

**IRSN**INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE*Faire avancer la sûreté nucléaire*

# Etude des transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire et la translocation aux parties aériennes du césium chez *Arabidopsis thaliana*

**Laure GENIES**

Janvier 2017

ISRN/IRSN-2017/196

Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transferts des  
radionucléides

Système de management



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE 62 : Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire de biologie du développement des plantes/CEA  
Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transferts des  
Radionucléides/IRSN

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Biologie  
Spécialité : Biologie Végétale

Laure GENIES

**Etude des transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire et la translocation aux parties aériennes du césium chez *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 26/01/2017 devant le jury :

Nele HOREMANS	SCK/CEN, Belgique	Rapporteur
Anne-Aliénor VERY	INRA Montpellier SupAgro, France	Rapporteur
Jacques BOURGUIGNON	CEA Grenoble, France	Examineur
Brigitte MEUNIER-GONTERO	CNRS, France	Présidente du jury
Nathalie LEONHARDT	CEA Cadarache, France	Invitée
Alain VAVASSEUR	CEA Cadarache, France	Directeur de thèse
Pascale HENNER	IRSN Cadarache, France	Encadrante



**RESUME :** Le  $^{134}\text{Cs}$  et le  $^{137}\text{Cs}$ , deux isotopes radioactifs du césium relâchés entre autres à la suite des accidents de Tchernobyl et Fukushima, sont des sources de préoccupations majeures pour la sécurité sanitaire et pour la préservation des écosystèmes. L'absorption de césium est inégale entre espèces végétales : outre sa disponibilité dans le sol, le transport du césium est également influencé par des propriétés propres à la plante. Les flux d'éléments chez les végétaux étant régulés par des transporteurs, l'objectif général de ma thèse a été d'identifier et de caractériser ceux qui sont significativement impliqués dans le transport du césium. Du fait de l'analogie avec le potassium, le césium est supposé emprunter les voies de transport dédiées à ce macronutriment. Le système de transport potassique comprend une diversité de protéines dont les contributions respectives dépendent des niveaux d'apport en potassium. Je me suis donc intéressée à l'étude de l'absorption, de l'accumulation et de la distribution du césium pour trois niveaux de nutrition potassique. En ce qui concerne l'absorption racinaire de césium, nos données sont cohérentes avec les connaissances sur les rôles respectifs du transporteur potassique HAK5 et des canaux cationiques non sélectifs en fonction du niveau de potassium. En outre, les tests réalisés indiquent que des canaux potassiques de la famille des Shaker pourraient être impliqués dans la translocation du césium ainsi que dans sa recirculation. Le transporteur HAK5, plutôt bien caractérisé pour son rôle dans l'absorption racinaire de césium et de potassium, appartient à la famille de transporteurs nommée KUP/HAK/KT. Les résultats produits pendant cette thèse mettent en évidence le rôle *in planta* du transporteur KUP9, un membre de cette famille des KUP et jusque-là peu étudié. Nous n'observons pas de modifications de l'absorption du potassium chez les mutants invalidés sur ce transporteur comparés à l'écotype sauvage : il serait donc possible de le manipuler pour moduler l'absorption de césium sans que la nutrition potassique ne soit altérée. Ce résultat est particulièrement encourageant dans un objectif de gestion des territoires contaminés par l'utilisation de plantes capables d'accumuler de grandes quantités de césium (phytoremédiation) ou à l'inverse limitant les transferts à la chaîne alimentaire (*safe food*).

**Mots-Clés :** *Arabidopsis thaliana*, césium, transporteurs

**ABSTRACT:**  $^{134}\text{Cs}$  and  $^{137}\text{Cs}$ , two radioactive isotopes unintentionally released after the Chernobyl and the Fukushima accidents, are of major concern for ecosystems protection and human health. Together with the soil and the soil solution composition, plant properties have a major influence on the amount of caesium uptake which is highly heterogeneous between species. Due to the important role of transporters in the control of elements fluxes, the aim during my thesis was to identify and characterize those that were involved in a significant part of caesium transport. Due to analogy with potassium (K), an essential macronutrient for plants, caesium is supposed to pass predominantly through potassium carriers. Potassium transport involves a diversity of proteins and their respective contribution depends on the level of K supply to the plant. Therefore, I started my project testing the effect of three different K-treatments on uptake, accumulation and distribution of caesium. Concerning the effects of K supply on root uptake of caesium, our results are consistent with the known role of the potassium transporter HAK5 and non-selective cations channels respectively. Additionally, our observations show that two potassium channels from the Shaker family could be involved in caesium translocation and recirculation. The HAK5 transporter mentioned above is already well characterized for its role in the root uptake of caesium and potassium. This transporter belongs to the KUP/HAK/KT family with 12 other proteins in *A. thaliana*. Results produced during my thesis demonstrate *in planta* the role of KUP9 transporter – a member of the KUP family-, which has received little attention so far. Changing in potassium uptake has not been observed in mutant lines disrupted in this KUP9 transporter: it could be possible to modulate caesium uptake without alteration of potassium nutrition. This result is very promising for management strategies of contaminated lands modulating plant properties to accumulate large amount of caesium (phytoremediation) or to limit caesium transfer in foodstuffs (*safe food*).

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, cesium, transporters



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Anne-Aliénor Véry et Nele Horemans d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs ainsi que Brigitte Meunier-Gontero et Jacques Bourguignon pour leur participation à ce jury.

Je remercie mon directeur de thèse et mes encadrantes pour leur accueil chaleureux dans leur laboratoire respectif et pour le travail d'appui et de conseil pendant ma thèse. Alain, je te souhaite une belle retraite et merci pour ta gentillesse. Nathalie, sans tes conseils précieux et le temps que tu as consacré à me transmettre une partie de tes connaissances je n'aurais certainement pas pu développer autant la partie biologie moléculaire. Pascale, merci pour toutes tes attentions aussi bien sur les plans professionnels que personnels. Un grand merci à vous pour votre écoute, votre implication et pour m'avoir accompagnée dans cette grande expérience.

J'ai trouvé une aide indispensable auprès des gens que j'ai rencontré au CEA, dans les laboratoires du LBDP et du GRAP. Je remercie en particulier Hélène, Serge, Pascale et Catherine pour leur grande sympathie et leurs conseils techniques. Ludovic, merci de m'avoir formée et accompagnée sur une grande partie de ce projet. Tu as eu une influence incontestablement positive sur mes travaux et tout ça dans la bonne humeur.

Du côté IRSN, je garderai également un très bon souvenir de la vie au SERIS en général. Je tiens donc à remercier tous les gens du L2BT, du LECO et du GARM qui font que le quotidien est agréable dans ces équipes. Parmi eux, merci à vous Rodolphe et Arnaud pour votre accueil au sein du L2BT. Vous vous êtes impliqués dans le bon déroulement de ma thèse avec une attitude très agréable. Je remercie également Claudine et Clara pour leur travail administratif qui m'a permis d'économiser pas mal de temps. Daniel, Virginie, Sandrine et Loïc vous avez joué un rôle essentiel dans l'acquisition de résultats et pour cela je vous en remercie tous les quatre. Merci aux autres permanents, en particulier Laureline, pour les conseils avisés sur les travaux de communication. Je remercie également tous les non-permanents pour la bonne ambiance : Magalie, Cécile, Kewin, Ingrid, Rémy, Mira, Adeline, Antoine, Marie, Florian, Léa, Caroline, Adrien, Amine, Yvan. J'ai vraiment apprécié votre compagnie et les bons moments passés avec chacun de vous. Vanessa, j'ai eu beaucoup de chance de partager ton bureau pendant la dernière partie de ma thèse. Je te remercie pour ta grande gentillesse, ta bonne humeur et d'avoir contribué au bon souvenir que je garderai de cette expérience.

Enfin, j'adresse tous mes remerciements et mon affection à ma famille, mes amis et spécialement à Bastien pour leurs encouragements et leur présence.



## Table des matières

<b>Contexte</b> .....	<b>13</b>
<b>Chapitre I - Analyse bibliographique</b> .....	<b>15</b>
I.1- L'élément étudié : le césium .....	16
I.1.1-Le césium dans l'environnement .....	16
I.1.2 – Propriétés physico-chimiques du césium .....	19
I.1.3 – Toxicité du césium .....	19
I.2 – La gestion des sols contaminés en radiocésium.....	22
I.2.1 - Les mesures traditionnelles.....	22
I.2.2 - L'utilisation des capacités d'absorption du césium par les végétaux .....	22
I.2.3 – Optimisation des stratégies de phytoremédiation et du développement de « safe food » .....	22
I.3 – Aspects généraux de l'absorption d'ions par la racine.....	23
I.3.1 – Transport radial d'ions : de la racine jusqu'au xylème .....	23
I.3.2 – Transport à longue distance : circulation dans le xylème et le phloème .....	24
I.3.3 – Aspect thermodynamique du flux d'ions à travers les membranes.....	24
I.3.4 – Les différents systèmes de transport membranaires.....	25
I.3.5- Le modèle de Michaelis-Menten appliqué au transport d'éléments chez les plantes .....	26
I.3.6 – Mécanismes généraux du transport de potassium chez les plantes.....	27
I.4 – Description du transfert de césium chez les végétaux.....	30
I.4.1 - L'absorption du césium est influencée et influence l'absorption d'autres cations .....	30
I.4.2 - Le césium est pris en charge par au moins deux systèmes d'absorption .....	31
I.4.3 – Variation quantitative de l'accumulation de césium en fonction de l'espèce végétale ....	33
I.5 – Etat des connaissances sur l'identité des transporteurs impliqués dans les flux de césium ....	35
I.5.1 - Les canaux potassiques Shaker ne semblent pas impliqués dans l'absorption racinaire de césium mais pourraient participer à sa translocation.....	36
I.5.2- Les Tandem-pore K <sup>+</sup> channel (TPK) et Two-Pore Channel 1 (TPC1) n'ont pas encore été étudiés pour leur rôle dans les flux de césium.....	40
I.5.4 - La famille des Trk/HKT.....	43
I.5.5 - Les antiports de la superfamille des CPA (monovalent Cation/Proton Antiporter) pourraient participer à la distribution cellulaire du césium .....	44
I.5.6 – Focus sur la famille de transporteurs KUP/HAK/KT.....	46
I.5.7 - Autres protéines impliquées dans les flux de césium .....	53
I.5.8- Bilan.....	53
<b>Présentation des objectifs de ma thèse et de la méthodologie appliquée</b> .....	<b>55</b>



<b>Chapitre II - Matériel et méthodes .....</b>	<b>59</b>
II.1-Matériel végétal et culture .....	60
II.1.1-Stérilisation des graines et culture in-vitro .....	60
II.1.2-Itinéraire cultural avec traitement potassique .....	60
II.1.3-Propagation des différentes lignées et obtention de nouvelles graines .....	61
II.2-Exposition au césium.....	61
II.2.1-Cinétique d'influx du césium tracé avec du <sup>137</sup> Cs.....	61
II.2.2 –Accumulation du césium stable ( <sup>133</sup> Cs).....	62
II.2.3 – Cinétiques de déplétion et d'efflux du <sup>133</sup> Cs.....	63
II.3 – Vérification des lignées mutantes par insertion d'ADN-T .....	63
II.3.1-Extraction de l'ADN génomique .....	65
II.3.2-Extraction de l'ARN et rétrotranscription .....	65
II.3.3-Design d'amorces pour la vérification des lignées mutantes .....	66
II.3.4-Conditions de PCR .....	67
II.4 – Analyse phénotypique des lignées mutantes.....	68
II.4.1 – Crible de toxicité du césium en milieu liquide et dosage de la chlorophylle .....	68
II.4.2 – Test d'élongation racinaire sur milieu gélosé en fonction de la nutrition potassique et en présence de césium.....	69
II.4.3 – Evaluation des capacités d'absorption du potassium .....	69
II.5- Quantification du niveau d'expression des gènes <i>KUP</i> par qRT-PCR.....	70
II.5.1-Matériel végétal et synthèse d'ADNc.....	70
II.5.2-Réactions de PCR quantitatives .....	70
II.5.3-Analyses.....	70
II.6- Clonage.....	71
II.6.1-Obtention des séquences à cloner.....	71
II.6.2-Clonage avec le système Gateway® .....	74
II.6.3 – Contrôle du clonage .....	78
II.7 – Transformation du matériel végétal.....	78
II.7.1 – Expression transitoire dans des protoplastes de mésophylle .....	78
II.7.2 - Expression stable dans des lignées transgéniques d' <i>A. thaliana</i> .....	79
II.8 – Analyse des lignées transgéniques .....	80
II.8.1-Contrôle du transgène par PCR.....	80
II.8.2 – Immuno-détection des protéines de fusion GFP-KUP9.....	81
II.8.3 – Détection de la fluorescence de la GFP par imagerie.....	83

II.8.4-Coloration GUS.....	83
II.9 – Statistiques .....	83
<b>Chapitre III - Effet de l'apport en potassium sur l'absorption, la translocation et l'accumulation de césium chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>85</b>
III.1-Résumé étendu de l'article et figures complémentaires .....	86
III.2 – Article en anglais .....	90
<b>Uptake and translocation of cesium by <i>Arabidopsis thaliana</i> in hydroponics conditions: links between kinetics and molecular mechanisms</b>	
Abstract	
1. Introduction	
2. Material and methods	
2.1. Plant material and growing before exposure to cesium	
2.2. Potassium treatments	
2.3. Exposure to cesium in short-term influx experiments	
2.4. Exposure to cesium in long-term accumulation experiments	
2.5. Measure of cesium and potassium	
2.6. Data analysis	
3. Results and discussion	
3.1. Effect of $K^+$ -treatment on plants K content and on plant growth	
3.2. Effect of potassium supply and cesium concentration in solution on cesium uptake efficiency	
3.3. Distribution of cesium in roots and shoots	
3.4. Discrimination between potassium and cesium	
3.5. Comparison between <i>athak5-3</i> mutant line and <i>Col-0</i> wild-type	
4. Conclusions	
<b>Chapitre IV - Etude du rôle de la famille de transporteurs KUP/HAK/KT dans le transport de césium chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>109</b>
IV.1 – Analyse des différents gènes <i>KUP/HAK/KT</i> chez <i>A. thaliana</i> .....	110
IV.1.1 - Identification d'éléments Cis-régulateurs sur les séquences promotrices des <i>KUP/HAK/KT</i> .....	110
IV.1.2 – Expression des <i>KUP/HAK/KT</i> étudiée par RT-qPCR .....	113
IV.1.3 – Limites des analyses <i>in silico</i> .....	114
IV.2 – Sélection de lignées mutantes <i>kup</i> valides .....	114
IV.2.1 - Matériel végétal .....	115
IV.2.2 - Sélection des lignées mutantes résistantes à la kanamycine ou à la phosphinotricine .	118
IV.2.3 - Vérification des lignées mutantes par PCR .....	119
IV.3 - Résultats du crible sur la sensibilité au césium des différentes lignées mutantes.....	120
IV.4 - Conclusions .....	124

<b>Chapitre V - Rôle du transporteur KUP9 dans l'accumulation de césium chez <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>125</b>
.....	
V.1 – Localisation tissulaire de l'activité du promoteur de <i>KUP9</i> .....	126
V.2 - Localisation de la protéine KUP9 .....	128
V.3 - Accumulation du césium chez les lignées mutantes <i>kup9</i> .....	131
V.3.1 - Faible niveau de potassium (10-20 $\mu$ M) .....	131
V.3.2- Fort niveau de K (1000-3000 $\mu$ M).....	135
V.4 - Influence du niveau de potassium sur l'expression de <i>KUP9</i> .....	137
V.5 - Compréhension du rôle de KUP9 dans l'accumulation de césium .....	138
V.5.1 - Expression de <i>HAK5</i> chez les mutants <i>kup9</i> .....	138
V.5.2 - Rôle de <i>KUP9</i> dans l'efflux de césium .....	139
V.6 – Evaluation des capacités d'absorption du potassium par les mutants <i>kup9</i> .....	141
V.7 –Conclusions .....	143
<b>Chapitre VI - Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>145</b>
VI.1 – L'étude du système de transport potassique pour mettre en évidence des candidats potentiels impliqués dans les flux de césium .....	146
VI.2 - L'absorption, l'accumulation et la distribution du césium chez <i>A. thaliana</i> .....	147
VI.3 - L'étude de mutants d'insertion pour l'identification de transporteurs impliqués dans le transport du césium .....	148
VI.4 - Le rôle du transporteur KUP9 dans l'accumulation de césium.....	149
VI.5 - Application des connaissances au développement de phytostratégies .....	150
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>153</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>167</b>

## LISTE DES FIGURES

**Figure I.1 :** Cycle du césium dans les écosystèmes terrestres.

**Figure I.2 :** Transport radial d'eau et de solutés dans la racine.

**Figure I.3 :** Les trois types de systèmes de transport.

**Figure I.4 :** Cinétique d'absorption du potassium par des racines excisées d'orge.

**Figure I.5 :** Principaux transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire de potassium chez *A. thaliana* et gammes de concentrations potassiques dans lesquelles ils opèrent.

**Figure I.6 :** Absorption du césium en fonction de la concentration en césium dans le milieu ( $[Cs]_{ext}$ ) par les racines excisées d'orge.

**Figure I.7 :** Absorption du césium en fonction de la concentration en césium dans le milieu ( $[Cs]_{ext}$ ) par les racines de blé tendre.

**Figure I.8 :** Variabilité du transfert de césium pour différents familles végétales.

**Figure I.9 :** Diversité des protéines de transport impliquées (supposées et avérées) dans les flux de potassium chez *A. thaliana*.

**Figure I.10 :** Organisation phylogénétique des KUP/HAK/KT chez *A. thaliana*.

**Figure I.11 :** Alignement des séquences peptidiques des différents KUP/HAK/KT chez *A. thaliana*.

**Figure I.12 :** Transporteurs et canaux impliqués dans les flux de potassium et de césium chez *Arabidopsis thaliana* (supposés et avérés).

**Figure II.1 :** Itinéraire cultural des plantes.

**Figure II.2 :** Dispositif de culture hydroponique.

**Figure II.3 :** Dispositif d'exposition des plantes au Cs tracé par du  $^{137}Cs$ .

**Figure II.4 :** Dispositif appliqué pour l'évaluation de l'efflux de césium des plantes contaminées vers la solution extérieure.

**Figure II.5 :** Organisation général de l'ADN-T inséré dans le génome des lignées mutantes.

**Figure II.6 :** Protocole pour la vérification des lignées mutantes par insertion d'ADN-T des banque SALK et SAIL.

**Figure II.7 :** Recherche d'informations sur le site de SIGnAL.

**Figure II.8 :** Méthode PCR pour la détection de l'ADN-T chez les lignées mutantes.

**Figure II.9 :** Constructions réalisées pour l'étude du gène *KUP9*.

**Figure II.10 :** Vecteur pCR-XL-TOPO®.

**Figure II.11 :** Recombinaisons BP et LR pour la construction *pKUP9:GFP-GUS*.

**Figure II.12 :** Vecteurs pDONR™ du système de clonage Gateway®.

**Figure II.13 :** Vecteurs de destination pBGWFS7 (construction *pKUP9:GFP-GUS*) et pB7m34GW (constructions avec fusion *KUP9-GFP*).

**Figure II.14 :** Sélection des lignées transgéniques homozygotes et avec une seule insertion du transgène.

**Figure III.1 :** Flux instantané de césium chez *A. thaliana*, écotype sauvage Col-0 mesuré après 15 min d'exposition.

**Figure III.2 :** Accumulation et distribution du césium chez *A. thaliana* écotype sauvage Col-0 mesurés après 7 jours d'exposition.

**Figure III.2 :** Accumulation et distribution du césium chez *A. thaliana* écotype sauvage Col-0 mesurés après 7 jours d'exposition.

**Figure IV.1** : Niveaux d'expression de différents gènes *KUP* mesurés par RT-qPCR chez Col-0.  
**Figure IV.2** : Localisation de l'insertion de l'ADN-T dans les différentes lignées de mutants *kup*.  
**Figure IV.3** : Résultats du test de résistance sur les lignées mutantes.  
**Figure IV.4** : Vérification des lignées mutantes par PCR sur ADNg.  
**Figure IV.5** : Crible basé sur la toxicité du césium sur différentes lignées mutantes *kup*.  
**Figure IV.6** : Crible basé sur la toxicité du césium sur les lignées mutantes *kup9* et *hak5*.  
**Figure IV.7** : Teneurs en chlorophylle de plantules exposées à différentes concentrations en césium.

**Figure V.1** : Schéma d'expression de *KUP9* chez les lignées transgéniques *A. thaliana* p*KUP9*:GFP-GUS.  
**Figure V.2** : Test d'expression transitoire en protoplastes de mésophylle.  
**Figure V.3** : Vérification de la fusion GFP-KUP9 (GFP en N-ter de KUP9) chez les lignées transgéniques.  
**Figure V.4** : Comparaison de la croissance des lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* et de l'écotype sauvage Col-0 à faible niveau de potassium et en présence de césium dans le milieu extérieur.  
**Figure V.5** : Comparaison de l'accumulation du césium en condition hydroponique entre les lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* et l'écotype sauvage Col-0 à faible niveau de potassium.  
**Figure V.6** : Distribution du césium chez l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* à faible niveau de K.  
**Figure V.7** : Comparaison de la croissance des lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* et de l'écotype sauvage Col-0 à fort niveau de potassium et en présence de césium dans le milieu extérieur.  
**Figure V.8** : Comparaison de l'accumulation du césium en condition hydroponique entre les lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* et l'écotype sauvage Col-0 à fort niveau de potassium.  
**Figure V.9** : Distribution du césium chez l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* à fort niveau de K.  
**Figure V.10** : Déplétion du césium dans une solution d'exposition alimentant l'écotype sauvage Col-0 ou les mutants *kup9*.  
**Figure V.11** : Efflux de césium de la plante vers le milieu extérieur pour l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9*.  
**Figure V.12** : Statut potassique des lignées mutantes *kup9* comparées à l'écotype sauvage Col-0.  
**Figure V.13** : Absorption du Rb, analogue du K, chez les lignées mutantes *kup9* comparées à l'écotype sauvage Col-0.  
**Figure V.14** : Hypothèses sur les mécanismes impliquant le transporteur KUP9 dans l'accumulation de césium chez *A. thaliana*.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau I.1** : Localisation de l'expression des différents *KUP/HAK/KT* chez *A. thaliana*.

**Tableau II.1** : Amorces utilisées pour les PCR quantitatives.

**Tableau II.2** : Code de significativité utilisé pour les analyses statistiques.

**Tableau IV.1** : Liste des motifs liés à des phytohormones identifiés dans les séquences promotrices des différents *KUP/HAK/KT* chez *A. thaliana*.

**Tableau IV.2** : Liste des lignées mutantes *kup* utilisées.

**Tableau V.1** : Comparaison de l'influx de Cs entre le mutant *kup9-1* et l'écotype sauvage Col-0.

**Tableau V.2** : Expression relative de *KUP9* chez *A. thaliana* en fonction de la concentration en potassium dans le milieu.

**Tableau V.3** : Expression relative de *HAK5* chez l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9* en fonction de la concentration en K dans le milieu.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ADNg</b>	ADN génomique
<b>ADN-T</b>	ADN de transfert
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BLAST</b>	Basic local alignment search tool
<b>CHX</b>	Cation/H <sup>+</sup> antiporter
<b>CNGC</b>	Cyclic nucleotid gated channel
<b>CPA</b>	Cation/proton antiporter
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide triphosphate
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine triacétate
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GLR</b>	Glutamate like receptor
<b>GUS</b>	β-glucuronidase
<b>HATS</b>	Système de transport haute affinité
<b>ICP-AES</b>	Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif
<b>ICP-MS</b>	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
<b>kD</b>	KiloDalton
<b>KEA</b>	K <sup>+</sup> efflux antiporter
<b>KIRC</b>	Canaux potassiques à rectification entrante
<b>KUP/HAK/KT</b>	K <sup>+</sup> Uptake/High Affinity K <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> Transporters
<b>KORC</b>	Canaux potassiques à rectification sortante
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis
<b>LATS</b>	Système de transport basse affinité
<b>MES</b>	Acide 2-(N-morpholino)-ethanesulfonique
<b>MF</b>	Matière fraîche
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>NASC</b>	Nottingham <i>Arabidopsis</i> stock center
<b>NHX</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter
<b>NSCC</b>	Non selective cation channel
<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne
<b>pKUP9</b>	Séquence promotrice du gène <i>KUP9</i>
<b>PTT</b>	Phosphinotricine
<b>RT</b>	Rétrotranscription
<b>qPCR</b>	PCR quantitative
<b>SAIL</b>	Syngenta <i>Arabidopsis</i> insertion library
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>TEMED</b>	Tétraméthyléthylènediamine
<b>TPC</b>	Tandem pore channel
<b>TPK</b>	Tandem pore K <sup>+</sup> channel
<b>Trk/HKT</b>	Transporters K <sup>+</sup> /High affinity K <sup>+</sup> transporters
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxyméthyl)-aminoethane
<b>VICC</b>	Voltage independant cation channel
<b>V<sub>max</sub></b>	Vitesse d'absorption maximale

## CONTEXTE

Cette thèse s'inscrit dans le projet DEMETERRES (DEveloppement de Méthodes bio- et Eco-Technologiques pour la Remédiation Raisonnée des Effluents et des Sols, ANR-11-RSNR-0005) soutenu par le programme d'investissements d'avenir pour la « Recherche en Sécurité Nucléaire et en Radioprotection » (RSNR) et piloté par l'ANR. Coordonné par le CEA, ce projet a pour ambition de développer un ensemble de technologies innovantes de remédiation des sols et des effluents contaminés, en appui à une stratégie de réhabilitation après un accident nucléaire. Ces technologies doivent être sélectives des radionucléides (principalement Césium et Strontium), non intrusives et optimisées en matière de déchets secondaires.

Dans ce cadre, ma thèse participe plus précisément aux objectifs concernant le développement de phytotechnologies pour la gestion de la contamination en radiocésium. Ces phytotechnologies consistent à utiliser les capacités des plantes à accumuler ou au contraire à discriminer le césium dans le but de gérer sa présence dans les sols contaminés par des technologies respectivement de phytoremédiation ou de « safe food ». Les travaux réalisés pendant ma thèse se situent en amont de ces stratégies c'est-à-dire au niveau de l'approfondissement des connaissances fondamentales concernant les propriétés du flux de césium chez les végétaux. Pour cela, les travaux ont été réalisés au sein de deux laboratoires d'accueil complémentaires. Le L2BT (Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transferts des Radionucléides) de l'IRSN mène des recherches concernant l'ensemble des voies de transfert de radionucléides au sein de la biosphère terrestre notamment dans le cadre de la gestion de crise et de suivi post-accidentel. L'équipe du LBDP (Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes) du CEA travaille principalement sur les aspects moléculaires relatifs au transport et au stockage d'éléments dans les plantes, en particulier chez *A. thaliana*.





## **CHAPITRE I**

### **ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE**

Le césium est présent naturellement à de faibles concentrations dans la croûte terrestre. Il n'a pas de rôle biologique connu chez les plantes et de ce fait a été écarté des recherches en biologie végétale pendant longtemps à part pour ses propriétés de bloquant des canaux potassiques. Cependant, le récent accident de Fukushima Daiichi, et avant lui celui de Tchernobyl, et la contamination en radiocésium des sols et de champs cultivés qui en a résulté a relancé l'intérêt de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'absorption de césium par les plantes.

Parmi les radioisotopes du césium, le  $^{137}\text{Cs}$  et  $^{134}\text{Cs}$  sont les principaux objets de préoccupation à cause de leur temps de demi-vie relativement long et de leur rapide incorporation dans les écosystèmes (**Section I.1**). Les fortes concentrations en césium induisent un retard de croissance chez les plantes ce qui suggère que ces dernières ont la capacité d'accumuler de grandes quantités de césium, en tout cas des quantités suffisamment élevées pour dépasser le seuil de tolérance.

L'absorption de césium chez les plantes est donc importante et la contamination des productions végétales agricoles n'est pas une menace anodine. Dans un objectif de sécurité alimentaire et de protection des écosystèmes, différentes stratégies de gestion des territoires contaminés sont mises en œuvre (**Section I.2**). Parmi ces stratégies, l'utilisation des capacités des plantes à extraire le césium du sol ou au contraire le développement de « safe food » représentent des alternatives intéressantes à la fois scientifiquement et économiquement mais sont encore à l'étude.

La compréhension des caractéristiques physiologiques et moléculaires de l'absorption et de l'accumulation de césium chez la plante est un outil indispensable à l'optimisation de ces stratégies alternatives. Le fait que le césium n'a pas de rôle dans le métabolisme de la plante suggère qu'il n'existe pas de système de transport spécifiquement dédié à cet élément. Le césium, radioactif ou stable, est présent en solution sous forme de cation  $\text{Cs}^+$ . En tant que tel, les flux de  $\text{Cs}^+$  dans la plante sont soumis aux mêmes règles que celles qui s'appliquent aux autres cations monovalents et notamment à  $\text{K}^+$  dont le système de transport est assez bien caractérisé (**Section I.3**).

En plus de l'analogie chimique existant entre les ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Cs}^+$ , les paramètres qui régissent le transfert de césium aux végétaux indiquent que les deux éléments sont vraisemblablement en compétition pour les mêmes systèmes de transport (**Section I.4**). Les flux de césium à travers la plante empruntent ainsi différents transporteurs dédiés ou contribuant au système de transport potassique (**Section I.5**).

## **I.1- L'ÉLÉMENT ETUDIÉ : LE CÉSIUM**

### **I.1.1-Le césium dans l'environnement**

Dans l'environnement, la répartition du césium stable d'origine naturelle diffère de celle du césium radioactif d'origine exclusivement anthropique. En effet, le césium stable atteignant les phases mobiles provient par exemple de l'érosion de certaines roches alors que le césium radioactif est inféodé aux activités nucléaires. Néanmoins, les différents isotopes du césium (stable et radioactifs) ont les mêmes propriétés chimiques et se comportent de la même manière notamment en termes de mobilité.

Le césium stable est un élément rare sur terre : il est présent à 3 ppm dans la croûte terrestre contre 25 000 ppm pour le potassium (K). On ne le trouve pas sous forme « pure » car, comme expliqué dans la section suivante, il réagit violemment avec l'eau mais il est présent sous forme de cristal. On

le trouve en faible proportion, avec le rubidium, dans les roches riches en silice et en alumine contenant du potassium et du lithium. Le césium est également présent en plus forte proportion (jusqu'à 34 à 36 %) dans la pollucite (Davis, 1963 ; Greenwood & Earnshaw, 1984 ; Daburon, 2000), un minerai d'aluminosilicate. On estime les concentrations en césium stable à  $10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}$  dans l'eau de mer,  $1 \mu\text{g.g}^{-1}$  dans les granites,  $4 \mu\text{g.g}^{-1}$  dans les roches sédimentaires et à  $13,4 \mu\text{g.g}^{-1}$  dans le charbon (Davis, 1963 ; Bowen, 1979 ; Coughtrey & Thorne, 1983).

Comme indiqué plus haut, l'occurrence de radiocésium dans l'environnement est uniquement due aux activités de l'homme. Deux isotopes majeurs du césium, le  $^{134}\text{Cs}$  et le  $^{137}\text{Cs}$  sont produits lors de la fission d'actinides ou le bombardement neutronique du  $^{133}\text{Cs}$  ou du  $^{136}\text{Ba}$ . Ces deux isotopes, le  $^{134}\text{Cs}$  et le  $^{137}\text{Cs}$ , présentent un intérêt environnemental particulier du fait de leur rapide incorporation dans les systèmes biologiques, leur demi-vie relativement longue et l'émission de rayonnements  $\beta$  et  $\gamma$  durant leur désintégration (White & Broadley, 2000).

Deux accidents nucléaires majeurs sont à l'origine des relargage les plus significatifs de  $^{137}\text{Cs}$  et de  $^{134}\text{Cs}$  dans l'environnement : l'accident de Tchernobyl (Ukraine) en 1986 et l'accident de Fukushima-Daiichi (Japon) en 2011. Treize ans après l'accident de Tchernobyl, plus de 70000 ha de terre ukrainienne –en plus des 30 km de la zone d'exclusion autour de la centrale de Tchernobyl- étaient toujours indisponibles pour l'usage agricole à cause de la présence de radiocésium à de fortes concentrations (Payne et al., 2004). A Fukushima, la majorité du territoire contaminé ( $>185 \text{ kBq.m}^{-2}$ ) qui s'étend sur environ 1700  $\text{km}^2$  est de nature forestière (75%, Yoshihara et al., 2013) et 20% sont constitués de zones agricoles (Steinhauser et al., 2014).

Dans les écosystèmes terrestres, le césium est mobile et échangeable d'un compartiment à l'autre (Fig.I.1).

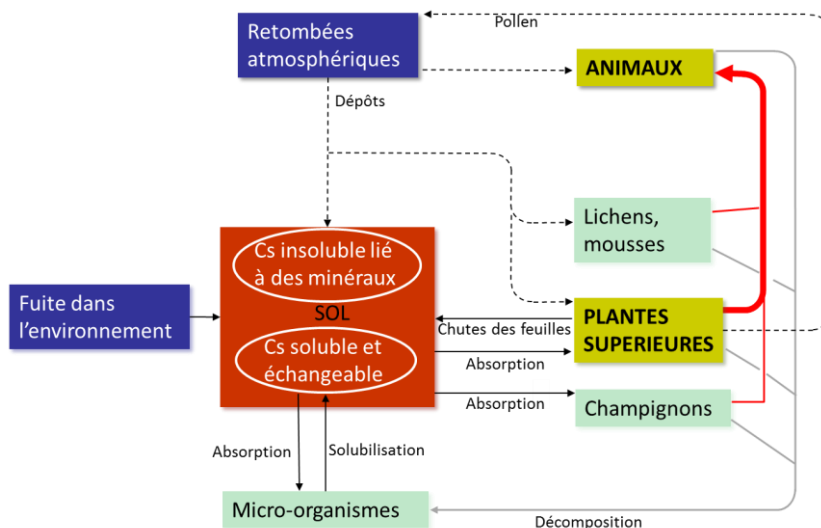


Figure I.1 : Cycle du césium dans les écosystèmes terrestres. D'après Avery (1996).

**Au niveau du sol**, le césium a tendance à rester dans les couches les plus superficielles à cause d'une adsorption sur les argiles, notamment sur les illites, et les fractions organiques (Cawse, 1983 ; Smith & Elder, 1999 dans White & Broadley, 2000). La solubilité et la mobilité du césium augmente avec la diminution du pH, le  $\text{H}^+$  remplaçant alors les ions  $\text{Cs}^+$  liés aux particules argileuses (Avery, 1996). Ainsi

dans les sols à hautes teneurs en humus, le caractère acide a tendance à faire augmenter la biodisponibilité des ions  $\text{Cs}^+$  (Heinrich, 1992). L'adsorption des ions  $\text{Cs}^+$  sur les argiles est également en compétition avec l'adsorption des ions potassium et ammonium (Nielsen & Strandberg, 1988 ; Kirk & Staunton, 1989). Finalement la part de césium présente dans la solution du sol, disponible pour les plantes, varie considérablement d'un sol à l'autre et selon de nombreux critères parmi lesquels la capacité d'échange cationique (Akiba et al., 1989), la durée écoulée depuis l'incorporation du césium (Konoplev et al., 1993 ; Absalom et al., 1995) et, comme dit plus haut, les teneurs en argiles, en potassium et en ammonium échangeable. L'estimation de la mobilité et de la biodisponibilité du césium dans les sols fait l'objet de nombreuses études. Le facteur de distribution ( $K_d$ ), correspondant au rapport de la concentration en césium dans la phase solide sur la concentration dans la phase liquide, est souvent utilisé pour évaluer la mobilité des radionucléides en général dans les sols. Les valeurs de  $K_d$  pour le césium peuvent être regroupées selon la texture du sol : de 9,6 à  $3,5 \cdot 10^4 \text{ L.kg}^{-1}$  pour les sols sableux, de  $3,9 \cdot 10^1$  à  $3,8 \cdot 10^5 \text{ L.kg}^{-1}$  pour les sols limoneux-argileux, de 4,3 à  $9,5 \cdot 10^4 \text{ L.kg}^{-1}$  pour les sols organiques (AIEA, 2010). Le paramètre RIP (pour Radiocesium Interception Potential), défini comme le produit du coefficient de distribution du césium labile ( $K_{dL}$ ) par la concentration des ions  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{K}^+$  et tenant compte de la nature des sites de sorption du césium (spécifiques ou non spécifiques), est utilisé en modélisation pour l'estimation du paramètre  $K_d$  et de la biodisponibilité du césium dans les sols (Cremers et al., 1988 ; Van Der Perk et al., 2000 ; Absalom et al., 2001 ; Sanchez et al., 2002 ; Takeda et al., 2014). Globalement, on peut retenir que les gammes de variations du  $K_d$  du césium sont très larges et que les valeurs sont plutôt élevées ce qui indique une faible mobilité du césium dans les sols.

**Au niveau des végétaux supérieurs**, le césium peut emprunter deux voies différentes : absorption foliaire ou racinaire. De très nombreux facteurs (mode d'exposition, climat, espèce végétale considérée...) influencent la quantité de césium absorbée par les végétaux que ce soit par voie foliaire (épaisseur de la cuticule, capacités de la canopée à retenir l'eau,...) ou par voie racinaire (propriétés et composition du sol, pratique culturale...). Le facteur de transfert (FT) sol-plante, défini comme le rapport de l'activité dans la plante sur l'activité dans le sol, peut être utilisé pour rendre compte de la mobilité d'un radionucléide entre ces deux compartiments. Pour le césium, les valeurs indiquées par l'AIEA peuvent être considérées comme globalement élevées avec des FT moyens tournant autour de  $10^{-2}$  à  $10^{-1}$  pour plusieurs plantes cultivées (AIEA, 2010).

**Les micro-organismes** ont une place majeure dans le cycle biogéochimique du césium, notamment via la décomposition de la matière organique, entraînant la lixiviation et une augmentation de la mobilité du césium (Witkamp & Frank, 1970 ; Clint et al., 1992). Dans les écosystèmes forestiers notamment, l'importance des champignons dans la migration du césium est bien connue (Rafferty et al., 1997). De plus, les micro-organismes seraient impliqués dans la rétention du césium au niveau de la couche supérieure des sols (Johnson et al., 1991).

**Au niveau des grands animaux**, la principale voie de contamination en radiocésium est la consommation de denrées alimentaires contaminées. Dans une moindre mesure, les contaminations aériennes ou de contact contribuent également à l'accumulation de césium par les grands animaux dans les zones urbaines (Andersson & Roed, 1994).

La mobilité du césium dans l'environnement dépend donc de nombreux facteurs comme la quantité

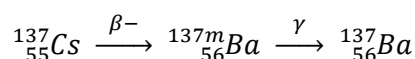
de cations monovalents présents ou encore la teneur en minéraux inorganiques des substrats solides. Les organismes biologiques directement contaminés par le radiocésium dans l'environnement sont les micro-organismes et les plantes alors que la contamination des plus grands animaux se fait en général via la consommation de denrées alimentaires contaminées.

### I.1.2 – Propriétés physico-chimiques du césium

Le césium fait partie du groupe des métaux alcalins avec qui il partage certaines propriétés comme de provoquer une vive réaction avec dégagement de dihydrogène quand il est mis en contact avec de l'eau et de perdre facilement un électron formant ainsi un cation. En solution, le césium est présent majoritairement sous forme de cation  $Cs^+$  avec une faible voire aucune tendance à former des complexes (Zhu & Smolders, 2000). Le point de fusion du césium (28,5°C) est le plus bas de la famille des alcalins (Daburon, 2000). Il fait ainsi partie, avec le gallium et le mercure, des rares métaux liquides à température ambiante.

Le césium possède 31 isotopes dont la masse varie de 114 à 145 (Daburon, 2000), tous radioactifs à l'exception du césium stable ( $^{133}Cs$ ). Comme expliqué plus haut, les deux isotopes radioactifs d'intérêt écologique sont le  $^{134}Cs$  et le  $^{137}Cs$ .

La désintégration du  $^{137}Cs$ , dont l'activité massique est de  $3,22 \cdot 10^{12} \text{ Bq} \cdot \text{g}^{-1}$ , suit la réaction suivante :



La désintégration de ces radionucléides produit donc des rayonnements  $\beta$  et  $\gamma$ , avec des périodes radioactives relativement longues : 2,06 ans pour le  $^{134}Cs$  et 30,17 ans pour le  $^{137}Cs$ . Du fait de sa décroissance moins rapide, le  $^{137}Cs$  est plus fréquemment retrouvé dans les milieux que le  $^{134}Cs$ .

D'un point de vue physico-chimique, le césium partage des points communs avec le potassium qui est un macronutriment essentiel impliqué dans de très nombreux mécanismes biologiques vitaux. Le potassium est aussi un métal alcalin, présent sous forme de cation monovalent  $K^+$  dans la nature. Cette ressemblance entre le potassium et le césium est un point majeur dans la suite du raisonnement présenté dans ce chapitre. En effet, même si le césium ne peut pas remplacer le potassium dans les différents processus biologiques dans lesquels il est impliqué, la proximité chimique de ces deux ions se traduit en revanche par un cheminement proche dans les différents compartiments d'un écosystème.

### I.1.3 – Toxicité du césium

#### Toxicité chimique

Chez l'homme, le césium est soluble dans les fluides corporels (Komarov & Bennett, 1983) et est distribué dans tout le corps, principalement les muscles et autres tissus mous, via le tractus digestif (Pendleton et al., 1965 ; Ghosh et al., 1993). La toxicité chimique des ions  $Cs^+$  se traduit par des troubles du système nerveux central - ce qui suggère qu'ils seraient capables de remplacer les ions  $K^+$  impliqués dans les fonctions de ce système (Ghosh et al., 1993 ; Bramham & Riddell, 1994), un changement de fluidité de la membrane plasmique ainsi qu'une altération de certains composés

cytoplasmiques comme le cytosquelette (Santini et al., 1993). La demi-vie dans le corps humain varie en fonction de l'âge et du sexe du sujet contaminé (Komarov & Bennet, 1983 ; Cambray et al., 1987), allant de 57 à 105 jours (Avery, 1996).

De la même façon que chez les animaux, les ions  $\text{Cs}^+$  peuvent perturber la physiologie des végétaux par compétition avec le  $\text{K}^+$  pour les sites de liaison avec les protéines (Avery, 1995 ; Hampton et al., 2004). En effet, le césium ne se comporte pas exactement comme le potassium qui, lui, est impliqué dans des mécanismes vitaux tels que l'homéostasie, la turgescence, les transports d'eau et de sève... Ainsi, différentes études suggèrent que la toxicité du césium tient plus au rapport Cs/K qu'à la quantité totale de césium (Davis, 1963 ; Sheahan et al., 1993). Chez *A. thaliana*, la toxicité chimique du césium est démontrée par la réduction de la matière fraîche des plantes cultivées sur agar contenant 2mM de  $\text{K}^+$  et plus de 0,3 mM de  $\text{Cs}^+$  ou contenant 20 mM de  $\text{K}^+$  et plus d' 1 mM de  $\text{Cs}^+$  (Hampton et al., 2004). D'après ces auteurs, on peut donc supposer que dans la plupart des conditions environnementales « naturelles », c'est-à-dire avec une concentration potassique de l'ordre du mM dans le sol (Marschner , 1995) et des concentrations en césium généralement inférieures au  $\mu\text{M}$  (White & Broadley, 2000), le césium n'entraîne que très rarement des effets toxiques sur les plantes.

Le retard de croissance engendré par les hautes concentrations en césium est médié en partie par la voie de signalisation d'une phytohormone, l'acide jasmonique acteur majeur dans la réponse aux stress biotique et abiotique telle que la déficience en potassium (Armengaud et al., 2004 ; Adams et al., 2013). De récentes études suggèrent également que le césium pourrait être séquestré dans les vacuoles via le fonctionnement d'une protéine SNARE, Sec22 (Dräxl et al., 2013).

### **Radiotoxicité**

Comme évoqué dans la Section I.1.1, la discrimination isotopique entre le césium stable et les formes radioactives  $^{137}\text{Cs}$  et  $^{134}\text{Cs}$  est négligeable. Les différents isotopes du césium se comportent donc de manière identique au niveau des organismes vivants en termes d'absorption et de mobilité. En revanche, si la toxicité chimique de l'élément césium est considérée comme faible, la radiotoxicité est également à considérer dans l'évaluation de la dangerosité des isotopes radioactifs du césium.

Les modes d'exposition des populations humaines au  $^{137}\text{Cs}$  sont multiples. Les expositions internes sont liées principalement à l'ingestion de denrées et, dans une moindre mesure, à l'inhalation de poussières contaminées. Bien que minoritaires, les irradiations externes liées à l'émission de rayonnements  $\gamma$  (les rayonnements  $\beta$  étant arrêtés par les barrières physiques) depuis les dépôts dans l'environnement existent également (Souidi et al., 2009).

Dans les cellules des organismes vivant, très rapidement (de l'ordre de  $10^{-12}$  secondes) après exposition à des rayonnements  $\gamma$ , des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites à la suite de la radiolyse de l'eau. Les effets en cascade qui en découlent, auxquels s'ajoutent des dommages directs liés à la rupture de différentes liaisons moléculaires, affectent les macromolécules biologiques : ADN (Duncan Lingdoh & Shaefer, 2009 ; Han & Yu, 2010 ; Lomax et al., 2013), lipides (Stark, 1991 ; Benderitter et al., 2003 ; Corre et al., 2010), protéines (Le Maire et al., 1990) et les processus les impliquant. Ainsi, au bout de quelques minutes à quelques heures, des dommages cellulaires (dépendants de la dose d'irradiation reçue) apparaissent comme un ralentissement de la

mitose ou encore une perturbation des transports transmembranaires voire la rupture des membranes (Singh & Singh, 1982 ; Reisz et al., 2014). Des mécanismes de réparation variés sont alors déclenchés. Ceux-ci impliquent par exemple des facteurs de transcription qui favorisent l'expression d'enzymes antioxydantes (McDonald et al., 2010 ; Patwardhan et al., 2013) et les réponses aux dommages de l'ADN (voir la synthèse de Thompson, 2012). Finalement les dommages causés par les rayonnements ionisants, en particulier les rayonnements  $\gamma$ , au niveau cellulaire et moléculaire sont plutôt bien connus et développés par exemple dans la synthèse de Reisz et al. (2014). Nous ne nous y intéresserons que très brièvement ici, l'objectif étant d'illustrer la radiotoxicité du césium sans en faire une synthèse exhaustive.

Chez l'homme, les effets radiotoxiques du  $^{137}\text{Cs}$  sont étudiés sur les populations contaminées accidentellement. Après l'accident de Goiânia au Brésil, ayant entraîné une exposition externe et/ou interne de plusieurs personnes à des doses élevées de  $^{137}\text{CsCl}$ , l'étude de Brandao-Mello et al. (1991) rapporte des effets classiquement associés à une radiotoxicité aigüe. Ces dommages se traduisent majoritairement par un syndrome d'aplasie médullaire (baisse du nombre de globules blancs et immunodéficience). Dans le cas d'une exposition chronique à de faibles doses, des études épidémiologiques ont été menées sur des populations vivant sur les territoires contaminés à la suite de l'accident de Tchernobyl. Les résultats obtenus sont néanmoins difficilement imputables au  $^{137}\text{Cs}$  spécifiquement car d'autres contaminants interviennent dans ces cas (Souidi et al., 2009).

Au laboratoire, les effets d'une exposition chronique par ingestion à de faibles doses de  $^{137}\text{Cs}$  dans un contexte post-accidentel ont été partiellement décrits chez le rat. Suite à l'ingestion d'eau contaminée en  $^{137}\text{Cs}$  ( $6500 \text{ Bq.L}^{-1}$  soit environ  $1,5 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}$ ), de fines modifications ont été observées sur plusieurs voies métaboliques comme celles de la vitamine  $\text{D}_3$  (Tissandie et al., 2006), du cholestérol (Souidi et al., 2006) et des hormones stéroïdiennes (Grignard et al., 2008), ainsi que sur plusieurs systèmes physiologiques comme le système cardio-vasculaire (Guéguen et al. 2008), digestif (Dublineau et al., 2007), ou encore la réponse neuro-inflammatoire (Lestaevel et al., 2008).

Sur le terrain, les effets de l'exposition chronique à de faibles doses sur les animaux et les plantes après l'accident de Tchernobyl sont publiés par exemple dans la synthèse de Geras' kin et al., (2008). Les auteurs distinguent en général deux périodes suivant un accident nucléaire tel que celui survenu à Tchernobyl : une courte période d'irradiation intense au cours de laquelle sont observés les effets les plus sévères suivie d'une longue période de diminution des doses reçues. Ces effets concernent à la fois la santé globale des écosystèmes avec par exemple des perturbations liées à la perte d'un maillon de la chaîne alimentaire et à la fois les organismes pris individuellement (mortalité, effets sur la reproduction et sur la viabilité de la descendance, altérations morphologiques, sensibilités aux pathogènes...).

Dans cette première section, nous avons vu que l'absorption de césium par les plantes terrestres est une source de préoccupation sur différents plans. D'une part, le césium radioactif est toxique pour les végétaux avec des effets négatifs observés sur plusieurs traits phénotypiques (reproduction, architecture...) et est donc considéré comme une menace vis-à-vis de la stabilité des écosystèmes. D'autre part, le facteur de transfert sol-plante du césium est relativement élevé pour différentes plantes consommées qui représentent la voie dominante de contamination des grands animaux. La



consommation de ces denrées contaminées menace donc également la sécurité sanitaire des populations humaines. Dans la section suivante, nous décrirons les méthodes liées à la dépollution des sols qui ont pour objectif de limiter l'entrée de radiocésium dans cette chaîne alimentaire.

## **I.2 – LA GESTION DES SOLS CONTAMINÉS EN RADIOCESIUM**

### **I.2.1 - Les mesures traditionnelles**

Les mesures traditionnelles de gestion des sols contaminés en radiocésium comprennent des méthodes physiques et des contre-mesures agricoles (voir la synthèse de Zhu & Shaw, 2000). Le remplacement par un nouveau sol impose le stockage et le traitement de l'ancien sol contaminé par exemple avec des agents chélatants. Cette technique est coûteuse (transport, stockage, traitement) et envisageable uniquement sur des petites zones (Zhu & Shaw, 2000). Une autre méthode, l'atténuation naturelle, consiste à laisser faire l'ensemble des processus naturels de dispersion, dilution, adsorption, dégradation de la contamination sous surveillance. Cette technique présuppose que l'entrée de radiocésium dans la chaîne alimentaire est réduite par exemple en retirant les sols contaminés de l'usage agricole (White et al., 2003).

Enfin, largement utilisées après l'accident de Tchernobyl et testées à Fukushima, les deux techniques utilisées « en routine » actuellement sont l'application d'intrants qui contiennent des cations compétiteurs (notamment  $K^+$ ) et des techniques agricoles de labour et de paillage. L'objectif étant de limiter la disponibilité du césium dans la solution du sol et son absorption par les plantes.

### **I.2.2 - L'utilisation des capacités d'absorption du césium par les végétaux**

Parallèlement à ces mesures traditionnelles, l'étude de la capacité d'absorption du césium par les plantes intéresse à la fois les industriels et les scientifiques dans un objectif d'application à la gestion des territoires contaminés. Le développement de stratégies de phytoremédiation se concentre ainsi sur l'extraction de radiocésium présent dans les sols contaminés par des plantes à biomasse élevée et ayant de grandes capacités d'absorption du césium. D'un autre côté, les plantes à faible capacité d'absorption du césium sont intéressantes dans le cadre du développement de « safe food » dont l'objectif est de limiter l'entrée de radiocésium dans la chaîne alimentaire.

### **I.2.3 – Optimisation des stratégies de phytoremédiation et du développement de « safe food »**

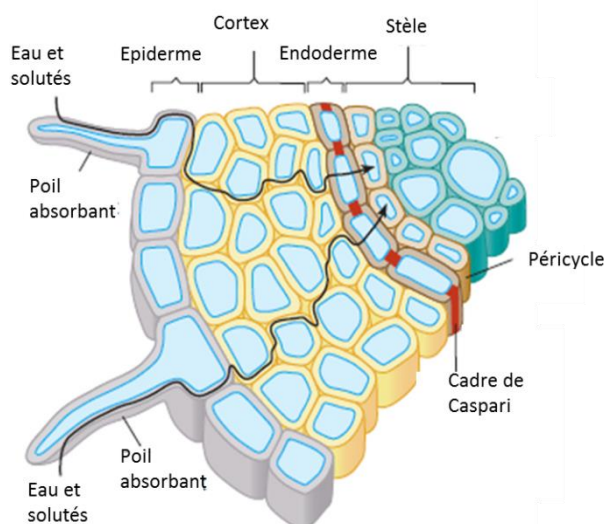
L'extraction du césium par absorption racinaire peut être limitée par des facteurs qui concernent à la fois sa biodisponibilité dans le sol (qui peut être limitée à cause de l'adsorption de  $Cs^+$  sur les argiles par exemple) et des caractéristiques propres à la plante (White et al., 2003). En ce qui concerne la plante, une biomasse trop faible et/ou une capacité insuffisante à accumuler le césium par exemple peuvent ralentir la dépollution des sols en radiocésium. Nous nous intéresserons dans la suite de ce chapitre aux caractéristiques du transfert de césium chez les végétaux et aux facteurs propres à la plante qui influencent l'intensité de ce transfert.

### I.3 – ASPECTS GÉNÉRAUX DE L'ABSORPTION D'IONS PAR LA RACINE

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, le césium est présent sous forme de cation  $Cs^+$  en solution. Afin de comprendre les mécanismes d'absorption qui sous-tendent l'accumulation de césium chez les végétaux, nous proposons dans cette section de rappeler la physiologie de l'absorption d'ions en général puis du potassium en particulier.

#### I.3.1 – Transport radial d'ions : de la racine jusqu'au xylème

L'évaporation de l'eau au niveau des feuilles, ou transpiration, est la principale force entraînant le flux radial d'eau et de solutés de la périphérie de la racine vers les vaisseaux conducteurs. En effet, la baisse de pression dans le xylème engendré par la transpiration crée une force de succion tirant la sève vers le haut. L'eau et les solutés en provenance de la racine viennent alors remplir l'espace laissé dans le xylème (grâce à la diffusion de solutés à l'intérieur du vaisseau via les plasmodesmes).



**Figure I.2 : Transport radial d'eau et de solutés dans la racine.** Illustration d'après le document en ligne [http://www.pearson.ch/download/media/9782744073069\\_SP\\_biologievegetale\\_chap04.pdf](http://www.pearson.ch/download/media/9782744073069_SP_biologievegetale_chap04.pdf). Globalement, le transport radial d'eau et de solutés se fait de la périphérie de la racine vers le cortex via le continuum des parois cellulaires interconnectées. A la frontière entre cortex et stèle, la couche cellulaire endodermique imperméable force le passage des ions dans le cytoplasme via la membrane plasmique. Ce point de contrôle permet également la collecte des ions s'échappant du xylème.

Les ions en solution dans le sol sont absorbés par la racine principalement au niveau des poils absorbants (la subérisation de l'épiderme en s'éloignant de la zone pilifère empêche l'absorption) et se dirigent vers le xylème, d'où ils sont distribués au reste des tissus végétaux (**Fig.I.2**). Jusqu'à l'endoderme le flux peut se faire par la voie apoplasmique c'est-à-dire via la paroi ou l'espace entre les cellules. L'endoderme et plus exactement le cadre de Caspari constitué de molécules hydrophobes de subérine forme ensuite une barrière à cette voie apoplasmique. Les ions sont alors forcés de pénétrer à l'intérieur des cellules de l'endoderme via des transporteurs situés sur la membrane plasmique : c'est la voie symplasmique. De l'endoderme jusqu'au xylème, les éléments peuvent circuler suivant leur gradient de concentration via des plasmodesmes c'est-à-dire des connections symplasmiques entre cellules. Finalement, le chargement du xylème est assuré au

niveau de la membrane plasmique des cellules parenchymateuse de la stèle par des transporteurs capables d'orienter le flux contre le gradient électrochimique.

Comme nous l'avons vu dans cette section, le transport de cations monovalents, comme  $\text{Cs}^+$ , à travers la racine et jusqu'au xylème se fait principalement par la voie symplasmique : il faut donc traverser au moins deux fois la membrane plasmique des cellules racinaires avant d'arriver au feuilles. On comprend alors l'importance d'identifier et de caractériser le fonctionnement des transporteurs gérant les flux de  $\text{Cs}^+$  à travers la membrane plasmique dans des stratégies de gestion de son accumulation par les végétaux.

### 1.3.2 – Transport à longue distance : circulation dans le xylème et le phloème

Le mouvement de solutés de la racine vers les feuilles, ou translocation, est entraîné principalement par la pression négative dans le xylème (créée par l'évaporation de l'eau au niveau des feuilles) mais aussi par la pression racinaire (due aux flux d'eau entrant à cause de la présence de nutriments dans la racine elle-même). Ces deux forces entraînent le mouvement ascendant de la sève brute dans le xylème.

Comme expliqué plus haut, le chargement du xylème au niveau de la racine fait intervenir des protéines de transport situées sur la membrane plasmique des cellules du parenchyme xylémien. De la même façon, le déchargement du xylème dans les parties aériennes passe vraisemblablement par l'activité de transporteurs spécifiques des cellules du parenchyme xylémien (Ahmad & Maathuis, 2014) et pourrait également faire intervenir des mécanismes d'endocytose (Botha et al., 2008).

Si le xylème est responsable des flux unidirectionnels d'eau et de solutés de la racine vers les feuilles, c'est le phloème qui assure la distribution des produits de la photosynthèse des organes sources vers les organes puits. Le taux de recirculation des feuilles vers les racines via le phloème de certains ions comme le  $\text{K}^+$  par exemple est également très important (Marschner et al., 1997). Cette recirculation du  $\text{K}^+$  joue ainsi différents rôles physiologiques : contre-ion pour la translocation du  $\text{NO}_3^-$  (Ahmad & Maathuis, 2014), chargement du phloème en produits de la photosynthèse pour distribution vers les organes puits.... Là encore, le chargement du phloème implique différentes protéines de transport.

### 1.3.3 – Aspect thermodynamique du flux d'ions à travers les membranes

Le caractère actif ou passif du transport membranaire d'un ion dépend de la variation du potentiel électrochimique  $\Delta\mu$  lorsque cet ion passe du milieu extérieur au milieu intracellulaire :

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1 = RT \ln \left( \frac{C_{ext}}{C_{int}} \right) - zF (E_{ext} - E_{int})$$

Avec

$R$  : constante des gaz parfaits

$T$  : température

$C_{ext}, C_{int}$  : concentration de l'ion dans le milieu extérieur, intracellulaire respectivement

$z$  : valence de l'ion considéré

$F$  : constante de Faraday

$E_{ext} - E_{int}$  : différence de potentiel membranaire

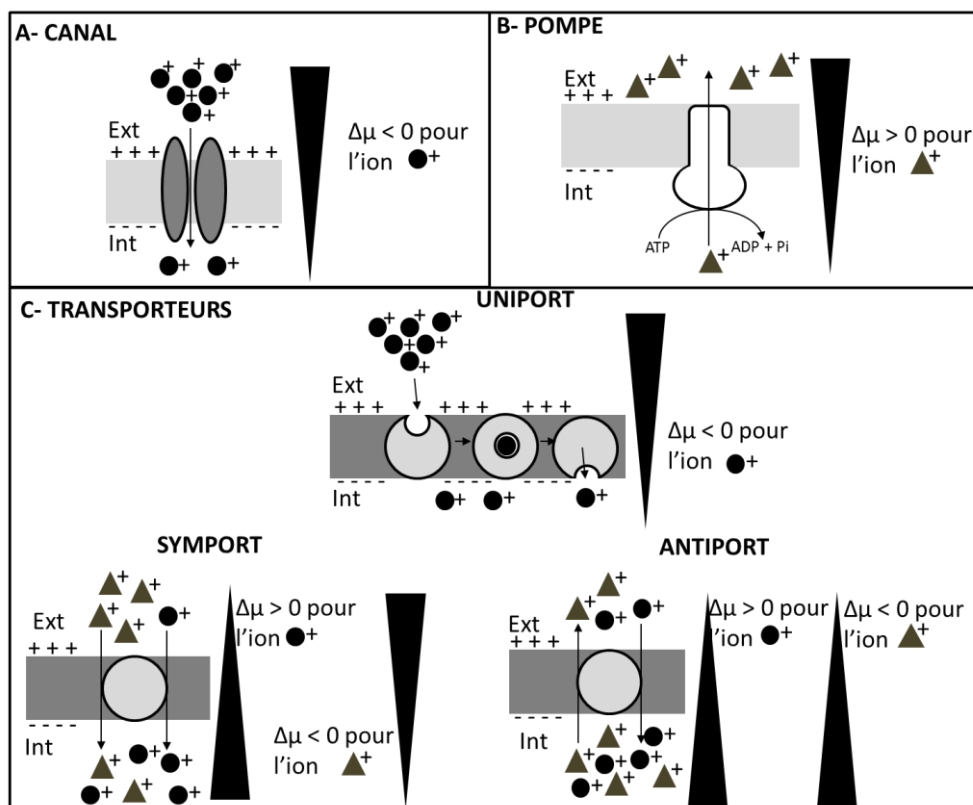
- Si  $\Delta\mu < 0$  : l'influx de l'ion dans la cellule se fait passivement selon le gradient électrochimique.
- Si  $\Delta\mu > 0$  : l'influx de l'ion dans la cellule se fait activement contre le gradient électrochimique.
- Lorsque  $\Delta\mu = 0$ , on dit que l'ion est à l'équilibre (le flux net de l'ion à travers la membrane est égal à 0).

Ce calcul prend donc en compte à la fois le gradient de concentration et la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane.

#### I.3.4 – Les différents systèmes de transport membranaires

On distingue trois grands types de systèmes de transport selon le sens de diffusion de l'élément transporté et les mécanismes permettant son passage d'un compartiment à l'autre :

- Les canaux (**Fig.I.3-A**) sont impliqués dans le transport passif des ions c'est-à-dire dans le sens du gradient électrochimique. Ils se caractérisent par la présence d'un pore qui, lorsqu'il est ouvert, laisse passer les ions sans changement de conformation supplémentaire. La vitesse de diffusion des ions à travers les canaux est donc très rapide comparée aux transporteurs.
- Les pompes ioniques (**Fig.I.3-B**) transportent leurs substrats contre le gradient électrochimique grâce à l'énergie issue de l'hydrolyse d'une liaison covalente d'une molécule d'ATP par exemple.
- Les transporteurs dits uniports sont impliqués dans le transport passif, alors que les symports et antiports permettent le transport des ions contre le gradient électrochimique (transport actif) grâce au couplage avec le transport d'un autre ion (**Fig.I.3-C**). A la différence des canaux, les transporteurs changent de conformation à chaque fois qu'ils laissent passer un substrat.



**Figure I.3 : Les trois types de systèmes de transport.** D'après le manuscrit de thèse de Jabnoue (2008). A- Les canaux facilitent le transport des ions dans le sens du gradient électrochimique. B- Les pompes ioniques permettent le transport des ions contre le sens du gradient électrochimique. C- Les transporteurs regroupent un ensemble de protéines capables de faciliter le transport d'ions dans le sens du gradient électrochimique ou dans le sens opposé grâce au couplage avec le transport d'un autre élément.

### I.3.5- Le modèle de Michaelis-Menten appliqué au transport d'éléments chez les plantes

Les études citées dans la section suivante (**Section I.4**) utilisent certains paramètres cinétiques pour décrire le transfert de césium chez les plantes. Il est donc nécessaire ici d'introduire la définition de ces paramètres.

Par analogie avec la vitesse d'une réaction enzymatique, la vitesse d'absorption d'un élément par la plante peut être décrite par l'équation suivante :

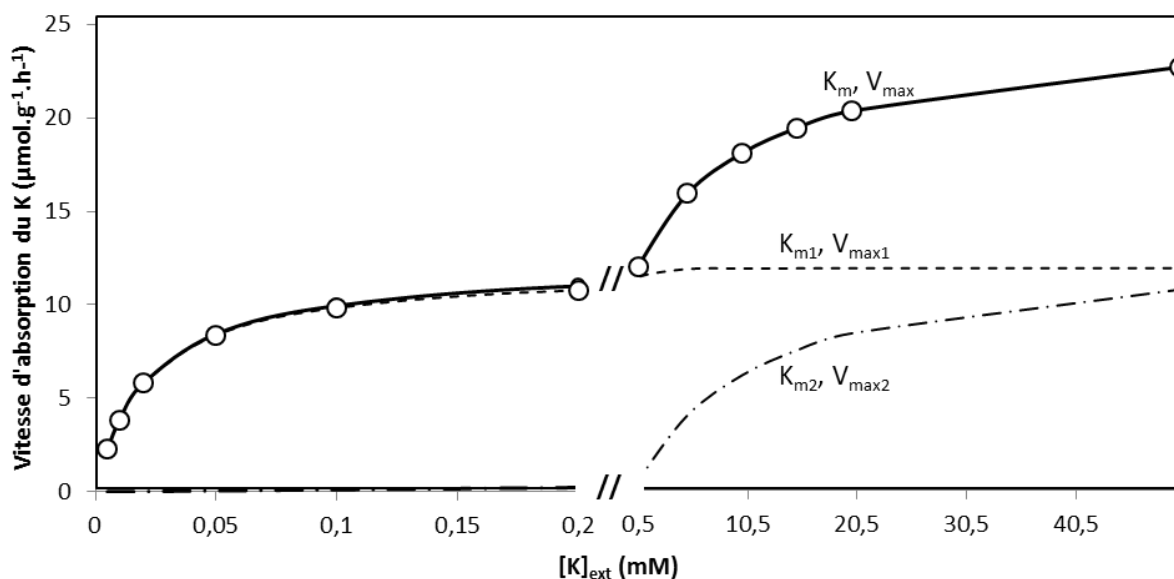
$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Avec  $v$  : vitesse d'absorption d'un élément en fonction de sa concentration  $[S]$ ,

$v_{max}$  : vitesse maximale d'absorption mesurée pour une concentration saturante en élément,

$K_m$  : constante de Michaelis spécifique de l'élément transporté et qui traduit la capacité de la plante à absorber l'élément. L'affinité de la plante pour l'élément considéré évolue à l'inverse du  $K_m$  : une augmentation du  $K_m$  traduit une diminution de l'affinité.

Pour la plupart des ions, comme  $K^+$  par exemple, la cinétique d'absorption est composée de deux systèmes dépendants de la concentration de l'ion (**Fig.I.4**). Quand la concentration de l'ion dans le milieu est élevée (de l'ordre du mM), c'est le système dit basse-affinité qui fonctionne parfois avec une cinétique quasi linéaire en fonction de la concentration en ion (comme dans le cas du nitrate,  $NO_3^-$ ) ou qui suit une cinétique de Michaelis-Menten avec un  $K_m$  relativement élevé (comme dans le cas de  $K^+$ ). A l'opposé, le système dit haute-affinité est actif pour des concentrations relativement faibles (de l'ordre du  $\mu M$  voire de la centaine de  $\mu M$ ) et suit une cinétique de type Michaelis-Menten avec un petit  $K_m$ .



**Figure I.4 : Cinétique d'absorption du potassium par des racines excisées d'orge (d'après Epstein et al., 1963).** L'absorption racinaire de  $K^+$  est décrite par la somme de deux équations de Michaelis-Menten de paramètres respectifs  $K_{m1}$  0,021 mM,  $V_{max1}$  11,9  $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  et  $K_{m2}$  11,4 mM,  $V_{max2}$  13,2  $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

L'absorption des cations monovalents en fonction de leur concentration dans le milieu extérieur est alors décrite comme la somme de deux équations de Michaelis-Menten qui traduisent deux mécanismes d'absorption distincts (Epstein et al., 1963). Il est à noter que l'utilisation du modèle de Michaelis-Menten pour décrire l'absorption de cations et notamment de  $K^+$  est antérieure à la découverte des différents types de systèmes de transport. Ainsi, aux débuts de l'application du modèle de Michaelis-Menten à l'absorption de  $K^+$ , les auteurs ont d'abord suggéré que la double composante cinétique pouvait s'expliquer par l'existence de deux sites de liaison et de transport d'ions sur un même transporteur.

