#### Montpellier SupAgro

2 Place Pierre Viala - 34060 Montpellier - Cedex 2 - France

# THESE

pour obtenir le grade de

# DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES - MONTPELLIER SUPAGRO -

Spécialité : Biologie Intégrative des Plantes Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences et Environnement

# Louis GRILLET

# Spéciation, transport et localisation subcellulaire du fer chez *Pisum sativum* et *Arabidopsis thaliana*

Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes CNRS/INRA/Montpellier SupAgro/Université Montpellier II

Soutenue publiquement le 13 décembre 2012 devant le jury composé de :

Mme Karine Gallardo M. Jacques Bourguignon M. Frédéric Gaymard M. Michel Lebrun M. Stéphane Mari M. Sébastien Thomine Chargée de Recherche, INRA, Dijon Directeur de Recherche, CEA, Grenoble Directeur de Recherche, INRA, Montpellier Professeur, Université de Montpellier II, Montpellier Chargé de Recherche, INRA, Montpellier Directeur de Recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette Examinatrice Rapporteur Examinateur Président du jury Directeur de thèse Rapporteur

# TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1) Contexte socio-économique	2
2) Propriétés physico-chimiques du fer	3
a) Le couple rédox Fe(II) / Fe(III)	
b) Chélation du fer	
c) Etude de la spéciation du fer <i>in vivo</i>	
i) Approches de chimie analytique	5
ii) Séparation par chromatographie	5
iii) Identification par spectrométrie de masse	6
iv) Techniques spectroscopiques	7
d) Complexes connus	8
i) Les complexes fer-citrate	8
ii) Les complexes métalliques avec la nicotianamine	9
iii) Interactions métaux-ligands	10
2) Dôlo physiologique du for	11
a) Los protéines à for	11
a) Les proteines à les arganites	11 12
b) Le lei dans les organites	12
4) Mécanismes racinaires d'acquisition du fer	13
a) Les différentes stratégies	13
b) Transport du fer chez les espèces de la stratégie de chélation	14
c) Transport du fer chez les espèces de la stratégie de réduction	15
i) Acquisition du fer par les racines	15
ii) Mécanismes de réduction du fer	17
iii) Systèmes membranaires	17
iv) Systèmes solubles	
5) Transport à longue distance, spéciation et distribution	19
a) Transport a vlémien	
b) Transport phloémien	20
c) Distribution aux différents organites	22
i) Import et export de fer des chloroplastes	
ii) Transport mitochondrial	24
d) Chargement des graines	24
i) Circulation du fer jusqu'à l'embryon	24
ii) Stockage et remobilisation	
6) Techniques d'imagerie et d'analyse des métaux	27
a) Localisation du fer par histochimie	
b) Localisation par émission de rayon X induite par particule (µPIXE)	
c) Localisation par spectroscopie de fluorescence X induite par ravonnement	-
synchrotron (SR-µXRF)	29
7) Objectifs de la thèse	29
a) Questions de recherche	29
b) Modèles d'étude	30

1) Introduction	
a) Localisation subcellulaire du fer	
b) Le nucleole	
i) Structure et assemblage du nucléole	
ii) Fonctionnement du nucléole	35
iii) Autres fonctions du nucléole	
iv) Les protéines de type nucléoline	
c) Rôles du fer dans le nucléole	
2) Résultats	
= ) -100 - 100 - 100	
a) Article publié: The plant cell nucleolus as a hotspot for iron	
<ul> <li>a) Article publié: The plant cell nucleolus as a hotspot for iron.</li> <li>b) Etude du pool de fer nucléolaire</li> </ul>	39 
<ul> <li>a) Article publié: The plant cell nucleolus as a hotspot for iron.</li> <li>b) Etude du pool de fer nucléolaire.</li> <li>i) Spectrométrie d'absorption des rayons X.</li> </ul>	39 
<ul> <li>a) Article publié: The plant cell nucleolus as a hotspot for iron.</li> <li>b) Etude du pool de fer nucléolaire.</li> <li>i) Spectrométrie d'absorption des rayons X</li> <li>ii) Microscopie et spectroscopie infra-rouge</li> </ul>	
<ul> <li>a) Article publié: The plant cell nucleolus as a hotspot for iron.</li> <li>b) Etude du pool de fer nucléolaire.</li> <li>i) Spectrométrie d'absorption des rayons X.</li> <li>ii) Microscopie et spectroscopie infra-rouge</li> <li>iii) Approche physiologique.</li> </ul>	
<ul> <li>a) Article publié: The plant cell nucleolus as a hotspot for iron.</li> <li>b) Etude du pool de fer nucléolaire</li> <li>i) Spectrométrie d'absorption des rayons X</li> <li>ii) Microscopie et spectroscopie infra-rouge</li> <li>iii) Approche physiologique</li></ul>	

CHAPITRE III CHARGEMENT DU FER DANS LES GRAINES	DE POIS 58
1) Introduction	
a) Albumen et nutrition des embryons	
b) Transport du fer vers les graines et spéciation	
c) Vitamine C et transport du fer	
2) Désultates article en préparations Accorbate offlux as	a now stratogy for iron
2) Resultats. at title en preparation. Ascorbate enfux as roduction and untake in noa ( <i>Pisum sativum</i> ) ombrues	a new strategy for non
a) Introduction	
b) Posults and conclusions	
i) Iron is delivered to embryos as Fe(III)-citrate and Fe(III)-	citrate-malate 65
i) Pea embryos are capable of ferric reduction	66
iii) An ascorbate efflux from embryos mediates ferric reduct	tion activity 67
iv) Pea embryos take un ferrous iron	68
c) Discussion	69
i) A new model for iron uptake: a strategy LV	
i) Is pea endosperm a post-phloem or a post-xylem?	
iii) Origin of embryo iron	
iv) Iron reduction and uptake by embryos	
v) A new physiological function of ascorbate	
d) Material and methods	
i) Plant material	
ii) Liquid endosperm sampling	
iii) Fe complexes chemical analysis	
iv) Ferrireduction assays	74
v) Quantification of exudates ferrireduction	
vi) Kinetics of embryo Fe reduction	
vii) <sup>55</sup> Fe accumulation in pea embryos	
e) Bibliography	76
3) Résultats sunnlémentaires	79
a) Flude de l'accumulation de fer chez <i>dal</i>	79
b) Réduction de chélates ferriques <i>in vitro</i>	

c)	Evolution du transport du fer au cours du développement des embryons	81
d)	Cinétique de l'accumulation de <sup>55</sup> Fe	81
e)	Influence de différents inhibiteurs sur l'efflux d'ascorbate	82
f)	Choix de l'EDTA comme ligand	83
g)	Caractéristiques du transport du fer par les embryons	84
h)	Sur la piste des transporteurs d'ascorbate	85

CHAPITRE IV RÔLES D'ATFRO2 ET ATFRO6 CHEZ ARABIDOPSIS	87
1) Introduction	88
a) Voies de chargement des graines	88
b) Implication des réductases ferrique	88
c) Fonctions d'AtFRO2 et AtFRO6	89
d) Etude du chargement des graines	90
2) Résultats	91
a) Isolation et caractérisation des mutants	91
b) Quantification du fer	91
c) Mesure de l'activité de ferriréduction des embryons	93
d) Etude de l'expression des gènes FRO dans les embryons	94
i) Par RT-PCR semi-quantitative	94
ii) Par construction promoteur-GUS	94
e) Etude de la localisation du fer	94
3) Discussion	96
4) Perspectives	99

# 

CHAPITRE VI MATERIEL ET METHODE	
1) Matériel végétal	
a) Génotypes étudiés	
b) Production de racines de pois, cultures en hydroponie	
c) Production de racines d'Arabidopsis, cultures in vitro	
d) Production de graines, culture en terreau	
e) Echantillonnage de l'albumen liquide de pois	
2) Histologie	
a) Fixation et déshydratation des tissus	
b) Inclusion en résine technovit 7100	
c) Inclusion en paraffine	
d) Cryo-coupes	
e) Coloration histochimique du fer (Perls/DAB)	
f) Analyse histochimique de l'activité GUS	
3) Analyses spectroscopiques de coupes histologiques	112
a) micro-PIXE	
b) micro-SRXRF et micro-EXAFS	
c) Microscopie et spectroscopie infra-rouge FT-IR et Raman	
4) Spéciation du fer dans l'albumen de pois	113

a) Reconstitution des complexes ferriques et ferreux in vitro	
b) Analyse chimique à 3 dimensions SEC(HILIC)-ICP-MS	
5) Etude du transport du fer: approche de biochimie	115
a) Dosage du fer par spectrophotométrie	
b) Quantification de la réduction du fer	
i) Par les embryons et racines de pois	
ii) Par les embryons et racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	
c) Mesure de la part de réduction ferrique due à l'efflux d'ascorbate	
d) Réduction chimique du fer par l'ascorbate in vitro	
e) Mesure de l'accumulation de <sup>55</sup> Fe dans les embryons de pois	
6) Etude du transport du fer: approche de biologie moléculaire	120
a) Extraction d'ARN de racines	
b) Extraction d'ARN de siliques, graines et embryons	
c) RT-PCR semi-quantitative	
d) Production des lignées exprimant la construction promoteurAtFR02::	<i>GUS</i> 123

<b>Références bibliog</b>	raphic	ues1	25
nerer ences sisting	, apine		

Abbréviations	
---------------	--

# Chapitre I

# Introduction

# 1) Contexte socio-économique

Le fer (Fe) est un des éléments les plus abondants de la croûte terrestre. Il est essentiel à la croissance et au développement des plantes et de presque tous les organismes vivants. Il est impliqué dans beaucoup de processus métaboliques tels que la respiration et la photosynthèse, et est un composant de nombreuses enzymes.

Il y a une trentaine d'années, le principal enjeu de l'agriculture mondiale était de résoudre les problèmes de famine dans le monde. Aujourd'hui, la quantité de nourriture est globalement considérée comme suffisante, et l'Organisation Mondiale de la Santé s'intéresse de plus en plus à l'incidence des carences en micronutriments sur les populations humaines. D'après les études menées entre 1993 et 2005, 1,6 milliards de personnes dans le monde souffrent d'anémie, ce qui représente environ 24,8% de la population mondiale (De Benoist et al., 2008). Il y donc une nécessité de mieux comprendre les mécanismes d'absorption et d'assimilation du fer, ainsi que d'augmenter les quantités présentes dans l'alimentation. A l'échelle mondiale, la majorité des apports en fer est d'origine végétale (FAO Statistics division, 2003-2005) dans les régimes alimentaires. Cependant la biodisponibilité du fer dans les aliments végétaux est, en général, très inférieure à celle du fer présent dans les aliments d'origine animale (Office of Dietary Supplements, National Institute of Health, USA). Cela est surtout vrai pour les grains entiers qui contiennent des composés réduisant l'absorption du fer (tannins, calcium, polyphénols, phytates...) et qui constituent une grande proportion de l'alimentation d'origine végétale (riz, blé, haricots, soja, maïs...).

La compréhension de la spéciation du fer ainsi que de son transport vers la graine parait donc être primordiale en vue d'applications en santé humaine et notamment pour établir des stratégies de biofortification.

De plus en plus de travaux montrent aussi l'importance de la localisation du fer, aussi bien en biofortification qu'en médecine. Il a par exemple été mis en évidence que dans le grain de riz, le fer est majoritairement stocké dans la couche d'aleurone (Takahashi et al., 2009), or le riz est le plus souvent consommé sous forme de grains polis, et donc exempts de cette couche riche en fer. La localisation du fer apparaît donc comme un caractère déterminant pour augmenter la quantité de fer apportée par le riz dans les régimes alimentaires.

De nombreuses études ont montré le lien entre certaines maladies dégénératives et le métabolisme du fer chez l'homme: des accumulations anormales de fer dans des neurones



<u>Figure 1:</u> Les états d'oxydation du fer. Le fer ferrique  $(Fe^{3+})$  peut être réduit en fer ferreux  $(Fe^{2+})$  en gagnant un électron  $(e^{-})$ , et le fer ferreux peut être oxydé en fer ferrique en perdant un électron.

atteints par la maladie d'Alzheimer (Smith et al., 1997), ainsi que dans la substance noire de cerveaux souffrant de la maladie de Parkinson (Oakley et al., 2007). Cependant, les causes et conséquences de ces perturbations restent relativement obscures. Chez les plantes, les exemples d'études de localisation du fer sont rares, du fait du coût des techniques nécessaires, mais leur nombre est cependant en augmentation (Kim et al., 2006; Roschzttardtz et al., 2009; Takahashi et al., 2009...).

# 2) Propriétés physico-chimiques du fer

# a) Le couple rédox Fe(II) / Fe(III)

Dans tous les organismes vivants, le fer est un cofacteur d'un grand nombre de protéines impliquées dans des voies métaboliques cruciales. Une particularité importante de cet élément est qu'il existe sous deux formes (Cf. Figure 1): la forme réduite (fer ferreux, Fe<sup>2+</sup>) et la forme oxydée (fer ferrique, Fe<sup>3+</sup>). Le fort potentiel redox du couple Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> (E° = 0,77 V) est une propriété qui explique pourquoi le fer est le co-facteur le plus fréquemment incorporé dans des complexes protéiques pour catalyser des réactions d'oxydo-réduction (transferts d'électrons, hydroxylations...). Une autre caractéristique importante du fer est sa forte affinité pour l'oxygène, ce qui lui permet de jouer un rôle physiologique important pour véhiculer de l'oxygène dans les tissus (fixation de l'oxygène par l'hémoglobine chez les animaux et par la leghémoglobine chez les fabacées), et le rend très réactif avec beaucoup de molécules organiques (e.g. protéines et acides nucléiques). Grâce à ces propriétés, le fer est un élément essentiel présent dans tous les tissus biologiques et dans tous les compartiments cellulaires, cependant, il peut également être toxique.

Le fer peut en effet participer à la formation de formes d'oxygène réactives (Reactive Oxygen Species, ROS) notamment via les réactions de Fenton (Haber et Weiss, 1932; Halliwell, 1978):

1:  $O_2^-$  + Fe<sup>3+</sup> →  $O_2$  + Fe<sup>2+</sup>

2:  $Fe^{2+}$  +  $H_2O_2$  →  $OH^-$  +  $OH^{\bullet}$  +  $Fe^{3+}$ 

3:  $Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + OOH^{\bullet} + H^{+}$ 

Ces réactions produisent des radicaux hydroxyle (OH<sup>•</sup>) hautement réactifs et capables d'oxyder des lipides, des protéines ainsi que des acides nucléiques. La dégradation de ces molécules aboutit à de graves dégâts cellulaires, soit en provoquant des mutations, soit en

inhibant les fonctions biologiques de ces molécules. Le Fe<sup>3+</sup> seul est également capable de provoquer la peroxydation des lipides *in vitro* (Braughler et al., 1986).

# **b**) Chélation du fer

Du fait de sa haute réactivité avec l'oxygène, les formes ioniques du fer sont très instables en solution aqueuse. La demi vie des ions ferreux en conditions aérobie est de quelques minutes. La présence d'oxygène en solution favorise donc l'état oxydé Fe<sup>3+</sup>, et le maintien de la forme ferreuse nécessite un apport de pouvoir réducteur. En aérobie, le fer est donc principalement sous forme oxydée. Or, le fer ferrique est peu soluble (10<sup>-18</sup> M à pH 7) et peut former des complexes insolubles avec des ions hydroxydes. Il est admis que le fer ne circule pas sous forme libre mais sous forme de complexes avec des molécules affines du fer telles que les acides organiques. Ces molécules sont capables de chélater le fer, c'est-à-dire d'établir des liaisons de coordination non-covalentes, définissant un cycle avec l'atome de fer. Une fois complexé, le fer est beaucoup moins susceptible de précipiter ou de réagir avec d'autres molécules, ce qui permet d'une part de limiter sa toxicité et d'autre part de le maintenir en solution.

La chimie des complexes de fer est extrêmement compliquée car un grand nombre d'espèces chimiques peuvent se former en solutions aqueuses en fonction de différents paramètres (Spiro et al., 1967a; Spiro et al., 1967b) tels que le pH, la lumière, les concentrations en oxygène, en fer et en chélateur, le statut redox du fer, etc... L'affinité "K" d'un ligand pour un métal est définie par la formule suivante: K = [Complexe] / ([Métal] × [Ligand]). L'affinité d'un ligand pour le fer peut varier énormément avec le pH, qui va déterminer l'état de protonation du ligand et donc la possibilité de coordination de l'atome de fer par cette molécule. Ainsi, un changement de pH peut fortement modifier la stabilité d'un complexe, voire provoquer un changement de ligand (Von Wirén et al., 1999).

A l'intérieur d'un organisme vivant, la compartimentation induit des différences de pH très élevées (pH acide dans le xylème et certaines vacuoles, pH proche de la neutralité voire basique dans le phloème par exemple). Les ligands du fer sont donc vraisemblablement différents selon les compartiments cellulaires considérés. La connaissance de l'état de chélation du fer, également appelée « spéciation du fer », est donc un élément très important à prendre en compte pour comprendre les mécanismes de circulation du fer, aussi bien à

l'échelle d'un organisme vivant qu'à celle des organes ou des cellules. Cependant, les études sur ce sujet se heurtent à une limite technique de quantité et de qualité de préservation des complexes lors des extractions et analyses. Il est en effet très difficile de produire un bon échantillon d'un compartiment cellulaire, en terme de pureté et de quantité. De plus, ces complexes sont fragiles puisque les liaisons entre le métal et le ligand sont non-covalentes. C'est pourquoi à ce jour, seulement quelques espèces chimiques de fer ont été clairement identifiées.

# c) Etude de la spéciation du fer in vivo

# i) Approches de chimie analytique

Historiquement, les approches les plus anciennes permettant d'identifier des complexes étaient corrélatives. L'isolation d'un complexe par électrophorèse ou par chromatographie puis la quantification des deux espèces chimiques par spectrophotométrie montrait leur présence commune. Les techniques de chimie analytique modernes sont basées sur les mêmes principes, mais les progrès en matière de chromatographie et de spectrométrie ont d'une part, amélioré la préservation des complexes non covalents, et d'autre part fortement diminué les seuils de détection.

La spectrométrie de masse permet aujourd'hui de quantifier différents isotopes d'un élément, et ainsi de réellement prouver la présence d'un métal dans une molécule, en se servant de la signature isotopique de cet élément. Le couplage de techniques de spectrométrie de masse et des séparations par chromatographie en phase liquide ou gazeuse est mis en application dans des études de plus en plus nombreuses.

# ii) Séparation par chromatographie

Les complexes métaux-ligands sont en général de petite taille, et sont assez fragiles. Leur séparation par chromatographie d'exclusion de taille (i.e. Size Exclusion Chromatography, SEC) pose problème. D'une part, les échantillons sont élués au travers d'une résine, ce qui aboutit à une dégradation des complexes les moins stables, ainsi qu'à une perte des complexes minoritaires. D'autre part, les complexes sont élués dans les fractions les plus concentrées, qui contiennent les autres composés de faible masse moléculaire ainsi que les sels inorganiques.



<u>Figure 2:</u> Signature isotopique du nickel (Ni) et du fer (Fe). Les isotopes les plus abondants du Ni et du Fe sont respectivement le <sup>58</sup>Ni (68%) et le <sup>60</sup>Ni (26%), et <sup>56</sup>Fe (92%) et <sup>54</sup>Fe (6%).

La chromatographie d'interaction hydrophile (i.e. Hydrophilic Interaction chromatography, HILIC), qui permet de séparer des composés polaires, est une bonne alternative. Elle se déroule intégralement en phase liquide, ce qui préserve les complexes, et assure un bon rendement. Elle permet d'obtenir un taux de pureté satisfaisant pour les applications de spectrométrie de masse.

### iii) Identification par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (i.e. Mass Spectrometry, MS) utilise le fait que les ions peuvent être séparés les uns des autres par application d'un champ électromagnétique, en fonction de leur masse atomique et de leur charge électrique, et finalement de leur rapport masse / charge (m/z). Les espèces chimiques de l'échantillon à analyser doivent en premier lieu être ionisés, puis leurs masses et leurs charges sont mesurées à l'aide de différents types de détecteurs (piégeage d'ions, temps de vol, filtre de masse, orbitrap). Cette technique permet ainsi d'identifier et de quantifier les ions présents dans un échantillon. Le type d'ions (i.e. atomiques ou moléculaires) analysé va dépendre de la manière dont l'échantillon est ionisé. Plusieurs éléments peuvent avoir la même masse, on parle alors d'isobares. Une superposition des signaux de deux éléments à la même masse mesurée peut alors se produire. Cependant, chaque élément possède sa propre signature isotopique, c'est-à-dire une distribution unique en plusieurs isotopes, qui permet d'attribuer le signal mesuré à son élément respectif. La figure 2 présente les signatures isotopiques du fer et du nickel (Ni) à titre d'exemple.

L'ionisation par torche à plasma (ICP) consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon ou d'hélium. Ce type d'ionisation est utilisé pour les dosages d'éléments individuels. L'ICP-MS est aujourd'hui la technique de dosage élémentaire la plus puissante du fait de sa sensibilité et de la possibilité de doser tous les éléments d'un échantillon en même temps.

L'ionisation par électronébuliseur (i.e. electrospray ionization, ESI) permet la ionisation de molécules dans des conditions de températures et de pression relativement douces, ce qui limite la fragmentation des molécules ionisées. Le spectromètre de masse permet d'identifier les ions formés grâce à leurs masses et leurs charges. Une même molécule peut produire plusieurs ions différents en gagnant ou perdant un proton par exemple. Chaque ion contenant un ou plusieurs atomes de métal peut aussi avoir des masses différentes, correspondant aux différents isotopes de ce métal. Ainsi, pour un élément avec quatre isotopes stables, un ion



<u>Figure 3:</u> Spectres d'absorption des rayons X des ions  $Fe^{3+}$  et  $Fe^{2+}$  dans des solutions de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) et de sulfate de fer (Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) respectivement. Les seuils d'absorption des deux états d'oxydations sont différents. Les atomes voisins peuvent être identifiés à partir des oscillations de la partie EXAFS, après un traitement mathématique du spectre. En solution aqueuse, les voisins les plus probables sont l'oxygène et l'hydrogène.

contenant cet élément peut avoir quatre masses différentes. La proportion de chacune des masses dépend de l'abondance naturelle de l'isotope correspondant. Il est alors possible d'identifier la signature isotopique d'un élément dans ces ions, et ainsi de déterminer dans quels complexes cet élément est présent.

Le couplage de la détection d'éléments par ICP-MS avec la détection de molécules par ESI-MS est actuellement une des méthodes les plus puissantes pour analyser de spéciation de métaux dans des échantillons biologiques. Ces deux méthodes peuvent être appliquées à des échantillons purifiés par chromatographie. On parle alors d'analyse à trois dimensions : purification par chromatographie, dosage élémentaire par ICP-MS, identification de molécules par ESI-MS.

#### iv) Techniques spectroscopiques

Historiquement, les premières techniques utilisées pour l'analyse d'espèces chimiques sont basées sur la résonnance magnétique des atomes (i.e. RMN) ou des électrons (i.e. RPE). Ces techniques sont applicables uniquement aux espèces paramagnétiques, dont font partie les métaux de transition.

Les techniques de spectroscopie plus modernes, utilisées pour l'identification d'espèces chimiques sont principalement basées sur l'absorption des rayons X. L'échantillon est irradié par un faisceau de rayon X dont on fait varier l'énergie. Lorsque l'énergie du rayonnement correspond à l'énergie de transition d'un électron depuis un niveau du cœur de l'atome vers un niveau du continuum, on observe un seuil d'absorption correspondant à l'éjection de l'électron. L'électron sortant de l'atome se comporte alors comme une onde qui est diffractée par les atomes environnants. Ces atomes vont à leur tour émettre chacun une onde qui interfère avec l'onde incidente ce qui va provoquer des variations de l'absorption. Des oscillations du spectre d'absorption vont donc être observées sur plusieurs centaines d'électron-volts (eV) après le seuil. L'amplitude et la fréquence de ces oscillations dépendent de la nature des atomes voisins, de leur distance, de leur nombre, et des angles qu'ils forment entre eux.

La partie du spectre proche du seuil est exploitée par la technique du XANES (i.e. X-Ray Absorption Near Edge Structure, Spectroscopie de structure près du seuil d'absorption de rayons X). Le XANES est utilisable directement sous forme de spectre et renseigne principalement sur l'état d'oxydation de l'élément étudié (Cf. Figure 3).

Le reste du spectre, qui contient les oscillations, est utilisé pour l'EXAFS (i.e. Extended X-ray Absorption Fine Structure, Spectroscopie de structure fine d'absorption de rayons X étendue) et nécessite un lourd traitement mathématique et notamment une transformée de Fourier puis une transformée de Fourier inverse. L'analyse consiste en une simulation à l'aide de valeurs théoriques des contributions des différents atomes environnant l'atome absorbeur. Elle permet de déduire la distance entre un atome absorbeur et l'atome rétrodiffuseur ainsi que le nombre de ces atomes rétrodiffuseurs. Il est ainsi possible d'identifier quels sont les atomes voisins de l'atome étudié, et donc de connaitre sa coordination dans une molécule donnée. Les spectres du fer ferreux et du fer ferrique en solution sont montrés dans la figure 3 à titre d'exemple.

# d) Complexes connus

# i) Les complexes fer-citrate

Le citrate est un intermédiaire du cycle de Krebs, synthétisé par la citrate synthase, par condensation d'un oxaloacétate avec un acetyl CoA (Srere, 1959). Le citrate joue plusieurs rôles métaboliques, et intervient notamment dans la synthèse des acides gras. On le trouve en forte concentration dans le cytosol et les mitochondries, où il est produit. Il s'agit donc d'une molécule ubiquitaire. Cet acide organique s'accumule dans les feuilles (McGeorges, 1949), les racines (Brown, 1966) et le xylème (Brown et Chaney, 1971) de plusieurs espèces de plantes carencées en fer. Un grand nombre d'études ont établi le lien entre le statut en fer des plantes et la concentration en citrate de différents tissus chez *Glycine max* (soja, Brown and Tiffin, 1966), *Pisum sativum* (pois), *Beta vulgaris* (betterave), *etc...* La fonction du citrate était alors inconnue, mais sa capacité à se complexer avec le fer *in vitro* avait déjà été observée (Lingane, 1946; Hamm et al., 1953), et différents auteurs supposaient son implication dans la mobilité du fer (Tiffin, 1965).

Le complexe fer-citrate est le premier complexe identifié dans des échantillons biologiques, et probablement un des plus étudiés. Il a d'abord été observé par électrophorèse sur papier (Tiffin, 1966; Tiffin 1970) dans le xylème de différentes espèces. Cette méthode peut cependant être remise en question: elle est corrélative, ne donne aucune information sur la structure des complexes, et ne permet pas un contrôle de la préservation des complexes. Ce complexe a ensuite fait l'objet de nombreuses publications (e.g. Epstein et al., 1970; Brown et Chaney 1971). Depuis, des complexes de structures variées, contenant des proportions diverses de fer et de citrate ont été synthétisés et caractérisés *in vitro* (Shweky et al., 1994; Matzapetakis et al., 1998; Bino et al., 1998).



<u>Figure 4:</u> Structure prédite du complexe Fe<sub>3</sub>-citrate<sub>3</sub> identifié dans le xylème de tomate par Rellan-Alvarez et al. (2009). Le fer, l'oxygène, le carbone et l'hydrogène sont représentés en violet, rose, vert et blanc respectivement.



Figure 5: Synthèse de la nicotianamine par la nicotianamine synthase à partir de S-adénosylméthionine.



 NH<sub>2</sub> <u>Figure 6:</u> Structure prédite des complexes métalnicotianamine. L'atome métallique (M) qui se trouve au centre de cette molécule, est coordonné par trois groupes amines et trois groupes carboxyle (Curie et al., 2009).

La preuve directe de l'existence de complexes fer-citrate *in vivo* est assez récente (Rellan-Alvarez et al., 2010). Elle a été produite en analysant le xylème de plants de tomate par une approche de chimie analytique couplant la chromatographie HILIC et la spectrométrie de masse. Ces auteurs ont d'abord fractionné un échantillon de xylème par chromatographie HILIC, puis ont quantifié le fer dans chacune des fractions obtenues. Ils ont ensuite analysé les fractions riches en fer par ESI-MS, et recherché la signature isotopique du fer dans les molécules observées: 5,85%, 91,75%, 2,12%, et 0,28% de <sup>54</sup>Fe, <sup>56</sup>Fe, <sup>57</sup>Fe et <sup>58</sup>Fe respectivement.

L'analyse détaillée des résultats et la comparaison avec des complexes standards a permis d'établir que dans le xylème de tomate le fer circule sous la forme de complexes constitués de 3 atomes de fer sous forme ferrique et 3 molécules de citrate (Fe<sup>(III)</sup><sub>3</sub>-citrate<sub>3</sub> ; Cf. Figure 4).

#### *ii)* Les complexes métalliques avec la nicotianamine

La nicotianamine (NA) est un aminé non proteinogénique découvert par Noma et al. (1971) résultant de la condensation enzymatique par la NA synthase de trois groupes aminocarboxylepropyle issus de trois molécules de S-adénosyl-méthionine. Au cours de la réaction, trois liaisons covalentes sont cassées et libèrent les trois groupes amino-carboxylepropyle et trois nouvelles liaisons covalentes sont formées, dont une pour former un cycle azetidine (Cf. Figure 5). La présence de trois groupements amines et trois groupements carboxyle dans la molécule permet une coordination hexadentée qui conduit à la formation de chélates octahédraux très stables, avec un ion métallique au centre (Cf. Figure 6). *In vitro*, la NA est capable de former des complexes avec le manganèse (Mn), le cobalt (Co), le zinc (Zn), le nickel (Ni), le cuivre (Cu) et le Fe ferreux et ferrique (Benes et al., 1983; Anderegg et Ripperger, 1989; von Wiren et al., 1999) ce qui n'est pas le cas du citrate qui est plutôt spécifique des ions ferriques (Cf. Tableau I).

Le complexe nickel-nicotianamine a été le premier complexe métallique de nicotianamine caractérisé sans équivoque dans des échantillons biologiques par une approche de chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse. Ces complexes ont été isolés à partir de levures exposées à du Ni et exprimant la NA synthase ainsi qu'à partir de tissus de *Thlaspi caerulescens*, une espèce végétale hyperaccumulatrice de Ni (Vacchina et al., 2003). Les auteurs ont d'abord purifié les complexes par chromatographie d'exclusion de taille puis par électrophorèse capillaire, et ont caractérisé les molécules obtenues par ESI-MS. Quelques

Métal	$Mn^{2+}$	$Fe^{2+}$	$\mathrm{F}\mathrm{e}^{3+}$	$Zn^{2+}$	$\mathbf{Co}^{2+}$	$Ni^{2+}$	$Cu^{2+}$
(log K) nicotianamine	8,8	12,45	20,6	15,05	14,8	16,1	18,6
(log K) citrate	3,2	3,2	11,8	4,5	4,4	4,8	6,1

<u>**Tableau I:**</u> Constantes de stabilité des complexes métalliques avec la nicotianamine et le citrate. Les complexes métal-nicotianamine sont très stables. Le citrate est plutôt spécifique du Fe(III).



Figure 7: Simulation informatique de la formation des complexes de fer avec le citrate et la nicotianamine en fonction du pH. Le fer serait complexé au citrate seulement à un pH compris entre 5 et 6,5, et à la nicotianamine à pH > 6,5 (Von Wiren et al., 1999).

années plus tard, Ouerdane et al. (2006) affinèrent la détection et la caractérisation de ces molécules en utilisant la chromatographie d'interaction hydrophile. L'utilisation de ce type de chromatographie a permis la détection d'un plus grand nombre d'ions contenant du Ni, et a montré que chez *Thlaspi caerulescens* le Ni circulait dans le xylème sous la forme de complexes avec la nicotianamine (Mari et al., 2006 ; Ouerdane et al., 2006).

#### iii) Interactions métaux-ligands

Dans des solutions plus complexes qui contiennent des mélanges de plusieurs ligands et de plusieurs métaux, plusieurs types d'interactions sont possibles. Ainsi, le métal d'un complexe peut s'échanger avec un autre métal, et un même métal peut changer de ligand. Ces phénomènes de changement de ligands ont été étudiés pour les complexes Fe-citrate et Fe-NA par simulation informatique (Von Wiren et al., 1999) et expérimentalement (Rellan-Alvarez et al., 2008).

Les constantes de stabilité (Cf. Tableau I) des complexes Fe-citrate montrent que le complexe Fe(III)-citrate est beaucoup plus stable (log K = 11,8) que le complexe Fe(II)-citrate (log K = 3,2). Un changement d'état rédox du fer va donc fortement changer la stabilité du complexe, et la réduction du fer par exemple, peut aboutir à une dissociation du complexe. Le complexe Fe-NA est très stable avec les deux formes Fe(II) et Fe(III) avec des constantes de 12,45 et 20,6 respectivement. Ainsi dans une solution contenant du fer sous forme réduite, du citrate et de la NA, le fer formera des complexes majoritairement avec la NA.

Le pH a une forte influence sur la stabilité des complexes. Dans le cas des complexes Fe-NA, la formation des complexes Fe(II)-NA ou Fe(III)-NA augmente beaucoup à pH > 6,2. A pH = 5, les complexes sont déjà présents mais une grande partie de la NA n'est pas associée au fer (Rellan-Alvarez et al., 2008). Les complexes Fe-NA sont stables à des pH > 6,5 alors que les complexes Fe-citrate sont stables à 3 < pH < 6,5. Un changement de ligand a été démontré expérimentalement par Rellan-Alvarez et al., (2008): ces auteurs ont placé des complexes fer-nicotianamine en présence de citrate et à différents pH, puis ont quantifiés la NA libre, et les complexes fer-NA. Le fer reste complexé en totalité à la nicotianamine à pH 7,5 mais ce n'est pas le cas à pH 5,5 ou la totalité de la nicotianamine est libre, et le fer est donc intégralement complexé au citrate. Ces données expérimentales, qui concordent avec les prédictions informatiques (Cf. Figure 7), montrent que le citrate est le ligand majeur dans les environnements légèrement acides, jusqu'à pH 6 environ, et donc qu'il joue son rôle de



Figure 8: Les différentes types de coordination du fer dans les protéines. (A) Coordination par les atomes d'azote dans le noyau tétrapyrrolique d'un hème, (B) un exemple de coordination directe du fer par les acides aminés de l'histone déacetylase 8 humaine (HsHDAC8, Dowling et al., 2010), et (C) quelques exemples de cluster fer-soufre.

chélateur du fer dans l'apoplaste, la vacuole et le xylème, et alors que la NA doit être plus importante en conditions de pH neutre, comme dans le cytosol, la matrice chloroplastique ou mitochondriale et le phloème. Dans ces conditions, la NA peut en théorie chélater 50% du fer.

# 3) <u>Rôle physiologique du fer</u>

#### a) Les protéines à fer

Les protéines à fer possèdent des fonctions essentielles aux processus métaboliques majeurs chez les végétaux, notamment la photosynthèse, la respiration, les métabolismes de l'azote et du soufre, la synthèse d'ADN, etc... A l'intérieur des protéines, le fer peut être coordonné de différentes manières: lié à des atomes de souffre (cluster), sous forme d'hème ou directement lié à des acides aminés.

Les protéines à hème possèdent un noyau tétrapyrrolique au centre duquel se trouve un atome de fer associé à quatre liaisons de coordination avec des atomes d'azote (Cf. Figure 8A). Ces protéines jouent un rôle dans les chaînes respiratoires et photosynthétiques (e.g. cytochromes), dans l'assimilation de l'azote (e.g. nitrate reductase), et dans la défense contre les stress oxydatifs (e.g. catalases et peroxydases),

Dans d'autres protéines, le fer est directement associé à la chaine polypeptidique. De nombreux types de coordination sont possibles. Par exemple, dans l'histone déacétylase 8 humaine, l'atome de fer est coordonné par deux acides aspartiques, une méthionine, une tyrosine et trois histidines (Cf. Figure 8B; Dowling et al., 2010). Certaines de ces protéines possèdent des fonctions biologiques essentielles, comme la ribonucléotide réductase, nécessaire pour la synthèse d'ADN (Reichard, 1993). Parmi ces protéines, les ferritines jouent un rôle important dans l'homéostasie du fer car elles sont capables de stocker de grandes quantités de fer (i.e. plusieurs milliers d'atomes par multimère) sous une forme non toxique et remobilisable (Theil, 1987; Bienfait et van den Briel, 1980; Laulhere et al., 1990).

Dans les protéines à cluster, les centres fer-soufre contenant différentes proportions de fer et de soufre, sont associés à la chaîne polypeptidique par l'intermédiaire de groupement thiols de résidus cystéines (Cf. Figure 8C). A l'intérieur de ces structures, la valence du fer peut varier, permettant aux centres fer-soufre et aux protéines correspondantes de former un couple d'oxydoréduction. Grâce à ces propriétés, les protéines à cluster jouent un rôle important dans

les chaînes de transport d'électrons, en particulier dans les mitochondries. Les mêmes raisons expliquent le rôle de ces protéines dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques dans les chloroplastes.

### **b**) Le fer dans les organites

Les chloroplastes et les mitochondries sont les compartiments cellulaires pour lesquels le besoin en fer est le plus évident. D'une part, ces deux organites sont les lieux de synthèse des hèmes et des clusters fer-soufre nécessaires au fonctionnement de nombreuses protéines. D'autre part, la respiration et la photosynthèse, deux processus basés sur des chaînes de transport d'électrons, se déroulent dans ces compartiments.

Comme les chloroplastes, la mitochondrie produit de l'adénosine triphosphate (ATP) et du pouvoir réducteur pour fournir différentes sources d'énergie à la cellule. Cette production d'énergie a lieu au travers le processus de respiration, mis en œuvre par des complexes protéiques ancrés dans la membrane interne des mitochondries. Les enzymes impliquées dans ce processus sont la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) déshydrogénase, la succinate-coenzyme Q reductase, le cytochrome c, la coenzyme Q-cytochrome c reductase et la cytochrome oxydase. A l'exception de cette dernière, tous ces complexes protéiques contiennent du fer sous diverses formes (Ohnishi et al., 1976; Rieske et al., 1964). La NADH déshydrogénase seule contient 22 à 24 atomes de fer (Ohnishi et al., 1985).

Le rôle du fer dans les chloroplastes est lié à son association avec des métalloprotéines de la chaine de transfert d'électrons issus de la photosynthèse. Les principales protéines photosynthétiques sont des complexes de multiples sous-unités, associés à la membrane des thylakoïdes. Les complexes photosynthétiques majeurs sont les photosystèmes I et II, les cytochromes b6f et les ATP synthases. Ces protéines fonctionnent de manière concertée pour générer de l'ATP et du pouvoir réducteur en présence de lumière. Elles contiennent divers cofacteurs, pigments, hèmes, clusters fer-soufre et ions métalliques qui s'associent aux protéines de manière covalente ou non. Ces complexes photosynthétiques, dont la structure a été principalement étudiée chez les algues et les cyanobactéries, contiennent tous plusieurs atomes de fer. Le photosystème II contient deux cytochromes et un atome de fer non hémique (Zouni et al., 2001; Kamiya and Shen, 2003). le cytochrome b6f contient quatre hèmes et un cluster Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> (Kurisu et al., 2003; Stroebel et al., 2003). Et le principal



**Figure 9 :** Modèle mécanistique actuel du transport du fer dans les plantes de la stratégie I dite "de réduction". (A) Extrusion de protons  $H^+$  dans la rhizosphère, (B) réduction du fer ferrique Fe(III) en fer ferreux Fe(II) par une réductase de chélat ferrique membranaire, et (C) transport de Fe(II) au travers de la membrane plasmique. Ces trois mécanismes sont induits chez les plantes carencées en fer.



Figure 10: Modèle mécanistique actuel du transport du fer dans les plantes de la stratégie II dite "de chélation". (A) Les racines excrètent des phytosidérophores, notamment l'acide déoxymuginéique (DMA). Cette molécule possède une très forte affinité pour le fer, et forme spontanément des complexes avec les ions ferriques présents dans le sol. Les complexes Fe(III)-DMA sont absorbés tel quel par les racines grâce à des transporteurs de la famille Yellow Stripe (YS). demandeur de fer dans le système photosynthétique est le photosystème I qui contient douze atomes de fer sous forme de quatre clusters Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub> (Jordan et al., 2001).

Il est donc évident que le pool de fer chloroplastique joue un rôle très important dans le métabolisme des cellules végétales. Il était d'ailleurs généralement admis que ce pool fer constituait 70 à 90% du fer foliaire (Shikanai et al., 2003; Terry et Abadia, 1986), information qui a été reprise dans de nombreux articles (e.g. Shingles et al., 2002; Jeong et al., 2008).

# 4) Mécanismes racinaires d'acquisition du fer

# a) Les différentes stratégies

Dans le sol, la concentration en fer optimale se situe dans une fenêtre étroite, entre 10<sup>-9</sup> à 10<sup>-</sup> <sup>4</sup>M (Guerinot et al., 1994). Les plantes, en tant qu'organismes sessiles, doivent s'adapter à leur environnement et elles possèdent donc des mécanismes qui leur permettent de réguler finement l'entrée et la distribution du fer dans leurs tissus. D'une part, un excès de fer conduit à la production de ROS toxiques, *via* la réaction de Fenton et d'autre part, une carence en fer provoque une forte diminution de la concentration des feuilles en chlorophylle, une modification de l'architecture racinaire (Schmidt et al., 2001), ainsi qu'une réduction de la biomasse.

Au cours de l'évolution, les végétaux ont développé des mécanismes racinaires d'absorption du fer élaborés. Deux stratégies majeures (Römheld et Marschner, 1986) ont vu le jour:

- La stratégie I, dite de réduction, observée chez les dicotylédones et les plantes non graminées (Cf. Figure 9), consiste à A) acidifier le pH de la rhizosphère par extrusion de protons à la surface de l'épiderme racinaire afin de favoriser la solubilisation du fer au voisinage de la racine, puis B) réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) dans la solution du sol, et enfin C) transporter le fer sous forme d'ion Fe<sup>2+</sup>dans la racine.

- La stratégie II, dite de chélation (Cf. Figure 10), observée chez les espèces de la famille des poacées, consiste à A) excréter des composés de faible masse moléculaire appartenant à la famille des acides muginéïques, appelés phytosidérophores. Ces molécules ont une forte affinité pour le fer sous forme Fe<sup>3+</sup>, et B) ces complexes Fe<sup>3+</sup>-phytosidérophores sont ensuite transportés dans la racine.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié la spéciation et le transport du fer chez les espèces Arabidopsis thaliana (A. thaliana) et Pisum sativum (P. sativum) qui sont toutes deux
des dicotylédones et appartiennent au groupe des plantes de la stratégie I, basée sur un système de réduction.

#### b) Transport du fer chez les espèces de la stratégie de chélation

Cette stratégie consiste à excréter des chélateurs à forte affinité, connus sous le noms de phytosidérophores, dans la rhizosphère afin de mobiliser le Fe(III) du sol. Les phytosidérophores font en général partie de la famille des acides muginéiques et ils sont synthétisés à partir de la nicotianamine (Takagi et al., 1984; Nomoto et al., 1981). L'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'acides muginéiques est induite par la carence en fer, ce qui conduit à une excrétion plus importante de ces composés (Nagasaka et al., 2009).

Les complexes fer-phytosidérophores formés dans la rhizosphère sont alors directement importés dans la racine. Le premier transporteur de complexes Fe-MA a été identifié chez le maïs grâce au mutant *ys1* (*Yellow-Stripe 1*) décrit pour la première fois par Beadle (1929). Ce mutant présente une chlorose internervaire due à un défaut d'utilisation du fer ferrique (Bell et al., 1958). Chez ce mutant, l'acquisition de ces complexes par les racines est déficiente (von Wiren et al., 1994). Le gène correspondant, *ZmYS1*, est exprimé dans la racine et code une protéine membranaire. Sa fonction d'import de complexes Fe(III)-DMA et de Fe-NA a aussi été démontrée en levure (Curie et al., 2001; Schaaf et al., 2004).

Un transporteur d'efflux de phytosidérophore a été identifié récemment chez l'orge et le riz (Nozoye et al., 2011). Il est capable de catalyser l'efflux d'acide déoxymuginéique depuis les racines vers la rhizosphère, il a donc été appelé TOM1 (Transporter of Mugineic Acid). Les plantes de riz surexprimant les gènes de riz (OsTOM1) et d'orge (HvTOM1) sont moins sensibles à la chlorose induite par une carence en fer et accumulent plus de Fe, Zn, et Cu dans leurs graines. Les concentrations de ces trois métaux sont plus faibles dans les graines de plantes dont l'expression de OsTOM1 est réduite par RNAi. Ces lignées ne semblent cependant pas plus sensibles à la carence en fer, et sécrètent encore du DMA. Ces résultats suggèrent qu'il existe d'autres transporteurs avec la même fonction chez le riz.

#### c) Transport du fer chez les espèces de la stratégie de réduction

#### i) Acquisition du fer par les racines

Chez *A. thaliana*, lors d'une carence en fer, le fer entre dans la racine essentiellement par le transporteur IRT1 qui appartient à la famille ZIP de transporteurs de Zinc/Fer. Chez *A. thaliana*, le mutant knock-out *irt1-1* est incapable d'absorber le fer du sol dans des conditions de teneur en fer du milieu normales ou limitantes. Il est alors extrêmement chlorotique, nain et stérile, sauf lorsqu'il est arrosé avec de fortes concentrations de fer. La protéine IRT1 est localisée sur la membrane plasmique des cellules de l'épiderme et du cortex de la racine où elle catalyse l'import de métaux divalents et en particulier du fer de la solution du sol vers les cellules de la racine (Vert et al., 2002)(Cf. Figure 9.C). Le gène orthologue d'*AtIRT1* a été cloné chez le pois en 1998 par Cohen et al., et appelé *PsRIT1*. Ces protéines sont considérées comme les principaux transporteurs de fer dans les racines d'*A. thaliana* et *P. sativum*.

Le génome d'*Arabidopsis* contient 16 gènes de la famille ZIP: *ZIP1* à *ZIP12*, *IRT1* à *IRT3* et *LAR1* (Lasswell et al., 2000; Mäser et al., 2001). Seulement quelques uns de ces membres sont caractérisés à ce jour, dont *AtIRT3*. Ce gène code un transporteur de zinc et de fer plasmalemmique, et sa surexpression permet de restaurer la croissance du mutant *irt1-1* (Shanmugam et al., 2011). Cela n'est pas le cas d'*AtIRT2* qui ne permet pas de complémenter *irt1-1* (Vert et al., 2009).

Dans le sol, le fer est présent surtout sous forme ferrique Fe<sup>3+</sup>, et son transport par AtIRT1 ou ses homologues nécessite une étape de réduction, typique des plantes de stratégie I. Ce système de réduction par la racine a été observé au niveau physiologique dans les années 80 chez différentes espèces (Bienfait et al., 1985 ; Buckhout et al., 1989). Le gène associé à cette fonction biologique a d'abord été identifié chez la levure *S. cerevisiae* (Dancis et al., 1990) à l'aide du mutant *fre1-1*. Ce mutant est très sensible à la carence en fer et présente une absorption du fer réduite par rapport à une souche exprimant un allèle fonctionnel de *FRE1*. Une dizaine d'années plus tard, un crible de mutants EMS d' *A. thaliana*, basé sur l'observation de la réduction du fer par les racines montra l'absence de cette fonction biologique chez le mutant *frd1-1* (Robinson et al., 1999). La mutation responsable de ce phénotype est localisée dans le premier exon d'un gène codant une protéine membranaire qui a été appelée réductase (de chélate) ferrique (i.e. AtFRO2 ; Cf. Figure 9.B). Son orthologue chez le pois (PsFRO1) a été caractérisé en 2002 par Waters et al., par expression en levure. La

dérégulation de l'expression du gène *PsFRO1* est corrélée à la dérégulation de l'activité réductase ferrique des racines des deux mutants *dgl (degenerative leaves)* et *brz (bronze)*.

Il est aujourd'hui admis que les protéines AtFRO2 et PsFRO1 sont les principales responsables de l'activité de réduction de chélate ferrique par les racines d'*Arabidopsis* et de pois respectivement.

L'acidification de la rhizosphère permet de mobiliser le fer: la diminution d'une unité de pH peut augmenter la solubilité du fer d'un facteur 1000 (Guerinot et al., 1994) et participer à l'établissement d'un potentiel de membrane négatif qui favorise l'entrée de cations (Palmgren et al., 2001). Cette fonction d'acidification a été imputée a des ATPases pompes à protons de la famille des AHA (i.e. *Arabidopsis* H+ ATPases ; Cf. Figure 9.A), localisées sur l'épiderme de la racine, et notamment AHA2. Ces protéines assurent la fonction d'extrusion de protons qui permet la mobilisation du fer à proximité des racines. Elles ont une forte influence sur les réductases ferriques racinaires dont l'activité nécessite un pH légèrement acide (Santi et Schmidt, 2009). Elles sont également importantes pour fournir l'énergie nécessaire aux activités de transport membranaires ATP-dépendantes.

