplastique (**Figure 31 B(4)**). Un autre argument en faveur d'un rôle de barrière apoplastique du fer joué par les AtMCOs est que le mutant *Atfer1,3,4* [196] qui produit très peu de ferritines présente une accumulation du fer apoplastique, suggérant un contrôle de l'entrée du fer plus important. Il serait très intéressant de mesurer l'induction des MCOs chez ce mutant *Atfer1,3,4*, ainsi qu'effectuer un croisement avec *mco1,2,3* pour essayer d'amplifier l'effet de l'absence des AtMCOs et peut-être observer une diminution de l'accumulation du fer à l'apoplaste. Nous pouvons aussi attendre une intoxication encore plus intense de l'excès de fer en l'absence à la fois du système de tampon du fer dans la cellule et de la supposée barrière formée par l'activité ferroxidase des AtMCOs.

Dans les deux situations, les AtMCOs sont des oxydases terminales : elles consomment du dioxygène pour oxyder leur substrat. La diminution du pool de Fe²⁺ en faveur du Fe³⁺ (ou de l'AH en MDHA) par les MCOs est donc associée à la diminution du responsable de la toxicité du fer : le dioxygène. Et ce « proprement », en le réduisant en deux molécules d'eau sans produire d'autres espèces réactives de l'oxygène. Ce type d'activité présente beaucoup

d'avantages et c'est très probablement la raison de son universalité parmi les organismes aérobies.

Chez les autres eucaryotes modèles aérobies, la ferroxidation est essentielle à l'acquisition et au transport du fer. Les MCOs chargées de cette activité sont induites pendant des carences en fer et réprimées en excès de fer. Chez les plantes supérieures, le besoin d'une activité ferroxidase est inversé avec une induction des AtMCOs en présence de fer et une gestion de l'excès. Le corps humain adulte nécessite l'absorption de 1 à 2mg de fer par jour dans son alimentation. Cela représente peu mais le corps humain est adapté pour perdre le moins possible de fer, ainsi une consommation de plus de 2mg [218] est déjà perçue comme une surdose. La quantité totale de fer dans un corps humain adulte oscille entre 1 et 4g de fer, la majorité de ce fer se trouve dans les érythrocytes (2 à 3g), le reste dans les organes puits et 2mg environ par circule dans l'organisme complexé à la transferrine, cependant cette transferrine contrôle un turn-over de 25mg de fer par jour de par ses échanges avec les organes [219]. De la même manière, le fer présent dans les érythrocytes est recyclé à hauteur de 25mg par jour également. Le statut redox du fer circulant dans le plasma est régulé par la céruloplasmine, une ferroxidase MCO. Les échanges entre les érythrocytes dans le plasma et le plasma avec les autres organes sont importants à défaut d'une grande variation de la quantité de fer par l'alimentation, les équilibres et les échanges sont intenses. Nous pouvons avoir une idée de la différence en quantité totale de fer entre Arabidopsis et l'être humain. Nous mesurons chez Arabidopsis, en condition normale ou en excès environ 130µg de fer par g de matière sèche. Ce qui représente 0,13g.kg⁻¹. Un corps humain contient en moyenne 3g pour 75kg de matière « fraîche ». Si nous estimons qu'un corps humain est composé à 90% d'eau, nous estimons sa matière sèche à 7,5kg soit une quantité totale de fer de 0,53g.kg⁻¹, 4,1 fois plus que chez Arabidopsis. En termes de quantité qui est susceptible d'être contrôlée par la céruloplasmine, il est estimé que le turn-over dans le plasma est de 50mg (25mg échangé par la transferrine et 25mg depuis les érythrocytes). Chez la plante nous manquons de données sur la quantité de fer circulant dans l'organisme, lors d'un développement dans des conditions normales, il existe deux évènements qui sont à l'origine de flux massif de fer. Le premier est associé à l'alternance jour/nuit et n'est pas contrôlé par l'horloge interne mais seulement par la variation de la luminosité. Le passage du jour à la nuit induit le chargement des ferritines dans le chloroplaste, ceci est dû à la dégradation des systèmes photosynthétiques. 70% du fer foliaire se trouve dans les chloroplastes et ce mouvement du fer hors des systèmes photosynthétiques reste localisé dans le chloroplaste. Le deuxième évènement est la remobilisation des micronutriments des feuilles vers les graines lors

de la sénescence de la plante, par un mécanisme d'autophagie. Ici, le fer est massivement déplacé des cellules foliaires vers la hampe et les graines. Chez *Arabidopsis*, environ 50% du fer contenu dans les feuilles est déplacé vers les graines lors de cette la remobilisation. De plus,

il a été montré que même le fer acquis par les racines à ce stade doit passer d'abord par les organes végétatifs avant d'être redirigé vers les graines [220], [221]. Les ferritines sont induites lors de cet évènement. Chez les plantes, les échanges de fer sont principalement mis en place pour le chargement vers les chloroplastes et les mitochondries. Chez les mammifères, le transport du fer dans le sang et le transport de l'oxygène pour la respiration impose un recyclage constant du métal et les ferroxidases interviennent pour contrôler l'état redox du fer tout du long. Les échanges chez la plante sont sans commune mesure avec ce qui peut exister chez les mammifères mais le flux de fer à la remobilisation lors de la sénescence peut faire l'objet d'un contrôle supplémentaire par des ferroxidases.

Les MCOs, si elles sont également des ascorbate oxydases, pourraient intervenir dans le contrôle d'un stress redox lié au fer et induit par la réduction par l'acide ascorbique lors de la variation de luminosité mais aussi pourquoi pas lors de la remobilisation vers les graines. L'ascorbate est également impliqué dans la remobilisation du fer complexé sous forme d'hydroxydes ferriques dans les ferritines et sa concentration varie en fonction de l'intensité lumineuse. La quantité d'acide ascorbique diminue pendant le jour, consommé pour résister aux ROS générés avec l'augmentation du rayonnement [222], [223]. Bien que cet ascorbate consommé soit principalement présent dans le chloroplaste et que les AtMCOs sont apoplastiques, l'induction de la voie de biosynthèse de l'ascorbate par la lumière et les stress abiotiques peut produire *in fine* une augmentation d'AH dans l'apoplaste. La voie principale de biosynthèse de l'Ascorbate est la voie L-Galactose dont l'enzyme opérant la dernière étape la L-galactono- γ -lactone dehydrogenase est localisée à la surface/ou dans la mitochondrie, mais ensuite l'ascorbate est transporté vers les autres compartiments cellulaires générant un gradient dans la cellule. Cet ascorbate peut réduire le fer lors d'un excès et augmenter sa toxicité.

L'étude de l'expression des gènes *MCO* et des expérimentations avec des constructions gène rapporteur pour tout le cycle de vie d'*Arabidopsis* peut nous apporter plus de profondeur dans la compréhension d'une activité transitoire qui régulerait la dynamique du fer pendant sa migration à travers l'organisme. L'approche qui est la nôtre depuis le début de l'étude de ces MCOs, consistant à jouer sur le statut en fer par la nutrition d'*Arabidopsis* n'est peut-être pas la plus pertinente plus éclairer la/les fonction/s de ces Multicopper oxydases dans l'homéostasie

du fer. Une approche plus systémique à différentes étapes du développement semble être une piste complémentaire pour mieux appréhender le rôle de cette petite famille de MCO.

Avec LPR1, et LAC12, les AtMCOs forment une cohorte de ferroxydases chez *Arabidopsis* dont l'activité a un impact dans la répartition du fer pour sa nutrition ou participant à la régulation d'autres mécanismes (cas de LPR1). Comme chez les autres modèles eucaryotes, il existe bien des ferroxydases chez les plantes supérieures, dont le rôle semble plus complexe que chez les premiers. La physiologie de l'excès de fer reste pour une grande part non élucidée, beaucoup d'autres paramètres importants dans la régulation de la toxicité du fer entrent en jeu, tel que l'intensité de la réduction du fer par la lumière *in vivo*. Quoiqu'il en soit, les plantes supérieures présentent elles-aussi une activité de ferroxydation, proche des autres modèles, et qui influencerait plus de paramètres qu'uniquement le transport du fer. Ouvrant un nouveau champ dans la complexité de la régulation de l'homéostasie de ce métal, qui n'a eu de cesse de s'adapter aux grands changements environnementaux depuis l'apparition des premières formes de vie.

4 MATERIEL ET METHODES

4.1 Données préliminaires

4.1.1 Territoire d'expression de *MCO1* et *MCO3*

Les lignées d'insertion d'ADN-T Salk_046824, Salk_136041 (fond Col-0, correspondant à At4g39830, également annoté comme ascorbate oxydase potentielle, AO) et SALK_039183 (Col-0, correspondant à At5g21105) ont été obtenues auprès du Nottingham Arabidopsis Stock Center. Pour les analyses d'activité des promoteurs de *MCO1* et *MCO3*, 2,0 kb de séquence génomique située en amont du codon d'initiation de *MCO1* ou *MCO3* ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique d'Arabidopsis à l'aide d'amorces (promoMCO1F 5'-CGC GGGTACCCTATCAAACGTAGTTTTAG-3'; promoMCO1R 5'-ATAGCCATGGCATT TTCCAATCGTGTC-3'; promoMCO3F 5'-CGCGGGTACCGTGGTACCGTTTATGTG GGTGTTC-3'; promoMCO3R 5'-ATAGCCATGGCGCCATGGGGAATCTTTCACTTTA-3'), introduisant respectivement un site KpnI et un site NcoI. Le fragment promoteur amplifié a été fusionné de manière translationnelle avec le gène *UidA*, codant pour la glucuronidase (GUS), par clonage dans les sites KpnI et NcoI du vecteur pGUS. Les cassettes ProMCO1-GUS et promoMCO3-GUS ont ensuite été sous-clonées en tant que fragment KpnI-XbaI dans le vecteur binaire végétal pBIN19 digéré avec les mêmes sites de restriction.

4.1.2 RT-qPCR d' *AtMCO1* et *AtMCO3*

Pour la PCR quantitative en temps réel, l'ARN total a été extrait des tissus végétaux à l'aide de la méthode d'extraction de l'ARN Trizol. Les échantillons ont été prélevés, immédiatement congelés et broyés avec un mortier en présence d'azote liquide jusqu'à ce qu'ils soient réduits en poudre. Ensuite, 1 ml de réactif Trizol a été ajouté à la poudre moulue et transféré dans des tubes Eppendorf de 2 ml. Après cela, 200 µl de chloroforme ont été ajoutés aux tubes d'Eppendorf, secoués à la main pendant 15s et centrifugés à 4°C 12 000 tr/min pendant 15 min. Le surnageant a été soigneusement transféré dans de nouveaux tubes Eppendorf et 500 µl d'isopropanol ont été ajoutés. Les tubes ont été mélangés en retournant 10s, incubés 10 min à température ambiante (15-30°C) puis, centrifugés à 4°C 12 000 tr/min pendant 15 min. Le surnageant a été retiré et la pastille a été lavée deux fois avec 1 ml d'éthanol à 75 %, séché et remis en suspension dans de l'eau stérile avec 20 à 25 µl. L'ARN total a été quantifié avec un spectrophotomètre Nano drop à 260 et 280nm. La quantité d'ARN a été ajustée à 1 µg et cette quantité utilisée pour un traitement avec 1U de DNase. Les échantillons ont été incubés à 37°C

pendant 30 min et ont été traités avec 50mM EDTA pendant 10 min à 65°C. Ceci a servi de matrice pour la transcription inverse. Le premier brin d'ADNc a été synthétisé avec des oligo dT à l'aide d'un kit de transcription inverse (kit de synthèse d'ADNc Premier brin Thermo Scientific RevertAid). La PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été réalisée avec l'ADNc dilué (1:20) avec le système Light Cycler 480 avec mélange SYBR Green. Le niveau de transcription relatif a été calculé en normalisant par l'expression d'*ACT2* comme suit : $RTL = 2^{\Delta\Delta Ct}$, où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{gène}) - \Delta Ct(\text{ACT2})$.

