ÉTUDE DE LA REMOBILISATION DES MÉTAUX AU COURS DE LA SÉNESCENCE FOLIAIRE DANS LE CADRE DE LA REHABILITATION DES SOLS POLLUÉS[1].

par Mathieu **Pottier**

En raison des intenses activités anthropiques des deux siècles précédents, la composition élémentaire de certains sols a été modifiée. Des éléments, nommés éléments traces métalliques (ETMs), constituant normalement moins de 0,1% de l'ensemble des atomes de la couche terrestre, se sont retrouvés surreprésentés. L'accumulation progressive des ETMs est responsable de pollutions rendant les parcelles touchées inexploitables et provoquant la pollution de nappes phréatiques et de cours d'eau environnants. Depuis le début des années 1990, différentes stratégies de phytoremédiation ont été proposées pour permettre la réhabilitation de ces zones par l'utilisation de plantes[1]. Parmi ces stratégies, la phytoextraction qui consiste en l'absorption et l'accumulation des ETMs par les plantes a été très largement présentée[2]. Parce que l'efficacité de ce mode d'action est totalement dépendante du choix de l'espèce végétale utilisée, des études ont été menées sur différentes espèces végétales, notamment sur des plantes tolérantes aux ETMs qui ont développé des mécanismes permettant l'hyperaccumulation de ces métaux dans leurs parties aériennes[3]. Cependant les plantes hyperaccumulatrices possèdent généralement de faibles biomasses, limitant le processus d'extraction et ne satisfaisant pas les intérêts des industriels[4]. Il est donc apparu essentiel de tester le potentiel de phytoextraction d'espèces végétales alternatives.

Du fait de sa croissance rapide, de son importante biomasse et de ses débouchés dans le domaine de l'énergie, le peuplier est vite apparu comme un choix judicieux[5,6,7,8]. Au cours de travaux précédents, différents cultivars de peuplier ayant poussés sur des parcelles polluées ont été étudiés, aboutissant à l'identification de génotypes accumulant d'importantes concentrations en ETMs. Cependant, une phytoextraction efficace suppose une accumulation préférentielle des ETMs dans les parties récoltables du peuplier, à savoir, le tronc et les branches. Or les données actuelles indiquent que le bois constitue l'un des tissus possédant les plus faibles concentrations en ETMs[9,10], alors qu'au contraire les feuilles en accumulent d'importantes concentrations[11]. Cette accumulation peut entrainer une limitation du processus de phytoextraction si aucun mécanisme de remobilisation des ETMs n'est mis en place au cours de la sénescence foliaire.

L'amélioration de l'efficacité de phytoextraction du peuplier nécessite donc d'augmenter les concentrations d'ETMs dans les parties pérennes et de diminuer leur accumulation dans les feuilles tout particulièrement avant leur chute. Pour cela les mécanismes moléculaires impliqués dans les trois composantes « Absorption à partir du sol », « remobilisation à partir des organes sénescents » et « accumulation au niveau des tissus pérennes » doivent faire l'objet d'études approfondies.

Dans ce contexte, un travail visant à étudier la composante « remobilisation à partir des organes sénescents » a été réalisé au sein de l'ISV du CNRS de Gif-sur-Yvette avec l'aide financière du DIM ASTREA (île de France). Cette thèse avait donc pour objectifs l'exploration de la variabilité génétique naturelle dans l'accumulation et la remobilisation des ETMs des feuilles chez le peuplier et l'analyse de mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans le contrôle et/ou la remobilisation des métaux des feuilles. L'ensemble de ces travaux a été abordé au travers de quatre chapitres résumés ci-après.

1. Identification de génotypes de peuplier efficaces pour la remobilisation des métaux au cours de la sénescence foliaire et recherche des gènes associés

Une étude *in situ*, visant à identifier parmi 14 génotypes de peupliers, des cultivars possédant soit une faible accumulation d'ETMs dans les feuilles soit une capacité à remobiliser les ETMs des feuilles au cours

[1] [1]Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud (Discipline : Biologie) soutenue le 13/03/2014, 175p, réalisée à l'Institut des Sciences du Végétal, CNRS de Gif-sur-Yvette.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

de la sénescence automnale a été entreprise[12]. Ce travail a été réalisé sur une parcelle expérimentale mise en place en 2007 lors du projet ANR PHYTOPOP sur la commune de Pierrelaye (Ile de France).