Il a été montré que ces trois étapes de l'entrée du fer, acidification, réduction et transport, sont très fortement et spécifiquement induites en situation de carence (Cf. Figure 9). Cette réponse physiologique et moléculaire à la carence de fer a été décrite chez plusieurs espèces de la stratégie I, notamment *Arabidopsis*, le pois, la tomate (*Lycopersicum esculentum*), le soja (*Glycine max*) et le tabac (*Nicotinia tabacum*). L'induction de ces activités est due à une augmentation de la quantité d'ARN des gènes correspondant. Chez *Arabidopsis* et la tomate, cette régulation transcriptionnelle est contrôlée par des facteurs de transcription de la famille des bHLH (basic Helix-Loop-Helix), et les principaux sont nommés respectivement AtFIT1 (Colangelo et Guerinot, 2004) et LeFER (Ling et al., 2002). Les plantes possédant des versions non fonctionnelles de ces protéines sont incapables d'induire leur activité réductase ferrique ainsi que leur transport du fer racinaire. Chez *Arabidopsis*, plusieurs autres facteurs de transcription bHLH impliqués dans cette réponse ont été identifiés tels que POPEYE (Long et al., 2010), bHLH38 et 39 (Yuan et al., 2008), bHLH100 et 101 (Sivitz et al., 2012) par exemple.

Il existe une autre réponse des plantes à la carence en fer qui a reçu moins d'attention: Brown et Ambler (1973) ont mis en évidence l'efflux de composés phénoliques par les racines de soja et Römheld et Marschner (1983) ont obtenu des résultats similaires sur l'arachide (*Arachis* 

*hypogeae*). Ces composés, potentiellement capables de réduire le fer, sont très nombreux (e.g. acide caféique, acide p-coumarique). Leur capacité à réduire le fer est faible par rapport à celle des réductases plasmalemmiques. Ces molécules pourraient cependant chélater le fer. Leur fonction exacte n'est pas encore clairement définie. Le rôle des exsudats racinaires dans l'absorption du fer est donc assez mal connu, mais son importance a été soulignée par plusieurs études.

#### ii) Mécanismes de réduction du fer

La grande différence entre les deux stratégies majeures de transport du fer est la forme de fer qui est transportée. Les plantes de la stratégie II transportent du fer ferrique complexé à des phytosidérophores alors que les espèces de la stratégie I transportent des ions ferreux seuls. Ces dernières sont donc capables de dissocier les complexes fer-chélateurs ainsi que de réduire le fer. Ces deux processus sont intimement liés puisque le changement d'état redox du fer provoquera également un changement d'affinité avec son ligand et éventuellement la dissociation du complexe (Römheld et Marschner, 1983). Plusieurs systèmes de réduction du fer sont aujourd'hui connus, et possèdent des gammes de pH, d'affinité et de vitesse variées. Les travaux pionniers de Römheld et Marschner ont montré l'existence de deux types de systèmes de réduction au niveau des racines: un système enzymatique lié au plasmalemme et un système chimique via l'excrétion de molécules réductrices. Des travaux plus récents (Xoconostle-Cazares et al., 2000) ont également montré l'existence d'un système protéique mobile chez *Cucurbita maxima* (i.e. le potiron).

#### iii) Systèmes membranaires

Il existe au moins deux types de protéines assurant cette fonction chez *Arabidopsis*. Les réductases de chélates ferriques (FRO) et les cytochromes b561.

Les FRO sont sans aucun doute les plus étudiées. Le génome d'*Arabidopsis* contient huit gènes de cette famille, qui diffèrent en termes de territoires d'expression (Wu et al., 2005; Mukherjee et al., 2006) et en terme de localisation subcellulaire des protéines encodées (revue du sujet: Jeong et al., 2009). La présence de ces systèmes de réduction au niveau des membranes plasmiques des cellules de racines et de mésophylle (Jeong et al., 2008), des chloroplastes (Jeong et al., 2008), des mitochondries (travaux non publiés et prédiction informatique, d'après Jeong, 2009) ainsi que l'absence de transporteurs de fer ferrique suggèrent un rôle important de ces protéines dans la distribution intracellulaire du fer.



Figure 11: Structure hypothétique de AtFRO2 (Robinson et al., 1999). Les points blancs représentent les quatre résidus histidine supposés coordonner deux hèmes. Les motifs HPFT et GPYG correspondent respectivement aux sites de fixation du FAD et du NADPH. PM, membrane plasmique ; e, face externe de la membrane plasmique ; i, face interne.



<u>Figure 12:</u> Auto-oxydation de l'ascorbate en présence de fer ferrique. Le Fe(III) est réduit en Fe(II) et l'ascorbate est oxydé en déhydroascorbate.

Les protéines FRO possèdent une architecture à huit (Robinson et al., 1999) à dix (Schlagerlöf et al., 2006) domaines transmembranaires, un site de fixation du FAD, un site de fixation du NADPH, ainsi que deux hèmes, (Cf. Figure 11). Dans le cas d'AtFRO2, le NADPH est oxydé du côté cytoplasmique et les électrons sont transférés *via* la flavine et les deux hèmes vers un site situé du côté extérieur de la membrane, ou la réduction du Fe<sup>3+</sup> a lieu. Les cytochromes b561 ont été caractérisés plus récemment et leur rôle est encore méconnu. Ils sont codés par quatre gènes d'*Arabidopsis*. Les deux protéines majoritaires (CYB-1 et CYB-2) sont localisées sur le tonoplaste et elles sont réductibles par l'ascorbate (Griesen et al., 2004). D'après les prédictions par comparaison de séquences, ces protéines possèdent 6 domaines trans-membranaires, deux hèmes et un motif de fixation d'ascorbate (Cenacchi et al., 2011). Bien que les cytochromes b561 soient capables de réduire du fer *in vitro* (Bérczi et al., 2007), leur rôle dans l'homéostasie du fer est putatif et n'a pas été clairement établi. Dans le cas de la réduction du fer par ces cytochromes, le donneur d'électrons serait l'ascorbate.

#### iv) Systèmes solubles

De nombreuses molécules sont capables de réagir directement avec le fer et de le réduire. Certaines sont des composés phénoliques tels que l'acide *p*-coumarique (Brown et Ambler, 1973) et l'acide caféique (Römheld et Marschner, 1983), mais l'une des plus étudiées, notamment dans les domaines de la médecine et de la biologie animale, est l'acide ascorbique. Chez l'homme, le lien entre sa propriété de réduction (Cf. Figure 12) et le transport du fer est maintenant établi: il favorise l'absorption du fer par les cellules épithéliales lors de la digestion (Zhu et al., 2006), et serait impliqué dans l'entrée du fer dans les neurones (Bradbury, 1997; Moos, 2007). Un système d'absorption du fer couplé à un efflux d'ascorbate a été clairement démontré récemment (Lane et Lawen, 2008) chez des cellules leucémiques K562. Le couplage du transport du fer avec une réduction par l'ascorbate existe très vraisemblablement dans de nombreux systèmes. Cependant, chez les plantes, le rôle direct de l'ascorbate dans le transport du fer n'a jamais été montré.

Xoconostle-Cazares et al. (2000) ont identifié chez le potiron, une protéine de la famille des cytochromes b5 réductases capable de réduire le fer *in vitro*. Cette protéine existe sous deux isoformes: la première est associée à la membrane plasmique, la seconde isoforme possède également une activité réductase ferrique et peut se déplacer dans le phloème et de cellule à



Figure 13: Phénotype macroscopique de deux allèles mutants frd3 présentant une chlorose cultivés en sol pendant 7 semaines. NM, lignée parentale non mutée; WT, lignée sauvage; frd3-6 et frd3-7, lignées mutantes (Roschzttardtz et al., 2011).

cellule. Elle résulterait du clivage du domaine transmembranaire N-terminal de la première isoforme. Aucun autre système de réduction de ce type n'a été décrit depuis.

#### 5) Transport à longue distance, spéciation et distribution

Bien que les mécanismes d'entrée du fer dans les plantes de stratégie I aient été étudiés de manière approfondie et décrits en détails, peu d'informations sont disponibles sur le transport du fer à l'intérieur de la plante, probablement du fait de la difficulté technique que cette étude représente. Or, il est évident que pour alimenter leurs tissus, les plantes possèdent des mécanismes permettant de distribuer le fer aux différents organes et jusqu'aux compartiments intracellulaires cibles dans lesquels il joue un rôle essentiel (Cf. Chapitre I.3.b). Quelques éléments déterminant la distribution intra-plante du fer ont été identifiés par des approches de génétique inverse.

#### a) Transport xylémien

Une fois arrivés dans les cellules de l'épiderme des racines, les ions métalliques peuvent se déplacer jusqu'au péricycle par voie symplastique. Le fer doit ensuite être chargé dans les vaisseaux du xylème, puis le flux de transpiration le conduit vers les parties aériennes (Kim et al., 2007 ; Curie et al., 2009).

L'augmentation de la concentration en acides organiques dans la sève xylémienne lors de carence en fer a fait l'objet de nombreuses publications. Il a d'abord été suggéré que le fer soit lié au malate (Tiffin and Brown, 1962), puis au citrate (Brown, 1966) dont la concentration augmente fortement dans le xylème de plusieurs espèces végétales lors de carences en fer. Le pH acide du xylème est favorable à la formation du complexe Fe(III)-citrate. De plus, un complexe Fe(III)-Citrate a récemment été identifié dans la sève xylémienne chez la tomate (Rellan-Alvarez et al., 2010).

Le rôle du citrate dans la mobilisation du fer dans le xylème a été établi *via* l'étude du gène *FRD3* chez *Arabidopsis. AtFRD3* encode un transporteur de la famille des MATE (i.e. Multidrug And Toxin Efflux) présentant une activité d'efflux de citrate en ovocytes de xénope (Durett et al., 2007). Le mutant *frd3* d'*Arabidopsis* présente un phénotype de carence en fer, y compris en conditions de suffisance dans le milieu de culture (Cf. Figure 13). Dans les racines de *frd3* le fer s'accumule très fortement dans le cylindre central et les concentrations de citrate et de fer circulant dans la sève du xylème sont réduites, confirmant le rôle du citrate dans la



**Figure 14 :** Précipitation du fer dans le xylème du mutant *frd3-7* révélée par coloration histochimique du fer par Perls-DAB sur des coupes de plantes sauvages (WT) et mutantes (*frd3-7*) de 4 semaines. A et B, coupe d'hypocotyle ; C et D, coupes de feuilles de rosette (Roschzttardtz et al., 2011). Cc, cambium cortical ; cp, parenchyme cortical ; e, endoderme ; ep, épiderme ; p, phloem; vc, cambium vasculaire ; x, xylem. Barre d'échelle = 100 µm pour A et B, et 50 µm pour C et D.

mobilisation du fer dans le xylème (Durett et al., 2007; Roschzttardtz et al., 2011a) (Cf. Figure 14).

Le chargement du fer dans le xylème pourrait être assuré par des transporteurs de la famille des ATPase à métaux lourds (i.e. Heavy metal ATPase; HMA), comme c'est le cas pour le zinc qui est chargé par AtHMA4 (Hussain et al., 2004). Le transport de fer par des protéines de cette famille a déjà observé chez d'autres organismes comme le rat (Fessel et al., 2007) et la levure (Eide et al., 1993), mais jamais chez les végétaux supérieurs. Le rôle d'une Ferroportine, AtFPN1, dans le chargement du xylème a également été suggéré (Morrissey et al., 2009). Le mutant *fpn1-2* d'*Arabidopsis* accumule autant de fer que les plantes sauvages dans ses parties aériennes et ses racines. Cependant, il accumule plus de cobalt que l'écotype sauvage dans ses racines, et moins dans ses feuilles. Il est donc plus vraisemblable que AtFPN1 soit impliquée dans la translocation du Co que dans celle du Fe.

Le déchargement du xylème est également un processus physiologique mal connu. Aucun gène jouant un rôle dans ce mécanisme n'a été décrit jusqu'à présent. Pourtant, le fer du xylème doit être distribué aux cellules du mésophylle, et entrer dans ces cellules. *AtIRT3* est un bon candidat: il code un transporteur de fer plasmalemmique, et il est très fortement exprimé dans le xylème et les cellules du mésophylle (Lin et al., 2009). L'implication d'*AtFRO6* a été suggérée par plusieurs études (Feng et al., 2006; Li et al., 2010), car il code une réductase ferrique plasmalemmique (Jeong et al., 2008) et est également exprimé dans les feuilles (Wu et al., 2005). Cependant, les fonctions de ces deux gènes à l'échelle de la plante sont encore obscures.

Les mécanismes de remobilisation du fer foliaire sont également inconnus. Il n'y a à ce jour aucune information disponible sur les transporteurs responsables de la sortie du fer des cellules foliaires, ou du chargement du phloème.

#### b) Transport phloémien

A l'exception de quelques cas tels que celui des plantules de ricin (*Ricinus communis*), il est très difficile d'obtenir du phloème de qualité satisfaisante et en quantité suffisante (Kehr & Rep, 2007) car:

 d'une part, les vaisseaux du phloème sont bouchés très rapidement par la formation de callose, ce qui empêche le prélèvement de phloème par exsudation, sauf en utilisant de l'EGTA pour chélater les ions calcium. Mais cette molécule possède également une



<u>Figure 15:</u> Phénotype macroscopique de chlorose internervaire chez le mutant *nas1234. nas4x*, mutant *nas1234*; WT, plante sauvage (d'après Schuler et al., 2012).

très forte affinité pour les ions métalliques, ce qui la rend inutilisable pour étudier la spéciation du fer.

D'autre part, les techniques de prélèvement par blessure ou utilisant des pucerons sont extrêmement laborieuses et comportent un risque non négligeable de contamination des extraits par des débris de cellules ou des molécules sécrétés par les pucerons. Les informations disponibles sur le transport et la spéciation du fer dans le phloème proviennent donc toutes d'observations indirectes. La nicotianamine apparaît comme un bon candidat pour être le chélateur principal du fer dans ces tissus : ses propriétés de chélation du fer sont maximales à un pH neutre ou alcalin correspondant aux conditions de la sève phloémienne, et son affinité pour le fer également. Bien que le complexe Fe-NA n'ait jamais été observé dans des échantillons biologiques, l'étude de mutants dépourvus de nicotianamine suggère que cette molécule joue un rôle important dans la circulation du fer.

Un mutant d'*Arabidopsis*, dont les quatre gènes codant les NA synthases (*AtNAS1*, *AtNAS2*, *AtNAS3* et *AtNAS4*) ont été disruptés, a récemment été publié (Klatte et al., 2009). Ces plantes sont incapables de synthétiser de la nicotianamine, et présentent une forte chlorose internervaire des jeunes feuilles (Cf. Figure 15). Une étude plus approfondie (Schuler et al., 2012) a révélé que le pollen de ce mutant est partiellement stérile et que chez ce mutant, le fer s'accumule dans le phloème. Ces résultats suggèrent un rôle de la NA dans le transport du fer du phloème vers les organes puits, ainsi que dans le développement du pollen.

Le mutant de tomate *chloronerva* (*chln*) est dépourvu de NA car l'unique gène codant la NA synthase dans cette espèce est muté (Ling et al., 1999). *Chloronerva* présente une chlorose ferrique, en particulier au niveau des jeunes feuilles, malgré la présence de fortes concentrations de fer, comme le quadruple mutant *nas* d'*Arabidopsis*. Les plantes mutantes sont également perturbées dans le transport intracellulaire du fer : elles accumulent plus de fer dans leurs cytosol et leurs vacuoles que des plantes sauvages (Becker et al., 1995; Liu et al., 1998). Ces données renforcent l'hypothèse d'un rôle de la nicotianamine dans la chélation du fer cytosolique.

Plusieurs travaux ont montré l'accumulation de NA dans les tissus de plantes carencées en fer ou dérégulées (Pich, 1994; Becker et al., 1998). La localisation de la NA a été étudiée chez la tomate (Pich et al., 1997) par immunohistochimie et a montré sa présence majoritairement dans les vacuoles du cylindre central, et dans une moindre mesure dans le cytosol. Un travail plus récent chez *Arabidopsis* (Haydon et al., 2012) a également montré la présence de nicotianamine dans les mitochondries et les vacuoles.



<u>Figure 16:</u> Structure présumée des complexes fer-nicotianamine (Fe(III)-NA) et fer-acide déoxymuginéique (Fe(III)-DMA), modélisée par informatique (d'après Von Wiren et al., 1999).

Cette molécule possède une structure analogue à celles des acides muginéiques (MA) et déoxymuginéiques. Or, ces deux phytosidérophores jouent un rôle prépondérant dans le transport du fer chez les plantes de la stratégie 2. Ces trois molécules (NA, MA et DMA) sont capables de former des complexes très similaires (Cf. Figure 16) en terme de masse et de structure (Murakami et al., 1989).

Les transporteurs de la famille des YSL (Yellow stripe 1–like) représentent des candidats de choix pour le transport de complexes métal-NA. Le premier gène de cette famille, YS1, a été identifié chez le maïs (*Zea mays*) et encode un transporteur responsable de l'import de complexes Fe(III)-Acide déoxymuginéïque dans les cellules de l'épiderme des racines (Curie et al., 2001 ; Murata et al., 2006). ZmYS1 est également capable de transporter des complexes Fe(II)-NA et Ni(II)-NA (Schaaf et al., 2004). Dans le génome d'*A. thaliana*, huit gènes homologues, appelés *YSL* pour *YS1-Like*, ont été identifiés (Curie et al., 2001). Puisque *Arabidopsis* ne synthétise pas de PS, il a été proposé que les transporteurs YSLs soient impliqués dans le transport de complexes métal-NA, notamment de Fe-NA. Cette fonction a été démontrée chez *Arabidopsis* par l'étude du mutant *ysl1* (Le Jean et al., 2005) et du double mutant *ysl1 ysl3* (Waters et al., 2006) qui est sensible à la carence en fer. De plus, l'orthologue d'AtYSL3 chez *Thlaspi caerulescens*, TcYSL3, est capable de transporter les complexes Fe-NA en système hétérologue (Gendre et al., 2007).

#### c) Distribution aux différents organites

Le fonctionnement des chloroplastes et des mitochondries nécessite un approvisionnement en fer (Cf. Chapitre I.3.b). Une fois arrivé dans les cellules, le fer doit donc arriver jusqu'à ces organites et en traverser les membranes. La nicotianamine est probablement impliquée dans la chélation du fer dans le cytosol (Cf. Chapitre I.5.b), il est donc vraisemblable que des transporteurs YSL soient impliqués dans les processus de transport intracellulaire. Plusieurs acteurs du transport par les organelles, identifiés chez différentes espèces de plantes, sont présentés dans les paragraphes suivants.

#### i) Import et export de fer des chloroplastes

Le système d'entrée du fer dans les chloroplastes n'est pas encore totalement caractérisé. Cependant, il a été montré que l'import du fer repose sur un système de réductase couplé à un

transporteur de Fe(II) : en effet, il a été démontré que la réductase ferrique AtFRO7 est impliquée dans ce processus. Cette protéine est localisée sur la membrane des chloroplastes, et elle est produite dans les cotylédons et les feuilles. Les chloroplastes du mutant fro7 contiennent moins de fer et portent une activité réductase ferrique de surface beaucoup plus faible que les chloroplastes de plantes sauvages. Cette diminution de la quantité de fer chloroplastique provoque une plus forte sensibilité des jeunes plantules à des conditions de carence en fer dans le sol (Jeong et al., 2008). Bien que le transporteur de Fe(II) n'ait pas été identifié jusqu'à présent, la perméase PIC1 (Permease In Chloroplast 1) semble jouer un rôle, plus ou moins direct dans l'homéostasie en fer du plaste. La disruption du gène PIC1 provoque un défaut de formation des chloroplastes, ce qui entraine un nanisme et une chlorose très prononcés (Duy et al., 2007). Les plantes surexprimant AtPIC1 accumulent plus de fer que les plantes sauvages dans leurs chloroplastes (Duy et al., 2011). L'expression de AtPIC1 en levure permet de restaurer la croissance de la souche fet3 fet4 déficiente en transport de fer. L'augmentation du transport du fer chez ces mêmes levures est relativement faible (Duy et al., 2007). AtPIC1 semble donc jouer un rôle dans l'entrée du fer dans les chloroplastes mais les auteurs suggèrent qu'il fonctionnerait de manière optimale seulement si il est associé à d'autres protéines et pour transporter non pas du directement du fer mais plutôt un ligand ou un co-facteur associé au fer.

Des travaux dans l'équipe ont mis en évidence le rôle des transporteurs AtYSL4 et AtYSL6 dans les mouvements de fer du chloroplaste. Les deux gènes sont exprimés dans les tissus chlorophylliens et fortement induits lors de la sénescence. La protéine AtYSL6 est localisée sur l'enveloppe des chloroplastes et le double mutant *ysl4ysl6* présente plusieurs phénotypes compatibles avec un rôle de ces transporteurs dans l'efflux du fer des plastes vers le cytosol : le double mutant est sensible à l'excès de fer et les chloroplastes accumulent deux fois plus de fer que chez les plantes sauvages. De plus, des plantes surexprimant *AtYSL6* (construction *promoteur35-AtYSL6*) sont plus sensibles à la carence en fer (Divol et al., manuscrit en préparation). Ces données indiquent que ces deux transporteurs pourraient jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie du fer dans cet organite à travers leur activité d'efflux, notamment en conditions d'excès.

#### ii) Transport mitochondrial

Parmi les huit protéines FRO d'*Arabidopsis*, deux d'entre elles sont supposées être localisées dans les mitochondries, AtFRO3 et AtFRO8. Cette hypothèse est basée sur des prédictions informatiques mais aucune preuve biologique n'a été publiée à ce jour. La localisation d'AtFRO3 semble cependant avoir été confirmée (Connolly, ISINIP 2012), mais son implication dans le transport du fer mitochondrial est suspectée mais pas démontrée.

L'importation de fer dans la mitochondrie par le transporteur de riz OsMIT1 a été bien caractérisée (Bashir et al., 2011). Ce transporteur est effectivement localisé à la mitochondrie en celules de tabac, et il est capable de restaurer le phénotype du mutant de levure  $\Delta mrs3$  $\Delta mrs4$ , déficient en acquisition du fer par les mitochondries (Foury et Roganti, 2002; Mühlenhoff et al., 2003). Chez le riz, la suppression de l'expression de *OsMIT* est létale à l'état homozygote, et les mitochondries de plantes, dont l'expression de *OsMIT* est diminuée, contiennent environ deux fois moins de fer que les mitochondries de plantes de type sauvage.

Les disruptions complètes des gènes *AtPIC1* ou *OsMIT1* sont létales au stade plantule dans les deux cas. De plus, le mutant *fro7* est également affecté lors de la germination. Ces données suggèrent que les transports mitochondriaux et chloroplastiques soient particulièrement importants dans les jeunes stades de développement des plantes.

#### d) Chargement des graines

Contrairement à l'entrée du fer dans les racines qui a été très étudiée au cours des deux dernières décennies, l'entrée du fer dans les graines a reçu moins d'attention. De plus en plus d'équipes de recherche s'intéressent aux mécanismes impliqués, et il devient évident que la nicotianamine joue un rôle important. Il n'y a cependant à ce jour aucun système de transport de fer caractérisé à l'intérieur des graines. Les voies d'entrée du fer dans les graines, puis d'arrivée dans l'albumen, et finalement d'absorption par l'embryon restent mystérieuses.

#### i) Circulation du fer jusqu'à l'embryon

Malgré un manque d'information sur les transporteurs impliqués dans les processus de chargement et déchargement du phloème, il est clair que ces transporteurs incluent les YSLs. *AtYSL1* est le membre de cette famille le mieux caractérisé : il est exprimé dans les tissus vasculaires des bourgeons, dans les siliques, les grains de pollen, et les graines en

développement. Le mutant « perte de fonction » ysl1 d'Arabidopsis accumule moins de fer et de nicotianamine dans les graines que l'écotype sauvage dont il est issu, et ses graines présentent un défaut de germination en conditions limitantes en fer, ce qui suggère l'implication d'AtYSL1 dans le chargement en fer et en NA des graines, vraisemblablement via le complexe Fe-nicotianamine (Le Jean et al., 2005). AtYSL3 a pratiquement les mêmes territoires d'expression que AtYSL1. Le mutant simple ysl3 n'a pas de phénotype apparent ; En revanche, le double mutant ysl1ysl3 présente un défaut de remobilisation de Fe, Cu et Zn depuis les feuilles âgées, ce qui entraîne une réduction de la concentration de ces trois métaux dans les graines (Waters et al., 2006).

Plusieurs études menées chez le riz ont depuis renforcé l'hypothèse du rôle de la nicotianamine dans le chargement du fer dans les graines. L'augmentation de la quantité de nicotianamine dans des plantes surexprimant une NA synthase (OsNAS3) conduit à une augmentation de la quantité de fer dans les graines, et la disruption de ce gène produit l'effet inverse (Lee et al., 2009). Le même type d'approche a été conduite avec OsNAS1 et a abouti à un résultat similaire (Zheng et al., 2010). *OsYSL2* est également un acteur important dans ce processus de chargement. Ce gène s'exprime dans les tissus phloèmiens, dans l'albumen et dans l'embryon (Koike et al., 2004). La réduction ou l'augmentation de son niveau d'expression aboutit à une diminution du contenu en fer des graines (Ishimaru et al., 2010). Cependant, lorsque l'expression de *OsYSL2* est placée sous le contrôle du promoteur d'*OsSUT1* (i.e. SUcrose Transporter 1), qui est un promoteur très actif dans l'albumen, la concentration en fer des grains polis est fortement augmentée par rapport à des plantes de type sauvage. Dans les graines de ces plantes transgéniques, le fer s'accumule principalement dans l'albumen. Ce travail montre clairement le rôle d'OsYSL2 dans le transport du fer du phloème vers les graines.

Dans un objectif de bio-fortification, la concentration des tissus en NA ainsi que le transport des complexes fer-NA apparaissent comme des cibles de choix. L'augmentation de la teneur en NA améliore la translocation du fer vers les grains. L'augmentation du transport vers l'albumen des complexes Fe-NA par les protéines YSL, permet de préserver ce fer en évitant sa perte lors du polissage des grains (Zheng et al., 2010) et améliore ainsi sa biodisponibilité.

L'activité du promoteur du gène codant le transporteur d'efflux de citrate *AtFRD3* a été récemment observée par Roschzttardtz et al. (2011) dans la couche aleurone des graines et



Figure 17: Activité du promoteur de *AtFRD3* dans le protoderme d'embryons d'*A. thaliana* ainsi que dans la couche aleurone, observée dans des plantes transgéniques exprimant une construction *promoteurAtFRD3::GUS*.

dans le protoderme de l'embryon (Cf. Figure 17). FRD3 ayant une activité d'efflux de citrate, il est possible que dans l'albumen d'*Arabidopsis*, qui est situé entre la couche d'aleurone et l'embryon, le fer soit chélaté par le citrate.

AtOPT3, un transporteur de la famille des OligoPeptide Transporters, semble jouer un rôle dans le transport du fer vers la graine chez *Arabidopsis*. L'allèle "perte de fonction" *opt3-1* est embryo-léthal : la croissance des embryons *opt3-1* homozygotes est arrêtée au cours du développement (Stacey et al., 2002 ; Stacey et al., 2008). De plus, ce gène est exprimé dans les tissus vasculaires et les embryons en développement, et son expression est induite en conditions limitantes en fer. Dans l'allèle knock-down *opt3-2*, la perception du statut en fer foliaire est altérée, entraînant l'expression constitutive des systèmes d'acquisition du fer et une forte accumulation de Fe dans les feuilles (Stacey et al., 2008). Chez ce mutant, la concentration en fer dans les graines est au contraire fortement réduite. Ces résultats mettent en évidence un rôle de OPT3 dans le maintien de l'homéostasie du fer à l'échelle de la plante entière ainsi qu'une fonction dans le remplissage en fer de la graine. Au niveau moléculaire, la fonction de OPT3 reste cependant inconnue puisque des informations telles que la localisation subcellulaire de cette protéine ainsi que le substrat transporté (fer ? ligand du fer ? complexe ligand-fer ?...) restent inconnus.

#### ii) Stockage et remobilisation

La vacuole joue un rôle majeur lors du remplissage de la graine et la germination. Ce compartiment est considéré comme le lieu principal de stockage du fer dans l'embryon d'*A. thaliana*. Il a en effet été montré que dans les embryons d'*Arabidopsis*, le fer est principalement localisé dans les vacuoles de l'endoderme (Roschzttardtz et al., 2009). Chez le mutant *vit1* (Vacuolar Iron Transporter 1), cette localisation est altérée (Kim et al., 2006): le fer n'est pas localisé dans les vacuoles de l'endoderme mais dans des vacuoles des couches cellulaires périphériques, notamment celles du cortex. De plus, l'expression hétérologue de *AtVIT1* complémente le phénotype de sensibilité à l'excès de fer du mutant  $\Delta ccc1$  de *Sacharomyces cerevisiae* qui est incapable de transporter le fer du cytosol vers la vacuole. AtVIT1 est donc un transporteur de fer tonoplastique qui permet la constitution d'un stock de fer vacuolaire dans l'embryon.

Lors de la germination, le pool de fer vacuolaire est remobilisé par les transporteurs AtNRAMP3 et AtNRAMP4 (Lanquar et al., 2005). Le double mutant *nramp3 nramp4* est



**Figure 18:** Visualisation du fer dans des plantules de 4 jours d'*A. thaliana* sauvages (WT) ou dans le mutant *nramp3 nramp4*, par coloration histochimique au Perls-DAB (Roschzttardtz et al., 2009). Dans les plantules sauvages, le pool de fer endodermique n'est plus détectable, alors qu'il n'a pas été remobilisé depuis les vacuoles de stockage chez les plantules mutantes *nramp3 nramp4* et reste donc encore visible.



Figure 19: Localisation du fer dans les embryons d' *A. thaliana* (A) sauvages (Col-0/WT) et (B) mutants *vit1-1* par microtomographie et spectrométrie de fluorescence X (Kim et al., 2006) et (C) par coloration au Perls-DAB (Roschzttardtz et al., 2009). Dans les embryons sauvages, le fer est localisé dans l'endoderme, tandis que dans les embryons du mutant *vit1-1*, la distribution du fer est diffuse.

effectivement incapable d'utiliser ce fer, qui reste donc bloqué dans les vacuoles, contrairement au cas de plantules sauvages dans lesquelles le pool de fer vacuolaire est remobilisé dès les premières heures de germination et n'est plus détectable dans les vacuoles de l'endoderme dès 4 jours de germination (Roschzttardtz et al., 2009; Cf. Figure 18).

Le défaut de distribution du fer chez le mutant *vit1* a d'abord été mis en évidence par microtomographie et spectrométrie de fluorescence X (XRF), techniques utilisant le rayonnement synchrotron (Kim et al., 2006; Cf. Figure 19A et 19B). Un niveau de résolution subcellulaire a ensuite été atteint grâce à une technique de coloration histochimique du fer mise au point dans notre équipe (Roschzttardtz et al., 2009). Cette technique est basée sur la réaction du fer avec le ferrocyanure de potassium (Perls) qui produit un précipité bleu, puis une intensification de cette réaction avec du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de la diaminobenzidine (DAB) qui aboutit à la formation d'un précipité brun (Cf. Figure 19C). Elle peut être réalisée sur des coupes fines de tissus végétaux. Cette méthode simple et peu coûteuse de localisation histochimique du fer a permis d'identifier l'endoderme comme étant la couche cellulaire de stockage du fer dans l'embryon et de préciser la localisation du fer dans les vacuoles de cette couche endodermique (Roschzttardtz et al., 2009).

Plusieurs composants majeurs du transport du fer dans les plantes sont donc connus et bien caractérisés. Toutefois, le transport du fer est un processus dynamique et beaucoup de mécanismes tels que le chargement des graines, ne sont pas encore élucidés. De plus, le transport et la spéciation intracellulaires sont très peu documentés. La figure 20 résume les différentes informations bibliographiques présentées dans ce chapitre. Les techniques modernes de chimie, discutées en début de chapitre, ainsi que de physique, qui permettent l'imagerie d'éléments ou de molécules à des résolutions de l'ordre du compartiment cellulaire, apportent des informations auparavant inaccessibles.

#### 6) <u>Techniques d'imagerie et d'analyse des métaux</u>

L'étude des processus de stockage et de distribution des métaux dans les tissus biologiques, un point critique pour la compréhension de leur homéostasie, nécessite absolument une connaissance approfondie de leur localisation et de leur spéciation.

Depuis les premières méthodes histochimiques d'observation microscopique des métaux il y a plus de 100 ans (Perls, 1867), de nombreuses méthodes de visualisation et d'analyse *in situ* ont vu le jour. Les techniques les plus modernes ont récemment fait l'objet de plusieurs revues



<u>Figure 20:</u> Bilan des connaissances actuelles sur le transport et la circulation du fer chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Palmer et Guerinot, 2009).

(McRae et al., 2009; Wu et Becker, 2012) et incluent des méthodes d'ablation laser couplée à la spectrométrie de masse (LA-ICP-MS), de spectroscopie de fluorescence X basées sur le rayonnement synchrotron (SRXRF), d'émission de rayon X induite par particule (PIXE), et de microscopie électronique couplée à de l'analyse dispersive en énergie (SEM-EDX et TEM-EDX).

#### a) Localisation du fer par histochimie

La méthode de coloration histochimique du fer la plus populaire est basée sur une intensification de la réaction entre le fer ferrique et le ferrocyanure de potassium (réaction 1), décrite par Perls (1867). Ce protocole, mis au point par Nguyen-Legros (1980) utilise le ferrocyanure de potassium ferrique (i.e. réactif de Perls;  $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ ) pour catalyser l'oxydation du diaminobenzidine par le peroxyde d'hydrogène (réaction 2), formant ainsi un polymère de benzidine de couleur brune. Cette réaction conduit à la formation de ferrocyanure de potassium ferreux qui peut également réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour former de nouveau du ferrocyanure de potassium ferrique (Réaction 3).

Réaction 1:  $4Fe^{3+} + 3 [Fe^{II}(CN)_6]^{4-} --> Fe^{III}_4 [Fe^{II}(CN)_6]_3 + H_2O$ 

Réaction 2:  $Fe^{III}_{4}[Fe^{II}(CN)_{6}]_{3} + \frac{1}{2}H_{2}O_{2} - Fe^{II}_{4}[Fe^{II}(CN)_{6}]_{3} + H^{+} + O$ 

Réaction 3:  $Fe^{II}_{4}[Fe^{II}(CN)_{6}]_{3} + \frac{1}{2}H_{2}O_{2} \rightarrow Fe^{III}_{4}[Fe^{II}(CN)_{6}]_{3} + OH^{-1}$ 

L'addition d' $H_2O_2$  au fer ayant réagit avec le réactif de Perls va aboutir à un cycle redox entre Fe(II) et Fe(III) et ainsi produire de l'oxygène qui va provoquer la polymérisation du DAB. Il y a quelques années, ce protocole a été adapté aux tissus végétaux dans notre laboratoire (Roschzttardtz et al., 2009).

#### b) Localisation par émission de rayon X induite par particule (µPIXE)

Le principe est de bombarder de particules ou de photons un échantillon dans le but d'induire une ionisation de l'enveloppe interne des atomes. Des électrons de l'enveloppe externe vont alors remplacer les électrons manquant de l'enveloppe interne en émettant des rayons X d'une

énergie caractéristique et spécifique à chaque élément. Les rayons X émis sont captés et quantifiés à l'aide d'un détecteur à énergie dispersive. Cette technique peut être mise en œuvre dans les conditions ambiantes mais permet uniquement de détecter les éléments plus lourds que le sodium.

### c) Localisation par spectroscopie de fluorescence X induite par rayonnement synchrotron (SR-µXRF)

L'échantillon est placé dans une chambre sous vide, ce qui permet l'analyse de tissus congelés. L'échantillon est bombardé de photons sous forme de rayons X issus d'un rayonnement synchrotron. Les électrons des orbitales internes de l'atome sont alors expulsés, puis remplacés par des électrons des orbitales supérieures. En changeant d'orbitale, ces électrons vont émettre de l'énergie sous forme de photons dont l'énergie sera caractéristique des atomes présents. Le spectre d'énergie émise est mesuré par un détecteur de fluorescence.

Un intérêt majeur de cette technique est qu'elle peut-être couplée à des analyses de spéciation des métaux par spectroscopie d'absorption des rayons X et notamment aux spectroscopies XANES et EXAFS. Il est ainsi possible d'identifier l'état redox ainsi que les atomes voisins de l'élément étudié *in vivo*.

#### 7) Objectifs de la thèse

#### a) Questions de recherche

Dans ce travail de thèse, je me suis attaché à étudier la circulation du fer dans la plante, en me focalisant sur la dernière étape de la circulation : le remplissage de la graine.

1) J'ai tout d'abord étudié la spéciation du fer dans la graine, c'est-à-dire la nature des ligands complexant le fer. 2) Grâce à ces informations sur les formes de fer arrivant à l'embryon, j'ai tenté de comprendre comment l'embryon assure sa nutrition en fer et ainsi découvrir de nouvelles fonctions physiologiques (e.g. synthèse des ligands, transport de complexe). 3) J'ai ensuite recherché où et comment le fer est stocké dans les cellules de l'embryon. 4) Enfin, j'ai cherché à remonter aux gènes impliqués dans les processus physiologiques ainsi mis en évidence.

L'étude de la spéciation du fer est extrêmement délicate, et il existe peu d'exemples de ce genre d'analyse (Rellan-Alvarez et al., 2010). Cette analyse a été possible grâce à la



Figure 21: Représentation schématique d'une graine de *Pisum sativum*. L'albumen est déconnecté des tissus vasculaires.

collaboration avec le laboratoire de chimie analytique du CNRS/Université de Pau (LCABIE, UMR 5254 IPREM), qui avait déjà travaillé avec notre équipe sur la spéciation du nickel (Ouerdane et al., 2006).

#### **b)** Modèles d'étude

Nous avons choisi de nous appuyer sur deux plantes modèles, le pois pour les approches biochimiques et *Arabidopsis thaliana* pour les approches de génétique. Le pois a été choisi car les graines, de grande taille, possèdent plusieurs caractéristiques intéressantes:

- elles accumulent un albumen liquide (appelé liquide du sac embryonnaire ou LSE) qui sert de support nutritionnel pour l'embryon. Ce LSE, accumulé en grandes quantités, est aisé à collecter par perfusion (Cf. Matériel et méthode). Cet albumen n'est pas en connexion directe avec le système vasculaire (Cf. Figure 21) et constitue donc un seul grand compartiment cellulaire, procurant ainsi des échantillons adéquats pour les analyses de spéciation;

- les embryons peuvent êtres facilement isolés par dissection et manipulés à l'œil nu;

- la grande taille des cellules de pois est également un atout pour étudier la localisation subcellulaire du fer et pour tenter des analyses de spéciation *in situ*.

*Arabidopsis thaliana* a l'avantage d'être une espèce modèle pour laquelle de nombreux outils de génétique moléculaire ont été développés. Le séquençage intégral de son génome en l'an 2000, ainsi que les ressources disponibles (e.g. collections de mutants) en font un modèle quasiment incontournable. Malheureusement, la très petite taille de ses graines (0,44 mm x 0, 27 mm) est clairement un frein technique aux recherches portant sur cet organe.

## Chapitre II

# Localisation subcellulaire et spéciation du fer
# 1) Introduction

## a) Localisation subcellulaire du fer

La connaissance de la localisation subcellulaire du fer est assez réduite. Pourtant, elle est indispensable à la compréhension des processus de circulation du fer. Quelques exemples de caractérisation de pool majeurs ont été publiés (Kim et al., 2006; Shikanai et al., 2003). Cependant, les autres pools, minoritaires en terme de quantité de fer et donc moins facilement observables, sont tout aussi importants en terme de fonctionnement biologique. Ce manque d'information est la conséquence de la difficulté d'étudier ce sujet. En effet, les techniques d'imagerie élémentaire sont extrêmement chères, donc difficilement accessibles à la plupart des groupes de recherches. La méthode de localisation histochimique par réaction avec le Perls et le DAB est une nouvelle alternative aux techniques inabordables utilisant les lasers. Les différentes méthodes permettant de déterminer la localisation du fer et d'autres éléments dans les tissus et cellules ont été discutées extensivement dans le chapitre précédent (Cf. Chapitre I.6).

Ce chapitre correspond à l'étude de la localisation subcellulaire du fer dans les cellules de différentes espèces de végétaux supérieurs, *A. thaliana, L. esculentum*, et principalement *P. sativum*. Nous rapportons ici un nouvel exemple de succès de l'utilisation du Perls-DAB pour l'étude de la localisation subcellulaire du fer dans les plantes: nous avons démontré l'existence d'un nouveau pool de fer complètement inattendu et localisé dans le nucléole des cellules de ces trois espèces. Nous avons confirmé chez le pois, les résultats obtenus à l'aide de deux techniques différentes d'imagerie élémentaire, l'une basée sur l'émission de rayon X induite par particule, et l'autre sur la fluorescence induite par rayon X.

Nous avons décidé de nous concentrer sur le pois, qui, grâce à la grande taille de ses cellules et noyaux est un bon modèle pour l'étude de la spéciation à l'échelle subcellulaire. La nature et la fonction de ce fer ont été étudiées de manière plus approfondie, en tentant de caractériser par spectroscopie d'absorption des rayons X, les molécules auxquelles il est complexé. D'autre part, les variations de composition chimique de cellules d'embryons soumises à différentes concentrations de fer ont été étudiées *in situ* par microscopie infrarouge. Enfin, des travaux de caractérisation physiologique de la fonction du fer nucléolaire ont été initiés.



Figure 22: Schéma de la région organisatrice du nucléole (RON), représentée en tant que segment d'un chromosome. Une partie de la RON est structurée en boule de chromatine condensée, et le reste forme une boucle étendue d'ADN contenant les gènes ribosomaux (ADNr). La RON comprend des centaines voire des milliers de gènes ribosomaux selon les espèces. Ces gènes sont organisés en répétition en tandem, et encodent les ARN ribosomaux 18S, 5,8S et 25S. Ces gènes sont transcrits par l'ARN polymérase I, qui produit les précurseurs des ARN ribosomaux (préARNr) qui incluent les espaceurs externes (ETS, External Transcribed Spacers) et internes (ITS, Internal Transcribed Spacers). Les ARNr 18S, 5,8S et 25S matures sont obtenus après une série de modifications incluant la méthylation et la pseudouridinylation de certaines bases, ainsi que des étapes endo- et exo-nucléolytiques pour retirer les espaceurs internes et externes. D'après Saez-Vasquez et al. (2008).

## **b**) Le nucléole

Le nucléole est une structure située à l'intérieur du nucléoplasme qui est connue pour être le lieu de production des ribosomes de la cellule. Ce processus implique la production des différentes sous-unités des ribosomes, par transcription des gènes codant trois des quatre types d'ARN ribosomaux (ARNr), sous forme d'une seule molécule de pré-ARNr qui sera ensuite traité pour former les ARNr 18S, 5,8S et 25S, ces derniers étant spécifiques des végétaux. Il a plus récemment été montré que le nucléole est également impliqué dans la maintenance des télomères (Diez et al., 2006) ainsi que dans d'autres réactions de maturation des ARN (Raska et al., 2006; Boisvert et al., 2007; Andersen et al., 2005).

### i) Structure et assemblage du nucléole

Les informations sur la structure du nucléole proviennent essentiellement d'observations par microscopie électronique. Ainsi, les différents sous compartiments du nucléole ont été définis par rapport à leur densité aux électrons, ainsi que par leur association avec différentes fonctions biologiques. La structure n'est pas formée pas des membranes ou des parois, mais par différents états de condensation de la chromatine de plusieurs parties du génome appelées régions organisatrices du nucléole (RON).

Ces régions contiennent les ADN ribosomaux (ADNr) qui sont disposés en répétitions en tandem, séparées par des régions intergéniques non transcrites appelées "linker" (Cf. Figure 22). Ces gènes peuvent être transcrits par l'ARN polymérase I pour produire les précurseurs des ARN ribosomaux (préARNr). Les gènes codant les ARN ribosomaux (ARNr) ont des séquences identiques mais diffèrent en terme d'organisation en chromatine (Grummt et Pikaard, 2003): ils sont dans des états plus ou moins condensés qui contrôlent leur activation ou leur répression.

Les nucléoles présentent un polymorphisme très important d'une espèce à une autre, d'un type cellulaire à un autre, ou même au sein d'un même type cellulaire. Certains spécialistes supportent l'idée que les mêmes composants structuraux possèdent la même fonction dans les différents types de nucléoles (Shaw and Jordan, 1995). Ce polymorphisme de structure est donc un bon outil pour associer des fonctions aux différents sous-domaines.

Le nucléole est, de manière générale, divisé en quatre sous-domaines qui ont été définis par observations microscopiques et par rapport à leur composition macro-moléculaire (Cf. Figure



Figure 23: Schéma structural des nucléoles de cellules animales (A) et végétales (B). D'après McKeown et Shaw. (2009).

23): les centres fibrillaires (CF), situés à l'intérieur des composants fibrillaires denses (CFD), un composant granulaire (CG), et une cavité, spécifique des nucléoles de cellules végétales, localisée entre les CFD (Jordan, 1984).

Les CF sont associés à l'organisation de la chromatine et la transcription de l'ADNr. Ils contiennent en effet de l'ARN polymérase I (Gilbert et al., 1995; Martin et Medina, 1991; Scheer et Rose, 1984), bien que l'activité transcriptionnelle ait été localisée à la zone de transition CF-CFD (Cmarko et al., 2000; De Carcer et Medina, 1999; Dundr et Raska, 1993). Le CFD est le site de maturation des préARNr et de ainsi que de nombreux ARN (Royal et Simard, 1975; Fakan et Puvion, 1980). Cette maturation se poursuit ensuite dans les granules du CG, ou se produit également l'assemblage des préribosomes avant leur exportation vers le cytosol. Le rôle de la cavité nucléolaire, qualifiée de vacuole nucléolaire, est inconnu. Cette cavité est présente dans les nucléoles ayant une forte activité de transcription et de traitement, typique des cellules en prolifération (Deltour et De Barsy, 1985; Gonzalez-Camacho et Medina, 2006).

Au début de la mitose, à la transition de phase G2/M, le nucléole est désassemblé, puis à la fin de la télophase, les nucléoles se reconstituent dans les cellules filles par un processus de nucléogenèse. Il s'agit d'un processus rapide ce qui rend difficile l'identification des voies conduisant à l'établissement de chaque composant du nucléole et de leur fonction.

La nucléogenèse commence par la formation de corps prénucléolaires (CPN). Le nucléole se reforme progressivement grâce au recrutement séquentiel de protéines nucléolaires au niveau des RON (Savino et al., 2001), provoquant l'initiation de la transcription des ADNr. Les CPN deviennent ainsi de plus en plus petit et le nouveau nucléole émerge au niveau des RON (Azum-Gélade et al., 1994; Hernandez-Verdun, 2006; Medina et al., 2000). Les CPN jouent donc un rôle primordial dans le réassemblage et la réactivation postmitotique du nucléole.

Le désassemblage du nucléole commence par la désagrégation du CG, et l'exportation des granules vers le cytoplasme, puis se poursuit par la dispersion du CFD entre les masses de chromatine condensée, jusqu'à ce que la structure nucléolaire ait complètement disparue en prométaphase. Ce processus de désassemblage est accompagné d'un arrêt de la transcription et du traitement des ARNr. Au moment de la formation des chromosomes, en métaphase, certaines protéines spécifiques restent associées aux loci occupés par les gènes ribosomaux ou RON, notamment les composants du complexe de transcription ARN polymérase I.

#### ii) Fonctionnement du nucléole

La principale fonction attribuée au nucléole est la production des précurseurs des ribosomes, depuis l'organisation et la transcription des ADNr, jusqu'à la synthèse des protéines préribosomales. L'organisation des régions génomiques correspondantes, ainsi que l'activation de la transcription des gènes codant les ARNr est intimement liée à la formation de la structure nucléolaire. Il est rare que ces gènes soient tous actifs en même temps, et leur activation est modulée au cours du cycle cellulaire (Hasterok et Maluszynska, 2000). La transcription de ces gènes est contrôlée par leur état de condensation en chromatine qui peut se présenter sous au moins trois formes: l'état ouvert et accessible qui permet l'activité des gènes, l'état condensé qui rend les gènes inactifs, et un état intermédiaire ouvert mais dont les gènes sont inactifs (Stefanovsky et Moss, 2006; Jones et al., 2007). Le niveau d'association de l'ARN polymérase I avec ces gènes dépend de leur niveau de méthylation, de l'état de condensation de leurs promoteurs, des variants d'histones qui leurs sont associés, et de différences de séquences promotrices (Grummt et Pikaard, 2003; Lawrence, 2004; McStay, 2006).