### I.3.6 – Mécanismes généraux du transport de potassium chez les plantes

Le césium possède des propriétés chimiques proches de celles du potassium, ce qui implique que les voies d'assimilation de ces deux éléments sont très proches.

Le potassium est l'un des éléments le plus abondant dans la matière sèche végétale dont il représente 3 à 10% (Marschner, 1995) et fait partie des nutriments essentiels à la plante. La disponibilité et le transport de  $K^+$  intra- et extra-cellulaire ont un rôle, entre autres, dans la

polarisation de la membrane, l'osmorégulation, le contrôle du potentiel hydrique et de la turgescence, l'élongation cellulaire... En outre, le  $K^+$  intervient dans les processus de transport longue-distance comme le transport des produits de la photosynthèse des organes source vers les organes puits ainsi que dans le phénomène de transpiration (contrôle de l'ouverture des stomates). Les différents mécanismes d'absorption et de translocation du  $K^+$  permettent à la plante de s'adapter aux changements de conditions environnementales et/ou à la modification des besoins potassiques de certains organes.

Au contraire, le césium n'a aucune fonction essentielle connue et n'est pas toxique aux concentrations retrouvées dans l'environnement (Hampton et al., 2004). Il est donc peu probable de trouver des protéines de transport spécifiquement dédiées au transport de césium. En revanche, la proximité chimique des deux ions et la comparaison des cinétiques d'absorption du  $Cs^+$  et du  $K^+$  (explicitée dans la Section I.4) suggèrent que ces deux éléments sont en compétition pour, au moins en partie, les mêmes systèmes de transport.

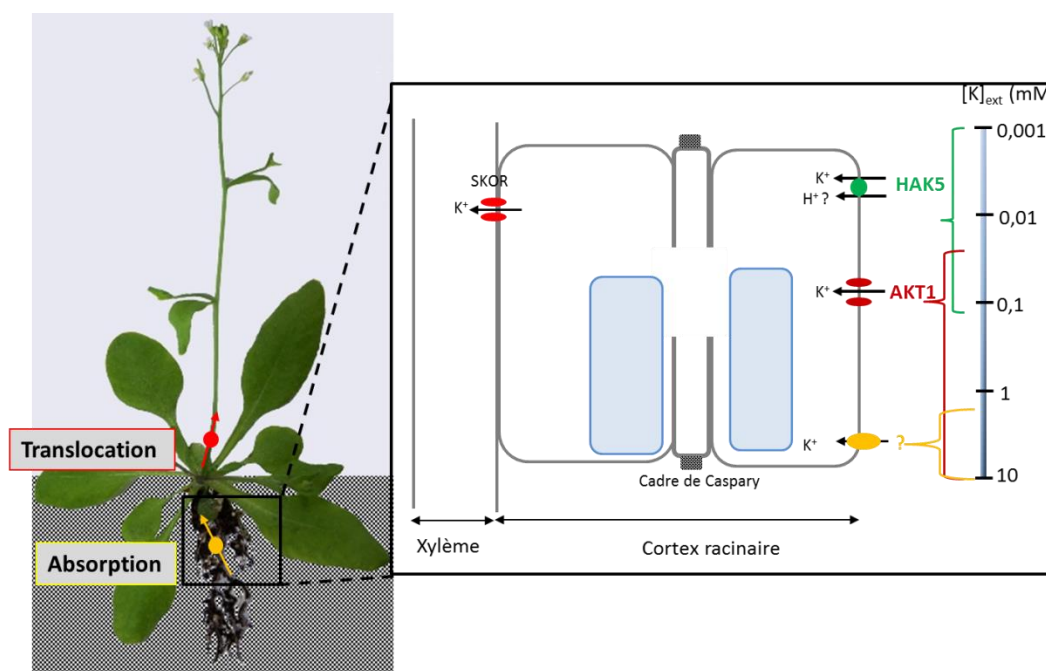
En se basant sur l'hypothèse générale que les végétaux n'ont pas développé de système de transport propre au césium et que celui-ci emprunterait plutôt les voies de transport potassique, nous proposons donc ici d'appliquer les concepts décrits plus haut au transport de potassium.

Quand la  $[K^+]_{ext}$  est faible ( $< 100 \mu M$ ), le potentiel membranaire des cellules racinaires d'*A. thaliana* peut descendre jusqu'à  $-215$  mV (Hirsch et al., 1998) et est entretenue majoritairement par l'activité de pompes à protons (Hedrich et al., 2012). Le gradient électrochimique impose alors l'apport d'énergie pour l'influx de  $K^+$ . Chez *A. thaliana*, ce système d'absorption est attribué à des transporteurs haute-affinité de la famille des KUP/HAK/KT et notamment au transporteur HAK5 (Rubio et al., 2000; Gierth et al. 2005; Rubio et al., 2008; Qi et al. 2008; Nieves-Cordones et al., 2010). Ce système de transport haute-affinité est représenté par la courbe de paramètres  $K_{m1}$ ,  $V_{max1}$  sur la **Fig. I.4**.

Quand la  $[K^+]_{ext}$  dépasse  $100 \mu M$ , le potentiel membranaire des cellules racinaires suit le potentiel d'équilibre de l'ion  $K^+$  (Hirsch et al., 1998). Ce potentiel d'équilibre est défini par l'équation de Nernst dont découle l'équation du gradient électrochimique décrit dans la section I.3.5 :

$$E_{eq} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_{ext}}{C_{int}}$$

Dans ces conditions, la conductance potassique est assurée par des canaux à rectification (du potentiel membranaire) entrante dont l'ouverture est activée pour des potentiels de membrane plus négatifs que le potentiel d'équilibre de l'ion  $K^+$ . Ce système d'absorption potassique implique les canaux Shaker avec un rôle dominant pour AKT1 quand la concentration externe en potassium dépasse  $500 \mu M$  (Rubio et al., 2010). Ce système est globalement défini comme un système d'absorption basse-affinité, représenté par la courbe de paramètres  $K_{m2}$ ,  $V_{max2}$  sur la **Fig. I.4**.



**Figure I.5 : Principaux transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire de potassium chez *A. thaliana* et gammes de concentrations potassiques dans lesquelles ils opèrent, d'après Alemán et al. (2011).** Le transporteur HAK5, fonctionnant probablement comme un symport  $K^+/H^+$ , est le seul système opérant à très faibles concentrations externes en  $K^+$  ( $< 10 \mu\text{M}$ ). Les deux systèmes, HAK5 et AKT1, se chevauchent pour des  $[K]_{\text{ext}}$  comprises entre 10 et 200  $\mu\text{M}$ . Un système encore non identifié est impliqué dans l'absorption de potassium pour des concentrations élevées ( $> 1 \text{mM}$ ).

Néanmoins, les deux systèmes transporteurs/canaux se « chevauchent » dans des gammes de concentrations potassiques comprises entre 10 et 200  $\mu\text{M}$  dans le milieu extérieur (Fig.I.5, Rubio et al., 2010 ; Pyo et al., 2010), la catégorisation d'une protéine de transport dans l'un des mécanismes haute- ou basse-affinité n'étant pas nette (Hirsch et al., 1998 ; Santa-María et al., 2000). De plus, un système dont l'identité n'est pas claire à ce jour intervient vraisemblablement dès 100  $\mu\text{M}$  de  $K^+$  extérieur (Rubio et al., 2010). D'après Alemán et al (2011), ce système pourrait être composé de transporteurs appartenant à la famille des CHX (Zhao et al., 2008), des CNGC (Li et al., 2005 ; Demidchik & Maathuis, 2007, Kaplan et al., 2007) et/ou des GLR (Dietrich et al., 2010 ; White & Karley, 2010).

Dans cette section, nous avons vu que le transfert d'ions chez les végétaux impliquent différents types de protéines de transport capables de faciliter la diffusion à travers les membranes biologiques dans le sens ou contre le gradient électrochimique de l'ion considéré. Le transfert apparent de cations comme  $K^+$ , un analogue de  $\text{Cs}^+$ , à la plante peut être décrit par le modèle de Michaelis-Menten avec des paramètres comme  $K_m$  qui traduisent l'affinité de la plante pour l'ion considéré. Ces paramètres, calculés pour l'absorption racinaire de différentes espèces végétales, sont présentés pour le césium dans la section suivante.



#### I.4 – DESCRIPTION DU TRANSFERT DE CESIUM CHEZ LES VEGETAUX

Dès les années 40, des études sur l'absorption racinaire de césium sont rapportées dans la littérature. D'abord utilisé pour ces propriétés chimiques de cations alcalins proches du macronutriment  $K^+$  (Collander, 1941) puis par souci des relargages de radiocésium dans l'environnement suite aux essais nucléaires dans la stratosphère entre 1952 et 1963 (Avery, 1996), l'intérêt pour le césium est encore accentué après l'accident nucléaire de Tchernobyl en 1986.

Alors qu'il travaille sur la sélectivité exercée par les racines des plantes supérieures vis-à-vis des ions, Collander (1941) publie pour la première fois (à notre connaissance) la capacité de ces organismes à absorber et à accumuler les ions  $Cs^+$  présents dans une solution nutritive. Il observe que les espèces végétales riches ou pauvres en potassium, le sont également en rubidium et en césium et que les vitesses d'absorption de ces trois éléments sont équivalentes. Pour expliquer ces similarités, il pose l'hypothèse que les plantes ne seraient pas capables de distinguer le potassium, le rubidium et le césium et que ces trois éléments emprunteraient alors les mêmes voies d'absorption.

Quelques années plus tard, Epstein & Hagen (1952) utilisent l'analogie entre activité enzymatique et mécanisme d'absorption des ions par la racine (expliqué dans la Section I.3.5) pour proposer que le potassium, le rubidium et le césium entreraient en compétition pour le même site actif sur le système chargé de leur transfert chez les racines excisées d'orge. Ces observations sont ensuite confirmées et complétées, entre autres, par les publications de Menzel & Heald (1955), de Bange & Overstreet (1960) et de Middleton et al. (1960) qui indiquent une discrimination des plantes envers le césium en faveur du potassium et du rubidium.

##### I.4.1 - L'absorption du césium est influencée et influence l'absorption d'autres cations

L'ajout de cations monovalents dans une solution nutritive contenant des ions  $Cs^+$  a pour effet de diminuer l'absorption de ce dernier (Sutcliffe, 1957 ; Bange & Overstreet, 1960 ; Zhu et al., 1999). Comme déjà abordé précédemment, l'absorption de  $Cs^+$  diminue quand la concentration en  $K^+$  et en  $Rb^+$  augmente (Bange & Overstreet, 1960 ; Smolders et al., 1996). Cette discrimination contre le  $Cs^+$  et en faveur de  $K^+$  par la plante peut être évaluée par le facteur de discrimination DF (pour *Discrimination Factor*) qui est défini par l'équation suivante :

$$DF = \frac{(Cs/K)_{plante}}{(Cs/K)_{ext}}$$

Ce facteur de discrimination correspond à la comparaison entre le rapport de concentrations en césium et en potassium dans le milieu extérieur et ce même rapport dans les plantes testées, c'est-à-dire à la comparaison entre la proportion de césium disponible dans le milieu et la proportion de césium effectivement absorbée.

Si  $DF < 1$ , le césium est absorbé moins efficacement que le potassium puisque le rapport  $Cs/K$  dans la plante est inférieur au rapport  $Cs/K$  dans le milieu extérieur. C'est le cas pour la plupart des facteurs de discrimination rapportés dans la littérature (voir la synthèse de Zhu & Smolders, 2000).

Plus DF est proche de 0, plus la sélectivité du système de transport est forte, autrement dit plus la discrimination envers le césium est importante. Chez le blé tendre (*Triticum aestivum*), Smolders et al. (1996) observent ainsi une importante diminution du DF (*i.e.* une plus grande sélectivité des racines) avec l'augmentation de la concentration en potassium dans le milieu extérieur. Outre l'effet

de la dilution du  $\text{Cs}^+$  en solution avec l'augmentation de  $\text{K}^+$ , les différences entre les DF en fonction du traitement potassique sont interprétées comme une preuve de la pluralité des mécanismes d'absorption du césium en fonction de l'apport potassique. Ainsi, pour des faibles concentrations en  $\text{K}^+$  (<100-200  $\mu\text{M}$ ), l'ajout de  $\text{K}^+$  réduit significativement l'absorption de  $\text{Cs}^+$  chez les plantes (Shaw & Bell, 1991). Dans ces conditions, le potassium est donc en compétition avec le césium pour le même système de transport haute-affinité peu sélectif. En revanche, quand le niveau de  $\text{K}^+$  dépasse le mM, l'absorption de  $\text{Cs}^+$  est beaucoup plus faible et reste quasiment inchangée avec l'ajout de  $\text{K}^+$  (Buysse et al., 1996 ; Sacchi et al., 1997 ; Zhu, 2001). A l'inverse du système impliqué à haute-affinité, le système de transport basse-affinité du potassium est donc très sélectif (en défaveur du césium).

En outre, d'autres cations monovalents ont été rapportés comme affectant l'absorption de  $\text{Cs}^+$  par les plantes avec un effet plus ou moins marqué suivant l'ordre suivant :  $\text{K}^+ \geq \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ \geq \text{Na}^+ \geq \text{Li}^+$  (Bange & Overstreet, 1960 ; Shaw & Bell, 1989 ; Hampton et al., 2004).

Certains cations divalents, ont également pour effet de diminuer l'absorption de  $\text{Cs}^+$  avec une efficacité suivant l'ordre  $\text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$  (Bange & Overstreet, 1960 ; Sze & Hogdes, 1977 ; Broadley et al., 2001 ; Hampton et al., 2004) ainsi que certains cations trivalents comme  $\text{La}^{3+}$  et  $\text{Gd}^{3+}$  (Broadley et al., 2001 ; Hampton et al., 2004).

Cette connaissance de l'effet inhibiteur de certains cations, et notamment de  $\text{K}^+$ , sur l'absorption de  $\text{Cs}^+$  par les racines est mise à profit dans la gestion des territoires agricole contaminés en césium. Ainsi, comme nous l'avons vu dans la **Section I.2.1**, l'épandage d'intrants contenant des cations est traditionnellement utilisé pour limiter l'entrée de césium dans les cultures (Zhu & Shaw, 2000 ; White et al., 2003). L'effet du potassium sur l'absorption de césium est donc rapporté dans plusieurs études sur des plantes cultivées : orge (Middleton et al., 1960), blé (Shaw & Bell, 1989 ; Smolders et al., 1996 ; Zhu et al., 2000 ; Zhu, 2001 ; Schimmack et al., 2004 ; Putyatin et al., 2006), maïs (Sacchi et al., 1997 ; Schneider et al., 2008), riz (Kondo et al., 2015), épinard (Buysse et al., 1995), radis (Prorok et al., 2016)...

En revanche, l'effet de  $\text{Cs}^+$  sur l'absorption d'autres cations est plus discuté. En effet, il semblerait que les différences entre conditions expérimentales (le statut nutritif des plantes utilisées, l'étude de racines séparées ou attachées aux parties aériennes de la plante, sur un laps de temps de l'ordre de l'heure ou de la minute) d'une publication à l'autre aient eu pour conséquence des conclusions contrastées (White & Broadley, 2000). Par exemple, Epstein & Hagen (1952) ont montré qu'à certaines concentrations le césium est capable d'inhiber l'absorption de rubidium. Cependant, dans les conditions décrites par Bange & Overstreet (1960), l'augmentation de la concentration en  $\text{Cs}^+$  dans le milieu extérieur s'accompagne d'une diminution de l'absorption de  $\text{Na}^+$  mais n'a pas d'effet sur l'absorption de  $\text{Rb}^+$ .

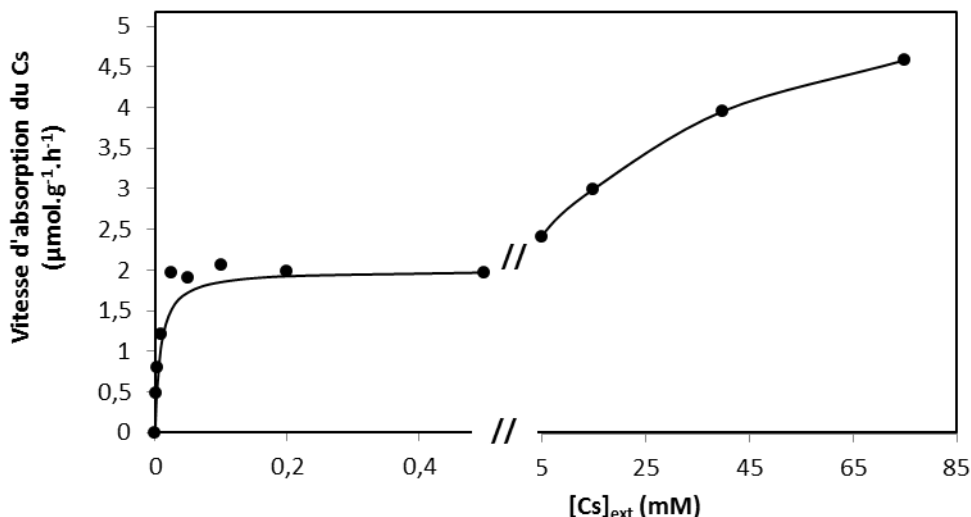
#### I.4.2 - Le césium est pris en charge par au moins deux systèmes d'absorption

Comme pour le potassium (Epstein et al., 1963, Section I.3.5), deux systèmes d'absorption du césium sont distingués chez les racines excisées d'orge par Bange & Overstreet (1960, **Fig.I.6**) :

- Le premier système, « très efficace » fonctionne à faible concentration externe en césium ( $[\text{Cs}]_{\text{ext}} < 100\mu\text{M}$ ) et sature aux alentours de 50  $\mu\text{M}$  :  $K_m = 8 \mu\text{M}$  et  $V_{\text{max}} = 2 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{MF.h}^{-1}$ . Ce

système est peu spécifique puisqu'il prend également en charge au moins le potassium et le rubidium.

- Le deuxième système devient dominant pour des concentrations externes en césium de l'ordre du mM et ne sature pas, même à des concentrations supérieures à 75 mM.

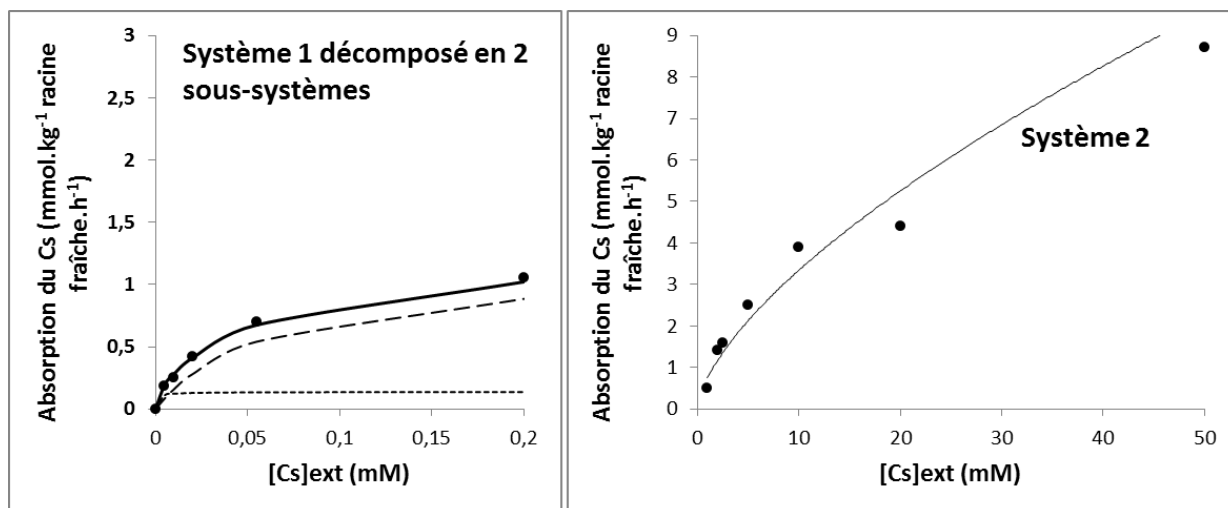


**Figure I.6 : Absorption du césium en fonction de la concentration en césium dans le milieu ( $[Cs]_{ext}$ ) par les racines excisées d'orge (d'après Bange & Overstreet, 1960).**

Comme observé par Epstein et al. (1963) sur l'absorption du potassium par les racines d'orge, le système d'absorption du césium ne suit donc pas une simple cinétique de Michaelis-Menten. La pluralité des mécanismes liés à l'absorption racinaire du césium est encore confirmée par le travail sur blé tendre (*Triticum aestivum*) de Shaw & Bell (1989). Ces auteurs distinguent, de la même façon que précédemment :

- un premier système (Système 1 sur la **Fig. I.7**) fonctionnant majoritairement à faible concentration externe en césium ( $[Cs]_{ext} < 200\mu M$ ) ;
- un deuxième système (Système 2) fonctionnant pour des concentrations plus élevées en césium ( $[Cs]_{ext} > 1mM$ ) et qui ne sature pas même à 50 mM.

En outre, à des  $[Cs]_{ext} < 200\mu M$  c'est-à-dire à l'intérieur du « Système 1 », deux mécanismes se distinguant par leur affinité pour le césium seraient à l'œuvre (Shaw & Bell, 1989). Poussant ainsi plus loin la décomposition du mécanisme d'absorption du césium en deux systèmes, ces auteurs proposent que le « Système 1 » (globalement haute-affinité) soit lui-même la somme de deux composantes dont les  $K_m$  respectifs seraient de  $1,18\mu M$  et  $63,5\mu M$  (Fig. I.7).



**Figure I.7: Absorption du césium en fonction de la concentration en césium dans le milieu ( $[Cs]_{ext}$ ) par les racines de blé tendre (d'après Shaw & Bell, 1989).** Le premier système d'absorption (courbe de gauche) est lui-même décomposé en deux sous-systèmes se distinguant par leurs paramètres cinétiques.

Comme pour les ions  $K^+$  (voir **Section I.3.6**), il a été proposé que le système d'absorption haute-affinité de  $Cs^+$  serait complètement énergie-dépendant alors que, à fortes concentration, les ions  $Cs^+$  passeraient par des canaux non-spécifiques, guidés par le gradient-électrochimique (Bange & Overstreet, 1960 ; Shaw & Bell, 1989).

#### I.4.3 – Variation quantitative de l'accumulation de césium en fonction de l'espèce végétale

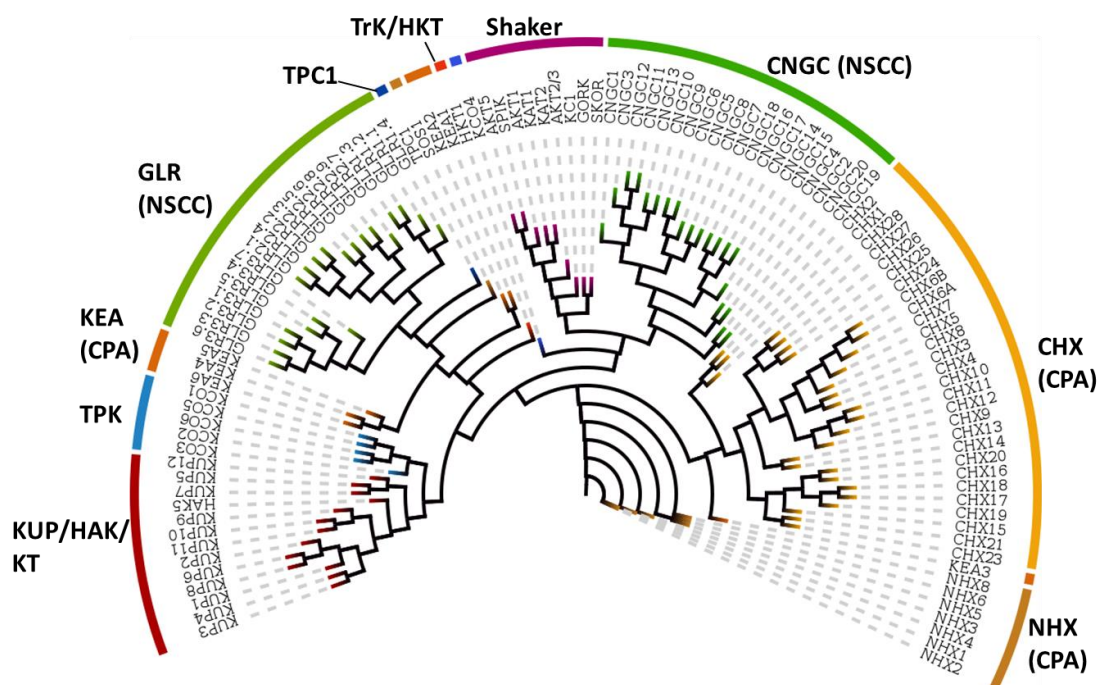
Nous avons vu dans la **Section I.4.2** que les paramètres cinétiques de l'absorption racinaire du césium varient d'une plante à l'autre, par exemple entre le blé et l'orge. Cette variation est d'ailleurs souvent plus grande entre différentes espèces placées sur un même sol que pour une même espèce placée sur différents sols (Bell et al., 1988).

Ces différences de capacité d'accumulation du césium existent même entre groupes de plantes d'une même espèce. Ainsi, l'accumulation de césium varie d'un facteur 1,5 à 4,3 entre différentes variétés d'une même espèce chez les Poacées comme le maïs (Schneider et al., 2008), le blé (Schimmack et al., 2004 ; Putyatin et al., 2006), l'orge ou encore le seigle (Prister et al., 1992). De même, l'accumulation de césium pour différentes accessions d'*Arabidopsis* présente une grande variabilité phénotypique expliquée à 69% par la variabilité génétique (Kanter et al., 2010).



## I.5 – ETAT DES CONNAISSANCES SUR L'IDENTITE DES TRANSPORTEURS IMPLIQUES DANS LES FLUX DE CESIUM

Au contraire du césium, le potassium est un élément essentiel chez les végétaux et différentes familles de gènes codant pour des transporteurs potassiques ont été identifiées chez *A. thaliana* (Fig.I.9).



**Figure I.9 : Diversité des protéines de transport impliquées (supposées et avérées) dans les flux de potassium chez *A. thaliana*.** L'arbre est construit à partir des séquences peptidiques récupérées sur TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) et analysées par le programme PhyML (v3.0, mode « One Click ») disponible via la plateforme en ligne Phylogeny.fr (<http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/index.cgi>) puis dessiné avec le programme en ligne AQUAPONY (<http://www.lirmm.fr/~cazaux/AQUAPONY/>). La construction de cet arbre a comme unique objectif d'illustrer la diversité des protéines de transport impliquées dans les flux potassiques. Nous ne discuterons pas dans cette thèse des liens phylogénétiques entre ces protéines et nous ne remettons pas en question les familles dans lesquelles elles sont classées.

En considérant que le césium emprunte en partie le système de transport potassique, les connaissances actuelles sur l'identité moléculaire des transporteurs impliqués dans les flux de potassium indiquent que plus d'une centaine de gènes sont des candidats potentiels au transport du césium chez *A. thaliana*. Les protéines codées par ces gènes sont regroupées en 7 familles (Fig.I.9) :

- (a) les transporteurs **KUP/HAK/KT** ( $K^+$  Uptake/High Affinity  $K^+/K^+$  Transporters- 13 gènes),
- (b) les canaux potassiques **Shaker** (9 gènes) subdivisés en 5 groupes selon leurs séquences et leur capacité de rectification du potentiel membranaire entrant chez les **KIRC** ( $K^+$  Inward-Rectifying Channels) et sortant chez les **KORC** ( $K^+$  Outward Rectifying Channels),
- (c) les transporteurs **TrK/HKT** (Transporters  $K^+$ / High-affinity  $K^+$  Transporters- 1 gène),
- (d) les canaux **TPK** (Tandem Pore  $K^+$  channel- 5 gènes),
- (e) **TPC1** (Tandem Pore Channel- 1 gène) parfois rattaché à la famille des TPK,

(d) les **NSCC** (Non-Selective Cation Channels) aussi appelé **VICC** (Voltage-Independent Cation Channels) subdivisés en 2 familles les **CNGC** (Cyclic-nucleotid Gated Channels- 20 gènes) et les **GLR** (Glutamate-Like Receptors- 20 gènes),

(g) les transporteurs **CPA** (Cation/Proton Antiporter) subdivisés en 3 groupes : les **KEA** (K<sup>+</sup> Efflux Antiporter- 6 gènes), les **NHX** (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter- 7 gènes) et les **CHX** (Cation/H<sup>+</sup> Antiporter- 28 gènes).

Plusieurs synthèses recensent la structure, le rôle et la régulation, connus ou supposés, des différents transporteurs potassiques (Véry & Sentenac, 2002, 2003 ; Gierth & Mäser, 2007 ; Lebaudy et al., 2007 ; Szczerba et al., 2009 ; Hedrich et al., 2012 ; Sharma et al., 2013 ; Ahmad & Maathuis, 2014 ; Anschütz et al., 2014 ; Nieves-Cordones et al., 2014 ; Véry et al., 2014...). Dans cette section, nous nous intéressons de manière non-exhaustive aux différentes protéines de transport connues pour leur rôle dans les flux de potassium chez *A. thaliana* et, si cela est explicité dans la littérature, pour leur capacité à transporter le césium.

#### SYSTEME DE TRANSPORT TYPE CANAL

##### **I.5.1 - Les canaux potassiques Shaker ne semblent pas impliqués dans l'absorption racinaire de césium mais pourraient participer à sa translocation**

La famille des canaux Shaker est composée de 9 gènes chez *Arabidopsis* (Véry & Sentenac, 2002). La différence de potentiel membranaire contrôle l'ouverture de certains de ces canaux et est rectifiée sous leur action de transport du K<sup>+</sup>. En se basant sur ces propriétés de rectification, on peut diviser les Shaker en 3 sous-familles : rectification entrante, faiblement entrante et sortante.

## Canaux potassiques Shaker à rectification entrante (KIRC pour K<sup>+</sup> inward-rectifying channels) et faiblement entrante

<p><b>Type de transport</b></p>	<p>Fonctionnement type <b>canal sélectif</b>, ouverture activée quand le potentiel membranaire est plus négatif que le potentiel d'équilibre du K<sup>+</sup> (E<sub>K</sub>) et permettant son influx.</p>
<p><b>Structure</b></p>	<p>4 sous-unités, chacune composée de 6 segments transmembranaires, organisées autour d'un pore central. La <b>sensibilité au voltage</b> est assurée par le 4<sup>ème</sup> segment et une boucle P membranaire relie le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> segment et intervient dans la <b>sélectivité du pore</b> (motif de sélectivité pour le K<sup>+</sup>). La région C-terminal cytosolique porte des domaines d'association à des nucléotides cycliques et à l'ankyrine.</p> <p>La formation d'<b>hétéromères</b> a été observée entre des canaux KAT et AKT (voir références citées dans Mäser et al., 2001 et dans Véry et al., 2014).</p>
<p><b>Localisation tissulaire</b></p>	<p>Périphérie de la <b>racine</b> <i>i.e.</i> poils absorbants et cortex (AKT1, KC1) ; tige (AKT1, AKT2, KAT1, KAT2, KC1) ; <b>feuilles</b> épiderme/cellules de garde (AKT1, KAT1 et KAT2) et <b>phloème</b> (AKT2 et KAT2) ; fleur (AKT6) et <b>pollen</b> (SPIK) (synthèse dans Véry et al., 2014).</p>
<p><b>Localisation intracellulaire</b></p>	<p>Membrane plasmique.</p>
<p><b>Gènes identifiés</b></p>	<p><b>7 gènes</b> organisés en 4 groupes :</p> <p>Groupe 1 (présence d'un domaine de fixation à l'ankyrine au niveau du C-terminal et lié à un courant rectifiant entrant) : AKT1, SPIK et AKT6.</p> <p>Groupe 2 (absence d'un domaine de fixation à l'ankyrine et lié à un courant rectifiant entrant) : KAT1 et KAT2.</p> <p>Groupe 3 (présence d'un domaine de fixation à l'ankyrine et lié à un faible courant rectifiant entrant) : AKT2.</p> <p>Groupe 4 (absence d'un domaine de fixation à l'ankyrine): KC1 (sous-unité régulatrice).</p>
<p><b>Fonctions</b></p>	<p><b>Nutrition potassique</b> (AKT1 et AtKC1/AKT1, Hirsch et al. 1998 ; Reintanz et al., 2002), régulation de la pression osmotique et du potentiel membranaire.</p>
<p><b>Rôle dans les flux de césium</b></p>	<p>Non significatif pour AKT1 (Broadley et al., 2001).</p>

Les fonctions identifiées pour les KIRC chez *Arabidopsis* sont généralement relatives à l'absorption/distribution du K<sup>+</sup> :

- AKT1, localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules racinaires, et associé à sa sous-unité régulatrice KC1 (Reintanz et al., 2002), est le canal dominant pour l'absorption racinaire du K<sup>+</sup> (Hirsch et al., 1998 ; Spalding et al., 1999 ; Broadley et al., 2001 ; Gierth et al., 2005). En effet, environ 60% de l'absorption racinaire d'un analogue du potassium, le rubidium, est attribué à l'activité du canal AKT1 dans la gamme de concentration externe comprise entre 10 et 50 mM (Gierth & Mäser, 2007).



- KAT1 et KAT2 participent à l'influx de  $K^+$  au niveau des cellules de garde et sont impliqués dans le contrôle de l'ouverture/fermeture des stomates (Kwak et al., 2001 ; Szyroki et al., 2001 ; voir la synthèse de Lebaudy et al., 2007). KAT1 est exprimé plus faiblement au niveau des racines où il est supposé récupérer le  $K^+$  localisé dans l'apoplasme (Nakamura et al., 1995).
- KAT2 et AKT2 sont impliqués dans les flux de  $K^+$  et le contrôle du potentiel membranaire au niveau du phloème, mécanisme indispensable dans la circulation de la sève élaborée (Deeken et al., 2002 ; Gajdanowicz et al., 2011).
- SPIK, spécifiquement exprimé dans les fleurs avec AKT6 (Lacombe et al., 2000 ; Mouline et al., 2002), joue un rôle dominant dans l'absorption de  $K^+$  au niveau du pollen et la croissance du tube pollinique (Mouline et al., 2002).

Certains de ces canaux sont faiblement perméables au  $Cs^+$  avec un rapport de coefficient de perméabilité  $P_{Cs}/P_K$  de 0,07 pour les canaux KIR des cellules du cortex racinaire d'*A. thaliana* (Maathuis & Sanders, 1995). En outre, différentes études d'électrophysiologie indiquent un effet inhibiteur du  $Cs^+$  sur des canaux de type KIRC (Véry et al., 1994 ; Becker et al., 1996 ; Ichida & Shroeder, 1996 ; Maathuis & Sanders, 1995 ; Bertl et al., 1997 ; Zimmermann et al., 1998, Lacombe et al., 2000). Cette inhibition se traduit par une atténuation du courant entrant mesuré en réponse au voltage imposé dans les différents systèmes utilisés (ovocytes de Xénope, levures, protoplastes de cellules racinaires d'*Arabidopsis*) et par une diminution de l'influx de  $K^+$ . Cette inhibition des KIRC par le césium extracellulaire dépend en général du voltage imposé et des concentrations en  $K^+$  et en  $Cs^+$  dans le milieu extérieur. Il est à noter que la sensibilité des KIRC au césium est fonction du système d'expression utilisé, du niveau d'expression des gènes et de leur combinaison (White & Broadley, 2000 et références citées dans cet article).

*In planta*, l'invalidation du canal AKT1 n'a pas d'effet sur l'absorption de césium par la lignée mutante *atakt1* suffisamment approvisionnée en potassium (Broadley et al., 2001). Bien que ce canal dominant de type KIRC n'ait pas de rôle direct dans l'absorption de césium, d'autres études indiquent que les KIRC restent des objets d'études intéressants dans un objectif de manipulation des capacités d'absorption du césium par les plantes. En effet, la caractérisation d'un mutant insensible au césium (appelé Csi52) indique qu'une modification des propriétés des KIRC (probabilité d'ouverture, dépendance au voltage et/ou affinité pour le  $K^+$ ) serait vraisemblablement à l'origine de cette résistance au césium (Sheahan et al., 1993 ; Maathuis & Sanders, 1996).

Nous avons donc vu que, de manière générale, les KIRC sont perméables au  $Cs^+$  mais n'en transporteraient que très peu vers les racines car l'augmentation de la concentration en césium dans le milieu extérieur diminue la perméabilité de ces canaux aux cations (références citées plus haut). S'appuyant sur le fait que la mutation de certains résidus du canal KAT1 affecte l'effet inhibiteur et/ou la perméabilité du césium (Becker et al., 1996 ; Ichida & Shroeder, 1996 ; Hoth et al., 1997 ; Ichida et al., 1999), White & Broadley (2000), suggèrent néanmoins la possibilité de moduler l'influx de césium via les KIRC grâce à des techniques de biologie moléculaire. Ces travaux sont particulièrement encourageants dans un objectif d'amélioration des stratégies de phytoremédiation des territoires contaminés en radiocésium évoquées dans la **Section I.2.**

**Les canaux potassiques Shaker à rectification sortante (KORC pour K<sup>+</sup> outward-rectifying channels)**

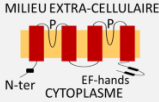
<b>Type de transport</b>	Fonctionnement type <b>canal sélectif</b> , ouverture quand le potentiel membranaire est moins négatif que $E_K$ et permettant <b>l'efflux de K<sup>+</sup></b> .
<b>Structure</b>	Voir Structure des KIRC.
<b>Localisation tissulaire</b>	GORK - poils absorbants, tige, <b>cellules de garde</b> SKOR - péricycle et <b>xylème</b> , pollen
<b>Localisation intracellulaire</b>	Membrane plasmique
<b>Gènes identifiés</b>	Groupe 5 des Shaker (présence d'un domaine de fixation à l'ankyrine et lié à un courant rectifiant sortant) : <i>AtGORK</i> et <i>AtSKOR</i>
<b>Fonctions</b>	Régulation de la pression osmotique et du potentiel membranaire
<b>Rôle dans les flux de césium</b>	Non connu

Les KORC sont des canaux potassiques sélectifs appartenant à la superfamille des Shaker. On en distingue deux types chez *A. thaliana* :

- SKOR (Stellar K<sup>+</sup> outward rectifier) permet principalement la sortie de K<sup>+</sup> dans un seul sens, des cellules racinaires vers le xylème (contribuant ainsi au transport longue-distance des racines vers les feuilles). Ainsi, une mutation de SKOR conduit à une moindre conductance de K<sup>+</sup> et à une diminution de la concentration en K<sup>+</sup> de la tige et des feuilles (Gaymard et al., 1998). En plus de son activité, le niveau d'expression de SKOR est régulé négativement quand la concentration en K<sup>+</sup> diminue (Maathuis et al., 2003 ; Pilot et al., 2003 ; Lebaudy et al. 2007).
- GORK (Guard-cell outward-rectifying K<sup>+</sup> channel) est le canal potassique à rectification sortante le plus abondant dans les cellules de garde et joue un rôle essentiel dans le mouvement des stomates (Ache et al., 2000 ; Hosy et al., 2003). GORK est activé par la sortie d'anions de la cellule de garde, c'est-à-dire à la dépolarisation et son activation a pour effet une perte d'eau et la fermeture des stomates. Les mutants *gork* montrent ainsi une anomalie au niveau de la fermeture des stomates (Hosy et al., 2003). GORK est également exprimé dans les cellules racinaires où il est vraisemblablement impliqué dans la régulation osmotique et le maintien du potentiel membranaire négatif (Ivashikina et al., 2001 ; Reintanz et al., 2002).

Comme les KIRC, les KORC et en particulier SKOR sont faiblement perméables au Cs<sup>+</sup> ( $P_{Cs}/P_K$  de 0,12-0,15, Maathuis & Sanders, 1995 ; Gaymard et al., 1998). En revanche, ils sont relativement peu sensibles à une inhibition par le Cs<sup>+</sup> extracellulaire (Maathuis & Sanders, 1995 ; Gaymard et al., 1998). Il existe néanmoins des preuves d'une inhibition des KORC par le Cs<sup>+</sup> cytoplasmique via un mécanisme voltage-dépendant (Maathuis & Sanders, 1995).

### I.5.2- Les Tandem-pore K<sup>+</sup> channel (TPK) et Two-Pore Channel 1 (TPC1) n'ont pas encore été étudiés pour leur rôle dans les flux de césium

<b>Type de transport</b>	Transport type <b>canal</b> , ouverture contrôlée par Ca <sup>2+</sup> et le pH et indépendante du voltage.
<b>Structure</b>	TPC1 : 2 segments transmembranaires, 1 boucle-P TPK : 4 segments transmembranaires, deux boucles-P, <b>motif de sélectivité à K<sup>+</sup></b> (GYGD), motif EF-hand en C-terminal (fixation Ca <sup>2+</sup> ) pour 3 membres sur 5 (TPK1,2 et 3).
	
<b>Localisation tissulaire</b>	Racines, Feuilles (stomates), pollen (TPK4)
<b>Localisation intracellulaire</b>	Tonoplaste (TPK1, TPK5), membrane plasmique (TPK4), thylakoïde (TPK3)
<b>Gènes identifiés</b>	5 gènes TPK identifiés chez <i>A. thaliana</i> : TPK1 (KCO1), TPK2 (KCO2), TPK3 (KCO6), TPK4 (KCO4), TPK5 (KCO5) et un seul gène TPC1 (KCO3)
<b>Fonctions</b>	<b>Flux de K<sup>+</sup> entre la vacuole et le cytosol</b> , impliqué dans le bon fonctionnement de la photosynthèse (TPK3), dans la croissance du tube pollinique (TPK1), dans le mouvement des stomates...
<b>Rôle dans les flux de césium</b>	Non connu

Globalement, les canaux de type TPK (à l'exception de TPK4) et TPC1 participent aux flux de K<sup>+</sup> entre la vacuole et le cytosol. Ces flux de K<sup>+</sup> médiés par les TPK sont reliés à divers mécanismes comme l'ouverture/fermeture des stomates et la croissance des plantes (Gobert et al., 2007), la croissance du tube pollinique (Becker et al., 2004) ou encore le contrôle de la photosynthèse (Carraretto et al., 2013).

Comme pour les canaux potassiques en général, le césium (5mM) bloque le transport de K<sup>+</sup> à travers AtTPK4 exprimé en ovocyte de Xénope (Marcel, 2010). En revanche, à notre connaissance, la perméabilité des TPK et de TPC1 à Cs<sup>+</sup> n'a pas encore été étudiée. Il est donc difficile de conclure sur un rôle potentiel de ces canaux dans les flux de césium.

### I.5.3 - Des canaux cationiques non sélectifs (NSCC) sont supposés prendre en charge la plus grande part de l'absorption de césium

Les NSCC, aussi appelés VICC (Voltage Independent Cation Channels) sont codés par des gènes de la famille des CNGC et des GLR, qui sont pour la majorité exprimés au niveau des racines (Lacombe et al., 2001 ; Mäser et al., 2001 ; Davenport, 2002 ; White et al., 2002 ; Talke et al., 2003 ; Hampton et al., 2005 ; Demidchik & Maathuis, 2007 ; Kaplan et al., 2007 ; Roy et al., 2008). Contrairement à ce que leur nom indique, l'ouverture des canaux de type VICC n'est pas indépendante du voltage mais en dépend faiblement (Tyerman et al., 2002). En revanche, leur ouverture est vraisemblablement contrôlée par des ligands : les nucléotides cycliques dans le cas des CNGC (Cyclic Nucleotid Gated Channels) ou des acides aminés dans le cas des GLR (Glutamate Like Receptor).

L'implication des NSCC dans l'absorption de césium par *A. thaliana* est suggérée en partie par un modèle théorique développé à partir des cinétiques de fonctionnement des protéines perméables au Cs<sup>+</sup> et capable de prédire la part de l'absorption totale assurée par chacune de ces protéines (White & Broadley, 2000 ; Hampton et al., 2005). Selon ce modèle, dans les conditions d'apport en potassium suffisantes, la plus grande partie du flux de Cs<sup>+</sup> (30-90%) absorbé par les racines emprunte

des NSCC et la partie restante est prise en charge par des transporteurs de la famille des KUP/HAK/KT.

## Les CNGC

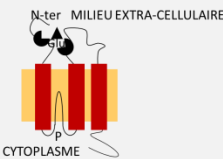
<p><b>Type de transport</b></p>	<p>Fonctionnement type <b>canal non sélectif</b>, ouverture activée par des nucléotides cycliques (AMPc et GMPc par exemple) et régulée par la calmoduline.</p>
<p><b>Structure</b></p>	<p>Proche des canaux Shaker avec 6 segments transmembranaires pour chaque sous-unité et une boucle P (mais ne portant <b>pas de motif à haute sélectivité vis-à-vis du K<sup>+</sup></b>), présence de domaines de fixation aux nucléotides cycliques et à la calmoduline en C-terminal (Köhler et al., 1999 ; Mäser et al., 2001).</p>
<p><b>Localisation tissulaire</b></p>	<p>Racines, feuilles, pollen.</p>
<p><b>Localisation intracellulaire</b></p>	<p>Membrane plasmique (Ma et al., 2006), localisation intracellulaire à déterminer.</p>
<p><b>Gènes identifiés</b></p>	<p>20 membres : AtCNGC 1 à 20 avec CNGC10 = ACBK1, CNGC19 = CNBT2 et CNGC20 = CNBT1 (Mäser et al., 2001).</p>
<p><b>Fonctions</b></p>	<p><b>Les connaissances sont encore partielles.</b> Impliqués dans la signalisation cellulaire et la réponse aux stress : CNGC2 joue un rôle dans la réponse végétale aux pathogènes (Clough et al., 2000) alors que l'invalidation de CNGC1 confère une tolérance à Pb<sup>2+</sup> (Sunkar et al., 2000). Perméabilité supposée faiblement sélective aux cations monovalents (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> ; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>...) et/ou à Ca<sup>2+</sup> (Köhler et al., 1999 ; Leng et al., 1999 ; Véry &amp; Sentenac, 2002).</p>
<p><b>Rôle dans les flux de césium</b></p>	<p><b>Perméabilité démontrée en système hétérologue</b> pour AtCNGC2 et AtCNGC4. <b>Absorption plus importante/moins importante du césium selon le gène invalidé chez <i>A. thaliana</i></b> (Hampton et al., 2005).</p>

Chez les plantes, les CNGC sont impliqués dans le transport d'ions. AtCNGC1 est impliqué dans le transport du Pb<sup>2+</sup> (Sunkar et al., 2000) et du Ca<sup>2+</sup> (Ma et al., 2006), AtCNGC3 participe à la translocation/distribution d'ions à partir du xylème (Gobert et al., 2006) et la surexpression d'*AtCNGC10* chez le mutant *atakt1* restaure en partie l'absorption du K<sup>+</sup> (Kaplan et al., 2007). Certains CNGC sont également impliqués dans la résistance aux pathogènes chez les plantes et le développement (voir références citées dans la synthèse de Kaplan et al., 2007).

Bien que le rôle des AtCNGC dans l'absorption de césium ne soit pas clairement défini, différents arguments tendent à démontrer que leur implication est loin d'être négligeable. Ainsi, AtCNGC2 et AtCNGC4 exprimés dans des ovocytes laissent passer un flux entrant de Cs<sup>+</sup> contrôlé par les nucléotides cycliques (Leng et al., 2002 ; Balagué et al., 2003). De plus, AtCNGC10 exprimé dans *E. coli* souche LB650 (*ΔtrkH*, *ΔtrkG*) conduit à une toxicité du césium (Li et al., 2005). Des tests sur des mutants *Arabidopsis* déficients en divers AtCNGC montrent des résultats divergents concernant leur rôle dans le transport de Cs<sup>+</sup> (White et al., 2004 ; Hampton et al., 2005). Alors que l'absence de certains AtCNGC s'accompagne d'une concentration moindre en césium dans la plantule (AtCNGC1, 9 et 12), les mutants déficients en d'autres AtCNGC montrent au contraire une accumulation plus

importante de césium comparativement à l'écotype sauvage (AtCNGC2, 3, 16, 19, 20) (Hampton et al., 2005). Les auteurs suggèrent que ces divergences seraient liées à des différences supposées entre les perméabilités des AtCNGC testés. Ainsi, les mutants déficients en AtCNGC supposés être perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  - comme AtCNGC2 (Hua et al., 2003 ; White et al., 2002) - accumulent souvent de faibles concentrations en  $\text{Cs}^+$ . En revanche, chez les mutants déficients en AtCNGC supposés être perméables aux cations monovalents – comme AtCNGC1 (Leng et al., 2002 ; Véry & Sentenac, 2002), les concentrations en  $\text{Cs}^+$  sont plus élevées. L'hypothèse avancée est qu'il existerait des voies de compensation chez les mutants pour lesquels ce sont des AtCNGC impliqués dans une part significative du transport de  $\text{K}^+$  qui sont invalidés. Le césium emprunterait alors ces voies de compensation induisant logiquement une plus forte concentration en cet élément.

### Les GLR

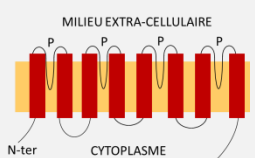
<b>Type de transport</b>	Fonctionnement type <b>canal non sélectif</b> , ouverture probablement activée par le glutamate (entre autres acides aminés).
<b>Structure</b>	Par homologie avec les récepteurs ionotropiques pour le glutamate chez les animaux : tétramère ou pentamère, chaque sous-unité contient 3 domaines transmembranaires, deux sites de fixation des ligands sont situés sur la face externe de la membrane (Dietrich et al., 2010).
	
<b>Localisation tissulaire</b>	Rosette, racines, siliques.
<b>Localisation intracellulaire</b>	Inconnue.
<b>Gènes identifiés</b>	20 membres identifiés chez <i>A. thaliana</i> : AtGLR 1.1 à 1.4, 2.1 à 2.9 et 3.1 à 3.7 (Lacombe et al., 2001).
<b>Fonctions</b>	Transport de $\text{Ca}^{2+}$ et d'ions monovalents.
<b>Rôle dans les flux de césium</b>	Non connu.

Toujours dans le groupe des NSCC, la famille des GLR (pour Glutamate-Like Receptor) chez les plantes est encore moins étudiée que celle des CNGC (Hedrich, 2012). Certains AtGLR sont supposés être des canaux non-sélectifs de cations tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cs}^+$  (Dennison & Spalding, 2000 ; Demidchik et al., 2004 ; Qi et al., 2006). Ainsi, AtGLR3.4 exprimé dans des ovocytes laisse passer un flux entrant de  $\text{Cs}^+$  (Meyerhoff et al., 2005). De plus, des courants de  $\text{Cs}^+$  activés par le glutamate, voltage-indépendants et sensibles à la quinine, au  $\text{La}^{3+}$  et au  $\text{Gd}^{3+}$  ont été enregistrés sur des protoplastes de cellules racinaires d'*Arabidopsis* (Demidchik et al., 2002 ; 2004). Ce profil pharmacologique concorde avec d'autres mécanismes végétaux impliquant les GLR (White et al., 2002).

L'expression de certains membres de la famille des AtGLR est régulée par le niveau de  $\text{K}^+$  : l'expression de *AtGLR1.3* et *AtGLR1.4* est plus élevée en condition de carence en potassium qu'en condition normale (Hampton et al., 2004). Il est également à noter que l'expression d'*AtGLR1.2* et d'*AtGLR1.3* augmente chez les plantes exposées au  $\text{Cs}^+$ , sans que l'on sache si cette régulation est un effet indirect dû à la carence en  $\text{K}^+$  induite par l'absorption de  $\text{Cs}^+$  (Hampton et al., 2004).

## SYSTEME DE TRANSPORT TYPE TRANSPORTEUR

## I.5.4 - La famille des Trk/HKT

<b>Type de transport</b>	Fonctionnement type transporteur : <b>symport <math>K^+/Na^+</math> et/ou uniport <math>Na^+</math>.</b>
<b>Structure</b>	4 paires de segments transmembranaires avec une boucle P entre chaque domaine transmembranaire d'une même paire. C- et N-terminal cytosoliques.
	
<b>Localisation tissulaire</b>	Cellules parenchymateuses du <b>xylème.</b>
<b>Localisation intracellulaire</b>	Membrane plasmique.
<b>Gènes identifiés</b>	Un seul gène chez <i>A. thaliana</i> ( <i>AtHKT1</i> : Uozumi , 2000 ; Kato et al., 2001) alors que plusieurs gènes chez différentes plantes à graine commercialisées.
<b>Fonctions</b>	<b>Tolérance au stress salin.</b>
<b>Rôle dans les flux de césium</b>	Non connu

Cette famille de transporteurs est présente chez les champignons (Trk) et les bactéries (Ktr). Le premier *HKT* végétal cloné est *TaHKT1* du blé (Schachtman & Shroeder, 1994). Ce transporteur (*TaHKT1*) agit comme un co-transporteur  $K^+/Na^+$  de haute-affinité, et est converti en uniport  $Na^+$  lorsque la force ionique est importante (Rubio et al., 1995). Exprimé en système hétérologue ovocyte de Xénope, *TaHKT1* est perméable au  $Cs^+$  : l'absorption de  $Cs^+$ , en absence de  $K^+$ , atteint environ 86% de l'absorption du  $K^+$  (Schachtman & Shroeder, 1994).

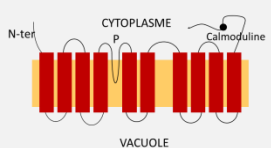
Par la suite, les caractérisations de *HKT* orthologues chez différentes espèces végétales ont révélé un mélange de transporteurs  $Na^+$ , de co-transporteurs  $Na^+/K^+$  et de transporteurs  $Na^+$  couplé au  $K^+$  pour ces gènes (Gierth & Mäser, 2007). Ainsi, la famille des transporteurs *HKT* est généralement divisée en deux groupes se distinguant par leur sélectivité. Le groupe 1 regroupe les uniports  $Na^+$  et serait probablement représenté chez toutes les espèces végétales (Véry et al., 2014). Les *HKT* du groupe 2, identifiés uniquement chez les Monocotylédones pour l'instant (Platten et al., 2006), sont impliqués dans le transport de  $Na^+$  et de  $K^+$  de type symport dans certaines conditions et uniport  $Na^+$  quand la concentration en  $Na^+$  est élevée.

En général, plusieurs gènes codant pour des *HKT* sont identifiés chez les végétaux. Par exemple, jusqu'à 9 gènes sont identifiés chez le riz (Garcia-deblas et al., 2003). En revanche, un seul gène, nommé *AtHKT1;1*, est identifié chez *A. thaliana* (Uozumi et al., 2000 ; Kato et al., 2001). Le transport de  $Na^+$  via *AtHKT1* est reconnu comme un mécanisme majeur de la tolérance à la salinité chez *A. thaliana* (Davenport et al., 2007 ; Horie et al., 2009). Ainsi, l'expression transgénique d'*AtHKT1* améliore la croissance du riz en milieu salin (Plett et al., 2010). Cette tolérance à la salinité chez les différentes lignées *Arabidopsis* varie en fonction des allèles de *HKT* présents (Rus et al., 2006 ; Baxter et al., 2010).

Même si l'implication directe des *HKT* dans le transport de  $Cs^+$  n'est pas avérée, les études sur le rôle de cette famille dans la gestion du stress salin est riche d'enseignements. La manipulation de

l'expression des *HKT* via des biotechnologies ou des techniques de sélection apparaît comme une stratégie intéressante pour améliorer la tolérance au stress salin chez les plantes cultivées (Waters et al, 2013). De la même façon, l'étude des transporteurs (pas forcément *HKT*) impliqués dans les flux de césium pourrait permettre d'identifier des gènes cibles dans un objectif de phytoremédiation des sols contaminés ou de développement de « safe-food » (voir Section I.2). Waters et al (2013) soulignent l'importance de connaître le schéma d'expression, la fonction et de la régulation des transporteurs ciblés pour atteindre le résultat escompté. Par exemple, l'étude de Moller et al. (2009) montre que la surexpression constitutive d'*AtHKT1* conduit à une augmentation de l'accumulation de  $\text{Na}^+$  dans les feuilles et une sensibilité accrue à la salinité alors que l'expression ciblée au niveau de la stèle améliore significativement la tolérance au stress salin chez *A. thaliana*.

### I.5.5 - Les antiports de la superfamille des CPA (monovalent Cation/Proton Antiporter) pourraient participer à la distribution cellulaire du césium

<b>Type de transport</b>	<b>Antiports cations monovalents/ <math>\text{H}^+</math></b> ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , $\text{K}^+/\text{H}^+$ )
<b>Structure</b>	CHX : 10-12 domaines transmembranaires et queue carboxyle hydrophile de longueur variable. NHX : des résidus acides situés dans les domaines transmembranaires seraient impliqués dans le transport du $\text{K}^+$ (Wang et al., 2015).
	
<b>Localisation tissulaire</b>	Racines, Feuilles, Pollen (CHX)
<b>Localisation intracellulaire</b>	Membrane plasmique (SOS1, CHX14), tonoplaste et endosome (NHX), chloroplaste (CHX et KEA),
<b>Gènes identifiés</b>	Environ <b>44 gènes</b> organisés en deux familles, elles-mêmes subdivisées en plusieurs catégories : <u>CPA1</u> : NHX (1 à 8) ; SOS1 <u>CPA2</u> : KEA (1 à 6) ; CHX (1 à 28)
<b>Fonctions</b>	CPA1 : <b>Stockage du <math>\text{K}^+</math> et détoxification du <math>\text{Na}^+</math> dans la vacuole.</b> CPA2 : CHX impliqués dans la régulation de l'homéostasie potassique pendant le développement du pollen et la germination. Gestion de <b>l'équilibre potassique et du stress salin.</b> KEA impliqués dans le <b>transport du <math>\text{K}^+</math></b> au niveau des chloroplastes.
<b>Rôle dans les flux de césium</b>	L'absorption du $\text{K}^+$ par <i>AtCHX13</i> exprimé en levures diminue avec l'augmentation de la concentration externe en $\text{Cs}^+$ (Zhao et al., 2008).

Trois types d'antiports  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$  sont distingués chez *Arabidopsis* : les AtKEA, les AtCHX et les AtNHX. Compte-tenu des gammes de concentrations en potassium et de pH dans lesquels ces antiports sont actifs, les modes d'action de ces trois types d'antiports semblent différents sans qu'un schéma clair n'ait été décrit (Wang et al., 2015).

## Les NHX

Les membres de la famille des CPA1 sont bien caractérisés. En se basant sur leur localisation et leurs fonctions *a priori*, les NHX sont classés en 3 groupes : les NHX vacuolaires (AtNHX1-AtNHX4), les NHX endosomaux (AtNHX5 et AtNHX6) et les NHX de la membrane plasmique (AtNHX7/SOS1 et AtNHX8) (Rodríguez-Rosales et al., 2009). Les NHX de la membrane plasmique jouent un rôle essentiel dans l'équilibre du Na<sup>+</sup>, du K<sup>+</sup> et du pH (voir références citées dans Wang et al., 2015). Les NHX vacuolaires sont impliqués dans la régulation de l'équilibre intracellulaire du potassium, dans la tolérance au stress salin et dans la croissance et le développement des plantes (AtNHX1 et AtNHX2, Bassil et al., 2011 et Barragán et al., 2012). Enfin, les NHX endosomaux sont impliqués dans l'homéostasie cellulaire du potassium et du pH (AtNHX5 et AtNHX6, Wang et al., 2015).

## CHX

Le génome d'*Arabidopsis* contient un grand nombre de gènes codant pour des antiports cation:H<sup>+</sup> et une grande partie de ces gènes n'est pas encore caractérisée. Beaucoup des CHX sont exprimés préférentiellement voire spécifiquement dans le pollen (Sze et al., 2004 ; Lu et al., 2011) bien qu'aucune déficience au niveau du pollen n'ait été décrite chez les mutants *atchx*, probablement à cause de la redondance de fonctions dans cette famille (Zhao et al., 2008). Cinq sous-classes sont généralement utilisées pour catégoriser les CHX (Sze et al., 2004).

Dans le Cluster IV, plusieurs CHX ont été caractérisés. AtCHX17 est localisé sur la membrane des endosomes et est impliqué dans l'équilibre intracellulaire du potassium (Cellier et al., 2004 ; Maresova & Sychrova, 2006 ; Chanroj et al., 2011 , 2013). AtCHX20 exprimé en levures permet leur croissance quand l'apport en potassium est faible et que le pH est alcalin et est impliqué dans la régulation de la pression osmotique dans les cellules de garde (Padmanaban et al., 2007 ; Lu et al., 2011). AtCHX21 est localisé au niveau de la membrane plasmique et est impliqué dans la régulation de la concentration en Na<sup>+</sup> dans le xylème (Hall et al., 2006 ; Evans et al., 2012). AtCHX23 est impliqué dans les fonctions chloroplastiques via la régulation du pH du stroma (Song et al., 2004) et dans les fonctions du pollen (Sze et al., 2004).

Dans le Cluster III, AtCHX13, localisé au niveau de la membrane plasmique, est impliqué dans l'absorption du K<sup>+</sup> quand la concentration potassique dans le milieu est limitante (Zhao et al., 2008). Son expression est d'ailleurs régulée positivement dans les racines dans des conditions de carence en potassium (Zhao et al., 2008). Il est à noter que le transport du K<sup>+</sup> (pour une concentration externe de 20 µM) à travers AtCHX13 diminue avec l'augmentation de la concentration externe en Cs<sup>+</sup> suggérant que ces deux cations pourraient entrer en compétition pour le même site de fixation sur le transporteur (Zhao et al., 2008). L'expression d'AtCHX14, localisé au niveau de la membrane plasmique, est également régulée par le niveau de K<sup>+</sup> notamment par les très hautes concentrations en potassium. AtCHX14 fonctionne alors comme un transporteur basse-affinité impliqué dans l'efflux de K<sup>+</sup> des cellules de l'épiderme et du cortex vers le xylème, l'objectif étant de gérer le stress d'un excès de K<sup>+</sup> (Zhao et al., 2015).

Finalement, la capacité de transport du césium par les CHX n'est pas encore connue. Ils pourraient être considérés comme des candidats intéressants pour les flux de césium (absorption racinaire, compartimentation, translocation, efflux). Nous avons vu plus haut que les rôles dans le transport de césium du canal potassique AKT1 (Broadley et al., 2001, voir p. 53) et de différents CNGC (Hampton



et al., 2005, voir p. 57) ont été démontrés par comparaison entre des lignées de mutants invalidés pour le gène cible et un écotype sauvage non muté. La redondance supposée des gènes codant pour des transporteurs de type CHX apparaît comme une difficulté majeure dans ce type de stratégies.

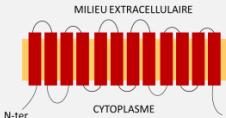
## KEA

Chez *A. thaliana*, trois KEA – KEA1, KEA2 et KEA3- sont impliqués dans l'efflux de potassium du chloroplaste vers le cytosol (Aranda-Sicilia et al., 2012 ; Kunz et al., 2014 ; Dana et al., 2016).

Bien qu'on ne connaisse pas directement le rôle des KEA dans le transport du césium, ils apparaissent comme des candidats intéressants. En effet, la toxicité du césium se traduit par une décoloration des feuilles et une réduction de la chlorophylle (Le Lay et al., 2006 ; Qi et al., 2008). De plus, des outils d'imagerie appliqués au césium indiquent vraisemblablement sa présence dans les chloroplastes (Le Lay et al., 2006). Ainsi, on peut penser que la localisation de plusieurs KEA au niveau des chloroplastes et l'accumulation de césium dans cet organelle pourraient être liées.

### I.5.6 – Focus sur la famille de transporteurs KUP/HAK/KT

Au cours de ma thèse, les travaux se sont dirigés vers la famille de gènes *KUP/HAK/KT* et leur implication dans les flux de césium. Nous aborderons donc ici plus en détail les connaissances actuelles sur cette famille.

<b>Type de transport</b>	Actif, <b>symport supposé <math>K^+</math> / <math>H^+</math></b> , système d'absorption potassique principalement haute-affinité.
<b>Structure</b>	10 à 14 segments transmembranaires (Gierth & Mäser, 2007), N-terminal et C-terminal cytoplasmiques.
	
<b>Localisation tissulaire</b>	<b>Toute la plante</b> (tissus floraux, foliaires, racinaires...).
<b>Localisation intracellulaire</b>	Membrane plasmique, tonoplaste, réticulum endoplasmique.
<b>Gènes identifiés</b>	13 membres nommés <i>KUP1</i> à <i>12</i> (avec <i>KUP3=KT4</i> et <i>KUP4=KT3</i> ) et <i>HAK5</i> . Répartis sur les cinq chromosomes et classés en trois clusters phylogénétiques.
<b>Fonctions</b>	Développement végétal, absorption/efflux du $K^+$ , régulation de la pression osmotique.
<b>Rôle dans l'absorption du Cs</b>	<i>AtKUP9</i> testé chez <i>E. coli</i> est impliqué dans l'absorption de $Cs^+$ . (Kobayashi et al., 2010) <b><i>AtHAK5</i> testé chez <i>A. thaliana</i> est impliqué dans l'absorption de <math>Cs^+</math></b> quand la concentration en $K^+$ est faible (100 $\mu$ M) (Qi et al., 2008)

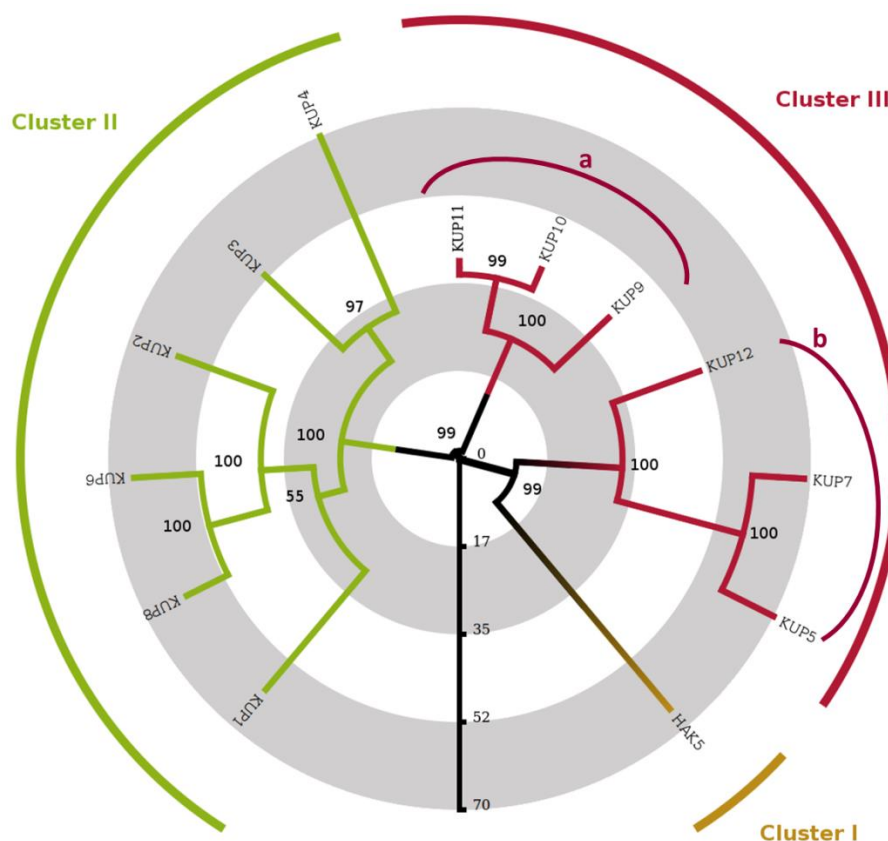
### Identification de la famille des *KUP/HAK/KT*

La famille des *KUP/HAK/KT* chez les plantes a été identifiée grâce à son homologie avec des perméases impliquées dans l'absorption de  $K^+$  chez les bactéries (*KUP* =  $K^+$  uptake permeases) (Schleyer & Bakker, 1993) et avec des transporteurs potassiques haute-affinité chez les champignons (*HAK* = High-affinity  $K^+$  transporters) (Bañuelos et al., 1995). Cette famille comprend 13 membres répartis sur les cinq chromosomes chez *A. thaliana* (Mäser et al., 2001), et 27 membres chez le riz

(Gupta et al., 2008). Selon les homologies de séquences, la famille des *KUP/HAK/KT* est organisée généralement en 4 clusters (Rubio et al., 2000) dont seulement 3 sont représentés chez *A. thaliana* (**Fig.I.10**):

- Le cluster I n'est représenté que par *AtHAK5* chez *A. thaliana*.
- Le cluster II comprend 6 gènes : *AtKUP1*, *AtKUP3*, *AtKUP4*, *AtKUP2*, *AtKUP6*, *AtKUP8*
- Le cluster III comprend 6 gènes : *AtKUP9*, *AtKUP10*, *AtKUP11*, *AtKUP5*, *AtKUP7*, *AtKUP12*.