Au cours de cette étude, nous avons pu observer une claire remobilisation automnale du magnésium des feuilles chez l'ensemble des génotypes présents au champ. A l'exception du cuivre, les microéléments sont, en revanche, pas remobilisés. On observe même pour le zinc et le cadmium, qui représentent les deux principaux ETMs, une accumulation continuelle dans les feuilles jusqu' à la fin de la sénescence et l'abscission des feuilles. Ces données indiquent donc que l'accumulation des ETMs au niveau des feuilles de peuplier est un véritable frein à la phytoextraction puisque une partie conséquente des métaux extraits retourne au sol lors de la chute des feuilles. Par ailleurs, les analyses de corrélations ont mis en lumière une potentielle gestion commune de certains métaux comme le cadmium, le zinc et le manganèse suggérant l'intervention de protéines de transport non spécifique ou de dispositifs de gestion commune.

C'est donc dans le but d'identifier ces mécanismes de gestion commune que des gènes putativement impliqués dans l'homéostasie des métaux des feuilles ont été sélectionnés à partir de données fonctionnelles et physiologiques déjà existantes chez d'autres espèces végétales ainsi que grâce aux données d'expression disponibles chez le peuplier[13]. Ainsi l'expression des gènes codant pour des transporteurs de métaux issus des familles HMA (Heavy Metal ATPase), ZIP (ZRT IRT like Protein) et NRAMP (Natural Associated Macrophage Protein) ont été mesurés. De plus, un gène *NAC*, nommé *NAP*, dont les homologues chez d'autres espèces sont impliqués dans la sénescence foliaire et dans la remobilisation a également été sélectionné[14,15,16,17,18]. Enfin l'expression du gène *CP* codant pour de la protéase à cystéine, marqueur de l'entrée en sénescence, a été dosée[19,20].

Les études de corrélation entre les expressions de gènes et les analyses en composantes principales ont montré de fortes relations entre d'une part *PtNRAMP2*, *PtHMA1* et *PtNRAMP3.1* et d'autre part *PtNAP*, *PtCP*, *PtHMA2* et *PtNRAMP3.2* mettant en évidence l'existence de deux clusters regroupant chacun des gènes qui pourraient participer à des processus communs. Par ailleurs, une forte corrélation positive a été observée entre l'expression de *PtNRAMP1* et le facteur de bioconcentration en zinc des feuilles, suggérant un rôle important de *PtNRAMP1* dans l'accumulation du zinc dans les feuilles de peuplier.

2. Caractérisation de transporteurs putativement impliqués dans la remobilisation des métaux

Au cours de la seconde partie de cette thèse, la caractérisation de protéines de transport supposées jouer un rôle dans le contrôle et/ou la remobilisation des métaux des feuilles de peuplier a été réalisée. Parce que la vacuole est un lieu privilégié de stockage des métaux[21], et qu'elle constitue un compartiment important pour le recyclage des nutriments au cours de la sénescence, les gènes codant pour des protéines tonoplastiques impliquées dans le transport de métaux vers le cytosol ont été particulièrement ciblés. Dans ce cadre, la famille de transporteur *NRAMP* (**N**atural **R**esistance-**A**ssociated **M**acrophage **P**rotein) a été sélectionnée puisqu'elle comprend chez *Arabidopsis thaliana*, deux membres, *AtNRAMP3* et *AtNRAMP4*, impliqués dans le déstockage vacuolaire de cations divalents incluant le cadmium et le zinc[22,23,24,25,26]. De plus des données transcriptomiques indiquent qu'*AtNRAMP4* pourrait être induit au moment de la sénescence, suggérant un rôle de ce gène dans la remobilisation des métaux spécifiquement au cours de sénescence[13,16].

Chez *Populus trichocarpa* nisqually, six *PtNRAMP*, ont été identifiés. Parmi eux *PtNRAMP3.1* et *PtNRAMP3.2* localisés en tandem sur le chromosome 7 sont les homologues de séquence d'*AtNRAMP3* et d'*AtNRAMP4*. Pour cette raison, ils ont fait l'objet d'une attention particulière, d'autant que *PtNRAMP3.1* et *PtNRAMP3.2* sont principalement exprimés au niveau des feuilles. De plus, des données transcriptomiques indiquent que *PtNRAMP3.2* est particulièrement induit en condition de stress cadmium[27] et qu'il est, tout comme AtNRAMP4, induit au moment de la sénescence[13,16].