L'initiation de la transcription des ADNr est peu documentée chez les plantes. Chez les animaux, elle implique le recrutement du complexe ARN polymérase I au niveau du promoteur par des facteurs de transcriptions. Il est probable qu'un système du même type existe chez les végétaux, mais il n'a pas pu être mis en évidence sur la base de comparaison de séquences protéiques (De Carcer et Medina, 1999; Rodrigo et al., 1992; Tao et al., 2001). Le complexe ARN polyémerase I est lui-même inconnu chez les plantes, mais contiendrait une caséine kinase ainsi qu'une histone acétyl-transférase (Saez-Vasquez et Pikaard, 1997). La transcription des ADNr aboutit à la production de préARNr. Cet ARN est le précurseur des ARNr matures. Le processus de maturation inclus des modifications de bases tels que des méthylations et des étapes endo- et exonucléolytiques pour retirer les zones d'espacement externes et internes (ETS et ITS).

Les modifications de bases sont dirigées par les snoRNP, (small nucleolar RiboNucleoProtein) des complexes contenant à la fois des protéines (e.g. la fibrillarine NOP1) et des petits ARN (small nucleolar RNA, snoRNA) tels les C/D snoRNA. Récemment, un complexe protéique impliqué à la fois dans la transcription et le traitement des préARNr a été identifié chez *Arabidopsis*: le facteur nucléaire D (Caparros-Ruiz et al.,

1997). Il s'agit d'un gros complexe ribonucléoprotéique qui contient des petits ARN nucléolaires et des protéines, nucléoline-like et fibrillarines. Ce complexe est capable de se fixer spécifiquement à l'ADNr ainsi que de cliver les préARNr au niveau de l'ETS situé en 5' (Saez-Vasquez et al., 2004). L'ETS en 3' serait clivé par AtRTL2, une protéine de la famille des RNase III (Comella et al., 2008).

La production des pré-ribosomes est un processus très peu connu chez les végétaux supérieurs. En revanche, on sait qu'il s'agit d'un processus très complexe chez les autres eucaryotes, qui implique plus de 80 protéines ribosomales, plus de 200 protéines non ribosomales, et 75 petits ARN nucléolaires (Freed et al., 2010; Kressler et al., 2010). Chez les levures, les ARNr 25S, 18S, 5,8S et 5S vont s'associer à de nombreuses protéines pour former une particule préribosomale, également qualifiée de particule 90S (Warner, 1989; Warner, 1999; Woolford, 1991). Cette particule va migrer vers le cytosol, au travers du nucléoplasme. Elle va subir un clivage et produire deux particules plus petites, 40S et 60S. Au cours de la maturation et du transport, la plupart des protéines de ces particules vont se dissocier (Nissan et al., 2002) et sont absentes dans les particules matures arrivant au cytosol.

#### iii) Autres fonctions du nucléole

Dans les dix dernières années, il est devenu clair que le nucléole est impliqué dans beaucoup d'autres fonctions que la biogenèse des ribosomes (Rubbi et Milner, 2003; Raska et al., 2006; Boisvert et al., 2007). La plupart sont des fonctions liées à la maturation des ARN et à l'assemblage des ribonucléoprotéines, mais le nucléole jouerait également un rôle de régulation important pour le cycle cellulaire, les réponses aux stress ou les activités télomérase (Pederson, 1998; Tsai et McKay, 2002; Boulon et al., 2010).

Chez *Arabidopsis*, les ARNm de nombreux gènes sont présents dans le nucléole (Kim et al., 2009), en particulier, de nombreux ARNm présentant un épissage aberrant, et des codons terminateurs prématures. Ce qui n'est pas le cas des nucléoles de cellules animales dans lesquels peu d'ARNm a été observé (Olson, 2004). En revanche, un point commun entre les nucléoles animaux et végétaux est la présence de précurseurs des microARN (miARN) ainsi que des protéines impliquées dans leur maturation (Pontes et Pikaard, 2008). Chez *Arabidopsis*, le nucléole serait donc impliqué dans la biogenèse des ARNm, la dégradation des ARN non-sens et la régulation de l'expression des gènes par les miARN.

#### iv) Les protéines de type nucléoline

Chez les eucaryotes, les nucléolines sont les protéines non ribosomales les plus abondantes du nucléole (Ginisty et al., 1999). Ces protéines jouent un rôle dans les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes, dont la transcription de l'ARN polymérase I et le traitement des préARNr (Roger et al., 2003), ainsi que l'assemblage et le transport vers le cytosol des particules ribosomales (Bouvet et al., 1998).

Les nucléolines seraient également impliquées dans le maintien de la structure de la chromatine (Angelov et al., 2006), la régulation de la transcription par l'ARN polymérase II (Huddleson et al., 2006), la réplication de l'ADN (Huddleson et al., 2006), la stabilité et la transcription des ARNm (Takagi et al., 2005), et l'assemblage des complexes ribonucléoprotéiques (Fouraux et al., 2002; Lefebvre et al., 2002). Chez *Arabidopsis*, deux gènes codant des nucléolines ont été clonés et partiellement caractérisés (Kojima et al., 2007; Petricka et Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007).

*AtNUC-L1* est exprimé de manière ubiquitaire alors que AtNUC-L2 est peu exprimé en conditions standard. La disruption d'*AtNUC-L1* provoque un retard de croissance et plusieurs défauts de développement. Chez le mutant *Atnuc-L1*, la structure du nucléole est également affectée: les CFD sont beaucoup plus petits et moins nombreux que chez l'écotype sauvage, et les granules du GC sont plus gros et plus dispersés. Dans les cellules de ce mutant les RON sont beaucoup moins condensés que dans les cellules de plantes sauvages, ce qui peut expliquer la structure moins compacte de leurs nucléoles (Pontvianne et al., 2007).

## c) Rôles du fer dans le nucléole

Il n'y a à ce jour aucune information directe sur la présence de fer dans le noyau ou le nucléole de plantes. En revanche, la localisation subcellulaire du fer a été étudiée par différents groupes, avec différentes problématiques, dans les cellules animales. Dans ces cellules, le fer est principalement localisé dans le cytoplasme. La forte concentration en fer dans le noyau est assez inattendue puisque ses propriétés chimiques le rendent susceptible d'endommager l'ADN et l'ARN. Chez les animaux, l'accumulation de fer dans les noyaux est en général associée à des disfonctionnements cellulaires comme par exemple dans les neurones atteints de neuroferritinopathie (Schroder, 2005; Vidal et al., 2008) ou dans les cellules atteintes par la maladie d'Alzheimer (Honda et al., 2005; Quintana et al., 2006).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, Honda et ses collaborateurs ont montré que le fer s'accumule notamment dans les noyaux des neurones dégénérescents et qu'il serait lié à l'ARNr. Cette interaction induit une oxydation des ARNr ce qui conduirait finalement à leur clivage.

Wang et al. (2010) ont montré, chez des cellules cancéreuse HeLa, l'induction de la production de la sous-unité H des ferritines par des inhibiteurs d'histone déacétylase à large spectre. Or, ces enzymes jouent un rôle important dans la modulation de la chromatine, et certaines sont localisées dans le nucléole. La signification biologique de cette induction reste cependant inconnue.

Le rôle du fer dans le nucléole est assez mystérieux. D'une part, la structure et le fonctionnement du nucléole sont peu connus, en particulier chez les plantes, et d'autre part, aucune information sur un rôle du fer dans ce sous-compartiment du noyau n'est disponible. Certaines protéines nucléolaires sont susceptibles de contenir du fer, comme par exemple les histones déacétylases (Dowling et al., 2010) et les hélicases (Wu et Brosh Jr, 2012). Ces protéines sont cependant ubiquitaires chez les animaux dont les nucléoles ne sont pas chargés en fer en conditions normales, donc elles ne justifient pas la présence d'une telle quantité de fer. Une des questions principales est de déterminer si le fer joue un rôle fonctionnel ou bien un rôle structural dans les nucléoles des plantes.

# 2) <u>Résultats</u>

# a) Article publié: The plant cell nucleolus as a hotspot for iron.

Roschzttardtz H, Grillet L, Isaure MP, Conejero G, Ortega R, et al. Plant Cell Nucleolus as a Hot Spot for Iron. The Journal of Biological Chemistry 286: 27863-27866. DOI: 10.1074/jbc.C111.269720. ISSN: 0021-9258

Hannetz Roschzttardtz<sup>a\*</sup>, Louis Grillet<sup>a</sup>, Marie-Pierre Isaure<sup>b</sup>, Geneviève Conéjéro<sup>a</sup>, Richard Ortega<sup>c</sup>, Catherine Curie<sup>a</sup>, Stéphane Mari<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Institut de Biologie Intégrative des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5004), Institut National de la Recherche Agronomique, Université Montpellier II, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, F-34060 Montpellier Cedex 2, France.

<sup>b</sup> Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5254), Université de Pau et des Pays de l'Adour, F-64063 Pau Cedex 9, France

<sup>c</sup> Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5797), Université de Bordeaux, F-33175 Gradignan Cedex, France.

\* current address, University of Wisconsin-Madison, B122 Birge Hall 430 Lincoln Drive Department of Botany Madison, WI 53706 US

Address correspondence to: Stéphane Mari, BPMP Bat 7, place Viala, F-34060, Montpellier; E-mail: mari@supagro.inra.fr

Many central metabolic processes require iron (Fe) as a cofactor and take place in specific subcellular compartments such as the mitochondrion or the chloroplast. Proper Fe allocation in the different organelles is thus critical to maintain cell function and integrity. To study the dynamics of Fe distribution in plant cells, we have sought to identify the different intracellular iron pools by combining three complementary imaging approaches, histochemistry, micro Particle Induced X-ray Emission (µPIXE) and synchrotron radiation micro X-Ray Fluorescence (µXRF). Pea (*Pisum sativum*) embryo was used as a model in this study because of its large cells size and high iron content. Histochemical staining with Ferro cyanide and diaminobenzidine (Perls/DAB) strongly labeled a unique structure in each cell, which co-labeled with the DNA fluorescent stain DAPI, thus corresponding to the nucleus. The unexpected presence of Fe in the nucleus was confirmed by elemental imaging using µPIXE. X-Ray Fluorescence on cryo-sectioned embryos further established that, quantitatively, the Fe concentration found in the nucleus was higher than in the expected Ferich organelles such as plastids or vacuoles. Moreover, within the nucleus, iron was particularly accumulated in a sub-compartment that was identified as the nucleolus as it was shown to transiently disassemble during cell division. Taken together, our data uncover an as yet unidentified though abundant iron pool in the cell, which is located in the nuclei of healthy, actively dividing, plant tissues. This result paves the way for the discovery of a novel cellular function for Fe related to nucleus/nucleolus-associated processes.

Metal ions play multiple structural and catalytic functions in living cells. Iron (Fe) is among the most important essential metals since it serves as a cofactor in many metabolic processes like respiration, photosynthesis, cell division, fatty acids and branched amino acid biosynthesis. Most of these reactions take place in intracellular organelles that represent as many sinks for Fe. The subcellular distribution of Fe and its dynamics between compartments is scarcely documented and relies mostly on fragmented biochemical estimations. For instance, with a complete electron transfer chain containing 22 Fe atoms, chloroplasts are considered as obvious sites of high Fe accumulation in plant cells (1). In animal cells, mitochondria and lysosomes, in particular those involved in autophagic degradation of Ferich macromolecules, are expected to contain rather high concentrations of iron as well (2). Because iron can react with oxygen and generate oxidative stress, living cells prevent both Fepromoted toxicity and Fe shortage by maintaining a strict balance between transport, storage and recycling of Fe in each compartment. The deregulation of Fe compartmentalization is

very often associated, in animal systems, with neurodegenerative pathologies. For example, mutations of the mitochondrial protein frataxin result in increased Fe accumulation as well as altered iron-sulfur cluster assembly in mitochondria, causing a human disease called Friedreich's ataxia (3,4). Likewise, the etiology of Alzheimer's and Parkinson's diseases is associated with the accumulation of Fe deposits in specific regions of the brain (5). In the model plant species Arabidopsis thaliana, the alteration of Fe distribution in two important organelles, the chloroplast and the vacuole, severely impacts plant growth. Indeed, the disruption of the FRO7 gene, encoding a ferric reductase located at the chloroplast surface, results in decreased chloroplastic Fe accumulation, severe leaf chlorosis and impaired growth on Fe-limited soils (6). In addition, the vacuoles were identified as the main storage site of Fe in mature Arabidopsis embryos (7). During embryo development, Fe loading into these vacuoles is mediated by VIT1, a Fe/Mn tonoplastic transporter (8), whereas the remobilization of this vacuolar Fe pool during early germination requires the efflux activity of the two cation metal transporters NRAMP3 and NRAMP4 (7,9). Abolition of vacuolar influx in a vit1 mutant or efflux in an nramp3 nramp4 double mutant similarly impairs postgerminative growth under Fe-limited conditions (8,9). Crucial in both studies was having recourse to elemental imaging techniques (synchrotron radiation X-ray fluorescence for the study of VIT1 and energy dispersive X-ray microscopy for NRAMP3 and NRAMP4) to reveal the subtle changes in Fe distribution occurring in seeds of the mutants, not detectable otherwise. These two studies perfectly illustrated the power of combining molecular genetics with sophisticated elemental imaging approaches to unravel the function of several transporters in metal homeostasis.

We have undertaken the analysis of Fe distribution in plant cells using several imaging approaches. In particular, we have utilized the Perls/DAB histochemical staining method that we had previously adapted to plant cells, and which is characterized by a sensitivity and resolution high enough to allow intracellular Fe detection (7).

Here we report on the unexpected finding that the nucleus is also a Fe-rich organelle in plant cells. It is likely that this compartment has been ignored, or at least overlooked, in the past because high spatial resolution Fe distribution has so far been addressed in very few reported studies.

#### **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

Histochemical staining of Fe with the Perls/DAB procedure- Pea embryos were dissected from developing seeds of pea plants (Pisum sativum) grown on pot in greenhouse and irrigated with water. Embryos from pea and leaf fragments from Arabidopsis thaliana and tomato (Lycopsersicum esculentum) were vacuum infiltrated with the fixation solution containing 2% (w/v) paraformaldehyde, 1% (v/v) glutaraldehyde, 1% (w/v) caffeine in 100mM phosphate buffer (pH 7) for 30 minutes and incubated for 15 hours in the same solution. The fixed samples were washed with 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) three times, and dehydrated in successive baths of 50%, 70%, 90%, 95% and 100% Ethanol, butanol/ethanol 1:1 (v/v) and 100% butanol. Then, the tissues were embedded in the Technovit 7100 resin (Kulzer) according to the manufacturer's instructions and thin sections (5 mm) were made. The sections were deposited on glass slides that were incubated for 45 minutes in Perls stain solution, except for negative controls. After washing with distillated water, the glass slides were incubated in a methanol solution containing 0.01M NaN<sub>3</sub> and 0.3% (v/v)  $H_2O_2$  for 1 hour, and then washed with 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). For the intensification reaction, samples were then incubated between 10 and 30 minutes in a 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) solution containing 0.025% (w/v) DAB (Sigma, St Louis, Mo, USA), 0.005% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.005% (w/v) CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O (intensification solution). Rinsing with distilled water stopped the reaction.

Double staining with Perls/DAB and DAPI- The thin sections were first stained with Perls/DAB, as described above, and then stained with DAPI. The glass slides were incubated in a 2  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (w/v) solution of DAPI for 5 minutes in the dark and rinsed with distilled water. Observations were realized using a Leica DM6000 microscope equipped with an A4 filter (excitation 340-380 nm, emission: 450-490 nm).

*Cryofixation and cryosections of pea embryos*- Embryos, dissected from seeds, were immersed in Optimum Cutting Formulation (OCT, Sakura Finetek, Leiden, Netherlands) and rapidly frozen in liquid nitrogen. The solid blocks obtained were then sectioned (30-40  $\mu$ m thickness) using a cryomicrotome (sample holder was kept at -50°C whereas the sample atmosphere was set at -18°C). The resulting slides were deposited on ultralene films (Spex Certiprep) and kept



**Figure 24:** Plant cells accumulate Fe in the nucleus. Histochemical analysis of pea embryonic cells (a-d), *Arabidopsis thaliana* (i) and tomato leaf mesophyll cells (j). Elemental imaging (e-h) was performed on sections of pea embryos embedded in resin. (a) Negative control of the Perls/DAB staining where the first reaction with potassium ferrocyanide was omitted, (b) Perls/DAB staining of Fe, (c) DAPI-stained nuclei revealed by epifluorescence (from control section showed in panel a), (d) merge of Perls/DAB and DAPI reactions, (e-f) bright field microscopy of unstained cells, (g-h) µPIXE analysis of the same sections with Fe imaging in green, phosphorus in red (panel g and h, respectively). Samples were scanned with a 3.0 MeV proton beam focused to 1 µm size and measuring the X-rays emitted at 6.4 keV for Fe and 2.0 KeV for phosphorus. Bar = 40 µm for panels a to d, bar = 20 µm for panels e to h.

in liquid nitrogen until introduced in the analysis chamber of the LUCIA synchrotron beamline.

#### RESULTS

The pea (*Pisum sativum*) embryo was chosen as plant material in this work for several reasons: (*i*) its high Fe content (200-400 ppm) that is above the detection threshold of elemental imaging techniques ( $\mu$ PIXE and  $\mu$ XRF), (*ii*) the large size of its cells and organelles that facilitates imaging analyses, (*iii*) the fact that, together with other legume seeds, it represents a widespread staple food for human, which makes it an excellent target for biotechnological engineering of seed nutritional quality.

In a first approach, pea embryos were dissected from developing seeds and stained with Perls/DAB. Pea embryonic cells exhibited a strongly stained structure (Fig. 24 b), invisible in control sections without Perls (Fig. 24 a), which resembled a nucleus (Fig. 24 a). The nuclear identity of this compartment was confirmed by counterstaining the histological sections with DAPI (Fig. 24 c-d). Although we had previously established that the Perls/DAB technique is specific for Fe, we sought to confirm this result with an elemental imaging approach. Unstained histological sections were thus analyzed by micro Particle Induced X-ray Emission (PIXE) using a proton beam of 1  $\mu$ m diameter at the AIFIRA facility (10). As expected, whenever a nucleus could be identified by light microscopy (Fig. 24 e-f), the  $\mu$ PIXE imaging analysis revealed the presence of high concentrations of Fe (Fig. 24 g-h), confirming the existence of a pool of Fe in the nucleus. This observation is not a particular feature of pea embryos, since in leaf cells from *Arabidopsis thaliana* and tomato the nuclei were also strongly stained with Perls/DAB (Fig. 24 i and j, respectively).

To rule out the possibility that this Fe distribution was somehow caused by sample processing for histological analyses, we then performed synchrotron radiation micro X-Ray Fluorescence ( $\mu$ XRF) on cryofixed and cryosectioned pea embryos. The cryosections were kept in liquid nitrogen until the introduction in the beamline chamber and the following analyses were performed in cryogenic conditions (130K) to maintain the cellular and chemical integrity throughout the process of elemental mapping. The average size of a pea embryonic cell, its vacuole and its nucleus are respectively, 60-70  $\mu$ m, 40-50  $\mu$ m and 15  $\mu$ m. Given that the lateral resolution of the synchrotron beam utilized is 2.5  $\mu$ m x 3.5  $\mu$ m, we could analyze zones of 100  $\mu$ m x100  $\mu$ m and obtain elemental mapping within compartments of a whole cell. The



<u>Figure 25:</u> elemental  $\mu$ XRF mapping on cryosections of pea embryos. (a) Mapping of K, (b) mapping of Fe, (c) pea cell from resin embedded embryo, stained with Perls/DAB and Schiff to reveal Fe and carbohydrates, respectively, (d) merge of K (red) and Fe (green) signals (e) Fe fluorescence intensity with modified fluorescence levels to reveal minor pools of Fe, (f) merge of K fluorescence (red) with the re-adjusted Fe fluorescence from (e). The synchrotron beam (size: 2.5 x 3.5  $\mu$ m) was set at 7200 eV. Bar = 10  $\mu$ m. n, nucleus, vac, vacuole, p, plastids.

mapping of potassium (K) was used as a canvas to locate the vacuolar compartment, where most of K is stored and thus depict cell-to-cell limits and focus on a single cell (Fig. 25 a). Iron detection showed a strong 20  $\mu$ m x 10  $\mu$ m signal (Fig. 25 b), a size that is compatible with that of the nucleus, clearly visible on an histological section of a comparable cell (Fig. 25 c). Merging both Fe and K maps clearly showed that the Fe-rich zones are adjacent to the Krich vacuolar structures (Fig. 25 d), which again is consistent with Fe being located in the nucleus. By increasing the fluorescence scale so as to saturate the nuclear signal, several other pools of Fe appeared in the cell periphery and in the vacuole (Fig. 25 e,f). Taken together, these results clearly establish that, besides the usual organelles, the nucleus represents a novel site of massive Fe accumulation in the cell.

A detailed observation of the Perls/DAB stained-Fe pool within the nucleus indicated that it is restricted to a sub-nuclear domain (Fig. 26 a, see also Fig 24d) that is reminiscent in size and shape to the nucleolus. Since one of the features of the nucleolus is its disorganization during mitosis, we followed the fate of the Perls/DAB-stained nuclear structure during the different stages of cell division, easily identified in pea embryo histological sections stained with DAPI (Fig. 26 i-n). Clearly, the Fe-rich structures, still visible during interphase (Fig. 26 c, i, o) and prophase (Fig. 26 d, j, p), disappeared from metaphase to telophase (Fig. 26 e, f, g, k, l, m, q, r, s), re-appearing in the daughter nuclei at the interphase stage (Fig. 26 h, n, t). This observation unambiguously identifies the nucleolus as the Fe-rich structure in pea cell nuclei. Consistently, fine mapping of the nucleus by  $\mu$ XRF showed that on a section representing a 20  $\mu$ m x 10  $\mu$ m large nucleus, Fe concentration is highest in a 5  $\mu$ m x 5  $\mu$ m sector, a size that is compatible with the measured size of the nucleolus in pea embryo cells (Fig. 26 a-b).

#### DISCUSSION

The analysis of sub-cellular Fe localization by histochemistry (Perls/DAB) and elemental microanalyses ( $\mu$ PIXE and  $\mu$ XRF) has established without doubt that the nucleus contains detectable amounts of Fe. This finding was not restricted to pea, since strong nuclear Fe staining was also observed in leaves of other species such as *Arabidopsis thaliana* and tomato (Fig. 24 i-j). Furthermore, we have shown that within the nucleus, the iron concentration in the nucleolus is the highest encountered among the intracellular compartments. This result is novel and completely unexpected. Indeed, the accumulation of a highly reactive and



**Figure 26:** Fe specific accumulation in the nucleolus. (a) Close-up view of a nucleus from a Perls/DAB and Schiff stained embryonic cell, (b) fine  $\mu$ XRF Fe mapping of a nucleus, (c-t) Perls/DAB and DAPI co-staining of embryonic cells at the different stages of mitosis, (c-h) bright field microscopy, (i-n) UV microscopy of the same sections to reveal DAPI epifluorescence, (o-t) merge of both signals. Bar = 10 µm.

potentially toxic metal in the very close vicinity of DNA and RNA is rather counter-intuitive. In mammals, the nuclei of healthy cells barely contains detectable amounts of Fe (11)·(12)·(13)·(14), Fe being located mainly in the cytoplasm, whereas strong Fe accumulations in nuclei has only been reported in neurodegenerative tissues, such as in cerebral cortex neurons with neuroferritinopathy (15,16) or in hippocampal glial cells from Alzheimer's disease (17,18). Therefore our findings challenge the widely admitted idea that in animals, the presence of Fe in nuclei is a sign of disease.

Our finding raises the important question of the role that nucleolar Fe plays in plant cells. If the nucleolus requires such high amounts of Fe, it is conceivable that Fe atoms might be associated to a very abundant class of molecules. Since the main function of the nucleolus is to synthesize ribosomal RNA, it is tempting to speculate that Fe is somehow involved in the metabolism of rRNA. Moreover, since it is difficult to conceive that such a high amount of Fe corresponds to the cofactor of a specific enzyme, a possibility exists that Fe in the nucleolus might be directly bound to rRNA. Consistent with this hypothesis, rRNA has been shown to bind high amounts of Fe, both *in vitro* (17,19) and *in vivo* (17). It is thus possible that in plants, Fe is required during ribosomal RNA biosynthesis in the nucleolus, either by promoting or stabilizing the secondary structure, or by catalyzing maturation of the different rRNA subunits.

Taken together, our data have revealed a new intracellular site where high amounts of Fe atoms are needed, for a function that remains to be identified. Consequently, this finding should lead to reconsider the overall scheme of Fe requirements and distribution at the intracellular level in plant cells, including from now on the nucleolus as a new player. This work has clearly illustrated that healthy cells can accumulate and tolerate high amounts of Fe in their nucleus without being a sign of a particular dysfunction. This peculiar feature of plant nuclei could reflect the fact that iron plays a plant-specific function. Plant cells must have evolved highly efficient mechanisms, still unidentified, to protect the nucleus from the potential deleterious effects of Fe.

#### REFERENCES

<sup>1.</sup> Wollman, F. A., Minai, L., and Nechushtai, R. (1999) *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1411, 21-85

- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., and Brunk, U. (2008) *Histochem. Cell Biol.* 129, 389-406
- 3. Gordon, N. (2000) Brain & Development 22, 465-468
- 4. Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., and Lill, R. (2002) *Human Molecular Genetics* **11**, 2025-2036
- Zecca, L., Youdim, M. B. H., Riederer, P., Connor, J. R., and Crichton, R. R. (2004) *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 863-873
- Jeong, J., Cohu, C., Kerkeb, L., Pilon, M., Connolly, E. L., and Guerinot, M. L. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 10619-10624
- 7. Roschzttardtz, H., Conejero, G., Curie, C., and Mari, S. (2009) *Plant Physiol.* 151, 1329-1338
- 8. Kim, S. A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, L., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Kaplan, J., and Guerinot, M. L. (2006) *Science* **314**, 1295-1298
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S. (2005) *EMBO J* 24, 4041-4051
- Carmona, A., Deves, G., and Ortega, R. (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 1585-1594
- Carmona, A., Cloetens, P., Deves, G., Bohic, S., and Ortega, R. (2008) Journal of Analytical Atomic Spectrometry 23, 1083-1088
- 12. Matsuyama, S., Shimura, M., Fujii, M., Maeshima, K., Yumoto, H., Mimura, H., Sano, Y., Yabashi, M., Nishino, Y., Tamasaku, K., Ishizaka, Y., Ishikawa, T., and Yamauchi, K. (2010) *X-Ray Spectrometry* **39**, 260-266
- 13. Ortega, R., Cloetens, P., Deves, G., Carmona, A., and Bohic, S. (2007) *PLoS ONE* 2, e925
- Witting, P. K., Harris, H. H., Rayner, B. S., Aitken, J. B., Dillon, C. T., Stocker, R., Lai, B., Cai, Z., and Lay, P. A. (2006) *Biochemistry* 45, 12500-12509
- 15. Schroder, J. M. (2005) Acta Neuropathologica 109, 109-114
- Vidal, R., Miravalle, L., Gao, X. Y., Barbeito, A. G., Baraibar, M. A., Hekmatyar, S. K., Widel, M., Bansal, N., Delisle, M. B., and Ghetti, B. (2008) *Journal of Neuroscience* 28, 60-67
- 17. Honda, K., Smith, M. A., Zhu, X. W., Baus, D., Merrick, W. C., Tartakoff, A. M., Hattier, T., Harris, P. L., Siedlak, S. L., Fujioka, H., Liu, Q., Moreira, P. I., Miller,

F. P., Nunomura, A., Shimohama, S., and Perry, G. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 20978-20986

- 18. Quintana, C., Bellefqih, S., Laval, J. Y., Guerquin-Kern, J. L., Wu, T. D., Avila, J., Ferrer, I., Arranz, R., and Patino, C. (2006) *Journal of Structural Biology* **153**, 42-54
- 19. Berens, C., Streicher, B., Schroeder, R., and Hillen, W. (1998) Chem. Biol. 5, 163-175

## FOOTNOTES

We thank SOLEIL synchrotron for provision of beamtime (project n° 20100264) as well as Nicolas Trcera, Pierre Lagarde and Anne-Marie Flank from LUCIA beam line for their unconditional help and support.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, l'Institut National de la Recherche Agronomique and by grants n° 23643 (CIDS) and n° 07-3-18-8-87 (DISTRIMET) from the Agence Nationale pour la Recherche. The work of H. R. is supported by a postdoctoral fellowship from the Agence Nationale pour la Recherche (program 07-3-18-8-87 DISTRIMET).



Figure 27: Spectre d'absorption des rayons X (micro-XANES et micro-EXAFS) de noyaux d'embryons de pois et de standard de différentes espèces chimiques de fer. La partie XANES du spectre donne des informations sur le statut redox du fer, et la partie EXAFS donne des informations sur les plus proches atomes.

## b) Etude du pool de fer nucléolaire

## i) Spectrométrie d'absorption des rayons X

Les cryo-coupes d'embryons de pois DGV, cartographiées par SR-µXRF afin de localiser les zones riches en fer. Ces zones, correspondants aux noyaux des cellules ont été analysées par EXAFS. Les spectres d'absorption des rayons X de différents standards ainsi que des noyaux sont présentés figure 27.

Dans la partie XANES du spectre, avant le seuil d'absorption, on remarque la présence d'un pré-seuil dans le spectre des noyaux. Ce pré-seuil n'est présent que pour certains des complexes standard analysés: Fe(III)-histidine, Fe(II)-citrate et Fe(III)-citrate. Dans les autres spectres, ce pré-seuil est soit absent, soit beaucoup moins intense.

Ensuite, on remarque que le seuil est différent pour le Fe(II) et le Fe(III). En effet, l'énergie de transition de l'électron éjecté est différente de quelques eV pour ces deux états rédox. Ainsi, sur ces spectres, le seuil d'absorption des standards contenant du Fe(II) se situe autour de 7127 eV alors celui des standards contenant du Fe(III) se situe autour de 7133 eV. Pour le spectre des noyaux, le seuil se situe à 7130 eV, ce qui signifie que les noyaux analysés contiennent un mélange de Fe(II) et de Fe(III), et que ces deux formes sont présentes dans des proportions équivalentes.

La partie EXAFS du spectre est toujours en cours d'analyse et permettra éventuellement de déterminer l'identité des plus proches atomes voisins du fer ainsi que leur distance.

## ii) Microscopie et spectroscopie infra-rouge

### (1) Présentation des échantillons

Les embryons analysés provenaient soit de pois sauvages (DGV), soit de mutants accumulateurs de fer (*dgl*), supplémentées (+fer) ou non (-fer) en fer. La quantité de fer a été mesurée dans les graines sèches de chacune de ces plantes (Cf. Figure 28). Les graines contenaient respectivement 56 ( $\pm$  3,2), 80 ( $\pm$  3,2), 136,6 ( $\pm$  11,9) et 172,9 ( $\pm$  30,2) µg Fe .g<sup>-1</sup>, pour les plantes de DGV -Fe, celles de DGV +Fe, puis de *dgl* -Fe et *dgl* +Fe. Les plantes mutantes, arrosées une fois avec du Fe-EDDHA (i.e. *dgl* +Fe), présentaient les symptômes de toxicité caractéristiques de la toxicité du fer déjà décrits dans cette lignée (Kneen et al., 1990). Conformément aux informations disponibles dans la littérature (Becker et al., 1998), les



Figure 28: Quantification du fer dans les graines sèches de plantes de pois sauvages (DGV) et mutantes (dgl) arrosés à l'eau déminéralisée (-Fe) ou arrosés une fois avec du fer.



<u>Figure 29</u>: Coloration histochimique du fer (Perls-DAB) dans des coupes d'embryons dépraffinées de pois sauvage DGV (A et B) et mutant dgl (C et D) cultivés sans fer ajouté (A et C) et avec du fer (B et D). Le fer est principalement localisé dans les noyaux (N) et dans les plastes (P). Le marquage est particulièrement fort dans les embryons de dgl qui accumulent de grandes quantités de fer.

graines de ce mutant contenaient au moins deux fois plus de fer que les graines de la lignée sauvage dans les deux conditions testées.

La coloration histochimique du fer dans les coupes de ces embryons (Cf. Figure 29) montre une nette différence de marquage des noyaux entre les échantillons de plantes sauvages qui sont assez peu marqués, et ceux des plantes mutantes qui sont très fortement colorés. On observe également de nombreux points concentrés en fer dans les plastes du mutant.

#### (2) Interprétation des spectres d'absorption

Les coupes déparaffinées d'embryons ont été analysées par FTIR. Des acides nucléiques purifiés et préalablement déposés sur une cellule en fluorure de baryum ont également été analysés. Les spectres d'absorption moyens dans la région entre 900 et 1800 cm<sup>-1</sup> obtenus sur les plastes et les acides nucléiques sont présentés dans les figures 30 et 31 respectivement. Les spectres obtenus sur les noyaux sont toujours en cours d'analyse. Ces spectres permettent d'avoir une vue d'ensemble de la composition des échantillons analysés car chaque liaison chimique possède un spectre d'absorption spécifique.

Le massif entre 900 et 1200 cm<sup>-1</sup> correspond à des liaisons C-O, C-O-C, C-C, C-N, S-O, P-H et P=O. Ces régions sont assez spécifiques des sucres et des liaisons phosphodiester des acides nucléiques (Dovbeshko et al., 2000, Mourant et al., 2003 ; Taillandier et Liquier, 1992).

La région entre 1300 et 1500 cm<sup>-1</sup> correspond à la zone d'absorption des liaisons C-O, C-H, N-H, C-O-H, C=C et C-H. Cette région est spécifique des sucres et des désoxyribonucléotides (Taillandier et Liquier, 1992; Dovbeshko et al., 2000).

Le massif de pics entre 1500 et 1600 cm<sup>-1</sup> correspond aux liaisons C=O, N-O (cycles aliphatiques ou aromatiques), N-H (amines et amides) et C=C. Elle est assez spécifique des amines et des amides. Le massif entre 1600 et 1700 cm<sup>-1</sup> correspond à des liaisons C=O, N-H, C=C, C=N. Cette région est donc plutôt spécifique des composés protéiques (Dovbeshko et al., 2000; Mourant et al., 2003).

Les spectres bruts donnent donc une vision globale de la composition chimique, indiquant, dans notre cas, que les plastes analysés contiennent principalement des protéines et des sucres. L'analyse a révélé des différences d'absorption entre des plastes et des acides nucléiques provenant d'embryons de plantes avec des statuts nutritifs en fer variés.



<u>Figure 30:</u> Spectres d'absorption infrarouge de plastes de cellules embryonnaires de pois sauvage (DGV) et mutant (*dgl*) obtenus par microscopie FT-IR. Les plantes ont été arrosées à l'eau de ville (DGV et *dgl*), ou avec du Fe-EDDHA (DGV +Fe et *dgl* +Fe).
Les différences observées doivent être interprétées avec précaution. En effet, une absorption moindre, à une longueur d'onde donnée peut signifier que les liaisons correspondant à cette longueur d'onde sont moins représentées. Mais cela peut aussi refléter une différence d'environnement chimique de ces liaisons qui est moins favorable à leur excitation, et donc aboutir à une absorption moindre malgré une abondance identique.

#### (3) Spectres de plastes in situ

Les spectres de plastes (Cf. Figure 30) correspondent aux spectres moyens acquis sur une vingtaine de plastes par échantillon. Dans la région du spectre de 900 à 1200 cm<sup>-1</sup>, on distingue clairement trois pics. Le premier est assez large est son maximum est situé à 1025 cm<sup>-1</sup>, et les deux autres sont plus pointus et situés respectivement à 1075 et 1150 cm<sup>-1</sup>. Les échantillons avec les absorbances les plus importantes au niveau de ces trois zones étaient par ordre décroissant: dgl +fer, dgl -fer, DGV +fer et DGV -fer. On observe également deux autres pics: un entre 1475 à 1575 cm<sup>-1</sup>, et un autre à 1650 cm<sup>-1</sup>.

Le massif de pic entre 900 et 1200 cm<sup>-1</sup> est très similaire pour les quatre échantillons: les pics sont observés aux mêmes longueurs d'ondes. En revanche, le profil du spectre de DGV cultivé sans fer est différent de ceux des autres échantillons au niveau des deux pics entre 1475 et 1650 cm<sup>-1</sup>. Dans les plastes de ces embryons, l'absorbance dans ces régions du spectre est beaucoup plus faible.

Dans le spectre des plastes d'embryons de DGV cultivés sans fer, les pics correspondants aux liaisons amides et amines sont moins intenses que dans les spectres des autres échantillons. La sous-représentation des liaisons amides peut être interprétée comme une concentration en protéines et ADN plus faible dans ces plastes. Dans les plastes d'embryons de DGV supplémentés en fer, ces pics sont beaucoup plus intenses, ce qui peut signifier que ces plastes contiennent beaucoup plus de ces composés. L'absorption dans ces mêmes régions du spectre est également importante dans les plastes d'embryons de *dgl*, indépendamment de leur nutrition en fer.

Or, chez les plantes sauvages, en absence d'un apport de fer, cet élément est détectable seulement dans les noyaux des cellules (Roschzttardtz et al., 2011). Un apport de fer a pour effet d'augmenter la concentration intracellulaire et de provoquer le chargement de fer dans les plastes. Cette accumulation de fer dans les plastes est accompagnée d'une accumulation de



<u>Figure 31</u>: Spectres d'absorption infrarouge des ADN et ARN extraits de pois sauvage (DGV) et mutant (dgl).

ferritines dans ce même compartiment. Chez le mutant *dgl*, cette accumulation de fer et de ferritines dans les plastes est constitutive (Becker et al., 1998).

L'absence presque totale des vibrations de liaisons amides dans les plastes de DGV non supplémenté en fer peut être interprétée comme une absence de ferritine. A l'inverse, la présence importante de ces liaisons dans les autres échantillons peut être expliquée par une accumulation de ferritines dans leurs plastes, qui est induite par une quantité de fer intracellulaire plus importante. L'accumulation de ferritines induite par le fer est très documentée et elle est attendue, il est donc très vraisemblable dans ce cas que la différence d'absorption soit le résultats d'une quantité de ferritines moins importante dans les plastes de DGV en -Fe.

Dans la zone du spectre plus spécifique des sucres, entre 900 et 1175 cm<sup>-1</sup>, les plastes de DGV sans fer ont également une absorbance moindre, ce qui peut signifier que la quantité de sucres et d'amidon est plus faible dans ces plastes que dans les autres échantillons. Mais ces résultats doivent être relativisé car cette différence spectrale peut également résulter non pas de l'accumulation de ferritines induite par le fer dans les cellules chargées en fer (i.e. DGV + fer, dgl et dgl +fer), ou d'une quantité moindre de sucres dans les plastes de DGV, mais plutôt d'une excitation plus faible ou plus forte des liaisons en l'absence de fer.

#### (4) Spectres d'acides nucléiques purifiés

Les spectres d'acides nucléiques de DGV et *dgl* (Cf. Figure 31), ont des profils assez différents des spectres acquis sur les plastes. Dans les deux cas, on distingue cinq pics d'absorption majoritaires : à 1650 ± 100 cm<sup>-1</sup>, 1525 cm<sup>-1</sup>, 1400 cm<sup>-1</sup>, 1235 cm<sup>-1</sup> et 1075 cm<sup>-1</sup>. Les acides nucléiques de DGV absorbent beaucoup plus que les acides nucléiques de *dgl* au niveau des pics à 1650, 1525 et 1325 cm<sup>-1</sup>. Leur absorption est un peu plus faible au niveau du pic à 1075.

Les spectres des acides nucléiques de DGV et *dgl* correspondent bien aux spectres d'ADN et ARN observés dans d'autres études. On retrouve bien les pics décrits par Taillandier et Liquier (1992), ainsi que par Dovbeshko et al. (2000) sur des acides nucléiques de rats.

Les spectres d'acides nucléiques de DGV et *dgl* sont très différents : ceux de DGV absorbent beaucoup moins dans les zones des liaisons amides et amines, ainsi que dans la zone des



<u>Figure 32</u>: Effet de la nutrition en fer sur l'expression des gènes de nucléolines (NUC1 et NUC2) et sur les variants d'ARNr 45S (ARNr var), mesurés par RT-PCR. Les plantules ont été cultivées in vitro avec 50  $\mu$ M de Fe-citrate ou sans fer et avec 30  $\mu$ M de Ferrozine. Les ARN ont été extraits de plantules entières (+FER et -FER) ou seulement des parties aériennes (S+FER et S-FER).

liaisons phosphate. Cela indique clairement que leurs conformations ou leur environnement chimique (protéines ou hydrates de carbones présents dans les extraits) sont également différents. Or, on sait que le fer est susceptible d'endommager les acides nucléiques. Il est donc très vraisemblable que les acides nucléiques d'un mutant qui accumule du fer tel que *dgl*, présentent des signes de dégradation. La nature exacte de ces dégâts n'est pas élucidée.

#### (5) Conclusions sur les spectres d'absorption de l'infrarouge

L'influence du fer sur les spectres d'absorption est très différente dans les plastes ou dans les acides nucléiques. En effet, dans la région du spectre située entre 1600 et 1700 cm<sup>-1</sup>, l'augmentation de l'absorption de l'infrarouge est corrélée avec une quantité de fer plus importante dans les plastes, alors que dans les acides nucléiques, c'est une diminution de cette absorption qui est corrélée avec l'augmentation de la quantité de fer. De plus, la très forte différence entre DGV et *dgl* dans cette zone pour les acides nucléiques purifiés, nous permet de conclure que le fer a une influence directe sur leur conformation ou leur environnement chimique. Il est maintenant nécessaire de confirmer si cet effet du fer sur les acides nucléiques est également visible sur spectres de noyaux *in situ*.

Cette approche a permis de mettre en évidence plusieurs effets physiologiques du fer à l'échelle subcellulaire, mais elle n'a cependant pas généré d'informations nouvelles sur la nature et la fonction du pool de fer nucléolaire.

#### iii) Approche physiologique

Cette approche est encore à l'état préliminaire, et fait l'objet d'une demande de financement au programme blanc de l'Agence National de la Recherche (ANR).

Les expériences préliminaires ont été menées sur des tissus jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana* avec des statuts nutritionnels en fer variés. L'effet de la nutrition en fer sur la maturation de l'ARNr 45S ainsi que sur l'expression des deux gènes de nucléolines ont été étudiés (Cf. Figure 32). Le niveau d'expression a été déterminé par RT-PCR semiquantitative. Le gène de ménage utilisé était le gène codant le facteur d'élongation EF1 $\alpha$ .

En condition de nutrition en fer normale, l'expression de NUC1 est légèrement plus forte dans les feuilles que dans les plantules entières, et l'expression de NUC2 est à l'inverse plus importante dans les plantules entières que dans les feuilles, en comparaison avec le niveau d'expression de EF1 $\alpha$ . NUC1 est globalement beaucoup plus exprimé que NUC2.

L'expression de NUC1 est très légèrement supérieure en condition de carence par rapport aux conditions normales, et l'expression de NUC2 est nettement plus forte dans les plantules ayant subi une carence en fer, aussi bien dans les feuilles que dans les plantules. Les profils d'ARNr 45S sont assez comparables dans les deux types de tissus et les deux conditions de culture utilisées. La quantité d'ARNr 45S semble légèrement plus faible dans les feuilles que dans les plantules entières.

### 3) Discussion

Grâce à une technique de coloration histochimique du fer récemment mise au point (Roschzttardtz et al., 2009), nous avons découvert la présence de concentrations importantes de fer dans les noyaux de cellules d'embryons de pois, et de cellules de mésophylle d'*Arabidopsis thaliana* et de *Lycopersicum esculentum*. Compte tenu de la réactivité du fer vis à vis des acides nucléiques, et de sa potentielle génotoxicité, ce résultat était très inattendu. De plus, aucune des études concernant la localisation intracellulaire du fer n'avait décrit une quantité de fer aussi importante dans les noyaux de cellules saines (Ortega et al., 2007; Carmona et al., 2008; Kim et al., 2006). En revanche, l'accumulation de fer dans les noyaux de neurones atteints de la maladie d'Alzheimer a été rapportée (Honda et al., 2005).

La technique de coloration histochimique du fer est potentiellement critiquable. Elle est appliquée à des tissus fixés et déshydratés, et ces traitements peuvent changer la localisation de certains éléments. Dans cette étude, c'est le cas notamment du potassium, qui est localisé autour des cellules dans les tissus inclus en résine (Cf. Figure 24 g,h), et dans les vacuoles pour les tissus cryofixés (Cf. Figure 25 a,d,f). De plus, cette technique est basée sur une réaction d'oxydo-réduction, elle est donc susceptible de favoriser le marquage de formes de fer plus réactives que d'autres. Nous avons donc confirmé cette localisation dans les cellules d'embryons de pois avec deux autres techniques d'imagerie élémentaire, afin de s'affranchir de ces deux limites. Les images obtenues par µPIXE certifient la présence de fer dans les noyaux, avec une très bonne résolution. Les cartographies SR-µXRF de coupes cryofixés attestent de la présence de ce pool de fer dans des cellules intactes.

L'observation plus approfondie de la distribution du fer a indiquée que sa concentration est hétérogène à l'intérieur des noyaux. Cet élément est effectivement très concentré en un point situé à l'intérieur du noyau, similaire au nucléole en taille et en forme. Sur des coupes histochimiques, le marquage simultané du fer par Perls-DAB, et des noyaux avec du DAPI, a

permis de visualiser la distribution du fer à différentes étapes du cycle cellulaire. Le fer, dont la présence est clairement visible dans les noyaux pendant l'interphase, est indétectable dans les noyaux de cellules en métaphase, anaphase et télophase. La disparition du pool de fer des noyaux est donc concomitante avec la désorganisation du nucléole (Saez-Vasquez et al., 2008). Nous avons conclu que le fer est principalement localisé dans les nucléoles.

Ce résultat inattendu a soulevé un grand nombre de questions:

- Quel est la fonction biologique de ce pool de fer? Le fer est-il impliqué dans la structuration du nucléole ou bien possède-t-il un rôle fonctionnel?

Afin de parvenir au nucléole, le fer doit traverser le nucléoplasme et ensuite y être maintenu.
Comment s'effectue ce transport?

- Afin de prévenir les réactions non souhaitables avec les acides nucléiques, l'acheminement doit être très contrôlé. Sous quelle forme est le fer? A quelle molécule est-il lié?

Nous avons tenté d'apporter des éléments de réponses par différentes approches discutées dans les paragraphes suivants.

Connaitre la spéciation du fer dans les noyaux permettrait certainement de mieux appréhender sa fonction dans ce compartiment cellulaire. L'EXAFS est un bon moyen d'analyser la spéciation directement dans les tissus cryofixés. Dans le cas ou les noyaux contiendraient un petit nombre d'espèces chimiques de fer, l'identification serait possible, car le spectre d'un mélange de complexes correspondra à la somme des spectres des différents complexes. L'identification se fait donc par comparaison avec des spectres de complexes isolés, elle nécessite donc des informations a priori, permettant de choisir les standards appropriés.

Dans le cas présent, la partie XANES du spectre d'absorption révèle que le fer du noyau se trouve dans deux états rédox différents: la forme réduite et la forme oxydée, ce qui indique déjà la présence de plusieurs espèces chimiques. De plus, la partie EXAFS du spectre ne correspond à aucun standard, ce qui signifie que les modes de coordination du fer sont multiples dans les zones analysées.

On sait que le nucléole est une structure nucléoprotéique, qui contient donc principalement des acides nucléiques et des protéines. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que dans le noyau, le fer est associé soit à des acides nucléiques, soit à des protéines.

Les différents types de coordination du fer dans les protéines sont présentés dans l'introduction (Chapitre I.3.a): les hèmes, les clusters fer-soufre, et les coordinations directes par des acides aminés. Selon le type de coordination, les atomes voisins du fer sont différents:

- dans les hèmes, le fer est entouré de quatre atomes d'azote

- dans les clusters fer-soufre, les plus proches atomes voisins sont deux atomes de soufre, et parfois un ou deux autres atomes de fer.

- le cas des coordinations directes du fer est assez complexe car les acides aminés impliqués ne sont pas systématiquement les mêmes. Donc tous les exemples de coordination de ce type sont des cas particuliers. Cependant, elles impliquent toujours des résidus histidine comme dans les exemples bien connus de la lactoferrine et de la transferrine (Steczko et Axelrod, 1992; Peterson et al., 2000; Lambert et al., 2005; Dowling et al., 2010).

Il nous a donc paru pertinent d'analyser du sulfure et du sulfate de fer (respectivement FeS et FeSO<sub>4</sub>), qui devraient produire des spectres d'absorption similaires à un fer coordonné dans un cluster fer-soufre, ainsi que du Fe(III)-histidine, qui devrait être représentatif des coordinations par l'azote.