Si les homologies de séquences entre ces différentes protéines sont grandes, les fonctions qu'elles assurent semblent diverses (quand elles sont connues).



**Figure I.10: Organisation phylogénétique des KUP/HAK/KT chez *A. thaliana*.** L'arbre a été généré comme décrit dans la légende de la Fig. I.9. L'alignement a été réalisé par Muscle (v3.8.31) puis corrigé par Gblocks (v091b). Le programme PhyML (v3.0) a utilisé la méthode du maximum de vraisemblance et la méthode WAG comme méthode de substitution des acides aminés. Les valeurs indiquées sur les nœuds correspondent à la valeur de Bootstrap (pour 100 tirages). L'échelle représente le nombre de changements pour 100 acides aminés.

### Fonctions des transporteurs KUP/HAK/KT chez les plantes

Les gènes *KUP/HAK/KT* ont été clonés à partir de différentes espèces végétales avant d'être testés par complémentation de mutation chez *Escherichia coli* et d'autres systèmes hétérologues pour le transport de  $K^+$  (Quintero & Blatt, 1997 ; Gierth & Mäser, 2007). Néanmoins, les connaissances actuelles sur le rôle physiologique et les mécanismes de transport du  $K^+$  par les transporteurs *KUP/HAK/KT* restent encore partielles (Véry et al., 2014).

Dans le Cluster I, HAK5 assure le transport du  $K^+$  quand les concentrations dans le milieu sont faibles ( $[K]_{ext} < 200 \mu M$ ) et apparaît comme un mécanisme d'adaptation activé en cas de carence (Rubio et al., 2000; Gierth et al. 2005; Rubio et al., 2008 ; Qi et al. 2008 ; Nieves-Cordones et al., 2010). Ainsi, comme nous l'avons vu dans la **Section I.3**, le transporteur HAK5 a un rôle majeur dans l'absorption racinaire du potassium.

Dans le Cluster II, les fonctions démontrées jusqu'à présent sont en lien avec la croissance et le développement chez *A. thaliana*. Ainsi, KUP4 est impliqué dans la croissance des poils absorbants (étude sur le mutant *tiny root hair 1 = trh1*, Rigas et al., 2001) et KUP2 dans l'élongation cellulaire en général (étude sur le mutant *shy3-1*, Elumalai et al., 2002). Avec KUP6 et KUP8, KUP2 serait également impliqué dans l'efflux de  $K^+$  au niveau des cellules racinaires participant ainsi aux processus d'ajustement de la pression osmotique qui interviennent lors de la croissance cellulaire et des réponses au stress hydrique (Osakabe et al., 2013).

Dans le Cluster III, KUP7 est impliqué dans l'absorption racinaire et la translocation du  $K^+$  des racines vers les feuilles en condition de carence potassique (Han et al., 2016). KUP11 est impliqué dans les mécanismes d'adaptation au stress salin (Maathuis , 2006). Exprimé en bactérie déficiente pour tous les systèmes de transport potassique, KUP9 est capable d'assurer l'absorption de  $K^+$  dans une large gamme de concentrations externes (Kobayashi et al., 2010). Dans une publication récente sur la comparaison des KUP/HAK/KT chez 46 espèces végétales d'Angiospermes, le Cluster III est en fait divisé en deux clusters distincts (Nieves-Cordones et al., 2016). L'arbre présenté en **Fig.I.10** est en accord avec ce résultat avec une divergence dès le 1<sup>o</sup> nœud et une valeur de Bootstrap élevée (99%) entre KUP9, KUP10 et KUP11 d'un côté et KUP7, KUP5 et KUP12 de l'autre.

Globalement, les KUP/HAK/KT sont donc considérés comme des transporteurs potassiques : haute-affinité pour HAK5 (Rubio et al., 2000), KUP4 (Rigas et al., 2001) et KUP7 (Han et al., 2016), apparemment basse-affinité pour KUP2 (Quintero & Blatt, 1997) ou à la fois haute et basse-affinité pour KUP1 (Fu & Luan , 1998 ; Kim et al., 1998). Le potassium est impliqué dans un grand nombre de mécanismes (croissance, régulation osmotique, polarisation de la membrane...) et les flux potassiques interviennent dans différents organes (absorption racinaire, translocation, compartimentation dans la vacuole ou encore dans les chloroplastes). Il n'est donc pas surprenant de recenser une diversité de fonctions au sein de cette même famille de transporteurs KUP/HAK/KT.

### Passage du césium par les KUP/HAK/KT

Une prise en charge du césium a d'abord été mise en évidence pour les KUP bactériens (Bossemeyer et al., 1989). Comme la structure des segments transmembranaires et de ceux reliant ces segments sont bien conservés entre ces KUP bactériens et les KUP chez les plantes, l'hypothèse avancée était que les mécanismes de transport le sont aussi (White & Broadley, 2000). Ainsi, des études où des KUP de plantes sont exprimés en système hétérologue levure (Fu & Luan, 1998) et bactérie (Kim et al., 1998), mettent en évidence un phénomène de compétition entre les ions  $Cs^+$  et  $K^+$  pour le transport par AtKUP1 et AtKUP2 .

Il existe également des preuves plus directes de la prise en charge du  $Cs^+$  par d'autres transporteurs KUP présents chez *A. thaliana*, notamment pour les transporteurs HAK5 (Qi et al., 2008) et KUP9 (Kobayashi et al., 2010). Ainsi, l'invalidation du gène *HAK5* chez *A. thaliana* a pour effet de diminuer

sa sensibilité et son absorption de césium dans certaines conditions (Qi et al., 2008). Le transporteur KUP9 exprimé chez *E. coli* déficiente pour tous les systèmes de transport potassiques induit l'absorption de Cs<sup>+</sup> (Kobayashi et al., 2010). Néanmoins, le rôle *in planta* de KUP9 dans le transport du césium reste encore à prouver.

Les transporteurs codés par la famille de gène *KUP/HAK/KT* sont donc des candidats très prometteurs pour l'absorption du Cs<sup>+</sup> chez *A. thaliana* et particulièrement dans des conditions de carence en K<sup>+</sup> (White & Broadley, 2000).

### **Régulation de l'expression des gènes *KUP/HAK/KT***

Nous avons vu précédemment que les différents *KUP/HAK/KT* sont impliqués dans des fonctions diverses chez *A. thaliana*. La régulation de ces différents gènes ainsi que la localisation des transporteurs pour lesquels ils codent pourrait expliquer au moins en partie les fonctions auxquelles ils sont associés.

Le niveau d'expression de certains gènes de la famille des *KUP/HAK/KT* chez *A. thaliana* dépend à la fois du stade de développement et de l'apport en potassium pendant la culture des plantes. Ainsi, alors qu'il est exprimé constitutivement au stade floraison (Ahn et al., 2004), l'expression du gène *KUP3* (codant pour le transporteur KT4/KUP3) est induite par le manque de K<sup>+</sup> chez les jeunes plantules (Kim et al., 1998). De la même façon, le transporteur KUP11 ne serait pas synthétisé chez les plantules alors qu'il est présent chez les plantes au stade floraison (Ahn et al., 2004). En ce qui concerne le gène *HAK5*, il semblerait que son niveau d'expression soit plus élevé au stade plantule qu'au stade floraison avec une régulation positive par le manque de K<sup>+</sup> externe pour ces deux stades de développement (Ahn et al., 2004). Au contraire, le niveau d'expression des gènes *KUP2*, *KUP3*, *KUP5* et *KUP8* augmente avec le niveau de K<sup>+</sup> (Hampton et al., 2004). Il est à noter que les conditions expérimentales (stades des plantes testées, durée du traitement potassique ...) ont une influence significative sur les résultats d'expression des gènes et notamment du gène *HAK5* (Gierth & Mäser, 2007).

### **Bilan des connaissances sur la localisation des transporteurs *KUP/HAK/KT* chez *Arabidopsis thaliana***

J'ai utilisé l'outil Arabidopsis eFP Browser (Winter et al., 2007) sur le site de BAR (Bio-Analytic Resource for plant biology, <http://bar.utoronto.ca/>) pour comparer les tissus et les membranes où sont exprimés les différents *KUP/HAK/KT* chez *A. thaliana*. Comme l'expression de certains *KUP* diffère en fonction du stade de développement considéré (comme *KUP3* et *KUP11*, Kim et al., 1998 ; Ahn et al. 2004), j'ai choisi de simplifier l'analyse en ne présentant ici que les stades de développement précédant le stade 5 (Emergence de l'inflorescence, Boyes et al., 2001 sur le site de TAIR), c'est-à-dire les stades testés dans les expériences d'accumulation du césium pendant ma thèse.

**Tableau I.1 : Localisation de l'expression des différents *KUP/HAK/KT* chez *A. thaliana*.** Les données sont issues de BAR sauf pour HAK5. Pour chaque tissu (Racines, Cotylédons ou Rosette), les valeurs d'expression des différents gènes (à l'exception de HAK5) ont été regroupées et classées selon leur écart à la médiane de toutes ces valeurs : -/+ = l'écart entre la valeur et la médiane est plus grand que l'écart moyen à la médiane, I = l'écart entre la valeur et la médiane est plus petit que l'écart moyen.

Cluster	Gène	Code	Racines	Cotylédons	Rosette	Membrane	
Cluster I	HAK5	At4g13420	+ [1]	- [1]	- [1]	Plasmique [2]	
Cluster II	KUP1	At2g30070	I	I	I	Tonoplaste [3], Plasmique [4]	
	KUP3	At3g02050	I	I	I		
	KUP4	At4g23640	I	+	+		
	KUP2	At2g40540	I	+	I		Plasmique [5]
	KUP6	At1g70300	-	-	+		Plasmique [6]
	KUP8	At5g14880	I	I	+		
Cluster III	KUP9	At4g19960	I	I	I	Plasmique [5] Tonoplaste [3] Tonoplaste [3], Plasmique [7] Chloroplaste [8]	
	KUP10	At1g31120	-	-	I		
	KUP11	At2g35060	I	I	I		
	KUP5	At4g33530	+	+	+		
	KUP7	At5g09400	-	-	I		
	KUP12	At1g60160	I	I	I		

Références : [1] Ahn et al., 2004 ; [2] Qi et al., 2008 ; [3] Jaquinod et al., 2007 ; [4] Rigas et al., 2013 ; [5] Nühse et al., 2004 ; [6] Osakabe et al., 2013 ; [7] Han et al., 2016 ; [8] Kleffmann et al., 2004.

D'après les résultats de micropuces mis à disposition sur BAR, tous les *KUP/HAK/KT* sont exprimés à la fois dans les racines et dans les feuilles avec un niveau plus ou moins important (+/- dans le **Tableau I.1**). Globalement, les gènes *KUP6*, *KUP7* et *KUP10* sont peu exprimés dans les racines comparés à l'expression des autres *KUP*, aux stades précoces de développement. Nous avons traité l'expression de *HAK5* à part ici car elle est fortement dépendante des niveaux de potassium dans le milieu de croissance.

Les résultats présentés sur BAR divergent parfois des résultats publiés dans la littérature, notamment pour les localisations membranaires qui sont prédites par algorithme avec l'outil Cell eFP Browser de BAR. J'ai donc préféré me référer aux résultats issus de tests protéomiques ou avec utilisation de gènes rapporteurs présentés dans la littérature pour cette donnée au moins. La localisation des transporteurs *KUP/HAK/KT* sur différentes membranes serait reliée à la diversité des fonctions assurées par cette famille de transporteurs (Senn et al., 2001 ; Bañuelos et al., 2002 ; Ahn et al., 2004).

Comme pour le potassium, la distribution cellulaire du césium ne se limite pas au cytosol. L'analyse de cellules végétales après exposition révèle ainsi la présence de césium dans la vacuole et potentiellement dans les chloroplastes (Le Lay et al., 2006 ; Akamatsu et al., 2014). Des flux de césium seraient donc possibles à travers la membrane plasmique mais également à travers d'autres membranes intracellulaires. Reliée à la présence de transporteurs *KUP* sur la membrane de différents compartiments cellulaires, l'observation précédente suggère la possibilité de trouver des rôles pour

des KUP dans le transport de césium autre que l'absorption racinaire ou la translocation vers les parties aériennes.

### Architecture des protéines KUP/HAK/KT

Les relations structure-fonction sont plutôt bien connues pour la famille des canaux potassiques Shaker par exemple. L'obtention des cristaux de canaux potassiques bactériens (KcsA Doyle et al., 1998 ; KvAP Jiang et al., 2003) et de mammifères (Kv1.2 Long et al., 2005) a ainsi fourni une vision très détaillée du mécanisme de sélectivité du pore de ces canaux (voir dans Benito et al., 2014). En revanche, l'architecture des KUP/HAK/KT n'est toujours pas avérée mais est déduite de l'index d'hydropathie de leur séquence d'acides aminés. Les analyses structure-fonctions pour ces transporteurs sont donc peu nombreuses (Alemán et al., 2014).

Dans la littérature, on trouve des données sur l'architecture supposée des transporteurs KUP chez *A. thaliana* et la conservation de différents motifs. Sur 10 à 14 domaines transmembranaires (Gierth & Mäser, 2007), 11 sont très conservés chez les différents KUP (Gupta et al., 2008). Néanmoins, Véry et al. (2014) indiquent qu'il n'y a pas de structures clairement répétées dans la séquence d'acides aminés des différents KUP si bien qu'il est difficile de préjuger de la configuration de ces domaines transmembranaires dans la formation de pores par exemple.

Récemment, il a été montré qu'une seule mutation au niveau de l'acide aminé 130 Phénylalanine de HAK5 (mutation F130S) avait pour effet d'augmenter la sélectivité en faveur du  $K^+$  et contre le  $Cs^+$  en système hétérologue levure (Alemán et al., 2014). L'hypothèse avancée par les auteurs est que cet acide aminé et plus largement la séquence GEGGTFALY seraient impliqués dans la sélectivité du transporteur HAK5. Il est à noter que nous avons retrouvé ce motif chez tous les KUP d'*A. thaliana* à l'exception de KUP9, KUP10 et KUP11 (**Fig.I.10**). Les connaissances sur le sujet sont encore trop incomplètes pour suggérer que ces trois transporteurs aient des propriétés bien différentes des autres KUP mais cette observation soutient la division du Cluster III en deux groupes distincts comme décrit dans le paragraphe **Organisation phylogénétique**.

Il est tentant de supposer, en se basant sur la conservation du domaine décrit par Alemán et al. (2014) et sur la sélectivité K/Cs du transporteur HAK5 (Rubio et al., 2000), que potentiellement la majorité des transporteurs KUP ne sont pas discriminants envers le  $Cs^+$ . Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires afin de compléter les connaissances sur les résidus acides aminés impliqués dans la sélectivité des KUP/HAK/KT.

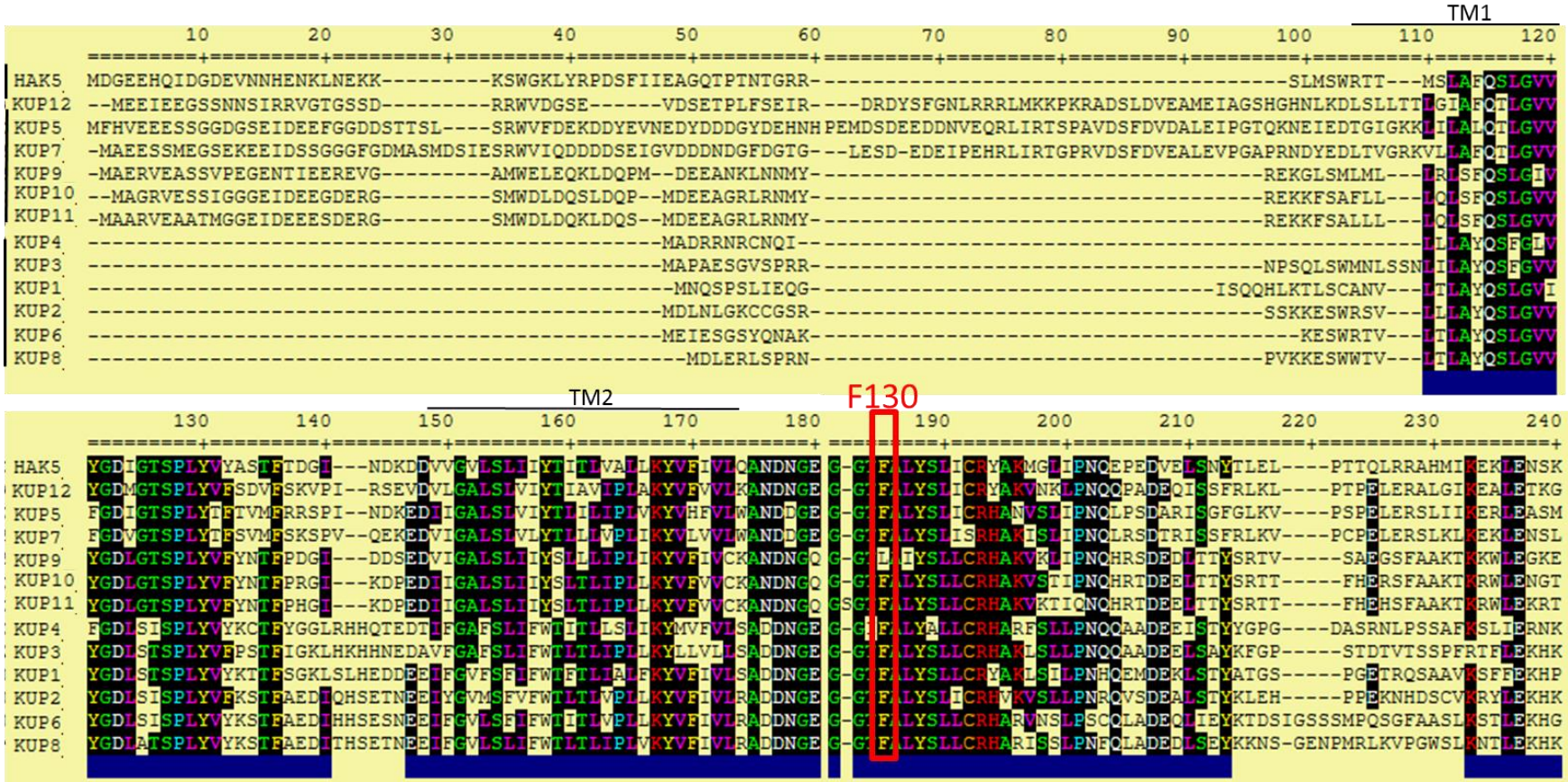


Figure I.11 : Alignement des séquences peptidiques des différents KUP/HAK/KT chez *A. thaliana*. Voir légende Fig. I.10 pour plus de précisions sur l’alignement. Seul le début de l’alignement est représenté ici. TM = domaine transmembranaire. F130 = Point de mutation étudié par Alemán et al. (2014).

## AUTRES PROTEINES

### I.5.7 - Autres protéines impliquées dans les flux de césium

Une étude récente, indique que ZIFL2 (pour Zinc-Induced Facilitator Like 2 appartenant à la super-famille des MFS pour Major Facilitator Superfamily) est impliqué dans le transport de  $K^+$  et de  $Cs^+$  chez *A. thaliana* (Remy et al., 2015). L'étude de lignées mutantes *Arabidopsis* indique qu'une invalidation ou une surexpression de ZIFL2 induit respectivement une hypersensibilité ou une diminution de la sensibilité au césium. Au vu des résultats présentés dans leur article, Remy et al. (2015) font l'hypothèse que, quand les concentrations en césium et en potassium sont élevées, ZIFL2 est impliqué dans l'efflux de  $K^+$  et de  $Cs^+$  dans l'apoplasme de l'endoderme et du péricycle limitant ainsi le chargement du xylème et l'accumulation de  $K^+$  et de  $Cs^+$  dans les feuilles. Comme cette étude se base sur la comparaison des effets toxiques du césium stable, les auteurs ont dû appliquer des niveaux (de l'ordre du mM) éloignés des concentrations enregistrées dans l'environnement.

Bien que cette protéine soit impliquée dans le développement des gamétophytes, Dräxl et al., (2013) ont trouvé un allèle mutant *sec22* qui n'affecte que les tissus végétatifs d'*A. thaliana* et qui s'accompagne d'une réduction significative de l'accumulation de césium dans la plante. Cette protéine SEC22 fait partie des SNARE, une super-famille impliquée dans la fusion des membranes et donc dans l'adressage des protéines et l'autophagie. En travaillant sur un orthologue de SEC22 chez la levure, les auteurs proposent l'hypothèse selon laquelle Sec22p serait impliquée dans l'adressage de transporteurs ou de protéines capables de moduler spécifiquement l'activité de transporteurs au niveau de la vacuole. La mutation de Sec22p aurait finalement pour effet d'altérer la séquestration des cations dans la vacuole. Cette découverte est particulièrement intéressante car les auteurs n'observent pas d'effets négatifs sur l'accumulation de potassium chez le mutant *A. thaliana sec22* et proposent donc une application potentielle à la phytoremédiation des sols contaminés en radiocésium avec une discrimination spécifique contre  $Cs^+$ .

### I.5.8- Bilan

Comme illustré dans la **Fig.I.12**, les flux de potassium *in-planta* et donc potentiellement de césium impliquent une diversité de protéines de transport.

En plus de jouer un rôle important dans l'absorption racinaire de  $K^+$ , les canaux Shaker sont impliqués dans sa distribution. Ainsi, la translocation du  $K^+$  de la racine vers les feuilles implique le chargement du xylème par le canal Shaker SKOR (Gaymard et al., 1998) et d'autres canaux à rectification sortante dont l'identité est encore inconnue (Ahmad & Maathuis, 2014) alors que sa recirculation via le phloème est assurée en partie par le canal AKT2/3 (Deeken et al., 2002). Le canal Shaker GORK, lui, est impliqué dans l'efflux de  $K^+$  (Demidchik, 2014). En ce qui concerne le canal dominant pour l'absorption racinaire de  $K^+$ , AKT1, il a été montré que sa participation dans l'absorption de  $Cs^+$  n'est pas significative (Broadley et al., 2001).

En parallèle des mouvements intercellulaires, les mouvements intracellulaires du  $K^+$  impliquent largement une compartimentation dans la vacuole (synthèse par Ahmad & Maathuis, 2014) via des transporteurs de la famille des KUP/HAK/KT (rôle supposé d'après les données de Jaquinod et al. 2007), des CHX et NHX (Bassil et al., 2012 ; Barragán et al., 2012) ou encore des TPK (Gobert et al.,



2007). Pour la plupart de ces protéines, les capacités à transporter les ions  $\text{Cs}^+$  ne sont pas encore démontrées.

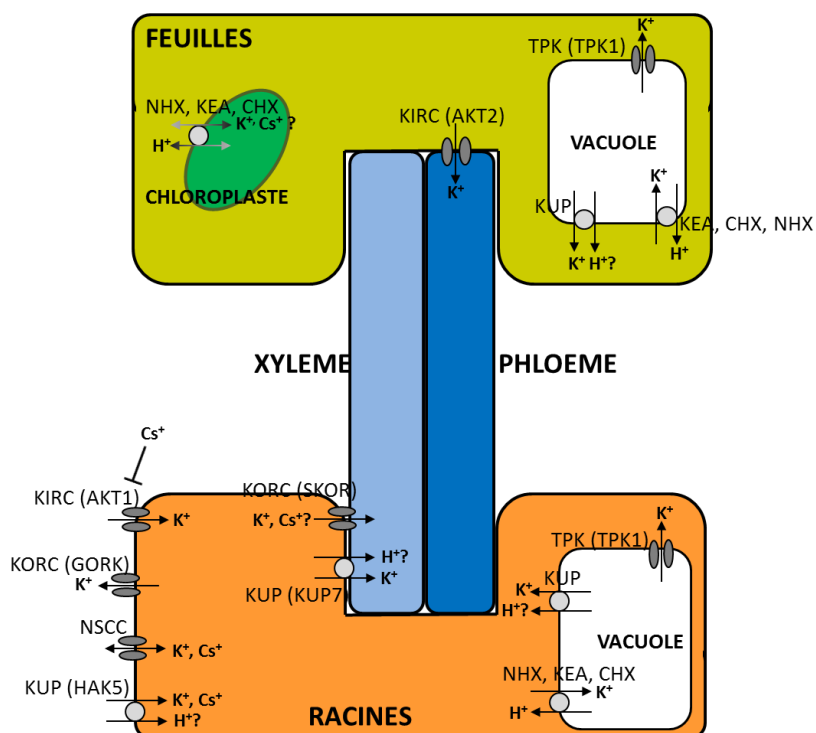


Figure I.12 : Transporteurs et canaux impliqués dans les flux de potassium et de césium chez *Arabidopsis thaliana* (supposés et avérés). D'après les synthèses de White & Karley (2010) et Ahmad & Maathuis (2014).

**PRESENTATION DES OBJECTIFS DE MA THESE ET DE LA  
METHODOLOGIE APPLIQUEE**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'identification et la compréhension des facteurs qui influencent l'accumulation de césium chez les plantes est un point clé dans la gestion des territoires contaminés. Dans ce contexte, mon travail de thèse a eu pour objectif général d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes de transport du césium chez *Arabidopsis thaliana*. Dans un premier axe, je me suis intéressée aux caractéristiques macroscopiques des flux de césium chez la plante modèle c'est-à-dire à la description de son absorption, son accumulation ainsi que sa distribution pour différentes conditions physiologiques. Par ailleurs, j'ai cherché à approfondir les connaissances sur le transport de césium d'un point de vue moléculaire en identifiant puis en caractérisant un transporteur impliqué dans les flux de césium et jusque-là très peu documenté.

Dans le but d'identifier les acteurs moléculaires du transport de césium chez la plante, j'ai été amenée à comparer différentes stratégies. Une d'entre elle est l'analyse QTL (*Quantitative Trait Loci*) qui a déjà été utilisée chez *A. thaliana* (Payne et al. 2004 ; Kanter et al., 2010). Cette méthode consiste à comparer le génome de plantes présentant des différences phénotypiques pour l'accumulation de césium afin de déterminer les loci qui ont un impact sur ce trait quantitatif complexe. Néanmoins, les différences d'absorption du césium entre plantes peuvent être liées à de nombreux paramètres physiologiques comme la demande de la plante en potassium, le degré de mycorrhization, les stratégies de croissance de la plante (taux de croissance racinaire, total...), l'architecture racinaire, le type de protéines de transport sur la membrane plasmique des cellules racinaires (Zhu & Smolders, 2000). En dehors de la diversité génétique, les multiples facteurs responsables des variations naturelles observées pour différentes lignées d'une même espèce peuvent donc compliquer la détection des gènes en question.

Ainsi pour identifier des gènes impliqués dans l'accumulation de césium, nous avons préféré nous intéresser à l'étude de lignées mutantes plutôt qu'à l'étude de la variation naturelle observée entre les différentes espèces végétales. Cette approche de génétique inverse a largement conditionné le choix du modèle d'étude qui s'est porté sur *Arabidopsis thaliana*. En effet, il existe des banques de mutants conséquentes (comme par exemple le NASC, Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Versailles ou encore GABI-Kat) pour cette espèce. De plus, *Arabidopsis* est largement utilisée dans différents domaines de la recherche en biologie ce qui facilite l'obtention de données par recherche bibliographique.

Comme expliqué dans l'analyse bibliographique, le transport du césium est lié (au moins en partie) à celui du macronutriment potassium. Nous avons donc choisi de rechercher les transporteurs impliqués dans les flux de césium au sein du système de transport potassique. Ce dernier incluant une centaine de gènes potentiels chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons été amenés à resserrer les travaux sur les candidats les plus prometteurs. Jusqu'ici des membres de la famille des canaux cationiques non sélectifs (NSCC) et HAK5, un transporteur haute-affinité de la famille des KUP/HAK/KT, ont été démontrés comme ayant un rôle significatif dans l'absorption de césium. Par ailleurs, KUP9 (un autre transporteur de la famille des KUP/HAK/KT) exprimé en système hétérologue bactérie démontre des capacités à transporter le césium. Les connaissances restent partielles et le rôle de KUP9 ainsi que celui des autres membres de la famille des KUP/HAK/KT par exemple n'avaient pas encore été testé *in planta* avant ma thèse. L'ensemble de ces résultats préliminaires m'ont finalement conduit à m'interroger plus en détail sur le rôle de cette famille dans les flux de

césium chez *A. thaliana* et à tester des lignées mutantes invalidées sur différents gènes *KUP/HAK/KT*.

Les méthodes utilisées pendant cette thèse incluent des techniques d'analyse radiologique (expériences avec traceurs et analyse en scintillation liquide  $\beta$ ), de génétique inverse (analyse de lignées mutantes, phénotypage sous différentes conditions physiologiques) et de biologie moléculaire (clonage, études de localisation, transcriptomique). Les résultats obtenus sont organisés en trois chapitres :

- (i) Dans le but de mieux comprendre les conséquences de l'analogie K/Cs sur le transfert de césium chez *A. thaliana*, nous avons mesuré l'absorption et la translocation de césium chez l'écotype sauvage Columbia 0 (Col-0) en conditions hydroponiques pour différents niveaux de compétition K/Cs. Dans ce chapitre, nous discutons des liens existants entre les cinétiques obtenues et les connaissances préliminaires présentées dans l'analyse bibliographique sur le transport de potassium et de césium chez *A. thaliana*.
- (ii) Nous avons utilisé une approche de génétique inverse afin d'identifier les membres de la famille *KUP/HAK/KT* qui ont un rôle significatif dans le transport de césium. Le principe consiste à comparer des mutants knock-out (invalidés au niveau de gènes codant pour des *KUP*) à l'écotype sauvage non muté. Les mutations des lignées obtenues du NASC ont d'abord été vérifiées puis nous présentons un crible qualitatif basés sur les effets toxiques du césium pour différentes lignées mutantes valides.
- (iii) Mise en évidence dans le crible qualitatif, l'hypersensibilité au césium des mutants *kup9* est quantifiée et reliée à une plus grande accumulation du césium dans le Chapitre V. Les connaissances sur la régulation et l'expression du gène *AtKUP9* était très partielles et son rôle dans l'accumulation de césium chez *A. thaliana* était encore inconnu. Des hypothèses sur les mécanismes impliquant le transporteur *AtKUP9* dans les flux de césium sont également présentées et évaluées.



## **CHAPITRE II**

### **MATERIEL ET METHODES**

## II.1-MATERIEL VEGETAL ET CULTURE

### II.1.1-Stérilisation des graines et culture in-vitro

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont stérilisées par deux lavages successifs avec un mélange 70% éthanol (96%) - 0,05% SDS (20%). Un dernier lavage à l'éthanol 96% est réalisé avant de les mettre à sécher sous hotte stérile.

Les graines sont semées en boîte de Pétri carrée 120mm\*120mm sur 60 mL d'un milieu MS ½ (dilution 1:2 du milieu de Murashige & Skoog, 2,2 g de poudre commerciale « MS ») contenant 1% m/v de sucrose, 1% m/v d'agar, 1,95 g de MES et au pH ajusté à 5,8 avec du N-méthyl-D-glucamine (NMDG).

Après 48h à 4°C dans l'obscurité afin de synchroniser la germination et de lever la dormance, les boîtes sont placées en position verticale dans une chambre de culture à 23°C, 50% HR, avec un cycle 8/16h jour/nuit pendant 7 jours.

### II.1.2-Itinéraire cultural avec traitement potassique

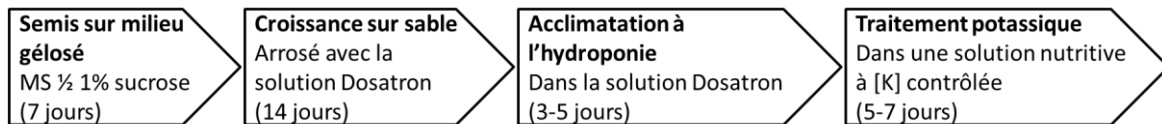


Figure II.1 : Itinéraire cultural des plantes.

L'itinéraire cultural suivi par les plantes est présenté dans la **Fig. II.1**. Les plantules âgées de 7 jours sont transférées sur du sable d'aquarium (Zoolux) et arrosées avec une solution nutritive utilisée en routine au laboratoire appelée Dosatron ( $\text{MgSO}_4$  1,1 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  805  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KNO}_3$  2 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  60  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  695  $\mu\text{M}$  et des micronutriments : Fe-EDTA 10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnSO}_4$  3,6  $\mu\text{M}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  74 nM,  $\text{ZnSO}_4$  3  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  9,25  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  785 nM, pH 5,8). Les plantes continuent leur croissance sur ce milieu pendant 14 jours.

Afin de les acclimater à la culture hydroponique, les plantes âgées de 21 jours sont d'abord placées dans 1L de la solution Dosatron pendant 3-5 jours. Le dispositif de culture hydroponique est illustré sur la **Fig. II.2**.



Figure II.2 : Dispositif de culture hydroponique. Entre 5 et 6 plantes peuvent être cultivées dans la même boîte de 1L. Les parois des boîtes sont opaques afin de limiter les perturbations que peut causer l'éclairage sur les racines. La solution est aérée et homogénéisée par bullage.

Le traitement potassique est ensuite appliqué, toujours en système hydroponique, en remplaçant la solution Dosatron par une solution nutritive à niveau de potassium contrôlé (0,75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,5 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 3,5 mM MES pH 5,8, micronutriments comme décrit pour la solution Dosatron, KCl 10/100 ou 3000  $\mu\text{M}$ , ajustement du pH à 5,8 avec NMDG). Ce traitement potassique est appliqué pendant 5 à 7 jours pour produire des plantes avec des statuts potassiques différents.

### II.1.3-Propagation des différentes lignées et obtention de nouvelles graines

Pour amener les plantes à la floraison et les porter à graines, la culture est réalisée sur terreau au phytotron OGM du CEA. Les plantes sont amenées jusqu'à ces stades pour différents objectifs : transformation des plantes pour la création de lignées transgéniques, maintien du stock de graines et normalisation de l'âge des graines pour l'expérimentation.

La croissance végétative est réalisée en jours courts (8 h de jour) pendant 4-5 semaines, puis les plantes sont transférées en jours longs (16 h de jour) pour favoriser leur floraison. Les conditions, en-dehors de la photopériode, sont sensiblement les mêmes en jours courts et en jours longs : 18-23°C, 55-60% HR, cycle d'arrosage solution nutritive/Eau/Eau/Eau.

Une fois que les fleurs sont formées, les plantes sont ensachées individuellement. Les graines sont récoltées après séchage des plantes pendant 14 jours (arrêt de l'arrosage seulement quand toutes les siliques sont formées).

## II.2-EXPOSITION AU CESIUM

Deux isotopes du césium ont été utilisés dans les différents tests dont les résultats sont présentés dans les Chapitres III et V. Pour les tests d'influx (exposition à court-terme) nous avons tracé l'absorption du  $^{133}\text{Cs}$  stable par du  $^{137}\text{Cs}$  radioactif. En revanche, pour les expositions plus longues et les tests nécessitant des manipulations fréquentes de la solution nutritive et des plantes nous avons préféré utiliser uniquement du Cs stable (sous forme de CsCl).

A ce jour, aucune discrimination isotopique n'a été décrite concernant l'absorption de césium par les végétaux : nous avons considéré pour nos expériences que le  $^{137}\text{Cs}$  et le Cs stable sont absorbés de la même façon.

### II.2.1-Cinétique d'influx du césium tracé avec du $^{137}\text{Cs}$

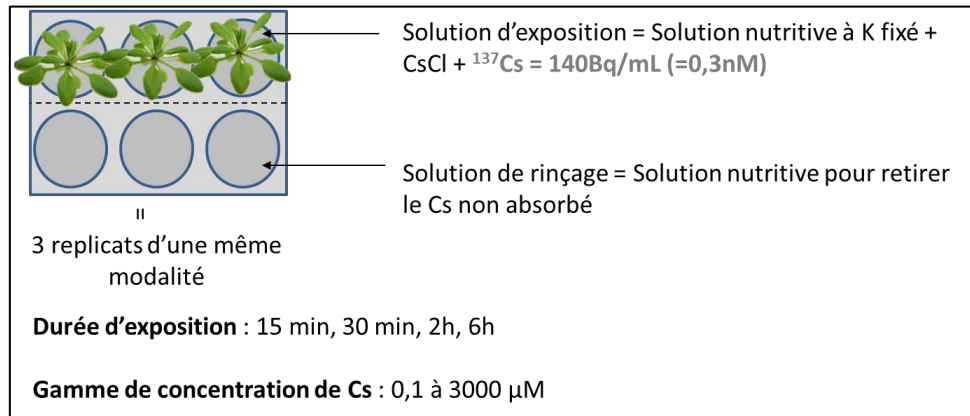
Les plantes utilisées sont pré-cultivées selon l'itinéraire décrit précédemment (**Fig. II.1**) avec un traitement potassique à 10, 100 ou 3000  $\mu\text{M}$ . Ce niveau de potassium est conservé pendant l'exposition au césium afin d'éliminer des effets potentiels d'un changement de composition du milieu - autres que ceux liés à la présence de césium - sur la physiologie des plantes testées.

La solution d'exposition est donc composée de la solution nutritive utilisée pour le traitement potassique à laquelle est ajoutée du Cs stable dans une gamme allant de 0,1 à 3000  $\mu\text{M}$  tracé par environ 140  $\text{Bq}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $^{137}\text{Cs}$  (0,3 nM). Le  $^{137}\text{Cs}$  est ajouté à partir d'une source du laboratoire diluée dans du HCl 0,1 M (CERCA-72652).

Les plantes sont exposées séparément dans des puits contenant 8 mL de solution d'exposition (**Fig. II.3**). Seules les racines sont en contact avec cette solution d'exposition. Après 15 min à 6 h



d'exposition, le césium adsorbé sur les racines est éliminé par rinçage dans 8 mL de solution nutritive (ne contenant pas de césium) pendant 1min.



**Figure II.3 : Dispositif d'exposition des plantes au césium tracé par du  $^{137}\text{Cs}$ .** Pour chacune des conditions (K, Cs et durée d'exposition), l'expérience a été répétée au moins deux fois sur un minimum de trois plantes à chaque fois.

Les plantes sont minéralisées à chaud dans des tubes en verre de 20 mL avant dosage des éléments. Sur bain de sable chauffant (environ 100-150 °C), les racines et les feuilles sont digérées dans 5-6 mL de  $\text{HNO}_3$  65%. Après dissolution des tissus végétaux dans l'acide, 1,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% est ajouté. Les échantillons sont évaporés à sec puis repris dans 1 mL de  $\text{HNO}_3$  2% v/v.

L'activité du  $^{137}\text{Cs}$  accumulé dans les plantes est mesurée par scintillation liquide (Wallac, Quantulus). Les minéralisats sont alors placés dans un liquide scintillant Insta-Gel Plus (Perkin Elmer). La lumière issue de l'interaction entre ce milieu et les particules  $\beta$  émises par la désintégration du  $^{137}\text{Cs}$  est mesurée pendant 30 min par échantillon. La quantité de Cs stable accumulée dans l'échantillon est déduite du ratio  $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$  choisi dans la solution d'exposition.

Le contenu en potassium des plantes à l'issue du pré-traitement potassique est dosé par ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique, OPTIMA 4300 DV, puis OPTIMA 8300, Perkin Elmer, limite de quantification 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) sur un minimum de 3 individus non exposés représentatifs de chaque lot testé.

### II.2.2 – Accumulation du césium stable ( $^{133}\text{Cs}$ )

Comme expliqué plus haut, pour ces tests nécessitant de grands volumes de solution d'exposition et des manipulations fréquentes nous avons préféré utiliser uniquement du Cs stable.

À l'issue de la pré-culture avec le traitement potassique, les plantes sont transférées dans 1L de solution d'exposition (avec 3 à 4 plantes exposées dans la même boîte). La solution d'exposition est composée de la même solution nutritive que celle utilisée pour le traitement potassique (10, 100 ou 3000  $\mu\text{M}$ ) à laquelle est ajouté 1  $\mu\text{M}$  de CsCl. L'exposition dure 7 jours avec deux renouvellements de la solution pour maintenir les concentrations en potassium et en césium proches des concentrations initiales et éviter les écarts entre les différentes boîtes.

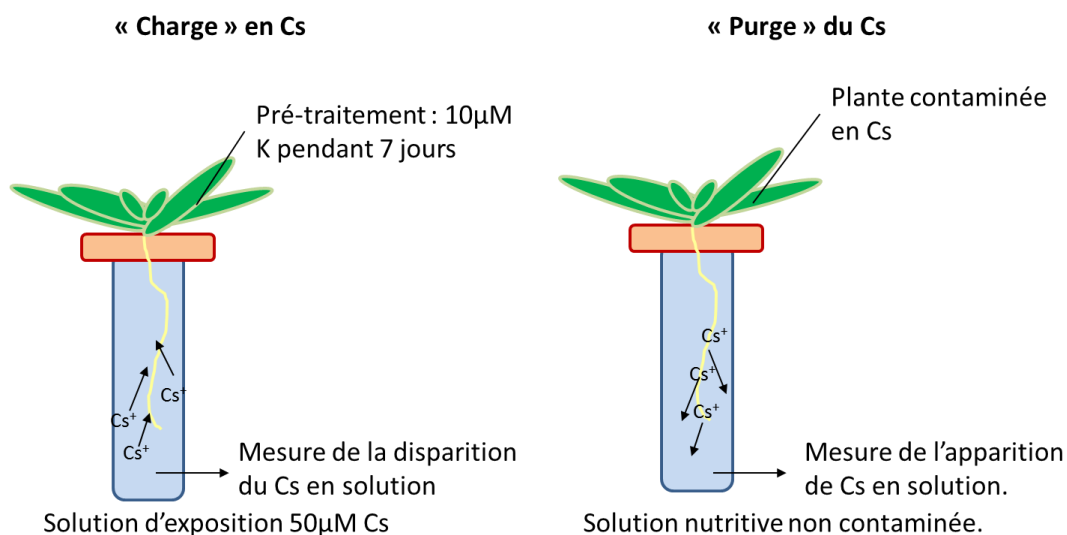
Après minéralisation des tissus végétaux, les contenus en potassium et en césium des plantes testées sont mesurés respectivement par ICP-AES et par ICP-MS (spectrométrie de masse, PQ Excell Thermo Electron avec S-Option, limite de détection 5  $\text{ng.L}^{-1}$ ). Les minéralisats évaporés à sec ont été repris et dilués dans  $\text{HNO}_3$  2% v/v pour ajuster les concentrations aux gammes de détection optimales par les

appareils de mesure. Les niveaux de potassium et de césium dans les solutions d'exposition ont également été suivis par les mêmes techniques.

### II.2.3 – Cinétiques de déplétion et d'efflux du $^{133}\text{Cs}$

L'objectif étant d'évaluer l'efflux de césium par des plantes contaminées, la première étape de cette expérience consiste à « charger » les plantes en césium. Pour cela, les plantes sont cultivées comme décrit précédemment pendant 35-39 jours dont 7 jours dans une solution nutritive à  $10\ \mu\text{M}$  de potassium pour favoriser l'absorption de césium par la suite. Les plantes sont ensuite transférées dans 20 mL d'une solution d'exposition (sous agitation) contenant  $50\ \mu\text{M}$  de Cs et  $0\ \mu\text{M}$  de K pendant 24 h (**Fig. II.4**).

La deuxième étape consiste à mesurer l'efflux de césium de ces plantes contaminées vers le milieu extérieur. Pour cela, les plantes contaminées en césium sont transférées dans 20 mL d'une solution nutritive contenant  $10\ \mu\text{M}$  K et  $0\ \mu\text{M}$  Cs pour mesurer la réapparition du césium en solution. A différents temps, et pendant 24h, 100  $\mu\text{L}$  de solution sont prélevés et la concentration en césium est suivie par ICP-MS.



**Figure II.4 : Dispositif appliqué pour l'évaluation de l'efflux de césium des plantes contaminées vers la solution extérieure.** La première étape consiste à « charger » les plantes en césium pendant 24h. Dans la deuxième étape, les plantes sont transférées dans une solution ne contenant pas de césium pour mesurer son relargage de la plante vers le milieu extérieur.

### II.3 – VÉRIFICATION DES LIGNÉES MUTANTES PAR INSERTION D'ADN-T

Les lignées mutantes utilisées dans cette thèse proviennent des banques SAIL (Syngenta Arabidopsis Insertion Library) et SALK construites par insertion d'ADN-Transfert (ADN-T) via *Agrobacterium tumefaciens* dans les fonds génétiques Columbia et stockées par le NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center). Dans la grande majorité des cas, l'insertion de cet ADN-T (**Fig. II.5**) dans une région codante a pour effet de supprimer la fonction du gène invalidé (Wang, 2008).



**Figure II.5 : Organisation général de l'ADN-T inséré dans le génome des lignées mutantes.**

L'ADN-T est encadré par des séquences appelées Right Border (RB) et Left Border (LB) dans lesquelles sont dessinées les amorces utilisées par la suite pour la vérification des lignées mutantes. Un gène de sélection, ici codant pour la résistance à un antibiotique toxique pour les plantes (kanamycine) ou à un herbicide (phosphinotricine), permet de cribler les plantes ayant réellement intégré l'ADN-T.

La collection de mutants SALK a été réalisée par transformation de l'écotype sauvage Col-0 (CS60000) avec le vecteur pBIN-pROK2 (Alonso et al., 2003). Ce vecteur de transformation portant un gène de résistance à la kanamycine, la discrimination entre plantes transformées ou non repose donc sur ce marqueur de résistance. Néanmoins, après plusieurs générations, une lignée mutante peut ne plus exprimer de résistance à la kanamycine.

Pour la collection de mutants SAIL, deux ADN-T différents ont été utilisés. Ces deux ADN-T ont le même Left Border mais des Right Borders différents :

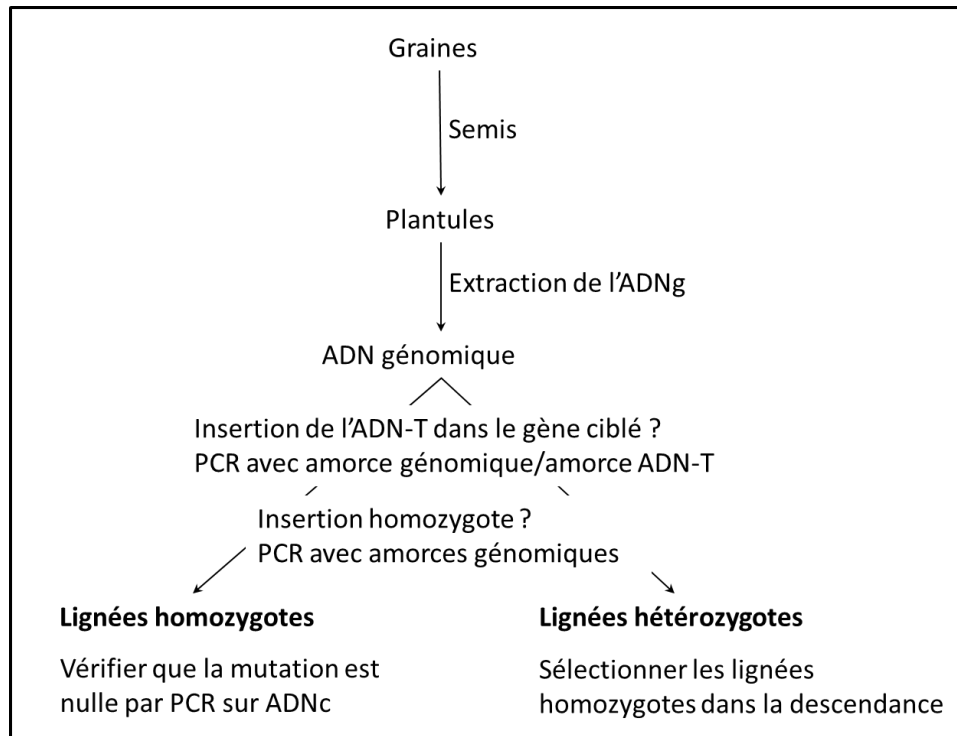
- Pour les lignées numérotées entre 1- 456, 1052-1057 et 1142-1205 c'est l'écotype Col-3 qui a été transformé avec le vecteur pCSA110 (Preuss et al., 1994 ; McElver et al., 2001). Les amorces spécifiques du *Right Border* de ce vecteur sont nommées QRB1, QRB2 et QRB3.
- Pour les lignées numérotées entre 500-918, 1206-1307 c'est l'écotype Col-0 qui a été transformé avec le vecteur pDAP101 (McElver et al., 2001). Les amorces spécifiques du *Right Border* de ce vecteur sont nommées RB1, RB2 et RB3.

Le marqueur de sélection des mutants de la collection SAIL est la résistance au BASTA ou phosphinotricine, et ce pour les deux vecteurs de transformation utilisés.

Les lignées mutantes doivent être vérifiées avant utilisation car l'insertion de l'ADN-T n'est pas toujours stable dans le génome, certaines lignées peuvent avoir perdu la mutation ou n'être qu'hétérozygotes. En collaboration avec Ludovic MARTIN, post-doctorant au CEA, les lignées mutantes *kup* ont donc été vérifiées avant d'être criblées sur leur sensibilité au césium. Le protocole de vérification suivi est résumé dans la **Fig. II.6**.

Une lignée mutante est considérée comme valide si :

- L'ADN-T est bien inséré dans le gène *KUP* ciblé,
- La lignée est homozygote pour la mutation : l'ADN-T doit être inséré sur les deux loci du gène *KUP* ciblé,
- La mutation est bien nulle : il n'y a pas de synthèse du transporteur codé par le gène invalidé.



**Figure II.6 : Protocole pour la vérification des lignées mutantes par insertion d'ADN-T des banques SALK et SAIL.** D'après le protocole « Screening SALK T-DNA mutagenesis lines », University of Wisconsin – Madison Knockout Facility et Ohio State University – Arabidopsis Biological Resource Center.

### II.3.1-Extraction de l'ADN génomique

L'ADNg des lignées mutantes est extrait à partir de deux jeunes feuilles de plantules âgées d'environ 3 semaines. Après broyage dans l'azote liquide, 250  $\mu\text{L}$  de tampon d'extraction est ajouté aux échantillons (50 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 0,2 mM EDTA pH8, 0,5 % SDS20%, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Protéinase K DNase-free). L'ADNg est isolé en phase aqueuse par centrifugation après ajout de 250  $\mu\text{L}$  de phénol-chloroforme-alcool isoamylique puis précipité à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 1h dans 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol 100% et 10  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium (3 M, pH 5). Le précipité est recueilli par centrifugation et lavé avec 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70% avant d'être repris dans  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ autoclavée. Les ADN ont été dosés au Nanodrop avant d'être stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### II.3.2-Extraction de l'ARN et rétrotranscription

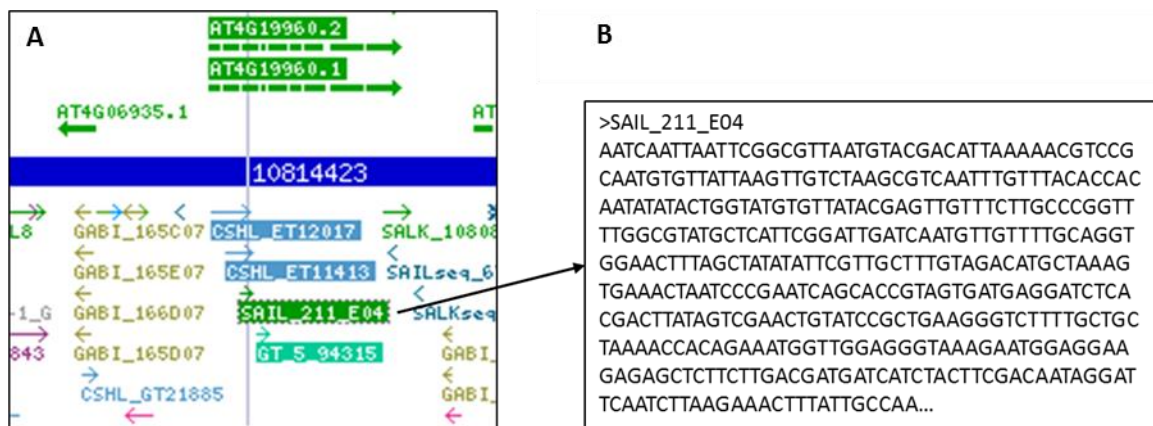
L'ARN total des lignées mutantes *kup* (et d'un témoin Col-0) a été extrait en suivant le protocole pour les tissus végétaux fourni avec le kit RNeasy (QIAGEN). Les plantes utilisées sont âgées d'une dizaine de jours et proviennent d'une culture *in vitro* pour prélever à la fois les feuilles et les racines.

La rétrotranscription de tous les ARNm a ensuite été réalisée avec le kit Superscript III (Invitrogen) sur 1  $\mu\text{g}$  d'ARN total en utilisant les Oligo(dT)<sub>20</sub> fournis. Pour les PCR, c'est une dilution au 1 :20<sup>ème</sup> ou 1 :40<sup>ème</sup> des ADNc synthétisés qui a été utilisée.

### II.3.3-Design d'amorces pour la vérification des lignées mutantes

Trois amorces sont nécessaires pour déterminer si l'ADN-T est inséré sur les deux loci chromosomiques du gène muté : une amorce dessinée dans un des *borders* de l'ADN-T (appelé amorce ADN-T) et deux amorces dessinées dans les régions de l'ADNg qui encadrent l'ADN-T (appelées amorces génomiques). Les amorces ADN-T existent déjà sous le nom de Lbb1.3 pour les lignées SALK et LB1, LB2 ou LB3 par exemple pour les lignées SAIL. En revanche, les amorces génomiques doivent être dessinées par l'utilisateur.

Le design des amorces et leur combinaison dans les réactions de PCR nécessite de connaître la localisation et le sens d'insertion de l'ADN-T dans l'ADNg. Ces informations sont disponibles en ligne sur le site Internet SIGnAL, comme illustré dans la **Fig.II.7**, avec l'outil « Arabidopsis Gene Mapping » (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).



**Figure II.7 : Recherche d'informations sur le site de SIGnAL.** A- Orientation de l'ADN-T dans le gène *KUP9* chez la lignée mutante *Sail\_211\_E04* (*kup9-1*). B- Séquence génomique voisine (séquence flanquante) de l'ADN-T chez la lignée mutante *kup9-1*.

Avec l'outil « Arabidopsis Gene Mapping », une flèche au-dessus du nom de la lignée mutante indique l'orientation de l'ADN-T dans le chromosome (**Fig. II.7.A**). Le site d'insertion de l'ADN-T dans le gène invalidé est également renseigné avec la séquence flanquante génomique (**Fig. II.7.B**) située en amont ou en aval de l'ADN-T (selon l'orientation de l'insert). Cette séquence est déterminée par séquençage après amplification de la région ADNg de la plante avec l'amorce Lbb1, spécifique du *Left Border* de l'ADN-T :

- si l'ADN-T est inséré dans le sens du gène, alors la séquence au niveau de l'insert est 5' « RB ADN-T LB » Région flanquante séquencée 3'
- si l'ADN-T est inséré dans le sens opposé au gène alors la séquence au niveau de l'insert est 5' Région flanquante séquencée « RB ADN-T LB » 3'

Du fait des incertitudes du séquençage (chevauchement de séquences, incertitudes sur le nucléotide séquencé), la localisation de l'ADN-T n'est pas exacte : la distance entre la séquence flanquante et le site d'insertion réel de l'ADN-T varie entre 0 à 300 pb. Les amorces génomiques sont donc dessinées en dehors de cette zone d'incertitude en respectant les critères suivant :

- Le nucléotide situé en 3' de l'amorce est une cytosine ou une guanine (liaison forte),

- La proportion d'adénine + thymine doivent être équivalente à la proportion de cytosine + guanine,
- La taille de l'amorce est comprise entre 25 et 30 nucléotides,
- La température de fusion ( $T_m$ ) est d'environ 60°C (même  $T_m$  pour toutes les amorces pour limiter les différences de conditions de PCR),
- Le risque d'homo- hétérodimères entre amorces doit être faible (l'énergie nécessaire à les désapparier doit être inférieure à 10 kcal.mole<sup>-1</sup>).

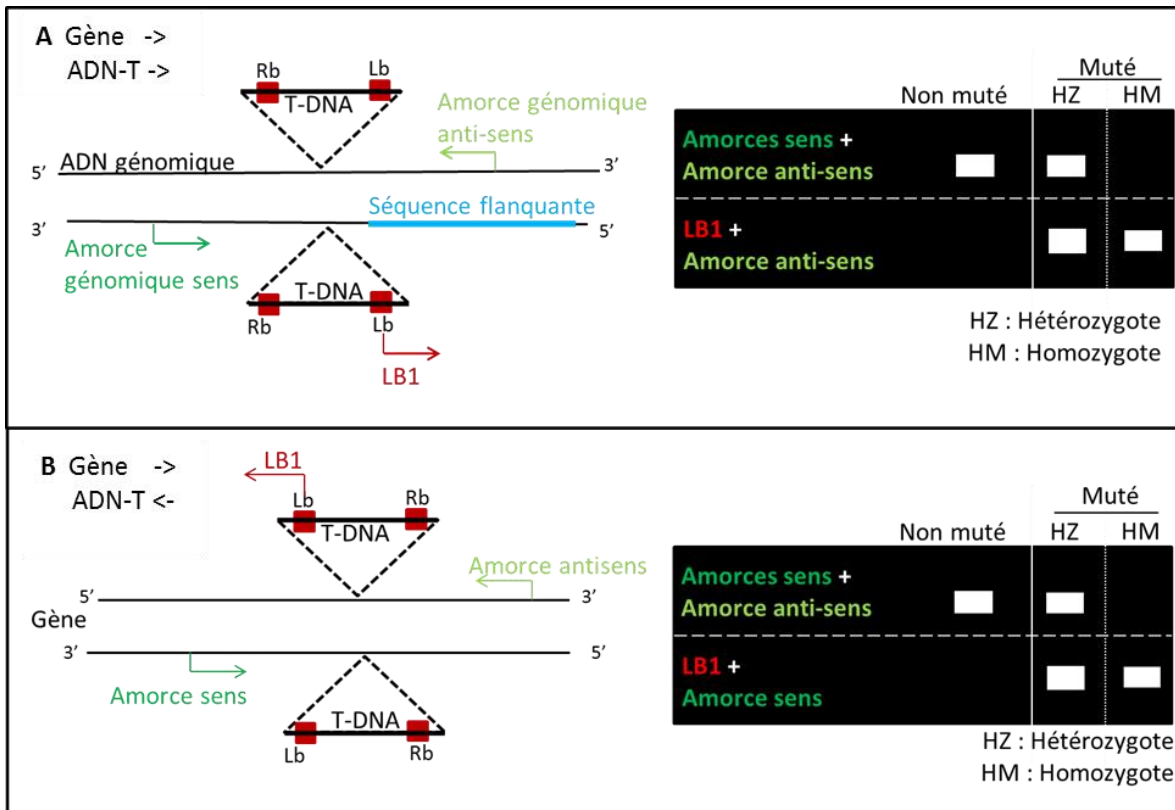
Ces critères ont été vérifiés grâce à l'outil OligoAnalyzer disponible en ligne sur le site d'IDT (Integrated DNA Technologies, <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). La liste des amorces utilisées pour la vérification des lignées de mutants *kup* (résultats décrits dans le Chapitre IV) est présentée en Annexe-1.

Encore inexistant au moment des travaux présentés ici, l'outil iSect Primers maintenant disponible sur le site Internet SIGnAL permet de dessiner les amorces génomiques en entrant le code SALK ou SAIL du mutant d'intérêt. Cet outil prend en compte l'orientation de l'ADN-T dans le gène muté : il suffit alors de combiner l'amorce notée RP (pour Right Primer) dessinée dans la région génomique placée en 3' de l'insert ADN-T avec l'amorce LB du *Left Border* de l'ADN-T. Le design des amorces est donc simplifié par cet outil.

#### II.3.4-Conditions de PCR

Les PCR ont été réalisées dans 10 µL réactionnel sur 50 ng d'ADNg. Chaque réaction contient 200 µM de dNTP, 1 µM de chacune des deux amorces, du tampon PCR (Taq DNA Polymerase Buffer, ThermoFisher) et environ 1 unité d'une Taq produite au LBDP. Le programme appliqué est le suivant : 10 min à 94°C, 35-40 cycles à 94°C pendant 30 sec, 52-55°C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min, et enfin 10 min à 72°C pour l'extension finale. Les produits PCR sont vérifiés par électrophorèse sur gel à 2% d'agarose et 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> de BET (Bromure d'Ethidium)

La combinaison des amorces pour vérifier l'insertion de l'ADN-T dans le gène *KUP* d'une part et vérifier l'homozygotie de la mutation d'autre part est expliquée dans la **Fig. II.8**.



**Figure II.8 : Méthode PCR pour la détection de l'ADN-T chez les lignées mutantes.** D'après le protocole décrit sur le site de SIGnAL. Le sens d'insertion de l'ADN-T dans le gène détermine les combinaisons entre amorces. A- Cas où l'ADN-T est inséré dans le sens du gène invalidé. B- Cas où l'ADN-T est inséré dans le sens opposé au gène invalidé.

Les lignées qui ont perdu la mutation se comportent comme l'écotype sauvage non muté : une PCR avec le couple d'amorces génomique donne un fragment amplifié dont la taille correspond à celle du fragment obtenu sur l'écotype sauvage non muté. Comme l'ADN-T n'est pas présent, rien n'est amplifié en combinant l'amorce placée dans l'ADN-T avec l'amorce génomique.

Au contraire, une PCR avec le couple amorce génomique/amorce ADN-T produit un fragment amplifié pour les lignées mutantes. Si la lignée est hétérozygote pour la mutation alors une PCR avec le couple d'amorces génomiques produit également un fragment amplifié de même taille que pour l'écotype sauvage non muté.

## II.4 – ANALYSE PHENOTYPIQUE DES LIGNEES MUTANTES

### II.4.1 – Crible de toxicité du césium en milieu liquide et dosage de la chlorophylle

Afin d'identifier des candidats *KUP* potentiellement impliqués dans le transport de césium, nous avons criblé les lignées mutantes sur leur sensibilité aux effets toxiques du Cs<sup>+</sup> stable.

Entre 15 et 25 graines stérilisées sont semées dans 2 mL de solution nutritive à K 10, 100 ou 1000 µM dans des plaques 12 puits. Après 48 h à 4°C pour vernalisation et synchronisation de la germination, 1 mL de solution nutritive contenant différentes concentrations en CsCl est ajouté dans les puits. Les

graines sont alors transférées en chambre de culture (jours courts) pendant 7-10 jours avant observation. Les solutions utilisées contiennent :

- K 10  $\mu\text{M}$  : 0, 10 ou 100  $\mu\text{M}$  de Cs,
- K 100  $\mu\text{M}$  : 0, 100, 300  $\mu\text{M}$  de Cs,
- K 3000  $\mu\text{M}$  : 0, 300, 500  $\mu\text{M}$  de Cs.

Ayant observé des phénotypes différents entre certaines lignées mutantes et l'écotype sauvage, les effets toxiques du césium en milieu liquide ont ensuite été quantifiés par dosage de la chlorophylle totale. Afin d'obtenir suffisamment de matériel végétal pour l'extraction de la chlorophylle, le protocole décrit plus haut a été adapté par l'équipe pendant un stage de Master 2 se déroulant en parallèle de ma thèse à l'IRSN. Les plantules sont pré-cultivées pendant 7 jours sur MS ½ agar avant d'être transférées pendant 7 autres jours dans des puits individuels contenant 300  $\mu\text{L}$  de solution d'exposition composé de césium. Les parties aériennes de chaque lignée sont prélevées et regroupées pour obtenir 300 mg de masse fraîche (24 à 42 plantes). Les feuilles sont d'abord réduites en poudre par broyage à l'aide d'un pilon en présence d'azote liquide avant d'être transférées dans 500  $\mu\text{L}$  d'acétone 80%. Après centrifugation (4°C, 15 min à 3000 rpm), l'absorbance du surnageant est mesuré à deux longueurs d'onde différentes (663 nm et 645 nm). La chlorophylle totale est finalement calculée à partir de l'équation suivante :

$$Chl_{ab} = \frac{(8,02 \times A_{663} + 20,20 \times A_{645}) \times V \times m}{1000}$$

Avec  $Chl_{ab}$  : concentration en chlorophylle totale ( $\text{mg.g}^{-1}$  MF),  
 $V$  : volume d'acétone (mL),  
 $m$  : masse fraîche (g).

#### II.4.2 – Test d'élongation racinaire sur milieu gélosé en fonction de la nutrition potassique et en présence de césium

Les graines stérilisées de Col-0 et des lignées de mutants homozygotes sont semées sur un milieu MS½ 1% sucrose 1% agar. Après 48h à 4°C puis 4 jours en chambre de culture, les plantules sont transférées en conditions stériles sur un milieu nutritif 1% agar contenant du CsCl (gamme de 0 à 500  $\mu\text{M}$ ) et différents niveaux de potassium (10, 100 ou 1000  $\mu\text{M}$ ). L'élongation racinaire est mesurée après 7 jours sur le milieu contenant du césium avec le logiciel public ImageJ (v 1.48, NIH, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Nous avons contrôlé les concentrations en potassium et en césium dans le milieu gélosé utilisé par ICP-AES et ICP-MS après minéralisation du milieu dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour les végétaux.

#### II.4.3 – Evaluation des capacités d'absorption du potassium

Les plantes sont cultivées comme décrit précédemment pendant 35-39 jours dont 7 jours dans une solution nutritive à 10  $\mu\text{M}$  de potassium.

Les capacités d'absorption du potassium des mutants *kup9* ont été évaluées par mesure de l'accumulation d'un de ses analogues, le rubidium (Rb). Le protocole suivi et une adaptation de celui



décrit dans Rubio et al. (2010) : les plantes sont transférées dans 20 mL d'une solution nutritive contenant 0  $\mu$ M K et 50  $\mu$ M de RbCl (seules les racines sont en contact avec cette solution). Toutes les heures, pendant 5 à 7 h, 100  $\mu$ L de cette solution sont prélevés afin de suivre par ICP-MS la déplétion du Rb dans le milieu due à l'absorption racinaire. La matière fraîche, la matière sèche et les concentrations en Rb dans les tissus végétaux (après minéralisation) à la fin du test sont également enregistrées.