Nous avons donc entrepris une caractérisation de ces transporteurs afin de déterminer s'ils sont également impliqués dans le déstockage vacuolaire tout comme leurs homologues chez *A. thaliana*. Au cours de la caractérisation en système levure, il est apparu que PtNRAMP3.1 est capable de transporter le fer, le manganèse et le zinc alors que PtNRAMP3.2 ne transporte que le fer et le manganèse. L'expression transitoire de ces transporteurs fusionnés à la GFP en protoplastes d'*A. thaliana* a permis de montrer que PtNRAMP3.2 est localisé sur la membrane de la vacuole tout comme ses orthologues chez *A. thaliana*. En

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

revanche, PtNRAMP3.1 est observé de façon surprenante au niveau de vésicules intracellulaires qui co-localisent avec des marqueurs de l'appareil de Golgi.

L'expression stable chez *A. thaliana* de ces transporteurs fusionnés à la GFP, a confirmé ces résultats. De plus, la transformation du double mutant *nramp3nramp4* d'*A. thaliana*, à la fois sensible à la carence en fer et à la présence de cadmium, a permis d'obtenir d'avantages d'informations concernant les fonctions physiologiques de PtNRAMP3.1 et de PtNRAMP3.2. Il est ainsi apparu que seul PtNRAMP3.2 complémente parfaitement les phénotypes de croissance du double mutant en conditions de carence en fer et de présence de cadmium. De même, seul PtNRAMP3.2 permet de restaurer les concentrations intracellulaires en métaux du double mutant. L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que contrairement à PtNRAMP3.1, PtNRAMP3.2 est bien un homologue fonctionnel d'AtNRAMP3 et d'AtNRAMP4. Par ailleurs, la faible complémentation du double mutant *nramp3nramp4* par PtNRAMP3.1 est cohérente avec sa différence de localisation subcellulaire.

Dans le but de déterminer plus clairement le rôle de ces transporteurs en système homologue, notamment celui de PtNRAMP3.1 dont la fonction n'a pas été élucidée chez *A. thaliana*, *PtNRAMP3.1* et *PtNRAMP3.2* ont été surexprimés chez le peuplier. Tout comme chez *A. thaliana*, PtNRAMP3.2 est observé sur le tonoplaste alors que PtNRAMP3.1 est observé au niveau de l'appareil de Golgi. L'analyse du contenu en métaux de feuilles de peuplier a révélé une diminution spécifique du contenu en cadmium chez les lignées surexprimant *PtNRAMP3.2* comparées aux lignées « sauvages ». Ces résultats confirment donc l'implication de PtNRAMP3.2 dans le déstockage vacuolaire des métaux. De façon intéressante, les feuilles des lignées surexprimant PtNRAMP3.1 présentent également une diminution du contenu en cadmium comparées aux lignées « sauvages ». De plus, ces lignées qui montrent une sérieuse chlorose interveinale présentent également une diminution des concentrations en manganèse et en zinc. Ces phénotypes importants observés chez les peupliers surexprimant *PtNRAMP3.1* montrent que malgré sa localisation inattendue, ce transporteur joue également un rôle conséquent dans le déstockage de métaux. Ces résultats semblent, au passage, attribuer au Golgi une fonction non décrite jusqu'à maintenant, dans la gestion des métaux de la cellule. Ainsi la surexpression de *PtNRAMP3.1* et de *PtNRAMP3.2* spécifiquement pendant la sénescence pourrait être une solution efficace pour limiter le retour au sol des ETMs par chute des feuilles.

3. Étude de la relation entre la structure primaire et la sélectivité chez AtNRAMP4, homologue des PtNRAMP3s

Les métaux non essentiels empruntent, le plus souvent, les systèmes de transport des métaux essentiels. L'amélioration de l'efficacité de phytoextraction, nécessite d'optimiser les capacités de transport d'ETMs de ces systèmes. Pour cela, il apparaît indispensable d'identifier, au niveau des protéines de transport, les déterminants structuraux permettant la discrimination des métaux essentiels des métaux non essentiels.