Pour conclure, ces analyses ont montré que dans ces noyaux, le fer est présent dans deux états rédox différents, et coordonné de multiples manières. L'absence d'une forme majoritaire rend difficile l'identification et la quantification précise de chaque type de coordination. En effet, le spectre observé correspond à la somme des spectres des composés présents dans l'analyte, donc dans le cas de mélanges complexes, plusieurs combinaisons linéaires sont possibles pour représenter au mieux le spectre final. Les spectres théoriques correspondant à différentes proportions de chaque standard sont générés puis comparés au spectre expérimental. Les résultats sont donc exprimés en terme de proportion de chaque élément voisin de l'atome de fer, aboutissant au spectre théorique qui maximise la corrélation avec le spectre observé. Plus il existe de combinaisons possibles, et moins les prédictions sont fiables. Il est de plus possible que certains types de coordination ne soient pas représentés dans les standards.

# 4) Perspectives

L'analyse de spéciation a révélé la présence de multiples formes de fer dans les noyaux, aussi bien en terme d'état rédox que de coordination. Cette variété d'espèces chimiques a rendu impossible l'identification des macromolécules majoritaires auxquelles le fer est lié.

La fixation du fer sur les acides nucléiques est improbable en conditions normales, du fait de sa potentielle génotoxicité, et les spectres EXAFS de noyaux ne correspondent pas aux spectres de complexes fer-acides nucléiques reconstitués *in vitro*. L'interaction entre le fer et les acides nucléiques est cependant vraisemblable dans le cas d'excès de fer, qui provoque le

chargement du fer dans les plastes. Cette redirection du fer est contrôlée par des mécanismes de signalisation, et il est possible d'imaginer que la perception de l'excès de fer a lieu directement dans le noyau.

Il devient alors évident qu'une grande proportion de ce fer est liée à des protéines et la littérature rapportant la présence de nombreuses protéines à fer dans le nucléole est très fournie. L'étude de standards plus représentatifs des molécules nucléolaires, tels que des protéines à fer purifiées, permettrait certainement d'améliorer les résultats de cette analyse de spéciation. Cependant, l'EXAFS requiert une concentration en fer de l'ordre du millimolaire pour produire des résultats exploitables, dans le cas de protéines contenant un petit nombre d'atomes de fer, l'analyse nécessiterait des quantités énormes de protéines purifiées. Un traitement mathématique plus approfondi des spectres d'absorption des rayons X, permettra également d'obtenir des informations plus précises sur la coordination des atomes de fer dans le nucléole.

L'analyse chimique par FT-IR a clairement mis en évidence des variations de l'absorption de l'infrarouge corrélées à la quantité de fer intracellulaire des échantillons étudiés, mais n'a pas permis d'obtenir des informations sur la nature et la fonction du fer nucléolaire.

Les études physiologiques menées sur *Arabidopsis thaliana* sont encore au stade préliminaire mais offrent de nombreuses perspectives. D'une part, l'étude de l'homéostasie du fer chez des mutants affectés dans la structure du nucléole, et d'autre part, l'étude de la structure du nucléole dans des mutants affectés dans l'homéostasie du fer permettrait certainement de mieux comprendre la fonction du fer dans ce compartiment. On sait par exemple que dans les graines d'*Arabidopsis*, le fer est stocké dans les vacuoles et qu'il est remobilisé pendant la germination par les transporteurs NRAMP3 et NRAMP4 (Lanquar et al., 2005). Or, on sait également que les nucléoles ne deviennent actifs que plusieurs jours après germination. Il y a donc une corrélation entre l'activité nucléolaire et la distribution intracellulaire du fer. Il serait par conséquent intéressant d'observer l'activité du nucléole dans le double mutant *Atnramp3 Atnramp4*.

Il serait également intéressant d'étudier certains tissus dans lesquels se produisent des situations particulières à la fois pour l'homéostasie du fer et pour les nucléoles. Dans le cas des grains de pollen par exemple, les noyaux végétatifs contiennent un nucléole, mais le fer n'est pas détectable dans ces nucléoles. Or, le processus de nucléogenèse est particulièrement lent dans ces tissus (Medina et al., 1983). L'étude du nucléole et de l'homéostasie du fer lors des

processus de germination et de gamétogenèse pourrait éventuellement montrer un lien entre l'activité nucléolaire et la présence de fer dans ce compartiment cellulaire.

Il est bien établi que le nucléole se désorganise pendant la métaphase de la mitose, puis se réorganise dans les cellules filles à la fin de la télophase. Nous avons montré dans ce chapitre que lors de cette désorganisation du nucléole, le pool de fer n'est plus détecté. Il est aussi admis que dans des cellules méristématiques, très actives en terme de division, les nucléoles sont également très actifs. Il serait donc judicieux d'observer la localisation du fer et la structure des nucléoles dans des cellules à différentes étapes de leur cycle cellulaire. Dans cette perspective, les cellules de tabac BY-2 représentent un modèle d'étude très intéressant puisqu'il est possible de synchroniser leur cycle cellulaire, et d'induire leur division et leur différentiation. Ainsi, il serait possible d'étudier les relations entre l'activité du nucléole et sa concentration en fer au cours du cycle cellulaire.

# Chapitre III

Chargement du fer dans les graines de pois (*Pisum sativum*): distribution de complexes Fe(III)-citrate-malate par les tissus maternels, et efflux d'ascorbate par les embryons obligatoire pour la réduction et le transport du fer

# 1) Introduction

#### **a)** Albumen et nutrition des embryons

Les graines représentent les organes puits les plus importants pour les plantes, ainsi que le point final de la circulation à longue distance des éléments nutritifs. Le transport des nutriments jusqu'aux embryons en développement est un processus complexe qui nécessite de nombreuses étapes de chargement et déchargement au travers des membranes plasmiques, puisque les embryons ne sont pas connectés au symplasme des tissus maternels. Pendant le remplissage des graines, les nutriments importés par le phloème sont déchargés dans l'apoplasme qui sépare le tégument des embryons, puis absorbés par les embryons (Patrick, 1997; Patrick et Offler, 2001). Dans les graines des espèces de la famille des fabacées, le flux massif de nutriments s'accumule en grande quantité, formant un compartiment appelé postphloème, ou liquide du sac embryonnaire (LSE). Chez certaines espèces, et notamment les céréales, ce compartiment est le principal lieu de stockage des nutriments dans les graines, et ce stockage s'effectue sous forme solide. Cet albumen liquide est biologiquement très important puisqu'il sert directement de support nutritif aux embryons (Van Dongen et al., 2003). Jusqu'à maintenant, aucune information n'est disponible quand à la forme biochimique des micronutriments dans le LSE, avant leur absorption par les embryons. La spéciation d'un ion métallique dans un compartiment biologique spécifique est une information cruciale pour comprendre comment ce métal est maintenu en solution, comment il est transporté à travers les membranes, et sous quelle forme il est délivré à sa cible finale (compartiment intracellulaire, apoenzyme...). L'analyse de la spéciation du fer constitue donc un pré requis indispensable à la découverte de nouveaux mécanismes impliqués dans la circulation du fer.

#### b) Transport du fer vers les graines et spéciation

Les différents transporteurs et chélateurs impliqués dans le chargement du fer dans les graines ont été décrits de manière exhaustive dans le chapitre d'introduction. Il est tout de même nécessaire de rappeler que les graines sont alimentées à la fois par voie phloémienne et xylémienne. Dans le cas de composés synthétisés dans les feuilles comme les sucres et les acides aminés, il est évident que transport phloémien joue un rôle majeur (Zhang et al., 2007). Mais dans le cas des éléments de transition, tels que le cuivre, le zinc et le fer, le transport xylémien est important (Hocking et Pate, 1977 ; Waters et Grusak, 2008).

Le transport xylémien dépend, au moins en partie, du chargement du citrate par le transporteur d'efflux de citrate FRD3 (Durrett et al., 2007) qui a un impact direct sur la circulation du fer puisque cette molécule est le principal ligand du fer dans la sève xylémienne (Rellan-Alvarez et al., 2010). En revanche, les processus impliqués dans la distribution du fer aux cellules du mésophylle sont peu caractérisés. Et les informations sur l'absorption et la perception du fer par les cellules des feuilles sont rares. Chez le pois, deux mutants accumulant le fer dans leurs feuilles (*bronze* et *dgl*) ont été caractérisés. Dans les deux cas, la perception du fer dans les parties aériennes est altérée, ce qui provoque l'expression constitutive de la machinerie d'acquisition racinaire et l'hyperaccumulation du fer dans les feuilles des set al., 1990; Grusak et al., 1994).

A ce jour, le nombre de molécules organiques dont la capacité à se complexer avec le fer a été démontré *in vivo* est très limité. En dehors du citrate, la plupart des informations concernent la NA. De nombreuses approches génétiques ont indiqué le rôle de la NA dans le transport du fer chez *Arabidopsis thaliana*. L'abolition de la production de NA chez le mutant *nas4x* provoque une accumulation moindre de fer dans les graines (Klatte et al., 2009). Une altération similaire du chargement en fer des graines a été observée dans le mutant *ysl1* (Le Jean et al., 2005). Ce phénotype est probablement causé par une remobilisation moins importante du fer des feuilles, ce qui a été clairement montré dans le double mutant *ysl1 ysl3* (Waters et al., 2006 ; Waters et Grusak, 2008). La chélation du fer est déterminante pour sa circulation à longue distance dans les plantes, et donc pour son acheminement vers les graines.

Dans ce travail, nous avons utilisé la graine de pois comme modèle biochimique pour étudier les mécanismes d'acquisition du fer par l'embryon. En premier lieu, nous avons analysé la spéciation du fer dans du LSE isolé, par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, ainsi que par spectroscopie d'absorption des rayons X issus du rayonnement synchrotron. Nous avons montré que dans le LSE, le fer se trouve sous forme de complexes ferriques avec du citrate et du malate, ce qui nous a rappelé la spéciation du fer dans les compartiments apoplasmiques tels que la sève xylémienne. Cette découverte nous a conduit à postuler que le transport du fer par les embryons pourrait nécessiter une étape de réduction pour dissocier le fer de ses ligands, et permettre son transport sous forme d'ion ferreux. Nous avons en effet montré que les embryons isolés ont une forte capacité de réduction ferrique, qui

est assurée par un efflux d'ascorbate dans le milieu extérieur. Cette activité de réduction ferrique est indispensable au transport du fer par les embryons.

La spéciation du fer *in vivo* dépend de nombreux facteurs, dont le pH, les concentrations en différents chélateurs, et son état d'oxydation. Le passage du fer d'un environnement à un autre, comme par exemple lors du passage d'une voie apoplasmique à une voie symplasmique provoque probablement un échange de ligand. Les changements de compartiments physiologiques sont sous contrôle, d'une part, des transporteurs de fer, et d'autre part, de son état redox. Il est généralement admis que la réduction du fer est assurée par les protéines FRO, mais d'autres systèmes de réduction existent également (Cf. Chapitre I.4.c). La réduction dépendante d'un efflux de composés réducteurs avait été étudiée au niveau des racines avant la découverte des réductases membranaires. Certaines molécules, très représentées dans les tissus végétaux, sont capables de s'oxyder spontanément pour provoquer la réduction.

#### c) Vitamine C et transport du fer

L'acide ascorbique est présent dans les graines en développement de nombreuses espèces, dont le pois (Bonner et Bonner, 1938 ; Stasolla et Yeung, 2001 ; De Tullio et Arrigoni, 2003). Chez cette espèce, il semble jouer un rôle important dans le développement des embryons (Bonner et Axtman, 1937), notamment en activant la prolifération cellulaire (Citterio et al., 2006). L'acide ascorbique est également impliqué dans la germination (Ye et al., 2011), phase pendant laquelle il est synthétisé en grande quantité (Pallanca et Smirnoff, 2000). La plupart des travaux effectués sur le rôle de l'ascorbate concernent la germination. Les fonctions de la vitamine C dans la maturation des graines et le développement des embryons restent donc peu connues.

Sa concentration dans les feuilles est très élevée puisqu'elle peut atteindre plusieurs dizaines de millimolaire (Rautenkranz et al., 1994; Foyer et Lelandais, 1996; Conklin et al., 2000). On imagine donc aisément que cette molécule puisse jouer un rôle dans la circulation du fer. Les activités de certaines enzymes du métabolisme de l'ascorbate sont régulées par le fer, notamment les peroxidases à ascorbate (Fourcroy et al., 2004; Ravet et al., 2009). De plus, le niveau d'ascorbate dans les tissus varie en fonction du statut en fer (Zaharevia et Abadia, 2003; Urzica et al., 2012). Le rôle de cette molécule dans les réponses aux stress en fer est

généralement attribué à ses propriétés anti-oxydantes, et de détoxication des ROS. Cependant, le rôle de l'acide ascorbique dans le transport du fer devient de plus en plus évident dans des espèces végétales variées, et notamment chez *Arabidopsis thaliana* et la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (Urzica et al., 2012).

# 2) <u>Résultats: article en préparation: Ascorbate efflux as a new strategy</u> <u>for iron reduction and uptake in pea (*Pisum sativum*) embryos</u>

Louis Grillet<sup>a\*</sup>, Paulina Flis<sup>b\*</sup>, Marie-Pierre Isaure<sup>b</sup>, Laurent Ouerdane<sup>b</sup>, Ryszard Lobinski<sup>b</sup>, Catherine Curie<sup>a</sup>, Stéphane Mari<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Institut de Biologie Intégrative des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5004), Institut National de la Recherche Agronomique, Université Montpellier II, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, F-34060 Montpellier Cedex 2, France.

<sup>b</sup> Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5254), Université de Pau et des Pays de l'Adour, F-64063 Pau Cedex 9, France

\* These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Stéphane Mari, BPMP Bat 7, place Viala, F-34060, Montpellier; E-mail: mari@supagro.inra.fr

#### a) Introduction

Iron (Fe) is an essential micronutrient for plants, used as an enzymatic cofactor in a wide range of metabolic processes such as photosynthetic and respiratory electron transfer reactions, reduction of nitrate and sulfate, synthesis of fatty acids and branched amino acids. Iron was selected on the redox capacity of the  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  couple that can exchange one electron. This chemical property is also responsible of the potential toxicity of iron in excess conditions since ferrous ions can promote, more or less directly, the generation of reactive oxygen species and oxidative stress. Plants, as sessile organisms, have to constantly maintain a strict homeostasis to cope with deficiency or excess conditions. At the whole plant level this is

achieved by the fine regulation of root absorption, allocation to the aerial parts, storage and remobilization.

Although very abundant in soils, Fe is often poorly available for plants since the main Fe form (Fe<sup>III</sup>) has a very limited solubility and is prone to precipitate in alkaline conditions. Therefore, plants have developed strategies to efficiently acquire Fe. In roots of dicotyledonous species such as the model plant Arabidopsis thaliana, the uptake of Fe requires (i) the acidification of the rhizosphere by the proton pumping activity of the ATPase AHA2 (Santi and Schmidt, 2009) to release Fe<sup>3+</sup> bound to humic substances, (ii) the reduction of ferric ions by the ferric chelate reductase encoded by FRO2 (Robinson et al., 1999) and the subsequent uptake of  $Fe^{2+}$  by the metal transporter IRT1 (Eide et al., 1996; Vert et al., 2002). Once in root cells, Fe atoms have to reach the vascular system and be loaded in the xylem vessels to be transported to the aerial parts. The xylem loading is controlled, at least in part, by the FRD3 protein that belongs to the Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE) family (Green and Rogers, 2004). This protein was shown to participate to citrate loading in the xylem via its efflux activity (Durrett et al., 2007), thus having a direct impact in the movement of Fe since citrate is the main ligand of Fe atoms in the xylem sap (Rellan-Alvarez et al., 2010). In contrast, the processes involved in the delivery of Fe to leaf cells remain barely characterized. Recently, a detailed analysis of the role of FRD3 in the rest of the plant has revealed that in leaves of the frd3-7 knock out mutant iron was blocked in the xylem vessels, provoking the chlorosis of the mesophyll (Roschzttardtz et al., 2011). These data indicate that a citrate efflux activity is also somehow required for the process of Fe unloading from the vascular system. Nevertheless, little information is available on the absorption and sensing of Fe in leaf cells. In pea (Pisum sativum), two mutants that hyperaccumulate Fe in leaves (bronze and dgl) have been isolated (Kneen et al., 1990). In both cases, the perception of the Fe nutritional status in shoots is compromised, inducing the constitutive expression of the root acquisition machinery and eventually the Fe overaccumulation in seeds of the dgl mutant (Grusak et al., 1990; Grusak and Pezeshgi, 1996). In Arabidopsis thaliana, the knock down mutant genotype opt3-2 displays a comparable phenotype of constitutive Fe uptake by roots and overaccumulation in leaves (Stacey et al., 2008). The precise function of the OPT3 gene, that belongs to the OligoPeptide Transporter family, remains nevertheless elusive, since the substrate of this membrane transporter, whether it is a Fe ligand or a Fe complex, is still unknown. To date, the number of organic molecules shown to form complexes with Fe in vivo is extremely limited. Beside the case of



Figure 33: ICP-MS quantification of iron in the steric-exclusion chromatography fractions of pea liquid endosperm. Iron-enriched fractions were eluted after 12 to 17 minutes.



<u>Figure 34:</u> ESI-MS analysis of the SEC fraction eluted at 13.17 min. The major peak correspond to an ion of m/z = 811.84. This peak corresponds to  $[Fe_3-Cit_2-Mal_2]^-$  (m = 812). Other peaks correspond to protonated and deprotonated forms of the ion.

citrate, most of the information concerns nicotianamine (NA). This aminopropyl polymer, enzymatically synthesized from S-adenosylmethionine, has a high affinity for iron, copper and zinc. Several studies have shown that the chemical properties and the binding capacity of NA make it an ideal ligand for Fe in neutral, cytosolic, conditions whereas in acidic, apoplastic, conditions citrate will prevail (Von Wirén et al., 1999; Rellan-Alvarez et al., 2008). In planta, NA has been shown to play a role in the root-to-shoot transport of copper in tomato (Pich and Scholz, 1996) and nickel in the hyperaccumulator species *Thlaspi caerulescens* (Mari et al., 2006). In the latter case, the formation of a complex between nicotianamine and nickel in xylem exudates was unambiguously demonstrated by the coupling of chromatography and mass spectrometry (Mari et al., 2006; Ouerdane et al., 2006).

In Arabidopsis thaliana, several genetic approaches have allowed to pinpoint the role of NA in the transport of Fe. The impairment of NA production, by the generation of a quadruple NA synthase mutant, provokes the expected phenotype of interveinal chlorosis as in the NA-free tomato mutant chloronerva and more interestingly a reduced accumulation of Fe in the seeds (Klatte et al., 2009). Such an impact on seed Fe loading was also reported in mutants of the Yellow-Stripe1 Like (YSL) family of NA-metal transporters. The mutation in AtYSL1 provokes a decrease in Fe and NA accumulation in seeds (Le Jean et al., 2005), due most likely to a reduced remobilization from old leaves, as shown in the double *atysl1atysl3* mutant (Waters et al., 2006; Waters and Grusak, 2008). Taken together, these results indicate that disturbing iron long distance transport has a major impact on the process of Fe seed loading (reviewed in Walker and Waters, 2011). Seeds represent the most important sink for plants and the end point of long distance circulation. The transport of nutrients to the developing embryo is a very complex process that requires several steps of unloading and reloading across cell membranes, since embryos are not symplastically connected to the maternal tissues. During seed filling, the nutrients imported via the phloem are released in the apoplast separating the seed coat and the embryo and subsequently taken up by the cotyledons of the embryo (Patrick, 1997; Patrick and Offler, 2001). In seeds of grain legumes the bulk flows of nutrients accumulate in large amounts, forming what was termed the post-phloem compartment, or Embryo Sac Liquid (ESL). This particular liquid is of high biological importance since it directly serves to feed the embryo (Van Dongen et al., 2003). So far, virtually nothing is known on the biochemical forms of micronutrients in the ESL, before their uptake by the embryo. The speciation of a metal ion in a specific biological compartment is a crucial information to further understand how the metal is kept soluble,



<u>Figure 35:</u> Putative structures of the  $Fe_3$ -Cit<sub>3</sub>-Mal<sub>1</sub>,  $Fe_3$ -Cit<sub>2</sub>-Mal<sub>2</sub>,  $Fe_3$ -Cit<sub>1</sub>-Mal<sub>3</sub> and Fe-Cit<sub>2</sub> complexes identified in ESI-MS analysis.

how it is transported across membranes and how it is delivered to its final target (sub-cellular compartment, apoenzyme...). The analysis of iron speciation represents thus a prerequisite to unravel new mechanisms involved in Fe movement and function.

In the work presented, we have used pea (*Pisum sativum*) seeds as a biochemical model to study the mechanisms of Fe acquisition by the embryo. First, we have investigated the speciation of iron on isolated ESL, using chromatography coupled to mass spectrometry and synchrotron radiation X-ray absorption spectroscopy. We have shown that in the embryo sac liquid Fe is found as ferric complexes with citrate and malate. This finding, reminiscent of the speciation of Fe in apoplastic compartments such as the xylem sap, has prompted us to postulate that embryos may require a reduction step to dissociate Fe from its ligands and facilitate its transport as ferrous iron. Indeed, we have shown that isolated embryos have a high ferrireduction capacity that is mediated by the efflux of ascorbate in the medium and that the reduction of ferric iron is an essential step before its uptake by the embryos.

#### **b**) Results and conclusions

#### i) Iron is delivered to embryos as Fe(III)-citrate and Fe(III)-citrate-malate

We sampled pea embryo sac liquid in large amount in order to identify iron complexes by SEC-ICP-MS and ESI-MS. The pH of isolated ESL was measured and found to be around 5.5. SEC-ICP-MS revealed four peaks of iron eluted at 12.74, 13.17, 14.04 and 16.17 minutes (Cf. Figure 33). Iron enriched fractions corresponding to each peak were then analyzed by ESI-MS in order to identified iron containing molecules. ESI-MS spectrum of the major iron peak eluted at 13.17 min is presented in Figure 34. This spectrum highlights a major peak at m/z = 811.84 that corresponds to a Fe<sub>3</sub>-Citrate<sub>2</sub>-Malate<sub>2</sub> complex (m = 812). The other peaks have been assigned to Fe-Citrate<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>-Citrate<sub>1</sub>-Malate<sub>3</sub>, and Fe<sub>3</sub>-Citrate<sub>3</sub>-Malate<sub>3</sub> respectively for peaks at m/z 437.972, 753.835 and 869.845. Theoretical masses of these complexes are respectively 438, 754 and 970.

Proposed structures of the four complexes are presented in Figure 35. They consisted in either one or three atoms of ferric iron, bound to citrate only in the case of the Fe-Cit<sub>2</sub> complex, or both citrate and malate. All three ferric citrate-malate complexes contained three iron atoms and four organic acids molecules, constituted by any possible combination: 3 citrate + 1 malate, 2 citrate + 2 malate, and 1 citrate + 3 malate.



**Figure 36:** Pea embryos express a ferric reduction activity. (A) Isolated embryos were incubated for 2 h in a 5 mM MES buffer pH 5.5 with 100  $\mu$ M Fe<sup>III</sup>EDTA and 300  $\mu$ M BPDS (left well) or in a control medium without Fe<sup>III</sup>-EDTA (center well). (right well), complete assay medium without embryos. The red colour in the left well represents the formation of the Fe<sup>II</sup>-BPDS<sub>3</sub> complex. (B) Ferric-chelate reductase activity regulation during embryo maturation. Individual embryos of each weight category were incubated 15 minutes in 1mL of 20mM Citrate-phosphate buffer pH 5.5 with 100 $\mu$ M Fe<sup>III</sup>-EDTA 300 $\mu$ M Ferrozine. Results are means of at least 8 embryos ± standard deviation. Significant differences were determined with a non-parametric Kruskal-Wallis test (p < 0,05).

This analysis of pea ESL revealed that citrate and malate are acting together to chelate iron in this compartment. This study brings new evidence for a role of malate in iron chelation *in vivo*. This role was suggested long ago by Tiffin and Brown (1962) but never demonstrated. Though Fe complexes with both citrate and malate have never been observed before, the presence of such Fe(III) – organic acids complexes at the slightly acidic pH we recorded is highly consistent with the data available in literature (Von Wiren et al., 1999; Rellan-Alvarez et al., 2010). Another major information to be pulled out of these results is that iron is mainly under its oxidized state in pea ESL. This means that at least in this species, Fe is delivered to embryos as ferric iron.

#### ii) Pea embryos are capable of ferric reduction

We then investigated the presence of an embryo iron reduction activity. BPDS has been used to visualize and measure embryo and root ferrireduction activity of *P.sativum* plants.

Formation of the typical pink complex of Fe-BPDS<sub>3</sub> could be seen in the incubation medium of isolated embryos in presence of Fe(III)-EDTA and BPDS (Figure 36.A). When embryos were incubated with BPDS only, no Fe-BPDS<sub>3</sub> was observed. This result confirms that the ferrous iron generated by the reaction was due to the reduction of exogenous Fe(III)-EDTA and rather than endogenous Fe. The spectrophotometric quantification of the Fe(II)-BPDS<sub>3</sub> complex showed that this activity was highest in young embryos (i.e. with fresh weights < 200 mg; Cf. Figure 36.B). Measured activities (Figure 36.B) were close to 90 nmol.g FW<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> in young embryos and decreased during their growth down to 20 nmol.g FW<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> in most mature embryos (500 < Fresh Weight < 650 mg). Quantifications of this activity were highly variable but displayed a very good fit with a Michaelis-Menten model as the R<sup>2</sup> ranged from 0,9 to 0,98 (Figure 37.A). Apparent K<sub>m</sub> values ranged from 30  $\mu$ M to 80  $\mu$ M and V<sub>max</sub> varied from 30 to 160 nmol.g FW<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. The ferric reduction activity was also measured as a function of pH in the incubation medium. The maximum activity was observed at pH ranging from 5.5 to 6 (Cf. Figure 37.B), which is similar to the pH value of the liquid endosperm.

In order to investigate a potential regulation of this activity by Fe, we compared root and embryo activities of DGV (WT) and the mutant *dgl* (Figure 38.A and 38.B). Roots of hydroponically grown DGV displayed a reductase activity of approximately 50 nmol .g<sup>-1</sup> FW .h<sup>-1</sup> under Fe sufficiency conditions and an activity of around 200 nmol .g FW<sup>-1</sup> .h<sup>-1</sup> when grown without Fe. Roots of *dgl* plants exhibited a much higher activity, in the range of 300



<u>Figure 37</u>: Biochemical features of the embryo ferric reduction activity. (A) Ferric-reduction activity measurement as a function of Fe<sup>III</sup>-EDTA concentration in the medium. Each curve corresponds to an independent set of embryos. Each data point consists in one measurement of ferric-chelate reductase activity performed with 5 embryos incubated for 15 minutes in 5 mL of 5 mM MES buffer pH = 5.5 with increasing Fe<sup>III</sup>-EDTA concentrations and 300µM BPDS. (B) pH-dependent ferric reductase activity.



<u>Figure 38:</u> The embryo ferric chelate reduction is not regulated by the Fe nutritional status. (A) Root ferric-chelate reductase activity was measured on excised roots of individual wild type (DGV) or mutant (*dgl*) plants, by incubation for 15 minutes in 100 mL of 5 mM MES buffer pH 5.5 with 100  $\mu$ M Fe<sup>III</sup>-EDTA and 300  $\mu$ M BPDS. (B) Embryo ferric reduction activity was carried out with 5 embryos incubated 15 minutes in 5 mL of 5 mM MES buffer pH 5.5 with 100 $\mu$ M Fe<sup>III</sup>-EDTA 300 $\mu$ M Ferrozine.

Each experiments was repeated 3 times, results are means of the 3 replicates  $\pm$  standard deviation. Significant differences were determined with a parametric Tukey test (p < 0,05).

nmol .g FW<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> independently of the Fe supply, confirming that in the *dgl* mutant the root ferric reductase is constitutively high, regardless of the Fe status. Embryos of both genotypes did not display any significant difference regarding to their ferrireduction activities under both Fe. This activity was in the range of 100 nmol .g<sup>-1</sup> FW .h<sup>-1</sup>.

These results demonstrate that pea embryos are capable of ferrireduction. This activity was gradually decreasing along embryo development. The optimal pH for this activity is between 5 and 6, values in the same range that ESL pH. The very good fit with Michaelis-Menten model first suggested that embryo ferric reduction was an enzymatic process. This argument was not strong enough to exclude the possibility of a chemical reduction by enzymatically effluxed reductants. The induction of root FCR activity by Fe deficiency in the WT plants and the constitutively high activity in *dgl* plants are consistent with previous studies carried out on these two genotypes (Grusak et al., 1990; Waters et al., 2002). We suspected that embryo ferrireduction activity of the mutant *dgl*, which accumulates more Fe than the WT, would be higher than that of wild type embryos, but our result show that this is not the case.

#### iii) An ascorbate efflux from embryos mediates ferric reduction activity

In order to check whether ferrireduction embryo activity was associated to plasma membrane or mediated by an efflux of reductive compounds, we quantified ferrireduction activity in embryo exudates (Cf. Figure 39.A). When embryos were incubated with Fe(III)-EDTA and BPDS, 158 ( $\pm$  20) nmol Fe .g<sup>-1</sup> FW .h<sup>-1</sup> was reduced, whereas exudates (i.e. by removing the embryos before measuring Fe reduction) were able to reduce 115 ( $\pm$  10) nmol Fe.g<sup>-1</sup> FW .h<sup>-1</sup> under the same conditions. Efflux of reductive compounds mediated a reduction of around 3 nmol Fe .g<sup>-1</sup> FW .min<sup>-1</sup>, and was linear in a 30 minutes time course (Cf. Figure 39.B). ESI-MS analysis of embryo exudates showed that at least two well-established reductants, namely ascorbate and glutathione, were effluxed by embryos. Since ascorbate, but not glutathione, is necessary and sufficient to spontaneously reduce iron *in vitro* (Cf. Figure 39.C), we suspected it to be one the reductive compound effluxed by embryos. We thus treated embryo exudates with ascorbate oxidase (AOX) prior to quantification of ferrireduction. When exudates were treated with AOX, their ferrireduction activity dropped to 5.5 ( $\pm$  5) nmol Fe .g<sup>-1</sup> FW .h<sup>-1</sup>, meaning a barely detectable activity. A 50 minutes time course of embryo ferrireduction activity showed that the activity was also in the range of 3 nmol .g<sup>-1</sup> FW .min<sup>-1</sup> (Cf. Figure



**Figure 39:** Ferric reduction of isolated pea embryos is mediated by ascorbic acid efflux. (A) Ferric reduction activity measured by BPDS method in presence of embryos (Embryo) or after removing embryos (Exudates). Ascorbate oxidase (Exudates +AOX) was added to the incubation solution after embryo removal and 5 minutes prior to Fe(III)-EDTA and BPDS addition. Results are means of 3 independent replicates ± standard deviation. Different letters indicate significant differences among means (p < 0,05 by Tukey's test). (B) Time course measurement of ascorbate efflux. (C) *In vitro* reduction of ferric iron by ascorbic acid and glutathione. 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA and 300 $\mu$ M BPDS were incubated with 5  $\mu$ M ascorbic acid or 5  $\mu$ M glutathione or both. OD<sub>535nm</sub> was measured 30 minutes after addition of reductants. Results are means of 2 replicates ± SD. (D) Ferric reduction activity of pea embryos incubated in 5 mM MES pH 5.5 with 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA and 300  $\mu$ M BPDS without AOX (Untreated), or in presence of 0.15 and 1.5 AOX Units .ml<sup>-1</sup>. Absorbance at 535 nm was measured every 10 minutes. Each curve has been built from means ± standard deviation of three experiments that consisted in measuring activities of 5 individual embryos for each treatment.
39.D) and linear for at least 50 minutes. This activity was strongly inhibited by AOX in a dose-dependent manner.

The capacity of embryo exudates to reduce iron was approximately 70% than that of embryos, thus proving that the major proportion of this activity was attributable to an efflux of reductive compounds by embryos. Embryos and exudates ferrireduction activities have similar kinetics, with exactly the same reaction speed.

Ascorbate ferrireduction capacity is known for decades (Römheld and Marschner, 1983; Buettner et al., 1986). Its presence in embryo exudates makes it a very good candidate for this reduction. The complete inhibition of ferrireduction activity by a short AOX treatment is a proof that effluxed activity is fully mediated by ascorbate.

## iv) Pea embryos take up ferrous iron

To assess the importance of ascorbate mediated ferrireduction for embryo Fe uptake, we quantified the accumulation of the radioactive isotope <sup>55</sup>Fe into isolated embryos in presence or absence of BPDS and AOX (Cf. Figure 40). The rationale of this experiment is that if iron is taken up as Fe(II), then both BPDS and AOX should inhibit the uptake. Indeed, if ferrous iron, produced from Fe(III) during the incubation, is the ion that is taken up, then BPDS will form non-permeant complexes preventing its uptake. Moreover, if ascorbate is indeed responsible for this reduction, then the oxidation by AOX should prevent ferrous iron formation and thus the subsequent uptake.

Untreated embryos accumulated 105 ( $\pm$  27) nmol. g<sup>-1</sup> FW .h<sup>-1</sup> when incubated at 30°C, and 43 ( $\pm$  11) at 4°C. In presence of AOX and BPDS, they accumulated respectively 62 ( $\pm$  8) and 22 ( $\pm$  4) nmol .g<sup>-1</sup> FW .h<sup>-1</sup>. Values obtained with untreated embryos at 30°C were significantly higher than those obtained with the three treatments. AOX treated embryos accumulated slightly but not significantly more <sup>55</sup>Fe than the control corresponding to cold-treated embryos. When incubated with BPDS, embryos accumulated much less <sup>55</sup>Fe and the incubation solution gradually turned to a strongly red stained solution indicating the formation of the Fe(II)-BPDS<sub>3</sub> complexes. Only a faint staining could be observed in the same solution without embryo.



Figure 40: <sup>55</sup>Fe influx in isolated pea embryos. Embryos were incubated in uptake buffer containing 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA and when stated 4 mM bathophenanthroline disulfonate (BPDS) or 1.5 AOX Units. ml<sup>-1</sup> (+AOX) were added. Incubations at 4°C with the complete uptake medium were also realized to measure passive adsorption of Fe at the embryo surface. Insert, net influx of <sup>55</sup>Fe deduced by calculating the difference between Fe accumulation at 30°C (complete, +AOX, +BPDS) and the 4°C control incubation. Each measurement was performed on 4-5 embryos of 20-50mg, and experiments were repeated 3 times independently. Results are means ± SE (n=3). Significant differences were determined with a non-parametric Kruskal-Wallis test (p < 0,05).

Iron uptake values of untreated embryos were in a similar range than data published by Welch and Larue (1990) with pea roots. AOX significantly inhibited <sup>55</sup>Fe accumulation to 59% of untreated embryos. The accumulation observed in AOX treated embryos was not significantly different from the 4°C treated embryos. This result suggests that the major proportion of <sup>55</sup>Fe in those embryos was accumulated in a physiologically passive way. The net <sup>55</sup>Fe influx was actually inhibited to 30% of the untreated embryos uptake. The remaining 30% uptake is thought to be a background from various origins. This may be caused by apoplastic ascorbate that cannot be reached by exogenous AOX but still able to reduce Fe, or to a small proportion of Fe that is reduced even in presence of AOX, photoreduction of iron during the experiment, and Fe binding to negatively charged cell wall components.

The ferrous chelator BPDS had a more drastic effect. It indeed inhibited Fe accumulation to 21% of that of untreated embryos, a value even lower than that of the 4°C value. This strong effect of BPDS demonstrates unambiguously that ferric reduction is an obligatory step for iron uptake by pea embryos. This experiment allows us to conclude that ascorbate-mediated ferric reduction is an absolute requirement for iron uptake by pea embryos, thus uncovering a new role for endogenous ascorbate in plants.

#### c) Discussion

#### i) A new model for iron uptake: a strategy I.V

In pea seeds, iron is delivered to embryos as ferric-citrate and ferric-citrate-malate complexes. Embryos release ascorbate into endosperm, through a physiologically active mechanism. In the presence of ferric iron, ascorbate catalyses iron reduction. Among candidate transport systems, IRT or NRAMP protein families of transporters can take up the ferrous ions generated by this reaction (Cf. Figure 41).

Historically, iron uptake has been divided in two strategies. Strategy one is used by dicotyledonous species and consists in ionic ferrous iron uptake following an enzymatic reduction of ferric chelates. Strategy two is observed in grass species and relies upon the transport of ferric iron as complexes with high affinity molecules excreted by roots and called phytosiderophores. In this study, we described an iron uptake system based on ferrous ion uptake, similar to the one of strategy 1 plants. However, in the present case the ferric reduction relies on an efflux of reductive molecules, and is not driven by a membrane bound reductase enzyme. The release of molecules that allow iron transport is more reminiscent of



Figure 41: Model for iron uptake by pea embryos. Iron, delivered by maternal tissues, is found in the liquid endosperm as ferric complexes with citrate and citrate/malate. Ascorbic acid, effluxed by embryos, will chemically reduce  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$  that is then taken up by the activity of plasma membrane divalent metal transporters.

uptake strategy 2. The strategy observed in the hereby research is intermediate between both strategies, and that is the reason why we suggest calling it strategy 1.5.

# ii) Is pea endosperm a post-phloem or a post-xylem?

The endosperm is usually termed as post-phloem (e.g. Fisher et al., 2000; Van Dongen et al., 2003). However, both xylem and phloem are unloading in this compartment. The pH we measured in this compartment was however more similar to that of xylem. And iron species found in embryo sac liquid were also similar to those of observed in xylem of other species. This is consistent with the nature of the endosperm that is an apoplasmic compartment.

#### iii) Origin of embryo iron

In this study, we have shown that Fe is delivered to pea embryos as  $Fe^{(III)}$ -citrate<sub>2</sub>,  $Fe^{(III)}_{3}$ -citrate<sub>1</sub>-malate<sub>3</sub>,  $Fe^{(III)}_{3}$ -citrate<sub>2</sub>-malate<sub>2</sub> and  $Fe^{(III)}_{3}$ -citrate<sub>3</sub>-malate<sub>1</sub> in a slightly acidic environment. Several data in literature suggest NA to be involved in seed Fe loading. Our results allow us to exclude a direct role of NA in iron chelation in pea liquid endosperm. This statement is likely true for other dicot species like *Arabidopsis thaliana*. Indeed, the involvement of citrate in this process is in agreement with the expression of *AtFRD3* in embryo protodermis and aleurone layer in *Arabidopsis thaliana* (Roschzttardtz et al., 2011).

Nicotianamine is undoubtedly involved in seed Fe loading. Indeed, seeds of the Fe-NA transporter double mutant, *atysl1 atysl3*, have a reduced Fe and NA content compared to wild-type plants (Waters et al., 2006). Waters and Grusak (2008) showed that this mutant fails to remobilize Fe from source tissues. The study of the *Arabidopsis* nicotianamine synthase quadruple mutant by Klatte et al. (2009) and Schuler et al. (2012) points out a role of NA in phloem circulation and remobilization of Fe from source tissues. In our opinion, NA is involved in the processes preceding Fe arrival in endosperm, and especially in Fe remobilization.

Different groups determined in various plant species (Hocking and Pate, 1977; Grusak et Waters, 2008) that seed Fe is provided in more or less equal proportions by direct supply from the roots through the xylem and remobilization from senescing tissues through phloem. In our study, the embryo ferrireduction activity of the *dgl* mutant was similar to the activity of wild-type. In contrast, *dgl* root FCR activity was much higher. Therefore, we suggest that accumulation of Fe in *dgl* seeds is not due to an enhanced Fe uptake by embryos, but rather to

an increased supply of Fe from the roots, and somehow an increased Fe unloading to the ESL, since the Fe concentration is higher in ESL from *dgl* (data not shown).

# iv) Iron reduction and uptake by embryos

We demonstrated that pea embryos transport Fe in its ferrous form, following its reduction by ascorbate. Interestingly, the Fe reduction capacity of embryos was slightly higher than their Fe uptake values. Embryo ferrireduction was higher than root FCR of wild-type Fe sufficient roots but lower than the one of Fe-deficient plants. Embryo activity was neither affected by the Fe status of maternal plants nor deregulated in the *dgl* mutant. Fe-deficiency cannot be induced in embryos as their supply is buffered by regulations of root Fe uptake and remobilization from other tissues. An excess of iron can be buffered by an accumulation of ferritins in embryo plastids (Becker et al., 1998). Thus, embryo ferrireduction and Fe uptake are not regulated through the same pathway than the roots of their mother plant.

Ascorbate efflux is the major, if not the only, embryo ferrireduction system in pea. However, ferrireduction activity was higher when measured in the presence of embryos, than in exudates only. This difference is attributed to an embryo activity that facilitates the reduction reaction perhaps by regenerating the oxidized form of ascorbate, namely dehydroascorbate (DHA). This can be achieved either by a transmembrane ascorbate cycling or by an external reduction of DHA (Lane and Lawen, 2008).

# v) A new physiological function of ascorbate

Interactions between ascorbic acid and Fe uptake have been extensively studied for medical purposes. Humans are unable to synthesize ascorbic acid, and several studies showed that exogenous vitamin C enhances absorption of dietary Fe in humans (Hallberg et al., 1986; Hallberg et al., 1989), guinea pigs (Smith et al., 1980) and pigs (Sayers et al., 1973). Ascorbic acid deficiency causes major abnormalities in Fe metabolism in human, including a low serum Fe concentration (Wapnick et al., 1970). In patients with dietary Fe overload, ascorbic acid deficiency often occurs (Wapnick et al., 1968). Vitamin C might be involved in Fe uptake by neurones (Bradbury et al., 1997; Moos et al., 2007). The coupling of ascorbate with a Fe transport system has been clearly demonstrated in leukemia K562 cells (Lane et Lawen, 2008) and is likely occurring in other living organisms.

In plants, ascorbate is an endogenous and ubiquitous molecule. It participates in a variety of processes including photosynthesis, photoprotection, cell growth and resistance to environmental stresses. Various ascorbate-oxidizing enzymes, like ascorbate peroxidase, are regulated by Fe status (Fourcroy et al., 2004) and ascorbate level varies with the Fe status of plants (Zaharevia et Abadia, 2003). It has also been shown to be involved in Fe release from ferritins (Bienfait et Van den Briel, 1980). The role of ascorbic in Fe stress responses is usually assigned to its antioxidant and ROS scavenging properties. In this study, we provide evidence that ascorbate is directly involved in iron transport by embryos.

Since large amounts of ascorbic acid are found in various tissues and intracellular compartments (Rautenkranz et al., 1994; Foyer et Lelandais, 1996; Conklin et al., 2000), we can imagine that its function in Fe homeostasis is not limited to embryo Fe uptake. Ascorbic acid might also play an important role in intracellular Fe distribution and speciation in other plant species as well as in animals. To conclude, ascorbate is a very useful molecule that deserves more care than it received regarding to iron transport.

# d) Material and methods

#### i) Plant material

Two genotypes of pea (*Pisum sativum* L.) were used in the present study: a wild type line (*cv* DGV) and a derived mutant line *dgl* (Gottshalk, 1987).

Plants used for root ferric-chelate reductase measurement were grown hydroponically for 15 days in a climate chamber at 20°C, 70% hygrometry, 16h light/8h dark, and 250  $\mu$ mol photons .m<sup>-2</sup> .s<sup>-1</sup> of photosynthetically active radiation. Nutrient solution contained 1.25 mM KNO<sub>3</sub>, 1.5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)2, 0.75 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25  $\mu$ M H<sub>3</sub>Bo<sub>3</sub>, 2  $\mu$ M MnSO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.1  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub>, buffered at pH = 5 with 1 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid and. For Fe deficient plants, no Fe was added to this solution, and Fe sufficient plants were fed with 50  $\mu$ M Fe(III)-EDTA.

Plants used for embryo sac liquid sampling, embryo ferric-chelate reductase activity and <sup>55</sup>Fe accumulation were grown in a greenhouse at 23°C, in 3 liters pots containing 0.5 l of quartz sand and 2.25 l of Humin substrate N2 Neuhaus (Klasmann-Deilmann, Geeste, Germany) irrigated with tap water for -Fe plants and 0,5 g .l<sup>-1</sup> Fe-EDDHA for +Fe plants.

#### ii) Liquid endosperm sampling

Developping pods were dissected with a surgical blade. Two holes were pierced into each seed using a glass capillar. The liquid endosperm was then quickly extracted with another glass capillary using a peristaltic pump and gently blown at the bottom of an ependorff tube kept on ice. Pumping was carried out carefully in order to avoid bubbling. Samples were then maintained frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until further analysis.

### iii) Fe complexes chemical analysis

Iron-containing complexes present in the liquid endosperm were analyzed by the coupling of a hydrophilic liquid chromatography (HILIC) column to an inductively coupled plasma mass spectrometer, ICP-MS, for iron quantitative detection and an electrospray mass spectrometer, ESI-MS, to achieve the identification of the corresponding iron-containing species.

Chromatographic separations were performed using a model 1100 HPLC pump (Agilent, Wilmington, DE, USA) as the delivery system. The HILIC column was a TSK gel amide 80 (250 x 1 mm internal diameter) (Tosoh Bioscience, Germany). All the connections were made of Fused silica/PEEK tubing (0.05 mm internal diameter). The ICP-MS instrument was Agilent 7500cs (Agilent Technologies, Japan), equipped with a collision cell with hydrogen as collision gas. The interface between HPLC and the Agilent 7500cs consisted of glass Cinnabar cyclonic spray chamber (Glass Expansion, Australia), a Micromist U-series nebulizer (Glass Expansion, Australia), a 1 mm internal diameter quartz torch (Agilent Technologies, Japan) and a set of platinum cones (Agilent Technologies, USA). The ESI-MS instrument was a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA).

The mobile phase was (A) 5 mmol .1<sup>-1</sup> ammonium acetate buffer (pH adjusted to 5.5 by addition of acetic acid) and (B) acetonitrile. Analytical reagent grade chemicals were used for buffer preparation and were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin, Fallavier, France). Water (18.2 MW.cm) was obtained with Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The optimized HILIC gradient started with 10% of A and was increasing to 50% of A during 25 min. The samples (diluted in acetonitrile 1/2, v/v, and 7 mL injection) were eluted at the flow rate of 50 µl .min<sup>-1</sup>. Iron-containing species were detected by direct on-line

coupling of HILIC column to the ICP-MS instrument (following signals for <sup>54</sup>Fe and <sup>56</sup>Fe isotopes) and to the ESI-MS instrument. ICP-MS conditions were optimized daily for highest intensities and lowest interferences using a standard built-in software procedure and ESI-MS instrument was calibrated daily with a standard mixture preconized by constructor. ES-MS spectra were acquired with maximum injection time 400 ms in the range 230 to 1000 u. The electrospray voltage was set at 3 kV in the positive ion mode and -3 kV in negative ion mode. The ions were fragmented by higher energy collisional dissociation at various energy levels.

#### iv) Ferrireduction assays

Ferric-chelate reductase activity was estimated as the quantity of Fe-BPDS<sub>3</sub> complexes formed in the assay solution calculated from the optical density measured at 535 nm with a Hitachi U-2800 spectrophotometer. OD<sub>535</sub> was measured incubation in the dark at 22-25°C, with 250 RPM shaking, in an assay solution that contained 5 mM MES buffer pH = 5.5, 300  $\mu$ M BPDS and 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA unless otherwise stated.

Embryos were dissected with a surgical blade as fast as possible, and kept in 5 mM MES buffer pH = 5.5 for 30 minutes, representing the time to dissect and weight around 15 embryos. Embryos were then incubated in the assay solution.

To measure root ferric-chelate reductase activity, whole root systems from individual plants were excised, rinsed three times with demineralized water, and incubated in 50 ml assay solution following the same protocol.

In order to estimate the kinetic parameters of this activity, embryos were dissected and incubated as previously described, except that the assay solution contained increasing concentrations of Fe(III)-EDTA and 300  $\mu$ M BPDS. Each data point has been generated from one reaction mix containing 5 embryos in 5 ml assay solution with the corresponding substrate concentration. OD<sub>535</sub> was measured after 15 minutes. Final values are means of 5 independent replicates ± SD. The R<sup>2</sup>, K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> were estimated with SigmaPlot 8.02 from the Michaelis-Menten equation: Activity = (V<sub>max</sub>\* [substrate]) / (K<sub>m</sub> + [substrate]).

To monitor changes in ferric reductase activity during embryo development, five categories were chosen on the basis of the fresh weight (>100 mg, 100-200, 200-300, 300-500, 500-

650). At least 8 individual embryos were sampled from each category and incubated as described above in 1 ml of assay solution. Final values are the mean  $\pm$  SD of the results of these assays. Significant differences were determined using R software with a non-parametric Kruskal-Wallis test (p < 0,05).

To compare root FCR activities of DGV and *dgl*, root systems from 3 different plants were incubated individually. This experiment was repeated three times independently, and values displayed on the chart are means  $\pm$  SD of the three experiments. Comparison of embryo FCR activities has been repeated 5 times independently, and each experiment consisted in the incubation of 5 embryos in 5 ml assay solution with the usual protocol. Final results are means  $\pm$  SD of the 5 values obtained.