Liste des primers utilisés :

MCO1 Forward 5'-ACGCAAACAACAGTGAAACG-3'

MCO1 Reverse 5'-GCAGTGAAACGACCAAACG-3'

MCO3 Forward 5'-AACGAAAGGTAGCGGGATTT-3'

MCO3 Reverse 5'-GTAACGGCGGATTCTTCAAA-3'

Fer1 Forward 5'-TCGTTGAGAGTGAATTTCTGG-3'

Fer1 Reverse 5'-ACCCCAACATTGGTCATCTG-3'

ACT2 Forward 5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG-3'

ACT2 Reverse 5'-AACGACCTTAATCTTCATGCTGC-3'

4.2 Arbre phylogénétique des laccases-like multicopper oxydases

4.2.1 Liste des séquences protéiques

Les séquences utilisées sont les mêmes que pour l'étude de McCaig *et al* 2005 [169] moins celles dont la séquence n'était plus accessible sur GenBank. A ces Laccase-likes ont été ajoutées les séquences de FET3 de la levure, LPR1 et 2, et les AtMCOs d'*Arabidopsis*, ainsi que les séquences de plusieurs ascorbates oxydases déjà caractérisées provenant du tabac, et de plusieurs espèces de cucurbitacées. La liste exhaustive des séquences utilisées avec leur numéro d'accèsion GenBank/NCBI actualisé :

ApLAC1 AAB09228.1 *Acer pseudoplatanus*

AtLAC1 AAF78389.1 *Arabidopsis thaliana*

AtLAC2 NP_180477.1 *Arabidopsis thaliana*

AtLAC3 Q56YT0.2 *Arabidopsis thaliana*

AtLAC4 O80434.2 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC5 Q9SIY8.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC6 Q9ZPY2.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC7 Q9SR40.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC8 Q9LFD2.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC9 Q9LFD1.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC10 AAT41838.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC11 Q8VZA1.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC12 Q9FLB5.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC13 Q9LYQ2.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC14 Q9FY79.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC15 Q84J37.1 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC16 Q1PDH6.2 *Arabidopsis thaliana*
AtLAC17 AAU95426.1 *Arabidopsis thaliana*
LtLAC1 AAB17191.1 *Liriodendron tulipifera*
LtLAC2 AAB17192.1 *Liriodendron tulipifera*
LtLAC3 AAB17193.1 *Liriodendron tulipifera*
LtLAC4 AAB17194.1 *Liriodendron tulipifera*
NtLAC4 NP_001312019.1 *Nicotiana tabacum*
OsLAC1 AAC04576.2 *Oryza sativa* Japonica Group
OsLAC2 BAB92845.1 *Oryza sativa* japonica Group
OsLAC3 BAB92843.1 *Oryza sativa* japonica Group
OsLAC4 BAB90733.1 *Oryza sativa* Japonica Group
OsLAC5 BAB86465.1 *Oryza sativa* japonica Group
OsLAC6 BAB86452.1 *Oryza sativa* Japonica Group
PtLAC1 AAK37823.1 *Pinus taeda*
PtLAC2 AAK37824.1 *Pinus taeda*
PtLAC3 AAK37825.1 *Pinus taeda*
PtLAC4 AAK37826.1 *Pinus taeda*
PtLAC5 AAK37827.1 *Pinus taeda*
PtLAC6 AAK37828.1 *Pinus taeda*
PtLAC7 AAK37829.1 *Pinus taeda*
PtLAC8 AAK37830.1 *Pinus taeda*
PtriLAC1 CAC14719.1 *Populus trichocarpa*
PtriLAC2 CAC14720.1 *Populus trichocarpa*
PtriLAC3 CAA74105.1 *Populus trichocarpa*
TvLAC1 BAB63411.2 *Toxicodendron vernicifluum*
CsAO P14133.1 *Cucurbita sativa*
CmAO P24792.2 *Cucurbita maxima*
NtAO Q40588.1 *Nicotiana tabacum*

ScFET3 NP_013774.1 *Saccharomyces cerevisiae*
AtLPR1 NP_173714.2 *Arabidopsis thaliana*
AtLPR2 NP_565008.1 *Arabidopsis thaliana*
CpAO 1ASQ_B *Cucurbita pepo*

4.2.2 L'arbre phylogénétique

Les séquences ont été alignées par le programme clustal omega intégré au logiciel SeaView [170]. L'arbre présenté est construit à partir de cet alignement par la méthode du maximum de parcimonie sans tenir compte des gaps entre les séquences conservées et avec 100 bootstraps. Les groupes de couleurs correspondent à ceux de l'étude de McCaig *et al* 2005, le groupe supplémentaire jaune regroupe les ascorbates oxydases et les ferroxidases.

4.3 Complémentation du mutant *fet3/fet4*

4.3.1 Lignées cellulaires

Le sauvage *Saccharomyces cerevisiae* est utilisé comme contrôle positif pour les expériences de complémentation et de consommation d'O₂, son fond génétique est le W303 (Mata/alpha ade2-1, ade3, trp1-1, can1-100, leu2-3112, his3-11, 15, ura3, GAL, psi+). Le mutant *fet3fet4* est utilisé comme contrôle négatif dans les mêmes expérimentations, il est de même fond génétique que le W303 moins *FET3* et *FET4* (Mata/Matalpha ade2/+ can1/can1 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3 fet3-2::HIS3 / fet3-2::HIS3 fet4-1::LEU2/fet4-1::LEU2). Le mutant *fet3fet4* est transformé avec les constructions MCO3 et MCO3(ch).

4.3.2 Vecteurs et transformation

4.3.2.1 Expression de AtMCO3

La séquence de l'ADNc de *MCO3* a été cloné dans un plasmide donneur (pDonor) de la technologie Gateway, pDonor207. Cette construction a servi pour la réaction de recombinaison LR avec un vecteur de destination pAG306-GDP, un vecteur intégratif pour l'expression en levure. L'expression du gène est contrôlée par un promoteur constitutif de la levure, le promoteur de la Glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogenase (GAP promoter). L'intérêt

d'utiliser un vecteur intégratif est l'insertion dans le génome par recombinaison en reconstruisant le gène *URA3*, absent du mutant *fet3/fet4* (souche W303) auxotrophe pour l'uracile. Ainsi nous obtenons des lignées stables exprimant AtMCO3, lignées qui doivent être re-générées régulièrement avec des plasmides multicopies car les porteurs du plasmide sont contre-sélectionnés au cours des générations. Le plasmide recombinant doit être digéré avec une enzyme ayant un site de restriction dans la séquence de *URA3* pour linéariser le vecteur recombinant. Le mutant *fet3/fet4* est transformé avec le plasmide linéarisé avec *ApaI* (voir la carte du plasmide) par la méthode Lithium/Acétate.

4.3.2.2 Expression de AtMCO3 modifiée

La séquence de la MCO3 modifiée a été synthétisée par la société TWIST Bioscience (<https://www.twistbioscience.com>) et fournie clonée dans un plasmide donneur compatible avec la technologie Gateway® : pTWIST-ENTR (backbone pMB1), résistance à la kanamycine. Ce vecteur a été utilisé comme donneur pour une recombinaison LR dans un vecteur pAG306-GDP puis amplifié dans *E.coli* DH5 α . Le principe de la modification est le remplacement du domaine prédit d'ancrage à la membrane de MCO3 par celui de FET3. Cependant, le domaine d'ancrage de FET3 se situe en C-ter et le domaine extracellulaire MCO de FET3, en N-ter. Le domaine d'ancrage prédit de MCO3 est retiré en gardant le cadre de lecture et le domaine d'ancrage de FET3 ajouté en C-ter à cette séquence tronquée de MCO3 en vérifiant toujours le cadre de lecture et en ajoutant un codon stop. Positions des régions tronquées ou ajoutées : Domaine transmembranaire de FET3 : résidus 556 à 636 (donc 80 résidus) ; Peptide signal tronqué de MCO3 : résidus 5 à 44 ; Le domaine transmembranaire de FET3 (80 résidus) est ajouté à MCO3 après le résidu 543 de la MCO3 native (dernier acide aminé). Voir **FIGURE** le schéma de la modification de MCO3.

4.3.2.3 Levures compétentes

Une culture de *fet3/fet4* a été préparée à partir d'une colonie isolée (YPD agar + 2% glucose) de 24h à 30°C en YPD + 2% glucose + 200 μ M Fe-citrate + 100 μ g/mL d'ampicilline. La culture est centrifugée à 4000rpm 5min, lavée une fois avec 1mL de Lithium Acétate 100mM en TE 100mM, re-centrifugée puis le culot resuspendu avec 500 μ L de Li/Ac 100mM. Les cellules compétentes sont conservées à température ambiante puis 150 μ L est utilisé par transformation.

4.3.2.4 Transformation Li/Ac

2µg de plasmide linéarisé est mélangé avec 20µL de DNA carrier Yeastmaker™ de Takara (préalablement dénaturé 5min à 95°C). 150µL de cellules compétente sont ajoutés au mélange, le tube est vortexé. 600µL de PEG/Li/Ac sont ajoutés au tube (480µL PEG 50% + 60µL de LiAc 1M + 60µL de TE 1M). Le tube est incubé 30min à 30°C puis 50µL de diméthylsulfoxyde pur sont ajoutés avant une autre incubation de 20min à 42°C. Puis le tube est brutalement transféré sur glace pendant 3min, centrifugé 15s à 14000rpm, resuspendu dans 500µL de YPD + 2% glucose et incubé 1h à 30°C pour laisser le temps à l'intégration de se produire puis l'expression du gène de résistance à l'ampicilline. Le tube est centrifugé 15s à 14000rpm et le culot resuspendu dans 400µL de TE 100mM. Les 400µL sont étalés sur deux boîtes YNB (-URA) agar + 2% glucose + 100µg/ml d'ampicilline + 200µM Fe-citrate, (2 x 200µL) et les boîtes incubées à 30°C pendant au moins 3 jours. Un contrôle négatif sans ADN est réalisé en parallèle. Les transformants sont repiqués et mis en culture en YNB (-URA) +2% glucose + 200µM de Fe-citrate. Stockés en glycérol 12,5% final (1mL) à -80°C.

4.3.3 Tests gouttes

A partir d'une colonie isolée sur une boîte YPD agar +2% glucose, préparer une culture de 25mL en YPD liquide +2% glucose 24h à 30°C en tube de 50mL couchés sous agitation 160rpm. Les cultures sont calibrées à $DO_{600nm} = 1$, puis diluées en série par 4. 5µL sont déposés par spot sur une boîte de YNB agar +2% glucose + uracile 2µg/mL à différentes concentrations de FeCl₃ et/ou CuSO₄. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 jours.