## II.5- QUANTIFICATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES GENES *KUP* PAR QRT-PCR

### II.5.1-Matériel végétal et synthèse d'ADNc

L'ARN total des lignées mutantes *kup9-1* et *kup9-2* et de l'écotype sauvage Col-0 a été extrait en suivant le protocole pour les tissus végétaux fourni avec le kit RNeasy (QIAGEN) sur des plantes âgées d'une trentaine de jours et cultivées comme décrit précédemment dont 7 jours de traitement potassique à 10, 100 ou 3000  $\mu$ M. La rétrotranscription de tous les ARNm a ensuite été réalisée avec le kit SuperScript® Vilo™ sur 1  $\mu$ g d'ARN total dans un volume total de 20  $\mu$ L.

### II.5.2-Réactions de PCR quantitatives

Les qRT-PCR ont été réalisées en utilisant le gène *ROC3* pour la normalisation de l'expression des gènes, comme appliqué en routine au laboratoire. Les amorces, dessinées et déjà testées par l'équipe du CEA, ont pu être réutilisées pendant ma thèse (**Tableau II.1**).

**Tableau II.1 : Amorces utilisées pour les PCR quantitatives.**

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>ROC3</i> (gène de référence)	TCGGTGAAAGCTTGATCCTT	ATCGTGATGGAGCTTTACGC
<i>HAK5</i>	ATCTAATGGGAGAGACCGAG	AACTCATAGGTCATGCCAAC
<i>KUP9</i>	AGAGGAGGAGGAGACGGATGAG	GCCCTACAAATCTTAGCAAG

Les réactions ont été réalisées en micro-plaque 384 puits dans un Light Cycler 480 (Roche). Chaque réaction d'un volume total de 5  $\mu$ L contient : 2,5  $\mu$ L de Sybr Green Master Mix 2X (intercalant de l'ADN double-brin utilisé pour suivre l'amplification des fragments ciblés par fluorescence), 2  $\mu$ L d'ADNc dilué au 1 :20<sup>ème</sup> v/v et 500 nM de chacune des amorces d'un couple. Le programme appliqué est le suivant : 10 min à 95°C, 45 cycles à 95°C pendant 10 sec, 60°C pendant 10 sec et 72°C pendant 10 sec. Les cycles d'amplification sont suivis d'une étape nécessaire à la réalisation de la courbe de fusion/dissociation : 30 sec à 95°C, 30 sec à 40°C, augmentation rapide de la température de 40°C à 65°C puis augmentation lente de 65°C à 95°C (avec 5 mesures par degré). La réaction est finalement refroidie pendant 2 sec à 37°C.

Des gammes de dilution ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de la PCR quantitative avec chacun des couples d'amorces utilisés. Quatre points ont ainsi été mesurés avec des dilutions en cascade (1, 1/5, 1/125, 1/625) de l'ensemble des échantillons d'une même expérience.

### II.5.3-Analyses

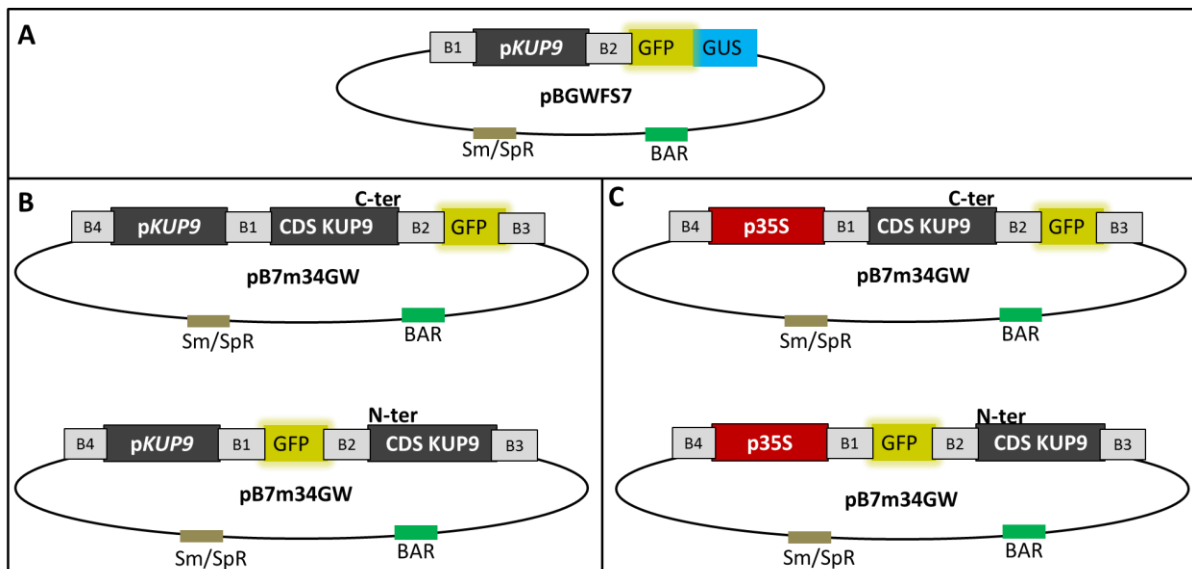
Chaque réaction contient l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN de 3 plantes distinctes et provenant

d'une même expérience (feuilles et racines traitées séparément) et est réalisée en triplicat technique sur la même plaque. Chaque expérience (traitement K10/100 ou 3000  $\mu$ M appliqué aux lignées mutantes *kup9* et à l'écotype sauvage Col-0) a été répétée au moins deux fois.

## II.6- CLONAGE

Le gène rapporteur codant pour GUS a été mis sous contrôle de la séquence promotrice du gène *KUP9* afin de localiser les tissus où celle-ci est active. Nous avons également tenté de localiser la protéine *KUP9* en fusionnant la séquence codante pour le transporteur avec le gène rapporteur codant pour la GFP.

Pour cela nous avons créé des lignées transgéniques exprimant les constructions décrites en **Fig. II.9**.



**Figure II.9 : Constructions réalisées pour l'étude du gène *KUP9*.** A- Construction pour l'étude du schéma transcriptionnel du gène *KUP9*. Les gènes rapporteurs codant pour la  $\beta$ -glucuronidase (GUS) et la « Green Fluorescent Protein » (GFP) sont placés sous le contrôle de la séquence promotrice du gène *KUP9* (*pKUP9*). B et C- Constructions pour la localisation du transporteur *KUP9*. La séquence codante pour *KUP9* (CDS *KUP9*) est fusionnée avec le gène codant pour la GFP. La séquence codante pour cette protéine de fusion est placée sous le contrôle du promoteur du gène *KUP9* ou du promoteur de la sous-unité ribosomale 35S afin de sur-exprimer et donc d'amplifier le signal de la GFP.

### II.6.1-Obtention des séquences à cloner

Les séquences clonées concernent le promoteur et la séquence codante du gène *KUP9* (At4g19960). Pour le clonage du promoteur, nous avons ciblé la séquence prédite par AGRIS AtCis (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>) comme étant la séquence promotrice du gène *KUP9*.

### Amplification des séquences d'intérêt par PCR

Le couple d'amorces utilisé pour l'amplification du promoteur de *KUP9* cible les 2745 pb situées en

amont du codon start du gène *KUP9* (At4g19960), dont 30 pb appartenant à la région 3'-UTR du gène At4g19950. Les 7 nucléotides précédant immédiatement le codon start de *KUP9* ne sont pas inclus dans cette séquence ciblée par le couple d'amorces p*KUP9*-F1c et p*KUP9*-R1b. Par la suite, ces 7 nucléotides sont réintégrés à la séquence clonée dans les vecteurs de destination du système Gateway® par amplification avec des amorces contenant la séquence manquante. Nous n'avons pas directement amplifié la séquence contenant les 7 nucléotides qui précèdent le codon start car les différentes amorces dessinées dans ce cas ne produisaient pas de bons rendements de produits PCR.

Pour l'amplification de la séquence codante du gène *KUP9* (appelé CDS pour Coding DNA Sequence), nous avons travaillé sur l'ADNc de Col-0 obtenu par rétrotranscription de 1 µg d'ARN avec le kit SuperScript III. La séquence codante correspond au variant d'épissage référencé sous le nom At4g19960.2 sur TAIR.

Différentes conditions de PCR ont été testées avant de garder celles présentées ci-après. La PCR est réalisée dans 25 µL réactionnel sur 250 ng d'ADNg pour amplification du promoteur et sur 2 µL d'ADNc de Col-0 dilué au 1 :20<sup>ème</sup> pour amplification de la séquence codante du gène *KUP9*. Chaque réaction contient 200 µM de dNTP, 1 µM de chacune des amorces, 0,5 unité de Taq haute-fidélité (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase) et du tampon (5X Phusion® HF Buffer). Le programme appliqué est le suivant : 30 sec à 98°C, 30-35 cycles à 98°C pendant 10 sec, 55°C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min 30 sec, et enfin 10 min à 72°C pour l'extension finale.

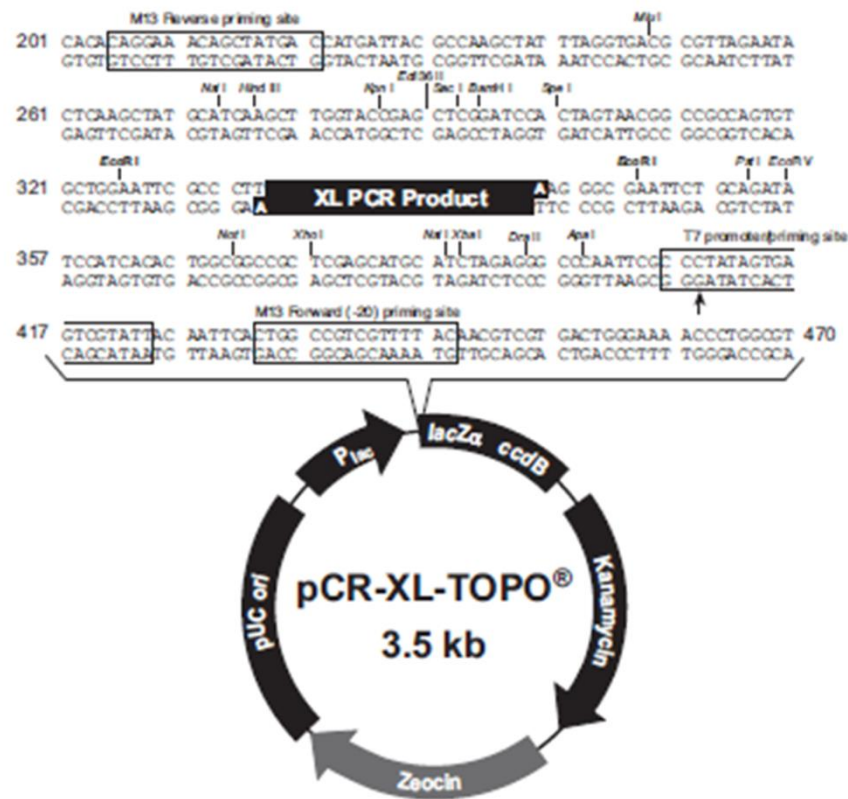
La Taq Phusion® génère des produits de PCR avec des extrémités franches (« blunt-ended ») alors que le clonage dans le vecteur pCR-XL-TOPO® utilisé par la suite repose sur la méthode de « TA-Cloning ». Cette méthode consiste à insérer le fragment d'intérêt dans un vecteur de clonage linéarisé portant une Thymine (T) à chaque extrémité. Le fragment à cloner doit donc porter une Adénine (A) à son extrémité pour être inséré dans le vecteur par complémentarité des bases. Cette adénine à l'extrémité des produits PCR a été obtenue par l'activité d'une Taq polymérase (TaKaRa ExTaq DNA Polymerase) ajoutée juste avant l'étape finale d'élongation des produits PCR. Nous n'avons pas utilisé directement cette Taq pour amplifier les séquences d'intérêt car nous obtenions des rendements de produits PCR bien inférieurs à ceux obtenus avec la Taq Phusion®.

### **Clonage dans le vecteur pCR-XL-TOPO®**

Nous avons choisi de passer par cette étape de clonage supplémentaire dans un vecteur de « transition » afin de faciliter le clonage avec le système Gateway® utilisé par la suite. L'objectif est de maintenir et de multiplier les séquences d'intérêt (le promoteur et la séquence codante du gène *KUP9*) dans des bactéries. La technique consiste à insérer les produits PCR des séquences d'intérêt dans un vecteur de clonage avant de transformer les bactéries avec cette construction. Le vecteur pCR-XL-TOPO® porte un gène létal appelé *ccdB* dont l'expression est invalidée par l'insertion des produits de PCR. Il porte également un gène de résistance à la kanamycine. Ainsi, seules les bactéries qui contiennent le vecteur dans lequel sont insérées les séquences d'intérêt survivent et sont capables de se développer sur un milieu sélectif.

Les produits de PCR ont d'abord été purifiés sur colonnes avec le kit QIAquick afin d'augmenter l'efficacité de la ligation dans le vecteur, comme recommandé dans le manuel d'utilisation de la technologie de clonage TOPO® XL PCR. La réaction de clonage est réalisée sur 4 µL de produits de PCR

purifiés (entre 50 et 150 ng) avec 1  $\mu$ L de solution pCR-XL-TOPO<sup>®</sup> fournie dans le kit de clonage. Après incubation pendant 30 min à température ambiante, la réaction est stoppée avec 1  $\mu$ L de TOPO Cloning Stop Solution.



**Figure II.10 : Vecteur pCR-XL-TOPO<sup>®</sup>.** Source : Guide utilisateur « TOPO<sup>®</sup> XL PCR Cloning kit » (25-0199).

### Transformation de bactéries

La transformation des bactéries compétentes One Shot<sup>®</sup> TOP10 a été réalisée par choc thermique. Nous avons utilisé 4  $\mu$ L de la construction pour 25  $\mu$ L de bactéries. Après incubation pendant 30 min sur glace, les bactéries sont placées 30 sec à 42°C puis remises immédiatement sur la glace pendant 2 min. Suite à ce choc thermique, les bactéries sont mises à incuber sous agitation à 37°C pendant 1h dans 250  $\mu$ L de milieu de culture S.O.C. (pour Super Optimal broth with Catabolit repression). Enfin, 200  $\mu$ L de cette solution bactérienne sont étalés sur milieux de culture gélosés LB (pour Lysogeny Broth) contenant 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de kanamycine pour la sélection des transformants.

### Extraction de plasmides

La préparation d'ADN plasmidique a été réalisée avec le kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) en suivant le protocole « Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli* ». Pour les minipreps, le point de départ est une culture liquide bactérienne de 3 mL dans du LB contenant 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de kanamycine. Brièvement, l'ADN plasmidique est isolé de l'ADN chromosomique bactérien par lyse alcaline (pour dénaturer les molécules d'ADN) puis neutralisation (pour permettre le ré-appariement

des brins de l'ADN plasmidique alors que l'ADN chromosomique, beaucoup plus long, est précipité). L'ADN plasmidique est purifié sur colonne et lavage à l'éthanol avant élution dans H<sub>2</sub>O puis dosé au Nanodrop.

### II.6.2-Clonage avec le système Gateway®

Le phage Lambda (Enterobacteria phage  $\lambda$ ) est un virus (Groupe I des virus à ADN double brin) bactériophage d'*E. coli*. Le cycle lysogénique (par opposition au cycle lytique) de ce virus correspond à l'insertion de son génome dans celui de la bactérie mais de manière « dormante », c'est-à-dire sans qu'il ne soit exprimé. La technique de clonage Gateway® est basée sur les mécanismes de recombinaison de l'ADN utilisés par le phage  $\lambda$ . Le protocole peut être divisé en trois étapes principales (Fig II.11):

(i) L'amplification de la séquence d'intérêt (ici le promoteur et la séquence codante du gène *KUP9*) encadrée par les sites de recombinaisons Gateway® attB pour permettre son insertion dans un vecteur d'entrée ;

(ii) La création d'un vecteur d'entrée pDONR™ : c'est un plasmide capable de « donner » à un plasmide de destination le gène d'intérêt. Ce vecteur n'est pas exprimé permettant ainsi le séquençage et le stockage du gène d'intérêt dans l'hôte c'est-à-dire *E. coli*. L'insertion de la séquence d'intérêt dans le vecteur d'entrée se fait par réaction de recombinaison BP (recombinaison entre les sites attB de la séquence d'intérêt et les sites attP du vecteur d'entrée) ;

(iii) Le transfert du gène d'intérêt du vecteur d'entrée vers le vecteur de destination. C'est à cette étape que les différents gènes sont assemblés selon le schéma de construction désiré. L'insertion des différents gènes dans le vecteur de destination se fait par réaction de recombinaison LR (recombinaison entre les sites attL et attR).

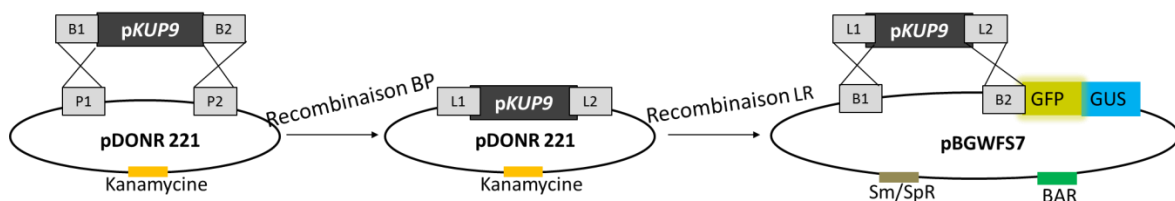


Figure II.11 : Recombinaisons BP et LR pour la construction pKUP9:GFP-GUS.

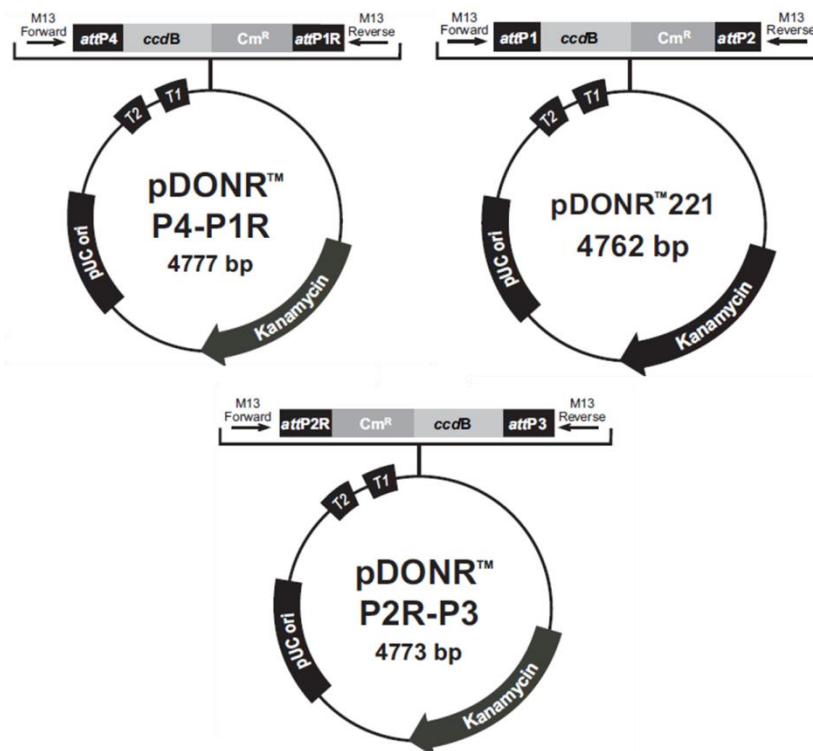
#### Obtention des séquences d'intérêt encadrées par les sites de recombinaison attB

Afin d'insérer les séquences d'intérêt dans les vecteurs d'entrée pDONR™, il faut intégrer des sites de recombinaison attB de part et d'autre de ces séquences. Pour cela, nous avons réalisé des PCR en utilisant des amorces spécifiques des séquences d'intérêt et portant les sites de recombinaison attB (amorces attB). Nous avons dessiné ces amorces en suivant le guide d'utilisateur « Multisite Gateway® Three-Fragment Vector Construction » (N° de publication 25-0541), en faisant attention à l'ajout de nucléotides pour respecter le cadre de lecture des fusions GFP-KUP9 par exemple.

Les PCR ont été réalisées sur 10 ng de plasmide pCR-XL-TOPO® contenant les séquences promotrices et codantes du gène *KUP9* clonées. Chaque réaction (50 µL) contient 200 µM de dNTP, 1 µM de chacune des amorces attB, 1 unité de Taq haute-fidélité (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase) et du tampon (5X Phusion® HF Buffer). Le programme appliqué est le suivant : 30 sec à 98°C, 35 cycles à 98°C pendant 10 sec, 55°C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min 30 sec, et enfin 10 min à 72°C pour l'extension finale.

Les produits PCR encadrés par les sites attB sont purifiés sur colonnes avec le kit QIAquick avant leur insertion dans les vecteurs pDONR™. L'objectif est d'éliminer les amorces attB qui entreraient en compétition avec les séquences d'intérêt pour la recombinaison avec le vecteur d'entrée.

### Clonage dans les vecteurs d'entrée et transformation de bactéries



**Figure II.12 : Vecteurs pDONR™ du système de clonage Gateway®.** Les vecteurs confèrent aux transformants une résistance à l'antibiotique kanamycine. Source : Guide utilisateur « Multisite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit » (25-0541).

Les séquences promotrices et codantes du gène *KUP9* sont transférées dans les vecteurs d'entrée par recombinaison BP. La réaction est catalysée par une enzyme BP Clonase® II sur 50 fmoles de produits PCR attB (80-90 ng) et 50 fmoles de vecteur pDONR™ (150 ng). Après incubation toute la nuit à 25°C, la réaction est stoppée par 2 µg de Protéinase K (10 min à 37°C).

Les différentes réactions réalisées sont les suivantes (présentées en **Annexe-3**) :

- séquence promotrice de *KUP9* dans pDONR221 pour la construction finale p*KUP9* :GUS-GFP,
- séquence promotrice de *KUP9* dans pDONR P4-P1r pour les constructions finales p*KUP9* :GFP-KUP9 et p*KUP9*: KUP9-GFP,
- séquence codante de *KUP9* dans pDONR P2r-P3 pour les constructions finales p*KUP9* :GFP-KUP9 et

p35S:GFP-KUP9,

- séquence codante de *KUP9* dans pDONR221 pour les constructions finales p*KUP9*:KUP9-GFP et p35S:KUP9-GFP.

Le promoteur 35S et la séquence codante pour la GFP encadrés par les sites de recombinaison attB étaient déjà disponible au LBDP.

Comme décrit précédemment, les bactéries One Shot TOP10 sont transformées par choc thermique. Nous avons utilisé entre 2 et 4  $\mu\text{L}$  de plasmide recombiné pour 25  $\mu\text{L}$  de bactéries. Les clones résistants sont sélectionnés sur milieu gélosé LB contenant 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de kanamycine.

L'ADN plasmidique est extrait comme décrit précédemment dans la **Section II.6.1** et est contrôlé par séquençage avant de passer à l'étape suivante.

### **Clonage dans les vecteurs de destination et transformation de bactéries**

Les différents gènes clonés sont assemblés selon le schéma de la construction finale par recombinaison LR dans le vecteur de destination (**Fig. II.9**). La réaction est catalysée par une enzyme LR Clonase II sur 10 fmoles de chacun des ADN plasmidiques purifiés (environ 50 ng) et 150 ng de vecteur de destination. Après incubation une nuit à 25°C, la réaction est stoppée par 2  $\mu\text{g}$  de Protéinase K (10 min à 37°C).

Comme décrit dans la **Section II.6.1**, les bactéries One Shot TOP10 sont transformées par choc thermique. Nous avons utilisé 5  $\mu\text{L}$  de la réaction de recombinaison LR pour 25  $\mu\text{L}$  de bactéries. Les clones résistants sont sélectionnés sur milieu gélosé LB contenant 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de spectinomycine.

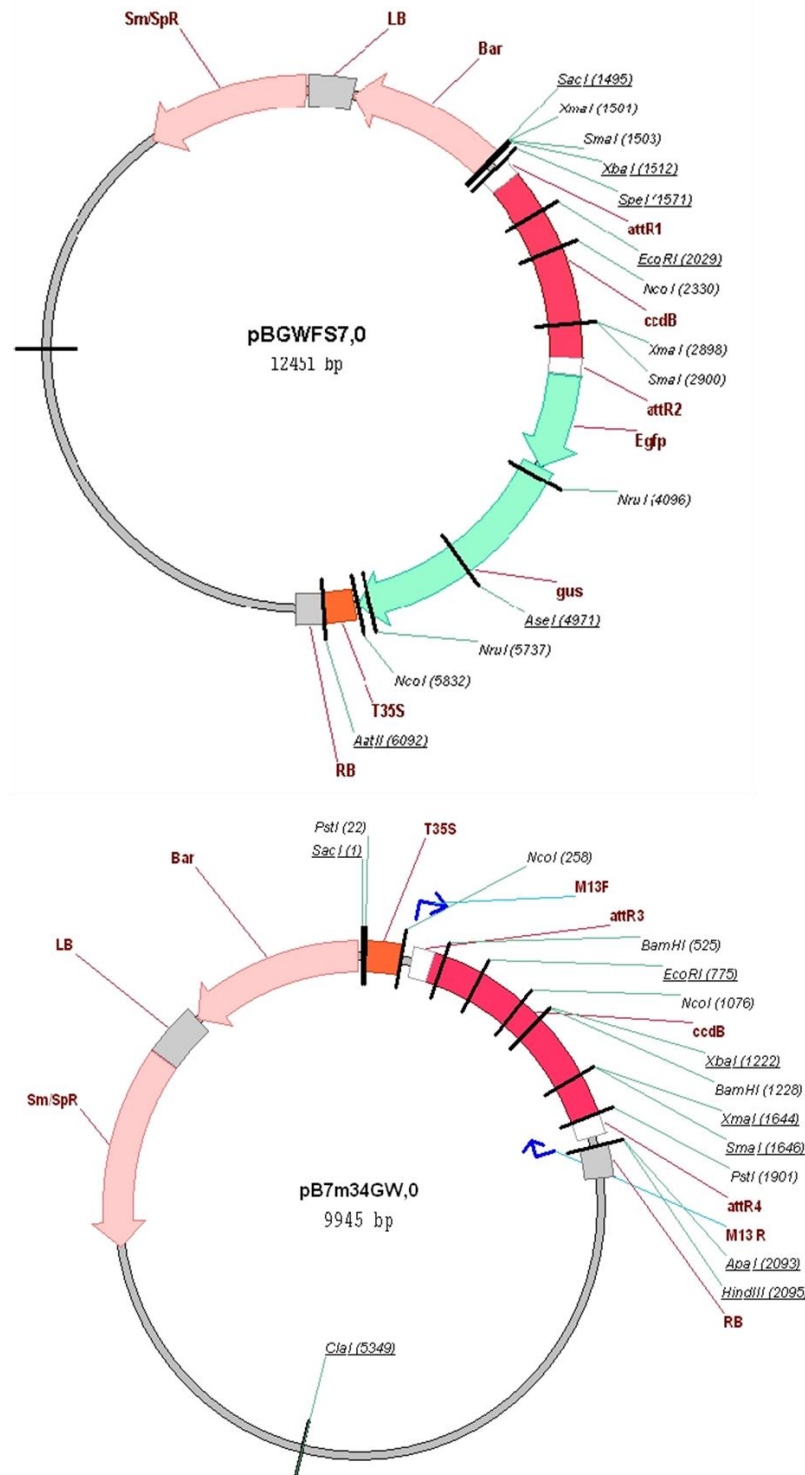


Figure II.13 : Vecteurs de destination pBGWFS7 (construction pKUP9:GFP-GUS) et pB7m34GW (constructions avec fusion KUP9-GFP). Les vecteurs confèrent aux transformants une résistance à l'antibiotique spectinomycine et à l'herbicide BASTA. Source : <https://gateway.psb.ugent.be>.



### II.6.3 – Contrôle du clonage

#### Vérification par PCR des bactéries transformées

La présence du gène cloné dans les colonies bactériennes résistantes est vérifiée par PCR avec des amorces spécifiques du promoteur/de la séquence codante du gène *KUP9*. La PCR est réalisée directement sur une partie de la colonie résistante qui est repiquée par la même occasion sur un nouveau milieu sélectif. Chaque réaction contient 200  $\mu$ M de dNTP, 1  $\mu$ M de chacune des deux amorces, du tampon PCR (Taq DNA Polymerase Buffer, ThermoFisher) et environ 1 unité d'une Taq produite au LBDP. Le programme appliqué est le suivant : 10 min à 98°C, 35 cycles à 94°C pendant 30 sec, 55°C pendant 30 sec et 72°C pendant 2 min, et enfin 10 min à 72°C pour l'extension finale.

#### Vérification par séquençage du gène cloné

Avant de l'envoyer pour séquençage, le profil de digestion des ADN plasmidiques par des enzymes de restriction a été vérifié. Le séquençage de l'ADN plasmidique a été réalisé par GATC Biotech (<https://www.gatc-biotech.com/fr/index.html>) selon la méthode de Sanger pour vérifier qu'il n'y avait pas d'erreurs dans la séquence du gène cloné. Le résultat du séquençage et la séquence du gène d'intérêt ont été comparés avec l'outil BLASTn disponible en ligne sur le site du NCBI ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)). La qualité du séquençage a été évaluée grâce au chromatogramme fourni par GATC Biotech. Les séquences du promoteur et de la région codante du gène *KUP9* clonées ont été vérifiées à chaque fois qu'une PCR aurait pu introduire des erreurs c'est-à-dire après insertion dans le vecteur pCR-XL-TOPO® et après insertion dans les vecteurs pDONR™.

## II.7 – TRANSFORMATION DU MATERIEL VEGETAL

### II.7.1 – Expression transitoire dans des protoplastes de mésophylle

#### Préparation de protoplastes

Le protocole suivi correspond à une adaptation du protocole de Sheen (2002, <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>) par N. Leonhardt au LBDP.

Les protoplastes de mésophylle de l'écotype sauvage Col-0 ont été isolés à partir des feuilles de plantes âgées d'environ 4-5 semaines. Les feuilles sont récoltées et leur face inférieure est frottée délicatement avec du papier à poncer. Elles sont incubées toute la nuit à 22°C et à l'obscurité dans 50 mL de solution de digestion (1% Cellulase R10, 0,2% Macerozyme R10, 0,1% BSA, mannitol 0,4 M, KCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 20mM pH 5,7). La solution est ensuite filtrée avec un filtre Nylon dans un tube Falcon 50 mL. Le filtrat est centrifugé à 100 g à 4°C pendant 10 min avec une accélération/décélération la plus douce possible. Le surnageant est éliminé et le culot qui contient les protoplastes est lavé deux fois avec une solution W5 (NaCl 154 mM, CaCl<sub>2</sub> 125 mM, KCl 5 mM, Glucose 5 mM, MES-KOH 1,5 mM pH 5,6). Les protoplastes sont conservés sur glace et leur concentration est ajustée à 1-2.10<sup>5</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> avec la solution W5 après comptage sur cellule de Malassez.

### Transformation des protoplastes

Dans un tube à fond rond, 100  $\mu\text{L}$  de protoplastes sont déposés et mélangés délicatement avec 35 à 100  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique. Ces grandes quantités d'ADN plasmidiques sont préalablement préparées avec le kit QIAGEN® Plasmid pour Maxiprep à partir d'une culture bactérienne dans 250 mL LB contenant 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de spectinomycine. La pénétration de l'ADN plasmidique dans les protoplastes est médié par 110  $\mu\text{L}$  d'une solution de PEG 4000 (40% PEG 4000, Mannitol 0,4 M,  $\text{CaCl}_2$  0,1 M) mélangés rapidement après ajout à la préparation de protoplastes par pipetage avec un cône coupé. Après incubation 30 min à température ambiante, la solution est diluée avec 440  $\mu\text{L}$  de solution W5 puis centrifugée à 100 g pendant 5 min. Le culot de protoplastes est resuspendu délicatement et 1 mL de solution W5 est à nouveau ajouté à la solution. Les protoplastes sont observés après 24 à 48 h d'incubation à l'obscurité.

#### II.7.2 - Expression stable dans des lignées transgéniques d'*A. thaliana*

La transformation de l'écotype sauvage Col-0 est médié par *Agrobacterium tumefaciens*.

### Transformation des agrobactéries

La transformation de la souche d'agrobactéries C58C1 résistante à la rifampicine est réalisée par électroporation. Nous avons utilisé environ 100 ng d'ADN plasmidique pour 50  $\mu\text{L}$  de bactéries. Après électroporation, les bactéries sont incubées pendant 3 h à 28°C et sous agitation dans 250  $\mu\text{L}$  de LB. Elles sont ensuite étalées sur milieu gélosé LB sélectif contenant 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de rifampicine et 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de spectinomycine.

### Préparation des agrobactéries pour transformation des plantes

Les colonies d'agrobactéries résistantes sont transférées pour culture pendant une nuit en milieu sélectif liquide dans 3 mL de LB avec antibiotiques. Cette culture bactérienne est ensuite étalée sur milieu gélosé sélectif et la croissance est encore permise pendant 24h. Le tapis bactérien ainsi formé est collecté dans 30 mL de LB (sans antibiotiques) et ajouté à 120 mL de solution SILWETT (5% sucrose, 0,003% SILWETT).

### Transformation des plantes

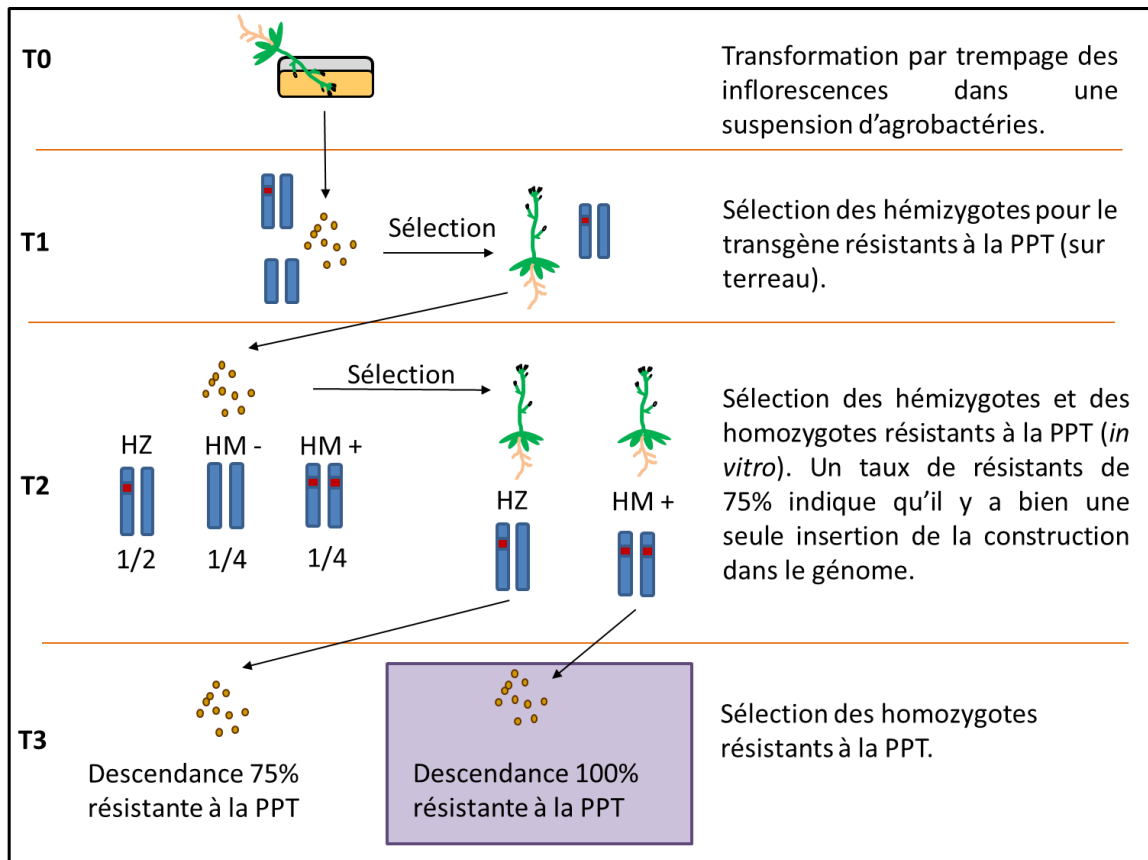
La transformation de l'écotype sauvage Col-0 est réalisée par trempage des inflorescences dans la solution d'agrobactéries décrite précédemment pendant 3 à 5 min. Les plantes transformées sont placées dans un sac étanche pendant 48h avant de continuer leur croissance normalement jusqu'à récolte des graines. Les graines récoltées sont considérées comme la 1<sup>o</sup> génération de transformants (T1).

### Sélection des lignées transgéniques

La 1<sup>o</sup> génération de transformants (T1) est sélectionnée sur terreau avec traitement à l'herbicide BASTA dont la substance active est la phosphinotricine (PPT). A cette génération, toutes les plantes

résistantes sont hémizygotés pour le transgène (**Fig.II.14**). Si la construction n'est insérée qu'une seule fois dans le génome de ces T1, leur descendance (T2) est composée de 50% d'individus hémizygotés et de 25% d'individus homozygotés pour le transgène. La sélection des lignées avec insertion du transgène à un seul locus se fait *in vitro* en milieu sélectif MS1/2 contenant 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de PPT d'après ce critère de ségrégation.

Finalement les individus homozygotés pour le transgène sont sélectionnés en testant la 3<sup>ème</sup> génération (T3), car les T2 homozygotés donnent une descendance à 100% homozygote (donc à 100% résistante à PPT).



**Figure II.14 : Sélection des lignées transgéniques homozygotés et avec une seule insertion du transgène.**

## II.8 – ANALYSE DES LIGNÉES TRANSGÉNIQUES

### II.8.1-Contrôle du transgène par PCR

La présence du transgène dans le génome des lignées transgéniques T3 ainsi que le bon déroulement de sa transcription ont été vérifiés par PCR sur ADNg et ADNc respectivement. Les protocoles suivis pour l'extraction d'ADNg et d'ARN ainsi que pour la synthèse d'ADNc sont détaillés dans les **Sections II.3.1** et **II.3.2**. Nous avons utilisé les amorces dessinées pour le séquençage du promoteur et de la séquence codante de *KUP9* ainsi que des amorces dessinées dans le gène codant pour la GFP. Les conditions de PCR appliquées sont similaires à celles décrites dans la **Section II.6.1** (la durée de l'étape d'élongation à 72°C varie selon la longueur de la séquence à amplifier, nous avons utilisé environ 1 min pour une séquence à amplifier de 1 kb avec la polymérase Phusion®).

### II.8.2 – Immuno-détection des protéines de fusion GFP-KUP9

Les protéines de fusion GFP-KUP9 (GFP placée en N-terminal de la protéine KUP9) synthétisées dans les lignées transgéniques ont été analysées par Western Blot. Le principe consiste à séparer les protéines extraites des T3 par électrophorèse, les transférer sur une membrane de nitro-cellulose puis de détecter les protéines d'intérêt avec un anticorps, ici dirigé contre la GFP. L'objectif est de vérifier la taille des protéines détectées par anticorps anti-GFP, c'est-à-dire des protéines de fusion GFP-KUP9.

#### Extraction des protéines à partir de matériel végétal

Environ 700 mg de matériel végétal (pool racines, feuilles et fleurs de 3 plantes matures appartenant à la 4<sup>ème</sup> génération de lignées transgéniques et cultivées sur sable) sont broyés dans un mortier avec de l'azote liquide. La poudre obtenue est transférée dans un tube 2 mL et un volume de tampon d'extraction est ajouté (700  $\mu$ L pour 700 mg de matériel végétal par exemple). La composition de ce tampon d'extraction est : 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA NaOH pH 8, 2 mM DTT (dithiothreitol) et 1X d'un cocktail inhibiteur de protéases. Le mélange est placé sur glace et est passé au vortex 3 fois (en remplaçant le tube sur glace entre chaque étape de vortex).

Les protéines solubles et membranaires sont ensuite séparées par centrifugation (14000 rpm à 4°C pendant 20 min). Alors que le surnageant correspondant à la fraction soluble est transféré dans un nouveau tube, le culot correspondant à la fraction membranaire est repris dans  $\frac{1}{2}$  volume de tampon de resuspension (c'est-à-dire 350  $\mu$ L pour 700 mg de matériel végétal initial). Ce tampon de resuspension est composé de 25 mM de Tris-HCl pH 8, 2 mM de DTT, 1X d'un cocktail inhibiteur de protéases et de 0,5% de Triton X-100.

Le tube contenant la fraction membranaire est passé au sonicateur en le gardant dans la glace (4 pulsations de 10 sec et espacées de 10 sec, amplitude réglée à 10%). Après centrifugation (14000 rpm à 4°C pendant 20 min), la fraction protéique membranaire contenue dans le surnageant est transférée dans un nouveau tube tandis que le culot de débris est éliminé.

Les protéines sont dosées par colorimétrie après mélange des échantillons avec un réactif contenant du bleu de Coomassie selon la méthode Bradford. Brièvement, 1  $\mu$ L d'extrait protéique est mélangé avec 450  $\mu$ L de réactif Coo Assay, 40  $\mu$ L d' $H_2O$  et 9  $\mu$ L de tampon d'extraction. Après avoir laissé le mélange à l'obscurité pendant 10 min, la mesure de l'absorbance de l'échantillon à 595 nm est réalisée. La concentration en protéines de l'échantillon est alors déduite d'après une courbe d'étalonnage réalisée préalablement avec une gamme de dilution de la BSA allant de 0,25 à 2  $\mu$ g. $\mu$ L<sup>-1</sup>. Les extraits protéiques sont finalement stockés à -20°C ou placés sur glace pour utilisation.

#### Electrophorèse en conditions dénaturantes

Cette étape consiste à dénaturer les protéines extraites des lignées transgéniques et à leur conférer une charge nette négative par l'utilisation de SDS puis de les séparer en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (technique SDS-PAGE).

Les gels de migration ont été préparés dans des cassettes Novex de 10 mL en superposant deux préparations contenant des niveaux d'acrylamide/Bis-acrylamide (mix acrylamide) différents afin de créer deux parties se distinguant par la taille de leurs mailles. Le premier tiers du gel, comportant les

puits pour déposer les préparations protéiques, est composé de mailles lâches afin de charger les protéines dans le gel de manière homogène (5% mix acrylamide, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS pour ammonium persulfate et 0,1% TEMED). Les deux autres tiers du gel sont composés de mailles plus serrées afin de séparer les protéines selon leur taille (8% mix acrylamide, 375 mM Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,08% TEMED).

Entre 40 et 50 µg de protéines sont mélangés avec 10 µL de réactif commercial NuPage® avant d'être déposés dans des puits de 50 µL. La migration est réalisée dans une cuve dédiée (Invitrogen Novex Mini Cell) remplie de tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 8, 192 mM Glycine, 0,1% SDS). Le voltage est réglé à 60V le temps que les protéines passent le premier tiers du gel puis est augmenté à 80V le reste du temps de migration (environ 2h au total).

A la fin de la migration, le gel est retiré délicatement de la cassette et il est soit traité comme décrit dans les sections suivantes pour le Western Blot soit il peut être coloré au bleu de Coomassie pour révéler l'ensemble des protéines. Pour la visualisation de l'ensemble des protéines, le gel est placé dans 20 mL de solution de pré-fixation (mélange à 1% d'acide acétique et 50% de méthanol dans H<sub>2</sub>O) pendant 30 min. Il est ensuite recouvert de bleu de Coomassie, toujours dans la solution de pré-fixation, pendant environ 2h (le temps qu'on ne distingue plus le gel dans la solution bleu foncé). La solution de coloration est éliminée et remplacée par une solution de décoloration (mélange à 7,5% d'acide acétique et 5% de méthanol dans H<sub>2</sub>O). La solution de décoloration est renouvelée jusqu'à ce que le gel soit suffisamment clair pour distinguer les différentes bandes bleues correspondant aux protéines (environ 2h de décoloration avec 4 renouvellements de la solution de décoloration). Finalement, le gel est conservé dans de l'acide acétique à 7% v/v.

### **Transfert sur membrane de nitrocellulose**

Cette étape consiste à transférer les protéines du gel de polyacrylamide vers une membrane de nitrocellulose dans le but de rendre ces protéines accessibles à l'anticorps anti-GFP.

La membrane de nitrocellulose est placée entre deux couches de Scotch-Brite et de papier Whatman. Le « sandwich » ainsi formé est imbibé de tampon de transfert (25 mM Tris-HCl pH 8, 192 mM Glycine, 0,1% SDS, 20% éthanol). Le gel de polyacrylamide portant les protéines est alors placé au centre de ce sandwich, au contact de la membrane de nitrocellulose. Le tout est placé dans une cassette puis positionné dans une cuve remplie de tampon de transfert sous agitation magnétique, à 4°C et réglée à 32V (500 mA) pour la nuit. Sous l'effet du courant électrique appliqué, les protéines sont alors transférées du gel de polyacrylamide vers la membrane de nitrocellulose.

Après le transfert des protéines, les sites inoccupés de la membrane de nitrocellulose sont saturés pendant 1h sous agitation dans une solution de TBS-T (0,1% Tween et 5% de lait en poudre dans du TBS : 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) afin d'éviter les interactions avec les anticorps utilisés par la suite.

### **Hybridation GFP-anticorps**

La membrane de nitrocellulose portant les protéines est mise à incuber pendant 2h sous agitation horizontale avec un anticorps primaire anti-GFP (dilution 1 :5000<sup>ème</sup> soit 200 ng.µL<sup>-1</sup> d'un anticorps monoclonal produit chez la souris, Living Colors® A.v. JL-8, Clontech) en solution dans 10 mL de TBS-T. Après trois lavages successifs d'une fois 15 min puis de deux fois 5 min avec du TBS-T, la membrane est placée dans une solution d'anticorps secondaires (dilution 1 :7000<sup>ème</sup> soit 140 ng.µL<sup>-1</sup> d'un

anticorps polyclonal anti-souris produit chez le lapin dans 14 mL TBS-T). Au bout de 20 min d'incubation, les anticorps qui ne se sont pas hybridés sont éliminés par lavage avec du TBS-T.

### Révélation du complexe protéine-anticorps

L'anticorps secondaire utilisé est couplé à la HRP (horseradish peroxidase, peroxydase du raifort en français), ce qui permet de le détecter par chimiluminescence. Pour cela, la membrane est mise à incuber avec 2 mL de réactifs commerciaux contenant du luminol et de l' $H_2O_2$  (kit de chimiluminescence SuperSignal™ West Pico, mélange entre 1 mL de chacun des deux réactifs du kit). La réaction entre le luminol et l' $H_2O_2$  et catalysée par la HRP émet alors de la lumière qui a été détectée par une G:box (utilisation du réglage par défaut au laboratoire, 2 min de temps d'acquisition).

### II.8.3 – Détection de la fluorescence de la GFP par imagerie

Différents outils d'imagerie de la plateforme ZoOM (Zone d'Observation en Microscopie) ont été utilisés afin de détecter la GFP par fluorescence chez les lignées transgéniques. Le microscope Axiozoom V16 Zeiss a été utilisé pour tenter de détecter par imagerie en fluorescence la GFP sur plusieurs plantes entières cultivées en boîte de Pétri. Des observations plus fines ont été réalisées avec le microscope Leica LMD6000 et avec le microscope confocal Zeiss LSM780 en montant différentes plantules de 7 jours entre lame et lamelle.

### II.8.4-Coloration GUS

Les tissus d'expression du gène *KUP9* ont été localisés par coloration GUS des lignées transgéniques *pKUP9 :GUS-GFP* placées dans une solution de fixation (tampon  $NaPO_4$  -30 mM  $Na_2HPO_4$  + 20 mM  $NaH_2PO_4$ - 50 mM, ferricyanure de potassium 2 mM, ferrocyanure de potassium 2 mM, 0,05% Triton X-100, X-Gluc 1 mg.mL<sup>-1</sup>, pH 7). Le temps d'incubation varie selon le tissu considéré : 30 min à 3 h pour les racines, 6 à 12 h pour les inflorescences, et nous avons testé jusqu'à 24h de coloration pour les rosettes, feuilles caulinaires et tiges. Après élimination de la solution de coloration, les tissus végétaux sont placés dans de l'éthanol à 70% pendant 6 à 12h puis dans de l'éthanol à 100% pour les décolorer et faciliter l'observation de la coloration GUS.

### II.9 – STATISTIQUES

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel public R (V3.2.0). Les détails sont indiqués dans les chapitres de résultats (**Chapitres III, IV et V**) pour chaque jeu de données.

De manière générale, la normalité des variables a été testée dans un premier temps en traçant les diagrammes quantile-quantile ou « droite de Henry » afin de comparer la distribution réelle du jeu de données avec une distribution construite sous l'hypothèse de normalité. Le test de Shapiro-Wilk a également été utilisé afin d'écarter ou non l'hypothèse de normalité. L'homogénéité des variances a été vérifiée avec le test de Levene.

Dans le cas d'une distribution normale, des tests ANOVA ont été réalisés afin de comparer les moyennes obtenues pour la variable étudiée (concentrations en césium, élévation racinaire ou

masse fraîche) en fonction du facteur « Lignée » (*hak5-3*, *kup9-1*, *kup9-2* ou Col-0). Le risque  $\alpha$  est fixé à 5%. Les codes de significativité sont présentés dans le **Tableau II.2**.

**Tableau II.2 : Code de significativité utilisé pour les analyses statistiques.**

Symbole de significativité	Valeur-p
NS	Non-significatif c'est-à-dire valeur-p > 0,05
*	0,01 < valeur-p < 0,05
**	0,001 < valeur-p < 0,01
***	0 < valeur-p < 0,001

Dans le cas où les variables ne suivent pas une distribution normale, nous avons appliqué le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Les moyennes significativement différentes des autres sont alors mises en évidence en comparant deux à deux les variables avec un test de Student, le risque  $\alpha$  global à l'issu des différentes comparaisons étant maintenu à 5% grâce à la méthode d'ajustement de Holm. Les codes de significativité utilisés sont présentés dans le **Tableau II.2**.

Enfin, pour les régressions linéaires réalisées dans le Chapitre III, l'hypothèse fondamentale d'homoscédasticité a été vérifiée en testant la normalité des résidus avec la « droite de Henry ».

### **CHAPITRE III**

## **EFFET DE L'APPORT EN POTASSIUM SUR L'ABSORPTION, LA TRANSLOCATION ET L'ACCUMULATION DE CESIUM CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA***



Comme nous l'avons vu dans le Chapitre I, les flux de césium sont supposés emprunter une partie du système de transport dédié au potassium. Ce système de transport potassique implique une diversité de protéines dont les contributions sont fonction de la gamme de concentrations en potassium dans le milieu extérieur et du statut potassique de la plante. Les connaissances sur l'identité et les caractéristiques des transporteurs potassiques majoritaires selon le niveau de potassium sont plutôt bien avancées pour le modèle *A. thaliana*. On peut ainsi diviser le système lié à l'absorption de potassium en 3 grands domaines (voir **Fig.I.5**, p.25):

- un domaine d'absorption haute-affinité pour des concentrations en potassium de l'ordre du  $\mu\text{M}$  et qui est pris en charge majoritairement par le transporteur HAK5,
- un large domaine impliquant principalement le canal potassique AKT1 pour des concentrations en potassium allant d'environ 50  $\mu\text{M}$  à 10 mM,
- un domaine où les concentrations en potassium sont de l'ordre du mM et qui implique vraisemblablement un ensemble de transporteurs encore non identifiés en plus du canal AKT1.

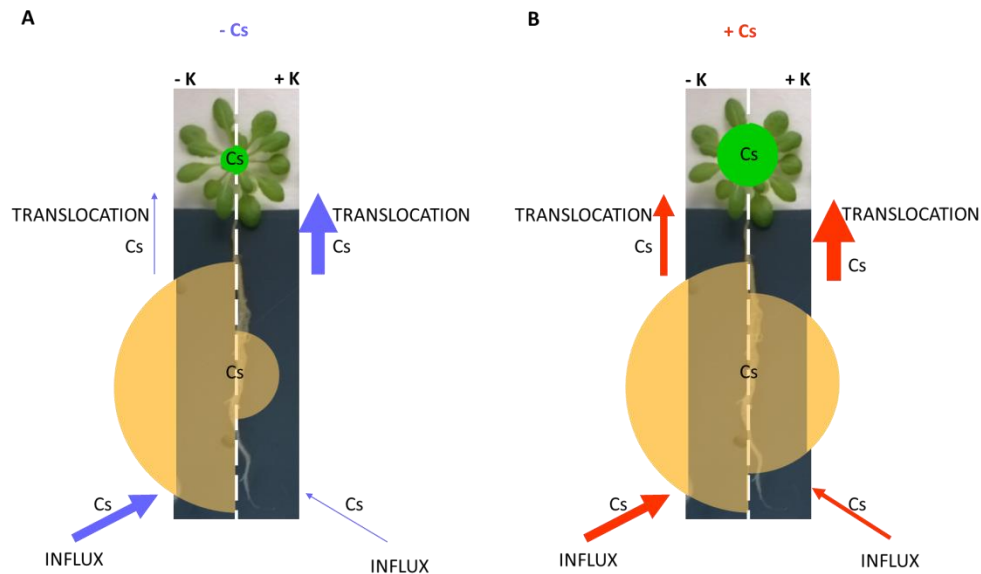
Nous avons donc décidé d'essayer de relier ces connaissances aux résultats obtenus quant à l'accumulation de césium chez *A. thaliana* en fonction du niveau de potassium : 10 (faible), 100 (intermédiaire) ou 3000  $\mu\text{M}$  (fort). En effet, chacun des trois domaines décrits fait intervenir des protéines de transport aux propriétés contrastées en termes de fonctionnement (transporteur/canal) et de sélectivité. Ces différences se répercutent notamment sur les paramètres cinétiques de l'absorption du potassium mais aussi sur sa distribution dans la plante. Par analogie entre les deux éléments, on peut donc s'attendre à ce que l'apport en potassium entraîne des modifications macroscopiques des paramètres de transport de césium liées à sa prise en charge ou non par ces différents transporteurs potassiques.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article (Genies, L., Orjollet, D., Carasco, L., Camilleri, V., Frelon, S., Vavasseur, A., Leonhardt, N. & Henner, P. (2017). Uptake and translocation of cesium by *Arabidopsis thaliana* in hydroponics conditions: links between kinetics and molecular mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 138(6), 164-172).

### III.1-RESUME ETENDU DE L'ARTICLE ET FIGURES COMPLEMENTAIRES

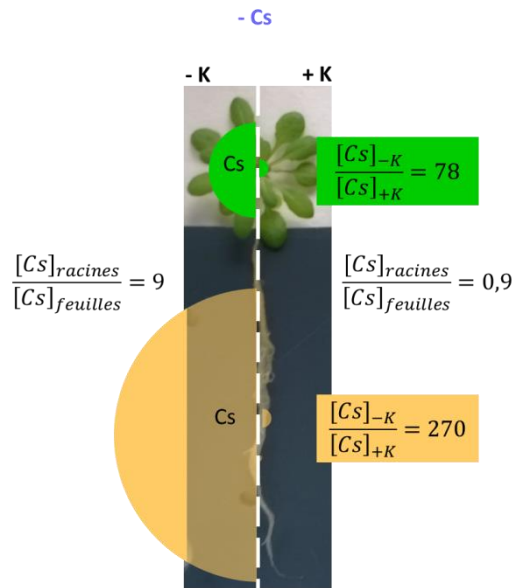
Afin de caractériser l'intensité du transport de césium en fonction de l'apport en potassium, nous avons réalisé deux types de tests. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'influx de césium sur des temps courts (de 15 min à 6 h) chez des plantes préalablement cultivées avec trois degrés de nutrition potassique distincts : 10, 100 ou 3000  $\mu\text{M}$ . Nous avons réalisé ces tests sur l'écotype sauvage Columbia-0 (Col-0) et sur une lignée mutante invalidée pour le gène *HAK5* (mutants *athak5-3*). Etant donné le rôle de ce transporteur dans l'absorption racinaire de césium en conditions de faible apport en potassium (Qi et al., 2008), l'effet de l'invalidation de *HAK5* sur l'influx de césium nous a permis d'évaluer la validité de nos tests mais aussi la part restant à attribuer à d'autres protéines de transport. Dans un deuxième temps, nous avons comparé les effets de ces trois traitements potassiques sur l'accumulation de césium sur un temps plus long (7 jours) pour Col-0. L'objectif étant d'évaluer la distribution du césium en situation d'équilibre avec le milieu extérieur.

Les résultats obtenus sur l'écotype sauvage (**Fig. III.1**) indiquent que le niveau de potassium affecte à la fois l'influx racinaire de césium et sa distribution entre les racines et les feuilles des plantes exposées.



**Figure III.1 : Flux instantané de césium chez *A. thaliana*, écotype sauvage Col-0 mesuré après 15 min d'exposition.** A- La solution d'exposition contient 1  $\mu\text{M}$  de CsCl (-Cs). B- La solution d'exposition contient 3000  $\mu\text{M}$  de CsCl (+Cs). Les plantes ont suivi un traitement nutritif à 10  $\mu\text{M}$  de K (-K) ou à 3000  $\mu\text{M}$  de K (+K). Les demi-cercles représentent les concentrations en césium mesurées dans les racines (jaune) et les feuilles (vert). Pour chacune des deux conditions Cs, la condition -K sert de référence pour les proportions des demi-cercles et des flèches représentant l'influx de césium. En revanche, les proportions des flèches représentant les flux nets de Cs des racines vers les feuilles sont relatives à la taille de la flèche de la condition -Cs/-K (condition pour laquelle le rapport de concentrations en césium feuilles/racines est minimum).

Élément globalement très mobile dans la plante, le césium se retrouve rapidement et parfois en grande quantité dans les feuilles : jusqu'à 30% de la quantité totale de césium absorbé est retrouvé dans les parties aériennes après seulement 15 min d'exposition chez des plantes suffisamment approvisionnées en potassium. Néanmoins, une carence en potassium a pour effet de diminuer la part de césium allouée aux feuilles. Ce résultat se retrouve à la fois sur les flux instantanés (test d'influx du césium sur 15 min) et sur les flux à l'équilibre (test d'accumulation du césium sur 7 jours, **Fig.III.2**).

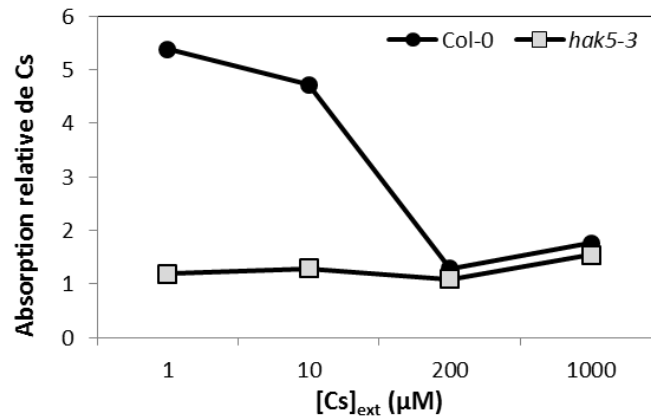


**Figure III.2 : Accumulation et distribution du césium chez *A. thaliana* écotype sauvage Col-0 mesurés après 7 jours d'exposition.** Les plantes testées ont suivi un traitement nutritif à 10  $\mu\text{M}$  de K (-K) ou à 3000  $\mu\text{M}$  de K (+K) et sont exposées à 1  $\mu\text{M}$  de césium stable.

Différentes hypothèses sont envisageables pour expliquer le modèle K-dépendant de la distribution du césium :

- (i) Le césium contenu dans les parois et les espaces intercellulaires entre en compte dans l'estimation des concentrations accumulées par la plante. La surface racinaire directement exposée à la solution constitue une zone d'adsorption avec une compétition entre les ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Cs}^+$  : la quantité de césium adsorbée est d'autant plus grande que les concentrations en potassium sont faibles dans le milieu (Zhu et al., 1999) . En revanche, le césium mesuré dans les feuilles provient exclusivement du pool absorbé par les racines. Le césium adsorbé sur la surface racinaire pourrait donc être un facteur de divergence entre la concentration racinaire et celle mesurée dans les feuilles. Dans nos tests, nous avons rincé les racines pendant 1 min avec une solution nutritive ne contenant pas de césium afin de minimiser la part de césium adsorbé entrant en compte dans la mesure de la concentration en césium racinaire.
- (ii) Il a été démontré que le canal potassique SKOR, impliqué dans le chargement du potassium dans le xylème, est inhibé en conditions de carence en potassium (Pilot et al., 2003). Ce canal exprimé en système hétérologue est perméable au césium (Gaymard et al., 1998). En se basant sur les caractéristiques de SKOR, il est tentant de penser que la translocation du césium puisse être en partie médiée par ce canal potassique ce qui expliquerait la diminution de la part de césium allouée aux parties aériennes en condition de carence potassique.
- (iii) En parallèle de la translocation, la concentration en césium mesurée dans les feuilles résulte également des mécanismes de stockage et de recirculation. A notre connaissance, il n'existe pas de preuves concernant une limitation du stockage de césium dans les parties aériennes et qui pourrait favoriser une recirculation potentielle du césium vers les racines en conditions de carence potassique. Dans le cas d'une carence

potassique, l'allocation du potassium aux racines est privilégiée sur les feuilles. Ce mécanisme adaptatif pourrait passer à la fois par l'inhibition de la translocation via SKOR et la régulation du canal AKT2, impliqué dans les flux de potassium transitant par le phloème. Par analogie entre les deux cations, on peut penser que la recirculation du césium des feuilles vers les racines pourrait également être influencée par le niveau de potassium.



**Figure III. 3 : Effet du niveau de potassium sur l'absorption de césium chez l'écotype sauvage Col-0 et le mutant *hak5-3*.** L'absorption de césium est mesurée sur des plantes pré-cultivées avec deux niveaux de potassium différents (10 µM ou 3000 µM) et exposées pendant 15 min à différentes concentrations de césium. Les valeurs représentent le rapport de l'absorption moyenne de césium à 10 µM de K sur l'absorption moyenne de césium à 3000 µM de K (moyennes sur un minimum de 5 plantes).

En ce qui concerne l'influx racinaire de césium, nous observons comme attendu une nette augmentation de son intensité avec la diminution de l'apport en potassium (**Fig. III. 3**). La régulation positive du transporteur potassique haute-affinité HAK5 dans ces conditions de carence potassique participe vraisemblablement à ce résultat. En effet, le niveau de potassium a moins d'effets sur l'absorption de césium mesurée chez une lignée mutante invalidée au niveau du gène *HAK5* (lignée *hak5-3*).

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre indique que le niveau global de potassium et les concentrations en césium dans le milieu extérieur ont une influence significative sur l'influx, l'accumulation et la distribution du césium chez *A. thaliana*. En se basant sur les connaissances actuelles concernant les mécanismes de transport du potassium, et à partir des résultats présentés ici, nous avons pu formuler différentes hypothèses sur l'identité des protéines impliquées dans les flux de césium. La comparaison de la distribution de césium en fonction du niveau de potassium nous laisse ainsi penser que des canaux potassiques de type Shaker pourraient être impliqués dans la translocation et la recirculation du césium. En ce qui concerne l'absorption racinaire de césium, nous concluons comme démontré précédemment que le transporteur HAK5 a en effet un rôle significatif en condition de carence potassique. Cependant, sa contribution est nettement réduite quand la concentration en césium dans le milieu extérieur augmente. Nous suggérons que d'autres transporteurs appartenant à la même famille que HAK5 ainsi que des canaux cationiques non sélectifs (NSCC) pourraient participer au transport de césium dans ces conditions. Jusque-là démontré pour de fortes concentrations en potassium, les NSCC pourraient donc aussi être impliqués

dans le transport de césium dans des conditions de carence potassique quand la concentration en césium augmente.

### III.2 – ARTICLE EN ANGLAIS

#### **Uptake and translocation of cesium by *Arabidopsis thaliana* in hydroponics conditions: links between kinetics and molecular mechanisms**

Laure GENIES<sup>a, b</sup>, Daniel ORJOLLET<sup>a</sup>, Loïc CARASCO<sup>a</sup>, Virginie CAMILLERI<sup>c</sup>, Sandrine FRELON<sup>c</sup>, Alain VAVASSEUR<sup>b</sup>, Nathalie LEONHARDT<sup>b</sup>, Pascale HENNER<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SERIS, Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transferts des radionucléides (L2BT), Cadarache, France*

<sup>b</sup> *Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), IBEB-SBVME, Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes (LBDP), Cadarache, France*

<sup>c</sup> *Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV, SERIS, Laboratoire d'ECOTOxicologie des radionucléides (LECO), Cadarache, France*

#### **ABSTRACT**

Early studies have shown that cesium ( $\text{Cs}^+$ ) competes with the macronutrient potassium ( $\text{K}^+$ ) for uptake by plants. The present study investigates the effect of  $\text{K}^+$  supply on  $\text{Cs}^+$  uptake and translocation in *Arabidopsis thaliana*. Taking advantage of the frequent use of this model plant in previous molecular studies, we discuss the link between functional features described for transporters involved in  $\text{K}^+$  (and sometimes in  $\text{Cs}^+$ ) uptake and results obtained here in both  $\text{Cs}^+$  influx and accumulation experiments under different  $\text{K}^+$ -treatments. In low  $\text{K}^+$  condition (10  $\mu\text{M}$ ), we observed that roots affinity for  $\text{Cs}^+$  increased significantly and  $\text{Cs}^+$  concentration in the external medium clearly affected the efficiency of  $\text{Cs}^+$  uptake. Our results are consistent with previous molecular studies indicating the role of the high-affinity  $\text{K}^+$  carrier *AtHAK5* in  $\text{Cs}^+$  uptake under  $\text{K}^+$ -deprivation. Further experiments show that the lack of *AtHAK5* has no more effect on  $\text{Cs}^+$  uptake for external  $\text{Cs}^+$  concentration above 100  $\mu\text{M}$ . We propose that non-selective cation channels, likely involved in  $\text{Cs}^+$  uptake under  $\text{K}^+$ -sufficient conditions according to previous studies, could also mediate  $\text{Cs}^+$  uptake under  $\text{K}^+$ -starvation and high  $\text{Cs}^+$  concentrations. Finally, evidences for  $\text{Cs}^+$  translocation mediated by  $\text{K}^+$  channels are discussed.

**Keywords:** Cesium uptake, Potassium uptake, kinetics parameters, transporters, *Arabidopsis thaliana*.

#### **1. Introduction**

Cesium ( $\text{Cs}^+$ ) has no known physiological role in plant but, because of its chemical similarity with the essential macronutrient potassium ( $\text{K}^+$ ), the monovalent cation  $\text{Cs}^+$  can be taken up from the soil solution by plant roots through the  $\text{K}^+$  uptake pathway (White & Broadley, 2000). Some biological processes involving  $\text{K}^+$  can be altered by  $\text{Cs}^+$  but, at the natural concentrations occurring in soil solutions, stable isotope  $^{133}\text{Cs}$  rarely causes environmental toxicity (Hampton et al., 2004). However, radiocesium ( $^{134}\text{Cs}$  and  $^{137}\text{Cs}$ ), which may occur in the environment after accidental release from nuclear plant facilities or resulting of nuclear weapon tests, is a major concern. These radioisotopes

emit harmful  $\beta$  and  $\gamma$  radiations during its decay and its uptake by plant is the predominant first step for its entry in the terrestrial food chain (Avery, 1996).

In order to minimize the entry of radiocesium in the food chain, contaminated soils are usually removed from agricultural uses or managed through the elimination of contaminated surface or by using countermeasures such as fertilization with competitive cations to minimize  $\text{Cs}^+$  uptake by plants (Zhu & Shaw, 2000). Alternatively, with new biotechnologies emerging, phytoremediation is studied for contaminated site rehabilitation using plants as extractor or developing "safe" crops which do not accumulate radiocesium (Lasat & Kochian, 1997; Kobayashi et al., 2014).