#### v) Quantification of exudates ferrireduction

Exudates consisted in 5 ml milliQ water in which 5 embryos were incubated, representing a total fresh weight of 0.7 to 1 g. For the efflux kinetics, embryos were incubated 10, 20 and 30 minutes or were immersed and removed immediately for the 0 minute time point. 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA and 300  $\mu$ M BPDS were then added to exudates and allowed to react for 1 hour in the dark prior to OD<sub>535</sub> determination. For the comparison of exudates activity with embryo activity, exudates were collected in milliQ water after 30 minutes incubation, and allowed to react with 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA and 300  $\mu$ M BPDS for 1 hour in the dark. In the case of AOX treatment, 1.5 unit of AOX per ml of exudates were added 2 minutes before Fe(III)-EDTA and BPDS addition. In this experiment, embryo ferrireduction activity was quantified following 30 minutes embryo incubation in milliQ water containing 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA and 300  $\mu$ M BPDS, and 1 hour incubation in the dark without embryos. All final values are mean results ± SD of three independent experiments.

#### vi) Kinetics of embryo Fe reduction

In this experiment, individual embryos were incubated in 2 ml assay solution containing 0, 0.15 or 1.5 AOX units per ml.  $OD_{535}$  was determined after 0, 10, 20, 30, 40 and 50 minutes incubation, from 2.5 µl of solution using a Nanodrop 1000 (ThermoScientific). The experiment was carried out with 5 individual embryos per treatment and repeated 3 times. Values are means of the three experiments ± SD.

# vii) <sup>55</sup>Fe accumulation in pea embryos

Embryos of 20 – 50 mg were isolated and weighed as fast as possible after pod harvesting. They were individually disposed in wells of 24 wells plates containing 2 ml of the following solution: 100 mM potassium chloride (KCl), 5 mM calcium sulfate (CaSO4) and 5 mM MES pH = 5.5. Influx was initiated by replacing this solution with influx buffer, that consisted in the same solution supplemented with 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA and 0.2  $\mu$ Ci .ml<sup>-1</sup> <sup>55</sup>Fe. In the BPDS and AOX treated samples, 4 mM BPDS and 1.5 AOX U .ml<sup>-1</sup> were also provided in the uptake buffer. After initiation, embryos were incubated for 40 minutes in the dark at either 30°C or 4°C. The réaction was stopped by rinsing embryos 3 times with an ice-cold solution containing 1 mM KCl, 10 mM EDTA, 1 mM FeCl<sub>3</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgSO4 and 5 mM MES pH = 5.5.

<sup>55</sup>Fe was quantified following PerkinElmer instructions. Embryos were transfered to glass vials and dried for 48 h at 50°C. They were then dissolved in 100  $\mu$ l perchloric acid at 50°C for 24 h. Sample were cleared by adding 200  $\mu$ l hydrogen peroxide and incubated at 50°C until complete bleaching that took around 3 days. 3 ml HionicFluor scintillating cocktail (PerkinElmer) were added to the samples. CPM were measured with a Tri-carb Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer) and converted to DPM by the QuantaSmart software (PerkinElmer) using tSIE/AEC quenching correction. Fe quantity was deduced from the activity of a standard vial containing 10  $\mu$ l uptake buffer and 3 ml HionicFluor. Net influx values were obtained by substracting the quantity of <sup>55</sup>Fe accumulated at 4°C.

Final quantities correspond to the mean ( $\pm$ SE, n = 3) of data obtained with 12 individual embryos from 3 independent experiments.

## e) Bibliography

**Becker R, Manteuffel R, Neumann D, Scholz G** (1998) Excessive iron accumulation in the pea mutants *dgl* and *brz*: subcellular localization of iron and ferritin. Planta **207**: 217-223

**Bienfait HF, Vandenbriel ML** (1980) Rapid mobilization of ferritin iron by ascorbate in the presence of oxygen. Biochimica Et Biophysica Acta **631:** 507-510

Bradbury MWB (1997) Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. Journal of Neurochemistry 69: 443-454

Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL (2000) Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. Genetics 154: 847-856

**Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 5624-5628

**Fisher DB, Cash-Clark CE** (2000) Sieve tube unloading and post-phloem transport of fluorescent tracers and proteins injected into sieve tubes via severed aphid stylets. Plant Physiology **123**: 125-137

Fourcroy P, Vansuyt G, Kushnir S, Inze D, Briat JF (2004) Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the APX1 gene in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiology **134**: 605-613

**Foyer CH, Lelandais M** (1996) A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. Journal of Plant Physiology **148:** 391-398

Gottschalk W (1987) Development of *Pisum* genotypes under long-day and short-day phytotron conditions. Biologisches Zentralblatt 106: 207-218

Green LS, Rogers EE (2004) FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. Plant Physiology 136: 2523-2531

**Grusak MA, Pezeshgi S** (1996) Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the dgl mutant of pea. Plant Physiology **110:** 329-334

**Grusak MA, Welch RM, Kochian LV** (1990) Physiological characterization of a single-gene mutant of *Pisum* sativum exhibiting excess iron accumulation. 1. Root iron reduction and iron uptake. Plant Physiology **93:** 976-981

**Hallberg L, Brune M, Rossander L** (1986) Effect of ascorbic acid on iron absorption from different types of meals. Studies with ascorbic-acid-rich foods and synthetic ascorbic acid given in different amounts with different meals. Human Nutrition Applied Nutrition **40:** 97-113

Hallberg L, Brune M, Rossander L (1989) Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. American Journal of Clinical Nutrition 49: 140-144

Hocking PJ, Pate JS (1977) Mobilization of Minerals to Developing Seeds of Legumes. Annals of Botany 41: 1259-1278

Klatte M, Schuler M, Wirtz M, Fink-Straube C, Hell R, Bauer P (2009) The Analysis of *Arabidopsis* Nicotianamine Synthase Mutants Reveals Functions for Nicotianamine in Seed Iron Loading and Iron Deficiency Responses. Plant Physiology **150**: 257-271

**Kneen BE, Larue TA, Welch RM, Weeden NF** (1990) Pleiotropic effects of *brz* - a mutation in *Pisum sativum* cv-sparkle conditioning decreased nodulation and increased iron uptake and leaf necrosis. Plant Physiology **93**: 717-722

Lane DJR, Lawen A (2008) Non-transferrin iron reduction and uptake are regulated by transmembrane ascorbate cycling in K562 cells. The Journal of Biological Chemistry **283**: 12701-12708

Le Jean M, Schikora A, Mari S, Briat JF, Curie C (2005) A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. The Plant Journal 44: 769-782

Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat JF, Lebrun M, Czernic P (2006) Root-toshoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Journal of Experimental Botany **57:** 4111-4122

Moos T, Nielsen TR, Skjorringe T, Morgan EH (2007) Iron trafficking inside the brain. Journal of Neurochemistry 103: 1730-1740

**Ouerdane L, Mari S, Czernic P, Lebrun M, Lobinski R** (2006) Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOF MS/MS after their isolation by 2D Size-Exclusion – Hydrophilic Interaction LC (SEC – HILIC) monitored by ICP MS. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 21: 676-683

**Patrick JW** (1997) Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**: 191-222

Patrick JW, Offler CE (2001) Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. Journal of Experimental Botany **52:** 551-564

**Pich A, Scholz G** (1996) Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. Journal of Experimental Botany **47**: 41-47

Rautenkranz AAF, Li LJ, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ (1994) Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*hordeum vulgare* cv gerbel) leaves. Plant Physiology **106**: 187-193

**Rellan-Alvarez R, Abadia J, Alvarez-Fernandez A** (2008) Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22: 1553-1562

**Rellan-Alvarez R, Giner-Martinez-Sierra J, Orduna J, Orera I, Rodriguez-Castrillon JA, Garcia-Alonso JI, Abadia J, Alvarez-Fernandez A** (2010) Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long-Distance Transport. Plant and Cell Physiology **51:** 91-102

Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. Nature **397:** 694-697

**Römheld VM, H.** (1983) Mechanism of iron uptake by peanut plants - I. Fe"' reduction, chelate splitting, and release of phenolics. Plant Physiology **71:** 949-954

**Roschzttardtz H, Séguéla-Arnaud M, Briat J-F, Vert G, Curie C** (2011) The FRD3 Citrate Effluxer Promotes Iron Nutrition between Symplastically Disconnected Tissues throughout *Arabidopsis* Development. The Plant Cell **23**: 2725-2737

Santi S, Schmidt W (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. New Phytologist 183: 1072-1084

Sayers MH, Lynch SR, Jacobs P, Charlton RW, Bothwell TH, Walker RB, Mayet F (1973) The Effects of Ascorbic Acid Supplementation on the Absorption of Iron in Maize, Wheat and Soya. British Journal of Haematology 24: 209-218

Schuler M, Rellàn-Alvarez R, Fink-Straube C, Abadia J, Bauer P (2012) Nicotianamine functions in the Phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. The Plant Cell **24**: 2380-2400

Smith CH, Bidlack WR (1980) Interrelationship of dietary ascorbic acid and iron on the tissue distribution of ascorbic acid, iron and copper in female guinea pigs. The Journal of nutrition **110**: 1398-1408

Stacey MG, Patel A, McClain WE, Mathieu M, Remley M, Rogers EE, Gassmann W, Blevins DG, Stacey G (2008) The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. Plant Physiology **146**: 589-601

Tiffin LO, Brown JC (1962) Iron chelates in soybean exudates. Science 135: 311

Van Dongen JT, Ammerlaan AMH, Wouterlood M, Van Aelst AC, Borstlap AC (2003) Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. Annals of Botany **91**: 729-737

**Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. The Plant Cell **14**: 1223-1233



<u>Figure 42:</u> Quantification du fer dans les tissus de pois sauvages (DGV) et mutants (*dgl*). (A) Quantification du fer dans les feuilles, (B) les téguments, (C) les embryons et (D) l'albumen des deux génotypes. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ g par g de masse sèche (MS), et en mM pour l'albumen. Les valeurs correspondent aux moyennes de 3 (téguments, embryons et albumen) à 5 (feuilles) expériences indépendantes ± l'écart-type. Les différences significatives ont été déterminées par un test de Student unilatéral. (\*) p < 0,05; (\*\*\*) p < 0,001.

von Wiren N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC (1999) Nicotianamine chelates both Fe-III and Fe-II. Implications for metal transport in plants. Plant Physiology **119**: 1107-1114

Wapnick AA, Bothwell TH, Seftel H (1970) The relationship between serum iron levels and ascorbic acid stores in siderotic Bantu. British Journal of Haematology 19: 271-276

Waters BM, Blevins DG, Eide DJ (2002) Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. Plant Physiology 129: 85-94

Waters BM, Chu HH, DiDonato RJ, Roberts LA, Eisley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) 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 Physiology **141**: 1446-1458

Waters BM, Grusak MA (2008) Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line *ysl1ysl3*. New Phytologist 177: 389-405

Welch RM, LaRue TA (1990) Physiological characteristics of Fe accumulation in the "bronze" mutant of *Pisum sativum* cv "Sparkle" E107 (brz brz). Plant Physiology **93**: 723-729

Zaharieva TB, Abadia J (2003) Iron deficiency enhances the levels of ascorbate, glutathione, and related enzymes in sugar beet roots. Protoplasma 221: 269-275

# 3) <u>Résultats supplémentaires</u>

# a) Etude de l'accumulation de fer chez dgl

Afin de mieux comprendre le phénotype de *dgl*, le fer a été quantifié dans ses différents tissus, ainsi que dans ceux de pois sauvage DGV (Cf. Figure 42). Les feuilles, téguments, et embryons de DGV contenaient 488 (± 252), 62 (± 10) et 62 (± 1)  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> MS respectivement, et ceux de *dgl* 2748 (± 1075), 241 (± 30) et 149 (± 56)  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> MS respectivement. Les albumens de DGV et *dgl* contenaient respectivement 0,51 et 1,3 mM de fer.

Les quantités de fer étaient beaucoup plus importantes dans les tissus de *dgl* que dans ceux de DGV, c'est-à-dire 5,6, 3,9, 2,4 et 2,5 fois plus élevée dans les feuilles, les téguments, les embryons et les albumens respectivement. Ce qui est en accord avec la littérature concernant ce mutant (Kneen et al., 1990; Marentes et Grusak, 1998). Ces auteurs n'avaient cependant pas quantifié le fer de l'albumen, et la différence de concentration entre DGV et *dgl* n'avait donc pas été observée. Chez DGV, les valeurs obtenues dans les albumens et les embryons étaient très peu variables, ce qui montre que les concentrations de fer arrivant aux embryons sont très finement contrôlées.



Figure 43: Réduction de chélats ferriques *in vitro*. (A) Différentes concentrations d'ascorbate ont été ajoutés à des solutions contenant 100  $\mu$ M de chélats ferriques variés (FeCl<sub>3</sub>, Fe-malate, Fe-citrate, Fe-citrate-malate, Fe(III)-EDTA), 300  $\mu$ M de BPDS, 5 mM de MES à pH 5,5, en absence ou présence d'AOX (1,5 unités par mL). (A) La photos a été prise 1 heure après l'ajout d'ascorbate et (B) après 30 minutes d'exposition à la lumière. (C) Cinétique de la réduction du fer dans les puits contenant 25  $\mu$ M d'ascorbate, du Fe-EDTA et Fe-citrate en présence (+AOX) ou non d'AOX. L'absorbance à 535 nm a été mesuré 0, 30 et 60 minutes après l'ajout d'ascorbate. (D) Réduction spontanée du fer de différents complexes en présence ou absence d'éclairage, en solution contenant du tampon MES pH 5,5, 300  $\mu$ M de BPDS, et 100  $\mu$ M de Fe-EDTA, Fe-citrate ou Fe-citrate-malate.

## **b**) Réduction de chélates ferriques *in vitro*

La réduction du fer de différents chélates ferriques par l'acide ascorbique et la lumière, ainsi que leurs inhibitions par l'AOX ont été étudiées par spectrophotométrie. Des concentrations croissantes d'acide ascorbique (0, 5, 25 et 50  $\mu$ M ) ont été ajoutées à des solutions contenant 100  $\mu$ M de fer et 300  $\mu$ M de BPDS dans 5 mM de tampon MES à pH 5,5. Les mélanges réactionnels ont ensuite été placés à l'obscurité pendant 1 heure (Cf. Figure 43.A), puis exposés à une lumière faible pendant 30 minutes (Cf. Figure 43.B). Les colorations obtenues ont été photographiées avant et après exposition à la lumière. Les concentrations en Fe(II)-BPDS<sub>3</sub> obtenues avec les complexes Fe-citrate et Fe-EDTA à 0, 30 et 60 minutes après ajout de 25  $\mu$ M acide ascorbique sont présentées dans la Figure 43.C.

Avec tous les ligands utilisés, la quantité de fer réduit était d'autant plus importante que la concentration en ascorbate était élevée (Cf. Figure 43.A), ce qui montre que le fer de tous les complexes était réductible par cette molécule. Le fer des complexes Fe-malate était réduit presque instantanément et en totalité par l'ajout de 25 et 50  $\mu$ M d'ascorbate. A l'inverse, les complexes Fe-Citrate-Malate étaient peu réactifs à l'ascorbate. Le Fe chélaté par l'EDTA se comportait comme le fer non chélaté (FeCl<sub>3</sub>), il était bien réductible par l'ascorbate. La réduction était efficacement inhibée par l'AOX pour tous les complexes, et toutes les concentrations d'ascorbate (Cf. Figure 43.B), sauf dans le cas du complexe Fe-malate. L'exposition à la lumière a provoqué la réduction d'une partie du fer de tous les complexes, indépendamment de la présence d'AOX et de la concentration en acide ascorbique. Les plus grandes quantités de fer réduit ont été observées avec les complexes Fe-citrate et Fe-citrate-malate, et la moins forte avec le Fe-EDTA (Cf. Figure 43.D).

A l'échelle d'une heure, et avec une concentration de 25  $\mu$ M d'ascorbate, le fer était plus réductible lorsqu'il était apporté sous forme de Fe-EDTA que sous forme de Fe-citrate (Cf. Figure 43.C). De plus, après 1 heure de réaction, l'inhibition par l'AOX était également plus importante dans le cas du Fe-EDTA (27% du témoin sans AOX) que dans celui du Fe-citrate (77% du témoin).

Les agents chélateurs, en plus de maintenir la solubilité de l'élément chélaté, sont supposés réduire sa réactivité avec les molécules environnantes. Or, contrairement à ce qui était attendu, le fer ionique n'était pas le plus sensible à la réduction, ni par l'ascorbate, ni par la lumière. La molécule ayant la plus forte affinité pour le fer dans notre étude était l'EDTA (log K = 25,7; Furia, 1972). Le fer du complexe Fe-EDTA était cependant réduit efficacement par l'ascorbate. Le fer de tous les complexes était réduit par la lumière par un processus connu de



Figure 44: Le transport du fer diminue au cours du développement des embryons. Les embryons ont été incubés 40 minutes dans une solution d'influx contenant 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA et 0,2  $\mu$ Ci .mL<sup>-1</sup>. Chaque valeur correspond à l'accumulation mesurée dans des embryons individuels.



Figure 45: Accumulation de <sup>55</sup>Fe dans les embryons de pois au cours du temps. Les embryons ont été incubés dans une solution d'influx contenant 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA, 0,2  $\mu$ Ci .mL<sup>-1</sup>, et dans le cas des traitements, 4 mM de BPDS (+BPDS) ou 1,5 unités d'AOX par mL (+AOX). Des incubations à 4°C avec la solution d'influx complète ont aussi été réalisées afin de mesurer l'adsorption passive du fer à la surface des embryons. Chaque valeur correspond à l'accumulation moyenne (± écart-type) mesurée dans au moins 6 jeunes embryons individuels (m = 20 à 50 mg).

photoréduction (Bienfait et Scheffers, 1992). La lumière peut donc avoir une influence importante sur les mesures de réduction du fer sur un intervalle de temps relativement court. Les complexes Fe-citrate et Fe-citrate-malate étaient les plus sensibles à la lumière, et le complexe Fe-EDTA était le moins sensible (Cf. Figure 43.D). La photoréduction avait lieu en présence d'AOX (Cf. Figure 43.B), ce qui implique que cette enzyme n'inhibe que la réduction dépendante de l'ascorbate.

# c) Evolution du transport du fer au cours du développement des embryons

L'accumulation de <sup>55</sup>Fe a été mesurée dans des embryons à des stades de développement relativement précoces (m < 150 mg). L'accumulation moyenne était de 128 (± 35), 57 (±16), et 23 (± 5) nmol .g<sup>-1</sup> MF .h<sup>-1</sup> dans des embryons de 1 à 50 mg, 50 à 75 mg et 75 à 150 mg respectivement (accumulation moyenne de 5 à 8 embryons ± écart-type). Elle était donc d'autant plus faible que la masse des embryons était importante (Cf. Figure 44).

La masse des embryons s'est révélé être le principal facteur de variabilité. D'une part la mesure de scintillation liquide peut-être biaisée par une quantité de matériel et une coloration importantes. D'autre part, il est vraisemblable que l'activité de transport, rapportée à la masse des tissus, diminue au cours du développement, comme cela a été observé avec l'activité de ferriréduction (Cf. Figure 36.B). Dans le cas présent, les mesures de scintillation liquide étaient fiables pour des embryons dont la masse était  $\leq 200$  mg. L'accumulation faible dans les embryons aux stades les plus avancés résultaient donc d'une diminution de leur activité de transport.

# d) Cinétique de l'accumulation de <sup>55</sup>Fe

L'accumulation de <sup>55</sup>Fe dans des embryons individuels a été mesurée après 20 et 40 minutes d'incubation à 30°C et 4°C, dans une solution d'influx contenant 100  $\mu$ M Fe(III)-EDTA, 0,2  $\mu$ Ci .mL<sup>-1</sup>, et dans le cas des traitements, 4 mM de BPDS ou 1,5 unités d'AOX par mL (Cf. Figure 45). Aux deux temps étudiés, les embryons non traités avaient accumulé plus de fer que les embryons traités. À 20 minutes, les embryons incubés dans la solution d'influx seule à 4°C, à 30°C, et en présence d'AOX ou de BPDS avaient accumulé respectivement 10 (± 2), 22 (± 5), 17 (± 2) et 6 (± 1) nmol Fe .g<sup>-1</sup>. Et à 40 minutes, 38 (± 11), 92 (± 25), 47 (± 9) et 16 (± 4)



Figure 46: Le transport d'ascorbate est inhibé par un pH alcalin et une température basse, mais insensible à différents inhibiteurs de canaux anioniques et d'ATPase pompe à protons. (A) Activité de ferriréduction d'exsudats d'embryons incubés dans 20 mM de tampon citrate-phosphate à pH 7 (Cit-PO pH = 7), ou dans 5 mM de tampon MES à pH 5,5, à 25°C (non traités) en absence ou présence de différents inhibiteurs (DIDS, 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonate, 100  $\mu$ M; Acide niflumique, 500  $\mu$ M), ou à 4°C. Les mesures ont été réalisées avec 5 embryons incubés dans 5 mL de tampon MES contenant ou non un inhibiteur. Chaque valeur correspond à la moyenne (± écart-type) de 3 expériences indépendantes. (B) Réduction du fer par l'ascorbate *in vitro*, à des pH variés. Les solutions contenaient 10  $\mu$ M d'acide ascorbique, 100  $\mu$ M de Fe(III)-EDTA dans du tampon MES à 5 mM à différents pH.

nmol.g<sup>-1</sup> respectivement. L'accumulation entre 20 et 40 minutes était plus importante que celle des 20 premières minutes, excepté dans le cas du traitement au BPDS. Ce constat est particulièrement vrai pour les embryons incubés à 30°C en absence de traitement. Le transport était donc plus actif entre 20 et 40 minutes que pendant les 20 premières minutes. Ce résultat est compatible avec l'hypothèse d'un transport dépendant d'une réduction du fer par l'ascorbate, puisque l'ascorbate doit d'abord être efflué, puis réagir avec le fer avant que ce dernier ne soit transporté. Cela explique que pendant les premières minutes d'incubation, en absence d'ascorbate, l'accumulation soit moins rapide.

# e) Influence de différents inhibiteurs sur l'efflux d'ascorbate

Dans le but d'obtenir des informations sur la nature des transporteurs d'efflux d'ascorbate présent à la surface des embryons, nous avons tenté d'inhiber cette activité de différentes manières: 1- à l'aide de molécules inhibitrices de canaux anioniques (DIDS, 4,4'-Diisocyanatostilbene-2,2'-disulfonate; Acide niflumique); 2- en se plaçant à un pH élevé pour casser le gradient de protons (tampon citrate-phosphate à pH 7); 3- en inhibant les processus physiologiques par le froid (4°C). La quantité d'ascorbate effluée a été mesurée comme la capacité de réduction du fer des exsudats d'embryons. Les embryons ont été incubés 30 minutes à l'obscurité, soit dans 5 mM de MES à pH 5,5 en absence d'inhibiteur à 4°C et à 25°C, soit à 25°C en présence d'inhibiteur ou dans 20 mM de tampon citrate-phosphate à pH 7. Les embryons ont ensuite retirés, et 100  $\mu$ M de Fe(III)-EDTA ainsi que 300  $\mu$ M de BPDS ont été ajoutés à la solution. Le mélange a été placé à l'obscurité pendant 1 heure avant mesure de son absorbance à 535 nm (Cf. Figure 46).

Dans le cas des embryons non traités, la réduction mesurée était de 193 (± 51) nmol. g<sup>-1</sup> MF .h<sup>-1</sup>. Dans le cas des traitements au DIDS et à l'acide niflumique, les quantités de fer réduites par les exsudats était de 184 (± 27) et 165 (± 68) nmol. g<sup>-1</sup> MF .h<sup>-1</sup> respectivement. Les réductions mesurées avec les embryons incubés à pH 7 et à 4°C étaient de 20 (± 9) et 29 (± 11) nmol. g<sup>-1</sup> MF .h<sup>-1</sup> respectivement.

Afin d'évaluer un éventuel effet du pH sur la réaction entre l'ascorbate et le fer, nous avons mesuré *in vitro* la réduction du fer par 10  $\mu$ M d'acide ascorbique dans 5 mM de tampon MES à différents pH. La quantité de complexes Fe(II)-BPDS<sub>3</sub> formée était la plus faible (6  $\mu$ M) à pH 3,5, et maximale (19  $\mu$ M) à pH 5,2. Cependant, la réduction du fer par l'acide

ascorbique avait bien lieu à pH 6 et 7, pH auxquels ont été observé respectivement 16 et 17  $\mu$ M de Fe(II)-BPDS<sub>3</sub>.

Aucune différence n'a été observée entre les embryons non traités et ceux traités au DIDS et à l'acide niflumique. Par contre, la capacité réductrice des exsudats était très efficacement inhibée par le pH élevé du tampon citrate-phosphate ainsi que par le froid, puisque les quantités de Fe(II)-BPDS<sub>3</sub> observée correspondaient respectivement à 10 et 15% des valeurs obtenues avec les embryons non traités.

# f) Choix de l'EDTA comme ligand

Dans les expériences présentées ici, nous avons montré que le fer est délivré aux embryons sous forme de complexes de citrate et malate ferriques. Cependant, pour les mesures d'activité de ferriréduction ainsi que d'accumulation de <sup>55</sup>Fe, nous avons délibérément choisi d'apporter le fer sous forme de Fe(III)-EDTA, et ceci pour plusieurs raisons qui sont discutées cidessous.

Il existe un grand nombre de types de citrate ferrique, différents entre eux principalement par le nombre d'atomes de fer et de citrate. Par exemple, Rellan-Alvarez et al. (2010) ont identifié des complexes Fe<sub>3</sub>-citrate<sub>3</sub>, mais en solution aqueuse, des complexes Fe-Cit, Fe-Cit<sub>2</sub> et Fe<sub>2</sub>-Cit<sub>2</sub> peuvent également se former (Fukushima et al., 2012). Les combinaisons avec le malate et le citrate sont encore plus nombreuses. D'une part, il est difficile de contrôler quel(s) type(s) de complexes sont formés lors d'une reconstitution *in vitro*, et d'autre part, la stabilité de ces complexes est impossible à prévoir. De plus, des complexes différents peuvent également posséder des propriétés différentes vis-à-vis de leur réduction et leur transport, comme cela a été montré par Fukushima et al. (2012).

Nous avons comparé la réduction du fer de différents complexes par l'ascorbate, en solution aqueuse, et observé des comportements extrêmement variés. Par exemple, le fer des complexes Fe-Malate était réduit presque instantanément et en totalité par l'ajout d'ascorbate. A l'inverse, les complexes Fe-Citrate-Malate étaient très peu réactifs à l'ascorbate. Le Fe chélaté par l'EDTA était bien réductible par l'ascorbate, et cette réduction était efficacement inhibée par l'AOX. La réduction et l'inhibition par l'AOX étaient également observées avec le Fe-Citrate, mais la réduction était moins importante, et l'inhibition moins prononcée qu'avec l'EDTA sur un temps court. En revanche, sur une période plus longue (10h), une réduction

plus importante était observée pour les complexes Fe-Cit et Fe-Cit-Mal, et uniquement en absence d'AOX (donnée non montrée).

Un autre point important est que les expériences ont lieu, au moins partiellement, en présence de lumière. Et nous avons observé un phénomène de photoréduction du fer, d'une intensité non négligeable à l'échelle d'une dizaine de minutes. La photoréduction du fer des complexes Fe-Mal, Fe-Cit et Fe-Cit-Mal était beaucoup plus importante que dans le cas de l'EDTA. Le complexe Fe-EDTA nous a donc semblé le plus approprié pour des expériences menés sur des temps courts, c'est à dire sur moins d'une heure, et en présence partielle de lumière.

# g) Caractéristiques du transport du fer par les embryons

Pour l'étude d'une activité de transport à l'aide d'isotopes radioactifs, il est nécessaire d'optimiser différents paramètres afin d'estimer de manière fiable la vitesse du transport :

- les caractéristiques des tissus étudiés, en terme de composition chimique pour limiter le quenching des photons du liquide scintillant, et d'activité de transport ;

- l'approvisionnement du substrat, en terme de qualité et de quantité, afin de s'assurer que le transporteur est saturé, et que son activité est maximale ;

- évaluer le bruit de fond provoqué par la fixation du substrat aux parois et la diffusion passive du substrat, à l'aide d'une mesure de l'activité à froid ;

- la durée pendant laquelle ce transport va avoir lieu, pour se placer à un temps de cinétique où ce transport est très actif et linéaire, ainsi que pour obtenir un rapport satisfaisant entre mesure et bruit de fond.

Dans le cas présent, les tissus étudiés sont des embryons isolés. Ils sont donc hors de leur environnement naturel, et leur nutrition n'est plus assurée par l'albumen. Il nous a paru important de travailler sur des temps courts de manière à ce que l'activité observée représente le mieux possible leur comportement *in vivo*.

Nous avons travaillé sur des embryons relativement petits, mais suffisamment gros pour être manipulables à l'œil nu. D'une part parce les embryons jeunes sont plus actifs en terme de réduction et de transport du fer, et d'autre part, ils sont plus facilement dissouts et décolorés lors des traitements inhérents à la mesure de scintillation liquide.

Le substrat est fourni en quantité suffisante pour saturer l'activité de réduction du fer, qui va fournir le substrat au(x) transporteur(s). Cette activité de transport est en effet limitée par la

quantité de fer réduite par les embryons. Dans nos conditions, cette quantité est de l'ordre de 150 à 200 nmol .g<sup>-1</sup> .h<sup>-1</sup>, ce qui restreint notre transport à cette valeur maximale. Après 40 minutes de réaction, la quantité de fer accumulée dans les tissus est proche de la quantité de fer réduite, ce qui signifie que la grande majorité du fer réduit a été transportée. Le transport peut donc difficilement être plus important que celui observé à ce temps de cinétique. De plus, à 40 minutes, la quantité de fer accumulée par les échantillons à 4°C est d'environ 30% de celle accumulée à 30°C, ce qui constitue un rapport entre signal et bruit satisfaisant. Nous avons choisi de fournir le fer sous forme de Fe-EDTA car il est très réactif avec l'ascorbate, et peu sensible à la photoréduction (Cf. Chap 3.3.f; Figure 43.B et 43.D).

#### h) Sur la piste des transporteurs d'ascorbate

Cette étude montre que le transport d'efflux d'ascorbate par les embryons de pois est efficacement inhibé par les basses températures. Le transport observé est donc bien un processus actif, conformément à la loi d'Arrhénius. L'activité de ferriréduction des exsudats est également inhibée de manière très efficace par un pH neutre (pH = 7), et cet effet n'est pas du à une inhibition de la réaction chimique entre l'ascorbate et le fer. Nous pouvons donc conclure que le transport d'ascorbate est inhibé par le pH supérieur à 5. L'activité d'efflux d'ascorbate est donc dépendante d'un gradient de proton. Il a déjà été suggéré que le transport d'ascorbate soit conduit par un gradient de proton (Horemans et al., 1998; Takahama et al., 1996; Rautenkranz et al., 1994), mais dans ces deux études, il s'agissait de transports d'influx. L'absence d'inhibition par le DIDS et l'acide niflumique permet d'écarter l'hypothèse d'un transport par des canaux anioniques.

A ce jour, aucun transporteur d'efflux d'ascorbate n'a été caractérisé. L'efflux d'ascorbate a pourtant été montré dans différents organismes, y compris des cellules humaines (Lane et Lawen, 2008), de rat (Toggenburger et al., 1981), et de cochons d'inde (Siliprandi et al., 1979), ainsi que des vésicules de membranes de haricots (Horemans et al., 1998). Toutes ces études ont mis en évidence une induction de l'efflux d'ascorbate par un apport de déhydroascorbate exogène.

La perspective majeure de cette étude est la recherche de protéines de transport d'efflux d'ascorbate. Compte tenu du peu d'information disponible sur ce type de protéines, les gènes candidats sont très nombreux. Il sera donc nécessaire de cribler ces candidats, ou des collections de mutants et des banques d'ADNc.
Le crible de mutants de pois ne semble pas être une solution adaptée:

- d'une part, le crible doit s'effectuer sur des graines en développement, ce qui exige de cultiver chaque plante jusqu'aux graines, ce qui serait très laborieux;

- d'autre part, le génome du pois n'est pas séquencé et l'identification d'un mutant ne permettra pas nécessairement d'identifier le gène sous-jacent.

Le crible de banque d'ADNc en levure, par exemple par complémentation de la souche  $\Delta fre1$  $\Delta fre2$ , dont les réductases ferriques membranaires sont disruptées, est envisageable. Les microalgues constituent également un modèle très attrayant pour ce crible. Par exemple, *Chlamydomonas reinhardtii* contient de grande quantité d'ascorbate (e.g. en contient 0,2 à 1 mM) et son système de réductase ferrique membranaire est inductible par la carence en fer, ce qui permet un crible sur la base de la réduction du fer extracellulaire par des cellules cultivées en conditions standard, et qui ne devraient donc pas réduire le fer. De plus, il est possible que ces cellules ne possèdent pas de système endogène d'excrétion de l'ascorbate, ce qui est le cas d'autres microalgues telles que la chlorelle (Running et al., 2002), et cette éventualité peut être facilement vérifiée. Et enfin, *C. reinhardtii* peut être transformé génétiquement avec des plasmides contenant les ADNc à cribler (Shimogawara et al., 1997 et Shimogawara et al., 1998). Les gènes identifiés dans ces cribles potentiels pourraient être exprimés en ovocytes de xénopes, afin de valider leur fonction en observant un éventuel efflux d'ascorbate. Ces cribles permettront peut-être d'identifier les premiers transporteurs d'efflux d'ascorbate.

## Chapitre IV

Rôle d'AtFRO2 et AtFRO6 dans le chargement en fer des graines chez *Arabidopsis thaliana* 

## 1) Introduction

#### a) Voies de chargement des graines

Ce chapitre correspond à la recherche de gènes candidats chez *Arabidopsis thaliana*, pour les fonctions impliquées dans le transport du fer vers la graine. Différents gènes impliqués ont été décrits dans le chapitre d'introduction (Cf. Chap I.5.d). Plusieurs auteurs se sont interrogés sur l'origine du fer arrivant aux graines dans différentes espèces végétales. Il peut provenir d'une part, de la remobilisation *via* le phloème, de fer préalablement stocké, et d'autre part de fer récemment prélevé du sol et envoyé directement aux graines par le xylème. Des études menées chez le pois et le lupin (i.e. *Lupinus albus* et *Lupinus angustifolius*) ont montré que seulement 20 à 30% du fer des graines est issu de la remobilisation (Hocking et Pate, 1977) chez ces espèces. Chez *Arabidopsis*, environ 50% du fer accumulé dans les graines proviendrait directement du prélèvement racinaire (Waters, et Grusak, 2008). Or, le fer provenant directement des racines et circulant par le xylème est vraisemblablement lié au citrate. Il existe donc bien deux voies : la voie phloèmienne, dépendante vraisemblablement des transporteurs YSL et par laquelle le fer provenant des tissus sénescents est remobilisé, et la voie xylémienne par laquelle arrive directement le fer prélevé par les racines.

L'important rôle de la nicotianamine dans ce processus a été mentionnée, et illustrée par l'étude des gènes *AtYSL1*, *AtYSL3* et *OsYSL2*. Cependant, le chargement en fer des graines n'est pas limité au transport de complexes Fe-NA par les protéines YSL, et ceci est parfaitement bien illustré avec le transporteur AtOPT3, qui participe au remplissage en fer de la graine mais dont le substrat reste inconnu. L'expression du transporteur de citrate AtFRD3 dans le protoderme des embryons et dans la couche d'aleurone est une preuve supplémentaire que plusieurs voie, symplasmiques et apoplasmiques, contribuent au transport du fer vers la graine.

#### **b)** Implication des réductases ferriques

Chez les plantes de stratégie I, et notamment *Arabidopsis*, les systèmes de transport du fer connus sont basés sur le transport d'ions Fe<sup>2+</sup> par les protéines ZIP, IRT ou NRAMP. À l'exception des complexes Fe-NA, le fer est principalement transporté sous sa forme réduite. Or, le fer en solution a tendance à s'oxyder. Son transport nécessite donc qu'il soit maintenu

Nom	AGI	Induction de l'expression	Territoire d'expression	Localisation subcellulaire	Phénotypes provoqués par une disruption
AtFRO1	At1g01590	Expression faible dans toutes les conditions testées	Tiges, siliques	Voie sécrétoire	Inconnu
AtFRO2	At1g01580	Induction par la carence en Fe	Epiderme de racines, filaments des anthères	Membrane plasmique	Pas d'activité réductase racinaire induite, sensibilité à la carence en fer
AtFRO3	At1g23020	Induction par les carences en Fe et Cu	Racines latérales et coiffe, tissus vasculaires, cotylédons et feuilles	Non publiée, supposée mitochondriale	Inconnu
AtFRO4	At5g23980	Induction par la carence en Cu	Racines et feuilles	Voie sécrétoire	Pas d'induction de l'activité de réduction cuprique racinaire par la carence en cuivre
AtFRO5	At5g23990	Induction par la carence en Cu	Racines et feuilles	Membrane plasmique	Pas d'induction de l'activité de réduction cuprique racinaire par la carence en cuivre
AtFRO6	At5g49730	Induction par l'excès de Cu et par la lumière	Feuilles, fleurs, siliques, feuilles caulinaires	Membrane plasmique	Inconnu
AtFRO7	At5g49740	Pas de régulation connue	Feuilles, fleurs racines, feuilles caulinaires	Chloroplaste	Activité réductase ferrique, et quantité de fer chloroplastique réduites, sensibilité aux pH alcalins
AtFRO8	At5g50160	Induction dans les feuilles sénescentes	Racines, vaisseaux des feuilles, fleurs, siliques	Non publiée, supposée mitochondriale	Inconnu

<u>**Tableau II:**</u> Résumé des informations bibliographiques sur la famille des gènes *FRO* chez *Arabidopsis thaliana.* Les informations sur les territoires d'expression sont tirées de Wu et al. (2005) et Mukherjee et al. (2006). Les informations sur les localisations subcellulaires proviennent de Jeong et al. (2008), Schagerlöf et al. (2006), et de la base de données ARAMEMNON (Schwacke et al., 2003), et de données non publiées mais citées par Jeong et al. (2009). sous sa forme réduite, c'est pourquoi les différents systèmes de réduction ferrique jouent vraisemblablement un rôle très important dans l'homéostasie du fer. De plus, plusieurs études chez différentes espèces ont localisé des locus de caractères quantitatifs (Quantitative Trait Loci; QTL) de quantité de fer dans les graines au niveau de différents gènes *FRO* (Waters et Grusak, 2008b; Blair et al., 2010). Dans cette étude, nous nous sommes donc intéressés à l'implication de la réduction du fer dans le transport du fer vers la graine. Nous avons notamment étudié la présence d'une activité réductase à la surface des embryons d'*Arabidopsis*, et recherché des gènes potentiellement responsables de cette fonction.

Les différents systèmes de réduction du fer connus chez *Arabidopsis* sont présentés dans l'introduction (Chap. I.4.c). Le système le mieux caractérisé est celui des réductases de chélates ferriques membranaire de la famille des FRO. Il s'agit du principal système impliqué dans l'entrée du fer dans les plantes de stratégie I. Les autres systèmes de réduction ont été beaucoup moins étudiés par le passé, et leur implication dans le transport du fer n'a jamais été démontrée chez les végétaux supérieurs.

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient huit gènes codant des protéines FRO. Ces gènes ont été étudiés par plusieurs groupes de chercheurs, et de nombreuses informations concernant leurs territoires d'expression, leurs localisations subcellulaires ainsi que leurs fonctions sont désormais disponibles dans la littérature et sont résumées dans le tableau II. Dans cette partie, nous nous sommes focalisés sur FRO2 et FRO6, pour plusieurs raisons : (*i*) les protéines FRO4 et FRO5 sont principalement impliquées dans l'homéostasie du cuivre (Bernal, et al. 2012), (*ii*) le gène *AtFRO1* n'est virtuellement pas exprimé (Wu et al., 2005; Mukherjee et al., 2006), (*iii*) les protéines FRO3, FRO7 et FRO8, seraient adressées aux mitochondries (FRO3, FRO8, Connolly, ISINIP 2012) ou aux chloroplastes (Jeong et al., 2008), elle joueraient donc une fonction intracellulaire.

#### c) Fonctions d'AtFRO2 et AtFRO6

AtFRO2 est la principale réductase de chélates ferriques racinaire chez *Arabidopsis*. Son importance dans l'entrée du fer dans les racines est très bien illustrée par le phénotype de sensibilité à la carence en fer des plantes dont le gène correspondant a été disrupté, tel que le mutant *frd1-1*. Contrairement aux plantes possédant un allèle fonctionnel, elles sont incapables d'induire leur activité de réduction ferrique racinaire et leur capacité à prélever le



Figure 47: Représentation des gènes *AtFRO6* (A) et *AtFRO2* (B) avec les sites de mutations utilisées dans cette étude.



<u>Figure 48:</u> Vérification de l'absence d'expression des gènes *AtFRO2* et *AtFRO6* dans les mutants *fro2-5* et *fro6* respectivement. L'expression d'*AtFRO2* a été observée dans des racines de plantules sauvages (Col-0) et mutantes (*fro2-5*) cultivées *in vitro*, en conditions standard (+Fe) ou en absence de fer (-Fe). L'expression d'*AtFRO6* a été observée dans les siliques de plantes sauvages (Col-0) et mutantes (*fro6*) cultivées en terreau.



Figure 49: Phénotype macroscopique des mutants *fro6* et *frd1-1*. Les plantes ont été cultivées en terreau et arrosées à l'eau de ville (-Fe) ou avec du Fe-EDDHA (+Fe).

fer d'une solution nutritive est fortement réduite (Yi et Guerinot, 1996). Les mutants cultivés en terreau n'accumulent cependant pas moins de fer dans leurs tissus (Yi et Guerinot, 1996). En condition standard, *AtFRO2* est peu exprimé, mais sa transcription est très fortement induite dans l'épiderme des racines par une carence en fer (Robinson et al., 1999; Connolly et al., 2003; Wu et al., 2005). Ce gène est également exprimé dans les fleurs.

La caractérisation d'AtFRO6 est plus récente et moins détaillée que celle d'AtFRO2. C'est une protéine plasmalemmique (Jeong et al., 2008) exprimée dans la plupart des tissus chlorophylliens et les fleurs (Wu et al., 2005 ; Mukherjee et al., 2006 ; Feng et al., 2006). L'activation du promoteur d'AtFRO6 est régulée par la différentiation cellulaire et la lumière (Feng et al., 2006). La surexpression d'AtFRO6 dans des feuilles de tabac leur confère une activité réductase ferrique importante (Li et al., 2010). Les données disponibles suggèrent que cette protéine pourrait être responsable de l'entrée du fer dans les cellules du mésophylle. Mais à ce jour, aucun mutant « perte de fonction » n'a été isolé et publié. Jeong et al. (2009) ont affirmé que chez des plantes dont le gène AtFRO6 n'est pas fonctionnel, les protoplastes ont une activité réductase ferrique moins importante que ceux de plantes sauvages. Ces auteurs affirment également que les mutants Atfro6 ne présentent aucun phénotype macroscopique particulier. Le rôle de FRO6 dans le transport du fer n'est donc élucidé. La fonction biologique exacte d'AtFRO6 demeure donc inconnue.

#### d) Etude du chargement des graines

Les informations présentes dans la littérature indiquent que FRO2 est responsable de l'entrée du fer dans la plante, et FRO6 serait impliqué dans son entrée dans les cellules des parties chlorophyllienne, ou bien dans sa circulation. La présence de FRD3 de part et d'autre de l'albumen suggère que le fer arrive à l'embryon sous forme de chélate Fe-citrate. Nous avons donc émis l'hypothèse que les FRO pourraient être impliquées dans la réduction du fer à la surface de l'embryon, afin de permettre son entrée par un transporteur de métaux divalents.

Les rôles respectifs d'AtFRO2 et AtFRO6 dans le remplissage de la graine ont été étudiés par différentes approches: génétique inverse, transgénèse, coloration histochimique, et dosage de fer. Dans un premier temps, nous avons isolé des lignées insertionelles pour ces deux gènes, appelées *fro2-5* (GK-055E10), et *fro6* (Salk-099597) respectivement pour *FRO2* et *FRO6* 



**Figure 50:** Activité réductase ferrique de racines du mutant *fro6* et de l'écotype sauvage Col-0. Les valeurs affichées correspondent à la moyenne ( $\pm$  écart-type) de 2 mesures réalisées chacune sur un lot de racines de 5 plantules, cultivées *in vitro* en carence de fer (-Fe) ou en conditions standards (+Fe).



**Figure 51:** Activité réductase ferrique de racines des mutants *frd1-1* et *fro2-5* ainsi que de l'écotype sauvage Col-0. Les valeurs affichées correspondent à la moyenne ( $\pm$  écart-type) de 3 mesures réalisées chacune sur un lot de racines de 5 plantules, cultivées *in vitro* en carence de fer (-Fe) ou en conditions standards (+Fe).

(Cf. Figure 47). Nous avons ensuite quantifié le fer dans les graines produites par chacune de ces plantes, ainsi que par le mutant frd1-1 qui possède un allèle non fonctionnel de FRO2 dans un fond génétique Col-5 gl-1.

Des embryons de plantes sauvages (Col-0) ont été isolés en quantité suffisante pour en extraire les ARN afin d'observer l'expression des gènes *FRO*. Nous avons étudié l'activité des promoteurs de *FRO2* et *FRO6* contrôlant l'expression du gène codant la  $\beta$ -glucuronidase. Les plantes *fro6* n'ayant aucun phénotype macroscopique, nous avons observé la localisation du fer dans leurs tissus.

### 2) <u>Résultats</u>

#### a) Isolation et caractérisation des mutants

Une lignée possédant une insertion T-DNA dans le huitième exon du gène *AtFRO6* a été isolée (Salk-099597). L'insertion conduit à la disruption du gène puisqu'il n'est pas possible d'amplifier de transcrit en pleine longueur (Cf. Figure 48). Ces plantes ne présentent pas de phénotype macroscopique (Cf. Figure 49), et leur activité réductase ferrique racinaire est similaire à celle de l'écotype sauvage Col-0 en termes d'induction par la carence et d'intensité (Cf. Figure 50).

La lignée *fro2-5* (GK-055E10) possède une insertion dans le cinquième exon du gène *AtFRO2* (Cf. Figure 47.B), qui aboutit également à l'absence de production de messager pleine longueur et à une perte de la fonction biologique correspondante. Les plantes *frd1-1* possèdent une mutation formant un codon stop dans le 1<sup>er</sup> exon de *FRO2* (Cf. Figure 47.B). Les plantes de ces deux lignées sont incapables d'induire leur activité réductase racinaire lors de carence en fer (Robinson et al., 1999; Cf. Figure 51). En culture en terreau, cela se traduit par une forte chlorose et une biomasse réduite, qui peuvent être compensés par un apport de fer exogène (Cf. Figure 49).

#### **b)** Quantification du fer

Des plantes, possédant différents allèles non fonctionnels de *FRO2* et *FRO6* à l'état homozygote, ont été produites. Les plantes ont été cultivées en terreau et arrosées à l'eau de ville ou avec du Fe-EDDHA. La quantité de fer des différents tissus a été déterminée par spectrophotométrie (Cf. Figures 52 et 53).

250 Figure 52: Quantification du fer dans les □-Fe С С graines de Col-0, frd1-1, fro2-5 et fro6, □+Fe cultivées en terreau et arrosées à l'eau de 200 ac ville ou avec du Fe-EDDHA. Les ac résultats sont exprimés en µg Fe.g-1 de Fe (µg.g<sup>-1</sup>) 150 graines sèches, et chaque valeur est la а +moyenne (± erreur standard, n=4) de 4 100 mesures réalisées sur des lots indépendants b b de graines récoltées sur 3 à 5 plantes. Les ╉ différences significatives ont été 50 1 déterminées avec un test non paramétrique de comparaison de moyennes multiples de 0 Kruskal-Wallis (p <0,05). Col-0 frd1-1 fro2-5 fro6 В А 350 450 🛛 +Fe 🛛 +Fe а а 🗆 - Fe 400 а 🗆 - Fe 300 350 ab ab 250 Fe (µg.g<sup>-1</sup> MS) Fe (µg.g<sup>-1</sup> MS) 300 200 250 ab 150 200 150 С 100 100 d d 50 50 0 0 Col-0 frd1-1 fro6 Col-0 frd1-1 fro6 C 100 250 🛛 +Fe 🛛 +Fe 🗆 - Fe □-Fe 80 b 200 Fe (µg.g<sup>-1</sup> MS) Fe (µg.g<sup>-1</sup> MS) 60 150 bc 40 100 С b 20 50 0 0 Col-0 frd1-1 fro6 Col-0 frd1-1 fro6

<u>Figure 53:</u> Quantification du fer dans (A) les feuilles de rosettes, (B) feuilles caulinaires, (C) tiges et (D) siliques, d'*Arabidopsis thaliana* sauvage (Col-0), et mutants (*frd1-1* et *fro6*), arrosées à l'eau de ville (-Fe) ou avec du Fe-EDDHA (+Fe). Les valeurs sont exprimées en  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> de matière sèche (MS), et correspondent à la moyenne (± erreur standard, n = 3) de 3 mesures réalisées sur des lots indépendants de graines récoltées sur 3 à 5 plantes. Les différences significatives ont été déterminées avec un test non paramétrique de comparaison de moyennes multiples de Kruskal-Wallis (p < 0,05).