4.3.4 Activité ferroxidase

4.3.4.1 Oroboros-O2k et cultures

La consommation en temps réel de dioxygène ($\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) et la concentration en dioxygène (μM) sont mesurées avec des Oroboros-O₂k d'Oroboros Instruments®. Chaque machine présente deux chambres de mesure contenant chacune : une électrode de Clark, un système d'agitation et contrôle de la température. Cette technologie, le matériel et les inhibiteurs ont été fournis par l'équipe DMEM (Dynamique Du Muscle et du Métabolisme), équipe INRAe de l'université de Montpellier. L'équipe nous a également fournit une assistance technique et théorique pendant toutes les acquisitions.

Les lignées sauvages de *S.cerevisiae* W303 et mutante *fet3fet4* sont utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif. Chaque lignée est cultivée comme pour les tests gouttes dans des tubes de 15mL disposés horizontalement dans une étuve agitante 24h à 30°C. Le sauvage est cultivé dans du YPD + 2% glucose + 50µM de BPDS un chélateur de fer (carence en fer) pour induire la ferroxidase FET3. Les clones *fet3fet4* exprimant MCO3(ch) sont cultivés dans le même milieu. Le mutant *fet3fet4* ne pouvant pas survivre en carence de fer, il est cultivé avec du YPD+2% glucose sans BPDS. Les cultures sont calibrées à $DO_{600nm} = 1$, lavées avec de l'eau distillée stérile après une centrifugation de 5min à 2000rpm. Les culots sont resuspendus avec du tampon Sodium Acétate 0,1M pH5. Les cultures sont concentrées 10fois dans le même tampon juste avant la mesure pour obtenir une concentration d'environ $250 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹. Les chambres des Oroboros sont remplis avec 2mL de culture, chaque mesure de MCO3(ch) dans une chambre est effectuée avec soit du sauvage, soit du mutant *fet3fet4* dans la chambre opposée de la même machine.

4.3.4.2 Profils d'acquisition

Après insertion de la culture, scellement de la chambre et stabilisation de la consommation en O₂ dans la chambre, 5µM final d'antimycine sont injectés. La respiration mitochondriale est inhibée complètement et la consommation d'O₂ observée est théoriquement liée à l'activité des oxydases de surface (dont MCO3(ch)). L'antimycine inhibe le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. La consommation en O₂ mesurée à ce point représente le bruit de fond de consommation en O₂ (intervalle 1). Puis nous injectons 100µM de FeSO₄ final, préparé extemporanément (stock 20mM) dans les deux chambres. Après stabilisation, un plateau de la consommation est mesuré pendant au moins 3min (intervalle 2). Deux injections supplémentaires sont opérées, chacune de 3-4min d'acquisition après stabilisation (intervalles 3 et 4). La consommation mesurée après injection d'antimycine (bruit de fond) est soustraite de la consommation mesurée après injection de fer pour obtenir la consommation reliée uniquement à la présence de fer. La consommation à chaque intervalle est moyennée sur tous les points de l'intervalle mesuré. Puis la moyenne des consommations pour toutes les mesures est calculée à partir de trois mesures indépendantes pour chaque lignée, chaque culture étant indépendante.

4.4 Génération de *mco1,2,3*

4.4.1 Vecteurs

Le backbone du vecteur utilisé pour générer le triple mutant *mco1mco2mco3* est celui développé par Wang *et al* 2015 [224](pHEE2F-Tri). Le promoteur dirigeant l'expression de la Cas9 dans ce vecteur est actif au stade œuf uniquement et favorise la génération de mutants homozygotes. Le vecteur pHEE2F-Tri possède un gène de résistance à l'hygromycine pour la sélection des transformants. Nous avons utilisé un couple d'ARN guides spécifiques à l'exon 1 de *MCO2* et de l'exon 5 de *MCO3* annotés « a » et « c » (voir Table ci-dessous). Les deux gènes sont en tandem sur le chromosome 5, la délétion totale attendue entre les deux sites ciblés par les ARN guides mesure 8498pb (ARN guides inclus).

Séquence des ARN guides utilisés

mutant	ARN guides	Séquences
<i>mco2</i>	« a »	5'-TGTGTGGTGGCTACTAACGG-3'
	« b »	5'-GGCAGTAGTAGAATCAACGT-3'
<i>mco3</i>	« d »	5'-CGCCCCACAGATACTCCACG-3'
	« c »	5'-AACACACAGAATCTAATCGA-3'
<i>mco1mco2mco3</i>	« a »	5'-TGTGTGGTGGCTACTAACGG-3'
	« c »	5'-AACACACAGAATCTAATCGA-3'

4.4.2 Transformation des *Arabidopsis* sauvages

Les plantes après apparition des hampes florales ont été transformées par floral dip [225]. Des cultures d'agrobactéries recombinantes en 200mL de LB liquide + gentamycine 25µg/ml, rifampicine 50µg/ml et kanamycine 25µg/mL, lancées avec 1mL de préculture dans le même milieu. La DO_{600nm} des cultures est suivie et les cultures arrêtées à DO = 0,8. Les cultures sont centrifugées à 5000rpm 15min RT et les culots resuspendus dans du sucrose 5% pour obtenir une DO de 0,8. A la resuspension est ajouté 0,02% final de SilwettL77. Pour générer le triple mutant, les hampes sont trempées dans un mélange des deux cultures recombinantes contenant

les vecteurs CRISPR pour les simples mutants *mco2* et *mco3*. Les hampes sont plongées dans les cultures 2 x 1min et les plantes placées en serre avec un sac à autoclave les recouvrant pour maintenir un environnement humide pendant 24h. Les sacs sont ouverts puis les plantes laissées en culture jusqu'à la récolte des graines.

Les graines obtenues sont sélectionnées sur un milieu MS/2 Agar contenant 15µg/mL d'hygromycine + 2% de sucrose. Les transformants résistants sont transférés en serre, génotypés par PCR sur une extraction d'ADN en CTAB à partir d'un prélèvement de feuille. Les plantes positives sont conservées et laissées en culture. La génération suivante est génotypée à son tour et les graines des plantes homozygotes sont conservées.

4.5 Phénotypage

4.5.1 Mesure élémentaire du fer et du cuivre

Les plantes sont cultivées sur MS/2 Agar pH 5,5 contenant 50µM Fe-EDTA (Normal), ou 250µM Fe-EDTA (excès de fer), ou 50µM Fe-EDTA + 25µM CuSO₄ (excès de cuivre), pendant deux semaines. Les plantes sont lavées 10s dans 0,1M d'EDTA et 20s au moins dans de l'eau distillée pour éliminer les métaux à la surface des feuilles et des racines. Environ 15 plantules sont utilisées pour un point de mesure. Les plantes sont séchées dans un étuve à 85°C au moins 5 jours. Les tissus séchés sont pesés (~15mg) puis minéralisés dans une solution de 1mL de 45% d'acide nitrique et 7.5% d'H₂O₂. Après 12h de dégazage, les échantillons sont chauffés 8h à 85°C, puis dilués avec 4mL d'eau distillée. La concentration en métaux est mesurée par spectroscopie d'émission atomique avec un plasma induit par micro-onde (MP-AES, Microwave Plasma Atomic Emission Spectrosc, Agilent technologies). La concentration des échantillons est déterminée grâce à une gamme étalon des éléments recherchés (ici le fer et le cuivre).

4.5.2 Coloration histochimique du fer par Perls/DAB

La coloration Perls du fer et son intensification par le DAB (Diamino benzidine) ont été effectuées d'après les travaux de Roschztardt et al., 2009. Les plantules sont infiltrées sous une cloche à vide pendant 5min avec la solution Perls (mélange équivalent de 4% HCl (v/v) and 4% K-Ferrocyanide (m/v)) et incubées sans le vide pendant 30min. Les plantules sont

lavées avec 3 bains d'eau distillée. L'intensification au DAB est opérée par un bain de 1h dans une solution de Méthanol contenant 0,01 M de NaN_3 and 0,3% (v/v) H_2O_2 . Les plantules sont lavées par 3 bains de tampon phosphate 0,1M pH7,4 et incubées dans un bain de tampon phosphate contenant 0,025% (w/v) 3,3-Diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma), 0,005% (v/v) H_2O_2 , et 0,005% (w/v) CoCl_2 (Solution d'intensification) pendant 30min maximum. Les échantillons sont finalement lavés avec de l'eau distillée pour arrêter la réaction d'intensification, plongés dans une solution de 50% glycérol pour être placés sur une boîte de petri contenant 1 %d'agarose. Les photos sont prises avec un Axio-zoom V16 de chez ZEISS.

4.5.2.1 Coupes histologiques

Les plantules d'une semaine sont déshydratées avec des bains progressif contenant de l'éthanol : 30min dans EtOH 50%, 30min dans EtOH 70%, 1h dans EtOH 70%, puis les plantes sont stockées à -4°C pendant une semaine. Puis un bain de 30min dans EtOH 95%, 1h dans EtOH 95%, 30min dans EtOH absolu, 1h dans EtOH absolu deux fois. Les échantillons sont ensuite pré-infiltrés avec un volume égal de 100% EtOH et de 100% solution basique Technovit7100 pendant 2h à temperature ambiante. Puis une solution de 50% solution basique Technovit 7100 + hardener 1 (solution d'infiltration). Enfin la solution de polymérisation est préparée extemporanément (Solution d'infiltration + hardener 2). Les moules sont remplis à 50% de leur volume avec la solution de polymérisation, les plantules disposées dans les moules et rapidement orientées. Les moules sont remplis à ras bord. La polymérisation se produit en anoxie, maintenue grâce à du film plastique à la surface du moule. Les blocs sont incubés 1mois à 37°C . Les coupes sont réalisées avec un microtome, d'une épaisseur de $6\mu\text{m}$, séchées sur des lames de microscopie en verre pendant 2 jours à 30°C puis une semaine à température ambiante.

4.5.2.2 Coloration des coupes

Les lames sont colorées au Perls/DAB comme ci-dessus, seuls les temps d'incubations sont modifiés : 45min avec la solution de Perls ; 1h avec le méthanol / NaN_3 / H_2O_2 ; 10min avec le tampon phosphate / DAB / H_2O_2 / CoCl_2 . Les coupes sont observées avec un microscope Olympus BX16.

4.5.2.3 Quantification des grains de ferritines chargés en fer

Les grains de ferritines chargés en fer apparaissent sous la forme de point noir bien nets après coloration par Perls/DAB. L'association de cette coloration en points noirs avec des ferritines

chloroplastique a été confirmée par immunolocalisation avec des anti-corps anti-ferritines sur des mutants *AtFer1* en 2009 [163]. A partir des photos de coupes colorés par Perls/DAB, le nombre total de grain noirs caractéristiques de ferritine chargée en fer a été déterminé avec ImageJ grâce au plugin CellCounter (Version FIJI, *Plugin* → *Analyse* → *Cellcounter*). Ce plugin permet de dénombrer au clique sur des images, plusieurs décomptes sont possibles en parallèle. Ici le nombre total de grain noirs et le nombre total de cellules par coupes sont dénombrés et les ratio nombre de grains/nombre de cellule nous permet de renseigner avec une mesure une information de chargement de ferritine par cellule mais aussi le niveau de chargement des cellules. Certaines coupes montrent beaucoup de grain à des zones très localisées, typiquement proche des vaisseaux. Le ratio nombre de grains totaux / nombre de cellules totales permet de compenser cette hétérogénéité.