The transport of monovalent cations from the soil solution to plant roots and shoots is mediated symplastically by transporters. Therefore, identification and characterization of genes encoding transporters involved in  $\text{Cs}^+$  fluxes across the membranes of plant cells are thought to be helpful to understand its uptake and accumulation. Phytoextraction and development of safe crops could be optimized using plant selection based on this  $\text{Cs}^+$  accumulation related knowledge (White et al., 2003).

Several recent studies on the model plant *Arabidopsis thaliana* have deciphered part of the molecular mechanisms involved in  $\text{Cs}^+$  uptake and accumulation, found among the plant  $\text{K}^+$  transporters system. Since the level of  $\text{K}^+$  (both in the external and intracellular medium) modifies the relative contribution of each transporters in  $\text{K}^+$  fluxes (see Alemán et al., 2011 and references therein),  $\text{Cs}^+$  uptake pathway also depends on the  $\text{K}^+$ -status. Up to now, non-selective cation channels (NSCC) also called Voltage-Independent Cation Channels (VICC) encoded by members of the cyclic-nucleotide gated channel (*AtCNGC*) and glutamate like-receptor (*AtGLR*) gene families are suspected to mediate the largest part of  $\text{Cs}^+$  uptake in *Arabidopsis* roots under  $\text{K}^+$ -sufficient conditions (White & Broadley, 2000; Hampton et al., 2005). Under  $\text{K}^+$ -starvation, the high-affinity transporters encoded by the *AtKUP/HAK/KT* gene families and in particular the HAK5 transporter mediate a significant part of  $\text{Cs}^+$  uptake in *A. thaliana* (Qi et al., 2008).

The competitive effect of  $\text{K}^+$  on kinetics of  $\text{Cs}^+$  uptake have been described for several crops species: barley (Middleton et al., 1960), wheat (Shaw & Bell, 1989; Smolders et al., 1996; Zhu, 2001), maize (Sacchi et al., 1997), rice (Kondo et al., 2015), spinach (Buysse et al., 1995), radish (Prorok et al., 2016). However, only few studies report the kinetics aspect of  $\text{Cs}^+$  uptake in *A. thaliana* (Broadley et al., 2001; Kanter et al., 2010) due to the fact that it is nor a commercial crop nor a potential plant for phytoremediation uses. Conversely, *A. thaliana* is the preferred organism for molecular studies (see above). Consequently, links between kinetics data and molecular characterization of transporters involved in  $\text{Cs}^+$  uptake is reported only in few studies.

In this study, we report the effect of  $\text{K}^+$ -supply on  $\text{Cs}^+$  uptake, distribution and accumulation by the model plant *A. thaliana* in hydroponics condition. Links between transporters involved in  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$  uptake related-knowledge and changes observed in  $\text{Cs}^+$  transport under  $\text{K}^+$ -starvation are discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and growing before exposure to cesium

*Arabidopsis thaliana* seeds of Columbia-0 (Col-0) and *athak5-3* mutant line (SALK\_074868) were used in this study. As described before (Qi et al., 2008; Rubio et al., 2008), the T-DNA insertion is located in exon 4 in *athak5-3*. Plants homozygous for the T-DNA insertion were identified by polymerase chain reaction (PCR) using primers annealing upstream (HAK5A-F1: CGCAGGAGGAACATTTGCATTGTACTC)

and downstream (HAK5B-R1: AGTGCCTTAAGACGGTAATGTCATGCTTG) of the insertion site and a T-DNA left-border primer (Lbb1.3: ATTTTGCCGATTCGGAAC) as advised by the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGNAL, <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

Seeds were surface-sterilized using a mix of 70% ethanol (v/v)/ 0.05% SDS (v/v) and rinsed in ethanol 96% before sowing in Petri dishes (120 mm \* 120 mm) on a half-strength Murashige and Skoog medium (MS½, Murashige & Skoog, 1962) containing 1% (w/v) agar and 1% (w/v) sucrose. To synchronize germination and to break the dormancy, the sowing boxes were placed at 4°C during 48 h before transfer in a growth chamber set to 23°C, 50% HR with 8 h/16 h day/night cycle. After 7 days on MS½ agar medium, seedlings were transferred on sand (Zolux) and watered with nutrient solution to allow roots and shoots growing for a further 14 days. Finally, plants were transferred in a hydroponic system over 1L of aerated nutrient solution.

The nutrient solution (pH 5.8) contained 1.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 805 µM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2 mM KNO<sub>3</sub>, 60 µM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 695 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and micronutrients (3.6 µM MnSO<sub>4</sub>, 74 nM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 3 µM ZnSO<sub>4</sub>, 9.25 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 785 nM CuSO<sub>4</sub>, 20 µM Na<sub>2</sub>EDTA and 20 µM FeSO<sub>4</sub>).

## 2.2. Potassium treatments

These experiments were designed to estimate the effect of K<sup>+</sup>-supply on uptake and accumulation of Cs<sup>+</sup> by *A. thaliana*. Three distinct concentrations of K<sup>+</sup> (10 µM, 100 µM or 3000 µM) were supplied during five days before addition of Cs<sup>+</sup> in the medium.

K<sup>+</sup> treatments were performed during the hydroponic step. After 3-5 days of acclimatization to hydroponics conditions with the nutrient solution described in section 2.1, plants were transferred over 1L of a K<sup>+</sup>-treatment solution (pH 5.8) containing 0.75 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, and micronutrients. Three different treatments were tested through adding different amounts of KCl in the K<sup>+</sup>-treatment solution: 10 µM (starved level), 100 µM (intermediate level) or 3000 µM (replete level).

In the same hydroponic box, 5-6 plants were allowed to grow over 1 L of K<sup>+</sup>-treatment solution during 5 days.

## 2.3. Exposure to cesium in short-term influx experiments

**Table 1: Experimental scheme.**

Step	Composition of the medium	Duration
1- Growing on agar plates	MS½ , 1% agar, 1% sucrose	7 days
2- Growing on sand	Watered with nutrient solution	14 days
3- Growing in hydroponics	Nutrient solution	3-5 days
4- K <sup>+</sup> -treatment in hydroponics	K <sup>+</sup> -treatment solution	5 days
5a- Exposure to Cs <sup>+</sup> (short-term experiments)	K <sup>+</sup> -treatment solution + <sup>133</sup> Cs (0.1-3000 µM) + <sup>137</sup> Cs	15 min to 6 h
5b- Exposure to Cs <sup>+</sup> (long-term experiments)	K <sup>+</sup> -treatment solution + <sup>133</sup> Cs (1 µM)	7 days

After 30 days (+/- 3 days) of growing and K<sup>+</sup> treatment in the conditions described in sections 2.1 and 2.2 (summarized in Table 1), seedlings were transferred into individual wells containing 8 mL of

exposure solution taking care to not contaminate shoots. The exposure solution contained the K<sup>+</sup>-treatment solution plus a range of <sup>133</sup>Cs from 0.1 μM to 3000 μM traced by <sup>137</sup>Cs (approximately 140 Bq.mL<sup>-1</sup> representing 3.3.10<sup>-4</sup> μM Cs<sup>+</sup>). Plants were exposed during 15 min in order to determine kinetics parameters of net influx or during 6 h to evaluate the evolution of Cs<sup>+</sup> distribution between roots and shoots. Activities of <sup>137</sup>Cs in the exposure solution were followed during the course of assays and reveal no significant depletion (data not shown).

After exposure to Cs<sup>+</sup>, plants were transferred in 8 mL of a fresh solution corresponding to the exposure solution without Cs<sup>+</sup> (*i.e.* the K<sup>+</sup>-treatment solution) for 1 min to remove Cs<sup>+</sup> bound to the cell wall. Roots and shoots of plants tested were separated and blotted on Benchkote paper before recording of fresh weights.

For each parameters (time of exposure, concentration of Cs<sup>+</sup> in the exposure solution, K<sup>+</sup>-treatment), experiments were repeated at least two times with a minimum of three plants per repetition.

#### **2.4. Exposure to cesium in long-term accumulation experiments**

Long-term accumulation experiments were performed into 1 L exposure solution containing the three different K<sup>+</sup>-treatment solutions described in section 2.2 (10, 100 or 3000 μM K) plus 1 μM stable Cs<sup>+</sup> (no tracer was used). After 30 days (+/- 3 days) of growing in the conditions described in sections 2.1 and 2.2 (summarized in Table 1), plants were exposed for 7 days with renewing of the exposure solution every 2-3 days to avoid significant decrease of Cs<sup>+</sup> concentration in the medium due to uptake by plants.

After 7 days exposure to Cs<sup>+</sup>, roots and shoots were harvested as described in section 2.3 for the short-term influx experiments. For each K<sup>+</sup>-treatments condition, three tests were performed with a minimum of five plants per test.

#### **2.5. Measure of cesium and potassium**

Fresh roots and shoots of plants were mineralized in 5 mL HNO<sub>3</sub> 65% and 1.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% at 100-150°C on a sand bath. Mineralisates were evaporated to dryness and redissolved in HNO<sub>3</sub> 2% v/v before measuring the different elements.

Activity of <sup>137</sup>Cs accumulated in plants in the short-term experiments was measured by β liquid scintillation counting. Liquid scintillation cocktail (Instagel-Plus, Perkin Elmer) was added to the mineralized samples. The photon emissions following interaction between the liquid scintillator and the β particles emitted in the radioactive decay of <sup>137</sup>Cs accumulated in plants were counted during 30 min. In parallel, concentration of <sup>137</sup>Cs and <sup>133</sup>Cs into the exposure solution were measured by β liquid scintillation counting and ICP-MS respectively. The amount of Cs<sup>+</sup> accumulated in plant sample was deduced from the content of <sup>137</sup>Cs in plant and the ratio <sup>137</sup>Cs/<sup>133</sup>Cs into the exposure solution.

<sup>133</sup>Cs concentrations in roots and shoots of plants and in the exposure solutions used for the long-term accumulation experiments were measured by ICP-MS.

K<sup>+</sup> content in plants after the K<sup>+</sup>-treatments was measured by ICP-AES on a minimum of 3 non-exposed samples per experiment.



## 2.6. Data analysis

Using data from the 15 min influx assays, we calculated a solution to plant transfer factor ( $TF_{ext \rightarrow plant}$ ) according to **Eq.1**, defined here as the ratio between  $Cs^+$  uptake by plant roots and the  $Cs^+$  concentration in the solution (named  $[Cs]_{ext}$  in the following).  $Cs^+$  uptake was calculated by dividing its amount in the whole plant by the roots fresh-weight (FW). This  $TF_{ext \rightarrow plant}$  is a modified version of the usual  $TF$  defined as the ratio between concentration in shoots and concentration in the medium.  $TF_{ext \rightarrow plant}$  represents influx of  $Cs^+$  by the plant roots depending on the external  $Cs^+$  concentration. Thus  $TF_{ext \rightarrow plant}$  estimates the efficiency of  $Cs^+$  net uptake by roots.

$$TF_{ext \rightarrow plant}(Cs) = \frac{(Cs \text{ uptake})_{plant \ roots}}{[Cs]_{ext}} \quad \text{Eq. 1}$$

As described in Zhu et al. (2000), Eadie-Hofstee plot was used to calculate the kinetics parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) of  $Cs^+$  influx from the 15 min experiment data. Linear regression on the range of  $[Cs]_{ext}$  comprised between 0.1 and 200  $\mu M$  was performed on this plot, with  $V = Cs^+$  uptake rate ( $\mu mol \cdot g^{-1} FW \ roots \cdot h^{-1}$ ) expressed as a function of the ratio  $V/[Cs]_{ext}$  according to the **Eq.2**:

$$V = -K_m \frac{V}{[Cs]_{ext}} + V_{max} \quad \text{Eq.2}$$

Using data from the long-term accumulation experiment, we calculated a discrimination factor ( $DF$ ) in order to estimate the selectivity for uptake between  $K^+$  and  $Cs^+$ , as described in Smolders et al. (1996) and in Kanter et al. (2010):

$$DF(Cs) = \frac{([Cs] / [K])_{plant}}{([Cs] / [K])_{solution}} \quad \text{Eq.3}$$

ANOVA analysis were performed to evaluate the effect of  $K^+$ -treatment on plant potassium content, fresh weight and cesium content separately (NS, Non-Significant and \*, \*\*, \*\*\* Significant at the  $\alpha = 0.05, 0.01$  and  $0.001$  level respectively). In tables, different letters in bold indicate significant differences between means (Tuckey post-hoc test,  $p$ -value  $< 0.05$ ).

## 3. Results and discussion

Effects of  $K^+$ -supply on cesium influx, accumulation and distribution was estimated using both short-term (from 15 min to 6 h exposure) and 7-days exposure assays performed on *A. thaliana* (Col-0 ecotype). The experiments were designed to compare the effects of three different  $K^+$ -treatments on:

- (i) Kinetics parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  for  $Cs^+$  influx,
- (ii)  $Cs^+$  uptake efficiency estimated by transfer factor,
- (iii) Distribution of  $Cs^+$  between roots and shoots.

Role of the high-affinity HAK5 potassium carrier in cesium uptake under both low and high  $K^+$ -supply is also described for a range of  $Cs^+$  external concentrations ( $[Cs]_{ext}$ ).

### 3.1. Effect of $K^+$ -treatment on plants potassium content and on plant growth

Early studies have shown that  $K^+$  content of plant affects uptake of monovalent cations (Kochian & Lucas, 1982). In order to evaluate the effect of  $K^+$ -supply on  $Cs^+$  uptake, 25 days-old plants were first acclimated during five days to three distinct levels of  $K^+$ .  $K^+$  content of plants after acclimation is significantly different between the three distinct  $K^+$ -treatments (Table 2): plant  $K^+$  content is 1.5 times higher for  $K^+$ -replete seedlings (3000  $\mu M$   $K^+$  condition) compared to the  $K^+$ -starved conditions (10  $\mu M$   $K^+$ ).

**Table 2: Fresh-weight (FW) and  $K^+$  content of roots and shoots of Col-0 depending on the  $K^+$ -treatment.** Plants were grown 7 days on MS½, 14 days on sand then 8 days in hydroponic system.  $K^+$ -treatments were applied during the last 5 days of the hydroponic step. Values are means of at least ten plants with standard deviation in brackets. To evaluate the effect of  $K^+$ -treatment, ANOVA analysis was performed on fresh-weight then on  $K^+$  content separately and results are indicated in the last line (NS, Non-Significant and \*\*, \*\*\* Significant at the  $\alpha = 0.01$  and 0.001 level respectively). Different letters in bold indicate significant differences between means (Tuckey post-hoc test, p-value < 0.05).

$K^+$ -treatment ( $\mu M$ )	Shoots (g)	Roots (g)	K shoots ( $\mu mol.g^{-1}$ FW)	K roots ( $\mu mol.g^{-1}$ FW)
10	0.331 (0.166) <b>NS</b>	0.107 (0.060) <b>NS</b>	50.64 (9.55) <b>a</b>	60.48 (15.15) <b>a</b>
100	0.280 (0.176) <b>NS</b>	0.129 (0.094) <b>NS</b>	65.70 (18.58) <b>b</b>	73.13 (29.69) <b>a</b>
3000	0.363 (0.176) <b>NS</b>	0.135 (0.056) <b>NS</b>	69.18 (17.89) <b>b</b>	109.03 (10.56) <b>b</b>
$K^+$ -treatment effect	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>**</b>	<b>***</b>

However, we did not observe visible potassium starvation symptoms like chlorosis of older leaves nor plant growth effects (Table 1). Plants were growing in standard  $K^+$ -condition (2,8 mM) before  $K^+$ -treatments were applied. As stated by Kanter et al. (2010), this pre-culture in sufficient- $K^+$  conditions can prevent the further effects of turning to low- $K^+$  supply.

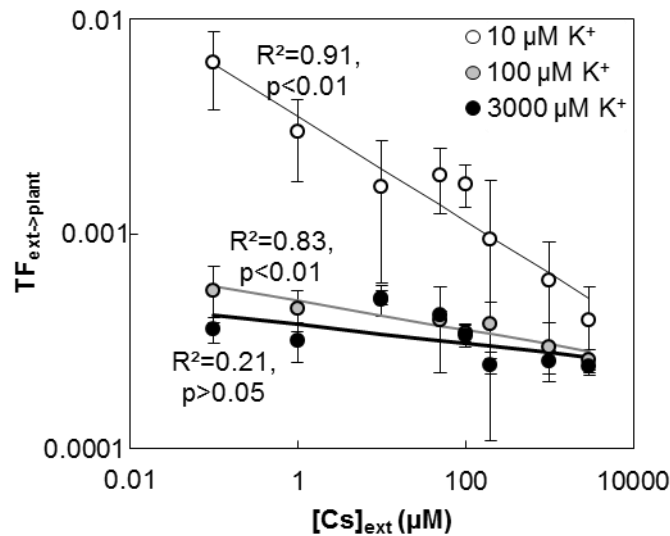
Plants were exposed to cesium after acclimation period with the three different  $K^+$ -supplies. The level of  $K^+$  during the pre-treatment was maintained in the exposure solution containing  $Cs^+$ . Thus, our experiments describe the effect of global level of  $K^+$ -supply *i.e.* in the solution outside the plants during the exposure to cesium but also inside the plants due to the  $K^+$ -treatment in pre-culture.

### 3.2. Effect of potassium supply and cesium concentration in solution on cesium uptake efficiency

Effects of  $[Cs]_{ext}$  on transfer factor for the three  $K^+$ -conditions are shown in Figure 1. As expected,  $TF_{ext \rightarrow plant}$  values (calculated as described in Eq.1) are higher for plants in the 10  $\mu M$   $K^+$ -condition compare to the  $K^+$ -replete plants (between 17 and 1.6 times higher, depending on the  $[Cs]_{ext}$ ). As stated before (Waegeneers et al., 2001), there are different reasons to record a higher cesium transfer factor in low- $K^+$  condition:

- i) the high depletion of  $K^+$  at the root surface due to high demand of plant to sustain growth whereas  $K^+$  is weakly available. This depletion of  $K^+$  in the medium favors  $Cs^+$  over  $K^+$  uptake.

- ii) the higher uptake rate potential of cesium at low potassium due to prevalence of high-affinity transport (HAT) system. In *A. thaliana*, this HAT system is mainly mediated by HAK5 which is known to be involved in  $\text{Cs}^+$  uptake (Rubio et al., 2000, Qi et al., 2008).

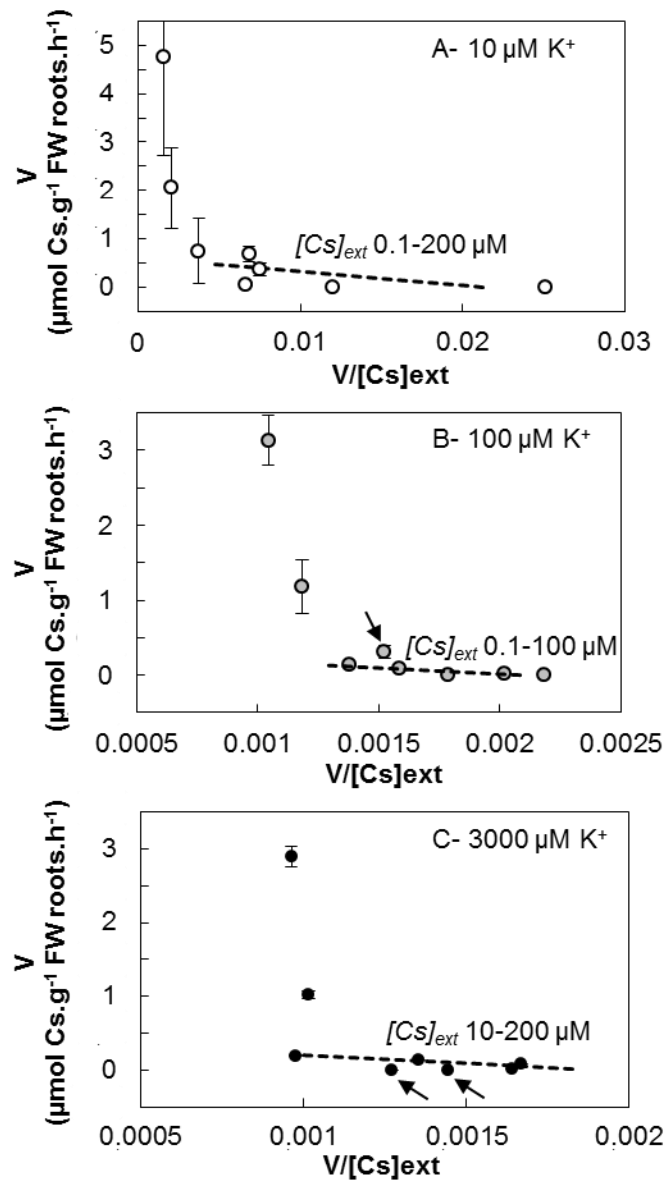


**Figure 1: Log-log plot of transfer factor ( $TF_{ext \rightarrow plant}$ ) of  $\text{Cs}^+$  for Col-0 grown with three different  $\text{K}^+$ -treatments (10, 100 or 3000  $\mu\text{M}$ ) and exposed during 15 min to a range of  $\text{Cs}^+$  concentrations. Transfer factor was calculated as described in Eq.1. Values are means of at least three different plants and error bars indicate standard deviation.**

When cultured in low  $\text{K}^+$  condition (10  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ ), the plasma membrane potential of *A. thaliana* roots cells (in the resting state) can become as negative as -215mV (Hirsch et al., 1998). In these conditions,  $\text{K}^+$  uptake is mainly mediated by high-affinity carriers that move  $\text{K}^+$  against the electrochemical gradient. In maize, it has been shown that these carriers display low selectivity between  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$  (Sacchi et al., 1997). Activity of low selective carriers, by contrast with highly selective transport system, should display strong sensitivity to  $\text{K}^+/\text{Cs}^+$  competition in the external medium. This could explain why increase in  $\text{K}^+/\text{Cs}^+$  competition with increasing  $[\text{K}]_{ext}$  in the low concentration range (between 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ -conditions in this study) results in significant decrease of  $\text{Cs}^+$  transfer factor (Figure 1).

Efficiency of  $\text{Cs}^+$  uptake also depends on the  $[\text{Cs}]_{ext}$ . Thus,  $TF_{ext \rightarrow plant}$  decreases with increasing  $\text{Cs}^+$  in the external solution (Figure 1). Linear regression indicates that this effect is significant ( $p < 0.01$ ) for the 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$  condition with adjusted- $R^2$  between 0.91 and 0.83 respectively. This could be due to the behavior of carriers which became saturated because conformational changes are needed for each transport event. As a consequence of transporters saturation, efficiency of  $\text{Cs}^+$  uptake (and thus  $TF_{ext \rightarrow plant}$ ) could be reduced with the  $[\text{Cs}]_{ext}$  increasing. Membrane depolarization due to the cation  $\text{Cs}^+$  accumulation in root cells and due to the fact that  $\text{Cs}^+$  blocks some of the  $\text{K}^+$  channels should also be addressed as a hypothesis to explain this observation. Indeed, lower membrane potential reduces the driving force for positively charged element and subsequently reduces  $\text{Cs}^+$  uptake as described previously for an *Arabidopsis* mutant disrupted in a plasma membrane proton pump (Haruta & Sussman, 2012).

When  $[K]_{ext}$  increases ( $>100 \mu\text{M}$ ), the electrochemical gradient is reduced (Hirsch et al., 1998) and the membrane potential follows the Nernst potential of  $K^+$  (Hedrich, 2012). In these conditions,  $K^+$  uptake is mainly mediated by channels. For higher  $K^+$  levels in this study ( $100 \mu\text{M}$  and  $3000 \mu\text{M}$ ), we observed only a slight decrease of  $TF_{ext \rightarrow plant}$  value with the increase of  $[Cs]_{ext}$  which is consistent with a channel-type transport system: when the pore is open, no more conformational changes are needed to transport ions. Therefore, saturation pattern are not observed conversely to carrier-mediated pathway.



**Figure 2: Eadie-Hofstee plot for  $Cs^+$  uptake data from 15 min influx assays.** Plants were supplied with three distinct  $K^+$ -treatments (A- $10 \mu\text{M}$ , B- $100 \mu\text{M}$ , C- $3000 \mu\text{M}$ ). Concentrations of  $Cs^+$  in the exposure solution range from  $0.1$  to  $3000 \mu\text{M}$ . Values are means of at least three different plants and error bars indicate standard deviation. Broken lines represent the Michaelis-Menten function with kinetics parameters calculated in Table 3. Linear regression is calculated over the range of external  $Cs^+$  concentrations ( $[Cs]_{ext}$ ) indicated on each figure. Arrows indicate extreme values which had to be removed from the calculation because they lead to absurd results.

Eadie-Hofstee plots (**Eq.2**) derived from data of the 15 min influx experiments are presented in Figure 2. The non-linear pattern of these plots let us to distinguish at least two systems for  $\text{Cs}^+$  uptake depending on the  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$ . In the range of  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  comprised between 0.1 and 200  $\mu\text{M}$ , kinetics parameters (Table 3) were estimated by linear regression on the Eadie-Hofstee plots for the three  $\text{K}^+$ -conditions. In  $\text{K}^+$ -starved plants (10  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ -supply), we observed a drastic reduction of  $K_m$  that signs a higher affinity of the roots transport system for  $\text{Cs}^+$ . The slight increase of  $V_{\text{max}}$ , which represent maximal rate of  $\text{Cs}^+$  influx when the uptake system is saturated, can be interpreted as a higher number of transporters with ability to transport  $\text{Cs}^+$  in the low- $\text{K}^+$  condition. The well-known positive regulation of high-affinity transporters encoding gene expression, in particular *AtHAK5*, by low  $\text{K}^+$  supply likely contributes to this effect of  $\text{K}^+$  on both  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$ . Additionally, early study in excised roots of winter wheat (Shaw & Bell, 1989) described a dual uptake mechanism for  $\text{Cs}^+$  uptake in the global high-affinity range ( $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  below 200  $\mu\text{M}$ ). The high-affinity HAK5 carrier contributing in this dual uptake system specifically for low  $\text{K}^+$  condition, this could explain the lower  $R^2$  obtained for  $\text{K}^+$ -starved plants in our experiments (Table 3).

**Table 3: Estimation of  $\text{Cs}^+$  influx kinetic parameters using Eadie-Hofstee plot for data from 15 min influx assays.** Uncertainties on parameters estimation by linear regression are indicated in brackets. In order to avoid absurd results for kinetics parameters, some extreme external  $\text{Cs}^+$  concentrations ( $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  in the table) had to be removed of the linear regression. The  $R^2$  values are associated with the linear regression represented in Figure 2 (broken lines).

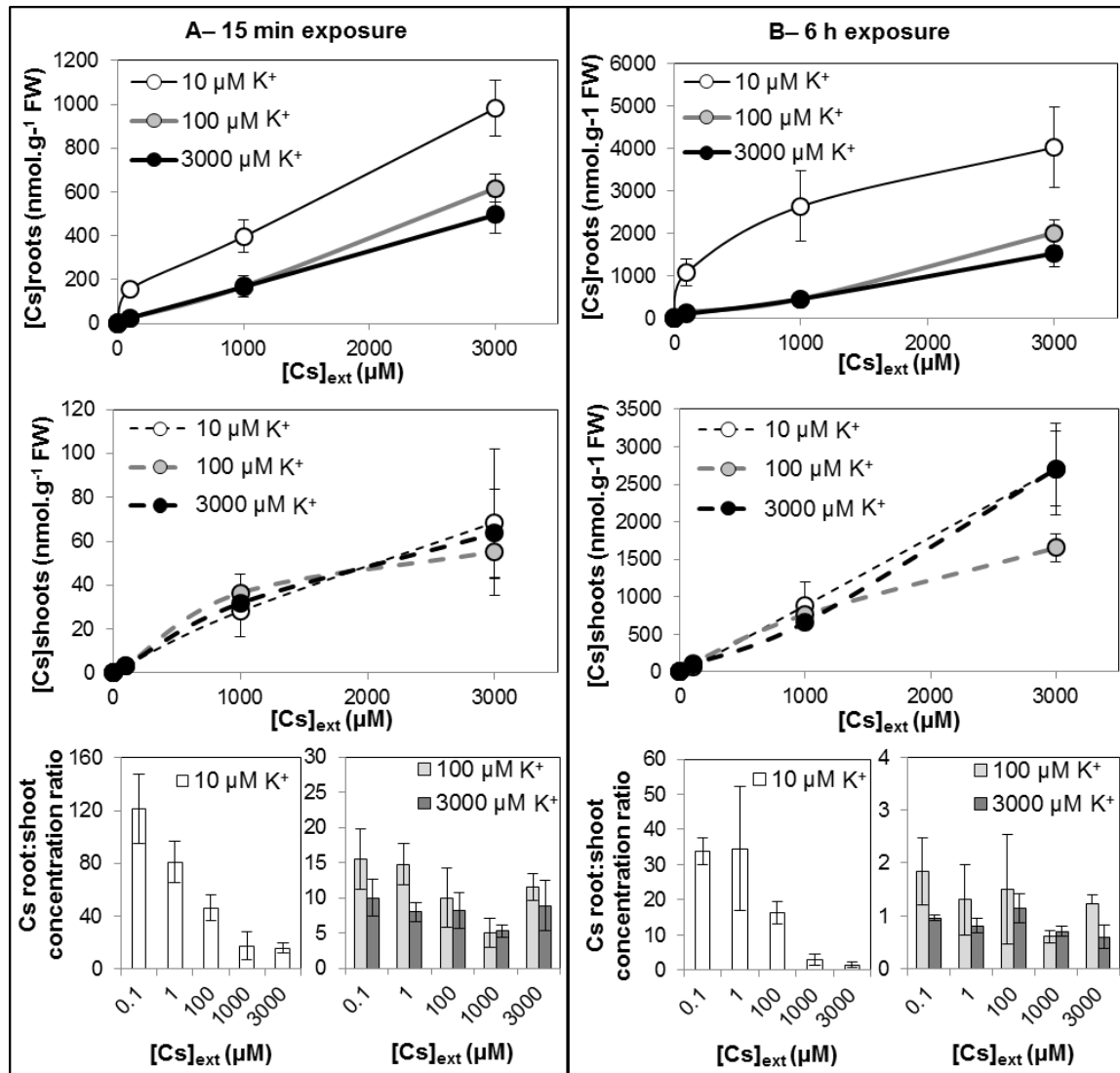
$\text{K}^+$ -treatment ( $\mu\text{M}$ )	$[\text{Cs}]_{\text{ext}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW roots.h $^{-1}$ )	$R^2$
10	0.1-200	28.68 (16.85)	0.61 (0.21)	0.42
100	0.1-100	163.48 (49.68)	0.34 (0.09)	0.78
3000	10-200	214.94 (70.03)	0.41 (0.10)	0.99

### 3.3. Distribution of cesium in roots and shoots

#### 3.3.1. Short-term cesium uptake experiment : evolution of cesium distribution with time and with $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$

Distribution of  $\text{Cs}^+$  between roots and shoots (related to fresh weight) after 15 min and 6 h exposure for the three  $\text{K}^+$ -conditions and a range of  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  are shown in Figure 3.  $\text{Cs}^+$  root:shoot concentration ratio decreased rapidly over time. Thus ratios after 6 h exposure are in average 5 to 10 times lower than after 15 min exposure, depending on the  $\text{K}^+$ -treatment. We also found that, on average, 30 % of the total quantity of  $\text{Cs}^+$  was found in shoots after only 15 min of exposure in the highest  $\text{K}^+$ -conditions (data not shown) suggesting that  $\text{Cs}^+$  is highly mobile in these conditions. In contrast,  $\text{Cs}^+$  root:shoot concentration ratio is up to ten times higher for  $\text{K}^+$ -starved plant compared to the highest  $\text{K}^+$ -conditions and between 3 and 20 % of  $\text{Cs}^+$  were found in shoots in this condition depending on  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$ . Interestingly,  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  seems to affect  $\text{Cs}^+$  root:shoot concentration ratio only for the 10  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ -condition. In this condition, translocation of  $\text{Cs}^+$  from the root to the shoot is higher when  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  increases.

These data suggest that  $\text{Cs}^+$  translocation is mediated by very efficient systems which could be inhibited by decrease of  $\text{K}^+$  and improved when  $\text{Cs}^+$  concentrations increase in low  $\text{K}^+$  condition.



**Figure 3: Evolution of the distribution of  $\text{Cs}^+$  between roots and shoots across a range of  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  for plants from the short-term influx assays.** Three distinct  $\text{K}^+$ -treatments (10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 3000  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ ) were applied during 5 days before exposure to  $\text{Cs}^+$ . Levels of  $\text{K}^+$  in the pre-culture were maintained during the exposure to  $\text{Cs}^+$ . Plants were exposed during A- 15min or during B- 6 h. Means of at least three different plants are represented with standard deviation.

## 3.3.2. Long-term cesium accumulation experiment

Cs<sup>+</sup> accumulation in roots and shoot tissues after 7 days exposure to 1 μM Cs<sup>+</sup> is given in Table 4 for the three K<sup>+</sup>-treatments. The Cs<sup>+</sup> root:shoot concentration ratio is 8.9 (SD=0.8), 1.6 (SD=0.4) and 0.9 (SD=0.2) in the 10 μM, 100 μM and 3000 μM K<sup>+</sup>-condition respectively. For the highest K<sup>+</sup>-conditions, these values are comparable with the root:shoot concentration ratio obtained after 6 h exposure to 1 μM Cs suggesting that equilibrium between roots and shoot Cs<sup>+</sup> content occurs quickly during the first hours. This equilibrium between Cs<sup>+</sup> concentrations in roots and shoots likely involves both translocation and recirculation mechanisms. Indeed, previous study on Cs<sup>+</sup> circulation in spinach indicates that about 85 % of Cs<sup>+</sup> accumulated in shoots is recirculating to the roots under certain conditions (Buysse et al., 1995).

**Table 4: Cs<sup>+</sup> accumulation in Col-0 exposed during 7 days to nutrient solution containing 1 μM Cs<sup>+</sup> and three distinct K<sup>+</sup> concentrations.** *DF*(Cs) is the discrimination factor calculated for Cs<sup>+</sup> with Eq.3. Values are mean of at least six different plants with standard deviation in brackets. Result of the ANOVA analysis is indicated in the last line. Different letters in bold indicate significant differences between means (Tuckey post-hoc test, p-value < 0.05).

K <sup>+</sup> -treatment (μM)	Cs <sup>+</sup> shoot (nmol.g <sup>-1</sup> FW)	Cs <sup>+</sup> roots (nmol.g <sup>-1</sup> FW)	Cs <sup>+</sup> whole plant (nmol.g <sup>-1</sup> FW)	Plant <i>DF</i> (Cs)
10	0.34 (0.04) <b>a</b>	3.08 (0.60) <b>a</b>	0.98 (0.10) <b>a</b>	0.37 (0.06) <b>a</b>
100	0.17 (0.02) <b>b</b>	0.28 (0.08) <b>b</b>	0.21 (0.03) <b>b</b>	0.54 (0.08) <b>b</b>
3000	0.01 (0.0007) <b>c</b>	0.01 (0.002) <b>c</b>	0.01 (0.0006) <b>c</b>	0.54 (0.03) <b>b</b>
K <sup>+</sup> -treatment effect	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>

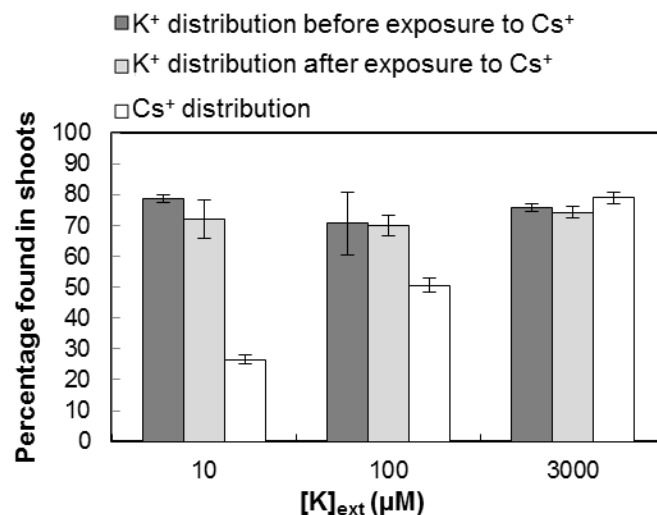
As in short-term influx experiments, fresh weight-based Cs<sup>+</sup> concentration remains globally higher in roots than in shoots of Col-0. This result is consistent with previous studies on different plant species (see the review by Zhu & Smolders (2000)) but reasons for higher Cs<sup>+</sup> accumulation in roots than in shoots remain unclear. As far as we know, limitation of Cs<sup>+</sup> storage in the vacuole which could enhance recirculation from the shoots to the roots has not been proven yet. Another explanation is that Cs<sup>+</sup> adsorbed on the root surface could be a factor of discrepancies between roots and shoot Cs<sup>+</sup> concentration. Roots are exposed to external Cs<sup>+</sup> whereas Cs<sup>+</sup> in shoots comes from roots only. Furthermore, some authors suggest that larger amount of Cs<sup>+</sup> distributes in cell wall (and free space) at low external K<sup>+</sup> concentration due to lower competition for adsorption site on the root surface (Zhu et al., 1999). This could explain why differences between Cs<sup>+</sup> roots and shoot concentrations are reduced when external K<sup>+</sup> concentration increases.

K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> do not display the same distribution pattern: shoots contain around 75% of the total amount of K<sup>+</sup> whereas shoots contain between 25 and 80% of the total amount of Cs<sup>+</sup> depending on the K<sup>+</sup>-treatment (Figure 4). When plants are K<sup>+</sup>-starved, Cs<sup>+</sup> distribution highly differs from K<sup>+</sup> distribution.

In accordance with others studies on different plant species (Buysse et al., 1996), we observed that the Cs<sup>+</sup> root:shoot concentration ratio in *A. thaliana* is higher when plants are K<sup>+</sup>-starved. By analogy with adjustment of K<sup>+</sup> distribution under low-K<sup>+</sup> supply condition in *A. thaliana*, the decrease of the part of total Cs<sup>+</sup> allocated to the shoots could be the result of two distinct mechanisms:

- (i) Limitation of  $\text{Cs}^+$  loading in xylem for translocation from roots to the shoots. The  $\text{K}^+$ -outward rectifying channel SKOR, expressed in root stellar tissues (pericycle and xylem parenchyma) and mediating  $\text{K}^+$  loading into the xylem sap (Gaymard et al., 1998), is down-regulated by low external  $\text{K}^+$  concentration (Pilot et al., 2003). Subsequently, loading of  $\text{K}^+$  in the xylem is reduced in low- $\text{K}^+$  condition. Expressed in *Xenopus* oocytes, AtSKOR displays a permeability to  $\text{Cs}^+$  (Gaymard et al., 1998) but its role in  $\text{Cs}^+$  transport remains unknown. Taking these previous findings with distribution pattern of  $\text{Cs}^+$  described here, it is tempting to speculate that inhibition of SKOR at low- $\text{K}^+$  could also limit  $\text{Cs}^+$  transport from roots to shoots. It is worth pointing out that modifications of internal  $\text{K}^+$  fluxes with external  $\text{K}^+$  concentrations are not significant in our experiments maybe due to the high  $\text{K}^+$  content of the plant before treatment with low- $\text{K}^+$  supply.
- (ii) Higher redistribution of  $\text{Cs}^+$  from the shoots to the roots via the phloem sap.

The decrease of  $\text{Cs}^+$  allocated to the shoots in low- $\text{K}^+$  condition could also be linked to the global increase of  $\text{Cs}^+$  content in plant. Indeed, preferential distribution in roots when plants accumulate high amount of  $\text{Cs}^+$  might reflect the limit of  $\text{Cs}^+$  storage and/or translocation in shoots together with the part of  $\text{Cs}^+$  adsorbed in roots mentioned above which is not available for translocation and which is taking account in roots  $\text{Cs}^+$  concentration calculation.



**Figure 4: Comparison between  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$  distribution in plants exposed during 7 days to a nutrient solution containing 1  $\mu\text{M}$   $\text{Cs}^+$  and three distinct  $\text{K}^+$  concentrations.** Percentage was calculated by dividing the quantity of element found in shoots by the quantity found in the whole plant.  $\text{K}^+$  distribution before exposure to  $\text{Cs}^+$  was measured on non-exposed plants from the same bulk than plants used for the  $\text{Cs}^+$  exposure assay. Means of at least four different plants are represented with standard deviation.

### 3.4. Discrimination between potassium and cesium

Discrimination factor ( $DF$ , Eq.3) values calculated for plants from the long-term exposure experiments are less than unity whatever the external  $\text{K}^+$  level (Table 4), which means that in any case  $\text{K}^+$  is more efficiently absorbed than  $\text{Cs}^+$ , as shown in most previous studies (Zhu & Smolders, 2000 and references therein).  $DF(\text{Cs})$  is significantly lower for the 10  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ -condition indicating a



stronger discrimination against  $\text{Cs}^+$  for  $\text{K}^+$ -starved plant. Interestingly, if only one system involved in K/Cs uptake operated for all  $\text{K}^+$  concentrations with a constant selectivity, we would have a reduction of discrimination against  $\text{Cs}^+$  at low  $\text{K}^+$  level due to the lowest competition between the two in the external medium. Decrease of discrimination against  $\text{Cs}^+$  for lower  $\text{K}^+$  level was observed for spring wheat (Smolders et al., 1996) but previous study on *A. thaliana* indicates the same result that we obtained here. Thereby, Kanter et al. (2010) recorded higher discrimination against  $\text{Cs}^+$  for the lowest  $\text{K}^+$  concentration.

A part of the effects of  $\text{K}^+$ -supply on plant  $DF(\text{Cs})$  can be imputed on the plural  $\text{Cs}^+$  uptake system involving transporters with different selectivity and with activity regulated by  $\text{K}^+$  concentrations and membrane potential. For example,  $\text{K}^+$  deprivation affects positively expression of *AtHAK5* gene which is a major contributor to  $\text{K}^+$  uptake under very low and low- $\text{K}^+$  conditions and a major pathway for  $\text{Cs}^+$  uptake in certain conditions.

It has been proposed that, conversely to channels functioning at high level of  $\text{K}^+$ , high-affinity carriers should display low discrimination against  $\text{Cs}^+$  (Zhu, 2001). It is worth pointing out that, in our experiments, the  $DF(\text{Cs})$  value is lower for  $\text{K}^+$ -starved plants indicating a higher discrimination against  $\text{Cs}^+$  at low level of  $\text{K}^+$ . From a molecular point of view, this result remains unclear. Otherwise, we think that the calculation of  $DF(\text{Cs})$  could be affected by bias.  $\text{K}^+$ -content of plants tested results from 25 days of culture in sufficient  $\text{K}^+$  supply prior to  $\text{K}^+$ -treatments. This pre-culture in sufficient- $\text{K}^+$  conditions could lead to a  $\text{K}^+$ -content higher than expected for plants supplied with  $10 \mu\text{M}$   $\text{K}^+$  and therefore a ratio  $([\text{Cs}]/[\text{K}])_{\text{plant}}$  "underestimated". Potential differences in  $\text{Cs}^+/\text{K}^+$  ratio at the root surface compared to bulk solution as a resultant of uptake kinetics of both species should also be addressed as factor of discrepancy as stated in Smolders et al. (1996).

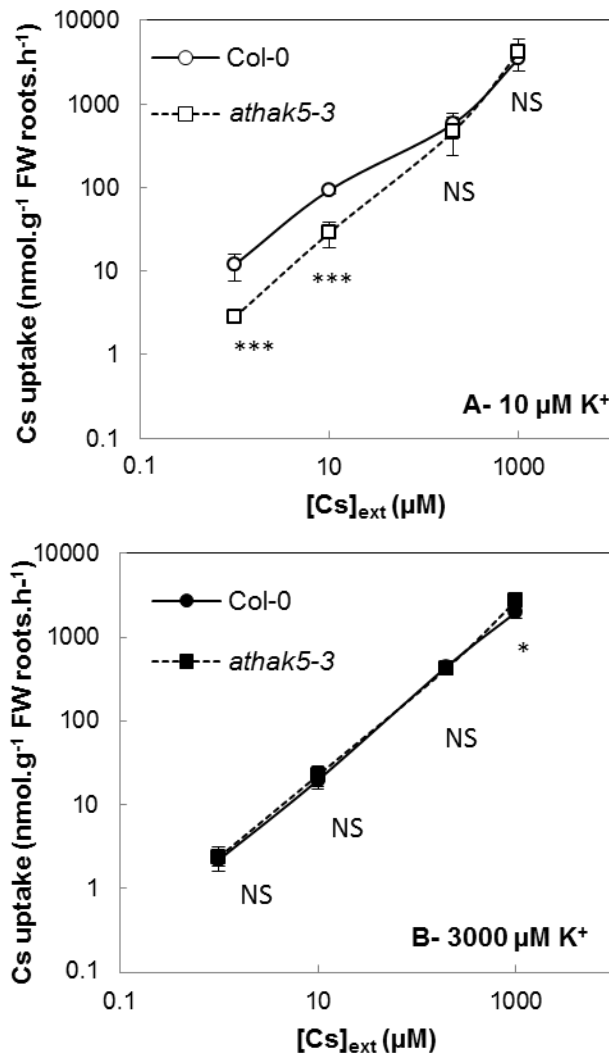
### **3.5. Comparison between *athak5-3* mutant line and *Col-0* wildtype**

We used a T-DNA insertion line in *AtHAK5* to study the effect of  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  and  $[\text{K}]_{\text{ext}}$  on HAK5-mediated  $\text{Cs}^+$  influx. PCR amplification as described in the Material and Method section confirmed the homozygosity of the T-DNA insertion in the mutant line used.

No significant differences on  $\text{Cs}^+$  influx between *athak5-3* mutant line and *Col-0* wildtype were detected for  $\text{K}^+$ -replete plants ( $3000 \mu\text{M}$   $\text{K}^+$ -condition, Figure 5-B). This result can be explained by the expression pattern of *HAK5* which is up-regulated by  $\text{K}^+$ -starvation and down-regulated after  $\text{K}^+$ -resupply (Armengaud et al., 2004).

As expected for  $\text{K}^+$ -starved plant ( $10 \mu\text{M}$   $\text{K}^+$ -condition, Figure 5-A),  $\text{Cs}^+$  uptake is lower in the *athak5-3* mutant due to the lack of HAK5 transporter. However, significant differences between *athak5-3* mutant and *Col-0* disappear for high concentration of  $\text{Cs}^+$ . According to the data, between 76% and 69% of the total  $\text{Cs}^+$  uptake is mediated by HAK5 pathway for  $1 \mu\text{M}$  and  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  while contribution of HAK5 to  $\text{Cs}^+$  uptake is negligible for high external  $\text{Cs}^+$  concentration (above  $200 \mu\text{M}$ ). In short-term uptake experiments on 14 days-old seedlings, Qi et al. (2008) measure only a 20% decrease of  $\text{Cs}^+$  influx in *hak5* mutants compare to wildtype. Based on result obtained here, this may be partly due to the high  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) they applied during the influx assay (with  $500 \mu\text{M}$  of  $\text{K}^+$  supply). In long-term exposure experiments (7 days) under  $\text{K}^+$ -sufficient conditions, it has been shown that  $\text{Cs}^+$  induces *AtHAK5* expression maybe due to  $\text{K}^+$ -deficiency caused by  $\text{Cs}^+$  (Adams et al., 2013) and, up to now,  $\text{Cs}^+$  has not been shown to inhibit HAK5 transporter. Therefore, specific blockade of HAK5-mediated pathway for  $\text{Cs}^+$  uptake when  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  is high remains unclear. Conversely,

we think that other systems involved in  $\text{Cs}^+$  uptake, which can be efficient under low- $\text{K}^+$  and high- $\text{Cs}^+$  conditions, may exist. These systems operating at high  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  could mediate  $\text{Cs}^+$  uptake in *athak5-3* mutant and explain why we do not observe differences between plants lacking HAK5 and wildtype under this condition.



**Figure 5:  $\text{Cs}^+$  uptake measured over 15 min for the wild-type Col-0 and the mutant line *athak5-3*.**

Two distinct levels of  $\text{K}^+$  were used during pre-culture and during exposure to  $\text{Cs}^+$ : A-10  $\mu\text{M}$  and B-3000  $\mu\text{M}$ . Means of at least five different plants are represented with standard deviation. Student t-tests were performed to compare  $\text{Cs}^+$  uptake between *hak5-3* and Col-0 for each  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  (NS, Non-significant and \*, \*\*\*  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$  respectively).

Several studies indicate that Non-Selective Cation Channels (NSCC) (also named Voltage-Independent Cation Channels, VICC, and encoding by *CNGC* and *GLR* genes) are very promising candidates for channel-mediated  $\text{Cs}^+$  transport pathway (White & Broadley, 2000 and references therein; Hampton et al., 2005). According to the model described by White and Davenport (2002) for permeation of monovalent cations through the VIC channels, at most two cations can bind simultaneously and interact within the pore. Applied to  $\text{Cs}^+$  and  $\text{K}^+$ , these interactions can result in the inhibition of  $\text{Cs}^+$  influx by  $\text{K}^+$  and therefore, this model predicts the greatest  $\text{Cs}^+$  influx through VIC channels when  $[\text{K}]_{\text{ext}}$  is low and  $[\text{Cs}]_{\text{ext}}$  is high (White & Broadley, 2000). This pattern is consistent with the system

described above to explain the *athak5-3* mutant and wildtype convergence with increasing external  $\text{Cs}^+$  concentration.

In *Arabidopsis*, *HAK5* gene belongs to the *HAK/KUP/KT* family with 12 other genes (Mäser et al., 2001). The knowledge about their role in  $\text{Cs}^+$  and  $\text{K}^+$  transport is still fragmentary but there are some very promising candidates for  $\text{Cs}^+$  pathway. Besides *AtHK5*, *AtKUP9* expressed in *E. coli* mediates  $\text{Cs}^+$  transport (Kobayashi et al., 2010). Further investigations are thus needed to understand the role of each *HAK/KUP/KT* transporter but up to now this family appears as the dominant  $\text{Cs}^+$  transport pathway for *A. thaliana* under low- $\text{K}^+$  supply.

#### 4. Conclusions

As for  $\text{K}^+$  uptake,  $\text{Cs}^+$  transport is mediated by both carriers and channels. Under low  $\text{K}^+$  condition (10  $\mu\text{M}$ ), we measured an increase of the affinity (calculated using Michaelis-Menten equation) of *Arabidopsis thaliana* roots for  $\text{Cs}^+$ . Additionally we observed a decrease of the transfer factor calculated for  $\text{Cs}^+$  with  $\text{Cs}^+$  increasing in the external medium. This result about the effect of  $\text{Cs}^+$  concentration on  $\text{Cs}^+$  uptake efficiency suggests that different mechanisms operate depending on  $\text{Cs}^+$  concentration in the medium or/and mechanisms operating at low- $\text{Cs}^+$  external concentration are saturated at high  $\text{Cs}^+$  concentration.

Taking together, results on affinity and transfer factor are consistent with the known  $\text{Cs}^+$  uptake mediated by the high-affinity  $\text{K}^+$  carrier *AtHAK5* under  $\text{K}^+$ -starvation. Testing a mutant lacking this carrier, we found that discrepancies between wildtype and *athak5-3* disappear when  $\text{Cs}^+$  in the external medium is high (above 100  $\mu\text{M}$ ). Based on predicted functioning of this type of channels, we suggest that non-selective cation channels could mediate  $\text{Cs}^+$  influx in low  $\text{K}^+$  condition and high external  $\text{Cs}^+$  concentrations.

Affinity of *A. thaliana* roots for  $\text{Cs}^+$  did not change substantially between intermediate and high level of  $\text{K}^+$  (100 and 3000  $\mu\text{M}$ ). Varying the  $\text{Cs}^+$  concentration in the external medium, we found that  $\text{Cs}^+$  has no significant effect on transfer factor calculated for  $\text{Cs}^+$  when  $\text{K}^+$  is high. These results are consistent with the supposed channel-mediated pathway for  $\text{Cs}^+$  uptake under  $\text{K}^+$ -sufficient conditions.

Studying the effect of  $\text{K}^+$ -supply on  $\text{Cs}^+$  distribution between roots and shoots, we found that the part of  $\text{Cs}^+$  allocated to the shoots was lower under  $\text{K}^+$ -deprivation. As the total  $\text{Cs}^+$  accumulated into the plant is higher in this condition, a part of the impairment of  $\text{Cs}^+$  translocation could be explained by a limitation of  $\text{Cs}^+$  storage into shoots. Additionally, we suggest that inhibition of *SKOR*-mediated  $\text{K}^+$  translocation at low- $\text{K}^+$  supply could also limit  $\text{Cs}^+$  translocation. However, further experiments on *skor Arabidopsis* mutant for example are needed to better understand the role of  $\text{K}^+$  channels in  $\text{Cs}^+$  translocation.

Finally, recent identification of transporters involved in  $\text{Cs}^+$  uptake and functional studies on  $\text{K}^+$  transporters let us to discuss kinetics data in a molecular and mechanistic way. The understanding of mechanisms leading to  $\text{Cs}^+$  uptake by plants is essential for modelling approaches to predict the success of phytoremediation strategies for example. However, beside the plant part, integration of the soil part to predict  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$  concentration around the roots is also needed for a higher accuracy of these modelling approaches.

## Acknowledgments

This work was conducted within a PhD cofunded by IRSN and CEA and has benefited from funds of the French government, managed by the Agence Nationale de la Recherche, originating from the funding program "Investissement d'Avenir" under the reference ANR-11-RSNR-0005.

## References

- Adams, E., Abdollahi, P., Shin, R., 2013. Cesium inhibits plant growth through jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 4545-59.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., Rubio, F., 2011. Root K<sup>+</sup> acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1603-12.
- Armengaud, P., Breitling, R., Amtmann, A., 2004. The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiol.* **136**, 2556-76.
- Avery, S.V., 1996. Fate of caesium in the environment: Distribution between the abiotic and biotic components of aquatic and terrestrial ecosystems. *J. Environ. Radioact.* **30**, 139-71.
- Broadley, M.R., Escobar-Gutiérrez, A.J., Bowen, H.C., Willey, N.J., White, P.J., 2001. Influx and accumulation of Cs<sup>+</sup> by the akt1 mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. lacking a dominant K<sup>+</sup> transport system. *J. Exp. Bot.* **52**, 839-44.
- Buysse, J., Van den Brande, K., Merckx, R., 1995. The distribution of radiocesium and potassium in spinach plants grown at different shoot temperatures. *J. Plant Physiol.* **146**, 263-267.
- Buysse, J., Van Den Brande, K., Merckx, R., 1996. Genotypic differences in the uptake and distribution of radiocaesium in plants. *Plant Soil* **178**, 265-71.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe B, Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.-B., Sentenac, H., 1998. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647-55.
- Hampton, C.R., Bowen, H.C., Broadley, M.R., Hammond, J.P., Mead, A., Payne, K.A., Pritchard, J., White, P.J., 2004. Cesium toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **136**, 3824-3837.
- Hampton, C., Broadley, M., White, P., 2005. Short review: the mechanisms of radiocaesium uptake by *Arabidopsis* roots. *Nukleonika* **50**, 3-8.
- Haruta, M., & Sussman, M.R., 2012. The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **158**, 1158-71.
- Hedrich, R., 2012. Ion channels in plants. *Physiol. Rev.* **92**, 1777-811.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., Sussman, M.R., 1998. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918-21.
- Kanter, U., Hauser, A., Michalke, B., Dräxl, S., Schäffner, A.R., 2010. Caesium and strontium accumulation in shoots of *Arabidopsis thaliana*: genetic and physiological aspects. *J. Exp. Bot.*, **erq213**.
- Kobayashi, D., Uozumi, N., Hisamatsu, S.I., Yamagami, M., 2010. AtKUP/HAK/KT9, a K<sup>+</sup> transporter from *Arabidopsis thaliana*, mediates Cs<sup>+</sup> uptake in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **74**, 203-5.
- Kobayashi, D., Okouchi, T., Yamagami, M., Shinano, T., 2014. Verification of radiocesium decontamination from farmlands by plants in Fukushima. *J. Plant Res.* **127**, 51-6.
- Kochian, L.V., & Lucas, W.J., 1982. Potassium transport in corn roots I. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. *Plant Physiol.* **70**, 1723-31.

- Kondo, M., Makino, T., Eguchi, T., Goto, A., Nakano, H., Takai, T., Arai-Sano, Y., Kimura, T., 2015. Comparative analysis of the relationship between Cs and K in soil and plant parts toward control of Cs accumulation in rice. *Soil Sci. Plant Nutr.* **61**, 144-155.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., Guerinot, M.L., 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**, 1646-67.
- Middleton, L.J., Handley, R., Overstreet, R., 1960. Relative uptake and translocation of potassium and cesium in barley. *Plant Physiol.* **35**, 473-495.
- Murashige, T., & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-97.
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Chérel, I., Sentenac, H., 2003. Regulated expression of Arabidopsis Shaker K<sup>+</sup> channel genes involved in K<sup>+</sup> uptake and distribution in the plant. *Plant Mol. Bio.* **51**, 773-87.
- Prorok, V.V., Dacenko, O.I., Bulavin, L.A., Poperenko, L.V., White, P.J., 2016. Mechanistic interpretation of the varying selectivity of Cesium-137 and potassium uptake by radish (*Raphanus sativus* L.) under field conditions near Chernobyl. *J. Environ. Radioact.* **152**, 85-91.
- Qi, Z., Hampton, C.R., Shin, R., Barkla, B.J., White, P.J., Schachtman D.P., 2008. The high affinity K<sup>+</sup> transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K<sup>+</sup> concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **59**, 595-607.
- Rubio, F., Guillermo, E., Rodríguez-Navarro, A., 2000. Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol. Plant.* **109**, 34-43.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., 2008. Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K<sup>+</sup> uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiol. Plant.* **134**, 598-608.
- Sacchi, G.A., Espen, L., Nocito, F., Cocucci, M., 1997. Cs<sup>+</sup> uptake in subapical maize root segments: Mechanism and effects on H<sup>+</sup> release, transmembrane electric potential and cell pH. *Plant Cell Physiol.* **38**, 282-9.
- Shaw, G., & Bell, J., 1989. The kinetics of caesium absorption by roots of winter wheat and the possible consequences for the derivation of soil-to-plant transfer factors for radiocaesium. *J. Environ. Radioact.* **10**, 213-31.
- Smolders, E., Kiebooms, L., Buysse, J., Merckx, R., 1996. 137Cs uptake in spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Tonic) at varying K supply. *Plant Soil* **181**, 211-20.
- Waegeneers, N., Camps, M., Smolders, E., Merckx, R., 2001. Genotypic effects in phytoavailability of radiocaesium are pronounced at low K intensities in soil. *Plant Soil* **235**, 11-20.
- White, P.J., Broadley, M.R., 2000. Tansley Review No. 113. *New Phytol.* **147**, 241-56.
- White, P.J., Davenport, R.J., 2002. The voltage-independent cation channel in the plasma membrane of wheat roots is permeable to divalent cations and may be involved in cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Plant Physiol.* **130**, 1386-95.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A., Wilkins, B., 1999. Effects of external potassium supply on compartmentation and flux characteristics of radiocaesium in intact spring wheat roots. *Ann. Bot.* **84**, 639-44.
- Zhu, Y.-G., & Smolders, E., 2000. Plant uptake of radiocaesium: a review of mechanisms, regulation and application. *J. Exp. Bot* **51**, 1635-45.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A., Wilkins, B., 2000. Effect of potassium starvation on the uptake of radiocaesium by spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Tonic). *Plant Soil* **220**, 27-34.

Zhu, Y.-G., 2001. Effect of external potassium (K) supply on the uptake of  $^{137}\text{Cs}$  by spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Tonic): a large-scale hydroponic study. *J. Environ. Radioact.* **55**, 303-14.



## **CHAPITRE IV**

### **ÉTUDE DU RÔLE DE LA FAMILLE DE TRANSPORTEURS KUP/HAK/KT DANS LE TRANSPORT DE CÉSIIUM CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA***



Pour de fortes concentrations en césium (au-delà de 200  $\mu\text{M}$  d'après les résultats présentés dans le Chapitre III), non représentatives des teneurs généralement mesurées dans l'environnement, l'absorption de césium serait principalement assurée par des canaux cationiques non sélectifs (codés par des gènes de la famille des *CNGC* et des *GLR*). En revanche, c'est la contribution des transporteurs de type KUP/HAK/KT qui est prépondérante dans des conditions où la concentration en césium est faible (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ), conditions se rapprochant des conditions environnementales. Ainsi, le transporteur potassique haute-affinité HAK5, appartenant avec 12 autres transporteurs à la famille des KUP/HAK/KT, est impliqué dans l'absorption de césium chez *A. thaliana* mais uniquement quand les conditions en potassium sont faibles. Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre III**, l'inactivation du gène *HAK5* chez la lignée mutante *hak5-3* ne suffit pourtant pas à inhiber totalement l'absorption de césium. J'ai donc décidé de d'orienter ma recherche de transporteurs impliqués dans les flux de césium sur les autres membres de la famille des *KUP/HAK/KT*. Cette famille de gènes est en effet supposée coder des transporteurs peu spécifiques du potassium et donc susceptibles de prendre en charge le transport de cations analogues du  $\text{K}^+$  comme  $\text{Cs}^+$ .

#### **IV.1 – ANALYSE DES DIFFERENTS GENES *KUP/HAK/KT* CHEZ *A. THALIANA***

Cette section est liée à la partie dédiée à la famille des *KUP/HAK/KT* dans le **Chapitre I (Section I.5.6)**. Les données *in silico* et d'expression des différents gènes de cette famille ont été analysées dans le but de mettre en évidence des candidats en particulier présentant des caractéristiques intéressantes pour le transport de  $\text{Cs}^+$ .

##### **IV.1.1 - Identification d'éléments Cis-régulateurs sur les séquences promotrices des *KUP/HAK/KT***

Les mécanismes d'adaptation des plantes à des stress nutritifs impliquent des modifications sur les protéines mais également des changements en amont dans le mécanisme de leur synthèse comme des changements dans le patron de transcription. La régulation transcriptionnelle joue ainsi un rôle majeur dans l'activation ou la suppression de l'expression d'un gène. A ce niveau, la régulation est largement assurée par le promoteur du gène et les éléments cis-régulateurs qui le composent.

Le type de protéines régulées en réponse à un stress nutritif correspond en grande partie à des transporteurs de nutriments (Amtmann & Blatt, 2009 ; Gojon et al., 2009). Dans la séquence promotrice de *HAK5*, différents motifs cis-régulateurs seraient ainsi impliqués dans la régulation de l'expression de ce gène en réponse à de faibles niveaux de  $\text{K}^+$ . Par exemple, un motif GCC-box et un motif ERE (Ethylene Responsive) seraient des sites de liaisons avec le facteur de transcription RAP2.11 impliqué dans le contrôle de l'expression du gène *HAK5* en réponse à une carence en  $\text{K}^+$  (Kim et al., 2012).

Nous avons comparé *in silico* les promoteurs des 13 *KUP/HAK/KT* chez *A. thaliana* afin de mettre en évidence des motifs similaires à ceux retrouvés pour *HAK5* et qui ont été démontrés comme impliqués dans la réponse à un stress potassique par exemple. L'objectif est de déterminer si des similarités existent dans la régulation de l'expression des différents *KUP*, certains motifs cis-régulateurs étant reliés à des facteurs de transcription dont les rôles sont partiellement connus.

La base de donnée AGRIS AtCis Db (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>) permet de prédire les promoteurs des gènes codants chez *A. thaliana* et d'identifier les motifs cis-régulateurs supposés et avérés sur ces séquences promotrices (Davuluri et al., 2003 ; Palaniswamy et al., 2006 ; Yilmaz et al., 2011). Nous avons également analysé les séquences promotrices avec PlantCARE (Cis-Acting Regulatory Element, Lescot et al., 2002, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) afin de confronter les deux outils qui n'utilisent pas les mêmes méthodes. Il est à noter que le motif GCC-box modifié décrit par Kim et al. (2012) comme étant un des sites de liaison de RAP2.11 sur le promoteur de *HAK5* n'est pas reconnu par ces outils à cause de sa divergence avec la séquence consensus GCC-box (GCCGGC dans le promoteur de *HAK5* au lieu de GCCGCC).

Plus de 72 motifs cis-régulateurs putatifs ont été identifiés en analysant les promoteurs des *KUP/HAK/KT* prédits par AGRIS AtCis. Parmi ces motifs, un grand nombre seraient liés à des réponses à la lumière (lbox, T-box, G-box... au total 20 motifs différents identifiés sur PlantCARE). Il est difficile d'interpréter ce résultat tant les réponses à la lumière chez les plantes sont complexes. De profonds changements du transcriptome ont ainsi été montré chez *Arabidopsis* en réponse à la lumière (López-Ochoa et al., 2007).

Des motifs GCC-box n'ont été identifiés que pour 3 gènes (*HAK5*, *KUP2* et *KUP10*). En revanche, l'analyse des promoteurs des différents *KUP/HAK/KT* révèle la présence de plusieurs cis-éléments liés à des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de phytohormones (éthylène, jasmonates, cytokinines...). Ces cis-éléments (ERE, ABRE, CGTCA-motif, TGACG-motif, GARE-motif) pourraient être liés à la régulation de plusieurs *KUP* par le niveau de  $K^+$ , comme ceci a été montré pour *HAK5* (Kim et al., 2012 ; Hong et al., 2013). En effet, les voies de signalisation activées en cas de carence potassique seraient étroitement liées à des phytohormones et plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des phytohormones sont d'ailleurs régulés par le niveau de  $K^+$  (Armengaud et al., 2004 ; Jung et al., 2009 ; Nam et al., 2012 ; Hong et al., 2013).

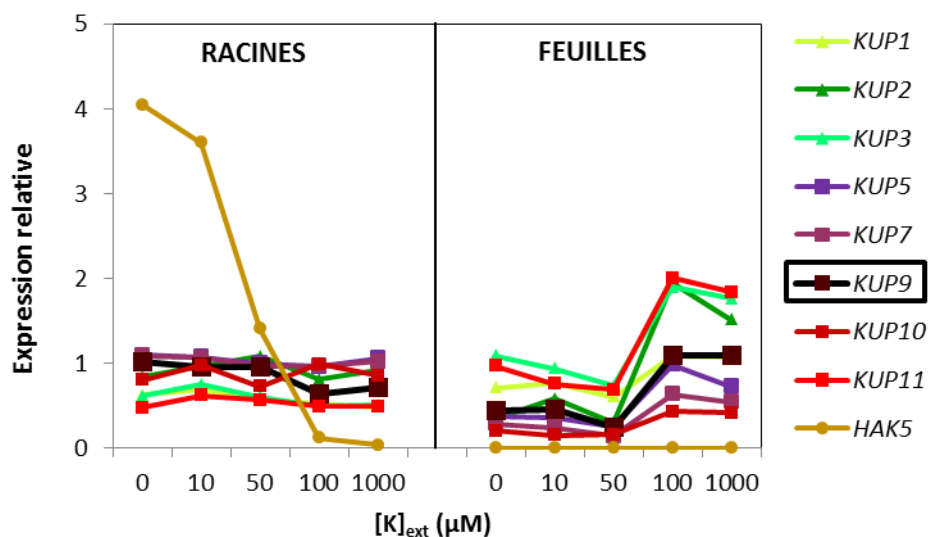
Tous les motifs cis-régulateurs identifiés sur les promoteurs des *KUP/HAK/KT* sont putatifs. Leur identification est le résultat d'une recherche de séquences consensus connues pour être des sites de liaison à des facteurs de transcription (Davuluri et al., 2003). Le rôle de ces facteurs de transcription est parfois décrit dans la littérature, pour d'autres espèces végétales mais surtout pour d'autres gènes que les *KUP/HAK/KT*. Il faut donc garder en tête que ces résultats ne sont pas encore vérifiés expérimentalement mais constituent des pistes intéressantes dans la compréhension de la régulation des *KUP/HAK/KT*.