Ainsi, une étude de la relation entre la structure primaire des NRAMPs et leur sélectivité a été réalisée sur la protéine AtNRAMP4, homologue de séquence de PtNRAMP3.1 et NRAMP3.2[28].

Suite à une mutagenèse aléatoire du CDS codant la protéine AtNRAMP4, une sélection en levure a été réalisée en présence de cadmium et en condition de carence en fer. Cette sélection a permis d'identifier chez AtNRAMP4, trois résidus indispensables au transport de cadmium. La sélectivité des différents AtNRAMP4 mutés a ensuite été testée par expression chez des levures déficientes pour différent systèmes d'influx de métaux. Parmi les mutations sélectionnés plusieurs affectent également le transport de zinc mais seulement une, E401K affecte aussi le transport de manganèse par AtNRAMP4. Les conséquences physiologiques de ces mutations ont ensuite été étudiées en plante chez le double mutant *nramp3nramp4* d'*A. thaliana*. Il est ainsi apparu que les mutations modifient de façon sélective l'accumulation du cadmium et du zinc sans affecter le transport du fer, indiquant qu'il est possible de modifier la sélectivité des NRAMP afin d'améliorer l'efficacité de phytoremédiation

4. Étude de l'implication de l'autophagie dans la remobilisation des métaux

La remobilisation des métaux des feuilles sénescentes implique un grand nombre d'acteurs moléculaires spécifiques comme les transporteurs de métaux, mais également non spécifiques, agissant sans discrimination sur l'ensemble des éléments. L'autophagie est un mécanisme ubiquitaire de recyclage

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

intracellulaire de molécules et d'organites par acheminement puis dégradation de ces éléments dans la vacuole chez les végétaux et les levures ou dans les lysosomes chez les animaux. De récents travaux réalisés chez *A. thaliana* ont mis en évidence que la quantité d'azote transloquée des feuilles vers les graines se trouve fortement diminuée chez le mutant d'autophagie *atg5* par rapport au sauvage[29]. De plus, il a été montré que durant la sénescence, l'autophagie joue un rôle majeur dans la dégradation du chloroplaste qui contient 80% de l'azote et du fer des cellules chlorophylliennes[24,30,31]. L'autophagie contrôle donc la remobilisation de l'azote des feuilles vers les graines au cours de la sénescence et pourrait représenter plus généralement un processus clé d'accompagnement de la remobilisation de l'ensemble des éléments dont les métaux[32].

Ainsi, des travaux ont été menés afin d'étudier l'implication de l'autophagie dans la remobilisation des métaux chez la plante modèle *A. thaliana* pour laquelle de nombreux outils sont disponibles tels que des mutants de l'autophagie. Le contenu en métaux des graines et des feuilles a été mesuré en fin de cycle chez plusieurs lignées d'*A. thaliana* déficientes pour différents acteurs du mécanisme d'autophagie. Nos résultats ont montrés que les concentrations en fer, manganèse et zinc sont augmentées jusqu'à 2,5 fois dans les feuilles des mutants d'autophagie par rapport aux feuilles de plantes sauvages, indiquant que l'autophagie est importante pour la remobilisation des métaux. Suite à cette première expérimentation, le mutant *atg5* a été sélectionné afin d'analyser plus finement le rôle de l'autophagie dans la remobilisation du fer. En condition de carence en fer réalisée au cours du stade reproducteur, la concentration en fer des graines du mutant *atg5* est nettement plus faible que celle des graines des plantes sauvages, ce qui se traduit par une diminution par cinq de l'Index de Récolte du Fe (IRF) chez le mutant *atg5* par rapport au sauvage. L'ajout du fer dans le milieu au cours du stade reproducteur permet d'augmenter par 2 la concentration en fer des graines du mutant *atg5*. Cependant, cela permet seulement d'atteindre 20% du contenu en fer des graines des plantes sauvages soumises aux mêmes conditions. C'est données suggèrent donc que l'autophagie est un processus essentiel à la remobilisation des métaux des feuilles vers les graines et que l'absorption racinaire de Fe ne peut pas compenser l'absence de remobilisation.