4.5.3 Détection du fer avec des sondes spécifiques

Des plantules de Col0 et de triple *mco* sont cultivés verticalement sur MS/2 Agar pH5,5 + 50µM Fe-EDTA pendant 6 jours puis transférées sur MS/2 Agar pH5,5 + 50µM Fe-EDTA (normal) ou +500µM Fe-EDTA (excès de fer) pendant 24h. Les plantules de chaque lignée/condition sont incubées avec 1µM de sonde spécifique au Fe²⁺ et 10µM de sonde spécifique au Fe³⁺ dans 50mM de MES pH 6 pendant au moins 3h. Les racines des plantules sont observées au microscope ZEISS observer 7 à épi-fluorescence (Apotome). Paramètres des sondes : Sonde spécifique Fe³⁺ : Ex max = 480nm, Em max = 509nm (signal vert) ; Sonde spécifique au Fe²⁺ : Ex max = 650nm, Em max = 673nm (signal violet). Les images des zones matures des racines sont acquises avec la technologie Apotome et sont des projections du signal maximum de tous les plans d'acquisition. Les plantules sont analysées en alternant les lignées et les conditions pour limiter un biais de différences de temps d'incubation avec les sondes.

4.5.4 Coloration au Nitro-blue de Tétrazolium (NBT)

Les plantules sont cultivées sur MS/2 Agar pH5,5 (7 ou 15 jours) avec 50µM de Fe-EDTA ou 250µM de Fe-EDTA. Les plantules sont infiltrées sous une cloche à vide 3 fois 30s en cassant le vide avec une solution de 1mg.mL⁻¹ de NBT en tampon PBS. Les plantules sont ensuite incubées 24h) température ambiante dans l'obscurité. Les plantules sont ensuite décolorées avec une solution contenant 20% d'acide Acétique, 20% de Glycérol, et 60% d'éthanol. La solution de décoloration est réchauffée avant utilisation (quelques secondes au

micro-onde). Les plantules sont incubées avec cette solution de décoloration jusqu'à ce que la chlorophylle disparaisse complètement. Les échantillons sont ensuite lavés 2 fois avec de l'eau distillée et placés dans une solution de glycérol 20%. Les plantules sont observées sur une boîte de pétri contenant 1% d'agarose avec une loupe Axio-Zoom V16 de chez ZEISS.

4.6 Localisation de AtMCO3 et AtMCO1

4.6.1 Vecteurs

La séquence de l'ADNc de MCO3 a été cloné dans un plasmide donneur (pDonor) de la technologie Gateway, pDonor207. Cette construction a servi pour la réaction de recombinaison LR avec un vecteur de destination pUb-RFP. Un promoteur constitutif ubiquitine et une protéine fluorescente RFP (Red Fluorescent Protein) de fusion en C-terminal. Le codon stop des deux séquences a été retiré pour exprimer une MCO fusionnée avec la RFP.

4.6.2 Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens (GV3003) a été transformée avec les vecteurs recombinants par électroporation, les transformants positifs sélectionnés sur un milieu gentamycine, rifampicine (sélection de la souche d'agrobactéries), et spectinomycine (sélection du vecteur recombinant). Les transformants positifs ont été vérifiés par PCR sur colonies. Les deux souches recombinantes sont conservées en stocks glycérols 25% à -80°C.

4.6.3 Transformation transitoire en tabac

Des tabacs de l'espèce *Nicotiana tabacum* de six-semaines sont transformés par les souches d'agrobactéries recombinantes par agroinfiltration. Les souches sont cultivées en 5mL de LB gentamycine 25 µg/mL, rifampicine 50 µg/mL et spectinomycine 100µg/mL 24h à 30°C. Lavées à l'eau milliQ, resuspendue avec 1mL de milieu d'infiltration consistant en 50mM de MES, 2mM de Na₂PO₄, 0,5% de glucose et 100µM d'acetosyringone. La DO_{600nm} est mesurée et les cultures calibrées à 0,05 ou 0,1. Les tabacs sont infiltrés avec les différentes souches. La souche contrôle exprimant la PM-Apo et servant de contrôle de la membrane plasmique est co-infiltrée avec les souches exprimant les AtMCOs. Les tabacs sont laissés sur la paille pendant

48h puis des disques foliaires sont observés par microscopie confocale avec un microscope Confocal Leica SP8 (détecteurs 1 PMT et 2 PMTs hybride HyD GaAsP).

4.6.4 Acquisition en microscopie confocale

Les disques foliaires sont montés sur lame avec de l'eau milliQ et observés à l'objectif 40x eau. Les images et stacks obtenus sont traités avec le logiciel libre open-source ImageJ avec les packages « bio-formats » de Fiji.

4.7 RT-qPCR

4.7.1 Extraction d'ARN totaux et Transcription inverse

50 à 100mg de plantules entières sont broyées avec un broyeur à bille (fréquence 30coups/s pendant 1min) dans des tubes de 2mL contenant 2 billes en acier. Les broyats sont maintenus à -80°C jusqu'à extraction. Les ARN totaux sont extraits par Phénol/Chloroforme (Tri-Reagent® de Molecular Research Center, MRC) : 1mL de Tri-Reagent pour 100mg de tissu broyé incubé 5min à température ambiante. Puis 200µL de chloroforme pour 1mL de Tri-Reagent, agiter 15s et incubé 2min. Une centrifugation à 14000rpm 4°C pendant 1h. La phase supérieure est transférée (~600µL) dans 500µL d'Iso-propanol et les ARN précipité pendant 10min à température ambiante. Une centrifugation de 20min 14000rpm à 4°C, l'isopropanol est éliminé puis les culots sont lavés avec 500µL d'éthanol 75%. Après une dernière centrifugation 5min à 14000rpm, l'éthanol est précautionneusement éliminé et les culots séchés quelques minutes sur la paillasse. Les culots sont solubilisés dans 30µL d'eau milliQ stérile et les ARN totaux dosés avec un Nano Photomètre® N60/N50 (IMPLEM). La qualité des ARN totaux est vérifiée par électrophorèse sur agarose 2% 10min à 135V et stockés à -80°C. Les ADNc sont produits grâce au kit Promega GoScript™ Reverse Transcription System. Les ADNc sont dilués au 1/50 dans de l'eau stérile et utilisés comme matrice pour des PCR quantitatives. Les qPCR sont effectuées avec le kit ONEGreen fast premix de OZYME avec les primers correspondant.

4.7.2 Primers utilisés pour les qPCR

ACT2 forward : 5' TCTTGTTCCAGCCCTCGTTT 3' (20)

ACT2 reverse : 5' CTTTGCTCATACGGTCAGCGA 3' (21)

FER1 forward : 5' GTCGTGTTCCAGCCTTTCG 3' (19)
FER1 reverse : 5' TGCCCTCTCTCTTCCTCACT 3' (20)
NRAMP4 forward : 5' ACATCTGGCGGAGTTGTGTC 3' (20)
NRAMP4 reverse : 5' CAACACCAGCCCAAAGAGGA 3' (20)
VTL2 forward : 5' TGGGAGTTGGAGCTGTGAAG 3' (20)
VTL2 reverse : 5' CTCTCTCCATCTGAGCCACC 3' (20)
VTL5 forward : 5' CGATGGTCTGGTCACAGTCG 3' (20)
VTL5 reverse : 5' AGCCATACTACAAGCACCCG 3' (20)
COPT2 forward : 5' AGTGGCTCGCTCATTACC 3' (19)
COPT2 reverse : 5' CGACGATGAAAACACCTGCG 3' (20)
CSD1 forward : 5' TCCTGAGATCACAAAGGCCAA 3' (21)
CSD1 reverse : 5' GGTGTCACCAAGAGCATGGA 3' (20)

4.8 Analyses statistiques et graphiques

4.8.1 Tests Anova et post-hoc TukeyHSD

Les tests statistiques Anova et test post-hoc TukeyHSD ont été effectués avec le logiciel libre R version 4.1.2 (2021-11-01) -- "Bird Hippie" avec l'interface Rstudio [226]. Le seuil de significativité sélectionné est toujours une p.value inférieure à 0,05. Ce type d'analyse a été effectué pour les mesures de racines, pour les mesures de consommation en dioxygène, pour les dosages totaux des métaux. Packages utilisés pour effectuer les tests : statsr [227] ; multcompView [228].

4.8.2 Test t-student

Les tests statistiques t-student ont été effectués sur le même logiciel que les tests Anova (voir ci-dessus), avec le même seuil de significativité. Ce type de test a été utilisé pour les analyses d'expression pour comparer deux à deux les mesures.

4.8.3 Version et packages utilisés pour générer les graphiques

Les graphiques ont été générés avec le logiciel libre R (voir référence ci-dessus) et exportés au format jpeg. Packages R : ggplot2 [229] ; dplyr [230] ; gridExtra [231] ; ggpubr [232].

5 REFERENCES

- [1] J. E. Posey and F. C. Gherardini, “Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen,” *Science* (80-.), vol. 288, no. 5471, pp. 1651–1653, 2000.
- [2] T. W. Lyons, C. T. Reinhard, and N. J. Planavsky, “The rise of oxygen in Earth’s early ocean and atmosphere,” *Nature*, vol. 506, no. 7488, pp. 307–315, 2014.
- [3] T. W. Lyons, “Oxygen’s rise reduced,” *Nature*, vol. 448, no. 15, pp. 1005–1006, 2007.
- [4] D. E. Canfield, E. Kristensen, and B. Thamdrup, *Advances in Marine Biology Volume 48: Aquatic Geomicrobiology*, vol. 36. 2005.
- [5] C. C. Winterbourn, “Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction,” *Toxicol. Lett.*, vol. 82–83, no. C, pp. 969–974, 1995.
- [6] R. J. . Williams and J. J. . Frausto da Silva, *The chemistry of evolution: the development of our ecosystem*, vol. 44, no. 07. 2006.
- [7] P. G. Ridge, Y. Zhang, and V. N. Gladyshev, “Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen,” *PLoS One*, vol. 3, no. 1, 2008.
- [8] A. M. Nersissian and E. L. Shipp, “Blue copper-binding domains,” *Adv. Protein Chem.*, vol. 60, pp. 271–340, 2002.
- [9] E. I. Solomon, A. J. Augustine, and J. Yoon, “O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases,” *Dalt. Trans.*, vol. 9226, no. 30, pp. 3921–3932, 2008.
- [10] J. Yoon and E. I. Solomon, “into the Reductive Cleavage of the O-O Bond,” *October*, vol. 129, no. 43, pp. 13127–13136, 2008.
- [11] R. R. R. Crichton and J.-L. L. Pierre, “Old iron, young copper: From Mars to Venus,” *BioMetals*, vol. 14, no. 2, pp. 99–112, 2001.
- [12] J. Liu *et al.*, “Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers,” *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 8, pp. 4366–4369, 2014.
- [13] M. E. P. P. Murphy, P. F. Lindley, and E. T. Adman, “Structural comparison of cupredoxin domains: Domain recycling to construct proteins with novel functions,” *Protein Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 761–770, 2008.
- [14] L. G. Rydén and L. T. Hunt, “Evolution of protein complexity: The blue copper-containing oxidases and related proteins,” *J. Mol. Evol.*, vol. 36, no. 1, pp. 41–66, 1993.