		ABRE (ABA)	ARF (Auxine)	AtMYC2 (ABA)	AuxRR- core (Auxine)	CE3 (ABA)	CGTCA- motif (MeJA)	DPBF (ABA)	ERE-motif (Ethylène)	GARE-motif (Gibbérelline)	P-Box (Gibbérelline)	TATC-box (Gibbérelline)	TCA- Element (SA)	TGACG- motif (MeJA)	TGA- element (Auxine)
Cluster I	HAK5	1	2		1	1	1	4	1				1	1	
Cluster II	KUP1			2				2	1	1			1		
	KUP3		1												
	KUP4						1							1	
	KUP2	3	1	1			1	2	1	1	1	1		1	
	KUP6	1		2				5	1	1	1				1
	KUP8	1					1	1		1				1	
Cluster III	KUP9		1				2	1		2	1			2	
	KUP10		2	2				3					1		1
	KUP11		1	2			1	4	1				1	1	1
	KUP5	2						3							
	KUP7							1		1					
	KUP12		1					1		2	1		1		

**Tableau IV.1 : Liste des motifs liés à des phytohormones identifiés dans les séquences promotrices des différents KUP/HAK/KT chez *A. thaliana*.** Les chiffres indiquent le nombre d'occurrence de ces motifs dans les promoteurs. Les séquences promotrices sont prédites par AtCis et les motifs sont identifiés par AGRIS AtCis (en bleu) et PlantCARE.

### IV.1.2 – Expression des *KUP/HAK/KT* étudiée par RT-qPCR

Les niveaux d'expression de différents gènes *KUP/HAK/KT* ont été mesurés par l'équipe du CEA chez l'écotype sauvage Col-0 placés dans des milieux nutritifs contenant des niveaux de  $K^+$  variables (Fig.IV.1).



**Figure IV.1 : Niveaux d'expression de différents gènes *KUP* mesurés par RT-qPCR chez Col-0.** Les valeurs sont exprimées relativement au niveau d'expression du gène *ROC3* mesuré dans les mêmes échantillons. Chaque point représente la moyenne de trois réplicats techniques (un seul pool de trois plantes testé trois fois), les écarts-type n'ont pas été représentés pour faciliter la lecture des courbes.

Dans les racines, les niveaux d'expression obtenus pour différents *KUP* sont sensiblement les mêmes. Comme attendu, le gène *HAK5* est fortement exprimé pour les faibles concentrations en potassium ( $[K]_{ext} < 50 \mu M$ ) et il est le seul gène de la famille à afficher une régulation aussi nette par le niveau de potassium.

Dans les feuilles, les niveaux d'expression des différents *KUP* sont plus variables. Certains gènes comme *HAK5* et *KUP10* affichent des niveaux d'expression très faibles comparés par exemple à *KUP1*, *KUP3* et *KUP11*. L'apport de  $K^+$  dans la solution nutritive a tendance à réguler positivement, mais faiblement, le niveau d'expression des différents *KUP*. Au maximum, le niveau d'expression est 4 fois plus élevé à 1000  $\mu M$  qu'à 0  $\mu M$ , résultat obtenu pour le gène *KUP2*.

La présence du motif GCC-box détectées dans les séquences promotrices des gènes *KUP2* et *KUP10* (voir section précédente IV.1.1) n'est pas liée à une régulation de l'expression de ces gènes par le niveau de  $K^+$ . On ne peut donc pas généraliser les résultats obtenus pour le gène *HAK5* : la présence de certains motifs n'est pas strictement liée à une voie de régulation.

### IV.1.3 – Limites des analyses *in silico*

Dans le **Chapitre I (Section I.5.6)**, nous avons vu que différentes bases de données et outils informatiques étaient disponibles pour l'étude des gènes chez *Arabidopsis thaliana*. Chez *A. thaliana*, la comparaison des séquences peptidiques aboutit à une division de cette famille des KUP/HAK/KT en 3-4 clusters phylogénétiques distincts qui semblent regrouper des transporteurs avec des fonctions similaires (par exemple rôle dans la croissance pour le Cluster II). Le transporteur le mieux caractérisé de cette famille, HAK5, est seul dans le Cluster I suggérant qu'il a une fonction bien distincte des autres KUP/HAK/KT.

La localisation d'un transporteur a un lien évident avec son rôle mais pour les KUP/HAK/KT il est difficile d'établir ce lien car ils sont généralement ubiquistes (présence dans les racines et la rosette) et sont parfois retrouvés sur différentes membranes cellulaires (dans la littérature, KUP7 et KUP4 sont décrits à la fois sur le tonoplaste et sur la membrane plasmique). A partir de cette donnée, nous suggérons que les KUP/HAK/KT pourraient avoir un rôle potentiel à la fois dans l'absorption racinaire (déjà démontré pour HAK5), la translocation (potentiellement KUP7) et dans la compartimentation cellulaire (pour les KUP exprimés au niveau du tonoplaste ou des chloroplastes).

Comme HAK5 est le seul transporteur KUP dont les capacités à transporter le césium *in planta* ont été démontrées, nous avons voulu comparer sa structure avec celle des 12 autres KUP (voir paragraphe **Architecture des protéines KUP/HAK/KT** de la **Section I.5.6**). Malheureusement, les connaissances sur les relations structures-fonctions sont encore très partielles pour la famille des KUP/HAK/KT. Malgré tout, nous avons retrouvé une séquence supposée être impliquée dans la sélectivité du transporteur HAK5 (séquence GEGGTFALY) chez la majorité des autres transporteurs de type KUP/HAK/KT suggérant qu'ils sont tous potentiellement non discriminants envers le césium.

A partir d'analyses *in silico* tous les KUP semblent donc avoir un rôle potentiel dans les flux de césium que ce soit dans l'absorption racinaire, la translocation ou la compartimentation cellulaire. Ce type d'analyses ne nous permet pas d'isoler des gènes ayant un plus fort potentiel pour le transport de césium, notamment du fait que le transporteur HAK5 semble issu d'une évolution différente des autres membres de la famille des KUP/HAK/KT chez *A. thaliana*.

### IV.2 – SELECTION DE LIGNEES MUTANTES KUP VALIDES

En parallèle de l'analyse présentée dans la **Section IV.1**, nous avons criblé des lignées mutantes invalidées au niveau de différents gènes *KUP*. Cette approche de génétique inverse est connue et a notamment été utilisée pour mettre en évidence que le canal potassique dominant AKT1 n'était pas impliqué significativement dans les flux de césium (Broadley et al., 2001) au contraire du transporteur HAK5 (Qi et al., 2008).

Les lignées mutantes proviennent de banque de graines et doivent être contrôlées avant utilisation. Nous présenterons dans cette section les différentes lignées mutantes utilisées et leur vérification.

### IV.2.1 - Matériel végétal

Pour la recherche de lignées mutantes, nous avons utilisé la base de données de TAIR avant de localiser *in silico* l'insertion de l'ADN-T dans le génome de ces lignées (outil T-DNA gene mapping tool). Sur les 13 membres de la famille des *KUP/HAK/KT* chez *A. thaliana*, nous avons trouvé des mutants pour 12 gènes au début de ma thèse. Quand cela était possible différents allèles de mutation ont été commandés pour s'assurer que les différences potentielles observées étaient bien dues à l'inactivation du gène *KUP* et non pas à d'autres arrangements génomiques liés à l'insertion de l'ADN-T.

**Tableau IV.2 : Liste des lignées mutantes *kup* utilisées**

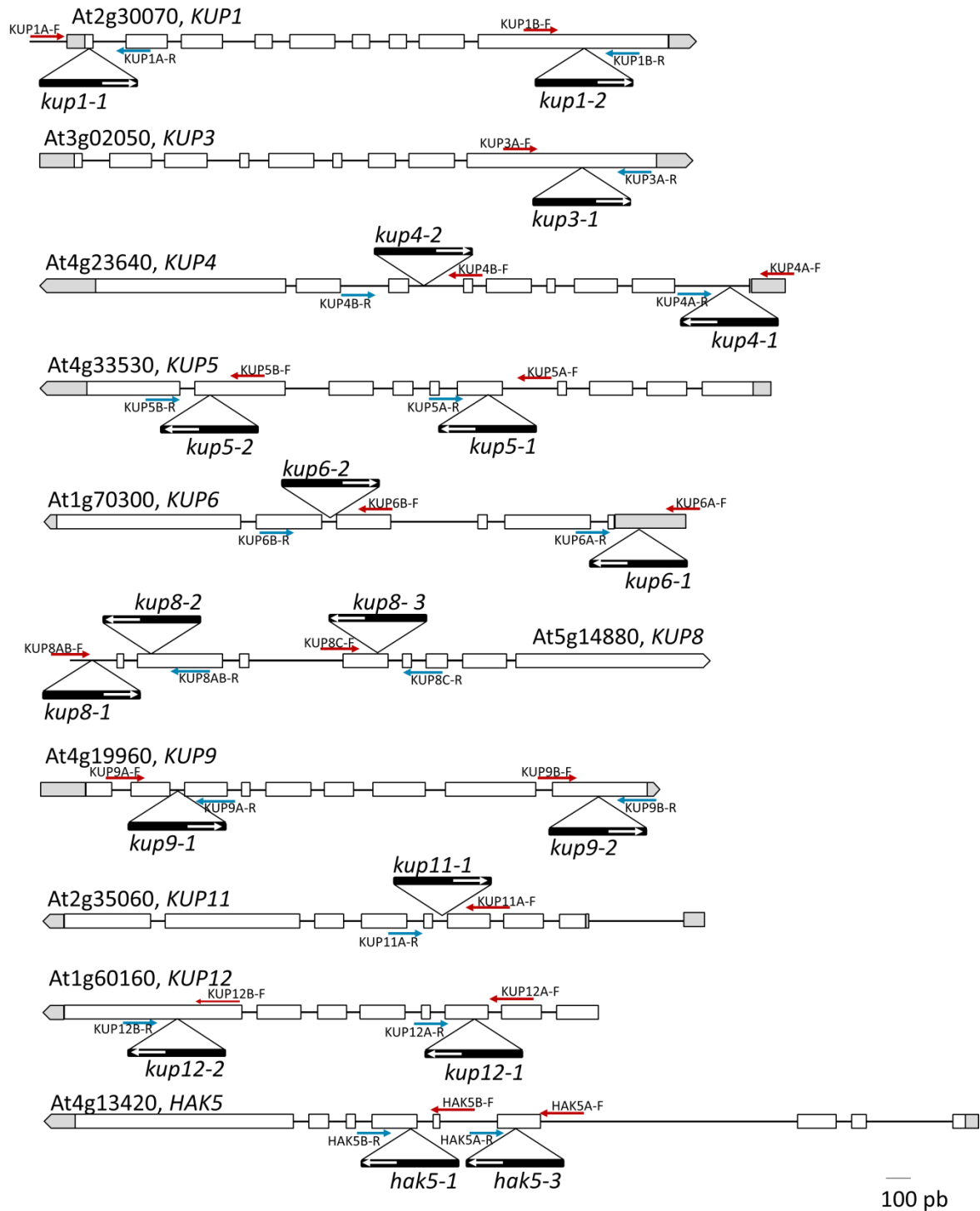
N° NASC	Code SAIL/SALK	Nom de la lignée	Gène invalidé	Fond génétique
N662453	SALK_051343C	<i>kup1-1</i>	At2g30070	Col-0
N861398	<a href="#">SAIL_895_G09</a>	<i>kup1-2</i>		Col-0
N670400	SALK_023287	<i>kup2</i>	At2g40540	
N684052	SALK_055089	<i>kup2</i>		
N671574	SALK_076472C	<i>kup2</i>		
N657864	SALK_002622C	<i>kup3-1</i>	At3g02050	Col-0
N684136	SALK_071644C	<i>kup4-1</i>	At4g23640	Col-0
N586060	SALK_086060	<i>kup4-2</i>		Col-0
N654262	SALK_072850C	<i>kup5-1</i>	At4g33530	Col-0
N654380	SALK_120707C	<i>kup5-2</i>		Col-0
N586950	SALK_086950	<i>kup6-1</i>	At1g70300	Col-0
N862303	<a href="#">SAIL_112_C03</a>	<i>kup6-2</i>		Col-3
N670051	SALK_113560C	<i>kup8-1</i>	At5g14880	Col-0
N859598	SALK_001070	<i>kup8-2</i>		Col-0
N655047	SALK_041357C	<i>kup8-3</i>		Col-0
N862313	<a href="#">SAIL_211_E04</a>	<i>kup9-1</i>	At4g19960	Col-3
N670022	SALK_108080C	<i>kup9-2</i>		Col-0
N671527	SALK_072956C	<i>kup10</i>	At1g31120	
N863396	<a href="#">SAIL_203_G07</a>	<i>kup11-1</i>	At2g35060	Col-3
N656923	SALK_121784C	<i>kup12-1</i>	At1g60160	Col-0
N665909	SALK_045392C	<i>kup12-2</i>		Col-0
N679336	SALK_014177C	<i>hak5-1</i>	At4g13420	Col-0
N672728	SALK_074868C	<i>hak5-3 [1] [2]</i>		

Références : **[1]** Qi et al., 2008 ; **[2]** Rubio et al., 2008.

Dans la liste présentée dans le **Tableau IV.2**, il manque des lignées mutantes pour le gène *KUP7*. Nous n'avons pas réussi à localiser l'insertion de l'ADN-T pour deux d'entre elles (pas de données sur T-DNA gene mapping tool pour la lignée SALK\_004133, pas de concordance entre la séquence flanquante séquencée et la séquence génomique du gène *KUP7* pour la lignée SALK\_002021). En revanche, la lignée SAIL 105 G04 (N805085) a récemment été utilisée dans l'étude de Han et al. (2016) pour mettre en évidence le rôle du transporteur *KUP7* dans les flux potassiques. A l'avenir, il serait intéressant d'étudier cette lignée pour laquelle nous ne disposons pas de lots de graines au moment des tests.

Nous avons également rencontré des difficultés avec les gènes *KUP2* et *KUP10* car la localisation de l'insertion de l'ADN-T dans les lignées mutantes référencées dans le **Tableau IV.2** est située en dehors de ces gènes, plus exactement avant le codon start. Dans ce cas, il est très probable que la transcription du gène soit réduite produisant un faible phénotype mutant plutôt que complètement invalidée (Wang, 2008). Devant l'ampleur du travail de vérification à réaliser sur les autres lignées mutantes et les résultats encourageants sur d'autres lignées, nous avons préféré ne pas continuer les analyses sur ces mutants *kup2* et *kup10*.

La localisation théorique de l'insertion de l'ADN-T dans les lignées mutantes ainsi que les amorces utilisées pour la vérification de ces lignées sont finalement présentées sur la **Fig. IV.2**.

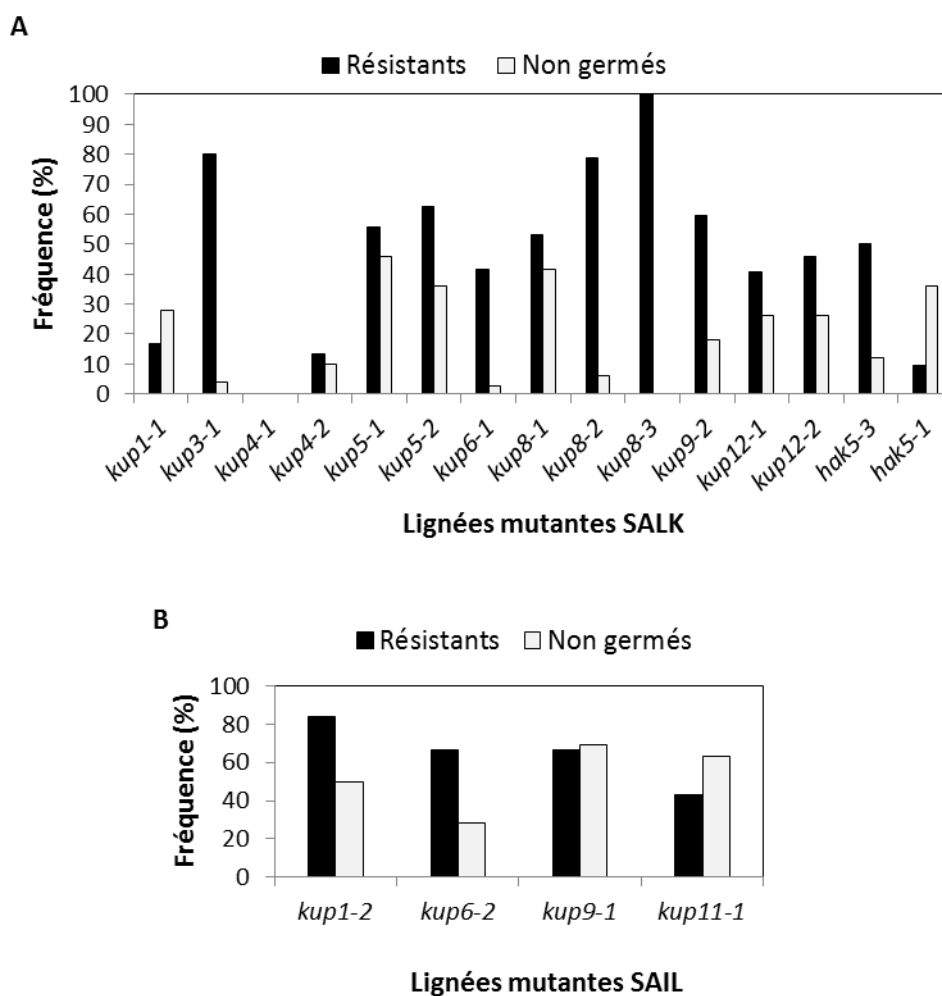


**Figure IV.2 : Localisation de l'insertion de l'ADN-T dans les différentes lignées de mutants *kup*.** Les exons et les introns sont représentés respectivement par des rectangles blancs et des lignes noires. Les différentes amorces génomiques utilisées pour la vérification des lignées sont représentées par des flèches rouges et bleues alors que les amorces commerciales dessinées dans l'ADN-T sont représentées en blanc.



### IV.2.2 - Sélection des lignées mutantes résistantes à la kanamycine ou à la phosphinotricine

Comme expliqué dans le **Chapitre II** – Matériel et Méthodes, la présence de l'ADN-T chez les lignées mutantes est marquée par la résistance à la phosphinotricine (PPT) pour les lignées SAIL et à la kanamycine pour les lignées SALK. Le premier tri a donc consisté à semer 50 graines stérilisées de chacun des lots reçus sur milieu sélectif MS½ contenant 10 mg.L<sup>-1</sup> de phosphinotricine ou 50 mg.L<sup>-1</sup> de kanamycine afin de sélectionner les plantes au moins hétérozygotes pour la mutation.



**Figure IV.3 : Résultats du test de résistance sur les lignées mutantes.** A- Résistance à la kanamycine chez les lignées SALK. B- Résistance à la phosphinotricine chez les lignées SAIL. La fréquence de plantules résistantes est relative au nombre de plantules germées alors que la fréquence de plantules non germées est relative au nombre total de graines semées. Les valeurs représentent les fréquences obtenues sur un seul test réalisé sur le lot de graines reçues directement du NASC.

Dans les lots de graines reçues du NASC, certaines lignées ont des taux de résistance très faibles voir nuls (**Fig. IV.3**, lignée *kup4* par exemple). Même placées sur milieu MS1/2, non sélectif, le taux de germination est également faible pour certaines lignées (données non présentées). Il est donc essentiel de propager les graines reçues pour assurer une qualité équivalente des graines entre les différentes lignées *kup*.

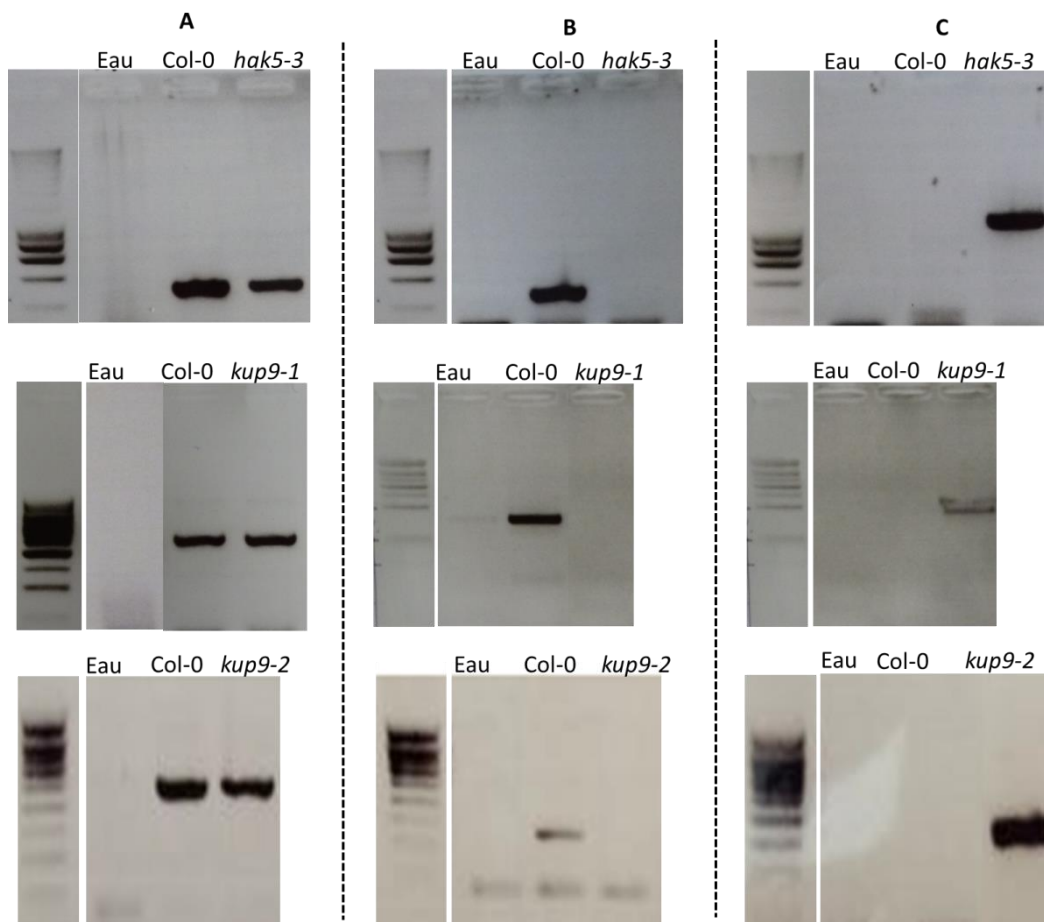
Seules les plantes résistantes ont été repiquées sur terreau et portées jusqu'à graines pour propager les lignées au moins hétérozygotes pour la mutation. Les graines récoltées ont ensuite été utilisées

pour le crible sur la toxicité du césium pour s'assurer que toutes les plantes testées aient environ le même âge (qui est un critère de la viabilité des graines). Les tests PCR ont été réalisés sur les plantes résistantes repiquées sur terreau pour sélectionner les lignées valides.

#### IV.2.3 - Vérification des lignées mutantes par PCR

Les amorces utilisées pour la vérification des lignées mutantes sont présentées en **Annexe-1**. Comme expliqué dans le **Chapitre II-Matériel et Méthodes**, la vérification de l'insertion homozygote de l'ADN-T nécessite deux réactions PCR distinctes sur ADNg alors que l'absence de transcrits du gène invalidé se fait par RT-PCR.

Finalement, en collaboration avec d'autres membres de l'équipe d'accueil du CEA, nous avons pu isoler 10 lignées dans 8 gènes différents respectant tous les critères de validité : *kup1-2*, *kup3-1*, *kup4-2*, *kup5-1*, *kup5-2*, *kup8-3*, *kup9-1*, *kup9-2*, *kup12-1* et *hak5-3*. Au maximum, l'ADN-T est décalé de 117 pb (pour *kup5-2*) de son site d'insertion théorique sur ces lignées valides. Le détail de cette vérification par PCR est présenté en **Fig.IV.4** pour les lignées mutantes *hak5-3*, *kup9-1* et *kup9-2* qui ont révélé un phénotype particulier en présence de Cs<sup>+</sup> comme présenté dans la section suivante.



**Figure IV.4 : Vérification des lignées mutantes par PCR sur ADNg.** A- PCR avec des amorces spécifiques d'un gène de ménage (*actine*). B- PCR avec amorces génomiques situées de part et d'autre de l'ADN-T : couple HAK5A-F/HAK5A-R (259 pb), couple KUP9A-F/KUP9A-R (325 pb), couple KUP9B-F/KUP9B-R (276 pb). C- PCR avec amorce ADN-T et une amorce génomique : couple Lbb1.3/HAK5B-R (1040 pb), couple LB1/KUP9A-R (414 pb), couple Lbb1.3/KUP9B-R (329 pb).

### IV.3 - RESULTATS DU CRIBLE SUR LA SENSIBILITE AU CESIUM DES DIFFERENTES LIGNEES MUTANTES

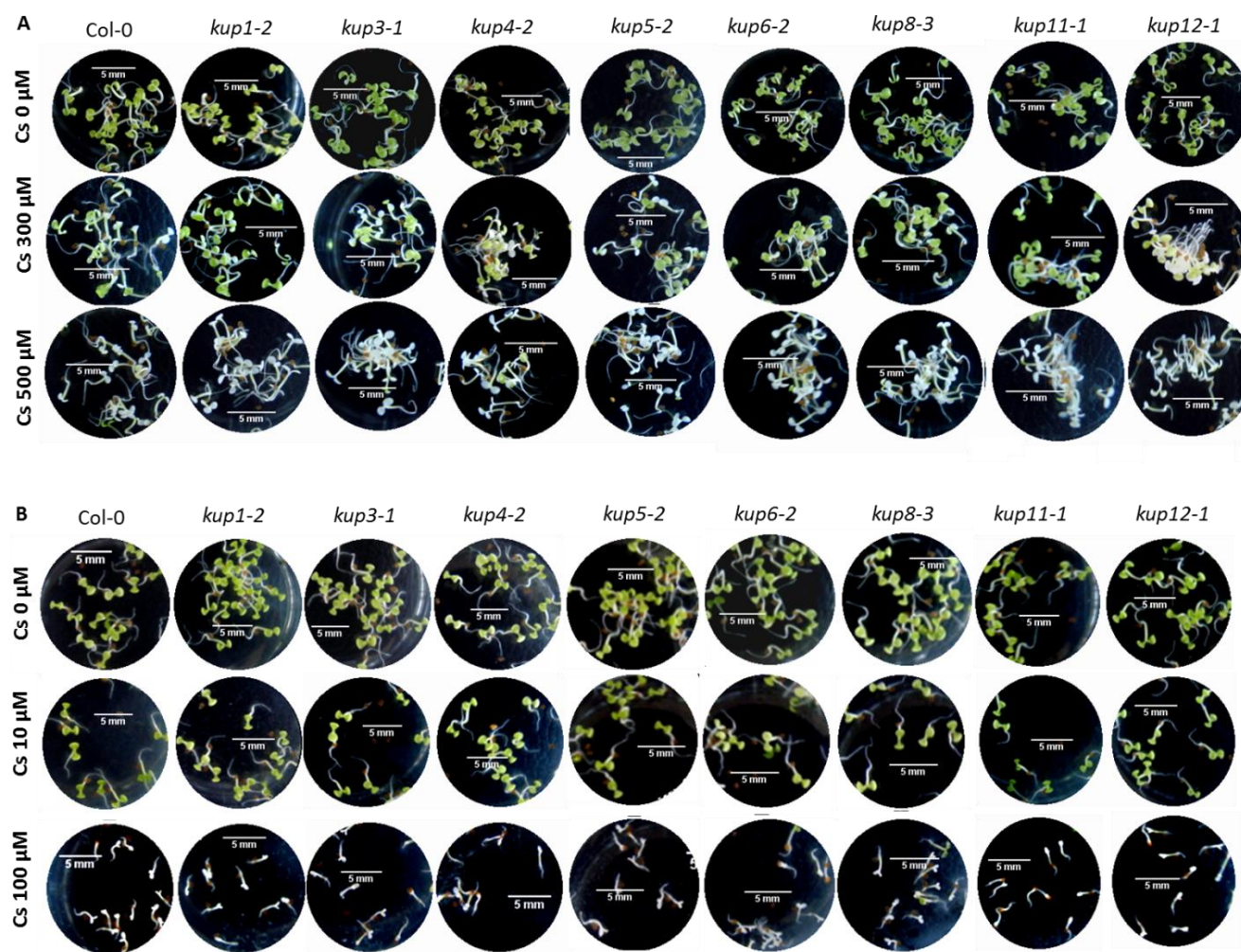
Dans la littérature au moment de ma thèse, des données de sensibilité au césium n'étaient disponibles que pour des mutants *hak5*. La plus faible sensibilité de ces mutants *hak5* aux ions stables  $Cs^+$  en conditions de faibles concentrations en  $K^+$  fait ainsi partie de la démonstration de son rôle dans les flux de césium *in planta*. En revanche, il n'existait pas de données publiées concernant la sensibilité de lignées mutantes pour les autres transporteurs de la famille des KUP/HAK/KT.

Des tests de sensibilité au césium ont donc été réalisés sur les lignées mutantes *kup* disponibles afin de mettre en évidence le rôle potentiel d'un des transporteurs de la même famille que HAK5 dans le transport de  $Cs^+$ . Ces tests consistent à faire germer les graines dans une solution nutritive contenant du césium à des concentrations plus ou moins toxiques pour l'écotype sauvage Col-0.

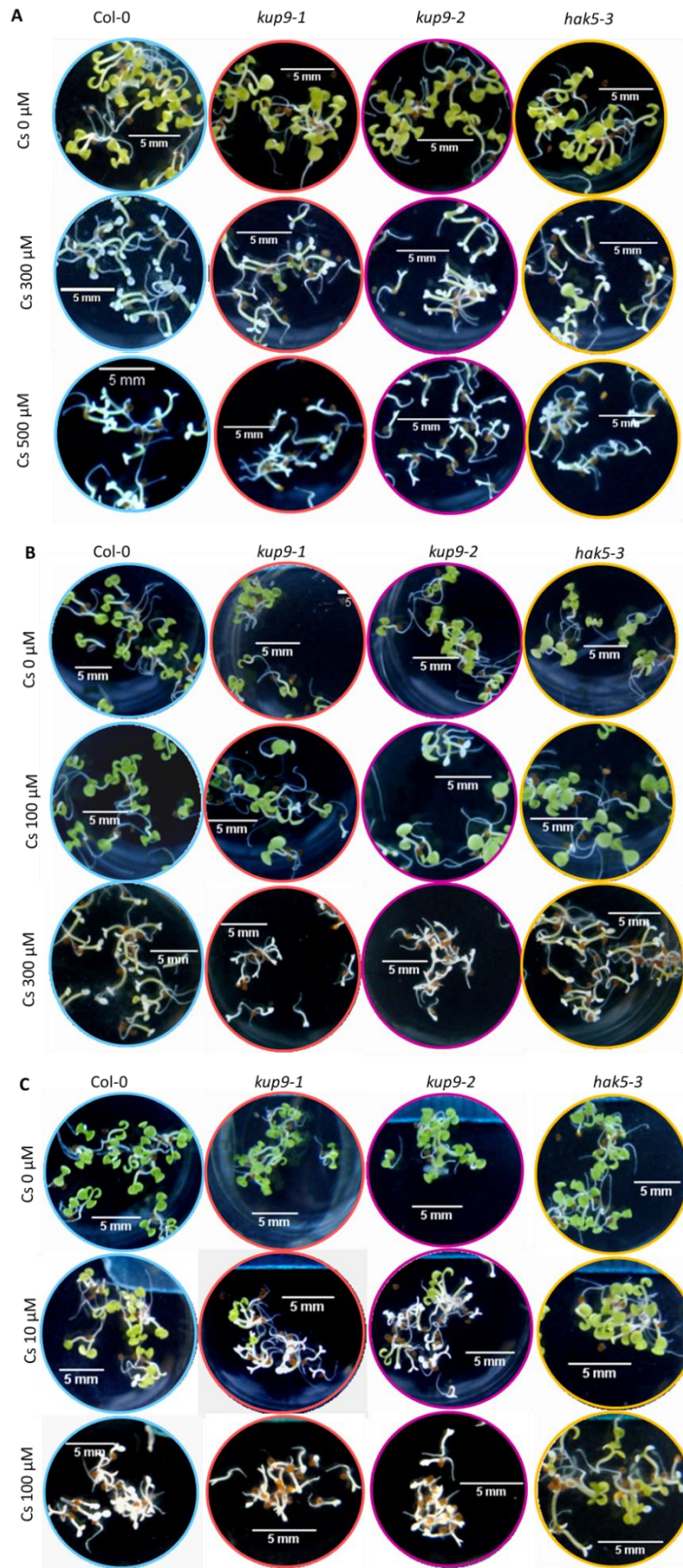
Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre III**, les transporteurs KUP sont supposés être peu sélectifs : la compétition K/Cs a donc un effet significatif sur la quantité de  $Cs^+$  transitant par ces transporteurs. En outre, les transporteurs KUP pourraient jouer un rôle à différentes étapes du flux de  $Cs^+$  (absorption, translocation/recirculation, compartimentation) et la concentration potassique a justement un effet sur la distribution du  $Cs^+$  dans la plante. Même s'il ne semble pas affecter de manière importante l'expression des gènes *KUP* (à l'exception de l'expression du gène *HAK5* dans les racines, voir **Section IV.1**), nous avons donc décidé de tester différentes conditions en potassium dans ces tests de sensibilité au césium.

Dans un autre objectif, différentes concentrations en  $Cs^+$  ont été testées pour pouvoir mettre en évidence à la fois des phénotypes hypersensibles (pour lesquels le seuil de toxicité du  $Cs^+$  est plus bas que pour l'écotype sauvage) ou au contraire moins sensibles comme dans le cas des mutants *hak5*.

Finalement les niveaux de  $Cs^+$  appliqués et pour lesquels on observe bien un gradient des effets toxiques sont présentés sur les **Fig. IV.5** et **Fig. IV.6**. Les tests ont été répétés au moins deux fois sur des graines toutes récoltées à la même date (+/- 30 jours).



**Figure IV.5 : Crible basé sur la toxicité du césium sur différentes lignées mutantes *kup*.** Les plantules sont âgées de 10 jours. A- Milieu nutritif à 1000 µM de K. B- Milieu nutritif à 10 µM de K.

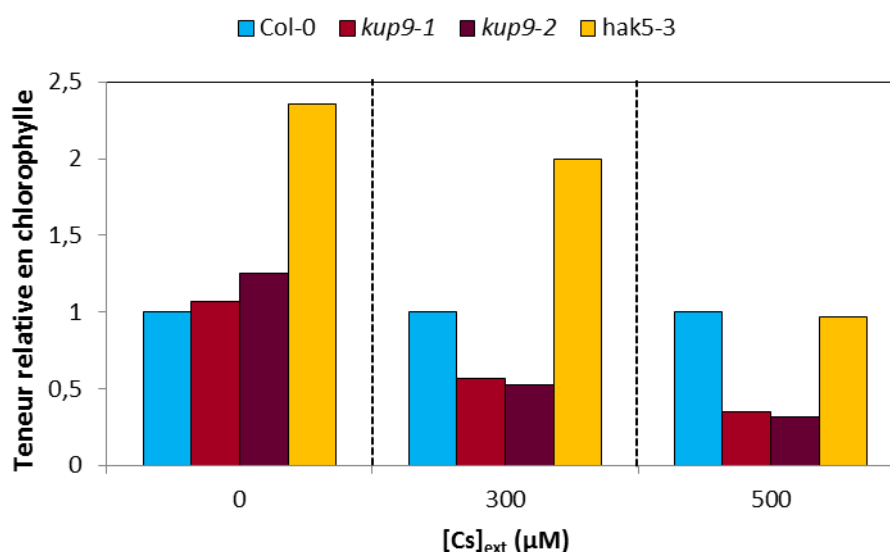


**Figure IV.6 : Crible basé sur la toxicité du césium sur les lignées mutantes *kup9* et *hak5*.** Les plantules sont âgées de 10 jours. A- Milieu nutritif à 1000  $\mu\text{M}$  de K. B- Milieu nutritif à 100  $\mu\text{M}$  de K. C- Milieu nutritif à 10  $\mu\text{M}$  de K.

A 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  dans la solution nutritive, on n'observe aucune différence nette de sensibilité entre l'écotype sauvage Col-0 et les différentes lignées mutantes *kup* (Fig. IV.5-A et Fig. IV.6-A). Pour les autres concentrations potassiques utilisées, sur les 11 lignées mutantes testées, seuls les mutants *kup9* et *hak5-3* montrent des différences de sensibilité au  $\text{Cs}^+$  comparé à l'écotype sauvage Col-0 (Fig. IV.5-B et Fig. IV.6-B et C).

Dans une solution nutritive à 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$ , on observe un effet toxique du césium à partir de 300  $\mu\text{M}$  qui se traduit visuellement par un blanchiment et une réduction de la taille des cotylédons chez les plantules exposées. Au contraire de Qi et al. (2008), nous n'observons pas de différences de sensibilité au  $\text{Cs}^+$  entre l'écotype sauvage Col-0 et le mutant *hak5-3* à ce niveau de potassium. Cette divergence est certainement liée au fait que nous travaillons dans des milieux liquides alors que les tests cités ont été réalisés en milieu gélosé. Les disponibilités du potassium et du césium pourraient en effet être différentes entre ces deux types de milieu (liquide et gélosé). Par contre, la sensibilité des mutants *kup9* est plus marquée que celle de l'écotype sauvage Col-0.

Dans une solution nutritive à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$ , les effets toxiques du césium stable se déclarent à des concentrations plus basses. Dès 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cs}^+$ , on observe un blanchiment des cotylédons chez les mutants *kup9* alors que les effets sont beaucoup moins marqués chez l'écotype sauvage Col-0. A l'inverse et comme attendu d'après les résultats de Qi et al. (2008), le mutant *hak5-3* est plus résistant que Col-0 dans ces conditions. Ainsi à 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cs}^+$ , les cotylédons de *hak5-3* restent globalement verts alors qu'ils sont blancs chez l'écotype sauvage Col-0.



**Figure IV.7 : Teneurs en chlorophylle de plantules exposées à différentes concentrations en césium** (solution à 100  $\mu\text{M}$  de K). Les plantules sont âgées d'une quinzaine de jours. Les valeurs représentent le rapport entre la concentration chlorophyllienne mesurée sur un pool de plantes mutantes (300 mg de matière végétale issue de *kup9-1*, *kup9-2* ou *hak5-3*) et celle mesurée dans les mêmes conditions sur un pool de Col-0.

La teneur en chlorophylle de différentes lignées dont *kup9-1*, *kup9-2* et Col-0 dans des conditions similaires à celles présentées plus haut a été mesurée en collaboration avec Lucie BARBIER lors de son stage de Master 2 (janvier-juin 2015). Nous observons ainsi que la teneur en chlorophylles des

mutants *kup9* est inférieure à celle de l'écotype sauvage Col-0 à 300  $\mu\text{M}$  de césium et 100  $\mu\text{M}$  de potassium (**Fig. IV.7**). Ce résultat appuie les observations faites plus haut sur le blanchiment plus marqué des cotylédons chez *kup9* comparé à Col-0. Le lien entre absorption du césium et diminution de la teneur en chlorophylle des feuilles d'*Arabidopsis* a déjà été montré et serait expliqué par la présence de  $\text{Cs}^+$  détecté potentiellement dans les chloroplastes (Le Lay et al., 2006). D'ailleurs cet effet du césium sur la pigmentation des feuilles a été utilisé pour tester la sensibilité des mutants *hak5* et démontrer le rôle du transporteur HAK5 dans l'absorption de  $\text{Cs}^+$  (Qi et al., 2008).

#### IV.4 - CONCLUSIONS

Nous n'avons pas pu obtenir de lignées mutantes valides pour chacun des 13 gènes de la famille des KUP/HAK/KT. Bien que des mutants d'insertion soient référencés pour tous ces gènes, nous avons vu que différentes difficultés compliquent parfois l'étude de ces lignées. Néanmoins, la découverte d'un phénotype particulier chez deux des lignées de mutants sélectionnées nous a convaincu d'approfondir les tests sur ces candidats plutôt que de consacrer plus de temps à la recherche d'autres lignées valides.

Ainsi, des tests de comparaison de la sensibilité au césium entre l'écotype sauvage et 11 mutants d'insertion dans 10 gènes indiquent que l'inactivation du gène *KUP9* chez deux lignées indépendantes conduit à un phénotype plus sensible. En se basant sur l'hypothèse de départ qui relie le niveau de sensibilité au niveau d'accumulation de césium, la réponse des mutants invalidés pour le gène *KUP9* suggère l'implication de ce dernier dans un mécanisme de tolérance au césium. On peut envisager cette tolérance sous différents angles :

(i) l'accumulation de césium pourrait être plus importante en absence du gène *KUP9*. Cette hypothèse suggère alors que le transporteur *KUP9* pourrait être impliqué dans les mécanismes d'efflux racinaire de césium ou encore de régulation d'autres transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire,

(ii) la circulation du césium au niveau des chloroplastes pourrait être impactée d'où le blanchiment des feuilles plus marqué chez les mutants *kup9*. On peut également envisager que l'inactivation du gène *KUP9* puisse altérer le stockage du césium dans un autre compartiment intracellulaire.

(iii) l'inactivation du gène *KUP9* pourrait aussi avoir un effet négatif sur l'absorption de potassium, rendant la plante plus sensible au césium. En effet, différentes études indiquent que la toxicité du césium tient plus au rapport de concentrations K/Cs qu'à la concentration en césium seule (Hampton et al., 2004 ; Le Lay et al., 2006).

## CHAPITRE V

# ROLE DU TRANSPORTEUR **KUP9** DANS L'ACCUMULATION DE CESIUM CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*



Le crible sur les différents mutants *kup* présenté dans le Chapitre IV indique que seuls les mutants *hak5-3* et *kup9* (deux lignées *kup9-1* et *kup9-2*) affichent des différences de sensibilité au césium comparé à l'écotype sauvage Col-0. Comme décrit en introduction, le rôle du transporteur HAK5 dans l'absorption de césium est démontré dans la littérature alors que le rôle de KUP9 *in planta* n'est pas encore connu. Nous avons donc décidé de nous concentrer sur l'étude de ce transporteur KUP9 dans la suite de ma thèse.

### V.1 – LOCALISATION TISSULAIRE DE L'ACTIVITE DU PROMOTEUR DE KUP9

A notre connaissance, il n'existe pas de données sur l'activité du promoteur de *KUP9* (*pKUP9*) dans la littérature. Dans le but d'étudier le schéma transcriptionnel du gène *KUP9*, nous avons utilisé deux gènes rapporteurs pour marquer l'activation du promoteur de *KUP9* dans les tissus végétaux : le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) qui est une protéine fluorescente et le gène *GUS* qui code pour la  $\beta$ -glucuronidase dont l'activité enzymatique sur son substrat libère un précipité bleu. Nous avons ainsi créé des lignées transgéniques *A. thaliana* exprimant la construction *pKUP9:GFP-GUS* (voir les Sections II.6, II.7 et II.8 du Chapitre II-Matériel et Méthodes pour les détails du protocole suivi).

De manière surprenante, nous n'avons pas détecté la GFP chez ces lignées transgéniques. Ceci pourrait être dû à la faible activité du promoteur de *KUP9*. En revanche, l'activité de l'enzyme GUS est bien repérable grâce à une accumulation du précipité bleu produit là où la GFP n'agit que « ponctuellement ».

Trois lignées indépendantes avec une seule insertion et homozygotes pour la construction *pKUP9:GUS-GFP* ont été testées avec sensiblement les mêmes résultats. Les images pour une seule de ces trois lignées sont présentées en Fig V.1.

Dans les racines (Fig. V.1-A), la coloration est globalement forte (visible dès 30 min de coloration) mais n'est pas homogène. Au niveau de l'apex racinaire, la coloration est intense à proximité du centre quiescent alors qu'elle est absente dans la zone de division cellulaire. En s'éloignant de l'apex racinaire, la coloration GUS est visible dans tous les types cellulaires.

Au niveau des jeunes feuilles de la rosette (Fig. V.1-B), la coloration GUS n'est visible qu'au niveau de zones très localisées souvent à proximité de la base d'un trichome. En outre, cette coloration ne se retrouve pas sur toutes les feuilles testées si bien qu'il est difficile d'interpréter ce résultat.

Au niveau des fleurs (Fig. V.1-C), la coloration GUS est nettement visible dans certains grains de pollen dépendant certainement de leur stade de développement. Ce résultat concorde avec les données publiées sur BAR qui indiquent un fort niveau de transcrits de *KUP9* au niveau du pollen d'*Arabidopsis thaliana*. Cette activité de *KUP9* dans le pollen ne semble pas essentielle à la reproduction car nous n'avons pas observé de phénotype particulier pendant la récolte des graines des lignées mutantes *kup9*.

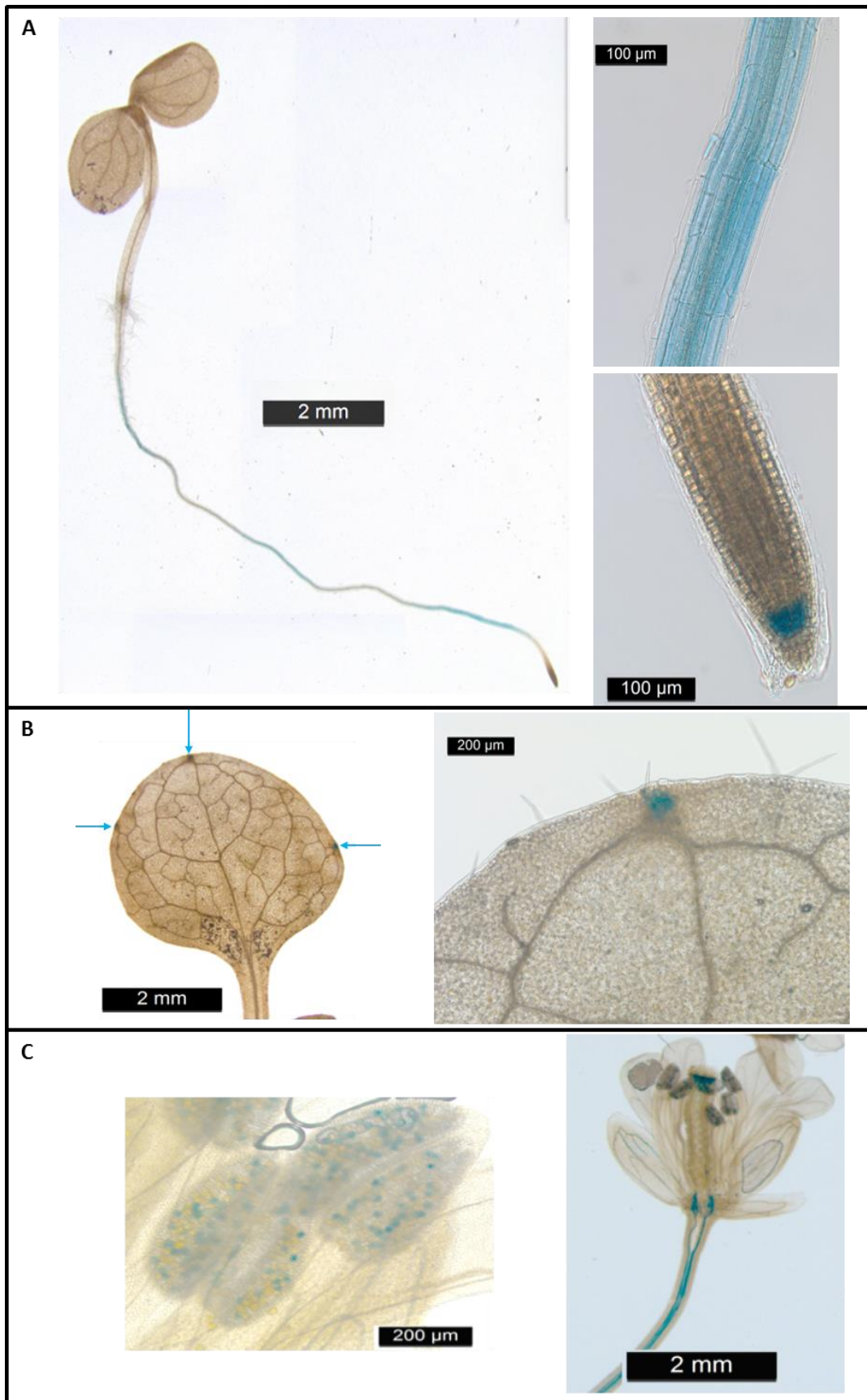


Figure V.1 : Schéma d'expression de *KUP9* chez les lignées transgéniques *A. thaliana* *pKUP9:GFP-GUS*. Coloration GUS au niveau A- des racines de plantules âgées de 7 jours, B- des feuilles de plantules âgées de 14 jours, C- des fleurs et anthères de plantes matures.

L'activité du promoteur de *KUP9* est plus importante au niveau des racines et du pollen chez *A. thaliana*. Ce résultat suggère que le transporteur KUP9 pourrait intervenir dans différents mécanismes comme la croissance, la reproduction et la circulation d'éléments dans les racines. Le schéma d'expression de *KUP7*, appartenant comme *KUP9* au Cluster V des *KUP/HAK/KT*, a récemment été publié et révèle une expression ubiquiste de *KUP7* dans les racines, feuilles, fleurs et siliques (Han et al., 2016). A ce jour, les fonctions connues de KUP7 concernent l'absorption et la translocation du potassium dans les racines d'*A. thaliana*, son rôle au niveau des parties aériennes reste encore à déterminer. Bien que la fonction du potassium dans divers aspects de la croissance et du développement est connue, le rôle des transporteurs de type KUP/HAK/KT dans des tissus tels que le pollen n'est donc pas encore très clair.

## V.2 - LOCALISATION DE LA PROTEINE KUP9

Il n'existe pas de données expérimentales sur la localisation subcellulaire du transporteur KUP9 chez *A. thaliana*. Nous avons donc tenté de localiser ce transporteur en fusionnant sa séquence codante avec la séquence codant pour la GFP. Nous avons placé cette fusion sous le contrôle du promoteur natif de *KUP9* mais également sous le contrôle d'un promoteur fort constitutif (promoteur 35S) afin d'augmenter le niveau de transcription de la construction et donc le signal potentiel de la GFP.

La GFP est une protéine relativement petite de moins de 240 acides aminés pour une masse molaire non négligeable d'environ 30 kDa. En comparaison, la protéine KUP9 issue du variant d'épissage At4g19960.2 est composée de 269 acides aminés pour une masse molaire d'environ 90 kDa d'après les données de TAIR. Comme la fusion avec la GFP peut gêner le repliement et/ou l'adressage de la protéine, nous avons testé une fusion de la GFP à l'extrémité amino-terminale (N-ter) et à l'extrémité carboxy-terminale (C-ter) du transporteur KUP9 (voir les **Sections II.6, II.7 et II.8** pour les détails du protocole suivi).

### *Expression transitoire en protoplastes*

Trois tests d'expression des fusions KUP9-GFP en protoplastes ont été réalisés (voir **Section II.7.1**). La transformation des protoplastes avec la GFP seule donne quelques bons résultats mais les tests avec les constructions où la GFP est fusionnée avec KUP9 n'ont malheureusement pas été concluants. Peu importe le promoteur utilisé (p35S ou pKUP9) et quel que soit le sens de la fusion (en C-ter ou en N-ter), aucune fluorescence n'a été détectée (**Fig. V.2**). Il est possible que la taille du vecteur avec les constructions (plus de 10 kb) et des transgènes eux-mêmes (plus de 5 kb) ait été un inconvénient par rapport à la taille du vecteur avec la GFP seule (moins de 8 kb pour le vecteur, moins de 3 kb pour le transgène).

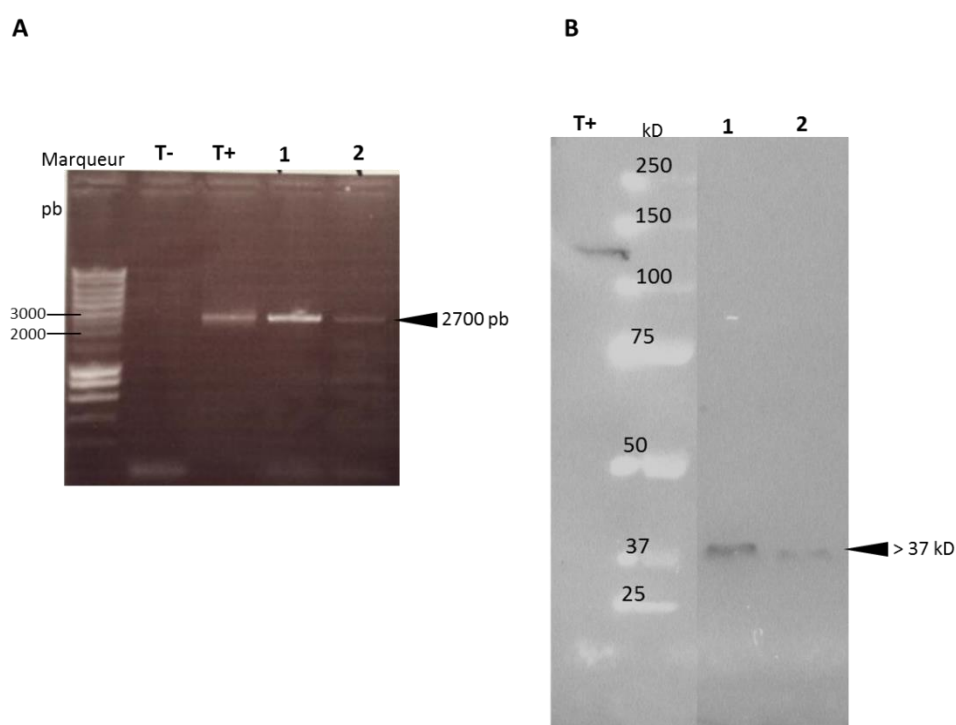


**Figure V.2 : Test d'expression transitoire en protoplastes de mésophylle.**

*Etudes des lignées transgéniques*

De la même façon que pour l'expression transitoire, l'expression stable des constructions avec fusion GFP-KUP9 dans des lignées transgéniques ne nous a pas permis de localiser la protéine KUP9. Différents tests ont été réalisés afin de comprendre pourquoi nous ne détectons pas la fluorescence de la GFP dans ces lignées transgéniques.

Dans un premier temps, nous avons vérifié le bon déroulement de la transcription du transgène. Dans cet objectif, des PCR sur l'ADNc des lignées transgéniques p35S :GFP-KUP9 et pKUP9 :GFP-KUP9 ont été réalisées avec une amorce dessinée dans la GFP (eGFP-Seq3) et une amorce dessinée dans KUP9 (KUP9-R2) (**Fig.V.3-A**). Les résultats indiquent que le fragment amplifié est à la taille attendue ne révélant donc pas d'anomalies de la transcription du transgène.



**Figure V.3 : Vérification de la fusion GFP-KUP9 (GFP en N-ter de KUP9) chez les lignées transgéniques.** **A-** Vérification du bon déroulement de la transcription du transgène par PCR sur ADNc des lignées transgéniques avec une amorce dessinée dans la GFP (eGFP-Seq3) et une amorce dessinée dans KUP9 (KUP9-R2). T- : ADNc Col-0, T+ : Miniprep d'*E. coli* contenant la construction p35S:GFP-KUP9, 1 : ADNc d'une lignée p35S:GFP-KUP9, 2 : ADNc d'une lignée pKUP9:GFP-KUP9. **B-** Immuno-détection de la GFP après migration et transfert sur membrane des protéines totales extraites sur les lignées transgéniques. T+ : protéines de levures transgéniques exprimant une fusion protéine-GFP, 1 : Lignée p35S:GFP-KUP9, 2 : Lignée pKUP9:GFP-KUP9.

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié le bon déroulement de la traduction du transgène. Une analyse par Western Blot a donc été réalisée avec un anticorps dirigé contre la GFP, le but étant de vérifier la présence de la protéine de fusion GFP-KUP9 d'une taille attendue à 120 kDa. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence que la protéine de fusion synthétisée est clivée avec une taille

d'environ 37 kDa (**Fig.V.3-B**). Différentes raisons peuvent être à l'origine de cette anomalie parmi lesquelles des erreurs de séquences introduites lors du clonage.

Un seul nucléotide ajouté, oublié ou modifié lors du clonage peut suffire à entraîner un décalage du cadre de lecture et une mauvaise « interprétation » du code du transgène. Dans notre cas, la création d'un codon stop aurait pu expliquer la synthèse d'une protéine de fusion incomplète. Afin d'éliminer ces erreurs, tout au long du processus de clonage une partie des constructions a été séquencée comme expliqué dans le **Chapitre II**-Matériel et Méthodes. Ainsi les séquences promotrices et codantes de *KUP9* ont été entièrement séquencées après clonage dans les vecteurs pCR-XL-TOPO® et pDONR™. La séquence du transgène dans les lignées transgéniques a également été vérifiée partiellement (voir **Annexe-4**). Aucune divergence entre les séquences théoriques du promoteur et de la séquence codante de *KUP9* n'a été détectée.

En ce qui concerne la séquence de la GFP, les vecteurs qui m'ont servi à l'insérer dans les différentes constructions avaient déjà été utilisés avec succès par d'autres membres de l'équipe du CEA. Afin de lever les doutes sur une mutation éventuelle de cette partie du transgène, j'ai quand même tenté de la séquencer après amplification à partir de l'ADNg des lignées transgéniques. Le domaine minimal requis pour l'acquisition de la fluorescence de la GFP constitue la quasi-totalité de la protéine (acides aminés 7 à 229, Li et al., 1997). Si j'ai pu valider l'absence d'erreurs sur une partie de la séquence de la GFP, la région allant des acides aminés 52 à 156 n'a pas pu être séquencée. En effet, les produits d'amplification de cette région avec les amorces disponibles au moment des tests n'étaient alors pas de qualité suffisante pour le séquençage - probablement à cause du processus de purification nécessaire après la PCR avec les amorces utilisées *pKUP9-F6* et *KUP9-R5* qui amplifient deux fragments distincts (l'un correspondant à l'amplification de la région génomique *pKUP9-KUP9* et l'autre à la région du transgène *pKUP9:GFP-KUP9*). L'utilisation d'autres amorces, spécifiques de cette région de la GFP, devra donc être envisagée par la suite pour obtenir le séquençage complet des transgènes et lever tous les doutes sur la présence d'erreurs.

### *Perspectives*

Comme expliqué précédemment, la GFP a été fusionnée à *KUP9* à son extrémité N-ter (protéine de fusion « GFP-KUP9 ») d'une part et à son extrémité C-ter d'autre part (protéine de fusion « KUP9-GFP »). Nous avons vu que pour les constructions dans le sens « GFP-KUP9 », la protéine de fusion est clivée empêchant la localisation du transporteur *KUP9*. Des difficultés ayant retardé les manipulations, j'ai travaillé sur des lignées transgéniques de 1<sup>ère</sup> génération (T1) pour les constructions dans le sens « KUP9-GFP ». Nous avons ainsi tenté de détecter la fluorescence de la GFP sur des protoplastes préparées à partir des feuilles de lignées transgéniques (T1) dans le but de préciser la zone d'observation. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu plus de résultats que sur plantules entières. Dans la continuité de cette stratégie, il serait judicieux de tester également des protoplastes de cellules racinaires et d'analyser, comme pour les constructions « GFP-KUP9 », la protéine de fusion « KUP9-GFP » par Western Blot.

Afin d'évaluer les différentes possibilités pour la localisation du transporteur *KUP9*, je me suis finalement intéressée aux données disponibles dans la littérature. J'ai ainsi cherché la présence potentielle de *KUP9* dans les études d'identification du protéome de différents organites chez *A. thaliana*. Par exemple, Jaquinod et al. (2007) rapportent que, parmi 650 protéines vacuolaires

identifiées, les transporteurs KUP4, KUP5, KUP7 ont été détectés dans le tonoplaste d'*Arabidopsis thaliana* mais pas KUP9. En analysant le protéome des chloroplastes, Kleffmann et al. (2004) mettent en évidence la présence de KUP12 (cité dans les données supplémentaires rattachées à l'article) parmi 689 autres protéines identifiées parmi lesquelles KUP9 n'est pas mentionné. Le fait que KUP9 n'ait pas été détecté dans ces études ne suffit pas à prouver que le transporteur n'est pas présent sur les membranes testées. En effet, sur quatre études d'identification du protéome vacuolaire d'*Arabidopsis* (Carter et al., 2004 : 402 protéines ; Shimaoka et al., 2004 : 163 protéines ; Szponarski et al., 2004 : 70 protéines identifiées ; Jaquinod et al., 2007), une seule rapporte la présence de transporteurs KUP dans le tonoplaste. Les techniques d'isolement des protéines et de leur identification à l'échelle subcellulaire ont donc déjà été améliorées, avec de plus en plus de protéines identifiées, mais les connaissances ne sont certainement pas encore complètes.

Finalement, des outils bio-informatiques qui permettent de prédire la localisation des protéines ont également été utilisés. Pour KUP9 (variant At4g19960.2), c'est la membrane plasmique qui obtient les plus hauts scores pour différents programmes comme WoLF PSORT ([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)) ou ProtComp (Version 9, <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=help&subgroup=prolo>).

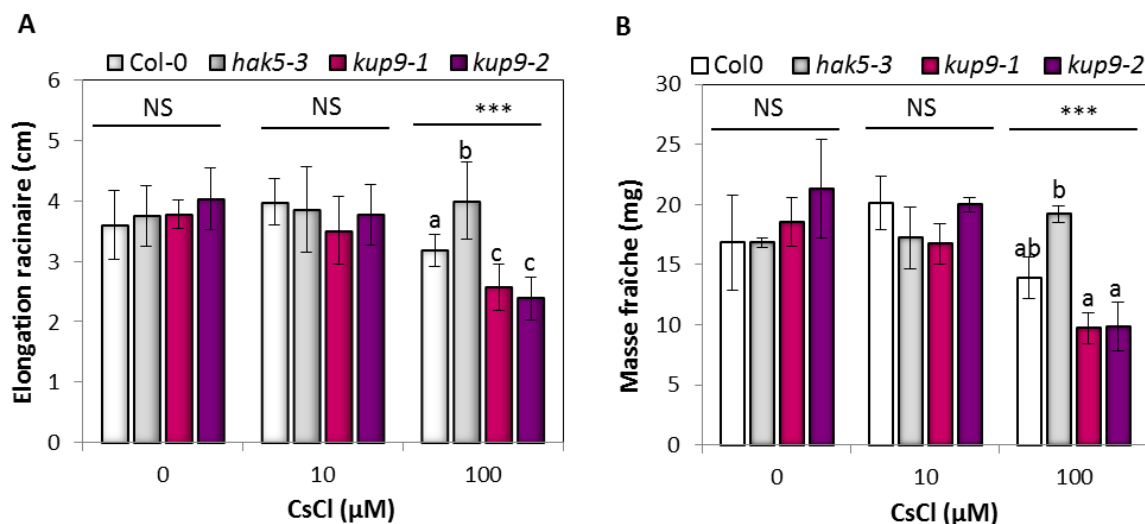
### V.3 - ACCUMULATION DU CESIUM CHEZ LES LIGNEES MUTANTES *KUP9*

Le crible sur les mutants *kup* présenté dans le Chapitre IV révèle que seules les lignées mutantes *kup9* et *hak5* présentent un phénotype différent de l'écotype sauvage Col-0 en présence de césium. Nous avons donc décidé de mener des tests complémentaires pour comparer les lignées mutantes *kup9* et l'écotype sauvage Col-0 sur leur réponse à la présence de césium dans le milieu extérieur. La lignée mutante *hak5-3* ayant déjà été utilisée pour des tests similaires (Qi et al., 2008), nous l'avons également intégrée pour valider nos expériences selon leur cohérence avec les résultats déjà publiés.

Également décrit dans le Chapitre IV, les différences de sensibilité au césium entre les lignées mutantes *kup9* et l'écotype sauvage Col-0 sont claires à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  mais s'estompent avec l'augmentation de la concentration en potassium dans le milieu extérieur. Nous avons donc testé le comportement des mutants *kup9* pour deux niveaux de potassium distincts (les codes couleurs utilisés sont différents pour ces deux niveaux de potassium afin de mieux les distinguer et de faciliter la lecture).

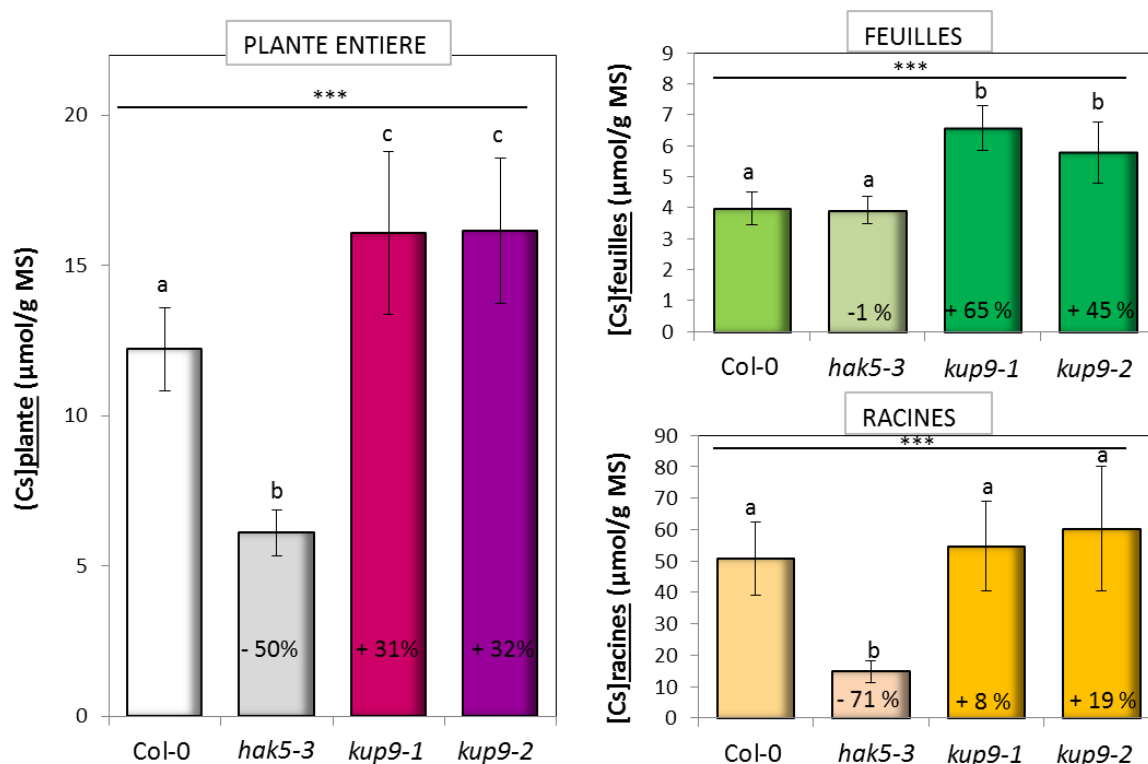
#### V.3.1 - Faible niveau de potassium (10-20 $\mu\text{M}$ )

Il a été montré que la toxicité chimique du césium stable chez les végétaux se traduit par un retard de croissance, des chloroses et l'inhibition de l'élongation de la racine primaire (Hampton et al., 2004 ; Kanter et al., 2010 ; Remy et al., 2015). En accord avec ces précédents travaux, nous avons pu mettre en évidence que la présence de  $\text{Cs}^+$  dans le milieu nutritif a un impact négatif sur l'élongation racinaire de Col-0 et des mutants *kup9* (Fig. V.4). À partir de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cs}^+$ , on enregistre une diminution de l'élongation racinaire de 12 % pour l'écotype sauvage et de 32 à 41 % pour les mutants *kup9*. L'inactivation du gène *KUP9* exacerbe donc la toxicité du césium chez les lignées mutantes. À l'inverse, et comme attendu compte-tenu de son rôle dans l'absorption de  $\text{Cs}^+$ , l'inactivation du gène *HAK5* induit une tolérance au césium, l'élongation racinaire restant inchangée pour des concentrations en  $\text{Cs}^+$  au moins inférieures à 100  $\mu\text{M}$ .