Les graines de plantes arrosées avec du fer contenaient globalement plus de fer que celles des plantes arrosées à l'eau (Cf. Figure 52). Dans ce cas, tous les génotypes contenaient sensiblement la même quantité de fer, c'est-à-dire entre 150 et 190  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> de graines. Aucune différence significative de la quantité de fer entre génotype n'est observée pour ces graines. En revanche, pour le cas des plantes cultivées sans fer, les graines des mutants *frd1-1* et *fro2-5* contenaient respectivement 60 et 56  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup>, soit environ deux fois moins de fer que les graines de plantes sauvages Col-0 ou de celles du mutant *fro6* qui contenaient 109 et 111  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> respectivement. L'analyse statistique des résultats obtenus montre que l'effet du traitement fer n'est pas significatif dans le cas de Col-0, mais qu'il l'est dans le cas des trois mutants *frd1-1, fro2-5* et *fro6*.

Les quantités de fer dans les feuilles de rosettes (Cf. Figure 53.A) de Col-0, *frd1-1* et *fro6*, étaient respectivement de 274 (± 39), 189 (± 57) et 247 (± 40)  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> de matière sèche (MS) dans le cas des cultures arrosées avec du fer, et de 125 (± 29), 71 (± 11) et 81 (± 10)  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> MS dans le cas des plantes arrosées à l'eau. La teneur en fer des rosettes était variable en fonction de la nutrition en fer des plantes. Les rosettes de plantes arrosées avec du fer contenaient globalement plus de fer que celles de plantes arrosées à l'eau de ville. Aucune différence significative entre génotype n'est observée dans ces plantes. En revanche, les rosettes de plantes *frd1-1* et *fro6* arrosées à l'eau de ville contenaient respectivement 71,2 et 81,4  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> MS).

La concentration en fer des feuilles caulinaires de Col-0, *frd 1-1* et *fro6* (Cf. Figure 53.B) était respectivement de 251 (± 36), 271 (± 42) et 349 (± 57) µg Fe .g<sup>-1</sup>MS pour les plantes cultivées avec du fer, et de 118 (± 13), 58 (± 6) et 59 (± 17) µg Fe .g<sup>-1</sup>MS pour les plantes cultivées sans fer. Elle était plus importante dans les plantes arrosées avec du fer que dans celles arrosées à l'eau de ville. Dans le cas des plantes supplémentées en fer, les feuilles de *fro6* contenaient 349 (± 57) µg Fe .g<sup>-1</sup> MS, soit légèrement plus de fer que celles des plantes sauvages qui contenaient 251 (± 35) µg Fe .g<sup>-1</sup> MS. Dans le cas des plantes arrosées à l'eau de ville, les feuilles caulinaires de *frd1-1* et *fro6* contenaient environ deux fois moins de fer que les feuilles de Col-0 (117 µg Fe .g<sup>-1</sup> MS chez Col-0 contre 58 et 59 µg Fe .g<sup>-1</sup> MS chez *frd1-1* et *fro6* respectivement).



**Figure 54:** Activité de ferriréduction d'embryons d'*Arabidopsis thaliana* sauvage (Col-0) aux stades cotylédons recourbés et matures. 10 embryons ont été isolés et incubés soit à 4°C, soit à 25°C, dans 20  $\mu$ L de MES pH = 5,5 contenant 100  $\mu$ M de Fe(III)-EDTA et 300  $\mu$ M de BPDS et à l'obscurité. La DO<sub>535</sub> a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop 1000. Les résultats correspondent aux moyennes de 3 mesures ± erreur standard.

Les quantités de fer dans les tiges étaient de 84 (± 8), 30 (± 14) et 60 (± 14)  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> MS respectivement pour les plantes de Col-0, *frd1-1* et *fro6* cultivées avec du fer, et de 40 (± 13), 32 (± 7) et 28 (± 3)  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup> MS pour les plantes arrosées à l'eau.

La plus importante concentration était observée dans les tiges (Cf. Figure 53.C) de plantes sauvages Col-0 arrosés avec du Fe-EDDHA (i.e. 84  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup>MS). Les tiges de *fro6* cultivé dans les mêmes conditions contenaient légèrement moins de fer (60  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup>MS). Les tiges de *frd1-1*, supplémenté en fer, contenaient seulement 30  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup>MS, soit presque trois fois moins que les tiges de plantes sauvages. De plus, chez *frd1-1*, la concentration en fer des tiges est globalement la même, indépendamment de l'apport de fer. Cela n'est pas le cas des plantes de Col-0 et *fro6*, dont les tiges contiennent moins de fer lorsqu'elles sont arrosées à l'eau (40 et 28  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup>MS respectivement).

Dans les siliques (Cf. Figure 53.D), les quantités de fer étaient de 172, 93 et 95  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup>MS pour les plantes Col-0, *frd1-1* et *fro6* supplémentées en fer, et de 79, 36 et 67  $\mu$ g Fe .g<sup>-1</sup>MS pour celles arrosée à l'eau. En absence d'apport de fer, les siliques de *frd1-1* contenaient deux fois moins de fer que celles de Col-0. L'effet de l'apport en fer sur la concentration des siliques de *fro6* n'était pas significatif.

#### c) Mesure de l'activité de ferriréduction des embryons

Afin de rechercher la présence d'une éventuelle activité de ferriréduction à la surface des embryons d'*Arabidopsis thaliana*, similaire à celle observée chez le pois dans le chapitre précédent, nous avons mesuré la réduction du fer par les embryons d'*Arabidopsis thaliana* au stades cotylédons courbés et matures, à 25°C et à 4°C (Cf. Figure 54). A 25°C, la quantité de fer réduit était de 30 (± 17) fmol. embryon<sup>-1</sup> .h<sup>-1</sup>, et à 4°C, elle était de 4 (± 3) fmol. embryon<sup>-1</sup> .h<sup>-1</sup>. Les embryons d'*Arabidopsis* sont donc également capables de réduire le fer ferrique. La masse d'un embryon d'*Arabidopsis* est de l'ordre de la dizaine de microgrammes (Jako et al.,

2001; Lonien et Schwender, 2009), et l'activité mesuré chez les embryons de pois matures est d'environ 30 fmol . $\mu$ g<sup>-1</sup> . $h^{-1}$  (i.e. 30 nmol . $g^{-1}$  par  $h^{-1}$ ). On peut donc considérer que l'activité de ferriréduction mesurée ici chez *Arabidopsis* est légèrement plus faible, mais dans le même ordre de grandeur que celle mesurée précédemment chez le pois.



<u>Figure 55:</u> Expression des gènes de la famille FRO dans les embryons d'*Arabidopsis thaliana* de types sauvages (Col-0). (A) Amplification des séquences cibles sur les RT d'embryons et (B) sur 5 ng d'ADN génomique.



<u>Figure 56</u>: Analyse histochimique de l'activité GUS dans les siliques (A) et embryons (B) de la lignée d'*Arabidopsis thaliana* transformée avec la construction *promFRO6-GUS* (fournie par Wu et al., 2005).



<u>Figure 57:</u> Analyse histochimique de l'activité GUS dans les racines de plantules en carence en fer (A), en conditions standard (B) et dans les embryons (C) des lignées d'*Arabidopsis thaliana* transformée avec la construction *promFRO2-GUS*.

#### d) Etude de l'expression des gènes FRO dans les embryons

#### *i)* Par RT-PCR semi-quantitative

L'expression des gènes *FRO* a été étudiée dans les embryons en amplifiant par PCR des fragments de chaque ADNc dans des RT d'embryons (Cf. Figure 55), à l'aide d'amorces spécifiques. L'efficacité des amorces a été vérifiée en amplifiant les mêmes séquences cibles à partir d'une matrice de 5 ng d'ADN génomique (Cf. Figure 55.B). Dans les réactions utilisant les RT d'embryons comme matrice (Cf. Figure 55.A), seuls les fragments issus des ADNc de *FRO3*, *FRO7* et *FRO8* ont été amplifiés. A l'inverse, aucune amplification n'était détectable pour les fragments correspondant aux messagers de *FRO1*, *FRO2*, *FRO4*, *FRO5* et *FRO6*.

#### ii) Par construction promoteur-GUS

L'activité des promoteurs de *FRO2* et *FRO6* a été étudiée dans des plantes exprimant le gène *uidA* (*GUS*) sous le contrôle des séquences promotrices de *FRO2* et *FRO6*. La lignée *promFRO6-GUS* a été générée par Wu et al. (2005) et les lignées *promFRO2-GUS* ont été produite dans notre laboratoire (Cf. Chapitre 5.6.d).

Dans la lignée *promFRO6-GUS*, l'activité GUS était très forte dans les feuilles et les siliques (Cf. Figure 56.A). Une activité était visible dans les funicules ainsi que l'albumen des graines. Aucune activité n'a été observée dans les embryons de cette lignée (Cf. Figure 56.B).

Dans la lignée *promFRO2-GUS*, l'activité GUS était principalement présente dans les racines de plantules cultivées en carence en fer (Cf. Figure 57.A). Une très légère coloration était cependant observable dans les racines de plantules cultivées en conditions standard (Cf. Figure 57.B). Aucun marquage n'était visible dans les embryons de ces lignées, même après une incubation prolongée de 24h (Cf. Figure 57.C). Aucune activité GUS n'a été observée dans les embryons pour les deux constructions étudiées. Les promoteurs de FRO2 et FRO6 ne semblent donc pas actifs dans les embryons.

#### e) Etude de la localisation du fer

La fonction de FRO6 a été étudiée plus en détail par coloration histochimique Perls-DAB de coupes de feuilles et de siliques du mutant *fro6* et de l'écotype sauvage Col-0 dont il est issu (Cf. Figures 58 à 63).



<u>Figure 58</u>: Coloration histochimique d'une coupe transversale de silique d'*A. thaliana*, écotype Col-0. Seules certaines cellules sont marquées en gris, ce qui indique une hétérogénéité de la concentration en fer. On remarque la présence de nombreux points très concentrés en fer (P) correspondant à des plastes ou à des noyaux.



<u>Figure 59</u>: Coloration histochimique d'une coupe transversale de silique du mutant *fro6* d'*A*. *thaliana*. Le marquage des cellules est hétérogène. Les points concentrés en fer (P) dans les structures intracellulaires sont peu nombreux.

Dans les coupes de ces deux génotypes, on observe un marquage diffus dans les cytoplasmes de certaines cellules. Les structures intracellulaires (i.e. chloroplastes et noyaux) sont très marquées chez Col-0 (Cf. Figures 58 et 60), et moins chez *fro6* (Cf. Figures 59 et 61). Dans les coupes de feuilles, un marquage fort et diffus est observable dans les espaces intercellulaires (e.g. chambre sous stomatique) chez le mutant uniquement (Cf. Figure 61). Au niveau des embryons (Cf. Figures 62 et 63), seules les vacuoles de l'endoderme sont marquées, et aucune différence de localisation du fer n'est visible entre les deux génotypes.

L'étude de la localisation intracellulaire du fer chez *fro6* et Col-0 a permis de mettre en évidence deux différences entre ces deux génotypes: d'une part, les chloroplastes et noyaux de *fro6* sont moins marqués que ceux de Col-0, et d'autre part, les espaces intercellulaires sont colorés chez *fro6* mais pas chez Col-0. L'accumulation de dépôts de fer dans l'espace intercellulaire chez *fro6* peut résulter d'un défaut d'entrée dans les cellules. Ce résultat est compatible avec un rôle d'AtFRO6 dans l'entrée du fer dans les cellules du mésophylle. Les cellules du mutant contiennent tout de même du fer en quantité suffisante pour assurer la plupart de leurs fonctions essentielle, puisque les plantes *fro6* sont en bonne santé. Il est toutefois surprenant qu'un tel défaut de localisation du fer ne conduise pas à un phénotype visible, et notamment à une sensibilité à la carence en fer accrue.

Plusieurs explications sont possibles pour justifier que la disruption de *fro6* n'entraîne pas une diminution de la concentration en fer intracellulaire:

- sa fonction peut être redondante avec un autre mécanisme de réduction du fer impliqué dans
l'entrée du fer dans les cellules, comme l'ont suggéré Jeong et al. (2008) et Li et al. (2010);

- la disruption de la fonction n'est pas complète dans la lignée utilisée, le T-DNA étant inséré en aval des sites actifs. L'ARNm tronqué pourrait aboutir à la production d'une protéine moins performante mais néanmoins toujours capable de réduire le fer ;

- il existe peut-être une autre voie d'entrée du fer dans ces cellules, qui ne dépendrait pas de la réduction du fer.

Le marquage des noyaux et chloroplastes moins important chez *frob* peut être interprété comme la conséquence de ce défaut d'entrée du fer. En effet, si la quantité de fer qui pénètre dans les cellules de *frob* est moins importante, il est probable que les organelles de ces cellules reçoivent également moins de fer.



<u>Figure 60:</u> Coloration histochimique d'une coupe transversale de feuille de rosette d'*A. thaliana*, écotype Col-0. Certaines structures intracellulaires sont bien marquées et la présence de fer est restreinte à ces structures. Aucun marquage n'est visible dans les espaces intercellulaires (I).



<u>Figure 61</u>: Coloration histochimique d'une coupe transversale de feuille de rosette du mutant *fro6* d'*A. thaliana.* Peu de structures intracellulaires sont bien marquées et le marquage intracellulaire est diffus. Les espaces intercellulaires (I) sont parsemés de dépôts de fer.

Cependant, le marquage cytosolique est également différent chez les deux génotypes étudiés. Ce marquage est très homogène chez Col-0, ce qui n'est pas du tout le cas chez *fro6* où ce marquage est présent mais assez hétérogène à l'intérieur d'une même cellule. En effet, dans les cellules de *fro6*, le marquage est assez prononcé en périphérie des cellules, autour des vacuoles. Chez Col-0, le marquage est clairement localisé dans les plastes et les noyaux, et très concentré en certains points qui correspondent vraisemblablement aux ferritines et aux nucléoles. Or, ces structures sont moins marquées chez *fro6*. On peut donc penser que le marquage diffus observé en périphérie des cellules de *fro6* est la conséquence d'une accumulation de fer due à un défaut d'entrée du fer dans ces organelles. Cela implique que la fonction de FRO6 ne se limiterait pas à permettre l'entrée du fer dans les cellules, mais que cette protéine jouerait également un rôle dans la distribution du fer. On peut supposer en effet, que si le fer n'est pas réduit par FRO6 pour entrer dans les cellules du mésophylle, alors il circule difficilement jusqu'aux plastes et aux noyaux.

### 3) Discussion

Dans ce chapitre, nous avons étudié le rôle d'AtFRO2 et AtFRO6 dans le transport du fer vers les graines. Aucune différence de concentration en fer des graines n'était visible entre *fro6* et son sauvage Col-0, alors qu'une grande différence était visible chez les lignées *frd1-1* et *fro2-5* possédant des allèles non fonctionnels de *FRO2*. En effet, les plantes *frd1-1* et *fro2-5* arrosées à l'eau de ville contenaient environ deux fois moins de fer que les graines de Col-0. Cette différence n'a pas été observée dans les plantes arrosées avec du Fe-EDDHA. Nous avons d'abord pensé que cette différence était due à un défaut d'entrée du fer dans les plantes possédant un allèle de *FRO2* disrupté, conduisant à une quantité moindre de fer dans tous ses tissus. Cependant, nous ne pouvions exclure un autre rôle de FRO2 dans le transport du fer vers les graines, et notamment l'entrée du fer dans les embryons.

Nous avons pu mettre en évidence que ni *FRO2* ni *FRO6* ne s'expriment dans les embryons, par RT-PCR ainsi que par des lignées exprimant le gène de la GUS sous le contrôle de leurs promoteurs respectifs. Par conséquent, nous avons conclu qu'aucun de ces deux gènes n'est impliqué directement dans le transport du fer par les embryons. Ces embryons sont pourtant capables de réduire le fer et l'expression de *FRD3* dans le protoderme et la couche aleurone suggère que le fer soit chélaté par le citrate dans l'albumen de cette espèce. Il est donc tout à



<u>Figure 62</u>: Coloration histochimique d'une coupe de graine en développement d'*A. thaliana*, écotype Col-0. Le fer est très majoritairement localisé dans les vacuoles de l'endoderme, autour des vaisseaux.



<u>Figure 63:</u> Coloration histochimique d'une coupe de graine en développement du mutant *fro6* d'*A. thaliana.* Le fer est localisé dans les vacuoles de l'endoderme, autour des vaisseaux.

fait légitime de proposer que le transport du fer par les embryons d'*Arabidopsis* s'effectue de la même manière que chez le pois. C'est-à-dire qu'il s'agirait d'un transport d'ion ferreux à la suite d'une réduction de citrate ferrique par de l'ascorbate fourni par les embryons.

Il semble clair que le rôle de FRO2 soit uniquement lié à l'entrée du fer dans les racines, et au remplissage des graines par la voie xylémienne. Ainsi, la différence de concentration en fer des graines, observée entre les plantes sauvages Col-0 et les plantes mutantes, *frd1-1* et *fro2-5*, est vraisemblablement causée par une entrée moins importante de fer dans les plantes mutantes. De plus, l'irrigation des plantes avec du Fe-EDDHA permet d'éliminer le défaut de chargement des graines, ce qui indique que lorsque *FRO2* est disrupté, le facteur limitant le transport du fer vers les graines est bien le transport racinaire. L'importance de l'absorption racinaire pour le chargement du fer dans les graines chez *Arabidopsis* a déjà été démontrée (Waters et Grusak, 2008a), et l'implication de la réduction du fer par les racines avait déjà été suggérée (Grusak, 1995). Et dans la présente étude, une altération de cette absorption conduit à une réduction de la quantité finale de fer dans les graines.

Le mutant *ysl1 ysl3*, incapable de remobiliser le fer de ses organes sénescents accumule moins de fer que les plantes sauvages dans ses graines. Cependant, ce mutant présente également une activité réductase ferrique racinaire plus faible (Waters et al., 2006), et donc son défaut de chargement des graines n'est pas entièrement imputable à un problème de remobilisation. Nos conclusions sont similaires à celles de Waters et Grusak (2008a) qui ont étudié de manière détaillée la répartition du fer dans les différents organes d'*Arabidopsis*. C'est-à-dire que au minimum 50% du fer des graines proviendrait directement de l'absorption racinaire et que la remobilisation, bien que non négligeable, participerait en moindre mesure à ce processus.

De nouvelles informations sur la fonction de FRO6 ont été apportées. La disruption de ce gène n'a eu aucune influence sur le transport du fer vers les graines qui contiennent autant de fer que les graines de plantes sauvages, et qui sont parfaitement viables. De plus, aucun défaut de localisation du fer dans les graines n'a été observé. FRO6 n'est donc pas impliqué dans le transport du fer vers les graines. Cependant, un défaut de localisation du fer dans les cellules de mésophylle et de siliques a été mis en évidence. L'accumulation de fer dans les espaces intercellulaires, ainsi que la présence de fer moins importante dans les noyaux et plastes de *fro6*, suggèrent que FRO6 joue effectivement un rôle dans l'entrée du fer dans ces cellules (Cf.



Figure 64: Vue d'ensemble du transport et de la circulation du fer dans les cellules du mésophylle d'*Arabidopsis thaliana*. (A) Hypothèse d'une réduction du fer de l'apoplasme par FRO6, et transport par une protéine IRT. (B) Hypothèse d'une réduction du fer par efflux d'ascorbate, et régénération du déhydroascorbate soit à la surface externe de la membrane plasmique, soit à l'intérieur des cellules. (C) Hypothèse du maintien d'un pool cytosolique de fer ferreux par l'ascorbate. (D) Remobilisation du fer stocké par les ferritines, induite par l'ascorbate.

Figure 64.A), comme l'ont proposé Jeong et al. (2008). L'accumulation de fer en périphérie ainsi qu'à l'intérieur des cellules de *fro6*, montre que son rôle ne se limite pas à permettre l'entrée du fer dans les cellules. En effet, la réduction du fer par FRO6 est également importante pour la distribution intracellulaire du fer. Cependant, les plantes portant un allèle non fonctionnel de *FRO6* ne présentent aucun signe de carence en fer. Des résultats similaires ont été obtenus avec le triple mutant *fer1 fer3 fer4* dans notre laboratoire (Roschzttardtz et al., article en préparation). Les cellules de ce mutant accumulent de grandes quantités de fer dans leurs apoplasmes, sans qu'aucun phénotype ne soit visible. En effet, ce mutant qui ne présente aucun signe de chlorose et est très légèrement sensible à un excès de fer (Ravet et al., 2009), a pourtant un problème majeur de localisation du fer dans ses feuilles.

Il semble qu'il existe d'autres voies d'entrée du fer dans ces types cellulaires, car la quantité de fer arrivant aux organelles des cellules de fro6 est suffisante à leur bon fonctionnement. Ces voies peuvent dépendre d'autres membres de la famille FRO, par exemple FRO4 ou FRO5 qui sont exprimés dans les feuilles (Wu et al., 2005), et sont capables de réduire le cuivre à la surface des racines (Bernal et al., 2012). D'autres systèmes de réduction, tels que les cytochromes ou l'ascorbate, peuvent également compenser la disruption de FRO6. Le système de réduction des cellules du mésophylle pourrait être par exemple similaire à celui étudié dans le chapitre précédent dans les embryons de pois. En effet, ces cellules qui contiennent des concentrations de l'ordre du millimolaire d'ascorbate sont probablement capables d'en exporter quelques micromolaires vers l'apoplaste afin de catalyser la réduction du fer et permettre son absorption (Cf. Figure 64.B). Le mouvement de l'ascorbate du cytosol vers l'apoplaste a d'ailleurs été observé à plusieurs reprises (Luwe et al., 1993 ; Takahama, 1998). Le rôle de l'ascorbate dans le transport du fer devient de plus en plus évident, ce qui est très bien illustré dans un travail mené récemment chez la microalgue Chlamydomonas reinhardtii, qui montre une forte accumulation d'ascorbate ainsi que l'induction des gènes de biosynthèse et de recyclage de l'ascorbate dans des cellules carencées en fer (Urzica et al., 2012). On peut imaginer que l'ascorbate facilite la circulation du fer dans les cellules en le maintenant sous forme réduite (Cf. Figure 64.C) ou bien qu'il permette de remobiliser le fer stocké par les ferritines (Cf. Figure 64.D) comme cela a été montré par Bienfait et Von den Briel (1980).

## 4) Perspectives

Cette étude a apporté une nouvelle preuve que le fer des graines provient majoritairement d'un remplissage d'un apport constant par les racines. Il est peu probable que FRO2 puisse influencer le chargement des graines dans d'autres tissus.

FRO6 n'est vraisemblablement pas impliqué dans le transport vers les graines. Par contre, il semble effectivement être en partie responsable de l'entrée du fer dans les cellules des tissus chlorophylliens, ainsi que dans la distribution du fer aux organites de ces cellules. Dans un premier temps, pour confirmer les résultats observés dans cette étude, il est nécessaire d'isoler des plantes portant un nouvel allèle non-fonctionnel de *FRO6*, ou de restaurer l'expression d'une version sauvage du gène dans le mutant *fro6*.

Il serait intéressant de confirmer le rôle de FRO6 par d'autres approches, comme par exemple en comparant l'activité de réduction ferrique des protoplastes du mutant *fro6* et de plantes sauvages. La mesure de cette activité est toutefois problématique. En effet, lors de l'isolation de protoplastes, tous ces protoplastes ne sont pas intacts. Et une fois en solution, la membrane plasmique de nombreux protoplastes peut se rompre. Or, les cellules d'*Arabidopsis* contiennent des concentrations en ascorbate de l'ordre d'une à plusieurs dizaines de millimolaires dans le cytosol et les chloroplastes (Rautenkranz et al., 1994; Foyer et Lelandais, 1996; Conklin et al., 2000), et cette molécule est capable de réduire le fer (Grinstead, 1960; Römheld et Marschner, 1983; Buettner, 1986). Les mesures d'activité réductase ferrique de protoplastes seront donc soumises à un bruit de fond important. Il sera nécessaire de quantifier l'ascorbate dans les feuilles de rosette de *fro6* et Col-0, d'une part pour pouvoir mesurer l'activité réductase ferrique des protoplastes de manière fiable, et d'autre part pour déterminer si l'ascorbate joue un rôle dans l'entrée et la distribution du fer dans les cellules du mésophylle.

La nature du fer des dépôts observés chez le mutant *fro6* reste inconnue. L'analyse de sa spéciation à l'aide de techniques spectroscopiques apporterait de plus amples informations sur la fonction de FRO6. Et la comparaison avec les dépôts de fer apoplasmique observé chez *fer1 fer3 fer4* serait pertinente afin de mieux comprendre les différentes étapes menant à l'entrée du fer dans les cellules du mésophylle.

## Chapitre V :

# Conclusions et discussion générales



Figure 65: Schéma intégratif du transport du fer dans les plantes, de l'échelle de la plante entière à l'échelle subcellulaire. (A) Prélèvement du fer dans le sol et circulation longue distance. (B) Transport du fer dans les cellules du mésophylle. (C) Transport du fer dans les graines.

Dans ce chapitre, nous avons intégré les différentes conclusions des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, de l'échelle de la plante, au niveau intracellulaire. Les nouvelles questions apportées par ces résultats sont également représentées. Nous avons aussi pris en compte les informations bibliographiques récentes sur le transport du fer dans les plantes, sa spéciation, et les mécanismes potentiellement impliqués dans sa distribution tissulaire et intracellulaire. Toutes ces informations sont représentées de manière simplifiée dans la figure 65.

Au niveau des racines, les transporteurs AtIRT1 ou PsRIT1, respectivement chez Arabidopsis et le pois, sont impliqués dans l'entrée du fer dans les racines (Vert et al., 2002; Cohen et al., 2004). Ces protéines transportent du fer ferreux. Leur activité est donc couplée à celles des réductases de chélates ferriques, AtFRO2 et PsFRO1 (Robinson et al., 1999; Waters et al., 2002), qui sont capables de transférer un électron au fer des différents complexes présents dans le sol. Cette réaction provoque la dissociation du fer de son ligand, et le fer se trouve alors sous forme d'ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>), substrat d'AtIRT1 et PsRIT1. La mobilisation du fer de la rhizosphère est facilitée par extrusion de protons qui est assurée par AtAHA2 chez Arabidopsis (Santi et Schmidt, 2009). Ces processus sont régulés en fonction des besoins de la plante, par des signaux envoyés des parties aériennes vers les racines (Grusak et Pezeshgi, 1996). Les acteurs de ces mécanismes de régulation ne sont pas entièrement connus, mais il est admis que chez Arabidopsis, ces signaux aboutissent à l'activation de la transcription des gènes AtIRT1, AtFRO2 et AtFRD3 par le facteur de transcription AtFIT1 (Colangelo et Guerinot, 2004). Plusieurs autres facteurs de transcription de la famille des bHLH (Cf. Chapitre I.4.c) sont impliqués dans la régulation de ces gènes. Ces mécanismes existent également chez le pois mais sont moins bien connus (Grusak et Pezeshgi, 1996 ; Waters et al., 2002 ; Cohen et al., 2004).

Le fer peut ensuite circuler jusqu'au péricycle, tissu depuis lequel il est chargé dans le xylème par des transporteurs non identifiés. Il est clair, en revanche, que le citrate est chargé par la protéine de la famille des MATE, AtFRD3 (Durett et al., 2007 ; Roschzttardtz et al., 2011). Une fois dans le xylème, le fer peut se fixer spontanément à différents acides organiques, et former notamment des complexes Fe-citrate. Ces complexes, portés par le flux transpiratoire, peuvent ensuite circuler librement jusqu'aux feuilles, aux fleurs et aux fruits. Le fer arrive également à ces différents organes puits, sous forme de complexes avec la nicotianamine Fe-

NA (Klatte et al., 2009; Schuler et al., 2012). Il est vraisemblable que ces derniers circulent par le phloème et proviennent des tissus sénescents, et sont probablement chargés dans le phloème par les transporteurs AtYSL1 et AtYSL3 (Le Jean et al., 2005 ; Waters et al., 2006). Le fer arrive donc aux cellules du mésophylle sous forme de deux espèces chimiques, et les protéines qui régissent leur entrée sont inconnues. Le fer ionique est susceptible d'être piégé par les parois qui sont très chargées négativement. Le transport du fer de l'apoplasme vers le cytosol des cellules du mésophylle est peu connu. Les données disponibles sur AtIRT3 sont compatibles avec un rôle dans ce processus (Lin et al., 2009; Shanmugam et al., 2011), mais d'autres transporteurs pourraient être impliqués. Plusieurs études, dont la présente, suggèrent une réduction du fer apoplasmique par AtFRO6. Cette réductase pourrait ainsi fournir le fer ferreux aux transporteurs. Cependant, l'étude du mutant fro6 montre que la réduction ferrique est également assurée par d'autres mécanismes. Sur la base de la connaissance d'efflux d'ascorbate, ainsi que de sa présence dans l'apoplasme de différentes espèces, nous avons proposé l'existence d'un mécanisme de réduction dépendant d'un efflux par les cellules du mésophylle. L'ascorbate oxydé (i.e. déhydroascorbate) par cette réaction peut ensuite être régénéré, soit à l'intérieur des cellules par consommation de glutathion via le cycle de Halliwell-Asada, soit directement dans l'apoplasme.

Une fois dans le cytosol, le fer tend à s'oxyder. Il est possible que l'ascorbate, présent en grande quantité dans ce compartiment, maintienne ce pool de fer sous forme réduite. Le maintien du fer ferreux pourrait faciliter sa chélation par la NA, qui est le ligand le plus favorable dans les conditions cytosoliques. Comme cela a été montré dans les embryons d'*Arabidopsis*, le fer peut être stocké dans les vacuoles après son transport par AtVIT1 (Kim et al., 2006) puis remobilisé par les transporteurs NRAMP3 et NRAMP4 (Lanquar et al., 2005). Ces mécanismes n'ont jamais été observés chez le pois. Ici encore, le transport du fer par NRAMP3 et 4 peut nécessiter une étape de réduction. Les cytochromes b561, et les FRO non caractérisées, sont des candidats de choix pour accomplir cette fonction.

Les mitochondries transportent le fer sous forme d'ions ferreux, par le transporteur MIT1 (Bashir et al., 2011), suite à une étape de réduction qui est probablement assurée par FRO3 ou FRO8 (Connolly, ISINIP 2012).

Le fer en excès est séquestré dans les plastes. L'entrée du fer dans les plastes est dépendante de la réductase FRO7 (Jeong et al., 2008), et peut-être de la perméase PIC1 (Duy et al., 2007; Duy et al., 2011). Le fer peut être stocké sous forme de multimères de ferritines, puis

remobilisé en cas de besoin. L'ascorbate est capable d'induire la libération de ce fer (Bienfait et Van den Briel, 1980; Baader et al., 1994), et cette molécule est également très représentée dans les chloroplastes. L'efflux de fer des chloroplastes est, au moins en partie, mis en œuvre par efflux de Fe-NA par YSL4 et YSL6 (Divol et al., en préparation).

Un des principaux résultats de cette thèse est l'observation de concentrations très élevées de fer dans les noyaux, et notamment les nucléoles (Cf. Chapitre II ; Roschzttardtz et al., 2011a). Ce pool de fer est constitué de fer oxydé et réduit. Les voies de transport du fer jusqu'à ce sous compartiment du nucléoplasme sont totalement inconnues. Compte tenu des dégâts qu'une telle quantité de fer pourrait causer aux acides nucléiques, ce processus doit être contrôlé.

La fonction du fer dans le nucléole est parfaitement inconnue, et les possibilités sont multiples : il pourrait jouer un rôle catalytique en tant que cofacteur d'enzymes, un rôle structural, ou être impliqué dans la régulation du statut redox du noyau. L'hypothèse d'un rôle structural est peu vraisemblable compte tenu de l'absence de fer dans les nucléoles de certains tissus (e.g. pollen; Roschzttardtz et al., en préparation). Le rôle du fer en tant que cofacteur de plusieurs protéines nucléaires est bien établi (Cf. Chapitre I.3.a ; Dowling et al., 2010 ; Wu et Brosh, 2012) mais il est difficile d'imaginer qu'il soit à l'origine d'une telle concentration, localement, dans le nucléole. La dernière hypothèse évoquée concerne un rôle du fer dans la régulation du statut redox du noyau. Le cycle cellulaire est régulé par le statut redox cellulaire (Atzori et al., 1990; Davies, 1999; Hirt, 2000), et la transition entre les phases G1 et S est déclenchée par un événement d'oxydation (Menon et al., 2003). Le glutathion semble être un des acteurs importants de ces variations de statut redox (Vivancos et al., 2010), et que son rôle dépend de son recrutement dans le noyau en fin de phase G1. Connaissant l'interdépendance du glutathion et l'ascorbate, ainsi que la localisation du fer dans les noyaux, on peut imaginer que le fer et le glutathion agissent ensemble pour orchestrer les évènements d'oxydation et de réduction ayant lieu dans les noyaux de cellules végétales.

La graine est approvisionnée en fer à la fois par le xylème et le phloème, c'est à dire par une voie apoplasmique et une voie symplasmique respectivement. L'apport de la sève du xylème provient directement de l'absorption racinaire, suivi par le chargement du fer et du citrate dans le xylème, et la formation de complexes Fe-citrate. En régulant leur absorption racinaire, les plantes contrôlent non seulement la quantité de fer prélevée dans le sol, mais également
l'approvisionnement des graines par la voie apoplasmique. En effet, nous avons montré dans cette étude que la diminution de l'absorption racinaire chez les mutants *Atfrd1-1* et *Atfro2-5*, ou son augmentation chez le mutant de pois *dgl*, entraînent toutes deux des fortes variations de teneur en fer des graines. Et ces variations sont dues à la perturbation de l'approvisionnement par les tissus maternels, plutôt qu'à la dérégulation de l'absorption par les tissus filiaux.

Le fer du phloème est fourni par les plus vieilles feuilles, sous forme de complexes Fe-NA qui sont ensuite acheminés jusqu'aux téguments des graines en développement. En conditions de nutrition en fer suffisante, il est probable que les voies apoplasmique et symplasmique contribuent de manière équivalente à l'approvisionnement des graines (Grusak et Waters, 2008). Cependant, lorsque le fer est limitant, la contribution de la voie apoplasmique devient plus importante : elle va déterminer d'une part la quantité de fer envoyée directement des racines aux graines par le xylème, et d'autre part la quantité de fer accumulée dans les tissus au cours de la croissance de la plante, qui constitue le pool de fer remobilisable.

Le fer des voies symplasmique et apoplasmique doit ensuite être déchargé dans de manière active dans l'albumen (Van Dongen et al., 2003). Les acteurs moléculaires de ce transport demeurent inconnus. En revanche, il est probable que chez *Arabidopsis*, le citrate est transporté par la protéine FRD3 qui est produite dans les cellules de la couche à aleurone (Roschzttardtz et al., 2011b) joue un rôle dans ce processus. Les embryons peuvent également effluer du citrate vers l'albumen, *FRD3* étant exprimé dans leur protoderme.

Dans le troisième chapitre de cette thèse, nous avons montré chez le pois, qu'une fois dans l'albumen, les ions ferriques s'associent au citrate et au malate pour former différents types de complexes. Une petite proportion de ce pool de fer est réduite par l'ascorbate, réaction qui produit donc des ions ferreux qui peuvent être directement transportés par l'embryon. Cet ascorbate est fourni, au moins en partie, par les embryons. La régénération de l'ascorbate oxydé par cette réaction n'a pas encore été étudiée.

Après son entrée dans les cellules des embryons, le fer est acheminé aux différents puits et notamment jusqu'aux nucléoles des noyaux par des mécanismes inconnus. Chez le pois, le fer va rester dans les nucléoles de manière permanente, jusqu'à la maturation complète des graines. Le fer excédentaire est stocké dans les plastes sous forme de complexes avec les ferritines. En contraste, dans les embryons d'*Arabidopsis*, le pool de fer nucléolaire n'est visible

que dans les premiers stades de développement, jusqu'au stade torpille, puis il disparaît progressivement. En parallèle, les vacuoles de l'endoderme vont se charger en fer. Au stade mature, le fer des nucléoles n'est plus détectable, et il n'est visible que dans ces vacuoles (Roschzttardtz et al., 2009).

Pour conclure, les résultats de cette thèse apportent de nouvelles informations sur le chargement du fer dans les graines, son transport par les embryons, ainsi que sur sa distribution subcellulaire. Ces résultats soulèvent également de nombreuses questions nouvelles, concernant notamment le rôle de l'ascorbate dans le transport et l'homéostasie, la nature et la fonction du fer nucléolaire, et son acheminement vers le nucléole.

# Chapitre VI:

## Matériels et méthodes

	(V)	(V)
+Fe		
-Fe		
	DGV (WT)	dgl (mutant)

Figure 66: Embryons et feuilles de lignée de pois DGV (sauvage) et dgl (mutant). Les embryons ont été colorés au ferrocyanure de potassium (Perls) afin de révéler la présence de fer. Les feuilles du mutant dgl sont plus petites et présentent des spots nécrotiques lorsque du fer leur est administré.

Génotype	Gène muté	Ecotype	Référence
frd1-1	At1g01580	Col-5 (gl1)	Robinson et al., 1999
fro2-5	At1g01580	Col-0	GK-055E10
fro6-1	At5g49730	Col-0	Salk_099597

T	<u>ableau</u>	III:	Lignées	mutantes	ď	' Arabidop.	sis	thaliana
---	---------------	------	---------	----------	---	-------------	-----	----------

Nom	Gène cible	Lignées	Séquence (5' - 3')
GK8409	bordure gauche du pAC161	GABI-KAT	GGCAGGATATATTCAATTGTAAAT
oLBb	bordure gauche du pROK2	Salk	CCACCATCAAACAGGATTTTCG
QFRO6-F	A+5 ~ 10730	Salk_099597	GCTACCACGGACCAACGGATG
F6 3'UTR	2115849750		GTCCAATGTAGAAACACCAACAAG
F2 3000 F	1+1-01590	GK-055E10	CGGAAACATATGTTTGGCGTT
FRO25 RP	2111201380		GGAGGATAGTTCAGTCTCAAGACC

Tableau IV: Amorces utilisées pour le génotypage des lignées mutantes

## 1) Matériel végétal

## a) Génotypes étudiés

Dans cette étude, deux génotypes de pois (*Pisum sativum* L.) ont été utilisés: une lignée sauvage (cv DGV) et une lignée mutante (*dgl*) générée à partir de DGV par mutagénèse induite par rayons X (Gottschalk, 1987). Le mutant *dgl* présente une activité réductase ferrique racinaire constitutivement élevée, et accumule des concentrations élevées en fer dans ses tissus. Ce mutant est très sensible à l'excès de fer (Cf. Figure 66).

Les lignées d'*Arabidopsis thaliana* mutantes (Cf. Tableau III) ont été fournies par le NASC (Nottingham European *Arabidopsis* Stock Center, Royaume-Uni), le Salk Institute (San Diego, USA) ou GABI-Kat (Max Planck Institute, Bielefeld, Allemagne). Le fond génétique des lignées mutantes était Col-0 à l'exception du mutant *frd1-1* qui provient d'un fond génétique Col-5 (*glabrous-1*). Les plantes ont été génotypées par PCR. Les couples d'amorces utilisés sont indiqués dans le tableau IV.

La lignée transgénique exprimant la construction *promoteurAtFRO6::GUS* (Wu et al., 2005) a été généreusement fournie par le laboratoire de Hong Qing Ling (State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Beijing China). Les lignées exprimant la construction *promoteurFRO2::GUS* ont été générées durant cette thèse (Cf. Chapitre 5.6.d).

Pour la production de graines, les plantes ont été cultivées en terreau (Neuhaus huminsubstrat, Klasmann-Deilmann, Allemagne) pendant 45 à 60 jours soit en chambre de culture, soit en serre. Pour la production de racines de pois, les plantes ont été cultivées en hydroponie. Pour la production de racines d'*Arabidopsis*, les plantes ont été cultivées *in vitro*.

## b) Production de racines de pois, cultures en hydroponie

Les plantes utilisées pour la mesure d'activité de réductase ferrique racinaire ont été cultivées en hydroponie, afin d'éviter la contamination par des résidus de terre. La germination a été réalisée dans du sable, puis les plantules d'une semaine ont été transférées en bassines de 8 L et cultivées pendant 15 jours en chambre de culture. La solution nutritive a été tamponnée à pH 5 avec 1 mM de 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) et contenait 1,25 mM KNO<sub>3</sub>, 1,5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,75 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25  $\mu$ M H<sub>3</sub>Bo<sub>3</sub>, 2  $\mu$ M

MnSO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, 0,5  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,1  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub>, conformément à la solution nutritive décrite par Grusak et Pezeshgi (1996). Pour les plantes cultivées en suffisance en fer, 50  $\mu$ M Fe(III)-EDTA ont été ajoutés au dernier moment dans la solution nutritive. Aucun ajout de fer n'a été réalisé sur les solutions nutritives des plantes carencées en fer.

#### c) Production de racines d'*Arabidopsis*, cultures *in vitro*

Les graines ont été stérilisées pendant 20 min, sous agitation, dans une solution contenant du Bayrochlore 1,5% (m/v) (Bayrol, Planegg, Allemagne) et de l'éthanol 50%. Elles ont ensuite été rincées 3 fois avec de l'éthanol 100% et séchées la nuit sous une hotte à flux laminaire. Les graines ainsi stérilisées ont été semées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu Murashige et Skoog dilué deux fois (MS/2, Sigma, M0654) supplémenté avec : H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100  $\mu$ M; MnSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M; ZnSO<sub>4</sub> 30  $\mu$ M; KI 5  $\mu$ M; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1  $\mu$ M; CoCl<sub>2</sub> 0,11  $\mu$ M; CuSO<sub>4</sub> 0,10  $\mu$ M; acide 2-MorpholinoEthane sulphonique (MES) 0,5 g.l<sup>-1</sup>; saccharose 1% (m/v); agar 0,8% (m/v). Le pH a été ajusté à 5,6 avec du KOH. Après semis, les boîtes sont placées deux jours à l'obscurité à 4°C, puis disposées verticalement dans une chambre climatisée (125  $\mu$ mol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, 70% d'humidité relative, photopériode de 16h de jour et 8h de nuit, température 21°C le jour et 18°C la nuit).

50  $\mu$ M de Fe(III)-Citrate ont été ajoutés à ce milieu pour les conditions de suffisance en fer. Les carences en fer, ont été induites en transférant des plantules de 7 jours vers un milieu MS/2 dans lequel aucun fer n'a été ajouté au milieu, et contenant 30  $\mu$ M de Ferrozine (acide 3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4"-disulfonique), afin de chélater les traces de fer présentes dans l'agar.

## d) Production de graines, culture en terreau

Caractéristiques de la chambre de culture: photopériode de 16h de lumière pour 8h d'obscurité, température de 20°C, 70% d'hygrométrie et une intensité de rayonnement photo-synthétiquement actif (RPA) d'environ 250  $\mu$ mol photons .m<sup>-2</sup> .s<sup>-1</sup>.

Caractéristiques de la serre: hygrométrie non contrôlée, température de 23°C le jour, 21°C la nuit, photopériode de 8h de nuit et 16h de jour avec complément d'éclairage par des lampes à



Figure 67: Echantillonnage de l'albumen liquide de graines de pois en développement.

sodium haute pression afin de maintenir une photopériode constante et une RPA de 150  $\mu$ mol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> minimum.

## e) Echantillonnage de l'albumen liquide de pois

L'albumen liquide peut être échantillonné en assez grande quantité à certains stades de développement de la graine. Ces stades correspondent aux stades 21 à 23 décrits par Marinos (1970). Les gousses en développement sont disséquées au scalpel immédiatement après récolte. Deux trous sont percés dans chaque graine à l'aide d'un capillaire en verre. L'albumen est ensuite rapidement extrait avec un nouveau capillaire relié à une pompe péristaltique Minipuls 2 (Gilson) et déposé délicatement au fond d'un tube Ependorf maintenu dans la glace. Le pompage est réalisé de manière à éviter de faire des bulles. Les échantillons sont maintenus congelés jusqu'aux analyses (Cf. Figure 67).

## 2) Histologie

## a) Fixation et déshydratation des tissus

Les tissus sont fixés pendant 45 minutes par infiltration sous vide d'une solution contenant 100 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7, 2% (m/v) paraformaldéhyde, 1% (m/v) glutaraldéhyde et 1% (m/v) caféine. Les tissus sont déshydratés par incubations successives dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes puis dans du butanol: 2 fois 30 min dans 50% d'éthanol, 2 fois 1h dans 70% d'éthanol, 30 min dans 90% d'éthanol, 30 min dans 95% d'éthanol, 2 fois 30 min dans de l'éthanol à 100% puis 24h dans une solution 50% éthanol / 50% butanol à 4°C, et 24h dans du butanol 100% à 4°C.

#### **b)** Inclusion en résine technovit 7100

Les tissus sont inclus en résine selon les instructions du fournisseur: les tissus sont placés dans un milieu d'imprégnation contenant 50% de butanol et 50% de méthacrylate de glycol (Technovit 7100, Kulzer, Hanau, Allemagne) puis infiltrés sous vide pendant 30 min et incubés 24h à 4°C. 0,01 g .mL<sup>-1</sup> d'un premier catalyseur sont ensuite ajoutés à cette solution, et les échantillons sont infiltrés 1 à 12 h. La polymérisation est induite par l'ajout d'un second



Figure 68: Obtention de cryo-coupes d'embryons de pois.



Figure 69: Protection de la chambre d'analyse de LUCIA lors de l'introduction d'un échantillon.

catalyseur sous forme liquide (67  $\mu$ L / mL), et dure au minimum 2 h à l'air libre à 37°C. Des sections de 4  $\mu$ m sont produites à l'aide d'un microtome.

## c) Inclusion en paraffine

Toutes les étapes sont réalisées dans une étuve à 58°C. A l'issue de l'étape de déshydratation, le butanol est remplacé par du Safe Solv (solvant de la paraffine) par des bains successifs d'une heure avec les proportions suivantes : butanol 2 / Safe Solv 1, butanol 1 / Safe Solv 2, puis Safe Solv seul. L'inclusion en paraffine est réalisée de la même manière, en remplaçant le Safe Solv par de la paraffine (paraplast) fondue, dans les proportion suivantes : Safe Solv 3 / paraplast 1, Safe Solv 1 / paraplst 1, Safe Solv 1 / paraplast 3, puis paraplast pur pendant une nuit minimum. Les échantillons ainsi inclus sont ensuite déposés dans des moules en plastique, recouverts de paraplast puis placés à 4°C pour accélérer le durcissement de la paraffine. Les coupes des blocs (entre 4 et 10  $\mu$ m) sont réalisées au microtome. Avant coloration, les coupes sont déparaffinées, par 3 bains successifs (15 min) dans du Safe Solv, 1 bain dans de l'éthanol 100%, 1 dans de l'éthanol 70%, 1 dans de l'éthanol 50%, puis rincées avec de l'eau distillée.

## d) Cryo-coupes

Les embryons ont été isolés par dissection de graines de pois puis immergés dans de l'Optimum Cutting Formation (OCT, Sakura Finetek, Leiden, Netherlands) et rapidement congelés dans de l'azote liquide. Les blocs solides obtenus ont été coupés avec un cryomicrotome (le portoir de l'échantillon était maintenu à  $-50^{\circ}$ C et l'environnement de l'échantillon à  $-18^{\circ}$ C) afin d'obtenir des sections de 30 à 40 µm (Cf. Figure 68). Les sections obtenues ont été déposées sur un film ultralene (SPEX Certiprep, Metuchen, USA) et maintenues dans de l'azote liquide jusqu'à l'introduction dans la chambre d'analyse de la ligne de lumière LUCIA du synchrotron SOLEIL (Cf. Figure 69).

## e) Coloration histochimique du fer (Perls/DAB)

D'après Roschzttardtz et al. (2009).

Cette coloration peut être réalisée soit sur des coupes histologiques soit sur des échantillons frais tels que des embryons, des jeunes plantules ou des racines. Quel que soit le type d'échantillon la procédure est identique.