Bien que l'implication de l'autophagie dans la remobilisation n'ait été démontré que pour des plantes annuelles lors de la sénescence monocarpique, il n'y pas de raison de penser que ce mécanisme ne puisse pas également intervenir lors de la sénescence automnale chez les arbres à feuilles caduques. Ainsi l'expression de *PtATG5* homologue d'*AtATG5*, a été suivie au niveau de feuilles matures et sénescences chez sept génotypes de peupliers. Bien qu'il existe d'importantes variations d'expression de *PtATG5* entre les génotypes, aucune augmentation n'est observée entre le stade mature et le stade sénescence chez les sept génotypes étudiés. Ainsi, contrairement à la sénescence monocarpique *d'A. thaliana*, la sénescence automnale des feuilles du peuplier ne semble donc pas s'accompagner de l'induction des gènes *ATG*. De futurs travaux devront être réalisés afin de tester si l'induction du mécanisme d'autophagie au niveau des feuilles sénescentes du peuplier permet d'améliorer la remobilisation des métaux et ainsi de limiter le retour au sol des ETMs.

5. Conclusion

A cours de ce travail de thèse, l'étude de l'évolution des contenus en métaux des feuilles réalisée sur différents génotypes de peuplier a permis de mettre en évidence une absence systématique de remobilisation des ETMs au cours de la sénescence foliaire, limitant le processus de phytoextraction. Dans le but de remédier à cette limitation, un travail ayant pour but d'identifier des mécanismes permettant la remobilisation des ETMs des feuilles a été entrepris. Les résultats obtenus indiquent que l'efficacité de phytoextraction du peuplier pourrait être améliorée par l'augmentation, spécifiquement au niveau des feuilles, de l'expression des gènes codant pour les transporteurs PtNRAMP3.1 et PtNRAMP3.2 ainsi que des gènes codant pour les différents acteurs du mécanisme d'autophagie. De plus, l'identification au niveau de la famille NRAMP, de résidus discriminant les métaux essentiels des métaux dits toxiques, donne la possibilité d'améliorer les capacités de transport d'ETMs des membres de cette famille.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

6. Perspectives

Bien que les résultats obtenus au cours de cette thèse aient montré que l'autophagie est essentielle à la remobilisation des métaux chez la plante annuelle *A. thaliana*, rien n'indique pour le moment qu'il en soit de même chez le peuplier. Il apparait donc important de tester l'effet de l'induction, au niveau des feuilles sénescentes, du mécanisme d'autophagie sur la remobilisation des métaux. De plus, cette thèse a mis en évidence que la surexpression de *PtNRAMP3.1* et *PtNRAMP3.2* permet de limiter le contenu en ETMs des feuilles de peuplier. Cependant, des analyses de contenus en métaux au niveau du tronc et des branches devront également être réalisées afin de s'assurer que la remobilisation des métaux des feuilles s'accompagne bien d'une accumulation supplémentaire d'ETMs au niveau du bois. Dans le cas inverse, il peut être envisagé d'exprimer *PtNRAMP3.1* et *PtNRAMP3.2* sous le contrôle d'un promoteur spécifique des feuilles sénescentes. Enfin, parce que la « remobilisation des métaux à partir des organes sénescents » ne représente qu'une des trois composantes permettant l'amélioration de la phytoextraction, il est également envisagé d'améliorer l'absorption des ETMs à partir des racines et l'accumulation des métaux dans les parties pérennes en identifiant des promoteurs forts et spécifiques de ces organes ainsi que des gènes codant pour des transporteurs permettant l'entrée de métaux dans la cellule et dans la vacuole. D'après les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse, il apparait que PtNRAMP1 pourrait représenter un bon candidat pour l'amélioration de l'absorption racinaire des ETMs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 Cunningham, S.D. Et Berti, W.R. (1993) Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **29**, 207-212.
2 Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Motto, H. et Raskin, I. (1995) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science & Technology*, **29**, 1232-1238.
3 Salt, D.E., Smith, R.D. et Raskin, I. (1998) PHYTOREMEDIATION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 643-668.
4 Ebbs, S.D. et Kochian, L.V. (1997) Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, **26**, 776-781.
5 Robinson, B.H., Mills, T.M., Petit, D., Fung, L.E., Green, S.R. et Clothier, B.E. (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil*, **227**, 301-306.
6 Pulford, I.D. et Watson, C. (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees a review. *Environment International*, **29**, 529-540.
7 Di Baccio, D., Tognetti, R., Sebastiani, L. et Vitagliano, C. (2003) Responses of *Populus deltoides* × *Populus nigra* (*Populus* × *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytologist*, **159**, 443-452.
8 Sebastiani, L., Scebba, F. et Tognetti, R. (2004) Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides x maximowiczii*) and I-214 (*P. x euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany*, **52**, 79-88.
9 Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C. et Ceulemans, R. (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution*, **131**, 485-494.
10 Unterbrunner, R., Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Tlustos, P., Zupan, M. et Wenzel, W.W. (2007) Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environmental Pollution*, **148**, 107-114.
11 Dinelli, E. et Lombini, A. (1996) Metal distributions in plants growing on copper mine spoils in Northern Apennines, Italy: the evaluation of seasonal variations. *Applied Geochemistry*, **11**, 375-385.
12 Pottier, M., García de la Torre, V. S., Victor, C., David, L. C., Chalot, M., & Thomine, S. (2015). Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. Environmental Pollution, 199, 73–82.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