**Figure V.4 : Comparaison de la croissance des lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* et de l'écotype sauvage *Col-0* à faible niveau de potassium et en présence de césium dans le milieu extérieur.** Les mesures sont réalisées sur des plantes âgées de 11 jours qui ont passé 4 jours sur MS1/2 puis 7 jours sur milieu gélosé à 14 µM de K (mesuré en ICP-AES) contenant du césium. A- Les données représentent la moyenne de l'élongation racinaire avec l'écart-type (n=12). B- Les données représentent la masse fraîche moyenne calculée sur 3 pools de 4 plantules avec l'écart-type. Pour chacune des concentrations en césium utilisées, les moyennes obtenues pour chaque lignée ont été comparées avec une ANOVA (NS : non significatif et \* ; \*\* ; \*\*\* : significatif pour un risque  $\alpha$  de 0,05 ; 0,01 ; 0,001 respectivement) et les lignées significativement différentes (indiquées par des lettres) ont été mises en évidence par le test post-hoc de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Il est à noter que, de manière surprenante, Qi et al. (2008) enregistrent une sensibilité au césium plus importante chez des mutants *hak5* pour des concentrations en potassium dix fois plus élevées que dans nos tests (100 µM au lieu de 14 µM ici). Les auteurs suggèrent que ce résultat inattendu pourrait s'expliquer par le blocage des autres voies de transport du  $K^+$ , en particulier AKT1, par le césium présent dans le milieu. Le potassium pourrait toujours être pris en charge par le transporteur haute-affinité HAK5 chez l'écotype sauvage tandis que pratiquement toutes les voies seraient alors bloquées chez les lignées mutantes *hak5*. Les différences entre notre protocole, dont une pré-culture sur milieu suffisant en  $K^+$  et un niveau de  $K^+$  très bas pendant l'exposition au  $Cs^+$ , et le protocole suivi par Qi et al. (2008) pourraient expliquer que nous n'observons pas les mêmes phénomènes.

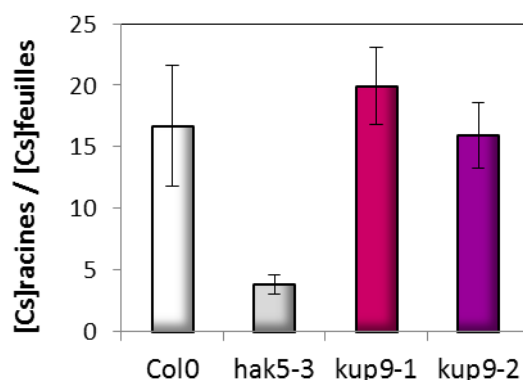


**Figure V.5 : Comparaison de l'accumulation du césium en condition hydroponique entre les lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* et l'écotype sauvage Col-0 à faible niveau de potassium.** Les données représentent les concentrations en césium dans la plante entière, les feuilles et les racines après 7 jours d'exposition. La solution d'exposition à 1 µM de Cs<sup>+</sup> contient les éléments nutritifs classiques dont **10 µM de K<sup>+</sup>** et est renouvelée tous les 2-3 jours (le suivi du K<sup>+</sup> et du Cs<sup>+</sup> dans les solutions n'indiquent pas de déplétion). L'expérience a été répétée trois fois sur 6 à 9 plantes/lignée à chaque fois. Les moyennes obtenues ont été comparées entre lignées par ANOVA (voir légende de la **Fig. V.4**).

En conditions hydroponiques à faible niveau de K<sup>+</sup>, nous enregistrons une augmentation de 30 à 40% de l'accumulation de césium chez les mutants *kup9* comparativement à l'écotype sauvage Col-0 (**Fig. V.5** et répliquats d'expérience non montrés). Au contraire de HAK5, le transporteur KUP9 n'est donc vraisemblablement pas impliqué dans l'absorption de césium par les racines mais serait plutôt impliqué dans un autre mécanisme lié à son accumulation.

La distribution du césium entre les racines et les feuilles après 7 jours d'exposition ne diffère pas entre les mutants *kup9* et l'écotype sauvage Col-0 (**Fig V.6**), indiquant que l'inactivation du gène KUP9 n'a pas d'incidence directe sur la translocation voire la recirculation du Cs<sup>+</sup>. Au contraire, la distribution du césium chez la lignée mutante *hak5-3* est très différente avec une plus grande part de Cs<sup>+</sup> alloué aux feuilles que chez l'écotype sauvage Col-0. Les connaissances sur le rôle de HAK5 dans l'absorption de Cs<sup>+</sup> par les racines ainsi que les concentrations mesurées dans les feuilles et les racines (**Fig. V.5**) suggèrent que ce schéma de distribution tient plus à la réduction de l'accumulation de Cs<sup>+</sup> dans la plante qu'à une modification des capacités de translocation chez le mutant *hak5-3*.





**Figure V.6 : Distribution du césium chez l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* à faible niveau de potassium.** Le rapport des concentrations en césium dans les racines et dans les feuilles a été calculé à partir des résultats présentés sur la **Fig.V.5**.

En outre, des tests d'influx du  $\text{Cs}^+$  sur des temps courts ne permettent pas de distinguer des différences significatives entre le mutant *kup9-1* et l'écotype sauvage Col-0 (**Tableau V.1**). Ces tests viennent étayer les arguments selon lesquels KUP9 serait plutôt impliqué dans un mécanisme à plus long-terme de l'accumulation de césium.

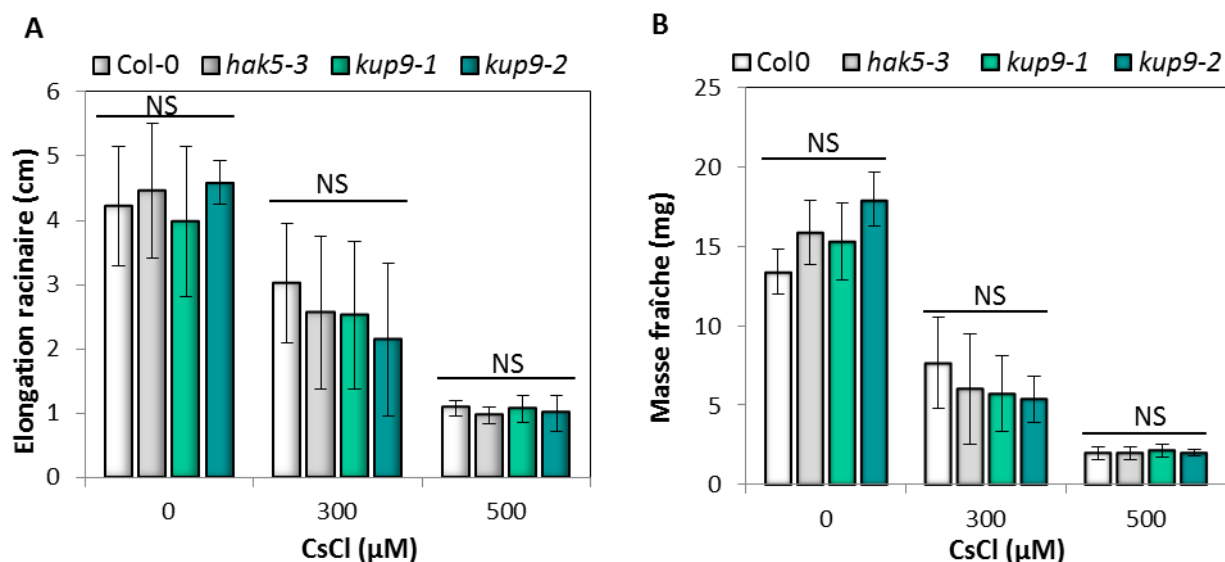
**Tableau V.1 Comparaison de l'influx de césium entre le mutant *kup9-1* et l'écotype sauvage Col-0.**

[K]ext ( $\mu\text{M}$ )	[Cs]ext ( $\mu\text{M}$ )	Durée exposition	Ecotype	MF (g)	Absorption du Cs ( $\text{nmol.g}^{-1}$ MF racines)
20	1	15 min	<i>kup9-1</i>	0,221 (0,039)	0,64 (0,18)
20	1	15 min	Col-0	0,171 (0,043)	0,56 (0,14)
20	1	6 h	<i>kup9-1</i>	0,181 (0,061)	7,35 (1,40)
20	1	6 h	Col-0	0,163 (0,039)	7,84 (2,22)

Finalement, à faible niveau de potassium, on peut retenir que l'invalidation du gène *KUP9* a pour effet d'augmenter significativement l'accumulation de césium chez *A. thaliana*. Avec les résultats présentés dans cette section, on peut rejeter les hypothèses selon lesquelles le transporteur KUP9 pourrait être impliqué dans les mécanismes de translocation/recirculation du césium ou dans l'absorption racinaire de  $\text{Cs}^+$ .

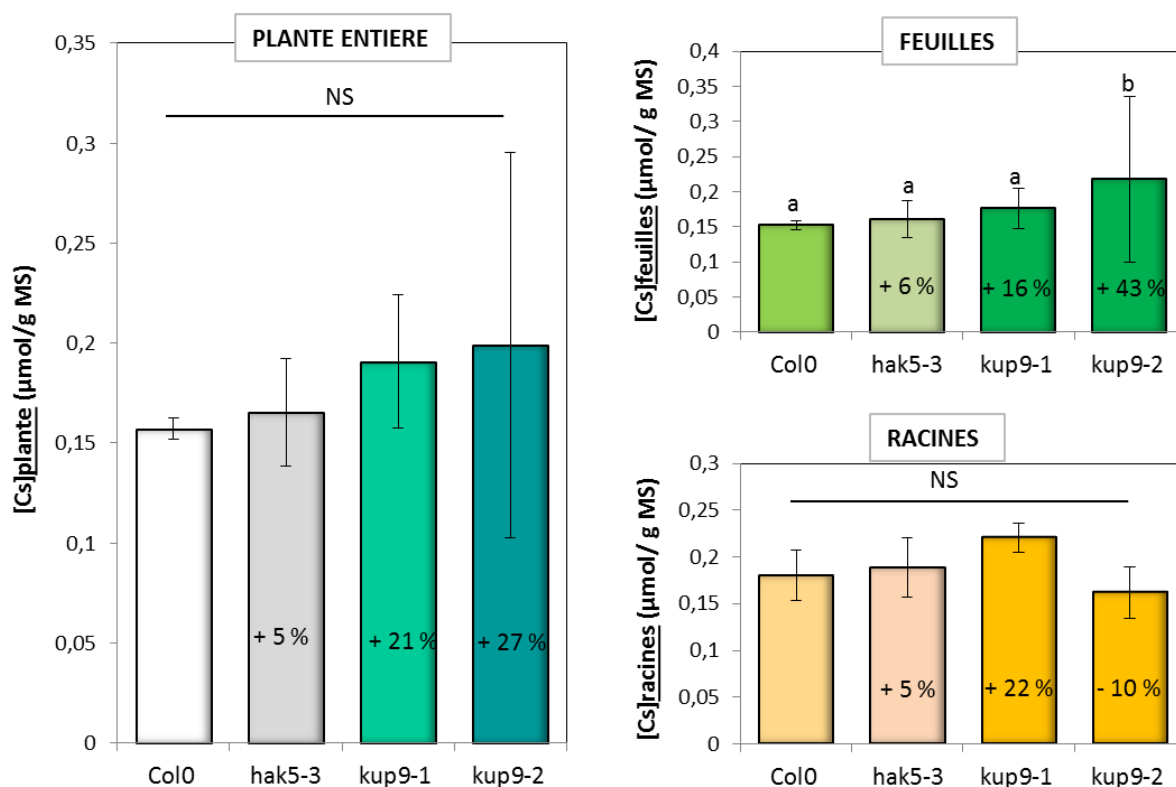
### V.3.2- Fort niveau de K (1000-3000 $\mu$ M)

La présence de Cs<sup>+</sup> dans un milieu gélosé nutritif contenant de fortes concentrations en K<sup>+</sup> (1000  $\mu$ M), a un impact significatif sur la croissance racinaire et la masse fraîche des différentes lignées testées (**Fig. V.7**). La croissance de la racine principale est ainsi réduite de 70% dans la condition à 500  $\mu$ M de Cs<sup>+</sup> pour les lignées de mutants *hak5* et *kup9* comme pour l'écotype sauvage Col-0.

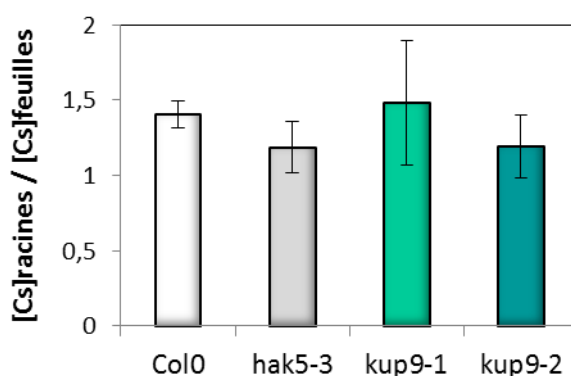


**Figure V.7 : Comparaison de la croissance des lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* et de l'écotype sauvage Col-0 à fort niveau de potassium et en présence de césium dans le milieu extérieur.** Les mesures sont réalisées sur des plantes âgées de 10 jours qui ont passé 4 jours sur MS1/2 puis 6 jours sur milieu gélosé à 1000  $\mu$ M de K contenant du césium. A- Les données représentent la moyenne de l'élongation racinaire avec l'écart-type (n=16). B- Les données représentent la masse fraîche moyenne calculée sur 4 pools de 4 plantules avec l'écart-type. Les moyennes ont été comparées par ANOVA (voir légende **Fig.V.4**).

Comme attendu, compte-tenu de la régulation de l'expression de *HAK5* par le niveau de potassium dans le milieu extérieur, l'inactivation de *HAK5* n'a pas d'effet sur l'accumulation de césium à fort niveau de K<sup>+</sup> (**Fig. V.8**). En revanche, l'accumulation de césium chez les mutants *kup9* a tendance à être plus élevée que chez Col-0 à 3000  $\mu$ M de K<sup>+</sup> mais les différences ne sont pas statistiquement significatives. En outre, le césium est distribué de la même façon pour les lignées mutantes et pour l'écotype sauvage (**Fig. V.9**)



**Figure V.8 : Comparaison de l'accumulation du césium en condition hydroponique entre les lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* et l'écotype sauvage Col-0 à fort niveau de potassium.** Les données représentent les concentrations en césium dans la plante entière, les feuilles et les racines après 7 jours d'exposition. La solution d'exposition à  $1\mu\text{M}$  de  $\text{Cs}^+$  contient les éléments nutritifs classiques dont  $3000\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  et est renouvelée tous les 2-3 jours (le suivi du potassium et du césium dans les solutions n'indiquent pas de déplétion).



**Figure V.9 : Distribution du césium chez l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9* et *hak5-3* à fort niveau de potassium.** Le rapport des concentrations en césium dans les racines et dans les feuilles a été calculé à partir des résultats présentés sur la Fig.V.8.

Ces résultats montrent que les effets de l'inactivation de *KUP9* sur la sensibilité et l'accumulation de césium sont K-dépendants, de la même façon que l'invalidation de *HAK5*. Pour ce dernier, la régulation positive de l'expression et l'augmentation de l'abondance de transporteurs *HAK5* en conditions de carence en  $K^+$  participent à ces différences de comportement en présence de césium en fonction de la concentration en potassium. Afin de comprendre si de tels mécanismes pouvaient s'appliquer au cas de *KUP9*, nous nous sommes donc intéressés à la régulation de son expression par le niveau de potassium.

#### V.4 - INFLUENCE DU NIVEAU DE POTASSIUM SUR L'EXPRESSION DE *KUP9*

Comme présenté dans le **Chapitre IV**, les tests réalisés par l'équipe du CEA indiquent que, à l'exception du gène *HAK5*, le potassium n'a qu'un faible effet sur la régulation des gènes de la famille des *KUP* chez *A. thaliana*. A notre connaissance, l'effet du niveau de potassium sur l'expression de *KUP9* n'est rapporté que dans une seule étude dans la littérature (Hampton et al., 2004). Il y est fait mention d'une augmentation significative du nombre de transcrits de *KUP9* dans les feuilles en condition de carence en  $K^+$  (valeurs non indiquées). L'expression des gènes en général est dépendante de nombreux facteurs comme la composition du milieu ou encore l'itinéraire cultural suivi. Ceci entraîne parfois des divergences de résultats entre des expériences indépendantes, comme c'est le cas concernant la régulation de *HAK5* par le niveau de potassium (Gierth & Mäser, 2007). J'ai donc décidé de mesurer le niveau d'expression du gène *KUP9* sur les mêmes lots de plantes que ceux utilisés pour les expériences décrites dans ce chapitre et cultivés dans les mêmes conditions.

Le niveau relatif de transcrits du gène *KUP9* a été mesurée sur des plantes âgées de 29-34 jours après 7 jours à 3 niveaux de potassium distincts (10, 100 ou 3000  $\mu\text{M}$ ) en hydroponie (voir **Section II.5**).

L'expression relative de *KUP9* a été calculée d'après la formule :

$$R = \frac{E_T^{(CpT(C)-CpT(S))}}{E_R^{(CpR(C)-CpR(S))}}$$

Avec :

$E_T$  et  $E_R$  Efficacité de la RT-qPCR sur le gène Target (*KUP9*) et sur le gène de Référence (*ROC3*).

$CpT(C)$  et  $CpT(S)$  Cycle seuil pour le gène Target (*KUP9*) chez le Calibrateur (condition à 3000  $\mu\text{M}$  de  $K^+$ ) et chez l'échantillon (conditions à 10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  de  $K^+$ ).

$CpR(C)$  et  $CpR(S)$  Cycle seuil pour le gène Référence (*ROC3*) chez le Calibrateur (condition à 3000  $\mu\text{M}$  de  $K^+$ ) et chez l'échantillon (conditions à 10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  de  $K^+$ ).

Comme décrit généralement pour les analyses d'expression en qRT-PCR (Yuan et al., 2006), la significativité des différences d'expression observées a été testé avec le test de Student (unilatéral, données non-appariées). Le test statistique a été appliqué sur les différences de Ct entre le gène de référence (*ROC3*) et le gène cible (*KUP9*) dans l'échantillon traité (10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  de  $K^+$ ) et l'échantillon contrôle (3000  $\mu\text{M}$  de  $K^+$ ).

**Tableau V.2 : Expression relative de *KUP9* chez *A. thaliana* en fonction de la concentration en potassium dans le milieu.** La quantité de transcrits de *KUP9* à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  et 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  est rapportée à la condition contrôle 3000  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ . Trois réplicats biologiques (chaque réplicat est un pool de 3 plantes cultivées dans la même boîte) ont été utilisés par condition.

Tissus	Traitement potassique ( $\mu\text{M}$ )	p-value	Expression relative moyenne de <i>KUP9</i>	Ecart-type
Racines	10	0,04	1,5	0,1
	100	0,02	1,4	0,2
Feuilles	10	0,06	1,1	0,4
	100	0,10	1,3	0,6

Le niveau relatif d'ADNc de *KUP9* ne change pas significativement ( $p\text{-value} > 0,05$ ) ou de manière conséquente (Expression relative  $< 2$ ) en fonction de la concentration en  $\text{K}^+$  que ce soit dans les racines ou dans les feuilles (**Tableau V.2**). Nous considérerons donc que l'effet du niveau de  $\text{K}^+$  sur les différences observées entre l'écotype sauvage et les lignées mutantes *kup9* ne sont pas imputables à une régulation du niveau d'expression de *KUP9* chez Col-0 dans nos expériences.

## V.5 - COMPREHENSION DU ROLE DE *KUP9* DANS L'ACCUMULATION DE CESIUM

### V.5.1 - Expression de *HAK5* chez les mutants *kup9*

Nous avons vu précédemment que les différences concernant l'accumulation de césium entre les mutants *kup9* et l'écotype sauvage Col-0 ne sont significatives statistiquement que dans la condition à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$ . L'expression de *HAK5* est régulée positivement dans ces conditions de carence potassique et il est impliqué dans l'absorption du césium. Mises ensembles, ces données nous ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle une surexpression de *HAK5* chez les mutants *kup9* pourrait expliquer qu'ils accumulent plus de césium relativement à l'écotype sauvage non muté. En effet, la concentration en  $\text{K}^+$  des cellules végétales est finement contrôlée pour maintenir l'homéostasie de ce cation essentiel. L'expression et/ou l'activité d'autres transporteurs potassiques pourraient donc être régulées différemment chez les mutant *kup9* par rapport à l'écotype sauvage de manière à maintenir le niveau d'absorption de potassium nécessaire. Précédemment, Qi et al. (2008) ont d'ailleurs montré que le niveau d'expression de *HAK5* est régulé positivement chez un mutant invalidé sur le canal potassique dominant AKT1.

Les valeurs obtenues par RT-qPCR pour l'expression relative de *HAK5* en fonction du niveau de  $\text{K}^+$  (**Tableau V.3**) sont cohérentes avec les données publiées dans la littérature. Ainsi, le gène *HAK5* est 9 fois plus exprimé chez Col-0 en condition de carence potassique dans l'étude de Hampton et al. (2004). La comparaison des niveaux d'expression relatifs moyens indique que la surexpression de *HAK5* à 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  est plus marquée chez les mutants *kup9* que chez l'écotype sauvage Col-0. En revanche, dans la condition à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$ , il n'y pas de différences significatives entre les mutants et Col-0.

**Tableau V.3 : Expression relative de *HAK5* chez l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9* en fonction de la concentration en potassium dans le milieu.** La quantité de transcrits de *HAK5* à 10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  est rapportée à la condition contrôle 3000  $\mu\text{M}$   $\text{K}^+$ . Trois réplicats biologiques ont été utilisés par condition. Les lettres indiquées entre parenthèse mettent en évidence les différences significatives (voir section V.4 pour l'analyse statistique).

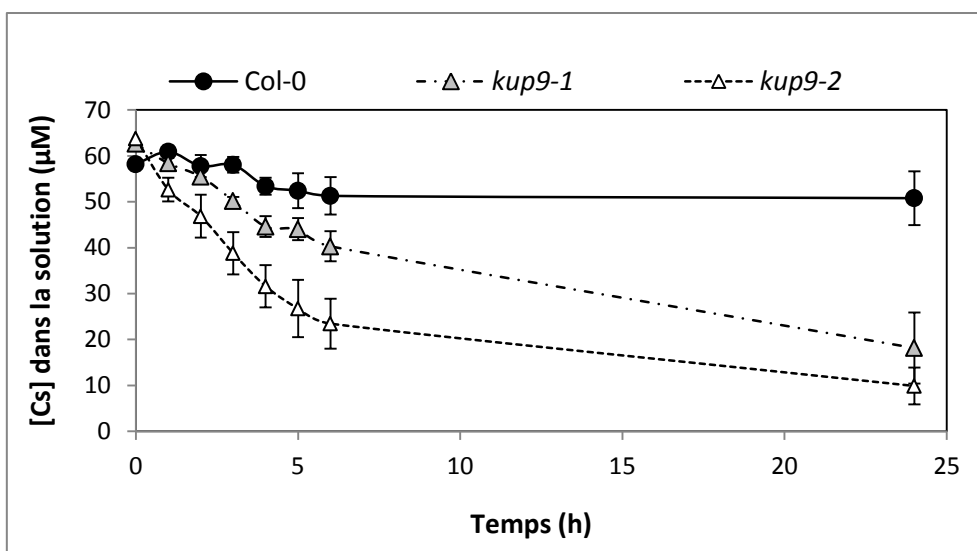
Traitement potassique ( $\mu\text{M}$ )	Lignées	p-value	Expression relative	Ecart-type
10	Col-0	$1,16 \cdot 10^{-5}$	11,9	1,3
	<i>kup9-1</i>	$9,46 \cdot 10^{-5}$	13,3	3,1
	<i>kup9-2</i>	$1,16 \cdot 10^{-7}$	14,3	3,8
100	Col-0	0,42	1,5 (a)	1
	<i>kup9-1</i>	0,01	4,1 (b)	1,1
	<i>kup9-2</i>	0,01	3,3 (b)	0,4

Ces résultats suggèrent que le niveau de  $\text{K}^+$  à partir duquel *HAK5* est induit est plus haut chez les mutants *kup9* que chez l'écotype sauvage Col-0. Néanmoins, dans les conditions en potassium utilisées pour les tests d'accumulation du césium décrit dans la **Section V.3**, le niveau d'expression de *HAK5* est équivalent entre l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9*. L'hypothèse selon laquelle l'accumulation de césium chez les lignées mutantes *kup9* serait favorisée par une surexpression de *HAK5* n'est donc pas valide.

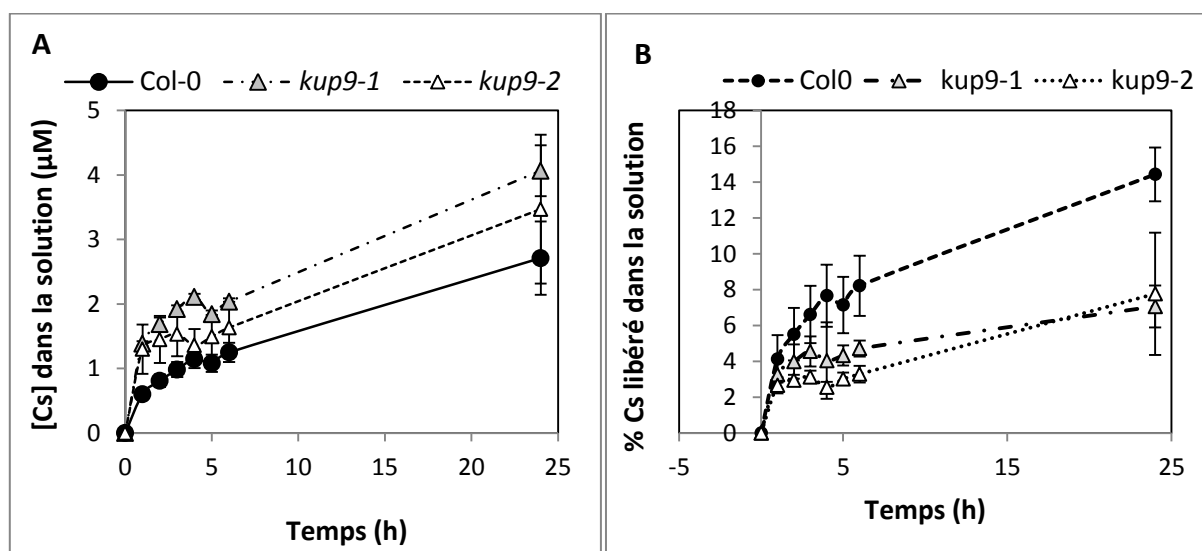
#### V.5.2 - Rôle de *KUP9* dans l'efflux de césium

Comme l'accumulation de césium est plus importante quand le gène *KUP9* est invalidé, nous avons également testé l'hypothèse selon laquelle le transporteur *KUP9* pourrait être impliqué dans l'efflux de  $\text{Cs}^+$  des racines vers le milieu extérieur (voir **Section II.2.3**). L'efflux de  $\text{Cs}^+$  a donc été comparé entre les mutants *kup9* et l'écotype sauvage Col-0.

Les plantes sont préalablement exposées à 50  $\mu\text{M}$  de césium stable en solution nutritive ne contenant pas de potassium pendant 24 h. À partir de 6h d'exposition, la déplétion du césium en solution est plus marquée pour les mutants *kup9* comparés à l'écotype sauvage Col-0 (**Fig. V.10**). Après ces 24 h d'exposition, les plantes sont transférées dans une solution nutritive ne contenant pas de césium. L'apparition de césium dans cette solution non contaminée indique un efflux de  $\text{Cs}^+$  des plantes préalablement exposées vers le milieu extérieur. Les concentrations en césium mesurées dans la solution non contaminée sont équivalentes pour les trois lignées testées (**Fig. V.11-A**). En revanche, en rapportant la quantité de césium libérée dans la solution par la plante à la quantité de césium préalablement accumulée (**Fig. V.11-B**), il apparaît que l'efflux de césium est deux fois moins important chez les mutants *kup9*.



**Figure V.10 : Déplétion du césium dans une solution d'exposition alimentant l'écotype sauvage Col-0 ou les mutants *kup9*.** Les plantes sont pré-cultivées pendant 7 jours en solution nutritive à 10 µM K avant exposition. La solution d'exposition ne contient pas de potassium.



**Figure V.11 : Efflux de césium de la plante vers le milieu extérieur pour l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9*.** A- Concentration en césium dans une solution nutritive alimentant les plantes préalablement exposées. B- La quantité de césium libérée de la plante vers la solution est rapportée à la quantité de césium accumulée dans la plante avant efflux.

Le transporteur KUP9 pourrait donc être impliqué dans les mécanismes d'efflux de césium de la plante vers le milieu extérieur. Bien que la localisation membranaire de KUP9 reste encore inconnue, l'activité de son promoteur dans les racines (**Section V.1**) appuie cette observation.

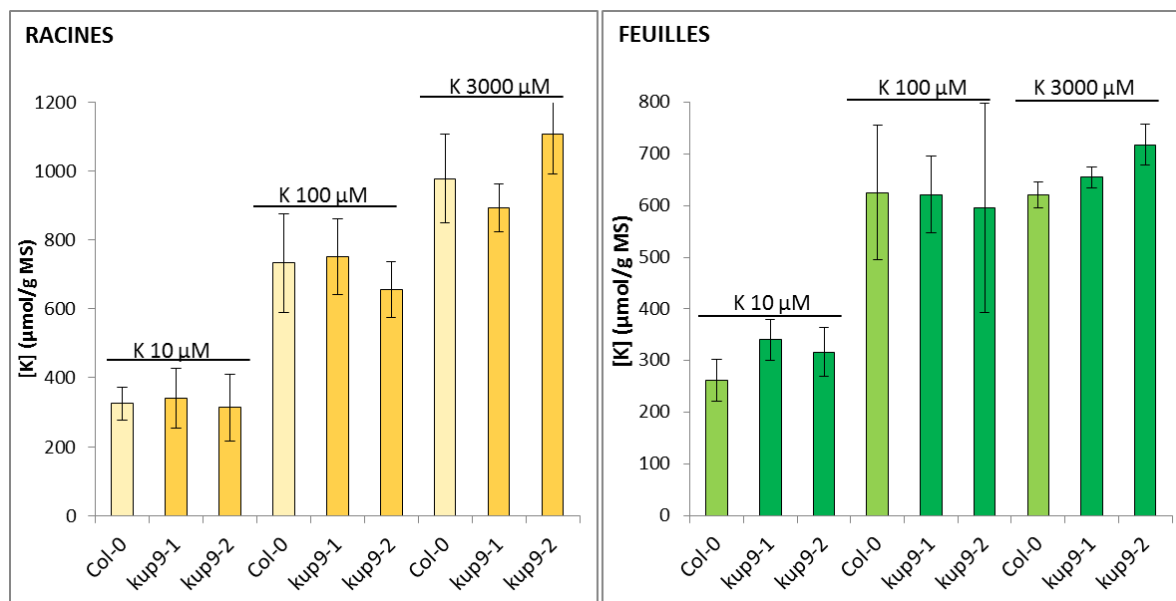
L'efflux racinaire de  $Cs^+$  vers le milieu extérieur n'est quantifié que dans de rares études. Nous ne pouvons donc pas confronter directement nos résultats à d'autres données. Dans l'étude de Zhu et al., (2000), des plantules de blé sont placées pendant 72h dans une solution d'exposition à  $8 \text{ Bq.mL}^{-1}$  de  $^{137}\text{Cs}$  (soit  $0,019 \text{ nM}$ ). Après 3h d'éluion dans une solution ne contenant pas de césium, ils

enregistrent un efflux augmentant de 4 à 12% de l'absorption totale de césium avec l'augmentation du niveau de  $K^+$  dans le milieu extérieur de 50 à 100  $\mu\text{M}$ . Ces faibles taux d'efflux enregistrés sur une autre espèce végétale et dans des conditions expérimentales bien différentes sont néanmoins comparables à ceux mesurés dans nos tests.

#### V.6 – EVALUATION DES CAPACITÉS D'ABSORPTION DU POTASSIUM PAR LES MUTANTS *kup9*

Le transport du césium est étroitement lié à celui du potassium. L'inactivation de *KUP9* entraînant des modifications significatives de l'accumulation de césium dans certaines conditions, nous nous sommes donc naturellement intéressés à son effet sur la nutrition potassique. Pour cela nous avons comparé l'absorption et l'accumulation de potassium entre l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9*.

Dans un premier temps, nous avons comparé le statut potassique de plantes placées 7 jours en conditions hydroponiques à K-contrôlé (Fig. V.12). Il apparaît que les mutants *kup9* ne montrent pas de différences significatives sur leur contenu en potassium comparés à l'écotype sauvage Col-0.

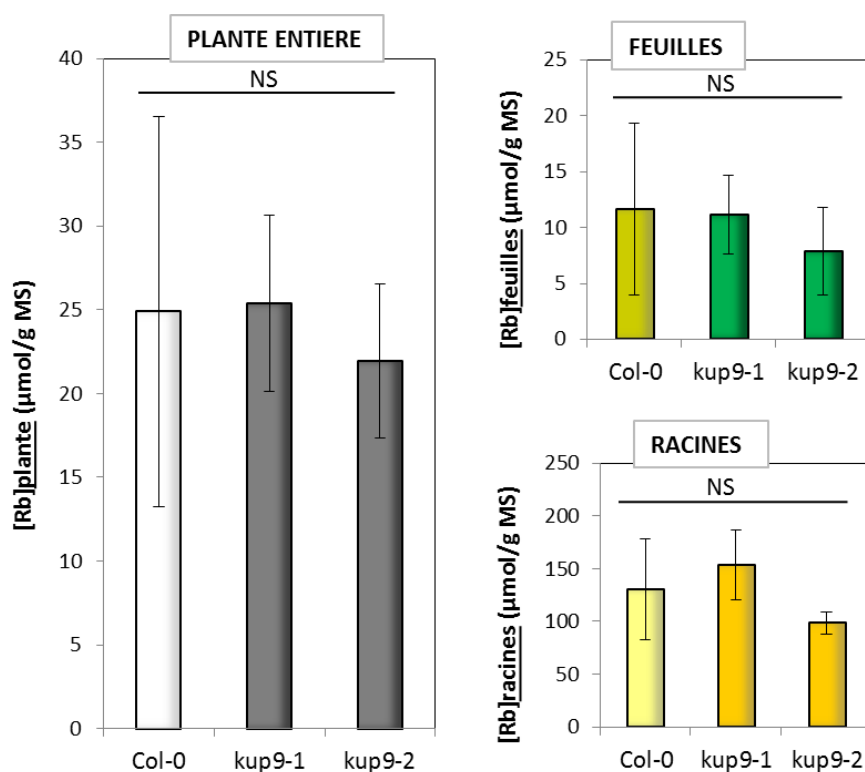


**Figure V.12 : Statut potassique des lignées mutantes *kup9* comparées à l'écotype sauvage Col-0.** Trois traitements (10, 100 et 3000  $\mu\text{M}$   $K^+$ ) ont été appliqués en hydroponie pendant 7 jours avant de mesurer le contenu en potassium des racines et des feuilles séparément. Les valeurs représentent les moyennes (avec l'écart-type) obtenues sur un minimum de 4 plantes pour chaque condition. L'expérience a été répétée au moins trois fois pour chaque traitement potassique.

Comme expliqué dans le **Chapitre III**, les étapes de culture précédant le traitement potassique peuvent influencer la réponse des plantes. Ainsi, il est possible que l'apport suffisant en potassium fourni aux plantes avant qu'elles ne soient placées dans chacune des conditions en  $K^+$  puisse avoir une influence sur leur statut potassique après traitement (Kanter et al. 2010). Dans un second temps, les capacités d'absorption du  $K^+$  chez les mutants *kup9* ont donc été évaluées indirectement par l'utilisation de rubidium (Rb), un analogue du potassium. Pour cela, des plantes de chaque lignée ont été transférées individuellement dans une solution contenant du  $\text{RbCl}$ , en absence de  $K^+$ , et le



contenu en  $\text{Rb}^+$  des feuilles et des racines a ensuite été mesuré (**Fig.V.13**). Après 7 h d'exposition, nous n'observons pas de différences significatives entre les mutants *kup9* et l'écotype sauvage Col-0.



**Figure V.13 : Absorption du rubidium, analogue du potassium, chez les lignées mutantes *kup9* comparées à l'écotype sauvage Col-0.** Les plantes sont pré-cultivées en solution nutritive à  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  pendant 7 jours avant d'être exposées à une solution nutritive à  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{RbCl}$  et absence de  $\text{K}^+$ . Le contenu en  $\text{Rb}$  est mesuré après 7h d'exposition. L'expérience a été répétée trois fois et les données présentées correspondent aux moyennes (avec l'écart-type) obtenues pour 5 plantes par lignée. Les moyennes obtenues pour chacune des lignées ont été comparées par ANOVA (voir légende **Fig.V.4**).

Le rubidium est souvent utilisé comme traceur du potassium chez les plantes (Hirsch et al., 1998 ; Spalding et al., 1999 ; Gierth et al., 2005 ; Rubio et al., 2008) mais son utilisation est parfois remise en question. Au niveau moléculaire, le canal potassique *AKT1* exprimé en ovocyte de Xénope pour des tests d'électrophysiologie, a une perméabilité relative de 0,65 pour le  $\text{Rb}^+$  comparée à la perméabilité pour le  $\text{K}^+$  (Maathuis & Sanders, 1995). En revanche, les transporteurs de type *KUP/HAK/KT* ne semblent pas discriminer le  $\text{Rb}^+$  du  $\text{K}^+$  (Rodríguez-Navarro & Rubio, 2006). Globalement, il existe donc une discrimination envers le rubidium et en faveur du potassium au niveau de racines (Marschner & Schimansky, 1971) : l'absorption de potassium est sous-estimée par l'utilisation de son analogue. L'utilisation du  $^{42}\text{K}$  comme traceur de l'absorption du potassium dans les laboratoires qui possèdent le matériel nécessaire à sa fabrication serait ainsi préférable au  $\text{Rb}$ .

Finalement, nous n'avons mesuré de différences significatives ni du statut potassique ni de l'absorption de rubidium entre l'écotype sauvage Col-0 et les deux lignées mutantes *kup9*. Compte-

tenu de ces résultats, on peut vraisemblablement considérer que l'inactivation du gène *KUP9* n'impacte pas la nutrition potassique des plantes.

## V.7 –CONCLUSIONS

A notre connaissance, les tests présentés dans ce chapitre sont les premiers à démontrer un rôle *in-planta* du transporteur KUP9 dans l'accumulation de césium. Ainsi, l'inactivation du gène *KUP9* chez les lignées mutantes réduit la part de césium libérée par la plante dans le milieu extérieur suggérant que le transporteur KUP9 pourrait être impliqué dans l'efflux de césium. Ce blocage partiel de l'efflux expliquerait alors l'augmentation de l'accumulation et de la sensibilité au césium chez les lignées mutantes *kup9-1* et *kup9-2* comparativement à l'écotype sauvage Col-0. Nous obtenons les mêmes résultats chez les deux lignées mutantes *kup9* ce qui confirme que c'est bien l'inactivation du gène *KUP9* qui engendre les effets observés.

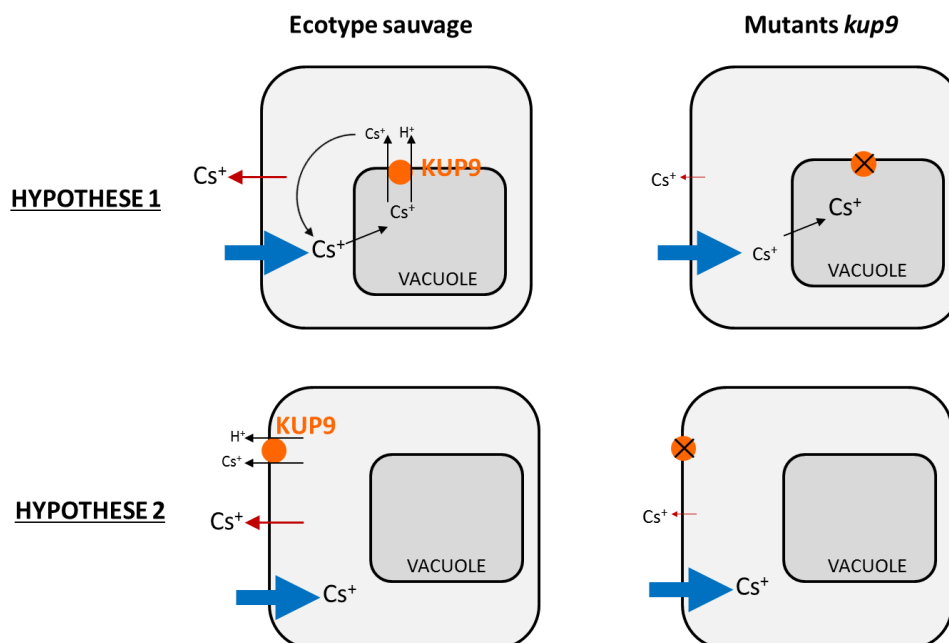
L'effet de l'inactivation du gène *KUP9* sur la sensibilité et l'accumulation de césium dépend du niveau de potassium appliqué. Cette régulation de l'activité du transporteur KUP9 par l'apport en potassium ne se fait vraisemblablement pas au niveau transcriptionnel puisque le niveau d'expression du gène *KUP9* reste inchangé en condition de carence en  $K^+$  (10  $\mu$ M) comparé à une culture en  $K^+$  suffisant (3000  $\mu$ M). Nous avons également montré dans ce chapitre que le niveau d'expression du gène *HAK5* est sensiblement identique entre les lignées mutantes *kup9* et l'écotype sauvage Col-0. Nous suggérons donc que le niveau de potassium agit directement sur l'activité du transporteur KUP9 ou du moins sur sa contribution dans le transport de césium. Compte-tenu des différentes composantes mises en évidence dans le système de transport du potassium et du césium et dont la part d'action dépend notamment des concentrations potassiques, il n'est en effet pas surprenant d'observer des phénotypes K-dépendants chez les lignées mutantes.

Le rôle de KUP9 dans l'accumulation de césium peut être envisagé selon deux mécanismes différents (Fig.V.14) :

**Hypothèse 1.** Dans des conditions de carence en potassium, la concentration potassique vacuolaire peut devenir plus faible que dans le cytosol (Walker et al., 1996). L'efflux de potassium de la vacuole vers le cytosol doit alors passer par un transporteur actif encore non identifié (Ahmad & Maathuis, 2014). Comme indiqué dans le Chapitre IV, des études protéomiques indiquent la présence de transporteurs de type KUP/HAK/KT dans le tonoplaste (Jaquinod et al., 2007 ; Whiteman et al., 2008 ; Hamamoto & Uozumi, 2014). Des transporteurs de type KUP pourraient donc être impliqués dans l'efflux de potassium de la vacuole vers le cytosol dans des conditions de carence potassique. Appliqué au césium, comme il est admis qu'ils sont peu sélectifs, des transporteurs de type KUP/HAK/KT pourraient également prendre en charge son efflux de la vacuole vers le cytosol. Dans ce cas, en posant l'hypothèse que KUP9 serait un de ces transporteurs (bien qu'il n'ait pas encore été identifié dans le protéome vacuolaire d'*Arabidopsis*), son inactivation chez les mutants *kup9* conduirait à un stockage de césium plus important dans la vacuole et donc potentiellement une absorption plus importante liée à la réduction de la concentration en césium dans le cytosol.

**Hypothèse 2.** La localisation de l'activité du promoteur du gène *KUP9* dans les racines vient étayer les arguments en faveur d'une implication du transporteur KUP9 dans les mécanismes d'efflux du césium vers le milieu extérieur. Malheureusement, la fusion KUP9-GFP ne nous a pas permis de déterminer la localisation membranaire de la protéine. Nous ne pouvons donc pas encore conclure

sur les mécanismes impliquant KUP9 dans l'accumulation de césium (transporteur d'efflux sur la membrane plasmique des cellules racinaires ou sur le tonoplaste).



**Figure V.13 : Hypothèses sur les mécanismes impliquant le transporteur KUP9 dans l'accumulation de césium chez *A. thaliana*.**

Finalement, nous n'avons détecté d'effets de l'inactivation du gène *KUP9* ni sur le statut potassique ni sur l'absorption d'un analogue du potassium chez les lignées mutantes *kup9* comparées à l'écotype sauvage Col-0. Les atteintes portées à la nutrition potassique par l'inactivation du gène *KUP9* sont donc vraisemblablement négligeables alors que l'accumulation de césium augmente significativement. Ce résultat est particulièrement encourageant dans un objectif d'amélioration des plantes dédiées à la phytoremédiation des sols contaminés en césium, sans altérations du transport du macronutriment potassium.

## **CHAPITRE VI**

### **CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**

L'objectif global de ma thèse était d'approfondir les connaissances sur l'identité et le fonctionnement des transporteurs impliqués dans une part significative du flux de césium chez les plantes. Du fait des analogies entre le potassium et le césium, nous sommes partis de l'hypothèse préliminaire que le césium emprunte préférentiellement le système de transport potassique. Nous avons donc concentré les recherches de transporteurs participant à l'absorption et/ou à la translocation du césium sur les différentes familles impliquées dans les flux de potassium.

### **VI.1 – L'ETUDE DU SYSTEME DE TRANSPORT POTASSIQUE POUR METTRE EN EVIDENCE DES CANDIDATS POTENTIELS IMPLIQUES DANS LES FLUX DE CESIUM**

Le potassium étant un macronutriment essentiel et représentant une part dominante des ions absorbés par le système racinaire, les mécanismes de transport potassique sont plutôt bien connus notamment chez la plante modèle *A. thaliana*. Les familles de protéines de transport potassique sont composées de symports, d'antiports et de canaux fonctionnant dans des gammes de concentrations en potassium différentes et possédant des propriétés diverses. Comme nous l'avons vu dans l'analyse bibliographique, certaines de ces protéines présentent un potentiel plus grand que d'autres pour le transport de césium.

Un système encore non identifié, vraisemblablement composé de canaux cationiques (NSCC) et d'antiports cations/H<sup>+</sup> (CHX) non spécifiques, intervient significativement dans l'absorption racinaire de potassium dès 100 μM de K<sup>+</sup> dans le milieu extérieur. Le fait que ce type de protéines ne soit pas spécifique d'un cation en particulier suggère que les NSCC et les CHX sont des candidats sérieux pour le transport de Cs<sup>+</sup>. Des mutants d'insertion dans différents gènes de la famille des *CNGC* (codant pour des canaux cationiques non sélectifs) exposés à 1 mM de Cs<sup>+</sup> stable en milieu agar accumulent ainsi plus ou moins de césium que l'écotype sauvage (Hampton et al., 2005). Des tests similaires ne sont pas publiés pour les CHX mais la redondance des fonctions assurées par les gènes codant pour ce type de transporteurs apparaît comme une difficulté majeure pour ce genre d'étude. En effet, il est possible que l'inactivation d'un transporteur CHX soit compensée par un autre transporteur de la même famille. Ainsi, dans un autre contexte visant à déterminer le rôle des transporteurs CHX exprimés dans le pollen, il apparaît que cette redondance de fonctions empêche l'observation de phénotype particulier chez des lignées de mutants d'insertion *chx* (Zhao et al., 2008).

Le canal potassique Shaker AKT1 le plus souvent associé à la sous-unité KC1, est un acteur majeur de l'absorption racinaire de K<sup>+</sup> pour une large gamme de concentrations potassiques allant de la cinquantaine de μM à la dizaine de mM. La sélectivité de ce type de canaux pour le potassium ainsi que leur inhibition par la présence de césium dans le milieu extérieur en font des candidats avec un faible potentiel pour le transport de césium. D'ailleurs, l'inactivation du gène *AKT1* chez des lignées mutantes d'*A. thaliana* n'a pas d'effets significatifs sur l'absorption de césium (Broadley et al., 2001).

Dans la gamme de concentrations potassiques de l'ordre du μM, l'activité du transporteur HAK5 est dominante pour l'absorption racinaire de K<sup>+</sup>. Ce transporteur haute-affinité appartient à la famille des symports supposés H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> nommée KUP/HAK/KT avec 12 autres transporteurs. Des preuves de l'implication du transporteur HAK5 dans l'absorption racinaire de césium, en conditions de faibles apports en potassium, existaient déjà dans la littérature avant le début de mon projet de thèse. En revanche, les connaissances sur le rôle des autres transporteurs KUP dans le transport de césium étaient encore très incomplètes.

## VI.2 - L'ABSORPTION, L'ACCUMULATION ET LA DISTRIBUTION DU CESIUM CHEZ *A. THALIANA*

Dans un premier temps, je me suis intéressée à la mesure du flux de césium chez des plantes cultivées avec différents niveaux d'apport en potassium (**Chapitre III**). En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le niveau de potassium influence la contribution de chacun des types de transport potassique : HAK5 est dominant à faible concentrations (10  $\mu\text{M}$ ), AKT1 et HAK5 sont actifs pour des concentrations intermédiaires (100  $\mu\text{M}$ ), AKT1 et un autre système interviennent à fortes concentrations en potassium (3000  $\mu\text{M}$ ). Chacune de ces protéines de transport possèdent des propriétés différentes (sélectivité, fonctionnement de type transporteur ou de type canal...), ce qui aboutit finalement à des variations des paramètres cinétiques d'absorption et de la distribution du potassium dans la plante en fonction de la concentration potassique dans le milieu. Nous nous sommes donc interrogés sur l'effet du niveau de potassium sur les paramètres cinétiques et sur la distribution du césium afin de relier, par analogie, les changements macroscopiques observés aux connaissances de l'identité et des propriétés des systèmes de transport potassique.

Afin de décrypter les mécanismes de translocation et de recirculation du césium, nous nous sommes intéressés à la distribution du césium entre les feuilles et les racines. Quelle que soit la durée de l'exposition au césium (15 min ou 7 jours), la part de césium allouée aux feuilles diminue en conditions d'apport limité en potassium (10  $\mu\text{M}$ ). Entre autres hypothèses, il est vraisemblable que le comportement du césium puisse mimer celui du potassium. Par analogie avec l'ajustement des concentrations en potassium dans les feuilles et les racines interprété comme un mécanisme d'adaptation des plantes à une carence potassique, la circulation du césium pourrait impliquer les canaux SKOR (au niveau du xylème) et AKT2/3 (au niveau du phloème). Cette hypothèse pourrait être évaluée par des tests d'accumulation du césium sur des mutants d'insertion *skor* et/ou *akt2*. Notons néanmoins qu'il est possible que d'autres protéines de transport puissent compenser l'invalidation de SKOR et d'AKT2/3 chez de tels mutants afin de « sauvegarder » les mécanismes de chargement du xylème et du phloème. Ainsi, d'autres canaux ainsi que des transporteurs de type KUP (KUP7, Han et al., 2016) pourraient intervenir sans que l'on ne connaisse encore les détails de leur contribution dans ces mécanismes (Deeken et al., 2002 ; Ahmad & Maathuis, 2014).

En ce qui concerne l'absorption racinaire de césium, nous avons observé une augmentation significative de l'affinité apparente (inverse du paramètre  $K_m$  de l'équation de Michaëlis-Menten) dans des conditions de carence potassique. Dans ces mêmes conditions, l'efficacité de l'absorption de césium diminue avec l'augmentation de la concentration en césium dans le milieu extérieur. Ces résultats sont en accord avec les connaissances sur le fonctionnement de type transporteur de HAK5 et de son rôle dans l'absorption de césium quand l'apport en potassium est faible. Pour aller un peu plus loin dans la caractérisation du rôle de HAK5 dans l'absorption de césium, nous avons comparé l'influx de césium entre une lignée de mutants d'insertion dans le gène *HAK5* à l'écotype sauvage de référence pour différentes concentrations en césium dans le milieu extérieur. Nous avons pu ainsi mettre en évidence que la contribution du transporteur HAK5 dans l'absorption racinaire de césium en conditions de carence potassique était largement diminuée quand les concentrations en césium dépassent la centaine de  $\mu\text{M}$ . Dans ces conditions, nous avons vu que les propriétés des canaux non sélectifs codés par des gènes de la famille des *CNGC* suggèrent qu'ils puissent être impliqués dans l'influx de césium.

Les données sur l'intensité de l'influx et sur le schéma de distribution du césium *in-planta* nous ont donc permis d'évaluer le rôle potentiel de certains transporteurs. Elles pourraient également être réutilisées dans un objectif d'évaluation des modèles de prédiction du transfert de radiocésium aux plantes. Récemment, il a été montré pour le riz que la prise en compte de l'effet du niveau de potassium sur l'expression de certains transporteurs (composante bas niveau/haut niveau de potassium) améliore la justesse des modèles de prédiction des transferts de césium à la plante (Fujimura et al., 2014). Ayant réalisé des mesures pour trois niveaux de potassium correspondant à des contributions différentes des trois systèmes d'absorption majeurs, il serait intéressant de conduire le même type de comparaison à l'aide des données obtenues.

### VI.3 - L'ÉTUDE DE MUTANTS D'INSERTION POUR L'IDENTIFICATION DE TRANSPORTEURS IMPLIQUÉS DANS LE TRANSPORT DU CESIUM

Du fait de la disponibilité de banques de mutants d'insertion conséquentes pour cette plante modèle, c'est *A. thaliana* qui a été choisie comme sujet d'étude pendant ma thèse. En effet, nous avons vu que la méthodologie adoptée pour l'identification de transporteurs perméables au césium consistait ici à comparer la sensibilité au césium et son accumulation entre des mutants invalidés pour un transporteur de potassium et un écotype sauvage non muté. Néanmoins, la vérification de ces lignées de mutants nous est apparue essentielle avant d'attribuer les différences phénotypiques observées à l'inactivation du transporteur. La localisation de l'insertion de l'ADN-T et son homozygotie ont donc été vérifiées sur les lignées mutantes avant de comparer leur phénotype en présence de césium à celui de l'écotype sauvage non muté.

Face à la diversité des transporteurs potentiellement impliqués dans le transport de césium, j'ai choisi de concentrer mon attention sur une famille de 13 transporteurs KUP/HAK/KT en particulier. Sur ces 13 transporteurs, nous avons pu obtenir des lignées mutantes valides pour 10 d'entre eux. Afin d'éliminer les divergences potentielles existant entre différents écotypes, c'est l'écotype Columbia qui a été étudié pour l'écotype sauvage non muté et pour les lignées de mutants (fonds génétiques Columbia-0 ou Columbia-3). Les tests sur ces lignées mutantes ont révélé que 2 transporteurs étaient impliqués dans des mécanismes de sensibilité/tolérance au césium : HAK5, déjà connu pour son rôle dans l'absorption de césium, et KUP9 testé positivement pour la première fois *in-planta*.

Des difficultés ont été rencontrées pour certaines lignées de mutants *kup* (mauvaise localisation de l'ADN-T, graines non disponibles...) tandis que, simultanément, des résultats encourageants mais nécessitant d'être validés ont été observés sur les mutants *kup9*. Ces lignées ont donc été écartées de ma thèse bien qu'elles auraient pu avoir des comportements différents de l'écotype sauvage vis-à-vis du césium. Par exemple, si on se base sur l'étude récemment publiée mettant en évidence le rôle du transporteur KUP7 dans la translocation du potassium (Han et al., 2016), il pourrait être pertinent de tester la sensibilité et la distribution du césium chez des mutants *kup7*. Il serait également intéressant de tester des lignées mutantes invalidées sur d'autres types de transporteurs potassiques. En se basant par exemple sur des études reliant une partie de cette famille à l'efflux de  $K^+$  des chloroplastes vers le cytosol (Aranda-Sicilia et al. 2012 ; Kunz et al., 2014 ; Dana et al., 2016), il est tentant de penser que certains KEA pourraient également intervenir dans la compartimentation du césium. Comme la toxicité du césium est vraisemblablement liée en partie à sa présence dans les

chloroplastes, on pourrait ainsi observer un effet de l'invalidation de chacun des 6 gènes codant pour ces antiports chez *A. thaliana* sur la tolérance au césium.

En outre, d'autres protéines qui ne sont pas liées directement au transport du potassium sont étudiées par l'équipe du CEA. En effet, si l'analogie entre le potassium et le césium suggère que ce dernier emprunte majoritairement le système de transport potassique, de nombreux autres facteurs influencent le passage de ce cation à travers la membrane plasmique. Par exemple, le transport de césium (comme pour tous les autres solutés) est couplé au gradient de protons entretenu par l'activité de pompes à protons nommées AHA (*Arabidopsis* H<sup>+</sup>-ATPase) chez *Arabidopsis*. L'effet de l'inactivation de certaines isoformes d'AHA sur l'accumulation de césium *in planta* a déjà pu être démontré et ouvre ainsi une autre piste de recherche encourageante.

#### VI.4 - LE ROLE DU TRANSPORTEUR KUP9 DANS L'ACCUMULATION DE CESIUM

Le rôle du transporteur KUP9 dans l'accumulation de césium a été étudié *in-planta* par génétique inverse. L'étude de deux lignées de mutants d'insertion (*kup9-1* et *kup9-2*) indique que l'inactivation du gène *KUP9* conduit à une augmentation de la sensibilité au césium qui se traduit par un ralentissement plus marqué de la croissance racinaire comparé à l'écotype sauvage placé dans les mêmes conditions. Cette « hypersensibilité » peut être reliée à une augmentation de l'accumulation de césium, mesurée en conditions hydroponiques sur 7 jours, chez les lignées mutantes *kup9*.

Nous avons pu mettre en évidence une transcription du gène *KUP9* dans les tissus racinaires de plantules et au niveau des grains de pollen de plantes matures par marquage GUS de l'activité de son promoteur. Nous avons également tenté de localiser la protéine KUP9 par fusion avec la GFP. Malheureusement, la fusion de la séquence codant pour la GFP à l'extrémité amino-terminale de KUP9 produit une protéine clivée. En ce qui concerne les lignées transgéniques avec la GFP fusionnée à l'extrémité carboxy-terminale de KUP9, des observations plus fines (sur des protoplastes de cellules racinaires) et des tests de vérification (détection de la protéine de fusion produite) sont nécessaires avant de conclure.

Nous avons montré que la part de césium relâchée dans le milieu extérieur était réduite chez les mutants *kup9* comparés à l'écotype sauvage. Comme expliqué plus haut, la localisation du transporteur KUP9 nous manque pour pouvoir trancher entre les deux hypothèses que nous proposons : KUP9 pourrait être impliqué dans des mécanismes d'efflux d'un compartiment intracellulaire vers le cytosol et/ou des racines vers le milieu extérieur.

Les différences observées entre l'écotype sauvage non muté et les lignées mutantes *kup9* sont K-dépendantes. Ainsi, l'inactivation du gène *KUP9* n'a pas d'effets significatifs visibles sur les flux de césium à fort niveau d'apport en potassium (1000-3000 μM). En revanche, comme pour le gène *HAK5*, des différences phénotypiques notables sont mesurables à faible niveau d'apport en potassium (10-20 μM). Différentes hypothèses ont été testées pour expliquer cette influence du niveau de potassium sur le rôle de KUP9 dans le transport de césium (mesure du niveau d'expression du gène *KUP9* pour différents traitements potassiques, comparaison du niveau d'expression du gène *HAK5*). Finalement, nous suggérons que la pluralité des mécanismes de transport du potassium et les facteurs (comme le gradient électrochimique par exemple) qui influencent l'intensité de leur contribution pourraient compenser l'absence du transporteur KUP9 à fort niveau de potassium.



## VI.5 - APPLICATION DES CONNAISSANCES AU DEVELOPPEMENT DE PHYTOSTRATEGIES

Cette thèse s'intègre dans le projet DEMETERRES et plus précisément dans ses objectifs de développement de phytotechnologies (en particulier de la phytoextraction) pour la gestion des sols contaminés en radiocésium. Les performances de la phytoextraction (en termes de vitesse de traitement et de teneur résiduelle post-traitement) dépendent de différents processus. La rétention forte du césium dans les sols (à cause de son adsorption sur les sites spécifiques des argiles par exemple) mais aussi des caractéristiques propres à la plante utilisée (faible biomasse, capacité d'absorption du césium insuffisante) peuvent ralentir et/ou limiter l'extraction du césium par absorption racinaire (White et al., 2003). Néanmoins, il est admis que la connaissance des gènes impliqués dans le trait phénotypique « accumulation et distribution du césium » chez les plantes peut être mise à profit dans l'optimisation de la phytoextraction et/ou le développement de « safe-food » (Zhu & Shaw, 2000 ; White et al., 2003 ; Payne et al., 2004). Les aspects traités dans ma thèse concernent l'identification des transporteurs participant à ce trait phénotypique, d'autres pistes (développées à la fin de cette section) étant explorées par ailleurs au sein du projet DEMETERRES.

Les programmes de sélection assistés par marqueurs (SAM) consistent à construire de nouvelles variétés de plantes qui combine les traits phénotypiques avantageux de différents individus, en suivant le génotype des générations obtenues au cours des croisements. L'identification des gènes d'intérêts participant à l'expression du phénotype recherché, ici l'accumulation de césium par exemple, est donc indispensable à cette technologie. La SAM est largement utilisée chez les plantes d'intérêt agronomiques (comme le maïs) pour améliorer les résistances aux maladies et ravageurs par exemple. Ainsi, de tels programmes de sélection pourraient être appliqués à l'amélioration des capacités des plantes à discriminer ou au contraire à accumuler le césium. L'avantage de ce type de programme est la production de plantes non transgéniques, donc socialement acceptable en l'état. Par contre le développement d'une nouvelle variété est un processus lent. En marge du projet DEMETERRES, est cependant apparu l'intérêt de divers semenciers. Ces derniers disposent de banques variétales de différentes espèces, générées par mutation chimique du génome (non OGM), et pourraient, par utilisation de ces marqueurs, identifier dans leurs banques une ou des variétés présentant les caractéristiques d'intérêt.

Les connaissances sur les transporteurs impliqués dans l'accumulation de césium pourraient également être utilisées pour moduler l'expression des gènes d'intérêt chez des cultures transgéniques. Par exemple, Alemán et al. (2014) ont montré qu'une mutation du transporteur *AtHAK5* améliorant sa sélectivité pour le potassium a pour effet de réduire l'accumulation de césium en système hétérologue levure. D'autres travaux encourageants montrent que la surexpression d'un gène (*At4g18280*) induit l'expression de *AtHAK5* même en conditions suffisantes en potassium (Adams et al., 2014). Sachant que *AtHAK5*, dont l'expression est induite par une carence en potassium, est impliqué dans l'absorption de césium (Qi et al., 2008), il serait intéressant de déterminer si la surexpression de *At4g18280* pourrait améliorer l'accumulation de césium chez *A. thaliana*. L'applicabilité de telles options est bien sûr questionnable, l'acceptabilité sociale de l'utilisation de plantes transgéniques en extérieur n'étant pas acquise.

De la même façon, les connaissances que nous avons pu apporter pendant cette thèse sur le rôle de *KUP9* dans l'accumulation de césium pourraient être réutilisées dans un objectif d'amélioration des plantes dédiées à la gestion des territoires contaminés en radiocésium. En effet, nous avons montré

que l'inactivation de KUP9 augmente de 30% l'absorption de césium par *A. thaliana* en conditions hydroponiques et avec un faible apport en potassium. De plus, nous n'avons pas observé d'impacts négatifs significatifs de l'inactivation de KUP9 sur l'accumulation de l'élément essentiel potassium. On pourrait donc imaginer de manipuler génétiquement l'expression du gène *KUP9* afin d'accroître la capacité d'accumulation des plantes ou au contraire de la réduire (par surexpression du gène). Des stratégies similaires ont d'ailleurs déjà été utilisées chez le tabac pour l'amélioration de la résistance au cadmium par surexpression du gène *LCT1* (Antosiewicz & Henning, 2003) ou encore la réduction de l'accumulation de plomb par surexpression d'un canal de type CNGC invalidé au niveau de son domaine régulateur (Sunkar et al., 2000).

En parallèle des questionnements sur l'acceptabilité sociale des plantes transgéniques, l'application des connaissances obtenues concernant le rôle du transporteur KUP9 dans l'accumulation de césium soulève également des questions techniques. Par exemple, nous avons travaillé sur *A. thaliana* qui ne produit qu'une faible biomasse comparée à d'autres plantes d'intérêt agronomique. On peut donc se poser la question de la transférabilité des résultats c'est-à-dire de la conservation des gènes *KUP* et de leurs propriétés pour d'autres espèces végétales. Dans la littérature, de récentes études phylogénétiques s'intéressent à la conservation de la famille des KUP/HAK/KT dans le règne végétal. Si les membres du Cluster III (comme c'est le cas de KUP9) semblent partager un ancêtre commun pour différentes espèces de Monocotylédones et de Dicotylédones, les connaissances sont encore trop partielles pour valider l'hypothèse selon laquelle ces transporteurs seraient impliqués dans des rôles physiologiques communs à toutes les espèces végétales (Véry et al., 2014). D'ailleurs il n'est pas rare que des protéines d'un même groupe phylogénétique aient des localisations subcellulaires et potentiellement des rôles différents (Gupta et al., 2008). Finalement, il apparaît qu'*Arabidopsis* est un modèle d'étude adapté pour des transporteurs bien conservés (Nieves-Cordones et al., 2016), comme c'est le cas du Cluster III dont fait partie KUP9. Ce modèle peut ainsi permettre de cibler les transporteurs à tester pour d'autres espèces, notamment des plantes cultivées : par exemple OsHAK27, OsHAK11 ou encore OsHAK17, proches de KUP9 d'un point de vue phylogénétique (Véry et al., 2014), apparaissent comme des candidats intéressants chez le riz.

En outre, il serait intéressant de comparer l'accumulation de césium entre l'écotype sauvage Col-0 et les lignées mutantes *kup9* sur un système sol contaminé en radiocésium. En effet, la rétention du césium dans les sols (dépendante de nombreux facteurs, comme expliqué dans le **Chapitre I**) limite sa disponibilité pour l'absorption racinaire si bien que les différences phénotypiques pourraient s'effacer. Dans le cadre du projet DEMETERRES, cinq sols « cibles » ont été sélectionnés parmi 20 sites correspondant à des centrales nucléaires de production d'électricité et à l'usine de retraitement de la Hague afin de tester les différentes technologies développées. Sous réserve de la viabilité d'*Arabidopsis* sur ces sols et du développement d'un dispositif adapté, il serait pertinent de comparer l'accumulation de césium entre l'écotype sauvage Col-0 et les lignées de mutants *hak5* et *kup9* dans ces conditions.