- [15] A. Vasin, S. Klotchenko, and L. Puchkova, "Phylogenetic Analysis of Six-Domain Multi-Copper Blue Proteins," *PLoS Curr.*, no. MARCH 2013, pp. 1–18, 2013.
- [16] A. J. Terzulli and D. J. Kosman, "The Fox1 ferroxidase of *Chlamydomonas reinhardtii*: A new multicopper oxidase structural paradigm," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 14, no. 2, pp. 315–325, 2009.
- [17] K. Nakamura, T. Kawabata, K. Yura, and N. Go, "Novel types of two-domain multicopper oxidases: Possible missing links in the evolution," *FEBS Lett.*, vol. 553, no. 3, pp. 239–244, 2003.
- [18] K. Nakamura and N. Go, "Function and molecular evolution of multicopper blue proteins," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 18, pp. 2050–2066, 2005.
- [19] P. Lindley, G. Card, I. Zaitseva, and Z. Vjacheslav, "Ceruleoplasmin: the beginning of the end of an enigma," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 1999.
- [20] Q. Zhao *et al.*, "LACCASE is necessary and nonredundant with PEROXIDASE for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*," *Plant Cell*, vol. 25, no. 10, pp. 3976–3987, 2013.
- [21] S. Berthet *et al.*, *Role of Plant Laccases in Lignin Polymerization*, 1st ed., vol. 61. Elsevier Ltd., 2012.
- [22] S. Berthet *et al.*, "Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems," *Plant Cell*, vol. 23, no. 3, pp. 1124–1137, 2011.
- [23] L. Pourcel, J. M. Routaboul, L. Kerhoas, M. Caboche, L. Lepiniec, and I. Debeaujon, "TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat," *Plant Cell*, vol. 17, no. 11, pp. 2966–2980, 2005.
- [24] P. J. Hoegger, S. Kilaru, T. Y. James, J. R. Thacker, and U. Kües, "Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences," *FEBS J.*, vol. 273, no. 10, pp. 2308–2326, 2006.
- [25] L. Grillet *et al.*, "Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 5, pp. 2515–2525, 2014.

- [26] G. R. Buettner and B. A. Jurkiewicz, "Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid," *Radiat. Res.*, vol. 145, no. 5, pp. 532–541, 1996.
- [27] G. W. Felton and C. B. Summers, "Potential role of ascorbate oxidase as a plant defense protein against insect herbivory," *J. Chem. Ecol.*, vol. 19, no. 7, pp. 1553–1568, 1993.
- [28] C. Pignocchi, J. M. Fletcher, J. E. Wilkinson, J. D. Barnes, and C. H. Foyer, "The function of ascorbate oxidase in tobacco," *Plant Physiol.*, vol. 132, no. 3, pp. 1631–1641, 2003.
- [29] A. Yamamoto *et al.*, "Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants," *J. Exp. Bot.*, vol. 56, no. 417, pp. 1785–1796, 2005.
- [30] P. M. Harrison and P. Arosio, "The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1275, no. 3, pp. 161–203, 1996.
- [31] N. D. Chasteen and P. M. Harrison, "Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage," *J. Struct. Biol.*, vol. 126, no. 3, pp. 182–194, 1999.
- [32] H. Marschner, "Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions," *Miner. Nutr. High. Plants*, pp. 596–680, 1995.
- [33] J. F. Briat and S. Lobreaux, "Iron transport and storage in plants," *Trends Plant Sci.*, vol. 2, no. 5, pp. 187–193, 1997.
- [34] S. A. Kim and M. Lou Guerinot, "Mining iron: Iron uptake and transport in plants," *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 12, pp. 2273–2280, 2007.
- [35] V. Romheld, "Different strategies for iron acquisition in higher plants," *Physiol. Plant.*, vol. 70, no. 2, pp. 231–234, 1987.
- [36] S. Santi and W. Schmidt, "Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots," *New Phytol.*, vol. 183, no. 4, pp. 1072–1084, 2009.
- [37] U. Schwertmann, "Solubility and dissolution of iron-oxides," *Plant Soil*, vol. 130, pp. 1–25, 1991.
- [38] A. O. Ralph, B. C. Ralph, and H. B. and Jesse, "The Enhancement of Soil Fertility by Plant Roots: Some plants, often with the help of microorganisms, can chemically modify

- the soil close to their roots in ways that increase or decrease the absorption of crucial ions on JSTOR,” 1981. [Online]. Available: https://www.jstor.org/stable/27850529?read-now=1&refreqid=excelsior%3A003062f1a20185e87db46ad68f0bd65e&seq=1#page_scan_tab_contents. [Accessed: 14-Jul-2021].
- [39] N. J. Robinson, C. M. Procter, E. L. Connolly, and M. Lou Guerinot, “A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils,” *Nature*, vol. 397, no. 6721, pp. 694–697, 1999.
- [40] C. Varotto, D. Maiwald, P. Pesaresi, P. Jahns, F. Salamini, and D. Leister, “The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*,” *Plant J.*, vol. 31, no. 5, pp. 589–599, 2002.
- [41] G. Vert *et al.*, “IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth,” *Plant Cell*, vol. 133, no. June, pp. 1223–1233, 2002.
- [42] A. Martín-Barranco, J. Spielmann, G. Dubeaux, G. Vert, and E. Zelazny, “Dynamic control of the high-affinity iron uptake complex in root epidermal cells,” *Plant Physiol.*, vol. 184, no. 3, pp. 1236–1250, 2020.
- [43] K. Higuchi, K. Suzuki, H. Nakanishi, H. Yamaguchi, N. K. Nishizawa, and S. Mori, “Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores,” *Plant Physiol.*, vol. 119, no. 2, pp. 471–80, 1999.
- [44] S. Shojima, N.-K. Nishizawa, S. Fushiya, S. Nozoe, T. Irifune, and S. Mori, “Biosynthesis of Phytosiderophores,” *Plant Physiol.*, vol. 93, pp. 1497–1503, 1990.
- [45] T. Nozoye *et al.*, “Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 7, pp. 5446–5454, 2011.
- [46] C. Curie, Z. Panaviene, C. Loulergue, S. L. Dellaporta, J. F. Briat, and E. L. Walker, “Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake,” *Nature*, vol. 409, no. 6818, pp. 346–349, 2001.
- [47] H. Inoue *et al.*, “Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron (III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 6, pp. 3470–3479, 2009.
- [48] K. Robe, E. Izquierdo, F. Vignols, H. Rouached, and C. Dubos, “The Coumarins: Secondary Metabolites Playing a Primary Role in Plant Nutrition and Health,” *Trends Plant Sci.*, vol. 26, no. 3, pp. 248–259, 2021.

- [49] S. Cesco, G. Neumann, N. Tomasi, R. Pinton, and L. Weiskopf, "Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition," *Plant Soil*, vol. 329, no. 1, pp. 1–25, 2010.
- [50] P. Fourcroy *et al.*, "Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency," *New Phytol.*, vol. 201, no. 1, pp. 155–167, 2014.
- [51] P. Sisó-Terraza, J. J. Rios, J. Abadía, A. Abadía, and A. Álvarez-Fernández, "Flavins secreted by roots of iron-deficient Beta vulgaris enable mining of ferric oxide via reductive mechanisms," *New Phytol.*, vol. 209, no. 2, pp. 733–745, 2016.
- [52] Y. Ishimaru *et al.*, "Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺," *Plant J.*, vol. 45, no. 3, pp. 335–346, 2006.
- [53] L. D. Palmer and E. P. Skaar, "Transition Metals and Virulence in Bacteria," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 50, no. 1, pp. 67–91, 2016.
- [54] U. Stephan, I. Schmidke, V. Stephan, and G. Scholz, "The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants," *Biometals*, vol. 9, no. 1, pp. 84–90, 1996.
- [55] N. Von Wiren *et al.*, "Nicotianamine Chelates Both Fe III and Fe II . Implications for Metal Transport in Plants 1," vol. 119, no. March, pp. 1107–1114, 1999.
- [56] R. Hell and U. W. Stephan, "Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants.," *Planta*, vol. 216, no. 4, pp. 541–551, 2003.
- [57] P. Flis, L. Ouerdane, L. Grillet, C. Curie, S. Mari, and R. Lobinski, "Inventory of metal complexes circulating in plant fluids: a reliable method based on HPLC coupled with dual elemental and high-resolution molecular mass spectrometric detection," *New Phytol.*, vol. 211, no. 3, pp. 1129–1141, 2016.
- [58] T. P. Durrett, W. Gassmann, and E. E. Rogers, "The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation," *Plant Physiol.*, vol. 144, no. 1, pp. 197–205, 2007.
- [59] H. Roschzttardtz, M. Seguela-Arnaud, J.-F. Briat, G. Vert, and C. Curie, "The FRD3 Citrate Effluxer Promotes Iron Nutrition between Symplastically Disconnected Tissues throughout Arabidopsis Development," *Plant Cell*, vol. 23, no. 7, pp. 2725–2737, 2011.

- [60] M. Bernal and U. Krämer, “Involvement of Arabidopsis Multi-Copper Oxidase-Encoding LACCASE12 in Root-to-Shoot Iron Partitioning: A Novel Example of Copper-Iron Crosstalk,” *Front. Plant Sci.*, no. October, pp. 1–19, 2021.
- [61] I. Mukherjee, N. H. Campbell, J. S. Ash, and E. L. Connolly, “Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper,” *Planta*, vol. 223, no. 6, pp. 1178–1190, 2006.
- [62] R. J. DiDonato, L. A. Roberts, T. Sanderson, R. B. Easley, and E. L. Walker, “Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): A metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes,” *Plant J.*, vol. 39, no. 3, pp. 403–414, 2004.
- [63] M. Le Jean *et al.*, “A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading,” *Plant J.*, vol. 44, no. 5, pp. 769–782, 2005.
- [64] B. M. Waters *et al.*, “Mutations in Arabidopsis yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds,” *Plant Physiol.*, vol. 141, no. August, pp. 1446–1458, 2006.
- [65] J. F. Briat, C. Curie, and F. Gaymard, “Iron utilization and metabolism in plants,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 10, no. 3, pp. 276–282, 2007.
- [66] C. Curie *et al.*, “Metal movement within the plant: Contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters,” *Ann. Bot.*, vol. 103, no. 1, pp. 1–11, 2009.
- [67] Z. Zhai *et al.*, “OPT3 Is a Phloem-Specific Iron Transporter That Is Essential for Systemic Iron Signaling and Redistribution of Iron and Cadmium in Arabidopsis,” *Plant Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 2249–2264, 2014.
- [68] G. Dubeaux, J. Neveu, E. Zelazny, and G. Vert, “Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition,” *Mol. Cell*, vol. 69, no. 6, pp. 953–964.e5, 2018.
- [69] E. P. Colangelo and M. Lou Guerinot, “The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response,” *Plant Cell*, vol. 16, no. 12, pp. 3400–3412, 2004.
- [70] P. Bauer, H. Q. Ling, and M. Lou Guerinot, “FIT, the FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR in Arabidopsis,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol.

45, no. 5, pp. 260–261, 2007.