- 1- coloration avec le Perls : mélanger un volume d'HCl 4% (v/v) avec un volume de ferrocyanure de potassium à 4% (m/v), c'est le réactif Perls. Incuber les échantillons pendant 45 minutes. Pour améliorer la pénétration du Perls dans des échantillons frais, faire le vide pendant les 15 premières minutes. Rincer à l'eau distillée.
- 2- Inhibition des péroxydases et réaction redox : incuber les échantillons pendant 1h dans le mélange suivant (préparer extemporanément): 0,65% (m/v) de NaN<sub>3</sub> et 0,3%  $H_2O_2$ (v/v à partir d'une solution commerciale à 30%) dans du méthanol. Rincer avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4.
- 3- Intensification avec la diaminobenzidine (DAB). Incuber pendant 30 minutes dans un mélange réactionnel contenant (pour 100 mL de tampon phosphate 100 mM pH7,4) : 500 μL de CoCl<sub>2</sub> à 1% (m/v), 2 μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% et 0,025 g de DAB. La DAB est d'abord dissoute dans un petit volume (10 mL) de tampon phosphate avant d'être ajoutée au reste du réactif. La coloration est stoppée par rinçage à l'eau distillée.

## f) Analyse histochimique de l'activité GUS

L'activité de la GUS a été évaluée en suivant le protocole de Jefferson (1987) avec de légères modifications. Les tissus ont été fixés par incubation dans une solution contenant 2% de paraformaldéhyde, 0,5% de glutaraldéhyde et 50 mM de tampon phosphate à pH 7. Cette solution a été infiltrée sous vide pendant 15 minutes, puis les tissus ont été incubés 45 minutes dans cette même solution. Les tissus ont ensuite été rincés 3 fois avec du tampon phosphate pH 7.

Les tissus ont été incubés pendant 12 h à 24 h dans une solution de 50 mM NaPO4 pH 7, 0,5 mM de ferricyanure de potassium et 0,5 mM de ferrocyanure de potassium, 0,05% (v/v) de Triton X100 et 1 mM de X-Gluc, préparée extemporanément. Une infiltration de cette solution, sous vide et pendant 5 minutes a précédé l'incubation.

Les tissus ont ensuite été décolorés de deux manières différentes selon la nature du tissu. Les racines ont été décolorées par lavages successifs de 30 minutes à 1h dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes (50%, 70%, 90% et 100%).

Les graines ont été décolorées en suivant la méthode décrite par Stangeland et al. (2002). Les graines ont été d'abord incubées pendant 4 h dans une solution de 50% éthanol, 50% acide acétique glacial (v/v), puis incubées pendant 3 jours dans une solution contenant 0,85 g .mL<sup>-1</sup> d'hydrate de chloral et 15% de glycérol (v/v).

## 3) Analyses spectroscopiques de coupes histologiques

## a) micro-PIXE

Cette technique a été appliquée à des échantillons inclus en résine. Les sections (30  $\mu$ m) d'embryons inclus en résine ont été analysées par Emission de Rayon X Induite par Particules (Particle induced X-ray Emission, PIXE) à l'aide d'un faisceau de proton de 1  $\mu$ m de diamètre à la plateforme AIFIRA (Carmona et al., 2008).

## **b**) micro-SRXRF et micro-EXAFS

Ces analyses ont été menées sur des échantillons cryo-fixés. Les cryo-coupes d'embryons ont été placées sur un portoir de cuivre dans la chambre d'analyse de la ligne de lumière LUCIA (synchrotron SOLEIL, Saclay, France). Le portoir ainsi que les échantillons ont été maintenus dans l'azote liquide jusqu'à introduction dans la chambre elle-même refroidie à environ -200°C. Un sac rempli d'azote gazeux a été maintenu autour de la trappe par laquelle est introduit l'échantillon afin d'éviter tout dépôt de glace par condensation dans la chambre ainsi que sur l'échantillon lors du transfert à partir de l'azote liquide vers le portoir de la chambre (Cf. Figure 69).

Pour les cartographies par micro-SRXRF, le diamètre du faisceau était de 2.5 x 3.5 µm et l'énergie a été réglée à 7200 eV. Pour les spectres EXAFS, le diamètre était de 5 x 5 µm, et les acquisitions ont été réalisées sur des zones riches en fer préalablement cartographiées par micro-SRXRF. Des caractéristiques plus détaillées de la ligne de lumière LUCIA sont disponibles en ligne (http://www.synchrotron-soleil.fr/Recherche/LignesLumiere/LUCIA).

## c) Microscopie et spectroscopie infra-rouge FT-IR et Raman

Cette technique nécessite des tissus inclus en paraffine. Les coupes déparaffinées ont été analysées au synchrotron SOLEIL (Saclay, France) en utilisant la ligne de lumière SMIS ainsi que les logiciels OMNIC et Atlus (ThermoFischer Scientific). Les caractéristiques techniques détaillées de cette ligne de lumière sont disponibles sur le site internet de SOLEIL (http://www.synchrotron-soleil.fr/Recherche/LignesLumiere/SMIS).

Les coupes ont été analysées à l'aide d'un microscope Infrarouge couplé à un spectromètre à transformée de Fourier. Chaque spectre a été généré à partir de 256 scans, avec une ouverture de faisceau de 6 µm et un pic d'interférogramme à au moins 10 volts. Les zones ciblées correspondaient aux noyaux et aux plastes des cellules. Les spectres de bruit de fond ont été générés en ciblant les zones vides des coupes, correspondant aux cytoplasmes des cellules.

## 4) <u>Spéciation du fer dans l'albumen de pois</u>

## a) Reconstitution des complexes ferriques et ferreux in vitro

Pour les analyses spectroscopiques par EXAFS, la concentration minimale en fer permettant d'obtenir un ratio signal/bruit satisfaisant est d'environ 1 mM, et idéalement d'environ 10 mM.

La reconstitution des complexes ferriques a été effectuée à l'air libre et le fer a été apporté sous forme de FeCl<sub>3</sub>. Le Fe(III)-citrate a été préparé à partir d'une solution d'acide citrique (Euromedex) à 400 mM dont le pH a été ajusté à 5 avec du KOH. 100 mM de FeCl<sub>3</sub> ont ensuite été ajoutés à la solution et l'incubation effectuée pendant plusieurs heures afin de permettre la fixation de la totalité du fer au citrate. La solution obtenue est de couleur verte. Pendant la préparation, le mélange a été protégé de la lumière car le complexe est très sensible à la photoréduction. Le Fe(III)-malate a été préparé à partir d'une solution d'acide L-malique (Sigma) à 400 mM de la même manière que le Fe(III)-citrate. La solution obtenue est de couleur brune. Le Fe(III)-citrate-malate a été préparé à partir d'une solution contenant 300 mM d'acide citrique et 100 mM d'acide L-malique, de la même manière que les deux complexes précédents. La solution est de couleur verte. Les complexes Fe(III)-histidine ont été reconstitués dans une solution contenant 10 mM de FeCl<sub>3</sub> et 10 mM de DL-histidine à pH 7.

La reconstitution des complexes ferreux de citrate, malate et citrate-malate a été effectuée sous vide, en utilisant de l'eau préalablement traitée à l'argon afin d'éliminer l'oxygène présent en solution. Le fer a été apporté sous forme de Fe(II)SO<sub>4</sub>. Les complexes ont ensuite été reconstitués de la même manière que les complexes ferriques. Les trois solutions obtenues sont de couleur jaune.

Les complexes Fe(III)-ADN ont été produits à partir d'ADN extraits avec une méthode au CTAB modifiée (à partir de Reichardt et Rogers, 1994), sans EDTA et sans 2- $\beta$ mercaptoéthanol, et avec un traitement au phénol/chloroforme suivi d'une précipitation à l'isopropanol. Une quantité de FeCl<sub>3</sub> nécessaire pour obtenir un ratio de 1 atome de fer pour 10 paires de bases d'ADN a ensuite été ajouté à la solution d'ADN. Le complexe obtenu est sous forme de précipité.

Les complexes Fe(II)-ARN ont été produits à partir d'ARN extraits au TriZol (Life Technologies) et chloroforme, puis précipités à l'isopropanol, selon les instructions du fabricant. Une quantité de FeSO<sub>4</sub> nécessaire pour obtenir un ratio de 1 atome de fer pour 10 paires de bases d'ARN a ensuite été ajoutée à la solution. Le complexe ainsi obtenu est soluble et incolore.

## **b)** Analyse chimique à 3 dimensions SEC(HILIC)-ICP-MS

Les complexes contenant du fer présents dans l'endosperme liquide ont été analysés en couplant une colonne de chromatographie d'interaction hydrophile en phase liquide (HILIC), à un spectromètre de masse à torche à plasma (ICP-MS) pour la quantification du fer, et à un spectromètre de masse à électronébuliseur (ESI-MS), pour l'identification des espèces chimiques contenant du fer.

Les séparations chromatographiques ont été menées en utilisant une pompe HPLC 100 (Agilent, Wilmington, DE, USA) comme système de distribution. La colonne HILIC était une TSK gel amide-80 de 250 x 1 mm (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Allemagne). Toutes les connections étaient faites avec des tubes en verre de silice / poly(étheréthercétone) de 0,05 mm de diamètre interne. L'ICP-MS était un spectromètre Agilent 7500cs (Agilent Technologies, Japon), équipé d'une cellule de collision à hydrogène. L'interface entre l'HPLC et l'ICP-MS était constituée d'une chambre de nébulisation cyclonique Cinnabar (Glass Expansion, Melbourne, Australie), un nébuliseur Micromist U-series (Glass Expansion,

Melbourne, Australie), une torche en quartz de 1 mm de diamètre interne (Agilent Technologies, Japon), et d'un lot de cônes en platine (Agilent Technologies, Japon). L'ESI-MS était un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos (ThermoScientific, San Jose, USA). La phase mobile était constituée de 5 mmol .L-1 de tampon d'acétate d'ammonium (NH<sub>4</sub>Ac) ajusté à pH 5,5 avec de l'acide acétique et d'acétonitrile. Les réactifs analytiques ont tous été fournis par Sigma-Aaldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'eau à 18,2 MW.cm a été obtenue avec un système Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Le gradient HILIC optimize commençait à 10% de tampon NH<sub>4</sub>Ac et augmentait jusqu'à 50% de NH<sub>4</sub>Ac pendant 25 minutes. Les échantillons dilués deux fois dans l'acétonitrile ont été élués à une vitesse de 50 µL .min<sup>-1</sup>. Les espèces contenant du fer ont été détectées par couplage direct de la colonne HILIC à l'ICP-MS et à l'ESI-MS, en suivant les signaux des isotopes 54Fe et 56Fe. Les conditions d'ICP-MS ont été optimisées chaque jour pour maximiser l'intensité et minimiser les interferences à l'aide d'un logiciel integré à la machine. L'ESI-MS a été calibré chaque jour avec un mélange standard préconisé par le fabricant. Les spectres ont été acquis avec un temps d'injection maximal de 400 ms. La tension de l'électronébuliseur était réglé à 3 kV en mode ion positif, et à -3 kV en mode ion négatif. Les ions ont été fragmentés par dissociation induite par collision, à différents niveaux d'énergie.

## 5) Etude du transport du fer: approche de biochimie

## a) Dosage du fer par spectrophotométrie

5 à 15 mg de tissus sont séchés 24 h dans une étuve à 80°C dans des tubes en pyrex. La minéralisation est réalisée dans 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95-97%, Merck) et 50  $\mu$ L de HNO<sub>3</sub> (65%, Merck) à 200°C jusqu'à dissolution complète des tissus. Après refroidissement, 50  $\mu$ L d'acide perchlorique (HClO<sub>4</sub>) à 70% sont ajoutés puis les tubes sont de nouveau placés à 200°C jusqu'à décoloration complète de la solution (environ 1 heure). Après refroidissement, les échantillons sont agités dans 1,25 mL d'acétate de sodium 2,5 M afin de tamponner le pH très acide de la solution, et de se placer dans des conditions favorables à la stabilité du complexe Fe(II)-BPDS<sub>3</sub>. Enfin, le fer de la solution est réduit en totalité par ajout de 100  $\mu$ L d'acide thioglycolique 10% (v/v), puis chélaté avec 100  $\mu$ L de bathophénanthroline disulfonate à 1% (m/v). 30 minutes d'incubation en présence de BPDS sont nécessaires pour assurer une chélation complète des ions ferreux par le BPDS. La concentration en fer est ensuite estimée en quantifiant les complexes Fe(II)-BPDS<sub>3</sub> (DO<sub>535nm</sub>) grâce à une courbe étalon établie entre

0 et 5 µg de Fe.

## b) Quantification de la réduction du fer

#### *i)* Par les embryons et racines de pois

L'activité de réduction ferrique a été estimée par la mesure de la quantité de complexes fer<sup>(II)</sup> -  $3 \times$  bathophénanthroline disulfonate (Fe(II)-BPDS<sub>3</sub>) formés en solution dont l'absorbance est mesurable à 535 nm. La DO<sub>535nm</sub> a été mesurée (spectrophotomètre U- 2800, Hitachi) après 15 minutes d'incubation à l'obscurité à 22-25°C avec agitation à 250 RPM dans une solution de titrage contenant 5 mM de MES pH 5,5, 300  $\mu$ M BPDS et 100  $\mu$ M Fe(III)-acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA). Les volumes utilisés ont été de 1 ou 2 mL pour les mesures réalisées sur des embryons individuels et de 5 mL pour les mesures réalisées sur 5 embryons.

Les embryons ont été disséqués avec un scalpel le plus rapidement possible après récolte et maintenus dans du tampon MES 5 mM pH 5,5 jusqu'à obtention d'une quinzaine d'embryons (10-20 minutes), puis l'activité a été mesurée. Les embryons ont ensuite été brièvement séchés avec un sopalin et pesés afin d'obtenir leur masse fraîche.

Pour l'estimation des paramètres cinétiques de cette activité, les embryons ont été isolés et incubés comme décrit précédemment. La solution de titrage contenait des concentrations croissantes en Fe(III)-EDTA et 300  $\mu$ M de BPDS. Chaque point de la courbe a été généré à partir de l'activité moyenne mesurée dans 5 mL de solution de titrage contenant 5 embryons et la quantité correspondante du substrat (i.e. Fe(III)-EDTA). L'activité moyenne a été calculée à partir des valeurs obtenues lors de 5 expériences indépendantes. Les valeurs de R<sup>2</sup>, Km et Vmax ont été estimées avec SigmaPlot 8.02 à partir de l'équation de Michaelis-Menten: Activité = (V<sub>max</sub> × [substrat]) / (K<sub>m</sub> + [substrat]).

Pour suivre l'évolution de l'activité pendant le développement des embryons, cinq catégories ont été déterminées arbitrairement sur la base de la masse fraîche (i.e. < 100 mg, 100-200 mg, 200-300 mg, 300-500 mg, 500-650 mg). Chaque catégorie correspond à l'activité moyenne ( $\pm$ écart-type) calculée à partir de la mesure de l'activité individuelle d'au moins huit embryons. Les différences significatives ont été déterminées à l'aide du logiciel R (version 2.11.1, General Public License version 2) avec un test non paramétrique de comparaison de moyennes de Kruskal-Wallis (p < 0,05).

Pour la comparaison des activités réductase des chélates ferriques des racines de DGV et du mutant *dgl*, les activités ont été mesurées sur trois systèmes racinaires entiers, préalablement excisés. Les racines ont été rincées trois fois à l'eau déminéralisée puis incubées dans 50 mL de la solution de titrage décrite précédemment, en suivant le même protocole. Les valeurs finales correspondent à l'activité moyenne (± écart-type) calculée à partir des résultats de trois expériences indépendantes.

Les activités de réduction ferrique des embryons de DGV et dgl ont été mesurées en parallèle lors de trois expériences indépendantes conduites avec 5 embryons dans 5 mL de solution de titrage. Les résultats correspondent à la moyenne des 5 valeurs obtenues ± l'écart-type. Les différences significatives ont été déterminées à l'aide d'un test paramétrique de comparaison de moyennes de Tukey (p < 0,05).

#### ii) Par les embryons et racines d'Arabidopsis thaliana

#### (1) Dissection d'embryons d'Arabidopsis thaliana

Les siliques fraîchement récoltées ont été ouvertes sur une boite de Petri carrée, à l'aide d'une aiguille de seringue (0,45 x 12 mm) et d'une pince fine, puis les graines ont été séparées des enveloppes de siliques et placées dans une goutte d'eau milliQ pour les extractions d'ARNs ou dans du tampon MES 5 mM pH 5,5 pour les mesures d'activités enzymatiques. Les graines ont ensuite été délicatement pressées avec une lamelle afin d'en faire sortir les embryons. Les embryons non endommagés ont été prélevés à la pipette et rincés 3 fois à l'eau ou au tampon MES.

Les embryons destinés aux extractions d'ARNs sont ensuite transférés dans des tubes Ependorf conservés dans la glace, et congelés dans de l'azote liquide. Les embryons sont congelés par groupes de 20 environ afin de limiter le temps écoulé entre la sortie de l'embryon et la congélation. Les extractions sont réalisées avec une centaine d'embryons.

Embryons destinés aux mesures d'activité de réduction du fer: dès que les embryons isolés sont au nombre de 20, ils sont immédiatement incubés dans la solution de titrage dans des tubes de 0,2 mL.

#### (2) Mesure de l'activité de réduction du fer

L'activité de réduction du fer embryonnaire a été mesurée dans un volume réactionnel de 10



<u>Figure 70:</u> Dispositif expérimental des mesures d'activité de réduction ferrique embryonnaires totale et exsudée, et de l'évaluation l'effet de l'AOX sur l'activité des exsudats.

 $\mu$ L de solution de titrage contenant 20 embryons. L'activité de réduction du fer racinaire a été mesurée dans un volume de 2 mL de solution de titrage contenant 3 à 10 mg de racines. La solution de titration contenait 5 mM de tampon MES à pH 5,5 ainsi que 100  $\mu$ M de Fe(III)-EDTA et 300  $\mu$ M de BPDS. L'activité de réduction ferrique a été estimée en quantité de complexes Fe(II)-BPDS<sub>3</sub> formés en solution, calculée à partir de la densité optique mesurée à 535 nm avec un Nanodrop 1000. Le Nanodrop a été réglé pour une mesure des UV visibles en désactivant l'utilisation automatique du trajet optique de 0,2 mm pour les fortes absorbances (HiAbs), ainsi que la normalisation des spectres (Normalize).

## c) Mesure de la part de réduction ferrique due à l'efflux d'ascorbate

L'ascorbate oxydase (AOX, Sigma-Aldrich A0157) a été reconstituée suivant les instructions du fournisseur dans un tampon phosphate 4 mM à pH 5,6 et 0,05% (w/v) d'albumine de sérum bovin (BSA). 10% de glycérol (v/v) ont ensuite été ajoutés avant congélation à -20°C. La solution mère obtenue contient environ 26 Unités .mL<sup>-1</sup>. Deux concentrations ont été utilisées pour les traitements : 2,6 U .mL<sup>-1</sup> et 0,26 U .mL<sup>-1</sup>. La mesure contrôle, sans AOX, a été obtenue en ajoutant un volume équivalent de tampon de reconstitution de l'AOX au mélange réactionnel.

Afin d'étudier l'implication de l'efflux de composés réducteurs et notamment d'ascorbate dans la réduction ferrique, cette activité a été mesurée dans des exsudats d'embryons traités ou non à l'ascorbate oxydase (Cf. Figure 70.A). L'activité a également été mesurée en présence des embryons (Cf. Figure 70.B).

L'expérience a été menée en incubant 5 embryons dans 5 mL de tampon MES 5 mM à pH 5,5. Cette incubation de 30 minutes a été réalisée à l'obscurité sous agitation de 250 RPM. 2 aliquots de 1 mL, d'exsudats ont ensuite été prélevés. L'un des aliquots a été traité avec 1,5 U d'AOX .mL<sup>-1</sup>, et l'autre aliquot a reçu un volume de tampon de reconstitution (sans AOX) équivalent. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 100  $\mu$ M de Fe(III)-EDTA et 300  $\mu$ M de BPDS ont été ajoutés à chacun des deux tubes et la réaction de réduction s'est déroulée pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité.

En parallèle, la mesure d'activité en présence des embryons a été réalisée en incubant 5 embryons dans 5 mL de solution de titrage pendant 30 minutes à l'obscurité et sous agitation.

1 mL de solution a été prélevé et incubé pendant 1 h supplémentaire à température ambiante et à l'obscurité. Cette expérience a été répétée 3 fois, et les valeurs présentées correspondent à la moyenne des 3 expériences (± l'écart-type). Les différences significatives ont été déterminées avec un test de comparaison de moyenne paramétrique (Tukey, p<0,05).

La cinétique de réduction du fer en présence ou non d'AOX a été conduite sur des embryons individuels incubés dans 2 mL de solution de titrage contenant 100  $\mu$ L .mL<sup>-1</sup> de tampon de reconstitution de l'AOX (échantillon non traité); 0,26 U .mL<sup>-1</sup> ou 2,6 U .mL<sup>-1</sup> d'AOX pour les deux séries d'échantillons traités. La DO<sub>535nm</sub> a été mesurée toutes les 10 minutes sur un prélèvement de 2,5  $\mu$ L, à l'aide d'un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Le Nanodrop a été réglé pour une mesure des UV visibles en désactivant l'utilisation automatique du trajet optique de 0,2 mm pour les fortes absorbance (HiAbs), ainsi que la normalisation des spectres (Normalize). Chaque expérience a été menée avec 5 embryons par traitement et réalisée 3 fois. Les points de la courbe correspondent à la moyenne des 3 expériences (± l'écart-type).

## d) Réduction chimique du fer par l'ascorbate *in vitro*

La réduction chimique du fer a été réalisée dans un volume réactionnel de 100  $\mu$ L contenant 100  $\mu$ M de fer (sous forme de différents chélates), une gamme de concentrations (1, 5, 25 et 50  $\mu$ M) d'acide L-ascorbique (Sigma) et soit 0,15 U d'AOX .mL<sup>-1</sup>, soit un volume équivalent de tampon de reconstitution de l'AOX. La DO<sub>535nm</sub> a été mesurée immédiatement après la mise en contact de l'acide ascorbique et du fer, puis après 30 min, 1h et 10h d'incubation dans le noir, avec un Nanodrop 1000.

## e) Mesure de l'accumulation de <sup>55</sup>Fe dans les embryons de pois

Des embryons de 20 à 50 mg ont été isolés et pesés aussi rapidement que possible après la récolte des gousses. Ils ont été disposés individuellement dans des puits de plaques 24 puits, contenant 2 mL de la solution suivante: 100 mM de chlorure de potassium (KCl), 5 mM de sulfate de calcium et 5 mM de MES. Le pH a été ajusté à 5,5 avec du KOH. L'influx a été initié en remplaçant cette solution par du tampon d'influx, qui correspond à cette même solution supplémentée avec 100  $\mu$ M de Fe(III)-EDTA contenant une petite proportion de <sup>55</sup>Fe. Le complexe Fe(III)-EDTA radiomarqué a été produit en incubant 0,5  $\mu$ L <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> avec

50  $\mu$ L Fe(III)-EDTA (Euromedex) 100 mM pendant 15 minutes à l'obscurité. La radioactivité finale dans le tampon d'influx était de 500000 DPM par mL, soit 0,2  $\mu$ Ci.

Dans le cas des traitements correspondants, 4 mM de BPDS ou 2,6 U .mL<sup>-1</sup> d'ascorbate oxidase. Le mélange a ensuite été placé dans le noir pendant 20 ou 40 minutes à 4°C ou 30°C. La réaction a été stoppée en rinçant trois fois avec 2 mL d'une solution glacée contenant 1 mM KCl, 10 mM EDTA, 1 mM FeCl<sub>3</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM MES pH 5,5.

La quantité de <sup>55</sup>Fe dans ces tissus a été mesurée en suivant les instructions fournies par PerkinElmer<sup>®</sup>. Les embryons ont été séchés pendant 48 heures à 50°C dans des fioles en verre partiellement bouchées. Les embryons secs ont ensuite été dissouts dans 100 µL d'acide perchlorique à 50°C pendant 24 heures. Après ajout de 200 µL de peroxyde d'hydrogène, les échantillons ont été incubés à 50°C jusqu'à décoloration complète (environ 3 jours). Les échantillons ont ensuite été incubés, après agitation vigoureuse, pendant 24 h à l'obscurité dans 3 mL de HionicFluor<sup>™</sup> scintillating cocktail (PerkinElmer). Les coups par minute (CPM) dans l'intervalle d'énergie de 0 à 10 eV ont été mesurés sur 10 minutes avec un compteur à scintillation Tricarb (PerkinElmer), avec correction du quenching de couleur. Les CPM ont été convertis en dégradation par minute (DPM) par le programme QuantaSmart en utilisant l'indicateur de quenching tSIE/AEC.

La quantité de fer en nanomoles a été calculée à partir de la valeur mesurée sur une fiole standard contenant un volume connu de tampon d'influx en suivant la formule suivante:

 $n_{\rm Fe\ {\acute{e}} chantillon}$  =  $DPM_{{\acute{e}} chantillon}$  / DPM standard \*  $n_{\rm Fe\ standard}$ 

Les valeurs d'influx net ont été calculées en retranchant la quantité de <sup>55</sup>Fe accumulée à 4°C aux valeurs obtenues après incubation à 30°C. Les quantités finales correspondent à la moyenne (± SE, n = 3) des valeurs obtenus sur au moins 12 embryons provenant de 3 expériences indépendantes.

## 6) Etude du transport du fer: approche de biologie moléculaire

## a) Extraction d'ARN de racines

- 5 à 10 mg de racines congelées dans de l'azote liquide sont broyés à l'aide d'un broyeur à billes Retsch MM400 (Retsch, Haan, Allemagne), par agitation (30 agitations .s<sup>-1</sup>) pendant 1

minute avec un portoir conservé à -50°C. et les ARNs totaux sont extraits dans 800  $\mu$ L de TRIZOL (Life Technologies).

- Les tubes sont ensuite centrifugés 3 minutes afin d'éliminer les débris solides.

- Le culot est éliminé et le surnageant est incubé avec 160  $\mu$ L de chloroforme/alcool isoamylique (24/1) puis le mélange est centrifugé.

- La phase aqueuse est prélevée et les acides nucléiques sont précipités par ajout d'un volume équivalent d'isopropanol.

- Après centrifugation (15 min, 14000 RPM, 4°C), les culots sont rincés à l'éthanol 75% et repris dans de l'H<sub>2</sub>O milliQ.

 - L'ADN présent dans la solution est éliminé par traitement à la DNase (Rnase-Free DNase Set, Qiagen) et les ARNs sont purifiés sur colonne (RNeasy MinEluteTM Cleanup Kit, Qiagen) selon les recommandations du fournisseur, et élués dans 20 μL.

- L'absence d'ADN génomique est vérifiée par PCR avec les couples d'oligonucléotides *APTR/F-APTR/R* situés de part et d'autre d'un intron du gène *APTR (At1g27450*, Cf.

Tableau V) en utilisant 1 µL de la solution d'ARN comme matrice.

- L'ARN est quantifié au nanodrop avec un volume de 2  $\mu$ L de solution.

- La transcription inverse des ARNm est effectuée à partir de 2 à 4  $\mu$ g d'ARN totaux en présence de 0,5  $\mu$ g . $\mu$ g<sup>-1</sup> d'ARN d'oligonucléotides poly-d(T)15 (Promega) et de 200 unités de reverse-transcriptase M-MLV (Promega) à 42°C pendant 1h 30.

## b) Extraction d'ARN de siliques, graines et embryons

Les graines et siliques d'*Arabidopsis thaliana* sont des tissus riches en carbohydrates, composés qui précipitent dans les conditions de précipitation des acides nucléiques. L'extraction d'ARN de ces tissus nécessite donc une étape particulière qui consiste à précipiter dans un premier temps les carbohydrates dans une solution de 30% d'éthanol (v/v) et environ 30 mM d'acétate de sodium (NaAc), puis de précipiter les acides nucléiques dans un deuxième temps en augmentant les concentrations en éthanol et NaAc à 70% (v/v) et 100mM respectivement.

Pour cette thèse, le protocole utilisé a été le suivant (Onate-Sanchez et Vicente-Carajosa, 2008):

- Les tissus (3 à 4 siliques, 100 à 150 graines ou embryons) sont broyés à l'aide d'un broyeur à
billes Retsch MM400 (Retsch, Haan, Allemagne), par agitation (30 agitations .s<sup>-1</sup>) pendant 1 minute avec un portoir conservé à -50°C.

- 550  $\mu$ L de tampon d'extraction (0,4 M LiCl, 0,2 M Tris pH 8, 0,25 mM EDTA, 1% SDS) sont ajoutés aux échantillons rapidement après les avoir sortis de l'azote liquide.

 Chaque tube est mélangé vigoureusement au vortex pendant 10 secondes et maintenu dans la glace pendant la préparation des échantillons suivants.

- Les tubes sont centrifugés 3 minutes à 14000 RPM.

- Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes et 500  $\mu$ L de phénol acide saturé en eau sont ajoutés. Les tubes sont agités vigoureusement au vortex, et 200  $\mu$ L de chloroforme sont ajoutés à chaque tube.

- Les échantillons sont à nouveau centrifugés 3 minutes à 14000 RPM, et les surnageants sont à nouveau transférés dans des tubes neufs.

- Un volume de LiCl 8 M, correspondant à 1/3 du volume de surnageant récupéré, est ajouté à chaque tube, puis les tubes sont placés à -20°C pendant 1 h (ou à 4°C pendant 12 h). Les tubes sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 30 min, le surnageant est éliminé, et les culots sont rincés avec 1 mL d'éthanol 70%.

- Le culot est resuspendu dans 85  $\mu$ L d'eau milliQ, 10  $\mu$ L de tampon 10X (e.g. tampon RDD) et 5  $\mu$ L de DNase (DNase free RNase set, Qiagen) sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé 30 minutes à 37°C.

- 400  $\mu$ L d'eau milliQ sont ajoutés, ainsi que 7  $\mu$ L de NaAc 3 M pH 5,2 et 250  $\mu$ L d'éthanol 100%. Le mélange est homogénéisé par retournements et centrifugé à 4°C pendant 10 minutes. Le culot de carbohydrate s'accumule alors au fond du tube, sous forme de gel.

- Les surnageants sont transférés vers des tubes neufs et 43  $\mu$ L de NaAc 3 M pH 5,2 et 750  $\mu$ L d'éthanol 100% sont ajoutés. Les tubes sont agités par retournements et placés à -20°C pendant au moins 1 h avant d'être centrifugés 20 min à 4°C à 14000 RPM.

- Les culots sont rincés avec 1 mL d'éthanol 70% puis séchés à l'air libre avant d'être resuspendus dans un volume adéquat d'eau milliQ (en général 10 à 30  $\mu$ L).

L'absence d'ADN génomique est vérifiée par PCR avec les couples d'oligonucléotides
APTR/F-APTR/R situés de part et d'autre d'un intron du gène APTR (At1g27450) (Tableau V).

- La transcription inverse des ARNm est effectuée dans un volume total de 25  $\mu$ L à partir de 2 à 4  $\mu$ g d'ARN totaux en présence de 0,5  $\mu$ g . $\mu$ g<sup>-1</sup> d'ARN d'oligonucléotides poly-d(T)15

Nom	Gène cible	Séquence (5' - 3')
APTR-F	A+1a27450	CGTTCTTCTCGACACTGAG
APTR-R	Ла 1827430	CAGGTAGCTTCTTGGGCTC
QCLAT-F	At4g24550	AGCATACACTGCGTGCAAAG
QCLAT-R		TCGCCTGTGTCACATATCTC
cFRO2 3000	At1g01580	CGGAAACATATGTTTGGCGTT
F		GGAGGATAGTTCAGTCTCAAGACC
FRO25 RP		
QFRO1-F	A+1 c01500	CCAGCCCATCTCACCAATCC
QFRO1-R	АП 201390	TGTTCCACAACATAGCAGCCGTA
QFRO3-F	At1g23020	TTGACGCATTGTCTCCGTTGA
QFRO3-R		AGATTCGCAGCCGAACCAAA
QFRO4-F	A+5~22080	TGCGTGCATTTTCATCTCTTCC
QFRO4-R	1115825760	AGGTTTGGAGCCGAAGTGGA
QFRO5-F	A+5 a23000	GTGCATTTTCATCTCGTCAAGCA
QFRO5-R	1115825990	AGGTTTGGAGCCGAAGTGGA
QFRO6-F	At5g49730	GCTACCACGGACCAACGGATG
F6 3'UTR		GTCCAATGTAGAAACACCAACAAG
QFRO7-F	At5g49740	ACAAGTACAACATAACAACATGGTGGTACAAG
QFRO7-R		AACACCATGGACCAACGGATGT
QFRO8-F	A+5~50160	TTGGTGGTTTCGCTGCAACT
QFRO8-R	1115850100	CCAACACTCGACCATCCTCTCA

<u>**Tableau V:**</u> Liste des couples d'amorces utilisées pour les RT-PCR semi quantitatives.

Nom	Gène cible	Séquence (5' - 3')
pFRO2KpnIFwd	At1g01580	GGTACCAATTATTTATCTTTTATAGCGTTTTCT
	C	TGTTACC
pFRO2NcoIRev	At1g01580	CCATGGTCTCTTTCCTCTCAGGATTTCTACTC
GUS150Rev	uidA	CTGCATCGGCGAACTGATCG

<u>**Tableau VI:**</u> Liste des amorces utilisées pour les clonages des promoteurs d'AtFRO2.

(Promega) et de 200 unités de reverse-transcriptase M-MLV (Promega) à 42°C pendant 1 h 30. L'enzyme est ensuite inactivée en chauffant la solution à 70°C pendant 15 minutes, puis le volume est ajusté à 100  $\mu$ L avec de l'eau milliQ.

## c) RT-PCR semi-quantitative

Les RT-PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 20 µL. Les amorces utilisées ainsi que les gènes cibles sont présentés dans le tableau V. Les conditions de réactions ont été 45 secondes à 95°C, 45 secondes à 60°C et 90 secondes à 72°C pendant 30 cycles, puis 7 minutes à 72°C pour l'élongation. Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium.

## d) Production des lignées exprimant la construction promoteurAtFRO2::GUS

Ces constructions ont été générées afin d'obtenir des informations sur la localisation de l'expression des gènes AtFRO2, en complément des analyses d'expression des gènes par RT-PCR. Les régions promotrices situées en amont du codon d'initiation ATG du gène AtFRO2, 1962 pb, ont été amplifiées à partir d'ADN génomique de Col-0, à l'aide d'amorces spécifiques (Cf. Tableau VI) et d'une ADN polymérase à haute fidélité (Herculase II, Agilent Technologies) en suivant les instructions du fournisseur. Les sites de restriction KpnI et NcoI ont été introduits aux extrémités des amorces sens et antisens respectivement. Les fragments amplifiés ont été sous clonés dans le vecteur pGEM-T easy (Promega) et le plasmide obtenu, appelé pGPF2.11, a été séquencé. L'insert a ensuite été cloné en fusion traductionnelle avec le gène uidA codant la ß-Glucuronidase (GUS) dans le vecteur pBI320x, entre les sites KpnI et NcoI. Le promoteur d'AtFRO2 contient un site NcoI situé 208 pb en amont de l'ATG. Donc dans un premier temps, ce fragment de 208 pb n'a pas été cloné, et seul le fragment de 1754 pb situé entre les sites KpnI et ce site NcoI a été inséré dans le vecteur pBI320x. Le vecteur ainsi obtenu contenant une partie du promoteur d'AtFRO2, a été appelé pBIPF2. Ensuite, la cassette KpnI-SacI [promoteur incomplet d'AtFRO2::GUS] du pBIPF2 a été sous-clonée dans le vecteur binaire pGREEN0029. : le fragment KpnI - SacI a d'abord été cloné, puis le fragment NcoI - NcoI manquant a été cloné dans un deuxième temps. Le

vecteur ainsi obtenu a été appelé pGRPF2G.

Le plasmide pGRPF2G a été introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* (souche GV131) par électroporation en présence du plasmide helper pSOUP. Ces agrobactéries ont servi à transformer des plantes d'*Arabidopsis* en fleur par la méthode du "Floral Dip" (Clough et Bent, 1998). Les plantes résistantes à la kanamycine ont été sélectionnées et la présence du transgène vérifiée par PCR.

## Références bibliographiques

**Anderegg G, Ripperger H** (1989) The normalizing factor for the tomato mutant *chloronerva*. 29. Correlation between metal-complex formation and biological-activity of nicotianamine analogs. Journal of the Chemical Society - Chemical Communications: 647-650

Andersen JS, Lam YW, Leung AKL, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M (2005) Nucleolar proteome dynamics. Nature **433**: 77-83

Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, Menoni H, Mongelard F, Hans F, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Dimitrov S, Bouvet P (2006) Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. EMBO Journal 25: 1669-1679

Atzori L, Dypbukt JM, Sundqvist K, Cotgreave I, Edman CC, Moldeus P, Grafstrom RC (1990) Growthassociated modifications of low-molecular-weight thiols and protein sulfhydryls in human bronchial fibroblasts. Journal of Cellular Physiology **143**: 165-171

Azum-Gélade MC, Noaillacdepeyre J, Caizerguesferrer M, Gas N (1994) Cell-cycle redistribution of U3 snRNA and fibrillarin - presence in the cytoplasmic nucleolus remnant and in the prenucleolar bodies at telophase. Journal of Cell Science 107: 463-475

**Baader SL, Bruchelt G, Carmine TC, Lode HN, Rieth AG, Niethammer D** (1994) Ascorbic-acid-mediated iron release from cellular ferritin and its relation to the formation of DNA strand breaks in neuroblastoma cells. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **120:** 415-421

Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, Nagasaka S, Fujimoto M, Takanashi H, Tsutsumi N, An G, Nakanishi H, Nishizawa NK (2011) The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. Nature Communications 2: 322

Becker R, Fritz E, Manteuffel R (1995) Subcellular-localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant *chloronerva*. Plant Physiology **108**: 269-275

Becker R, Manteuffel R, Neumann D, Scholz G (1998) Excessive iron accumulation in the pea mutants *dgl* and *brz*: subcellular localization of iron and ferritin. Planta 207: 217-223

Benes I, Schreiber K, Ripperger H, Kircheiss A (1983) On the normalizing factor for the tomato mutant *chloronerva*. 13. Metal-complex formation by nicotianamine, a possible phytosiderophore. Experientia 39: 261-262

**Bérczi A, Su D, Asard H** (2007) An *Arabidopsis* cytochrome b561 with trans-membrane ferrireductase capability. FEBS Letters **581**: 1505-1508

Bernal M, Casero D, Singh V, Wilson GT, Grande A, Yang HJ, Dodani SC, Pellegrini M, Huijser P, Connolly EL, Merchant SS, Kramer U (2012) Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. The Plant Cell **24**: 738-761

**Bienfait H, Scheffers M** (1992) Some properties of ferric citrate relevant to the iron nutrition of plants. Plant and Soil **143**: 141-144

**Bienfait HF** (1985) Regulated redox processes at the plasmalemma of plant-root cells and their function in iron uptake. Journal of Bioenergetics and Biomembranes **17:** 73-83

**Bienfait HF, Vandenbriel ML** (1980) Rapid mobilization of ferritin iron by ascorbate in the presence of oxygen. Biochimica Et Biophysica Acta 631: 507-510

Bino A, Shweky I, Cohen S, Bauminger ER, Lippard SJ (1998) A novel non-iron(III) citrate complex: A "ferric triple-decker". Inorganic Chemistry 37: 5168-5172

Blair MW, Knewtson SJB, Astudillo C, Li CM, Fernandez AC, Grusak MA (2010) Variation and inheritance of iron reductase activity in the roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and association with seed iron accumulation QTL. BMC Plant Biology **10**: 12

**Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascues J, Lamond AI** (2007) The multifunctional nucleolus. Nature Reviews Molecular Cell Biology **8:** 574-585

**Bonner J, Axtman G** (1937) The growth of plant embryos *in vitro* - Preliminary experiments on the role of accessory substances. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 23: 453-457

**Bonner J, Bonner D** (1938) Ascorbic acid and the growth of plant embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 24: 70-75

Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI (2010) The nucleolus under stress. Molecular Cell 40: 216-227

**Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ, Amalric F** (1998) Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. The Journal of Biological Chemistry **273**: 19025-19029

Bradbury MWB (1997) Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. Journal of Neurochemistry 69: 443-454

Brown JC (1966) Fe and Ca uptake as related to root-sap and stem-exudate citrate in soybeans. Physiologia Plantarum 19: 968

Brown JC, Chaney RL (1971) Effect of iron on transport of citrate into xylem of soybeans and tomatoes. Plant Physiology 47: 836

Brown JC, Ambler JE (1973) Reductants released by roots of Fe-deficient soybeans. Agronomy Journal 65: 311-314

Buckhout TJ, Bell PF, Luster DG, Chaney RL (1989) Iron-stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) is localized on the plasma-membrane. Plant Physiology **90**: 151-156

**Buettner GR** (1986) Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. Free Radical Research Commun 1: 349-353

**Caparros-Ruiz D, Lahmy S, Piersanti S, Echeverria M** (1997) Two ribosomal DNA-binding factors interact with a cluster of motifs on the 5' external transcribed spacer, upstream from the primary pre-rRNA processing site in a higher plant. European Journal of Biochemistry **247:** 981-989

**Carmona A, Cloetens P, Deves G, Bohic S, Ortega R** (2008) Nano-imaging of trace metals by synchrotron Xray fluorescence into dopaminergic single cells and neurite-like processes. Journal of Analytical Atomic Spectrometry **23**: 1083-1088

**Carmona A, Deves G, Ortega R** (2008) Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques. Analytical and Bioanalytical Chemistry **390:** 1585-1594

**Cenacchi L, Busch M, Schleidt PG, Muller FG, Stumpp TVM, Mantele W, Trost P, Lancaster CRD** (2011) Heterologous production and characterisation of two distinct dihaem-containing membrane integral cytochrome b(561) enzymes from *Arabidopsis thaliana* in Pichia pastoris and Escherichia coli cells. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1818**: 679-688

**Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **16:** 735-743

**Cmarko D, Verschure PJ, Rothblum LI, Hernandez-Verdun D, Amalric F, van Driel R, Fakan S** (2000) Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. Histochemistry and Cell Biology **113**: 181-187

**Cohen CK, Garvin DF, Kochian LV** (2004) Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum* sativum indicate a primary function in Fe uptake from the soil. Planta **218**: 784-792

**Colangelo EP, Guerinot ML** (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. The Plant Cell **16:** 3400-3412

**Comella P, Pontvianne F, Lahmy S, Vignols F, Barbezier N, DeBures A, Jobet E, Brugidou E, Echeverria M, Saez-Vasquez J** (2008) Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the prerRNA in the 3 ' ETS in *Arabidopsis*. Nucleic Acids Research **36**: 1163-1175

Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL (2000) Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. Genetics 154: 847-856

**Connolly EL, Campbell NH, Grotz N, Prichard CL, Guerinot ML** (2003) Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. Plant Physiology **133**: 1102-1110

Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and YELLOW STRIPE 1-LIKE transporters. Annals of Botany **103**: 1-11

**Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL** (2001) Maize *YELLOW STRIPE1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. Nature **409:** 346-349

**Dancis A, Klausner RD, Hinnebusch AG, Barriocanal JG** (1990) Genetic-evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology **10**: 2294-2301

**Davies KJA** (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: A new paradigm for oxidative stress. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life **48**: 41-47

**de Benoist B, McLean E, Egli I, Cogswell M** (2008) Worlwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data

de Carcer G, Medina FJ (1999) Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. Journal of Structural Biology **128**: 139-151

**De Tullio MC, Arrigoni O** (2003) The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. Seed Science Research **13:** 249-260

**Deltour R** (1985) Nuclear activation during early germination of the higher-plant embryo. Journal of Cell Science **75:** 43-83

**Diez JL, Vilarino VR, Medina FJ, Morcillo G** (2006) Nucleolar localization of a reverse transcriptase related to telomere maintenance in *Chironomus (Diptera*). Histochemistry and Cell Biology **126:** 445-452

Dovbeshko GI, Gridina NY, Kruglova EB, Pashchuk OP (2000) FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. Talanta 53: 233-246

**Dowling DP, Gattis SG, Fierke CA, Christianson DW** (2010) Structures of metal-substituted HUMAN HISTONE DEACETYLASE 8 provide mechanistic inferences on biological function. Biochemistry **49:** 5048-5056

**Dundr M, Raska I** (1993) Nonisotopic ultrastructural mapping of transcription sites within the nucleolus. Experimental Cell Research **208**: 275-281

**Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE** (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. Plant Physiology **144:** 197-205

**Duy D, Stube R, Wanner G, Philippar K** (2011) The chloroplast permease PIC1 regulates plant growth and development by directing homeostasis and transport of iron. Plant Physiology **155**: 1709-1722

Duy D, Wanner G, Meda AR, von Wiren N, Soll J, Philippar K (2007) PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. The Plant Cell **19:** 986-1006

**Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 5624-5628

**Eide DJ, Bridgham JT, Zhao Z, Mattoon JR** (1993) The vacuolar H+-atpase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial-function, and iron-metabolism. Molecular & General Genetics **241**: 447-456

**Epstein LM, Cheng HS, Lin CI, Li NC** (1970) Mossbauer spectra of iron(III)-citrate complexes. Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry **32**: 2104

**Fakan S, Puvion E** (1980) The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. International Review of Cytology **65:** 255-299

Feng HZ, An FY, Zhang SZ, Ji ZD, Ling HQ, Zuo JR (2006) Light-regulated, tissue-specific, and cell differentiation-specific expression of the *Arabidopsis* Fe(III)-chelate reductase gene *AtFRO6*. Plant Physiology 140: 1345-1354

**Fessel MR, Vasconcelos EG, Gurgueira SA, Meneghini R** (2007) A partially purified putative iron P type-ATPase mediates Fe3+ transport into proteoliposome. Archives of Biochemistry and Biophysics **458**: 229-235

**Fisher DB, Cash-Clark CE** (2000) Sieve tube unloading and post-phloem transport of fluorescent tracers and proteins injected into sieve tubes via severed aphid stylets. Plant Physiology **123**: 125-137

Fouraux MA, Bouvet P, Verkaart S, van Venrooij WJ, Pruijn GJM (2002) Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. Journal of Molecular Biology **320**: 475-488

**Fourcroy P, Vansuyt G, Kushnir S, Inze D, Briat JF** (2004) Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the *APX1* gene in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiology **134**: 605-613

Foury F, Roganti T (2002) Deletion of the mitochondrial carrier genes *MRS3* and *MRS4* suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. The Journal of Biological Chemistry 277: 24475-24483

**Foyer CH, Lelandais M** (1996) A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. Journal of Plant Physiology **148:** 391-398

Freed EF, Bleichert F, Dutca LM, Baserga SJ (2010) When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis. Molecular Biosystems 6: 481-493

**Fukushima T, Sia AK, Allred BE, Nichiporuk R, Zhou Z, Andersen UN, Raymond KN** (2012) *Bacillus cereus* iron uptake protein fishes out an unstable ferric citrate trimer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Online

Furia TE (1972) Sequestrants in Foods. CRC Handbook of Food Additives Chap. 6

**Gendre D, Czernic P, Conejero G, Pianelli K, Briat JF, Lebrun M, Mari S** (2007) *TcYSL3*, a member of the *YSL* gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. The Plant Journal **49:** 1-15

Gilbert N, Lucas L, Klein C, Menager M, Bonnet N, Ploton D (1995) 3-dimensional co-location of RNA polymerase 1 and DNA during interphase and mitosis by confocal microscopy. Journal of Cell Science 108: 115-125

Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P (1999) Structure and functions of nucleolin. Journal of Cell Science 112: 761-772

**Gonzalez-Camacho F, Medina FJ** (2006) The nucleolar structure and the activity of NopA100, a nucleolin-like protein, during the cell cycle in proliferating plant cells. Histochemistry and Cell Biology **125**: 139-153 **Gordon N** (2000) Friedreich's ataxia and iron metabolism. Brain and Development **22**: 465-468

Gottschalk W (1987) Development of *Pisum* genotypes under long-day and short-day phytotron conditions. Biologisches Zentralblatt 106: 207-218

Green LS, Rogers EE (2004) FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. Plant Physiology 136: 2523-2531

Griesen D, Su D, Berczi A, Asard H (2004) Localization of an ascorbate-reducible cytochrome b561 in the plant tonoplast. Plant Physiology **134:** 726-734

**Grinstead RR** (1960) The oxidation of ascorbic acid by hydrogen peroxide - Catalysis by ethylenediaminetetraacetato-iron(III). Journal of the American Chemical Society **82:** 3464-3471

Grummt I, Pikaard CS (2003) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. Nature Reviews Molecular Cell Biology 4: 641-649

Grusak MA (1994) Iron transport to developing ovules of *Pisum sativum*. I. Seed import characteristics and phloem iron-loading capacity of source regions. Plant Physiology **104**: 649-655

**Grusak MA** (1995) Whole-root iron(III)-reductase activity throughout the life-cycle of iron-grown *Pisum sativum* L. (*Fabaceae*) - relevance to the iron nutrition of developing seeds. Planta **197:** 111-117