13 Sjödin, A., Street, N.R., Sandberg, G., Gustafsson, P. et Jansson, S. (2009) The Populus Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. *New Phytologist*, **182**, 1013-1025.

14 Guo, Y. et Gan, S. (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, **46**, 601-612.

15 Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A.D., Matallana-Ramirez, L.P., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanor, M.-I., Köhler, B. et Mueller-Roeber, B. (2010) A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *The Plant Journal*, **62**, 250-264.

16 Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.-s., Penfold, C.A. et Jenkins, D. (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell Online*, **23**, 873-894.

17 Kou, X., Watkins, C.B. et Gan, S.-S. (2012) Arabidopsis AtNAP regulates fruit senescence. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 6139-6147.

18 Zhang, K. et Gan, S.-S. (2012) An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiology*, **158**, 961-969.

19 Bhalerao, R., Keskitalo, J., Sterky, F., Erlandsson, R., Björkbacka, H., Birve, S.J., Karlsson, J., Gardeström, P., Gustafsson, P., Lundeberg, J. et Jansson, S. (2003) Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology*, **131**, 430-442.

20 Couturier, J., Doidy, J., Guinet, F., Wipf, D., Blaudez, D. et Chalot, M. (2010) Glutamine, arginine and the amino acid transporter Pt-CAT11 play important roles during senescence in poplar. *Annals of Botany*, **105**, 1159-1169.

21 Molins, H., Michelet, L., Lanquar, V., Agorio, A., Giraudat, J., Roach, T., Krieger-Liszkay, A. et Thomine, S. (2012) Mutants impaired in vacuolar metal mobilization identify chloroplasts as a target for cadmium hypersensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 804-817.

22 Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. et Schroeder, J.I. (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* **97**, 4991-4996

23 Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I. et Barbier-Brygoo, H. (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal*, **34**, 685-695.

24 Lanquar, V., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H. et Thomine, S. (2004) Regulation and function of AtNRAMP4 metal transporter protein. *Soil science and plant nutrition*, **50**, 1141-1150.

25 Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier-Brygoo, H. et Thomine, S. (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J*, **24**, 4041-4051.

26 Lanquar, V., Ramos, M.S., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Kramer, U. et Thomine, S. (2010) Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiology*, **152**, 1986-1999.

27 Induri, B.R., Ellis, D.R., Slavov, G.T., Yin, T., Zhang, X., Muchero, W., Tuskan, G.A. et DiFazio, S.P. (2012) Identification of quantitative trait loci and candidate genes for cadmium tolerance in Populus. *Tree Physiology*, **32**, 626-638.

28 Pottier, M., Oomen, R., Picco, C., Giraudat, J., Scholz□Starke, J., Richaud, P., Carpaneto A. & Thomine, S. (2015). Identification of mutations allowing Natural Resistance Associated Macrophage Proteins (NRAMP) to discriminate against cadmium. *The Plant Journal*, *83*(4), 625-637.

29 Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M.-P., Avice, J.-C. et Masclaux-Daubresse, C. (2012) Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. *New Phytologist*, **194**, 732-740.

30 Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T. et Makino, A. (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology*, **149**, 885-893.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

31 Nouet, C., Motte, P. et Hanikenne, M. (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends in Plant Science*, **16**, 395-404.
32 Pottier, M., Masclaux-Daubresse, C., Yoshimoto, K., & Thomine, S. (2014). Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds. *Frontiers in plant science*, *5*.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.