- [71] Y. Yuan *et al.*, “FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis,” *Cell Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 385–397, 2008.
- [72] A. B. Sivitz, V. Hermand, C. Curie, and G. Vert, “Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 Control Iron Homeostasis via a FIT-Independent Pathway,” *PLoS One*, vol. 7, no. 9, 2012.
- [73] N. Wang *et al.*, “Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in arabidopsis thaliana,” *Mol. Plant*, vol. 6, no. 2, pp. 503–513, 2013.
- [74] S. Lingam *et al.*, “Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in Arabidopsis,” *Plant Cell*, vol. 23, no. 5, pp. 1815–1829, 2011.
- [75] M. Wild *et al.*, “Tissue-Specific Regulation of Gibberellin Signaling Fine-Tunes Arabidopsis Iron-Deficiency Responses,” *Dev. Cell*, vol. 37, no. 2, pp. 190–200, 2016.
- [76] C. M. Palmer, M. N. Hindt, H. Schmidt, S. Clemens, and M. Lou Guerinot, “MYB10 and MYB72 Are Required for Growth under Iron-Limiting Conditions,” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 11, 2013.
- [77] T. A. Long, H. Tsukagoshi, W. Busch, B. Lahner, D. E. Salt, and P. N. Benfey, “The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in arabidopsis roots,” *Plant Cell*, vol. 22, no. 7, pp. 2219–2236, 2010.
- [78] Y. Li *et al.*, “IRON MAN interacts with BRUTUS to maintain iron homeostasis in Arabidopsis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, no. 39, pp. 1–10, 2021.
- [79] D. Selote, R. Samira, A. Matthiadis, J. W. Gillikin, and T. A. Long, “Iron-binding e3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors1[open],” *Plant Physiol.*, vol. 167, no. 1, pp. 273–286, 2015.
- [80] Y. Ogo *et al.*, “The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions,” *Plant J.*, vol. 51, no. 3, pp. 366–377, 2007.

- [81] T. Kobayashi *et al.*, “The rice transcription factor IDEF1 is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes,” *Plant J.*, vol. 60, no. 6, pp. 948–961, 2009.
- [82] Y. Ogo *et al.*, “A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 19, pp. 13407–13417, 2008.
- [83] L. Zheng, Y. Ying, L. Wang, F. Wang, J. Whelan, and H. Shou, “Identification of a novel iron regulated basic helix-loop-helix protein involved in Fe homeostasis in *Oryza sativa*,” *BMC Plant Biol.*, vol. 10, pp. 1–9, 2010.
- [84] T. Kobayashi, S. Nagasaka, T. Senoura, R. N. Itai, H. Nakanishi, and N. K. Nishizawa, “Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation,” *Nat. Commun.*, vol. 4, 2013.
- [85] H. Zhang, Y. Li, X. Yao, G. Liang, and D. Yu, “POSITIVE REGULATOR OF IRON HOMEOSTASIS1, OsPRI1, facilitates Iron homeostasis,” *Plant Physiol.*, vol. 175, no. 1, pp. 543–554, 2017.
- [86] F. Gao and C. Dubos, “Transcriptional integration of plant responses to iron availability,” *J. Exp. Bot.*, vol. 72, no. 6, pp. 2056–2070, 2021.
- [87] L. J. Shin, J. C. Lo, G. H. Chen, J. Callis, H. Fu, and K. C. Yeh, “IRT1 degradation factor1, a ring E3 Ubiquitin ligase, regulates the degradation of iron-regulated transporter1 in *Arabidopsis*,” *Plant Cell*, vol. 25, no. 8, pp. 3039–3051, 2013.
- [88] M. Barberon *et al.*, “Monoubiquitin-dependent endocytosis of the Iron-Regulated Transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 32, 2011.
- [89] M. Barberon, G. Dubeaux, C. Kolb, E. Isono, E. Zelazny, and G. Vert, “Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 22, pp. 8293–8298, 2014.
- [90] E. Zelazny and G. Vert, “Regulation of Iron Uptake by IRT1: Endocytosis Pulls the Trigger,” *Mol. Plant*, vol. 8, no. 7, pp. 977–979, 2015.
- [91] R. K. Kumar *et al.*, “Iron-nicotianamine transporters are required for proper long

- distance iron signaling,” *Plant Physiol.*, vol. 175, no. 3, pp. 1254–1268, 2017.
- [92] Ste, U. W. Phan, and G. Scholz, “Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem?,” *Physiol. Plant.*, vol. 88, no. 3, pp. 522–529, 1993.
- [93] M. Schuler, R. Rellán-Álvarez, C. Fink-Straube, J. Abadía, and P. Bauera, “Nicotianamine functions in the phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in Arabidopsis,” *Plant Cell*, vol. 24, no. 6, pp. 2380–2400, 2012.
- [94] M. G. Stacey, S. Koh, J. Becker, and G. Stacey, “AtOPT3, a member of the oligopeptide transporter family, is essential for embryo development in Arabidopsis,” *Plant Cell*, vol. 14, no. 11, pp. 2799–2811, 2002.
- [95] M. J. García *et al.*, “Shoot to root communication is necessary to control the expression of iron-acquisition genes in Strategy I plants,” *Planta*, vol. 237, no. 1, pp. 65–75, 2013.
- [96] M. J. García, V. Suárez, F. J. Romera, E. Alcántara, and R. Pérez-Vicente, “A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 49, no. 5, pp. 537–544, 2011.
- [97] W. W. Chen *et al.*, “Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in arabidopsis,” *Plant Physiol.*, vol. 154, no. 2, pp. 810–819, 2010.
- [98] R. F. H. Giehl, J. E. Lima, and N. von Wirén, “Localized iron supply triggers lateral root elongation in Arabidopsis by altering the AUX1-mediated auxin distribution,” *Plant Cell*, vol. 24, no. 1, pp. 33–49, 2012.
- [99] Y. Qi *et al.*, “OsARF12, a transcription activator on auxin response gene, regulates root elongation and affects iron accumulation in rice (*Oryza sativa*),” *New Phytol.*, vol. 193, no. 1, pp. 109–120, 2012.
- [100] J. Wu *et al.*, “Ethylene is involved in the regulation of iron homeostasis by regulating the expression of iron-acquisition-related genes in *Oryza sativa*,” *J. Exp. Bot.*, vol. 62, no. 2, pp. 667–674, 2011.
- [101] D. Wendehenne, J. Durner, and D. F. Klessig, “Nitric oxide: A new player in plant signalling and defence responses,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 449–455, 2004.

- [102] M. Graziano and L. Lamattina, “Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots,” *Plant J.*, vol. 52, no. 5, pp. 949–960, 2007.
- [103] M. Graziano and L. Lamattina, “Nitric oxide and iron in plants: An emerging and converging story,” *Trends Plant Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 4–8, 2005.
- [104] J. Astier *et al.*, “S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants,” *Plant Sci.*, vol. 181, no. 5, pp. 527–533, 2011.
- [105] M. Séguéla, J. F. Briat, G. Vert, and C. Curie, “Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in Arabidopsis through a growth-dependent pathway,” *Plant J.*, vol. 55, no. 2, pp. 289–300, 2008.
- [106] J. Shah, “Plants under attack: systemic signals in defence,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 12, no. 4, pp. 459–464, 2009.
- [107] C. Wasternack and E. Kombrink, “Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 63–77, 2010.
- [108] F. Maurer, S. Müller, and P. Bauer, “Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 49, no. 5, pp. 530–536, 2011.
- [109] T. Kobayashi *et al.*, “The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 48, pp. 19150–19155, 2007.
- [110] T. Kobayashi, R. N. Itai, M. S. Aung, T. Senoura, H. Nakanishi, and N. K. Nishizawa, “The rice transcription factor IDEF1 directly binds to iron and other divalent metals for sensing cellular iron status,” *Plant J.*, vol. 69, no. 1, pp. 81–91, 2012.
- [111] L. Grillet, P. Lan, W. Li, G. Mokkaapati, and W. Schmidt, “IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants,” *Nat. Plants*, vol. 4, no. 11, pp. 953–963, 2018.
- [112] W. Stumm and G. F. Lee, “Oxygenation of Ferrous Iron,” vol. 53, no. 2, pp. 143–146, 1961.
- [113] M. Becker and F. Asch, “Iron toxicity in rice - Conditions and management concepts,”

J. Plant Nutr. Soil Sci., vol. 168, no. 4, pp. 558–573, 2005.

- [114] M. S. Aung and H. Masuda, “How Does Rice Defend Against Excess Iron?: Physiological and Molecular Mechanisms,” *Front. Plant Sci.*, vol. 11, no. August, pp. 1–8, 2020.
- [115] T. Shikanai, P. Müller-Moulé, Y. Munekage, K. K. Niyogi, and M. Pilon, “PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts,” *Plant Cell*, vol. 15, no. 6, pp. 1333–1346, 2003.
- [116] F. Kellermeier, P. Armengaud, T. J. Seditas, J. Danku, D. E. Salt, and A. Amtmann, “Analysis of the root system architecture of Arabidopsis provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals,” *Plant Cell*, vol. 26, no. 4, pp. 1480–1496, 2014.
- [117] P. Arosio, R. Ingrassia, and P. Cavadini, “Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1790, no. 7, pp. 589–599, 2009.
- [118] J. F. Briat, F. Cellier, and F. Gaymard, “Ferritins and iron accumulation in plant tissues,” *Iron Nutr. Plants Rhizospheric Microorg.*, pp. 341–357, 2006.
- [119] S. C. Andrews, A. K. Robinson, and F. Rodríguez-Quñones, “Bacterial iron homeostasis,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 27, no. 2–3, pp. 215–237, 2003.
- [120] G. S. Waldo, E. Wright, Z. H. Whang, J. F. Briat, E. C. Theil, and D. E. Sayers, “Formation of the ferritin iron mineral occurs in plastids: An x-ray absorption spectroscopy study,” *Plant Physiol.*, vol. 109, no. 3, pp. 797–802, 1995.
- [121] V. J. Wade *et al.*, “Structure and composition of ferritin cores from pea seed (*Pisum sativum*),” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.*, vol. 1161, no. 1, pp. 91–96, 1993.
- [122] J. Seckback, “Ferretting Out the Secrets of Plant Ferritin - A Review,” *J. Plant Nutr.*, vol. 5, no. 4–7, pp. 369–394, 1982.
- [123] I. Murgia, M. Delledonne, and C. Soave, “Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in Arabidopsis,” *Plant J.*, vol. 30, no. 5, pp. 521–528, 2002.
- [124] K. Ravet, B. Touraine, J. Boucherez, J. F. Briat, F. Gaymard, and F. Cellier, “Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis,” *Plant*

J., vol. 57, no. 3, pp. 400–412, 2009.