Au sein du projet DEMETERRES, 3 thématiques d'intérêt pour le transfert de césium sont étudiées en parallèle : i) l'aspect transporteur développé dans ce travail et qui renvoie à la capacité d'absorption, ii) l'enracinement ou plutôt le rapport entre la localisation de la majorité des racines et celle de la contamination, et iii) l'exsudation d'acides organiques et indirectement leurs effets sur la biodisponibilité du Cs<sup>+</sup> au voisinage des racines. Les connaissances acquises dans ce travail pourraient donc être couplées à celles des autres thématiques dans le but de fusionner dans la même plante les

meilleures performances sur ces aspects, auxquelles pourrait aussi être adjointe celle de la production de biomasse.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Absalom, J. P., Young, S. D., & Crout, N. M. J. (1995). Radiocaesium fixation dynamics: measurement in six Cumbrian soils. *European Journal of Soil Science*, *46*, 461-469.
- Absalom, J. P., Young, S. D., Crout, N. M. J., Sanchez, A., Wright, S. M., Smolders, E., . . . Gillett, A. G. (2001). Predicting the transfer of radiocaesium from organic soils to plants using soil characteristics. *Journal of Environmental Radioactivity*, *52*, 31-43.
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., & Hedrich, R. (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *Febs Letters*, *486*, 93-98.
- Adams, E., Diaz, C., Matsui, M., & Shin, R. (2014). Overexpression of a Novel Component Induces HAK5 and Enhances Growth in *Arabidopsis*. *ISRN Botany*, *2014*.
- Ahmad, I., & Maathuis, F. J. (2014). Cellular and tissue distribution of potassium: Physiological relevance, mechanisms and regulation. *Journal of plant physiology*, *171*(9), 708-714.
- Ahn, S. J., Shin, R., & Schachtman, D. P. (2004). Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K<sup>+</sup> uptake. *Plant Physiology*, *134*(3), 1135-1145.
- AIEA (2010). Handbook of Parameter Values for the Prediction of Radionuclide Transfer in Terrestrial and Freshwater Environments. IAEA-TRS-472. IAEA, Vienna.
- Akamatsu, M., Komatsu, H., Mori, T., Adams, E., Shin, R., Sakai, H., . . . Ariga, K. (2014). Intracellular Imaging of Cesium Distribution in *Arabidopsis* Using Cesium Green. *ACS applied materials & interfaces*, *6*(11), 8208-8211.
- Akiba, K., Hashimoto, H., & Kanno, T. (1989). Distribution coefficient of cesium and cation exchange capacity of minerals and rocks. *Journal of Nuclear Science and Technology*, *26*, 1130-1135.
- Alemán, F., Caballero, F., Ródenas, R., Rivero, R. M., Martínez, V., & Rubio, F. (2014). The F130S point mutation in the *Arabidopsis* high-affinity K<sup>+</sup> transporter AtHAK5 increases K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> selectivity and confers Na<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> tolerance to yeast under heterologous expression. *Frontiers in plant science*, *5*, 430.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., & Rubio, F. (2011). Root K<sup>+</sup> acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. *Plant and Cell Physiology*, *52*(9), 1603-1612.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., . . . Cheuk, R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, *301*(5633), 653-657.
- Amtmann, A., & Blatt, M. R. (2009). Regulation of macronutrient transport. *New Phytologist*, *181*(1), 35-52.
- Andersson, K. G., & Roed, J. (1994). The behaviour of Chernobyl <sup>137</sup>Cs, <sup>134</sup>Cs and <sup>106</sup>Ru in undisturbed soil: implications for external radiation. *Journal of Environmental Radioactivity*, *22*, 183-196.
- Anschütz, U., Becker, D., & Shabala, S. (2014). Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *Journal of plant physiology*, *171*(9), 670-687.
- Antosiewicz, D. M., & Hennig, J. (2004). Overexpression of LCT1 in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environmental Pollution*, *129*, 237-245.
- Aranda-Sicilia, M. N., Cagnac, O., Chanroj, S., Sze, H., Rodríguez-Rosales, M. P., & Venema, K. (2012). *Arabidopsis* KEA2, a homolog of bacterial KefC, encodes a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter with a chloroplast transit peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1818*, 2362-2371.
- Armengaud, P., Breitling, R., & Amtmann, A. (2004). The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology*, *136*(1), 2556-2576.
- Avery, S. V. (1995). Caesium accumulation by microorganisms: uptake mechanisms, cation competition, compartmentalization and toxicity. *Journal of industrial microbiology*, *14*(2), 76-84.

- Avery, S. V. (1996). Fate of caesium in the environment: Distribution between the abiotic and biotic components of aquatic and terrestrial ecosystems. *Journal of Environmental Radioactivity*, 30(2), 139-171. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0265-931X\(96\)89276-9](http://dx.doi.org/10.1016/0265-931X(96)89276-9)
- Balagué, C., Lin, B., Alcon, C., Flottes, G., Malmström, S., Köhler, C., . . . Roby, D. (2003). HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *The Plant Cell*, 15(2), 365-379.
- Bange, G., & Overstreet, R. (1960). Some observations on absorption of cesium by excised barley roots. *Plant Physiology*, 35(5), 605.
- Bañuelos, M. A., Klein, R. D., Alexander-Bowman, S. J., & Rodriguez-Navarro, A. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO Journal*, 14(13), 3021-3027.
- Bañuelos, M. a. A., Garcíadeblas, B., Cubero, B., & Rodríguez-Navarro, A. (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiology*, 130(2), 784-795.
- Barragán, V., Leidi, E. O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J. A., . . . Pardo, J. M. (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(3), 1127-1142.
- Bassil, E., Coku, A., & Blumwald, E. (2012). Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 63(16), 5727-5740.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.-C., Ohto, M.-a., Ushijima, K., Nakano, R., . . . Blumwald, E. (2011). The *Arabidopsis* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K<sup>+</sup> homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant Cell*, 23(9), 3482-3497.
- Baxter, I., Brazelton, J. N., Yu, D., Huang, Y. S., Lahner, B., Yakubova, E., . . . Nordborg, M. (2010). A coastal cline in sodium accumulation in *Arabidopsis thaliana* is driven by natural variation of the sodium transporter *AtHKT1*; 1. *PLoS Genet*, 6(11), e1001193.
- Becker, D., Dreyer, I., HoTH, S., Reid, J. D., Busch, H., Lehnen, M., . . . Hedrich, R. (1996). Changes in voltage activation, Cs<sup>+</sup> sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K<sup>+</sup> channel KAT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 8123-8128.
- Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., . . . Voelker, C. (2004). *AtTPK4*, an *Arabidopsis* tandem-pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15621-15626.
- Bell, J., Minski, M., & Grogan, H. (1988). Plant uptake of radionuclides. *Soil Use and Management*, 4(3), 76-84.
- Benderitter, M., Vincent-Genod, L., Pouget, J. P., & Voisin, P. (2003). The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation. *Radiation research*, 159, 471-483.
- Benito, B., Haro, R., Amtmann, A., Cuin, T. A., & Dreyer, I. (2014). The twins K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in plants. *Journal of plant physiology*, 171(9), 723-731.
- Bertl, A., Reid, J. D., Sentenac, H., & Slayman, C. L. (1997). Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *Journal of Experimental Botany*, 48(Special Issue), 405-413.
- Bossemeyer, D., Schlösser, A., & Bakker, E. P. (1989). Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K<sup>+</sup> uptake system. *Journal of bacteriology*, 171(4), 2219-2221.
- Botha, C. E. J., Aoki, N., Scofield, G. N., Liu, L., Furbank, R. T., & White, R. G. (2008). A xylem sap retrieval pathway in rice leaf blades: evidence of a role for endocytosis? *Journal of Experimental Botany*, 59, 2945-2954.
- Bowen, H. J. M. (1979). *Environmental chemistry of the elements*.: Academic Press, London.
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis* a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7), 1499-1510.

- Bramham, J., & Riddell, F. G. (1994). Cesium uptake studies on human erythrocytes. *Journal of inorganic biochemistry*, 53, 169-176.
- Brandao-Mello, C. E., Oliveira, A. R., Valverde, N. J., Farina, R., & Cordeiro, J. M. (1991). Clinical and hematological aspects of <sup>137</sup>Cs: the Goiania radiation accident. *Health physics*, 60, 31-39.
- Broadley, M. R., Escobar-Gutiérrez, A. J., Bowen, H. C., Willey, N. J., & White, P. J. (2001). Influx and accumulation of Cs<sup>+</sup> by the akt1 mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. lacking a dominant K<sup>+</sup> transport system. *Journal of Experimental Botany*, 52(357), 839-844.
- Broadley, M. R., & White, P. J. (2012). Some elements are more equal than others: soil-to-plant transfer of radiocaesium and radiostrontium, revisited. *Plant and soil*, 355(1), 23-27.
- Broadley, M. R., & Willey, N. J. (1997). Differences in root uptake of radiocaesium by 30 plant taxa. *Environmental Pollution*, 97, 11-15.
- Broadley, M. R., Willey, N. J., & Mead, A. (1999). A method to assess taxonomic variation in shoot caesium concentration among flowering plants. *Environmental Pollution*, 106, 341-349.
- Buysse, J., Van den Brande, K., & Merckx, R. (1995). The distribution of radiocaesium and potassium in spinach plants grown at different shoot temperatures. *Journal of plant physiology*, 146(3), 263-267.
- Buysse, J., Van den Brande, K., & Merckx, R. (1996). Genotypic differences in the uptake and distribution of radiocaesium in plants. *Plant and soil*, 178(2), 265-271.
- Cambray, R. S., Cawse, P. A., Garland, J. A., Gibson, J. A. B., Johnson, P., Lewis, G. N. J., . . . Wade, B. O. (1987). Observations on radioactivity from the Chernobyl accident. *Nuclear energy*, 26, 77-101.
- Carraretto, L., Formentin, E., Teardo, E., Checchetto, V., Tomizioli, M., Morosinotto, T., . . . Szabó, I. (2013). A thylakoid-located two-pore K<sup>+</sup> channel controls photosynthetic light utilization in plants. *Science*, 342(6154), 114-118.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T., & Raikhel, N. V. (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell*, 16, 3285-3303.
- Cawse, P. A. (1983). The accumulation of caesium-137 and plutonium-239+ 240 in soils of Great Britain, and transfer to vegetation. In *Ecological aspects of radionuclide release*, ed. Coughtrey P.J., Bell J.N.B, Roberts T.M., Oxford, UK : Blackwell Scientific Publications, 47-62.
- Cellier, F., Conéjéro, G., Ricaud, L., Luu, D. T., Lepetit, M., Gosti, F., & Casse, F. (2004). Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *The Plant Journal*, 39, 834-846.
- Chanroj, S., Lu, Y., Padmanaban, S., Nanatani, K., Uozumi, N., Rao, R., & Sze, H. (2011). Plant-specific cation/H<sup>+</sup> exchanger 17 and its homologs are endomembrane K<sup>+</sup> transporters with roles in protein sorting. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 33931-33941.
- Chanroj, S., Wang, G., Venema, K., Zhang, M. W., Delwiche, C. F., & Sze, H. (2012). Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporters from algae to flowering plants.
- Clint, G., & Dighton, J. (1992). Uptake and accumulation of radiocaesium by mycorrhizal and non-mycorrhizal heather plants. *New Phytologist*, 121(4), 555-561.
- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I.-c., Lippok, B., Smith, R. K., & Bent, A. F. (2000). The *Arabidopsis* dnd1 “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9323-9328.
- Collander, R. (1941). Selective absorption of cations by higher plants. *Plant Physiology*, 16(4), 691.
- Corre, I., Niaudet, C., & Paris, F. (2010). Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704, 61-67.
- Coughtrey, P. J., & Thorne, M. (1983). *Radionuclide distribution and transport in terrestrial and aquatic ecosystems. A critical review of data. Volume 1*: AA Balkema.
- Daburon, F. (2000). Chaîne alimentaire. In *Le caesium de l’environnement à l’homme*, EDP Sciences, 151-186.

- Dana, S., Herdean, A., Lundin, B., & Spetea, C. (2016). Each of the chloroplast potassium efflux antiporters affects photosynthesis and growth of fully developed Arabidopsis rosettes under short-day photoperiod. *Physiologia Plantarum*.
- Davenport, R. (2002). Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany*, 90(5), 549-557.
- Davenport, R. J., MUÑOZ-MAYOR, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A., & Tester, M. (2007). The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1; 1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in Arabidopsis. *Plant, cell & environment*, 30(4), 497-507.
- Davis, J. J. (1963). Cesium and its relationship to potassium in ecology. In *Radioecology*, ed. V. Schultz & A.W. Klement, Reinhold, New York, 539-556.
- Davuluri, R. V., Sun, H., Palaniswamy, S. K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M., & Grotewold, E. (2003). AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC bioinformatics*, 4(1), 25.
- Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., . . . Hedrich, R. (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. *Planta*, 216(2), 334-344.
- Demidchik, V. (2014). Mechanisms and physiological roles of K<sup>+</sup> efflux from root cells. *Journal of plant physiology*, 171(9), 696-707.
- Demidchik, V., Davenport, R. J., & Tester, M. (2002). Nonselective cation channels in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 67-107.
- Demidchik, V., Essah, P. A., & Tester, M. (2004). Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of Arabidopsis root cells. *Planta*, 219(1), 167-175.
- Demidchik, V., & Maathuis, F. J. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*, 175(3), 387-404.
- Dennison, K. L., & Spalding, E. P. (2000). Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124, 1511-1514.
- Dietrich, P., Anshütz, U., Kugler, A., & Becker, D. (2010). Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels. *Plant Biology*, 12(s1), 80-93.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., . . . MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- Dräxl, S., Müller, J., Li, W. B., Michalke, B., Scherb, H., Hense, B. A., . . . Schäffner, A. R. (2013). Caesium accumulation in yeast and plants is selectively repressed by loss of the SNARE Sec22p/SEC22. *Nature communications*, 4.
- Dublineau, I., Grison, S., Grandcolas, L., Baudelin, C., Paquet, F., Voisin, P., . . . Gourmelon, P. (2007). Effects of chronic <sup>137</sup>Cs ingestion on barrier properties of jejunal epithelium in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70, 810-819.
- Duncan Lyngdoh, R. H., & Schaefer III, H. F. (2009). Elementary lesions in DNA subunits: electron, hydrogen atom, proton, and hydride transfers. *Accounts of chemical research*, 42, 563-572.
- Dushenkov, S., Mikheev, A., Prokhnevsky, A., Ruchko, M., & Sorochinsky, B. (1998). Phytoremediation of Radiocesium-Contaminated Soil in the Vicinity of Chernobyl, Ukraine. *Environmental Science & Technology*, 33(3), 469-475. doi: 10.1021/es980788+
- Elumalai, R. P., Nagpal, P., & Reed, J. W. (2002). A mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *The Plant Cell Online*, 14(1), 119-131.
- Epstein, E., & Hagen, C. (1952). A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology*, 27(3), 457.
- Epstein, E., Rains, D., & Elzam, O. (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 49(5), 684.
- Evans, A. R., Hall, D., Pritchard, J., & Newbury, H. J. (2012). The roles of the cation transporters CHX21 and CHX23 in the development of Arabidopsis thaliana. *Journal of experimental botany*, 63, 59-67.

- Fu, H. H., & Luan, S. (1998). AtKUP1: A dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from arabidopsis. *Plant Cell*, *10*(1), 63-73.
- Fujimura, S., Ishikawa, J., Sakuma, Y., Saito, T., Sato, M., & Yoshioka, K. (2014). Theoretical model of the effect of potassium on the uptake of radiocesium by rice. *Journal of Environmental Radioactivity*, *138*, 122-131. doi: 10.1016/j.jenvrad.2014.08.017
- Gajdanowicz, P., Michard, E., Sandmann, M., Rocha, M., Corrêa, L. G. G., Ramírez-Aguilar, S. J., . . . Van Dongen, J. T. (2011). Potassium (K<sup>+</sup>) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(2), 864-869.
- Garciadeblas, B., Senn, M. E., Bañuelos, M. A., & Rodríguez-Navarro, A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal*, *34*(6), 788-801.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., . . . Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell*, *94*(5), 647-655.
- Geras' kin, S. A., Fesenko, S. V., & Alexakhin, R. M. (2008). Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident. *Environment International*, *34*, 880-897.
- Ghosh, A., Sharma, A., & Talukder, G. (1993). Effects of cesium on cellular systems. *Biological trace element research*, *38*, 165-203.
- Gierth, M., & Mäser, P. (2007). Potassium transporters in plants—involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters*, *581*(12), 2348-2356.
- Gierth, M., Mäser, P., & Schroeder, J. I. (2005). The potassium transporter AtHAK5 functions in K<sup>+</sup> deprivation-induced high-affinity K<sup>+</sup> uptake and AKT1 K<sup>+</sup> channel contribution to K<sup>+</sup> uptake kinetics in Arabidopsis roots. *Plant Physiology*, *137*(3), 1105-1114.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., & Maathuis, F. J. (2007). The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K<sup>+</sup> conductance and plays a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(25), 10726-10731.
- Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D., & Maathuis, F. J. (2006). Arabidopsis thaliana cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *Journal of Experimental Botany*, *57*(4), 791-800.
- Gojon, A., Nacry, P., & Davidian, J.-C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current opinion in plant biology*, *12*(3), 328-338.
- Greenwood, N. N., & Earnshaw, A. (1984). Chemistry of the Elements. Pergamon press, Oxford.
- Grignard, E., Guéguen, Y., Grison, S., Lobaccaro, J.-M. A., Gourmelon, P., & Souidi, M. (2008). In vivo effects of chronic contamination with 137 cesium on testicular and adrenal steroidogenesis. *Archives of toxicology*, *82*, 583-589.
- Guéguen, Y., Lestaevel, P., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Jourdain, J.-R., . . . Souidi, M. (2008). Chronic contamination of rats with 137cesium radionuclide: impact on the cardiovascular system. *Cardiovascular toxicology*, *8*, 33-40.
- Gupta, M., Qiu, X., Wang, L., Xie, W., Zhang, C., Xiong, L., . . . Zhang, Q. (2008). KT/HAK/KUP potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*). *Molecular Genetics and Genomics*, *280*(5), 437-452.
- Hall, D., Evans, A. R., Newbury, H. J., & Pritchard, J. (2006). Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, *57*, 1201-1210.
- Hamamoto, S., & Uozumi, N. (2014). Organelle-localized potassium transport systems in plants. *Journal of plant physiology*, *171*, 743-747.
- Hampton, C., Broadley, M., & White, P. (2005). Short review: the mechanisms of radiocaesium uptake by Arabidopsis roots. *Nukleonika*, *50*, 3-8.
- Hampton, C. R., Bowen, H. C., Broadley, M. R., Hammond, J. P., Mead, A., Payne, K. A., . . . White, P. J. (2004). Cesium toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *136*(3), 3824-3837.
- Han, M., Wu, W., Wu, W.-H., & Wang, Y. (2016). Potassium Transporter KUP7 Is Involved in K<sup>+</sup> Acquisition and Translocation in Arabidopsis Root under K<sup>+</sup>-Limited Conditions. *Molecular plant*, *9*(3), 437-446.



- Han, W., & Yu, K. N. (2010). Ionizing radiation, DNA double strand break and mutation. *Advances in Genetics Research*, 4, 197-210.
- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiological reviews*, 92(4), 1777-1811.
- Heinrich, G. (1992). Uptake and transfer factors of  $^{137}\text{Cs}$  by mushrooms. *Radiation and environmental biophysics*, 31, 39-49.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P., & Sussman, M. R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, 280(5365), 918-921.
- Hong, J.-P., Takeshi, Y., Kondou, Y., Schachtman, D. P., Matsui, M., & Shin, R. (2013). Identification and characterization of transcription factors regulating Arabidopsis HAK5. *Plant and Cell Physiology*, ptc094.
- Horie, T., Hauser, F., & Schroeder, J. I. (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in plant science*, 14(12), 660-668.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., . . . Véry, A.-A. (2003). The Arabidopsis outward  $\text{K}^+$  channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 5549-5554.
- Hoth, S., Dreyer, I., & Hedrich, R. (1997). Mutational analysis of functional domains within plant  $\text{K}^+$  uptake channels. *Journal of Experimental Botany*, 48(Special Issue), 415-420.
- Hua, B.-G., Mercier, R. W., Zielinski, R. E., & Berkowitz, G. A. (2003). Functional interaction of calmodulin with a plant cyclic nucleotide gated cation channel. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(11), 945-954.
- Ichida, A., & Schroeder, J. (1996). Increased resistance to extracellular cation block by mutation of the pore domain of the Arabidopsis inward-rectifying  $\text{K}^+$  channel KAT1. *The Journal of membrane biology*, 151(1), 53-62.
- Ichida, A. M., Baizabal-Aguirre, V. M., & Schroeder, J. I. (1999). Genetic selection of inward-rectifying  $\text{K}^+$  channel mutants with reduced  $\text{Cs}^+$  sensitivity by random recombinant DNA shuffling mutagenesis and mutant selection in yeast. *Journal of Experimental Botany*, 50(Special Issue), 967-978.
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H. H., & Hedrich, R. (2001).  $\text{K}^+$  channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Letters*, 508, 463-469.
- Jabnoute, M. (2008). Adaptation des plantes au stress salin : caractérisation de transporteurs de sodium et de potassium de la famille HKT chez le riz. Manuscrit de thèse.
- Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J., & Bourguignon, J. (2007). A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(3), 394-412.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel. *Nature*, 423(6935), 33-41.
- Johnson, E. E., O'Donnell, A. G., & Ineson, P. (1991). An autoradiographic technique for selecting  $\text{Cs}^+$ -137-sorbing microorganisms from soil. *Journal of microbiological methods*, 13, 293-298.
- Jung, J.-Y., Shin, R., & Schachtman, D. P. (2009). Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(2), 607-621.
- Kanter, U., Hauser, A., Michalke, B., Dräxl, S., & Schäffner, A. R. (2010). Caesium and strontium accumulation in shoots of Arabidopsis thaliana: genetic and physiological aspects. *Journal of Experimental Botany*, erq213.
- Kaplan, B., Sherman, T., & Fromm, H. (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters*, 581(12), 2237-2246.
- Kato, Y., Sakaguchi, M., Mori, Y., Saito, K., Nakamura, T., Bakker, E. P., . . . Uozumi, N. (2001). Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of  $\text{K}^+$  transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6488-6493.
- Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N., & Schroeder, J. I. (1998). AtKUP1: An Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*, 10(1), 51-62.

- Kim, M. J., Ruzicka, D., Shin, R., & Schachtman, D. P. (2012). The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2. 11 modulates plant response to low-potassium conditions. *Molecular plant*, 5(5), 1042-1057.
- Kirk, G. J. D., & Staunton, S. (1989). On predicting the fate of radioactive caesium in soil beneath grassland. *Journal of Soil Science*, 40, 71-84.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Grussem, W., & Baginsky, S. (2004). The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology*, 14(5), 354-362.
- Kobayashi, D., Okouchi, T., Yamagami, M., & Shinano, T. (2014). Verification of radiocesium decontamination from farmlands by plants in Fukushima. *Journal of plant research*, 127(1), 51-56.
- Kobayashi, D., Uozumi, N., HISAMATSU, S. i., & Yamagami, M. (2010). AtKUP/HAK/KT9, a K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis thaliana, mediates Cs<sup>+</sup> uptake in Escherichia coli. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(1), 203-205.
- Köhler, C., Merkle, T., & Neuhaus, G. (1999). Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide-and calmodulin-regulated ion channels in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 18, 97-104.
- Komarov, E., & Bennett, B. G. (1983). Selected radionuclides. *World Health Organization, Geneva*.
- Kondo, M., Makino, T., Eguchi, T., Goto, A., Nakano, H., Takai, T., . . . Kimura, T. (2015). Comparative analysis of the relationship between Cs and K in soil and plant parts toward control of Cs accumulation in rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(1), 144-151.
- Konoplev, A. V., Viktorova, N. V., Virchenko, E. P., Popov, V. E., Bulgakov, A. A., & Desmet, G. M. (1993). Influence of agricultural countermeasures on the ratio of different chemical forms of radionuclides in soil and soil solution. *Science of The Total Environment*, 137, 147-162. doi: 10.1016/0048-9697(93)90383-H
- Kunz, H.-H., Gierth, M., Herdean, A., Satoh-Cruz, M., Kramer, D. M., Spetea, C., & Schroeder, J. I. (2014). Plastidial transporters KEA1,-2, and-3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), 7480-7485.
- Kwak, J. M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V. M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., . . . Schroeder, J. I. (2001). Dominant negative guard cell K<sup>+</sup> channel mutants reduce inward-rectifying K<sup>+</sup> currents and light-induced stomatal opening in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 127, 473-485.
- Lacombe, B., Becker, D., Hedrich, R., DeSalle, R., Hollmann, M., Kwak, J. M., . . . Coruzzi, G. (2001). The identity of plant glutamate receptors [3]. *Science*, 292(5521), 1486-1487.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., & Thibaud, J.-B. (2000). A shaker-like K<sup>+</sup> channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(6), 837-851.
- Lasat, M. M., Fuhrmann, M., Ebbs, S. D., Cornish, J. E., & Kochian, L. V. (1998). Phytoremediation of a radiocesium-contaminated soil: evaluation of cesium-137 bioaccumulation in the shoots of three plant species. *Journal of Environmental Quality*, 27(1), 165-169.
- Lasat, M. M., & Kochian, L. V. (1997). Potential for phytoextraction of 137 Cs from a contaminated soil. *Plant and soil*, 195(1), 99-106.
- Le Lay, P., Isaure, M.-P., Sarry, J.-E., Kuhn, L., Fayard, B., Le Bail, J.-L., . . . Bourguignon, J. (2006). Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of Arabidopsis thaliana cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply. *Biochimie*, 88(11), 1533-1547.
- Lebaudy, A., Véry, A. A., & Sentenac, H. (2007). K<sup>+</sup> channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters*, 581(12), 2357-2366.
- Le Maire, M. I., Foresta, B. d., Viel, A., Thauvette, L., Beauregard, G., & Potier, M. (1990). Effects of ionizing radiations on proteins. *Biochemical Journal*, 267, 431-439.
- Leng, Q., Mercier, R. W., Hua, B.-G., Fromm, H., & Berkowitz, G. A. (2002). Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiology*, 128(2), 400-410.

- Leng, Q., Mercier, R. W., Yao, W., & Berkowitz, G. A. (1999). Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiology*, *121*, 753-761.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., . . . Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, *30*(1), 325-327.
- Lestaevel, P., Grandcolas, L., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., & Gourmelon, P. (2008). Neuro-inflammatory response in rats chronically exposed to 137 Cesium. *Neurotoxicology*, *29*, 343-348.
- Li, X., Borsics, T., Harrington, H. M., & Christopher, D. A. (2005). Arabidopsis AtCNGC10 rescues potassium channel mutants of E. coli, yeast and Arabidopsis and is regulated by calcium/calmodulin and cyclic GMP in E. coli. *Functional Plant Biology*, *32*(7), 643-653.
- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S. R., & Huang, C.-C. (1997). Deletions of the Aequorea victoria green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 28545-28549.
- Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clinical oncology*, *25*, 578-585.
- Long, S. B., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*, *309*(5736), 897-903.
- López-Ochoa, L., Acevedo-Hernández, G., Martínez-Hernández, A., Argüello-Astorga, G., & Herrera-Estrella, L. (2007). Structural relationships between diverse cis-acting elements are critical for the functional properties of a rbcS minimal light regulatory unit. *Journal of Experimental Botany*, *58*(15-16), 4397-4406.
- Lu, Y., Chanroj, S., Zulkifli, L., Johnson, M. A., Uozumi, N., Cheung, A., & Sze, H. (2011). Pollen tubes lacking a pair of K<sup>+</sup> transporters fail to target ovules in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *23*, 81-93.
- Ma, W., Ali, R., & Berkowitz, G. A. (2006). Characterization of plant phenotypes associated with loss-of-function of AtCNGC1, a plant cyclic nucleotide gated cation channel. *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*, 494-505.
- Maathuis, F. J. (2006). The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Journal of Experimental Botany*, *57*(5), 1137-1147.
- Maathuis, F. J., Filatov, V., Herzyk, P., C Krijger, G., B Axelsen, K., Chen, S., . . . Sánchez-Fernández, R. (2003). Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *The Plant Journal*, *35*(6), 675-692.
- Maathuis, F. J., & Sanders, D. (1995). Contrasting roles in ion transport of two K<sup>+</sup>-channel types in root cells of Arabidopsis thaliana. *Planta*, *197*(3), 456-464.
- Maathuis, F. J., & Sanders, D. (1996). Characterization of csi52, a Cs<sup>+</sup> resistant mutant of Arabidopsis thaliana altered in K<sup>+</sup> transport. *The Plant Journal*, *10*(4), 579-589.
- Marcel, D., Müller, T., Hedrich, R., & Geiger, D. (2010). K<sup>+</sup> transport characteristics of the plasma membrane tandem-pore channel TPK4 and pore chimeras with its vacuolar homologs. *FEBS Letters*, *584*(11), 2433-2439.
- Maresova, L., & Sychrova, H. (2006). Arabidopsis thaliana CHX17 gene complements the kha1 deletion phenotypes in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, *23*, 1167-1171.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd. Edn. Academic Press, London.
- Marschner, H., & Schimansky, C. (1971). Suitability of using rubidium-86 as a tracer for potassium in studying potassium uptake by barley plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, *128*, 129-143.
- Marschnert, H., Kirkby, E. A., & Engels, C. (1997). Importance of cycling and recycling of mineral nutrients within plants for growth and development. *Botanica Acta*, *110*, 265-273.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., . . . Sanders, D. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiology*, *126*(4), 1646-1667.

- McDonald, J. T., Kim, K., Norris, A. J., Vlashi, E., Phillips, T. M., Lagadec, C., . . . Hlatky, L. (2010). Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer research*, *70*, 8886-8895.
- McElver, J., Tzafrir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., . . . Cushman, M. A. (2001). Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *159*(4), 1751-1763.
- Menzel, R., & Heald, W. (1955). Distribution of potassium, rubidium, cesium, calcium, and strontium within plants grown in nutrient solutions. *Soil science*, *80*(4), 287-294.
- Meyerhoff, O., Müller, K., Roelfsema, M. R. G., Latz, A., Lacombe, B., Hedrich, R., . . . Becker, D. (2005). AtGLR3. 4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta*, *222*, 418-427.
- Middleton, L. J., Handley, R., & Overstreet, R. (1960). Relative uptake and translocation of potassium and cesium in barley. *Plant Physiology*, *35*(6), 913.
- Moller, I. S., Gilliham, M., Jha, D., Mayo, G. M., Roy, S. J., Coates, J. C., . . . Tester, M. (2009). Shoot Na<sup>+</sup> Exclusion and Increased Salinity Tolerance Engineered by Cell Type-Specific Alteration of Na<sup>+</sup> Transport in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, *21*, 2163-2178. doi: 10.1105/tpc.108.064568
- Mouline, K., Véry, A.-A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., . . . Sentenac, H. (2002). Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K<sup>+</sup> channel in *Arabidopsis*. *Genes & development*, *16*, 339-350.
- Nakamura, R. L., McKendree Jr, W. L., Hirsch, R. E., Sedbrook, J. C., Gaber, R. F., & Sussman, M. R. (1995). Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiology*, *109*(2), 371-374.
- Nam, Y.-J., Tran, L.-S. P., Kojima, M., Sakakibara, H., Nishiyama, R., & Shin, R. (2012). Regulatory roles of cytokinins and cytokinin signaling in response to potassium deficiency in *Arabidopsis*. *PLoS One*, *7*(10), e47797.
- Nielsen, B., & Strandberg, M. (1988). A literature study of the behaviour of cesium, strontium and plutonium in the soil-plant ecosystem.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., & Rubio, F. (2010). The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K<sup>+</sup> transporter is required for plant growth and K<sup>+</sup> acquisition from low K<sup>+</sup> solutions under saline conditions. *Molecular plant*, *3*(2), 326-333.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., & Rubio, F. (2014). K<sup>+</sup> uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. *Journal of plant physiology*, *171*(9), 688-695.
- Nieves-Cordones, M., Ródenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R. M., Martinez, V., Gaillard, I., & Rubio, F. (2016). Uneven HAK/KUP/KT Protein Diversity Among Angiosperms: Species Distribution and Perspectives. *Frontiers in plant science*, *7*.
- Nühse, T. S., Stensballe, A., Jensen, O. N., & Peck, S. C. (2004). Phosphoproteomics of the *Arabidopsis* plasma membrane and a new phosphorylation site database. *The Plant Cell*, *16*(9), 2394-2405.
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., . . . Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *25*(2), 609-624.
- Padmanaban, S., Chanroj, S., Kwak, J. M., Li, X., Ward, J. M., & Sze, H. (2007). Participation of endomembrane cation/H<sup>+</sup> exchanger AtCHX20 in osmoregulation of guard cells. *Plant Physiology*, *144*, 82-93.
- Palaniswamy, S. K., James, S., Sun, H., Lamb, R. S., Davuluri, R. V., & Grotewold, E. (2006). AGRIS and AtRegNet. a platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. *Plant Physiology*, *140*(3), 818-829.
- Patwardhan, R. S., Checker, R., Sharma, D., Sandur, S. K., & Sainis, K. B. (2013). Involvement of ERK-Nrf-2 signaling in ionizing radiation induced cell death in normal and tumor cells. *PLoS one*, *8*, e65929.

- Payne, K. A., Bowen, H. C., Hammond, J. P., Hampton, C. R., Lynn, J. R., Mead, A., . . . Broadley, M. R. (2004). Natural genetic variation in caesium (Cs) accumulation by *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *162*(2), 535-548.
- Pendleton, R. C., Mays, C. W., Lloyd, R. D., & Church, B. W. (1965). A Trophic Level Effect on <sup>137</sup>Cs Concentration. *Health Physics*, *11*, 1503-1510.
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Chérel, I., & Sentenac, H. (2003). Regulated expression of *Arabidopsis* Shaker K<sup>+</sup> channel genes involved in K<sup>+</sup> uptake and distribution in the plant. *Plant molecular biology*, *51*(5), 773-787.
- Platten, J. D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R. J., Fairbairn, D. J., . . . Luan, S. (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in plant science*, *11*(8), 372-374.
- Plett, D., Safwat, G., Gilliam, M., Møller, I. S., Roy, S., Shirley, N., . . . Tester, M. (2010). Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of AtHKT1; 1. *PLoS One*, *5*(9), e12571.
- Preuss, D., Rhee, S. Y., & Davis, R. W. (1994). Tetrad analysis possible in *Arabidopsis* with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science*, *264*(5164), 1458-1460.
- Prister, B., Loshchilov, N., Perepelyatnikova, L., Perepelyatnikov, G., & Bondar, P. (1992). Efficiency of measures aimed at decreasing the contamination of agricultural products in areas contaminated by the Chernobyl NPP accident. *Science of the total environment*, *112*(1), 79-87.
- Prorok, V., Dacenko, O., Bulavin, L., Poperenko, L., & White, P. (2016). Mechanistic interpretation of the varying selectivity of Cesium-137 and potassium uptake by radish (*Raphanus sativus* L.) under field conditions near Chernobyl. *Journal of Environmental Radioactivity*, *152*, 85-91.
- Putyatin, Y. V., Seraya, T. M., Petrykevich, O. M., & Howard, B. J. (2006). Comparison of the accumulation of <sup>137</sup>Cs and <sup>90</sup>Sr by six spring wheat varieties. *Radiation and environmental biophysics*, *44*(4), 289-298.
- Pyo, Y. J., Gierth, M., Schroeder, J. I., & Cho, M. H. (2010). High-affinity K<sup>+</sup> transport in *Arabidopsis*: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions. *Plant Physiology*, *153*(2), 863-875.
- Qi, Z., Hampton, C. R., Shin, R., Barkla, B. J., White, P. J., & Schachtman, D. P. (2008). The high affinity K<sup>+</sup> transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K<sup>+</sup> concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *59*(3), 595-607.
- Qi, Z., Stephens, N. R., & Spalding, E. P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3. 3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology*, *142*, 963-971.
- Quintero, F. J., & Blatt, M. R. (1997). A new family of K<sup>+</sup> transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Letters*, *415*(2), 206-211. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01125-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01125-3)
- Rafferty, B., Dawson, D., & Kliashtorin, A. (1997). Decomposition in two pine forests: the mobilisation of <sup>137</sup>Cs and K from forest litter. *Soil Biology and Biochemistry*, *29*(11), 1673-1681.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., . . . Hedrich, R. (2002). AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel  $\alpha$ -subunit modulates root hair K<sup>+</sup> influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(6), 4079-4084.
- Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., & Furdui, C. M. (2014). Effects of ionizing radiation on biological molecules—mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants & redox signaling*, *21*, 260-292.
- Remy, E., Cabrito, T. R., Batista, R. A., Teixeira, M. C., Sa-Correia, I., & Duque, P. (2015). The Major Facilitator Superfamily Transporter ZIFL2 Modulates Cesium and Potassium Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, *56*, 148-162. doi: [10.1093/pcp/pcu157](https://doi.org/10.1093/pcp/pcu157)
- Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K. A., Grabov, A., . . . Hatzopoulos, P. (2001). TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell*, *13*(1), 139-151.

- Rigas, S., Ditengou, F. A., Ljung, K., Daras, G., Tietz, O., Palme, K., & Hatzopoulos, P. (2013). Root gravitropism and root hair development constitute coupled developmental responses regulated by auxin homeostasis in the Arabidopsis root apex. *New Phytologist*, *197*(4), 1130-1141.
- Rodríguez-Navarro, A., & Rubio, F. (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, *57*, 1149-1160.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Gálvez, F. J., Huertas, R., Aranda, M. N., Baghour, M., Cagnac, O., & Venema, K. (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant signaling & behavior*, *4*(4), 265-276.
- Roy, S. J., Gilliham, M., Berger, B., Essah, P. A., Cheffings, C., Miller, A. J., . . . Davies, J. M. (2008). Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in Arabidopsis thaliana. *Plant, cell & environment*, *31*, 861-871.
- Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M., & Martínez, V. (2010). Studies on Arabidopsis athak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K<sup>+</sup> uptake. *Physiologia Plantarum*, *139*(2), 220-228.
- Rubio, F., Gassmann, W., & Schroeder, J. I. (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, *270*, 1660.
- Rubio, F., Guillermo, E., & Rodríguez-Navarro, A. (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum*, *109*(1), 34-43.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., & Martínez, V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K<sup>+</sup> uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum*, *134*(4), 598-608.
- Rus, A., Baxter, I., Muthukumar, B., Gustin, J., Lahner, B., Yakubova, E., & Salt, D. E. (2006). Natural Variants of AtHKT1 Enhance Na<sup>+</sup> Accumulation in Two Wild Populations of Arabidopsis. *PLoS Genetics*, *2*, e210. doi: 10.1371/journal.pgen.0020210
- Sacchi, G. A., Espen, L., Nocito, F., & Cocucci, M. (1997). Cs<sup>+</sup> uptake in subapical maize root segments: Mechanism and effects on H<sup>+</sup> release, transmembrane electric potential and cell pH. *Plant and Cell Physiology*, *38*(3), 282-289.
- Sanchez, A. L., Smolders, E., Van den Brande, K., Merckx, R., Wright, S. M., & Naylor, C. (2002). Predictions of in situ solid/liquid distribution of radiocaesium in soils. *Journal of Environmental Radioactivity*, *63*, 35-47.
- Santa-María, G. E., Danna, C. H., & Czibener, C. (2000). High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and-insensitive pathways. *Plant Physiology*, *123*, 297-306.
- Santini, M. T., Paradisi, S., Straface, E., & Malorni, W. (1993). Cesium ions influence cultured cell behavior by modifying specific subcellular components: The role of membranes and of the cytoskeleton. *Cell biology and toxicology*, *9*, 295-306.
- Schachtman, D. P., & Schroeder, J. I. (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants.
- Schimmack, W., Zimmermann, G., Sommer, M., Dietl, F., Schultz, W., & Paretzke, H. (2004). Soil-to-grain transfer of fallout 137Cs for 28 winter wheat cultivars as observed in field experiments. *Radiation and environmental biophysics*, *42*(4), 275-284.
- Schleyer, M., & Bakker, E. P. (1993). Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K<sup>+</sup>-uptake protein kup from Escherichia coli is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *Journal of bacteriology*, *175*(21), 6925-6931.
- Schneider, K., Kuznetzov, V. K., Sanzharova, N. I., Kanter, U., Telikh, K. M., & Khlopuk, M. S. (2008). Soil-to-plant and soil-to-grain transfer of 137Cs in field-grown maize hybrids during two contrasting seasons: assessing the phenotypic variability and its genetic component. *Radiation and environmental biophysics*, *47*(2), 241-252.

- Senn, M. a. E., Rubio, F., Bañuelos, M. a. A., & Rodríguez-Navarro, A. (2001). Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44563-44569.
- Sharma, T., Dreyer, I., & Riedelsberger, J. (2013). The role of K<sup>+</sup> channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 4, 224.
- Shaw, G., & Bell, J. (1989). The kinetics of caesium absorption by roots of winter wheat and the possible consequences for the derivation of soil-to-plant transfer factors for radiocaesium. *Journal of Environmental Radioactivity*, 10(3), 213-231.
- Shaw, G., & Bell, J. N. B. (1991). Competitive effects of potassium and ammonium on caesium uptake kinetics in wheat. *Journal of Environmental radioactivity*, 13, 283-296.
- Sheahan, J. J., Ribeiro-Neto, L., & Sussman, M. R. (1993). Cesium-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 3(5), 647-656.
- Sheen, J. (2002). A transient expression assay using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>
- Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K.-I., . . . Mimura, T. (2004). Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 45, 672-683.
- Singh, A., & Singh, H. (1982). Time-scale and nature of radiation-biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Progress in biophysics and molecular biology*, 39, 69-107.
- Smith, J. T., & Elder, D. G. (1999). A comparison of models for characterizing the distribution of radionuclides with depth in soils. *European Journal of Soil Science*, 50, 295-307.
- Smolders, E., Kiebooms, L., Buysse, J., & Merckx, R. (1996). <sup>137</sup>Cs uptake in spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Tonic) at varying K supply. *Plant and soil*, 181(2), 211-220.
- Song, C.-P., Guo, Y., Qiu, Q., Lambert, G., Galbraith, D. W., Jagendorf, A., & Zhu, J.-K. (2004). A probable Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 10211-10216.
- Souidi, M., Tissandie, E., Grandcolas, L., Grison, S., Paquet, F., Voisin, P., . . . Gueguen, Y. (2006). Chronic contamination with <sup>137</sup>cesium in rat: effect on liver cholesterol metabolism. *International journal of toxicology*, 25, 493-497.
- Souidi, M., Bertho, J.M., Lecompte-Pradines, C., Beaugelin-Seiller, K., Ansoborlo, E., Bourguignon, J. (2009). Césium. In Ménager, M.T., Garrner-Laplace, J., Goyffon, M., *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*, Lavoisier, ed. Tec&Doc, Paris, 469-488.
- Spalding, E. P., Hirsch, R. E., Lewis, D. R., Qi, Z., Sussman, M. R., & Lewis, B. D. (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *The Journal of general physiology*, 113(6), 909-918.
- Stark, G. (1991). The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1071, 103-122.
- Steinhauser, G., Brandl, A., & Johnson, T. E. (2014). Comparison of the Chernobyl and Fukushima nuclear accidents: A review of the environmental impacts. *Science of the total environment*, 470, 800-817.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouche, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I. N., . . . Fromm, H. (2000). Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGC1 gene confer Pb<sup>2+</sup> tolerance. *The Plant Journal*, 24(4), 533-542.
- Sutcliffe, J. (1957). The selective uptake of alkali cations by red beet root tissue. *Journal of Experimental Botany*, 8(1), 36-49.
- Szczerba, M. W., Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (2009). K<sup>+</sup> transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of plant physiology*, 166(5), 447-466.
- Sze, H., & Hodges, T. K. (1977). Selectivity of Alkali Cation Influx Across the Plasma Membrane of Oat Roots Cation Specificity of the Plasma Membrane ATPase. *Plant Physiology*, 59(4), 641-646.

- Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N.-H., Bock, K. W., . . . Ward, J. M. (2004). Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development. *Plant Physiology*, *136*(1), 2532-2547.
- Szponarski, W., Sommerer, N., Boyer, J.-C., Rossignol, M., & Gibrat, R. (2004). Large-scale characterization of integral proteins from Arabidopsis vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography. *Proteomics*, *4*, 397-406.
- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., Ache, P., Reintanz, B., . . . Steinmeyer, R. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*, 2917-2921.
- Takeda, A., Tsukada, H., Yamaguchi, N., Takeuchi, M., Sato, M., Nakao, A., & Hisamatsu, S. i. (2014). Relationship between the radiocesium interception potential and the transfer of radiocesium from soil to soybean cultivated in 2011 in Fukushima Prefecture, Japan. *Journal of environmental radioactivity*, *137*, 119-124.
- Talke, I. N., Blaudez, D., Maathuis, F. J., & Sanders, D. (2003). CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends in plant science*, *8*, 286-293.
- Thompson, L. H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *751*, 158-246.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M. A., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Paquet, F., & Souidi, M. (2006). Chronic contamination with <sup>137</sup> Cesium affects Vitamin D 3 metabolism in rats. *Toxicology*, *225*, 75-80.
- Tyerman, S. D. (2002). Nonselective cation channels. Multiple functions and commonalities. *Plant Physiology*, *128*, 327-328.
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., . . . Schroeder, J. I. (2000). The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*, *122*(4), 1249-1260.
- Van der Perk, M., Lev, T., Gillett, A. G., Absalom, J. P., Burrough, P. A., Crout, N. M. J., . . . Voigt, G. (2000). Spatial modelling of transfer of long-lived radionuclides from soil to agricultural products in the Chernigov region, Ukraine. *Ecological modelling*, *128*, 35-50.
- Véry, A.-A., Bosseux, C., Gaymard, F., Sentenac, H., & Thibaud, J.-B. (1994). Level of expression in *Xenopus* oocytes affects some characteristics of a plant inward-rectifying voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Pflügers Archiv*, *428*(3-4), 422-424.
- Véry, A.-A., & Sentenac, H. (2002). Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. *Trends in plant science*, *7*, 168-175.
- Véry, A. A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C., & Sentenac, H. (2014). Molecular biology of K<sup>+</sup> transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? *Journal of plant physiology*, *171*(9), 748-769.
- Véry, A. A., & Sentenac, H. (2003) Molecular Mechanisms and Regulation of K<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Vol. 54* (pp. 575-603).
- Walker, D. J., Leigh, R. A., & Miller, A. J. (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(19), 10510-10514.
- Wang, L., Wu, X., Liu, Y., & Qiu, Q.-S. (2015). AtNHX5 and AtNHX6 control cellular K<sup>+</sup> and pH homeostasis in Arabidopsis: three conserved acidic residues are essential for K<sup>+</sup> transport. *PLoS one*, *10*, e0144716.
- Wang, Y. H. (2008). How effective is T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis? *Journal of Biochemical Technology*, *1*, 11-20.
- Waters, S., Gilliam, M., & Hrmova, M. (2013). Plant High-Affinity Potassium (HKT) Transporters Involved in Salinity Tolerance: Structural Insights to Probe Differences in Ion Selectivity. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 7660-7680. doi: 10.3390/ijms14047660
- White, P., Karley, A., Potassium, R. H., & Mendel, R. (2010). Cell Biology of Metals and Nutrients. *Plant Cell Monographs, Springer, Berlin*, 199-224.



- White, P. J., Bowen, H. C., Demidchik, V., Nichols, C., & Davies, J. M. (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1564(2), 299-309.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2000). Tansley Review No. 113. Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytologist*, 147(2), 241-256. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00704.x
- White, P. J., Swarup, K., Escobar-Gutiérrez, A. J., Bowen, H. C., Willey, N. J., & Broadley, M. R. (2003). Selecting plants to minimise radiocaesium in the food chain. *Plant and soil*, 249(1), 177-186.
- Whiteman, S.-A., Serazetdinova, L., Jones, A. M., Sanders, D., Rathjen, J., Peck, S. C., & Maathuis, F. J. (2008). Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, 8, 3536-3547.
- Willey, N. J., & Martin, M. H. (1997). A comparison of stable caesium uptake by six grass species of contrasting growth strategy. *Environmental pollution*, 95(3), 311-317.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, 2(8), e718.
- Witkamp, M., & Frank, M. L. (1970). Effects of Temperature, Rainfall, and Fauna on Transfer of Cs-137, K, Mg, and Mass in Consumer-Decomposer Microcosms. *Ecology*, 51, 465-474.
- Yilmaz, A., Mejia-Guerra, M. K., Kurz, K., Liang, X., Welch, L., & Grotewold, E. (2011). AGRIS: the *Arabidopsis* gene regulatory information server, an update. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl 1), D1118-D1122.
- Yoshihara, T., Matsumura, H., Hashida, S.-n., & Nagaoka, T. (2013). Radiocesium contaminations of 20 wood species and the corresponding gamma-ray dose rates around the canopies at 5 months after the Fukushima nuclear power plant accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, 115, 60-68.
- Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*, 7, 1.
- Zhao, J., Cheng, N.-H., Motes, C. M., Blancaflor, E. B., Moore, M., Gonzales, N., . . . Hirschi, K. D. (2008). AtCHX13 is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. *Plant physiology*, 148, 796-807.
- Zhao, J., Li, P., Motes, C. M., Park, S., & Hirschi, K. D. (2015). CHX14 is a plasma membrane K<sup>+</sup>-efflux transporter that regulates K<sup>+</sup> redistribution in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment*, 38, 2223-2238.
- Zhu, Y.-G. (2001). Effect of external potassium (K) supply on the uptake of 137 Cs by spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Tonic): a large-scale hydroponic study. *Journal of Environmental Radioactivity*, 55(3), 303-314.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A., & Wilkins, B. (1999). Effects of external potassium supply on compartmentation and flux characteristics of radiocaesium in intact spring wheat roots. *Annals of Botany*, 84(5), 639-644.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A., & Wilkins, B. (2000). Effect of potassium starvation on the uptake of radiocaesium by spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Tonic). *Plant and soil*, 220(1-2), 27-34.
- Zhu, Y. G., & Shaw, G. (2000). Soil contamination with radionuclides and potential remediation. *Chemosphere*, 41(1), 121-128.
- Zhu, Y. G., & Smolders, E. (2000). Plant uptake of radiocaesium: a review of mechanisms, regulation and application. *Journal of Experimental Botany*, 51(351), 1635-1645.
- Zimmermann, S., Talke, I., Ehrhardt, T., Nast, G., & Müller-Röber, B. (1998). Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiology*, 116(3), 879-890.

## **ANNEXES**

**Annexe 1 : Liste des amorces utilisées pour la vérification des lignées mutantes *kup***

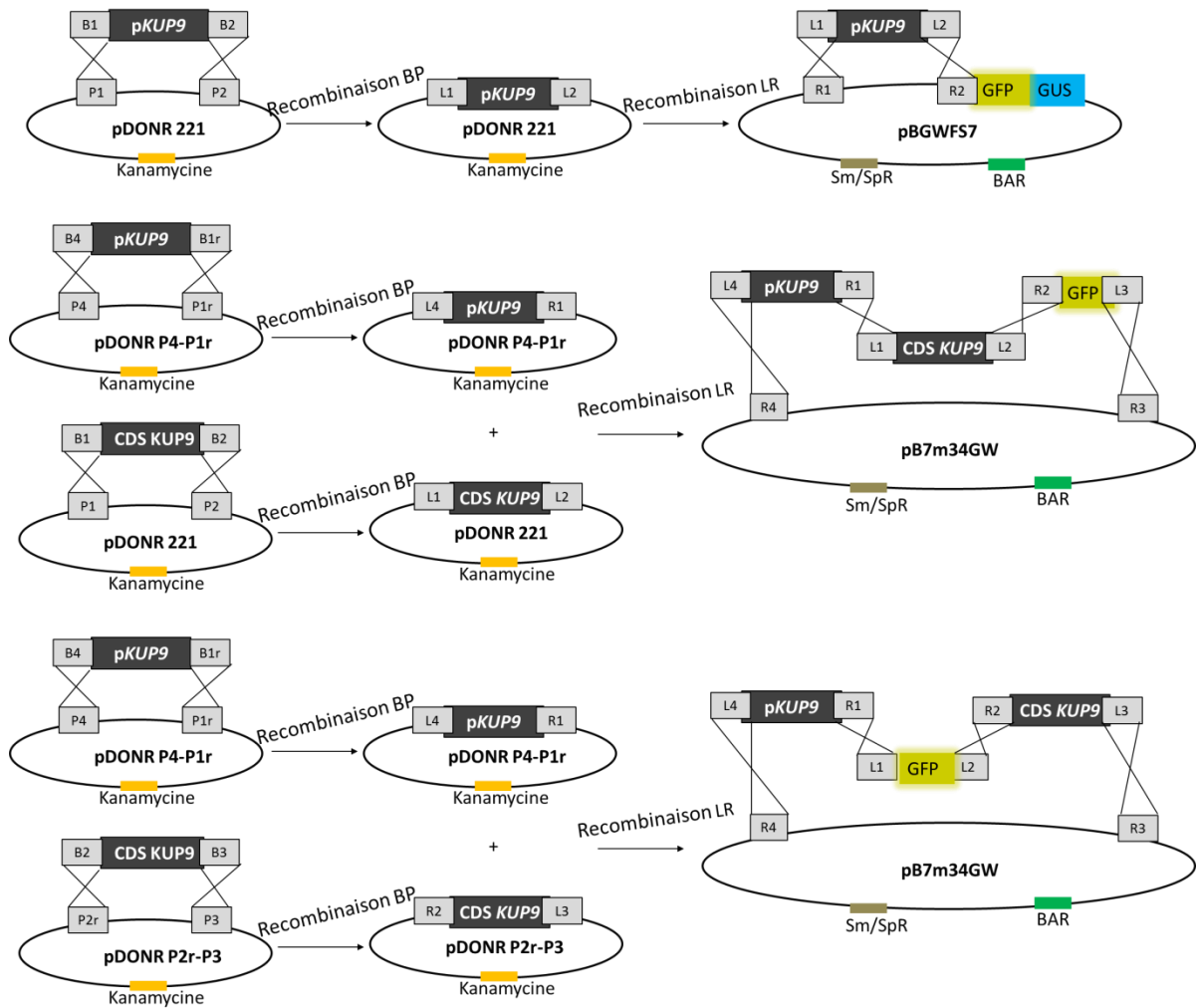
Nom	Séquence amorce sens (F)	Séquence amorce anti-sens (R)
KUP1A	CTCTTTCTTCTTCTCCTCCTACTTCCCAAC	CTCGACCACATAAATTCGCATTGTTCCC
KUP1B	GAGGTTTGTGATAAGCAGAGTAGGGCC	CACTGCTAGTTTCTTCAACACCGACGATG
KUP3A	GCACTATGGCACCCGTAGGAAATACAG	CTTGCGGATACTCATCCTCGTACACTG
KUP4A	CTGATCGTTGAAGATCCAAGCTACGCC	CACCACGCTGGTCAAAACTACACAC
KUP4B	GTTCTTTATGCAGCAGAACTTGTGGAG	CATGTATTGAAGCACCAGACACGGGTAAC
KUP5A	ACTGGGCAGTAACCTTGGGACAATTAG	CCTCCGCACATCTTTGTATCCATACCTG
KUP5B	GGTAAACTCTTCTGCCCCCTGAATAGG	CCCCAAGTGCATACCAAGCATTTACAG
KUP6A	CGCATGTGTACCAAGCACTTTCTCC	GCAGCGAGTATAGCGATCACAAGAAGT
KUP6B F	GCCGAAACAAAACCTCTCTTCTCACAAG	CCTTGGCGTTTTGATAACTTCTGATTCCG
KUP8AC	TGTGTTTCTCTCTCTCTCTCTTTGTGG	ACCTTCACCATTATCATCAGCACGAAGAAC
KUP8B	TTGTGCTTGCATGGCTTCTCTGTATAAGC	GTGTCCTAGATCAGCAAACATAGCTTCCG
KUP9A	GGAGATTTAGGGACGTCTCCATTGTATGTG	TCCTCATCACTACGGTGCTGATTCCG
KUP9B	CCTACAGCAGCACGTATTCCGTCAAC	CGGTGTTCCCCATTATATGAACAACACCTG
KUP11A	CTCACACTCATCCCTCTCCTCAAATACG	GCTCTTCATCAGTACGGTGTTGGTTCTG
KUP12A	CAAAGCGAGGTCAGGGAAAGAATCTCC	CGCAATGCACCTGAACATATGGTAGTCC
KUP12B	GTTATGTGTGCAGGAGGGACATTTGC	CTCACCTGACATAGCTGGTGTTAGAATTCC
HAK5A	CGCAGGAGGAACATTTGCATTGTACTC	AGTTACCTGAGATGGAAGGAGTAAGGATTCC
HAK5B	AGCAGTAAGTGGAATCAAATCTCTCGGC	AGTGCCTTAAGACGGTAATGTCATGCTTG
Lbb1.3 (SALK)	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	
QRB1 (SAIL)	CAAAC TAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTC	
RB1 (SAIL)	ATTAGGCACCCAGGCTTTACTTTATG	
LB1 (SAIL)	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	

**Annexe 2 : Liste des amorces utilisées pour le clonage de la séquence promotrice (pKUP9) et de la séquence codante de KUP9 (KUP9)**

Nom	Séquence	Utilisation
pKUP9-F1c	CCAATGTAACGAGGGAAGAGACT	Clonage dans pCR-XL-TOPO et séquençage du promoteur de KUP9
<b>attB1-</b> pKUP9_F1	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTA</b> <b>TTGTAACGAGGGAAGAGACTTG</b>	Clonage du promoteur de KUP9 dans pDONR221 (pKUP9:GFP-GUS)
<b>attB4-</b> pKUP9_F1	<b>GGGGACAAGTTTGTATAGAAAAGTTGATTGT</b> <b>AACGAGGGAAGAGACTTG</b>	Clonage du promoteur de KUP9 dans pDONR P4-P1r
pKUP9-F2	CTGGGGATTTCGAGTTGGTCC	Séquençage du promoteur de KUP9 après clonage
pKUP9-F3	GGATCTTAAGTGGAAATATGCGTCACC	
pKUP9-F4	CCGCCACTAATTTTCCATAGCACATA	
pKUP9-F5	CTGGTACATGTATCGAAAAGTTGTGCG	
pKUP9-F6	CTTTGGCCACTCTCTGTGTCTTTC	
pKUP9-R1b	ACAAAAGAACTCGAAATTCCTG	
<b>attB2-</b> pKUP9_R1	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT</b> <b>TTTGTAAACAAAAGAACTCGAAATTC</b>	Clonage du promoteur de KUP9 dans pDONR221 (pKUP9:GFP-GUS)
<b>attB1r-</b> pKUP9_R1	<b>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTCTTTT</b> <b>GTAACAAAAGAACTCGAAATTC</b>	Clonage du promoteur de KUP9 dans pDONR P4-P1r
pKUP9-R2	GAAGACGCTGACAAAAGTGAAGACG	Séquençage du promoteur de KUP9 après clonage
pKUP9-R3	GTACGAAAAGTGTGGCTCGTCATTG	
pKUP9-R4	CTCCTGAAAAGAGAAGCTGCATGAG	
pKUP9-R5	GAGTAGGACAAAAGTCAATAGACTCAATACC A	
pKUP9-R6	GTTCAAGATGGTTCACCTTCCCGT	
<b>Nom</b>	<b>Séquence</b>	
KUP9-F1	ATGGCGGAAAGAGTCGAAGCATC	Clonage dans pCR-XL-TOPO et séquençage de la séquence codante de KUP9
<b>attB2r-KUP9_F1</b>	<b>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCTATG</b> <b>GCGGAAAGAGTCGAAG</b>	Clonage de la séquence codante de KUP9 dans pDONR P2r-P3 (fusion GFP-KUP9)
<b>attB1-KUP9_F1</b>	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</b> <b>ATGGCGGAAAGAGTCGAAG</b>	Clonage de la séquence codante de KUP9 dans pDONR221 (fusion KUP9-GFP)
KUP9-F2	TATCCGCTGAAGGGTCTTTTGC	Séquençage de la séquence codante de KUP9 après clonage
KUP9-F3	CTAGCGATACAGCTCGCCTTTAC	
KUP9-F4	GAGTTATCGTACTTCTCAGCCGTGATC	
KUP9-F5	GATTCCACCGTAGACTTGATCCAC	
KUP9-R1	CTAAACATAAAAGACTTGCCAACG	
<b>attB3-KUP9_R1</b>	<b>GGGGACAAGTTTGTATAATAAAGTTGCCTAA</b> <b>ACATAAAAGACTTGCCAACG</b>	Clonage de la séquence codante de KUP9 dans pDONR P2r-P3 (fusion GFP-KUP9)
<b>attB2-KUP9_R1</b>	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCA</b> <b>ACATAAAAGACTTGCCAACGTT</b>	Clonage de la séquence codante de KUP9 dans pDONR221 (fusion KUP9-GFP)

KUP9-R2	GCTGCTGTAGGTGCTTGAGTTTG	Séquençage de la séquence codante de <i>KUP9</i> après clonage
KUP9-R3	GGACAAGGATCCAGTGGCAATG	
KUP9-R4	GTATAGTGCCTCCGTGCCTGTTAT	
KUP9-R5	GTCGTGAGATCCTCATCACTACGG	
<b>Nom</b>	<b>Séquence</b>	<b>Utilisation</b>
eGFP-Seq3	AAGCAGAAGAACGGCATCAAGG	Amorces dessinées par l'équipe pour séquençage de la partie GFP
eGFP-Seq5	GACTTCAAGTAGACGTGGTGGC	

### Annexe 3 : Réactions BP et LR réalisées pour l'étude transcriptionnelle et pour les tests de localisation de KUP9





AAGCAAGAAGCTGGATCATGGCTTCCAAAAAGATTGCGATTGATTATGTTTATGCATTTCTTGCTAAGATTGTAGGGCCAATAGTGTATCTTACATGTTCC  
 TCATGAAACCCCTTTTAAACGTTGGACAAGTCTTTTATGTTTAGGCAACTTTATTATAC

**Figure A.1 : Séquence du transgène pour la construction pKUP9:GFP-KUP9.** Les codes couleurs utilisés sont les suivants :

TGGTT : Séquence promotrice du gène KUP9

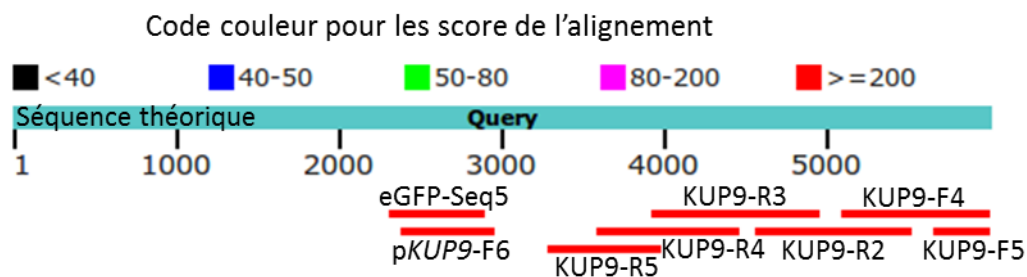
GACGACG : Séquence codant pour la GFP

TACGGGAC : Séquence codant pour KUP9

CTTTGGCCACTCTCTGTGCTTTG ... CTGAAGTTCATCTGCACCACCG : Couple d'amorces pKUP9-F6/eGFP-Seq5 utilisé pour l'amplification de la région de l'ADNg des T3 à séquencer.

AAGCAGAAGAACGGCATCAAGG ... CGTTGGACAAGTCTTTTATGTTTAG : Couple d'amorces eGFP-Seq3/KUP9-R1 utilisé pour l'amplification de la région de l'ADNg des T3 à séquencer.

Les résultats du séquençage réalisé par GATC Biotech ont été alignés avec la séquence théorique du transgène afin de révéler les erreurs potentielles en utilisant l'outil Blastn du NCBI (**Fig.A.2**). La région promotrice de *KUP9* a été vérifiée uniquement après les étapes de clonage dans les vecteurs de transition (pCR-XL-TOPO®) et d'entrée (pDONR™). En revanche, les séquences codant pour la GFP et le transporteur KUP9 ont également été vérifiées après transfert du transgène *in planta*. Ce séquençage révèle qu'il n'y a pas de divergence entre les séquences théoriques et réelles.



**Figure A.2 : Résultat de l'alignement entre le séquençage du transgène et la séquence théorique de la construction pKUP9:GFP-KUP9.** La région allant des nucléotides 1 à 2791 (correspondant au promoteur de *KUP9*), séquencée et vérifiée par ailleurs au moment de son clonage dans les vecteurs d'entrée, n'a pas été vérifiée une nouvelle fois dans les lignées de plantes transgéniques.





**RESUME :** Le  $^{134}\text{Cs}$  et le  $^{137}\text{Cs}$ , deux isotopes radioactifs du césium relâchés entre autres à la suite des accidents de Tchernobyl et Fukushima, sont des sources de préoccupations majeures pour la sécurité sanitaire et pour la préservation des écosystèmes. L'absorption de césium est inégale entre espèces végétales : outre sa disponibilité dans le sol, le transport du césium est également influencé par des propriétés propres à la plante. Les flux d'éléments chez les végétaux étant régulés par des transporteurs, l'objectif général de ma thèse a été d'identifier et de caractériser ceux qui sont significativement impliqués dans le transport du césium. Du fait de l'analogie avec le potassium, le césium est supposé emprunter les voies de transport dédiées à ce macronutriment. Le système de transport potassique comprend une diversité de protéines dont les contributions respectives dépendent des niveaux d'apport en potassium. Je me suis donc intéressée à l'étude de l'absorption, de l'accumulation et de la distribution du césium pour trois niveaux de nutrition potassique. En ce qui concerne l'absorption racinaire de césium, nos données sont cohérentes avec les connaissances sur les rôles respectifs du transporteur potassique HAK5 et des canaux cationiques non sélectifs en fonction du niveau de potassium. En outre, les tests réalisés indiquent que des canaux potassiques de la famille des Shaker pourraient être impliqués dans la translocation du césium ainsi que dans sa recirculation. Le transporteur HAK5, plutôt bien caractérisé pour son rôle dans l'absorption racinaire de césium et de potassium, appartient à la famille de transporteurs nommée KUP/HAK/KT. Les résultats produits pendant cette thèse mettent en évidence le rôle *in planta* du transporteur KUP9, un membre de cette famille des KUP et jusque-là peu étudié. Nous n'observons pas de modifications de l'absorption du potassium chez les mutants invalidés sur ce transporteur comparés à l'écotype sauvage : il serait donc possible de le manipuler pour moduler l'absorption de césium sans que la nutrition potassique ne soit altérée. Ce résultat est particulièrement encourageant dans un objectif de gestion des territoires contaminés par l'utilisation de plantes capables d'accumuler de grandes quantités de césium (phytoremédiation) ou à l'inverse limitant les transferts à la chaîne alimentaire (*safe food*).

**Mots-Clés :** *Arabidopsis thaliana*, césium, transporteurs

**ABSTRACT:**  $^{134}\text{Cs}$  and  $^{137}\text{Cs}$ , two radioactive isotopes unintentionally released after the Chernobyl and the Fukushima accidents, are of major concern for ecosystems protection and human health. Together with the soil and the soil solution composition, plant properties have a major influence on the amount of caesium uptake which is highly heterogeneous between species. Due to the important role of transporters in the control of elements fluxes, the aim during my thesis was to identify and characterize those that were involved in a significant part of caesium transport. Due to analogy with potassium (K), an essential macronutrient for plants, caesium is supposed to pass predominantly through potassium carriers. Potassium transport involves a diversity of proteins and their respective contribution depends on the level of K supply to the plant. Therefore, I started my project testing the effect of three different K-treatments on uptake, accumulation and distribution of caesium. Concerning the effects of K supply on root uptake of caesium, our results are consistent with the known role of the potassium transporter HAK5 and non-selective cations channels respectively. Additionally, our observations show that two potassium channels from the Shaker family could be involved in caesium translocation and recirculation. The HAK5 transporter mentioned above is already well characterized for its role in the root uptake of caesium and potassium. This transporter belongs to the KUP/HAK/KT family with 12 other proteins in *A. thaliana*. Results produced during my thesis demonstrate *in planta* the role of KUP9 transporter – a member of the KUP family-, which has received little attention so far. Changing in potassium uptake has not been observed in mutant lines disrupted in this KUP9 transporter: it could be possible to modulate caesium uptake without alteration of potassium nutrition. This result is very promising for management strategies of contaminated lands modulating plant properties to accumulate large amount of caesium (phytoremediation) or to limit caesium transfer in foodstuffs (*safe food*).

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, cesium, transporters