**Grusak MA, Pezeshgi S** (1996) Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the *dgl* mutant of pea. Plant Physiology **110:** 329-334

**Grusak MA, Welch RM, Kochian LV** (1990) Physiological characterization of a single-gene mutant of *Pisum* sativum exhibiting excess iron accumulation. 1. Root iron reduction and iron uptake. Plant Physiology **93**: 976-981

Guerinot ML, Yi Y (1994) Iron - nutritious, noxious, and not readily available. Plant Physiology **104:** 815-820 Haber F, Weiss J (1932) On the catalysis of hydroperoxide. Naturwissenschaften **20:** 948-950

**Hallberg L, Brune M, Rossander L** (1986) Effect of ascorbic acid on iron absorption from different types of meals. Studies with ascorbic-acid-rich foods and synthetic ascorbic acid given in different amounts with different meals. Human Nutrition Applied Nutrition **40**: 97-113

Hallberg L, Brune M, Rossander L (1989) Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. American Journal of Clinical Nutrition 49: 140-144

Halliwell B (1978) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in presence of iron chelates - is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? FEBS Letters 92: 321-326

Hamm RE, Shull CM, Grant DM (1954) Citrate complexes with iron(II) and iron(III). Journal of the American Chemical Society 76: 2111-2114

Hasterok R, Maluszynska J (2000) Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid Brassica species. Genome 43: 574-579

Haydon MJ, Kawachi M, Wirtz M, Hillmer S, Hell R, Kramer U (2012) Vacuolar nicotianamine has critical and distinct roles under iron deficiency and for zinc sequestration in *Arabidopsis*. The Plant Cell **24**: 724-737

**Hernandez-Verdun D** (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. Histochemistry and Cell Biology **125**: 127-137

**Hirt H** (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**: 2405-2407

Hocking PJ, Pate JS (1977) Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. Annals of Botany 41: 1259-1278

Honda K, Smith MA, Zhu XW, Baus D, Merrick WC, Tartakoff AM, Hattier T, Harris PL, Siedlak SL, Fujioka H, Liu Q, Moreira PI, Miller FP, Nunomura A, Shimohama S, Perry G (2005) Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. The Journal of Biological Chemistry **280**: 20978-20986

Horemans N, Potters G, Caubergs RJ, Asard H (1998) Transport of ascorbate into protoplasts of *Nicotiana tabacum* Bright Yellow-2 cell line. Protoplasma **205**: 114-121

Huddleson JP, Ahmad N, Lingrel JB (2006) Up-regulation of the KLF2 transcription factor by fluid shear stress requires NUCLEOLIN. The Journal of Biological Chemistry **281:** 15121-15128

Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. The Plant Cell **16**: 1327-1339

Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, Nakanishi H, Aoki N, Hirose T, Ohsugi R, Nishizawa NK (2010) Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the longdistance transport of iron and manganese. The Plant Journal **62:** 379-390

Jako C, Kumar A, Wei YD, Zou JT, Barton DL, Giblin EM, Covello PS, Taylor DC (2001) Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. Plant Physiology **126**: 861-874

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions - beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher-plants. EMBO Journal 6: 3901-3907

Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 10619-10624

Jeong J, Connolly EL (2009) Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. Plant Science 176: 709-714

Jones HS, Kawauchi J, Braglia P, Alen CM, Kent NA, Proudfoot NJ (2007) RNA polymerase I in yeast transcribes dynamic nucleosomal rDNA. Nature Structural & Molecular Biology 14: 123-130

Jordan EG (1984) Nucleolar nomenclature. Journal of Cell Science 67: 217-220

Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution. Nature **411**: 909-917

Kamiya N, Shen JR (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus* vulcanus at 3.7-angstrom resolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 98-103

Kehr J RM (2007) Protein extraction from xylem and phloem sap. Methods in Molecular Biology 355: 27-35

Kim SA, Guerinot ML (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. FEBS Letters **581**: 2273-2280 Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li LT, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. Science **314**: 1295-1298

Kim SH, Koroleva OA, Lewandowska D, Pendle AF, Clark GP, Simpson CG, Shaw PJ, Brown JWS (2009) Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the *Arabidopsis* nucleolus. The Plant Cell **21**: 2045-2057

Klatte M, Schuler M, Wirtz M, Fink-Straube C, Hell R, Bauer P (2009) The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. Plant Physiology **150**: 257-271

**Kneen BE, Larue TA, Welch RM, Weeden NF** (1990) Pleiotropic effects of *brz* - a mutation in *Pisum sativum* cv-sparkle conditioning decreased nodulation and increased iron uptake and leaf necrosis. Plant Physiology **93**: 717-722

Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. Plant Journal **39**: 415-424 Kojima H, Suzuki T, Kato T, Enomoto K-i, Sato S, Kato T, Tabata S, Saez-Vasquez J, Manuel E, Nakagawa T, Ishiguro S, Nakamura K (2007) Sugar-inducible expression of the NUCLEOLIN1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. The Plant Journal **49**: 1053-1063

Kressler D, Hurt E, Bassler J (2010) Driving ribosome assembly. Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Cell Research 1803: 673-683

Kurisu G, Zhang HM, Smith JL, Cramer WA (2003) Structure of the cytochrome b(6)f complex of oxygenic photosynthesis: Tuning the cavity. Science **302**: 1009-1014

Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT (2008) Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. Histochemistry and Cell Biology **129:** 389-406

Lambert LA, Perri H, Halbrooks PJ, Mason AB (2005) Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology 142: 129-141

Lane DJR, Lawen A (2008) Non-transferrin iron reduction and uptake are regulated by transmembrane ascorbate cycling in K562 cells. The Journal of Biological Chemistry **283**: 12701-12708

Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. EMBO Journal 24: 4041-4051

Lasswell J, Rogg LE, Nelson DC, Rongey C, Bartel B (2000) Cloning and characterization of *IAR1*, a gene required for auxin conjugate sensitivity in *Arabidopsis*. The Plant Cell **12**: 2395-2408

Laulhere JP, Laboure AM, Briat JF (1990) Photoreduction and incorporation of iron into ferritins. Biochemical Journal 269: 79-84

Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS (2004) A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. Molecular Cell 13: 599-609

Le Jean M, Schikora A, Mari S, Briat JF, Curie C (2005) A loss-of-function mutation in *AtYSL1* reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. The Plant Journal **44:** 769-782

Lee S, Jeon US, Lee SJ, Kim YK, Persson DP, Husted S, Schjorring JK, Kakei Y, Masuda H, Nishizawa NK, An G (2009) Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**: 22014-22019

Lefebvre S, Burlet P, Viollet L, Bertrandy S, Huber C, Belser C, Munnich A (2002) A novel association of the SMN protein with two major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy. Human Molecular Genetics 11: 1017-1027

Li LY, Cai QY, Yu DS, Guo CH (2010) Overexpression of *AtFRO6* in transgenic tobacco enhances ferricchelate reductase activity in leaves and increases tolerance to iron-deficiency chlorosis. Molecular Biology Reports **38**: 3605-3613

Lin YF, Liang HM, Yang SY, Boch A, Clemens S, Chen CC, Wu JF, Huang JL, Yeh KC (2009) *Arabidopsis* IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. New Phytologist 182: 392-404

Ling HQ, Bauer P, Bereczky Z, Keller B, Ganal M (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 13938-13943

Ling HQ, Koch G, Baumlein H, Ganal MW (1999) Map-based cloning of *CHLORONERVA*, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 7098-7103

**Lingane JJ** (1946) Polarographic investigation of oxalate, citrate and tartrate complexes of ferric and ferrous iron. Journal of the American Chemical Society **68:** 2448-2453

Lonien J, Schwender J (2009) Analysis of metabolic flux phenotypes for two *Arabidopsis* mutants with severe impairment in seed storage lipid synthesis. Plant Physiology **151**: 1617-1634

Luwe MWF, Takahama U, Heber U (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. Plant Physiology **101:** 969-976

Marentes E, Grusak MA (1998) Iron transport and storage within the seed coat and embryo of developing seeds of pea (*Pisum sativum* L.). Seed Science Research 8: 367-375

Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat JF, Lebrun M, Czernic P (2006) Root-toshoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Journal of Experimental Botany **57**: 4111-4122

Marinos NG (1970) Embryogenesis of pea (*Pisum sativum*). 1. Cytological environment of developing embryo. Protoplasma **70**: 261

Martin M, Medina FJ (1991) A drosophila anti-RNA polymerase-II antibody recognizes a plant nucleolar antigen, RNA polymerase-I, which is mostly localized in fibrillar centers. Journal of Cell Science 100: 99-107

Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. Plant Physiology **126**: 1646-1667

**Matzapetakis M, Raptopoulou CP, Tsohos A, Papaefthymiou V, Moon N, Salifoglou A** (1998) Synthesis, spectroscopic and structural characterization of the first mononuclear, water soluble iron-citrate complex, (NH4)(5)Fe(C6H4O7)(2)center dot 2H(2)O. Journal of the American Chemical Society **120:** 13266-13267

Matsuyama S, Shimura M, Fujii M, Maeshima K, Yumoto H, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Nishino Y, Tamasaku K, Ishizaka Y, Ishikawa T, Yamauchi K (2010) Elemental mapping of frozen-hydrated cells with cryo-scanning X-ray fluorescence microscopy. X-Ray Spectrometry **39:** 260-266

McGeorges W (1949) Lime-induced chlorosis: relation between active iron and citric and oxalic acids. Soil Science 68: 381-390

McRae R, Bagchi P, Sumalekshmy S, Fahrni CJ (2009) In situ imaging of metals in cells and tissues. Chemical Reviews 109: 4780-4827

McStay B (2006) Nucleolar dominance: a model for rRNA gene silencing. Genes & Development 20: 1207-1214

Medina FJ, Cerdido A, de Carcer G (2000) The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. European Journal of Histochemistry 44: 117-131

**Medina FJ, Risueno MC, Rodriguezgarcia MI, Sanchezpina MA** (1983) The nucleolar organizer (NOR) and fibrillar centers during plant gametogenesis. Journal of Ultrastructure Research **85:** 300-310

Menon SG, Sarsour EH, Spitz DR, Higashikubo R, Sturm M, Zhang H, Goswami PC (2003) Redox regulation of the G1 to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. Cancer Research 63: 2109-2117

Moos T, Nielsen TR, Skjorringe T, Morgan EH (2007) Iron trafficking inside the brain. Journal of Neurochemistry 103: 1730-1740

Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li LT, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinot ML (2009) The FERROPORTIN metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. The Plant Cell **21**: 3326-3338

Mourant JR, Yamada YR, Carpenter S, Dominique LR, Freyer JP (2003) FT-IR spectroscopy demonstrates biochemical differences in mammalian cell cultures at different growth stages. Biophysical Journal 85: 1938-1947

Muhlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G, Lill R (2002) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. Human Molecular Genetics 11: 2025-2036

Muhlenhoff U, Stadler JA, Richhardt N, Seubert A, Eickhorst T, Schweyen RJ, Lill R, Wiesenberger G (2003) A specific role of the yeast mitochondrial carriers Mrs3/4p in mitochondrial iron acquisition under ironlimiting conditions. The Journal of Biological Chemistry **278:** 40612-40620

Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. Planta **223**: 1178-1190

Murakami T, Ise K, Hayakawa M, Kamei S, Takagi SI (1989) Stabilities of metal-complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron(III). Chemistry Letters: 2137-2140

Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T (2006) A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. The Plant Journal **46**: 563-572

Nagasaka S, Takahashi M, Nakanishi-Itai R, Bashir K, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009) Time course analysis of gene expression over 24 hours in Fe-deficient barley roots. Plant Molecular Biology **69:** 621-631

Nguyen-Legros J, Bizot J, Bolesse M, Pulicani JP (1980) Diaminobenzidine black as a new histochemical demonstration of exogenous iron. Histochemistry 66: 239-244

Nissan TA, Bassler J, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. EMBO Journal **21:** 5539-5547

Noma M, Noguchi M, Tamaki E (1971) New amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. Tetrahedron Letters: 2017

Nomoto K, Yoshioka H, Arima M, Fushiya S, Takagi S, Takemoto T (1981) Structure of 2'-deoxymugineic acid, a novel amino-acid possessing an iron-chelating activity. Chimia **35:** 249-250

Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. The Journal of Biological Chemistry **286**: 5446-5454

Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, Edwardson JA, Elstner M, Morris CM (2007) Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. Neurology **68**: 1820-1825

**Ohnishi T, Ragan CI, Hatefi Y** (1985) Electron-paramagnetic-res studies of iron-sulfur clusters in isolated subunits and subfractions of NADH-ubiquinone oxidoreductase. The Journal of Biological Chemistry **260**: 2782-2788

Ohnishi T, Salerno JC, Winter DB, Lim J, Yu CA, Yu L, King TE (1976) Thermodynamic and EPR characteristics of 2 ferredoxin-type iron-sulfur centers in succinate ubiquinone reductase segment of respiratory-chain. The Journal of Biological Chemistry 251: 2094-2104

Ortega R, Cloetens P, Deves G, Carmona A, Bohic S (2007) Iron storage within dopamine neurovesicles revealed by chemical nano-imaging. Plos One 2

**Ouerdane L, Mari S, Czernic P, Lebrun M, Lobinski R** (2006) Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOF MS/MS after their isolation by 2D Size-Exclusion – Hydrophilic Interaction LC (SEC – HILIC) monitored by ICP MS. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 21: 676-683

Palmer CM, Guerinot ML (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. Nature Chemical Biology 5: 333-340

**Palmgren MG** (2001) Plant plasma membrane H<sup>+</sup> ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52**: 817-845

**Patrick JW** (1997) Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**: 191-222

**Patrick JW, Offler CE** (2001) Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. Journal of Experimental Botany **52:** 551-564

Pederson T (1998) The plurifunctional nucleolus. Nucleic Acids Research 26: 3871-3876

**Perls** (1867) Nachweis von Eisenoxyd in gewissen pigmenten. Virchows Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin **39:** 42-48

**Peterson NA, Anderson BF, Jameson GB, Tweedie JW, Baker EN** (2000) Crystal structure and iron-binding properties of the R210K mutant of the N-lobe of human Lactoferrin: Implications for iron release from Transferrins. Biochemistry **39**: 6625-6633

Petricka JJ, Nelson TM (2007) Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. Plant Physiology 144: 173-186

**Pich A, Hillmer S, Manteuffel R, Scholz G** (1997) First immunohistochemical localization of the endogenous Fe2+-chelator nicotianamine. Journal of Experimental Botany **48:** 759-767

**Pich A, Scholz G** (1996) Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. Journal of Experimental Botany **47**: 41-47

**Pich A, Scholz G, Stephan UW** (1994) Iron-dependent changes of heavy-metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of 2 tomato genotypes - Nicotianamine as possible copper translocator. Plant and Soil **165**: 189-196

**Pontes O, Pikaard CS** (2008) siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. Current Opinion in Genetics & Development **18:** 197-203

**Pontvianne F, Matia I, Douet J, Tourmente S, Medina FJ, Echeverria M, Saez-Vasquez J** (2007) Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in *Arabidopsis*. Molecular Biology of the Cell **18**: 369-379

Quintana C, Bellefqih S, Laval JY, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Avila J, Ferrer I, Arranz R, Patino C (2006) Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. Journal of Structural Biology 153: 42-54

Raska I, Koberna K, Malinsky J, Fidlerova H, Masata M (2004) The nucleolus and transcription of ribosomal genes. Biology of the Cell **96:** 579-594

**Raska I, Shaw PJ, Cmarko D** (2006) New insights into nucleolar architecture and activity. *In* KW Jeon, International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 255, Vol 255, pp 177-+

Rautenkranz AAF, Li LJ, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ (1994) Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* cv Gerbel) leaves. Plant Physiology **106**: 187-193

**Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F** (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. The Plant Journal **57:** 400-412

Reichard P (1993) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases. Science 260: 1773-1777

Reichardt M, Rogers S (1994) Preparation of genomic DNA from plant tissue. Current Protocols in Molecular Biology Chap.2 Unit 2.3

**Rellan-Alvarez R, Abadia J, Alvarez-Fernandez A** (2008) Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22: 1553-1562

**Rellan-Alvarez R, Giner-Martinez-Sierra J, Orduna J, Orera I, Rodriguez-Castrillon JA, Garcia-Alonso JI, Abadia J, Alvarez-Fernandez A** (2010) Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. Plant and Cell Physiology **51:** 91-102

**Rieske JS, Maclennan DH, Coleman R** (1964) Isolation and properties of iron-protein from (reduced coenzyme q) -cytochrome c reductase complex of respiratory chain. Biochemical and Biophysical Research Communications 15: 338

Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. Nature **397**: 694-697

**Rodrigo RM, Rendon MC, Torreblanca J, Garciaherdugo G, Moreno FJ** (1992) Characterization and immunolocalization of RNA polymerase-I transcription factor UBF with anti-NOR serum in protozoa, higher-plant and vertebrate cells. Journal of Cell Science **103**: 1053-1063

**Roger B, Moisand A, Amalric F, Bouvet P** (2003) Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. Chromosoma **111**: 399-407

**Römheld V, Marschner H** (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant Physiology **80:** 175-180

**Römheld VM, H.** (1983) Mechanism of iron uptake by peanut plants - I. Fe<sup>III</sup> reduction, chelate splitting, and release of phenolics. Plant Physiology **71**: 949-954

**Roschzttardtz H, Conéjéro G, Curie C, Mari S** (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. Plant Physiology **151**: 1-10

**Roschzttardtz H, Séguéla-Arnaud M, Briat J-F, Vert G, Curie C** (2011) The FRD3 citrate effluxer promotes iron nutrition between symplastically disconnected tissues throughout *Arabidopsis* development. The Plant Cell **23**: 2725-2737

Royal A, Simard R (1975) RNA-synthesis in ultrastructural and biochemical components of nucleolus of chinese-hamster ovary cells. Journal of Cell Biology 66: 577-585

**Rubbi CP, Milner J** (2003) Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. EMBO Journal **22:** 6068-6077

**Running JA, Severson DK, Schneider KJ** (2002) Extracellular production of L-ascorbic acid by *Chlorella protothecoides*, Prototheca species, and mutants of P-moriformis during aerobic culturing at low pH. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **29:** 93-98

Saez-Vasquez J, Caparros-Ruiz D, Barneche F, Echeverria M (2004) A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing *in vitro*. Molecular and Cellular Biology **24**: 7284-7297

**Saez-Vasquez J, Medina FJ** (2008) The plant nucleolus. *In* JC Kader, M Delseny, eds, Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology, Vol. 47, Vol 47, pp 1-46

**SaezVasquez J, Pikaard CS** (1997) Extensive purification of a putative RNA polymerase I holoenzyme from plants that accurately initiates rRNA gene transcription *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 11869-11874

Santi S, Schmidt W (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. New Phytologist 183: 1072-1084

Savino TM, Gebrane-Younes J, De Mey J, Sibarita JB, Hernandez-Verdun D (2001) Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. Journal of Cell Biology **153**: 1097-1110

Sayers MH, Lynch SR, Jacobs P, Charlton RW, Bothwell TH, Walker RB, Mayet F (1973) The effects of ascorbic acid supplementation on the absorption of iron in maize, wheat and soya. British Journal of Haematology 24: 209-218

Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, von Wiren N (2004) ZmYS1 functions as a protoncoupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. The Journal of Biological Chemistry 279: 9091-9096

Schagerlöf U, Wilson G, Hebert H, Al-Karadaghi S, Hagerhall C (2006) Transmembrane topology of FRO2, a ferric-chelate reductase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology **62:** 215-221

Scheer U, Rose KM (1984) Localization of RNA polymerase-I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron-microscopic immunocytochemistry. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81: 1431-1435

Schmidt W, Schikora A (2001) Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. Plant Physiology 125: 2078-2084

**Schroder JM** (2005) Ferritinopathy: diagnosis by muscle or nerve biopsy, with a note on other nuclear inclusion body diseases. Acta Neuropathol **109:** 109-114

Schuler M, Rellàn-Alvarez R, Fink-Straube C, Abadia J, Bauer P (2012) Nicotianamine functions in the Phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. The Plant Cell **24**: 2380-2400

Shanmugam V, Lo JC, Wu CL, Wang SL, Lai CC, Connolly EL, Huang JL, Yeh KC (2011) Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* - The role in zinc tolerance. New Phytologist **190**: 125-137

Shaw PJ, Jordan EG (1995) The nucleolus. Annual Review of Cell and Developmental Biology 11: 93-121

Shikanai T, Muller-Moule P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M (2003) PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. The Plant Cell **15**: 1333-1346

Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Genetics **148**: 1821-1828

Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman AR, Usuda H (1997) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Plant Physiology **114**: 1595-1595

Shingles R, North M, McCarty RE (2002) Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes. Plant Physiology **128**: 1022-1030

Shweky I, Bino A, Goldberg DP, Lippard SJ (1994) Syntheses, structures, and magnetic-properties of 2 dinuclear iron(III) citrate complexes. Inorganic Chemistry 33: 5161-5162

Siliprandi L, Vanni P, Kessler M, Semenza G (1979) Na+ dependent, electroneutral L-ascorbate transport across brush-border membrane-vesicles from guinea-pig small-intestine. Biochimica Et Biophysica Acta 552: 129-142

Sivitz A, Hermand V, Curie C, Vert G (2012) *Arabidopsis* bHLH100 and bHLH101 Control Iron Homeostasis via a FIT-Independent Pathway. Plos One **7** 

Smith CH, Bidlack WR (1980) Interrelationship of dietary ascorbic acid and iron on the tissue distribution of ascorbic acid, iron and copper in female guinea pigs. The Journal of nutrition 110: 1398-1408

Smith MA, Harris PLR, Sayre LM, Perry G (1997) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 9866-9868

Srere P (1959) The citrate cleaving enzyme. I- Distribution and purification. The Journal of Biological Chemistry 234: 2544 - 2547

**Stacey MG, Koh S, Becker J, Stacey G** (2002) AtOPT3, a member of the oligopeptide transporter family, is essential for embryo development in Arabidopsis. Plant Cell **14**: 2799-2811

Stacey MG, Patel A, McClain WE, Mathieu M, Remley M, Rogers EE, Gassmann W, Blevins DG, Stacey G (2008) The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. Plant Physiology **146**: 589-601

**Stangeland B, Salehian Z** (2002) An improved clearing method for GUS assay in *Arabidopsis* endosperm and seeds. Plant Molecular Biology Reporter **20:** 107-114

**Stasolla C, Yeung EC** (2001) Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. Physiologia Plantarum **111:** 196-205

**Steczko J, Axelrod B** (1992) Identification of the iron-binding histidine-residues in soybean lipoxygenase L-1. Biochemical and Biophysical Research Communications **186**: 686-689

**Stefanovsky V, Moss T** (2006) Regulation of rRNA synthesis in human and mouse cells is not determined by changes in active gene count. Cell Cycle **5**: 735-739

**Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, Picot D** (2003) An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. Nature **426:** 413-418

**Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB** (2005) Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. Cell **123**: 49-63

**Takagi S, Nomoto K, Takemoto T** (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. Journal of Plant Nutrition **7:** 469-477

Takahama U (1998) Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotiana tabacum* L. Plant and Cell Physiology **39:** 681-689

Takahashi M, Nozoye T, Kitajima N, Fukuda N, Hokura A, Terada Y, Nakai I, Ishimaru Y, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK (2009) *In vivo* analysis of metal distribution and expression of metal transporters in rice seed during germination process by microarray and X-ray Fluorescence Imaging of Fe, Zn, Mn, and Cu. Plant and Soil **325**: 39-51

**Tao W, Xu W, Valdivia MM, Hao S, Zhai ZH** (2001) Distribution and transcription activity of nucleolar DNA in higher plant cells. Cell Biology International **25:** 1167-1171

Terry N, Abadia J (1986) Function of iron in chloroplasts. Journal of Plant Nutrition 9: 609-646

**Theil EC** (1987) FERRITIN - Structure, gene-regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. Annual Review of Biochemistry **56**: 289-315

Tiffin LO, Brown JC (1962) Iron chelates in soybean exudates. Science 135: 311

Tiffin LO (1965) Translocation of iron by citrate in plant exudates. Plant Physiology S 40: R12

**Tiffin LO** (1966) Iron translocation. 2. Citrate/iron ratios in plant stem exudates. Plant Physiology **41:** 515

**Tiffin LO** (1966) Iron translocation. 1. Plant culture exudate sampling iron-citrate analysis. Plant Physiology **41:** 510

**Tiffin LO** (1970) Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exudate of soybean. Plant Physiology **45**: 280

Toggenburger G, Hausermann M, Mutsch B, Genoni G, Kessler M, Weber F, Hornig D, Oneill B, Semenza G (1981) Na+ dependent, potential-sensitive L-ascorbate transport across brush-border membrane-vesicles from kidney cortex. Biochimica Et Biophysica Acta 646: 433-443

Urzica EI, Casero D, Yamasaki H, Hsieh SI, Adler LN, Karpowicz SJ, Blaby-Haas CE, Clarke SG, Loo JA, Pellegrini M, Merchant SS (2012) Systems and trans-system level analysis identifies conserved iron deficiency responses in the plant lineage. The Plant Cell Online

Vacchina V, Mari S, Czernic P, Marques L, Pianelli K, Schaumlöffel D, Lebrun M, Lobinski R (2003) Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. Analytical Chemistry **75:** 2740-2745

Van Dongen JT, Ammerlaan AMH, Wouterlood M, Van Aelst AC, Borstlap AC (2003) Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. Annals of Botany **91:** 729-737

Vert G, Barberon M, Zelazny E, Seguela M, Briat JF, Curie C (2009) *Arabidopsis* IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells. Planta **229**: 1171-1179

**Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. The Plant Cell **14**: 1223-1233

Vidal R, Ghetti B, Takao M, Brefel-Courbon C, Uro-Coste E, Glazier BS, Siani V, Benson MD, Calvas P, Miravalle L, Rascol O, Delisle MB (2004) Intracellular Ferritin accumulation in neural and extraneural tissue characterizes a neurodegenerative disease associated with a mutation in the ferritin light polypeptide gene. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **63**: 363-380

von Wiren N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC (1999) Nicotianamine chelates both Fe-III and Fe-II. Implications for metal transport in plants. Plant Physiology **119**: 1107-1114

von Wiren N, Mori S, Marschner H, Romheld V (1994) Iron inefficiency in maize mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv Yellow-stripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. Plant Physiology **106**: 71-77

Wang W, Di X, Torti SV, Torti FM (2010) Ferritin H induction by histone deacetylase inhibitors. Biochemical Pharmacology **80:** 316-324

Wapnick AA, Bothwell TH, Seftel H (1970) The relationship between serum iron levels and ascorbic acid stores in siderotic Bantu. British Journal of Haematology 19: 271-276

Warner JR (1989) Synthesis of ribosomes in Saccharomyces cerevisiae. Microbiological Reviews 53: 256-271

Warner JR (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. Trends in Biochemical Sciences 24: 437-440

Waters BM, Blevins DG, Eide DJ (2002) Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. Plant Physiology **129:** 85-94.

Waters BM, Chu HH, DiDonato RJ, Roberts LA, Eisley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) 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 Physiology **141**: 1446-1458

Waters BM, Grusak MA (2008) Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line *ysl1ysl3*. New Phytologist 177: 389-405

Waters BM, Grusak MA (2008) Quantitative trait locus mapping for seed mineral concentrations in two *Arabidopsis thaliana* recombinant inbred populations. New Phytologist **179**: 1033-1047

Witting PK, Harris HH, Rayner BS, Aitken JB, Dillon CT, Stocker R, Lai B, Cai Z, Lay PA (2006) The endothelium-derived hyperpolarizing factor,  $H_2O_2$ , promotes metal-ion efflux in aortic endothelial cells: elemental mapping by a hard X-ray microprobe. Biochemistry **45**: 12500-12509

Wollman FA, Minai L, Nechushtai R (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics 1411: 21-85

Woolford JL (1991) The structure and biogenesis of yeast ribosomes. Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine 29: 63-118

**Wu B, Becker JS** (2012) Imaging techniques for elements and element species in plant science. Metallomics **4**: 403-416

Wu HL, Li LH, Du J, Yuan YX, Cheng XD, Ling HQ (2005) Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology **46**: 1505-1514

**Wu YL, Brosh RM** (2012) DNA helicase and helicase-nuclease enzymes with a conserved iron-sulfur cluster. Nucleic Acids Research **40:** 4247-4260

**Xoconostle-Cazares B, Ruiz-Medrano R, Lucas WJ** (2000) Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b(5) reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. The Plant Journal **24:** 735-747

Yi Y, Guerinot ML (1996) Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. The Plant Journal 10: 835-844

Yuan YX, Wu HL, Wang N, Li J, Zhao WN, Du J, Wang DW, Ling HQ (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. Cell Research 18: 385-397

Zaharieva TB, Abadia J (2003) Iron deficiency enhances the levels of ascorbate, glutathione, and related enzymes in sugar beet roots. Protoplasma 221: 269-275

Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. Nature Reviews Neuroscience 5: 863-873

Zhang WH, Zhou YC, Dibley KE, Tyerman SD, Furbank RT, Patrick JW (2007) Nutrient loading of developing seeds. Functional Plant Biology 34: 314-331

Zheng LQ, Cheng ZQ, Ai CX, Jiang XH, Bei XS, Zheng Y, Glahn RP, Welch RM, Miller DD, Lei XG, Shou HX (2010) Nicotianamine, a Novel Enhancer of Rice Iron Bioavailability to Humans. Plos One 5: 7

**Zhu L, Glahn RP, Yeung CK, Miller DD** (2006) Iron uptake by Caco-2 cells from NaFeEDTA and FeSO<sub>4</sub>: Effects of ascorbic acid, pH, and a Fe(II) chelating agent. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**: 7924-7928

Zouni A, Witt H-T, Kern J, Fromme P, Krauss N, Saenger W, Orth P (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 [angst] resolution. Nature **409**: 739-743

## **Abbréviations**

ADN	Acide désoxyribonucléique
AEC	Automatic efficiency control
AHA	ARABIDOPSIS H <sup>+</sup> ATPASE
AIFIRA	Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine
ANR	Agence Nationale de la Recherche
At	Arabidopsis thaliana
ARN	Acide ribonucléique
AOX	A scorbate oxidase
ARNr	ARN rihosomal
ARNm	ARN messager
ADNc	A cide désovyribonucléique complémentaire
APTR	A denosine phosphoribosyl transferace
A thaliana	Arabidopsis thaliana
ΔΤΟ	A dénocina Trinhomheta
	Adenosine Triphosphale
	Dasic Heitx-Loop-Heitx
	DOIC Ded and for all a line die 16 meter
BPDS	Bathophenanthroline disulfonate
brz	bronze
BY-2	Bright Yellow-2
	Degré Celsius
C	Carbone
Ca	Calcium
ccc1	Cellular calcium homeostasis
Cf.	confer
Chln	Chloronerva
CF	Centre Fibrillaire
CFD	Composante Fibrillaire Dense
CG	Centre granulaire
Cit	Citrate
C1	Chlore
cm	centimètre
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
Co	Cobalt
CoA	Coenzyme A
Col-5	Columbia-5
Col-0	Columbia-0
СРМ	Coups par minute
C. reinhardtii	Chlamvdomonas reinhardtii
СТАВ	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
Си	Cuivre
CYB	CYTOCHROME B
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	4' 6'-diamidino-2-nhénylindole
dal	decemeratione leagues
DHA	Debydroascorbic acid, acide débydroascorbique
DIDS	A cide 1 1/- disothiograpo-2 2/-stillene-disulfonique
DMA	Deow/Musineis Asid
	Decoxymuginete Actu
DNA	Desotyfillofiluciele acid
	Dénsité optique
	Degradations par minute
	Electropotentiel
EDDHA	Acide Ethylène Diamine-N,N'-bis(2-hydroxyphénylacétique)
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EDX	Energy Dispersive X-ray spectroscopy

EF1α	ELONGATION FACTOR $\alpha$
e.g.	exempli gratia
EGTA	Acide Ethylène Glycol Tetra-Acétique
EMS	Méthanesulfonate d'éthyl
ESI	Electrospray Ionization
ESL	Embryo sac liquid
et al. <i>et alii</i>	
Etc	et caetera
ETS	External Transcribe Spacer
eV	Electron Volt
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAO	Food and Agriculture Organisation
Fe	Fer
Fe2+	Fer ferreux
Fe3	Fer ferrique
FFR	FF RECIILATOR
f EK fat	FE REGULATOR
	Fello-O <sub>2</sub> -oxydoleductase
FII	FEDRODODTIN
FPN C. L	
Ird	FERRIC REDUCTACE
FRE	FERRIC REDUCTASE
FRO	FERRIC REDUCTASE OXIDASE
FW	Fresh weight
FCR	Ferric-chelate reductase
fmol	femtomole
FT-IR	Fourier Transform - InfraRed
g	Gramme
GABI-Kat	German plant genomic research Kölner Arabidopsis T-DNA lines
gl-1	glabrous-1
GUS	β-glucuronidase
h	heure
Н	Hydrogène
H+	Proton
HeLa	Cellules immortelles de cancer des cervicales de Henrietta Lacks
HILIC	HydrophILic Interaction Chromatography
НМА	HEAVY METAL ATPASE
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ι	Iode
IAR	Indol-acetic acid. Alanine Resistant
ICP	Inductively-Coupled Plasma
ie	id est
IRT	IRON REGULATED TRANSPORTER
ITS	Internal Transcribed Spacer
K	Affinité potassium ou degré Kelvin
K 562	Cellules éruthroleucémiques
	Lagar Ablation ablation lagar
	Lazer Adration, adration laser
	Laboratoire de Chimie Analytique, Dio-inorganique et Environnementaile
L. esculentum	<i>Lycopersicum esculentum</i> , tomate
LSE	Liquide du Sac Embryonnaire
LUCIA	Line for Ultimate Characterisation by Imaging and Absorption
M	Molaire
MA	Mugineic Acid
Mal	Malate
MATE	MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION
MES	Acide (2-(N-morpholino) éthane sulfonique
MF	Masse Fraîche

Mg	Magnésium
mg	Milligramme
miARN	microARN
min	Minute
MIT	MITOCHONDRIAL IRON TRANSPORTER
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
Mn	Manganèse
Mo	Molybdène
mrs	Suppressor of mtRNA splicing defect
ms	Millingcondec
MS	Mans mastromatry ou Massa Sàsha
MS	Miley Murachice et Shace
115	Mineu Murasinge et Skoog
m/v	iviasse par volume
m/z	Masse sur charge
N	Azote
NA	Nicotianamine
Na	Sodium
NaAc	Acétate de sodium
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAS	Nicotianamine synthase
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Center
Ni	Nickel
nm	Nanomètre
nmol	Nanomole
NRAMP	NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN
NUC	Nucleolin
0	Oxygène
OD	Optical density
OPT	OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER
Р	Phosphore
PCR	Polymerase chain reaction
Perls	Ferrocyanure de notassium
PIC	PERMEASE IN CHI OROPI AST
DIXE	Particle-Induced X-ray Emission
DODEVE	Factour de transcription bHI H
Drá ADN.	Promoteur Dréasann de l'ADN site en sel
D.	
PS C	Pisum satioum
P. sativum	Prisum sativum, pois
QIL DIT	
KH	REGULATED IKON TRANSPORTER
KIVIIN DNIA	Resonnance Magnetique Nucleaire
RNA	Ribonucleic acid
RNA1	ARN interferent
RON	Région Organisatrice du Nucléole
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Rayonnement Photosynthétiquement Actif
RPE	Résonnance Paramagnétique Electronique
RPM	Rotations par minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
S	Soufre
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae, levure de boulanger
SD	Standard deviation, écart-type
SDS	Sodium dodécyl sulfate

SE	Standard error, erreur standard
SEC	Steric Exclusion Chromatography
SEM	Scanning Electron Microscopy
snoRNP	Small nucleolar RiboNucleoProtein
SOLEIL	Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE
SR-XRF	Synchrotron Radiation X Ray Fluorescence
SUT	SUCROSE TRANSPORTER
Tc	Thlaspi caerulescens
T. caerulescens	Thlaspi caerulescens
T-DNA	Acide désoxyribonucléique de transfert
TEM	Transmission Electron Microscopy
ТОМ	TRANSPORTER OF MUGINEIC ACID
tSIE	Transformed spectral index of external standard
UMR	Unité Mixte de Recherche
USA	United States of America
UV	Ultra-Violets
VIT	VACUOLAR IRON TRANSPORTER
V	Volt
v/v	Volume à volume
w/v	Masse par volume
WT	Wild-Type, sauvage
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure
XAS	X Ray Absorption
X-Gluc	Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronique
XRF	X Ray Fluorescence
YS	YELLOW STRIPE
YSL	YELLOW-STRIPE LIKE
Zn	Zinc
ZIP	ZRT IRT-LIKE PROTEIN
μCi	MicroCurie
μg	Microgramme
μL	Microlitre
μm	Micromètre
μΜ	Micromolaire
### **Remerciements**

Sur le plan scientifique, je veux d'abord remercier toutes les personnes impliquées dans ce projet de recherche: Paulina Flis, Laurent Ouerdane, et Ryszard Lobinski du LCABIE de Pau qui ont réalisé les expériences de chimie analytique présentées dans ce travail, ainsi que Marie-Pierre Isaure qui a rendu possible les expériences menées aux synchrotrons SOLEIL et ESRF. Je remercie également le personnel de ligne LUCIA du synchrotron SOLEIL, Nicolas Trcera, Anne-Marie Flanck, Delphine Vantelon, Pierre Lagarde, Damien Roy et Matthieu Chorro qui ont été d'un soutien sans faille lors de nos visites.

Je remercie particulièrement Hannetz Roschzttardtz de ses conseils, de son aide avec le marquage histochimique du fer, ainsi que de m'avoir permis de participer à l'étude du pool nucléaire de fer.

Je remercie Jossia Boucherez, Damien Sudre, Brigitte Touraine et Robert Blanvillain pour leur aide pour les clonages, les protocoles, et leurs conseils. et je remercie Jean-Baptiste Thibaut pour ses conseils sur l'utilisation de SigmaPlot.

Merci également aux services communs de BPMP, administratifs et techniques. Merci notamment à l'équipe Moyens de Culture qui fait toujours du très bon boulot et est indispendable au bon fonctionnement du laboratoire. Je remercie plus personnellement Thierry Dessup, José Garcia, Hugues Baudot, Guy Ruiz, Xavier Dumont, Franck Lecocq, Henrique Afonso qui m'ont tous aidé pendant ces trois ans. Je remercie également Véronique Rafin, Cyrielle Muller, Caroline Ausseil, Cécile Abauzit et Sophie Gelin de la gestion. Un grand merci à Chantal Baracco pour son super travail d'organisation de la Caravane des sciences, ainsi que pour son aide précieuse en tant que documentaliste.

Je tiens à remercier l'INRA qui a financé ces recherches, et en l'occurrence, M. Frédéric Gaymard. Sans ce financement presque inespéré, rien n'aurait été possible. Je remercie mes collègues les plus proches, ceux avec qui j'ai partagé nombres de repas, de cafés, de bières, et de discussions : Sandrine Chay, J.F. Briat, Damien Sudre, Marc Bournier, Guillhem Reyt, Alex Martinière, Fred Sanchez (reste assis, c'est pas grave !), Nicolas Tissot, Carine Alcon, Stéphanie Loubet, Odile Richard, Elsa Ronzier, Tou Cheu Xiong. Je remercie aussi mes collègues de Kung-Fu et autres activités, Illiana Ribeiro, Christelle Taochy, Jossia Boucherez, Brigitte Touraine, Mamy Andrianteranagna, avec une petite pensée pour Alice Drain et Oriane Mith ! Force et honneur les jeunes ! Vous êtes les vieilles de demain ! Vous allez tous me manquer, et ça va être difficile de retrouver un environnement de travail aussi sympathique parce que vous avez mis la barre très haute !

Je remercie particulièrement Carine Alcon qui a toujours fait preuve d'une grande gentillesse et qui m'a beaucoup aidé pour mes photos et mes expériences d'imagerie.

Un grand merci à ma stagiaire Mlle Saint-Cirel Amélie qui a été d'une grande aide et qui est restée très sérieuse et professionnelle pendant les mois qu'elle a passés au laboratoire.

Je remercie également l'équipe TSF d'avant, Greg, Marie, Hannetz, Enric, Manuel et Robert, pour vos remarques souvent constructives. Ca n'a pas toujours été facile entre nous, mais je vous aime bien quand même.

Je remercie les membres de mon jury Karine Gallardo, Sébastien Thomine, Jacques Bourguignon, Michel Lebrun et Frédéric Gaymard pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail ainsi que pour la qualité de leurs questions et corrections.

Je remercie bien chaleureusement mes deux encadrants Catherine Curie et Stéphane Mari

pour leur accueil, leur soutien dans les moments difficiles, et pour tout ce qu'ils m'ont appris. J'espère que tout le retour se passera bien pour toi Cathy, et on se reverra sans doute à Taïwan! Et Steph, j'aurais plein de choses à dire! J'ai vraiment beaucoup aimé travailler avec toi, et je sens que ça va être difficile de trouver un chef avec qui je m'entende aussi bien. Je te remercie beaucoup de m'avoir donné ma chance, et je te remercie également pour les bons moments passés ensemble. La pêche, les champignons, le synchrotron, Boston, les soirées... Bref, j'oublie sans doute d'autres moments mais au moins c'est un échantillon représentatif. Et je pense que pour un doctorat, il est vraiment important d'être bien encadré, à la fois scientifiquement et psychologiquement, et tu as su faire ça très bien. Et tu le feras sans doute encore pour d'autre! Voire même encore plus avec ton HDR (la voilà la balle dans le pied!). J'espère sincèrement que l'on restera en contact et que je pourrais un jour vous renvoyer l'ascenseur à Cathy et toi!

Un doctorat est long travail. Un long travail de formation d'abord, puis un long travail de recherche. Mais, plus important encore que l'effort intellectuel fourni, un doctorat est un travail sur soi. Il requiert un effort psychologique qui permet de se donner la patience et la persévérance nécessaire dans les moments de doute et les nombreuses défaites inhérents à la recherche. Et c'est dans ces moments que l'on comprend à quel point l'affection de notre entourage est importante. Car même si l'on passe la plus grande partie de notre vie au laboratoire, le laboratoire n'est pas notre vie.

A mon entourage, amis et famille, je veux dire que la thèse ne nécessite pas réellement de grandes qualités intellectuelles, si ce n'est la persévérance. Mais contrairement à ce qu'il n'y paraît, l'intelligence n'est pas une qualité requise. J'ai moi-même une très mauvaise mémoire, et je ne suis pas particulièrement vif. Et d'ailleurs, la définition du mot intelligence est très vague : « faculté de connaître et de comprendre ». Mais étudier la biologie nous montre surtout que nous connaissons peu de choses, et que nous comprenons très lentement. Et d'ailleurs, en quoi est-ce intelligent de s'enfermer dans un laboratoire jour et nuit, vacances et week-end ? Comment cela peut-il nous aider à connaître et comprendre le monde vivant ? Je ne cherche pas à dénigrer mon travail, que j'aime beaucoup du reste, mais simplement à montrer que la voie que j'ai choisie n'est qu'un des chemins possibles pour arriver à obtenir ce que nous recherchons tous d'une manière ou d'une autre : la satisfaction. Je pense que ce n'est ni le chemin le plus honorable, ni le plus juste, et certainement pas le plus court. Mais au fond, comme me l'a si justement fait remarquer mon premier encadrant, Antoine Deniau, peu importe où l'on arrive, c'est seulement le chemin parcouru qui compte. A cela, j'ai envie d'ajouter que la vie n'est pas une course, et encore moins une course à la réussite sociale. Et aussi, peu importe l'ivresse, du moment que le flacon a été bu en bonne compagnie !

Pour toutes ces raisons, je tiens à remercier ma famille. Mon père et ma mère bien sur, et aussi ma belle-mère, pour le soutien sans faille qu'ils m'ont apporté. Il m'a été nécessaire d'aller me ressourcer à de nombreuses reprises durant cette thèse. Je veux également remercier ma sœur Elise, et mon frère Morgan pour leurs encouragements, ainsi que Jean-Jacques, Charlotte, Hugo et Cureuil pour tous les bons moments partagés avant et pendant ces trois ans. Et pour les bons moments à venir bien sur ! Je remercie également mes amis de longue date, que j'ai la chance d'avoir en très grand nombre ! Je ne vais pas me risquer à faire une liste, car je suis sur d'en oublier ! Désolé les gars (et les gaffettes), mais pour être sur de ne vexer personne, je préfère vous vexer tous, ça me paraît plus juste pour les autres ! Bon, je vais me risquer quand

même, parce que je sens déjà vos regards désapprobateurs fixer cette feuille, mais en vrac alors : la famille Deslandes, Jojo (dit « le parigo »), toute la clique des tourangeaux (spécial dédicace à Bigben, Rama et Dou Tseu, aux Meufs, et aux autres), l'autre clique des autres tourangeaux (tous les « ures » et conjoint(e)s), les collègues du BTS TV d'Agritec (Labrem, Fanche, Mat, Emile et Marionette), de l'EED de Dronten, de l'Hospitium, de la licence de Nantes (Marie et Simon, alias "Pipetman"), et du master de Rennes (Zak, Zog, Kinsy et les filles). Et bien sur mes amis de Montpellier ! Tomtom la girouette (surtout ne perd pas le nord ! Et merci de m'avoir introduit à Montpellier), les collocs de la Kiépour, du Jardin, du Lavomatic, mes super collocs, Marion (et Coco), Maria, Emy, Eliane, Francesco, et bien sur Marie, ma compagne de bricolage, jardinage, cuisine et streaming ! Ca va être dur de quitter cette superbe ville de Montpellier et son climat exceptionnel (n'en déplaise à certains)! J'aime mon short & mes tong !

Et comme les bonnes choses ont un fin, et que ces remerciements seront forcément trop courts, en proportion de ce qu'ils devraient, je vais conclure en m'excusant d'avance auprès des gens que j'ai oublié de citer!

Louis

#### **Résumé:**

# Spéciation, transport et localisation subcellulaire du fer chez *Pisum sativum* et *Arabidopsis thaliana*

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié le transport du fer dans la plante, en nous focalisant sur la dernière étape de circulation : le remplissage de la graine. Il nous a paru important de comprendre 1- comment le fer arrive à la graine, 2- la manière dont il est délivré à l'embryon en développement, 3- sous quelles formes et 4- où et comment il est stocké dans l'embryon.

Nous avons choisi de nous appuyer sur deux espèces modèles: *Pisum sativum* pour les approches de biochimie et *Arabidopsis thaliana* pour les approches de génétique. Le pois a été choisi car ses graines sont de grande taille et ont la particularité d'accumuler un albumen liquide qui sert de soutien nutritionnel pour l'embryon. Le point de départ de ce projet est l'étude de la spéciation du fer, c'est-à-dire des ligands du fer, dans cet albumen. Nous avons identifié des complexes de citrate et de malate ferriques, puis nous avons démontré que le transport du fer par les embryons de pois est dépendant de sa réduction en fer ferreux. Nous avons finalement prouvé que cette activité de réduction ferrique est assurée par l'ascorbate. Cette molécule, capable de réduire le fer, est excrétée par les embryons de pois.

Chez *Arabidopsis*, nous avons étudié le rôle de deux gènes candidats, *AtFRO2* et *AtFRO6*, potentiellement impliqués dans le transport du fer vers la graine.

La grande taille des cellules d'embryons de pois a permis d'étudier la localisation du fer à l'échelle subcellulaire, et d'analyser sa spéciation *in situ*. Nous avons observé de très fortes concentrations en fer dans les nucléoles. La nature et la fonction de ce pool de fer nucléolaire sont encore inconnues.

Mots clés: Arabidopsis thaliana, Pisum sativum, réduction ferrique, ascorbate, citrate, malate

#### Abstract:

# Iron transport, speciation and subcellular localization in *Pisum sativum* and *Arabidopsis* thaliana

In this work, we studied iron transport in plants and we focused on the last circulation step: the seed filling. It seemt important to understand 1- how iron is arriving to the seeds, 2- the way it is delivered to developping embryos, 3- in which form and 4- where and how it is stored in embryos. To adress these questions, we used two model species: *Pisum sativum* for biochemical approaches and *Arabidopsis thaliana* for genetic approaches. Pea was choosen because of the large size of its seeds, and their characteristic to accumulate a liquid endosperm that feeds embryos. The project started with the study of iron speciation, meaning the identification of iron ligands, in this endosperm. We first identified ferric citrate and malate complexes, and then we demonstrated that embryo iron uptake relies on a ferric reduction activity. This molecule can reduce iron, and is excreted by pea embryos. In *Arabidopsis*, we studied the role of two candidate genes, *AtFRO2* and *AtFRO6* putatively involved in iron transport to seeds.

The large size of pea cells also allowed us to study iron localization and *in situ* speciation, at subcellular level. We observed very high concentrations of iron in nucleoli. Nature and function of this nucleolar iron pool remain unknown.

Key words: Arabidopsis thaliana, Pisum sativum, ferric reduction, ascorbate, citrate, malate