- [125] S. Lobreaux and J.-F. Briat, “Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development,” *Biochem. J.*, vol. 274, pp. 601–606, 1991.
- [126] H. Inoue, K. Higuchi, M. Takahashi, H. Nakanishi, S. Mori, and N. K. Nishizawa, “Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron,” *Plant J.*, vol. 36, no. 3, pp. 366–381, 2003.
- [127] Y. Zhang, Y. H. Xu, H. Y. Yi, and J. M. Gong, “Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice,” *Plant J.*, vol. 72, no. 3, pp. 400–410, 2012.
- [128] R. J. Stein, F. K. Ricachenevsky, and J. P. Fett, “Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2),” *Plant Sci.*, vol. 177, no. 6, pp. 563–569, 2009.
- [129] M. S. Aung, H. Masuda, T. Kobayashi, and N. K. Nishizawa, “Physiological and transcriptomic analysis of responses to different levels of iron excess stress in various rice tissues,” *Soil Sci. Plant Nutr.*, vol. 64, no. 3, pp. 370–385, 2018.
- [130] T. Kobayashi, T. Nozoye, and N. K. Nishizawa, “Iron transport and its regulation in plants,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 133, pp. 11–20, 2019.
- [131] M. Kawase, “Effect of Ethylene on Aerenchyma Development,” *Am. J. Bot.*, vol. 68, no. 5, pp. 651–658, 1981.
- [132] C. C. Chen, J. B. Dixon, and F. T. Turner, “Iron Coatings on Rice Roots: Mineralogy and Quantity Influencing Factors,” *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 44, no. 3, pp. 635–639, 1980.
- [133] C. M. Geilfus, “The pH of the Apoplast: Dynamic Factor with Functional Impact Under Stress,” *Mol. Plant*, vol. 10, no. 11, pp. 1371–1386, 2017.
- [134] M. N. Hindt *et al.*, “BRUTUS and its paralogs, BTS LIKE1 and BTS LIKE2, encode important negative regulators of the iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana*,” *Metallomics*, vol. 9, no. 7, pp. 876–890, 2017.
- [135] J. M. Petit, O. Van Wuytswinkel, J. F. Briat, and S. Lobréaux, “Characterization of an Iron-dependent Regulatory Sequence Involved in the Transcriptional Control of AtFer1

- and ZmFer1 Plant Ferritin Genes by Iron,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 8, pp. 5584–5590, 2001.
- [136] N. Tissot *et al.*, “Transcriptional integration of the responses to iron availability in *Arabidopsis* by the bHLH factor ILR3,” *New Phytol.*, vol. 223, no. 3, pp. 1433–1446, 2019.
- [137] E. L. Connolly, J. P. Fett, and M. Lou Guerinot, “Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation,” *Plant Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 1347–1357, 2002.
- [138] A. T. McKie *et al.*, “An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron,” *Science (80-.)*, vol. 291, no. 5509, pp. 1755–1759, 2001.
- [139] H. Gunshin, Y. Fujiwara, A. O. Custodio, C. DiRenzo, S. Robine, and N. C. Andrews, “Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 5, pp. 1258–1266, 2005.
- [140] A. Donovan *et al.*, “The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis,” *Cell Metab.*, vol. 1, no. 3, pp. 191–200, 2005.
- [141] C. D. Vulpe *et al.*, “Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse,” *Nat. Genet.*, vol. 21, no. 2, pp. 195–199, 1999.
- [142] P. T. Gomme and K. B. McCann, “Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions,” *Drug Discov. Today*, vol. 10, no. 4, pp. 267–273, 2005.
- [143] O. Han and E. Y. Kim, “Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 101, no. 4, pp. 1000–1010, 2007.
- [144] S. Osaki, A. D. Johnson, and E. Frieden, “The Possible Significance of the Ferrous Oxidase Activity of Ceruloplasmin in Normal Human Serum,” *J. Biol. Chem.*, no. 12, pp. 2746–2751, 1966.
- [145] T. A. Rouault, “Regulation of iron metabolism in mammalian cells,” *Iron Physiol. Pathophysiol. Humans*, pp. 51–62, 2012.
- [146] T. A. Rouault, “The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 8, pp. 406–414, 2006.
- [147] D. M. De Silva, C. C. Askwith, D. Eide, and J. Kaplan, “The FET3 gene product required

- for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 3, pp. 1098–1101, 1995.
- [148] R. Stearman, D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner, and A. Dancis, “A Permease-Oxidase Complex Involved in High-Affinity Iron Uptake in Yeast,” *Science* (80-.), vol. 271, no. 5255, pp. 1552–1557, 1996.
- [149] E. Y. Kwok, S. Severance, and D. J. Kosman, “Evidence for Iron Channeling in the Fet3p–Ftr1p High-Affinity Iron Uptake Complex in the Yeast Plasma Membrane †,” *Biochemistry*, vol. 45, no. 20, pp. 6317–6327, May 2006.
- [150] C. Askwith *et al.*, “The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake,” *Cell*, vol. 76, no. 2, pp. 403–410, 1994.
- [151] A. B. Taylor, C. S. Stoj, L. Ziegler, D. J. Kosman, and P. J. Hart, “The copper-iron connection in biology: Structure of the metallo-oxidase Fet3p,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 43, pp. 15459–15464, 2005.
- [152] D. Dix, J. Bridgham, M. Broderius, and D. Eide, “Characterization of the FET4 Protein of Yeast,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 18, pp. 11770–11777, 1997.
- [153] D. R. Dix, J. T. Bridgham, M. a. Broderius, C. a. Byersdorfer, and D. J. Eide, “The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 42, pp. 26092–99, 1994.
- [154] A. Terzulli and D. J. Kosman, “Analysis of the high-affinity iron uptake system at the *Chlamydomonas reinhardtii* plasma membrane,” *Eukaryot. Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 815–826, 2010.
- [155] J. C. Chen, S. I. Hsieh, J. Kropat, and S. S. Merchant, “A ferroxidase encoded by FOX1 contributes to iron assimilation under conditions of poor iron nutrition in *Chlamydomonas*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 7, no. 3, pp. 541–545, 2008.
- [156] A. Herbik, C. Bölling, and T. J. Buckhout, “The involvement of a multicopper oxidase in iron uptake by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Plant Physiol.*, vol. 130, no. 4, pp. 2039–2048, 2002.
- [157] S. La Fontaine *et al.*, “Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 1, no. 5, pp. 736–757, 2002.

- [158] M. D. Knutson, “Iron transport proteins: Gateways of cellular and systemic iron homeostasis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 31, pp. 12735–12743, 2017.
- [159] A. C. Illing, A. Shawki, C. L. Cunningham, and B. Mackenzie, “Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 36, pp. 30485–30496, 2012.
- [160] I. De Domenico *et al.*, “Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin,” *EMBO J.*, vol. 26, no. 12, pp. 2823–2831, 2007.
- [161] J. T. Hoopes and J. F. D. Dean, “Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 42, no. 1, pp. 27–33, 2004.
- [162] J. Müller *et al.*, “Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability,” *Dev. Cell*, vol. 33, no. 2, pp. 216–230, 2015.
- [163] H. Roschztardt, G. Conejero, C. Curie, and S. Mari, “Identification of the Endodermal Vacuole as the Iron Storage Compartment in the *Arabidopsis* Embryo,” *Plant Physiol.*, vol. 151, no. 3, pp. 1329–1338, 2009.
- [164] D. M. Miller and S. D. Aust, “Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 271, no. 1, pp. 113–119, 1989.
- [165] D. M. Brown, L. A. H. Zeef, J. Ellis, R. Goodacre, and S. R. Turner, “Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics,” *Plant Cell*, vol. 17, no. 8, pp. 2281–2295, 2005.
- [166] H. Khandal, A. P. Singh, and D. Chattopadhyay, “The microRNA397b-LaCCASE2 module regulates root lignification under water and phosphate deficiency,” *Plant Physiol.*, vol. 182, no. 3, pp. 1387–1403, 2020.
- [167] Y. Lee *et al.*, “A Lignin Molecular Brace Controls Precision Processing of Cell Walls Critical for Surface Integrity in *Arabidopsis*,” *Cell*, vol. 173, no. 6, pp. 1468–1480.e9, 2018.
- [168] P. V. Turlapati, K. W. Kim, L. B. Davin, and N. G. Lewis, “The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: Towards addressing the mystery of their gene function(s),” *Planta*, vol. 233, no. 3, pp. 439–470, 2011.

- [169] B. C. McCaig, R. B. Meagher, and J. F. D. Dean, “Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*,” *Planta*, vol. 221, no. 5, pp. 619–636, 2005.
- [170] M. Gouy, S. Guindon, and O. Gascuel, “Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 27, no. 2, pp. 221–224, 2010.
- [171] D. Winter, B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G. V. Wilson, and N. J. Provart, “An ‘electronic fluorescent pictograph’ Browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets,” *PLoS One*, vol. 2, no. 8, pp. 1–12, 2007.
- [172] L. T. Jensen and V. C. Culotta, “Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron,” *J. Mol. Biol.*, vol. 318, no. 2, pp. 251–260, 2002.
- [173] G. Vert, J. F. Briat, and C. Curie, “*Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter,” *Plant J.*, vol. 26, no. 2, pp. 181–189, 2001.
- [174] G. Vert, M. Barberon, E. Zelazny, M. Séguéla, J. F. Briat, and C. Curie, “*Arabidopsis* IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells,” *Planta*, vol. 229, no. 6, pp. 1171–1179, 2009.
- [175] V. Lanquar *et al.*, “Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron,” *EMBO J.*, vol. 24, no. 23, pp. 4041–4051, 2005.
- [176] S. S. Conte and E. L. Walker, *Genetic and Biochemical Approaches for Studying the Yellow Stripe-Like Transporter Family in Plants*, vol. 69. Elsevier, 2012.
- [177] L. Li, C. D. Vulpe, and J. Kaplan, “Functional studies of hephaestin in yeast: Evidence for multicopper oxidase activity in the endocytic pathway,” *Biochem. J.*, vol. 375, no. 3, pp. 793–798, 2003.
- [178] D. De Silva, S. Davis-Kaplan, J. Fergestad, and J. Kaplan, “Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 22, pp. 14208–14213, 1997.
- [179] X. Shi, C. Stoj, A. Romeo, D. J. Kosman, and Z. Zhu, “Fre1p Cu²⁺Reduction and Fet3p Cu¹⁺Oxidation Modulate Copper Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 50, pp. 50309–50315, 2003.

- [180] C. Stoj and D. J. Kosman, "Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: Implication for function," *FEBS Lett.*, vol. 554, no. 3, pp. 422–426, 2003.
- [181] G. R. Buettner and G. Czapski, "Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates," *Free Radic. Res.*, vol. 1, no. 6, pp. 349–353, 1986.
- [182] R. Hassett and D. J. Kosman, "Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 1, pp. 128–134, 1995.
- [183] K. H. Norris, J. H. Bennettl, J. C. Brownl, and T. Zaharieva, "Photochemical Reduction of Iron. I. Light Reactions," *J. Plant Nutr.*, vol. 5, no. 4–7, pp. 323–333, 1982.
- [184] R. H. De Deken, "The Crabtree effect: a regulatory system in yeast," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 149–156, 1966.
- [185] D. J. Kosman, "Multicopper Oxidase Assembly," *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.*, pp. 1–17, 2017.
- [186] R. Liso *et al.*, "Localization of ascorbic acid, ascorbic acid oxidase, and glutathione in roots of *Cucurbita maxima* L.," *J. Exp. Bot.*, vol. 55, no. 408, pp. 2589–2597, 2004.
- [187] N. Hoffmann, A. Benske, H. Betz, M. Schuetz, and A. Lacey Samuels, "Laccases and peroxidases co-localize in lignified secondary cell walls throughout stem development," *Plant Physiol.*, vol. 184, no. 2, pp. 806–822, 2020.
- [188] C. Grefen, N. Donald, K. Hashimoto, J. Kudla, K. Schumacher, and M. R. Blatt, "A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies," *Plant J.*, vol. 64, no. 2, pp. 355–365, 2010.
- [189] A. Martinière, R. Gibrat, H. Sentenac, X. Dumont, I. Gaillard, and N. Paris, "Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 25, pp. 6488–6493, 2018.
- [190] G. Li, W. Xu, H. J. Kronzucker, and W. Shi, "Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in *Arabidopsis*," *J. Exp. Bot.*, vol. 66, no. 7, pp. 2041–2054, 2015.
- [191] A. G. Scheinberg, I. H., and Morell, "In Inorganic Biochemistry," *Elsevier*, pp. 306–319, 1973.

- [192] J. Nguyen-Legros, J. Bizot, M. Bolesse, and J. P. Pulicani, "Diaminobenzidine black as a new histochemical demonstration of exogenous iron," *Histochemistry*, vol. 66, no. 3, pp. 239–44, 1980.
- [193] O. Van Wuytswinkel, G. Vansuyt, N. Grignon, P. Fourcroy, and J. F. Briat, "Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin," *Plant J.*, vol. 17, no. 1, pp. 93–97, 1999.
- [194] J. L. Burkhead, K. A. Gogolin Reynolds, S. E. Abdel-Ghany, C. M. Cohu, and M. Pilon, "Copper homeostasis," *New Phytol.*, vol. 182, no. 4, pp. 799–816, 2009.
- [195] R. Sunkar, A. Kapoor, and J. K. Zhu, "Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance (Plant Cell (2006) 18 (2051-2065))," *Plant Cell*, vol. 18, no. 9, p. 2415, 2006.
- [196] H. Roschztardt et al., "New insights into Fe localization in plant tissues," *Front. Plant Sci.*, vol. 4, no. September, pp. 1–11, 2013.
- [197] V. Hervé et al., "An enlarged cell wall proteome of Arabidopsis thaliana rosettes," *Proteomics*, vol. 16, no. 24, pp. 3183–3187, 2016.
- [198] M. A. Green and S. C. Fry, "Apoplastic degradation of ascorbate: Novel enzymes and metabolites permeating the plant cell wall," *Plant Biosyst.*, vol. 139, no. 1, pp. 2–7, 2005.
- [199] G. Diallinas et al., "Melon ascorbate oxidase: Cloning of a multigene family, induction during fruit development and repression by wounding," *Plant Mol. Biol.*, vol. 34, no. 5, pp. 759–770, 1997.
- [200] R. Lagunas, "Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 27, no. 3, pp. 139–146, 1979.
- [201] M. Johnston, "Feasting, fasting and fermenting: Glucose sensing in yeast and other cells," *Trends Genet.*, vol. 15, no. 1, pp. 29–33, 1999.
- [202] G. Reyt, S. Boudouf, J. Boucherez, F. Gaymard, and J. F. Briat, "Iron- and ferritin-dependent reactive oxygen species distribution: Impact on arabidopsis root system architecture," *Mol. Plant*, vol. 8, no. 3, pp. 439–453, 2015.
- [203] G. A. Vert, J. F. Briat, and C. Curie, "Dual regulation of the Arabidopsis high-affinity

- root iron uptake system by local and long-distance signals,” *Plant Physiol.*, vol. 132, no. 2, pp. 796–804, 2003.
- [204] J.-M. Petit, J.-F. Briat, and S. Lobréaux, “Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family,” *Biochem. J.*, vol. 359, no. 3, p. 575, 2001.
- [205] J. Gollhofer, C. Schläwicke, N. Jungnick, W. Schmidt, and T. J. Buckhout, “Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 49, no. 5, pp. 557–564, 2011.
- [206] C. Pignocchi and C. H. Foyer, “Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 379–389, 2003.
- [207] C. H. Foyer, T. Kyndt, and R. D. Hancock, “Vitamin C in Plants: Novel Concepts, New Perspectives, and Outstanding Issues,” *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 32, no. 7, pp. 463–485, 2020.
- [208] N. Smirnoff, “The function and metabolism of ascorbic acid in plants,” *Ann. Bot.*, vol. 78, no. 6, pp. 661–669, 1996.
- [209] H. Sandermann, “Ecotoxicology of ozone: Bioactivation of extracellular ascorbate,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 366, no. 2, pp. 271–274, 2008.
- [210] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, “Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 246, no. 2, pp. 501–514, 1986.
- [211] M. Reymond, S. Svistoonoff, O. Loudet, L. Nussaume, and T. Desnos, “Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*,” *Plant, Cell Environ.*, vol. 29, no. 1, pp. 115–125, 2006.
- [212] S. Svistoonoff *et al.*, “Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture,” *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 6, pp. 792–796, 2007.
- [213] A. Vatén *et al.*, “Callose Biosynthesis Regulates Symplastic Trafficking during Root Development,” *Dev. Cell*, vol. 21, no. 6, pp. 1144–1155, 2011.
- [214] Y. Benitez-Alfonso *et al.*, “Control of *Arabidopsis* meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*

A., vol. 106, no. 9, pp. 3615–3620, 2009.

- [215] W. Cui and J. Y. Lee, “Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress,” *Nat. Plants*, vol. 2, no. 5, 2016.
- [216] M. C. Pereira, L. C. A. Oliveira, and E. Murad, “Iron oxide catalysts: Fenton and Fentonlike reactions – a review,” *Clay Miner.*, vol. 47, no. 3, pp. 285–302, 2012.
- [217] D. J. Kosman and B. Sciences, “The teleosts of metallo-reduction and metallo-oxidation in eukaryotic iron and copper trafficking,” vol. 10, no. 3, pp. 370–377, 2019.
- [218] G. J. Anderson and F. Wang, “Essential but toxic: Controlling the flux of iron in the body,” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 39, no. 8, pp. 719–724, 2012.
- [219] T. Ganz, “Systemic iron homeostasis,” *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 4, pp. 1721–1741, 2013.
- [220] E. Himelblau and R. M. Amasino, “Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence,” *J. Plant Physiol.*, vol. 158, no. 10, pp. 1317–1323, 2001.
- [221] M. Pottier, J. Dumont, C. Masclaux-Daubresse, and S. Thomine, “Autophagy is essential for optimal translocation of iron to seeds in *Arabidopsis*,” *J. Exp. Bot.*, vol. 70, no. 3, pp. 845–858, 2019.
- [222] S. Bulley and W. Laing, “The regulation of ascorbate biosynthesis,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 33, no. vitamin C, pp. 15–22, 2016.
- [223] J. Wang, Z. Zhang, and R. Huang, “Regulation of ascorbic acid synthesis in plants,” *Plant Signal. Behav.*, vol. 8, no. 6, 2013.
- [224] Z. P. Wang *et al.*, “Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation,” *Genome Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, 2015.
- [225] A. F. Bent, S. J. Clough, A. F. Bent, and S. J. Clough, “Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*,” *Plant J.*, vol. 16, no. 6, pp. 735–743, 1998.
- [226] R Core Team, “R: A Language and Environment for Statistical Computing.” Vienna, Austria, 2021.

- [227] R. Colin, M. C. Banks, M. Rundel, and D. Clyde, “statsr: Companion Software for the Coursera Statistics with R Specialization,” 2021.
- [228] S. Graves, H.-P. Piepho, and L. S. with help from Sundar Dorai-Raj, “multcompView: Visualizations of Paired Comparisons.” 2019.
- [229] H. Wickham *et al.*, “ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics.” 2021.
- [230] H. Wickham, R. François, L. Henry, and K. Müller, “dplyr: A Grammar of Data Manipulation.” 2021.
- [231] B. Auguie, “gridExtra: Miscellaneous Functions for ‘Grid’ Graphics.” 2017.
- [232] A. Kassambara, “ggpubr: ggplot2 Based Publication Ready Plots.” 2020.

Abstract

Iron is a universal essential micronutrient for primordial metabolism (respiration, photosynthesis, electron transfer etc ...). Although abundant, it is not bio-available in aerobic environments and can generate ROS. Its acquisition and transport require the control of its redox status to limit its toxicity. In addition to iron reduction to mobilize it, eukaryotic models have ferroxidases associated with transporters to transport iron in the form of Fe(III), less toxic than Fe(II). In higher plants, iron reduction has received particular attention in the context of the fight against iron deficiency in culture soil for crops, but the study of ferroxidation has remained superficial until very recently. Ferroxidases exist in Arabidopsis but their role, if any, in iron homeostasis has not yet been elucidated. In Arabidopsis, there are several potential ferroxidases including a small subfamily of Multicopper-oxidases (MCO1,2,3) which has a great similarity with the ferroxidase model FET3 of *S.cerevisiae* yeast. In my work, I was able to highlight that among them, MCO3 has a ferroxidase activity and complements the *fet3fet4* mutant; MCO1 and MCO3 are apoplasmic proteins. To analyze the physiological role of these genes, I generated a triple mutant *mco1,2,3* by CRISPR/Cas9. Using iron imaging approaches, I was able to show that the mesophyll cells of the triple mutant accumulate more iron than the wild. Specifically, more iron is observed in chloroplasts and in vacuoles. These observations were confirmed by analysis of the expression of genes related to intracellular iron transport. In the triple mutant *mco1,2,3*, the VTL2 and VTL5 genes, encoding vacuolar iron influx transporters, are induced while the vacuolar efflux transporter, NRAMP4, is repressed. This over-accumulation of iron could lead to some toxicity, also suggested by a higher production of reactive oxygen species in the triple mutant. I propose that these AtMCOs would form an additional barrier in the management of excess iron at mesophyll cells surface, thus influencing iron distribution at the cellular level by limiting its entry into leaf cells. AtMCOs thus enlarge the small cohort of Arabidopsis known ferroxidases (with LPR1 and LAC12 (Muller *et al* 2015; Bernal *et al* 2021)) whose integration into Arabidopsis iron homeostasis remains to be clarified.

Résumé

Le fer est un micronutriment essentiel universel pour des réactions primordiales du métabolisme (respiration, photosynthèse, transfert d'électron etc...). Bien qu'abondant, il est peu bio-disponible en milieu aérobie et peut générer des ROS. Son acquisition et son transport nécessite le contrôle de son statut redox pour limiter sa toxicité. En plus de la réduction du fer pour le mobiliser, les modèles eucaryotes possèdent des ferroxidases associées à des transporteurs pour acheminer le fer sous forme de Fe(III), moins toxique. Chez les plantes supérieures, la réduction du fer a bénéficié d'une attention particulière dans un contexte de lutte contre la carence en fer en culture, mais l'étude de la ferroxidation est restée superficielle jusqu'à récemment. Des ferroxidases existent chez *Arabidopsis* mais leur rôle, s'il existe, dans l'homéostasie du fer n'est pas encore élucidée. Chez *Arabidopsis*, il existe plusieurs ferroxidases potentielles dont une petite sous-famille de Multicopper-oxydases (MCO1,2,3) qui présente une grande similarité avec la ferroxidase modèle FET3 de *S.cerevisiae*. Dans mes travaux, j'ai pu mettre en évidence que parmi elles, MCO3 a une activité ferroxidase et complète le mutant *fet3fet4* ; MCO1 et MCO3 sont apoplastiques. Pour analyser le rôle physiologique de ces gènes, j'ai généré un triple mutant *mco1,2,3* par CRISPR/Cas9. Grâce à des approches d'imagerie du fer, j'ai pu montrer que les cellules de mésophylle du triple mutant accumulent plus de fer que le sauvage. Plus précisément, on observe plus de fer dans les chloroplastes et dans les vacuoles. Ces observations ont été confirmées par l'analyse de l'expression de gènes liés au transport intracellulaire du fer. Chez le triple mutant *mco1,2,3*, les gènes VTL2 et VTL5, codant pour des transporteurs vacuolaires d'influx de fer sont induits alors que le transporteur vacuolaire d'efflux, NRAMP4, est réprimé. Cette sur-accumulation de fer pourrait entraîner une certaine toxicité, également suggérée par une plus forte production d'espèces réactives de l'oxygène chez le triple mutant. Je propose que ces AtMCOs formeraient une barrière supplémentaire dans la gestion de l'excès de fer à la surface des cellules du mésophylle, influençant ainsi la répartition du fer au niveau cellulaire en limitant son entrée dans la cellule foliaire. Les AtMCOs viennent ainsi agrandir la cohorte restreinte de ferroxidases d'*Arabidopsis* connues (avec LPR1 et LAC12 (Muller *et al* 2015 ; Bernal *et al* 2021)) dont l'intégration dans l'homéostasie du fer d'*Arabidopsis* reste à clarifier.