

Accumulation des métaux lourds chez le Peuplier: Localisation tissulaire et expression de quelques transporteurs

MIGEON Aude, BLAUDEZ Damien, GUINET Frédéric, CHALOT Michel
et BOTTON Bernard

Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelles, Unité Mixte de Recherche INRA-UHP 1136, Interactions
Arbres-Microorganismes, Faculté des Sciences et Techniques IFR 110 Génomique, Université Henri
Poincaré, Nancy 1, Vandoeuvre-Les-Nancy Cedex, France

Résumé- Chez les végétaux, des éléments non essentiels comme le Cd et le Pb peuvent être absorbés et constituer un danger potentiel car ils entrent dans la chaîne alimentaire. Les éléments traces comme le Zn, Fe, Cu, Co, Mn, Mo et Ni sont nécessaires aux processus biologiques, mais leur accumulation excessive peut être toxique. Dans le cadre de cette étude il a été montré que le Peuplier (*Populus* spp.) pouvait accumuler de relativement fortes concentrations de certains métaux (Cd, Zn et Ni) par rapport à d'autres espèces ligneuses. Différents cultivars ont été testés en culture hydroponique et il a été montré que les hybrides de *Populus trichocarpa* accumulaient davantage que les autres. Ces hybrides ont été implantés sur deux sites pollués et il en résulte que, combiné à la production d'une forte biomasse qui peut être utilisée pour produire de l'énergie, le caractère accumulateur du Peuplier, fait de cet arbre un bon candidat pour la phytoremédiation. Une étude de localisation tissulaire des métaux dans les feuilles et les tiges de Peupliers soumis à une polycontamination métallique a également été entreprise par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et Spectrométrie de Masse à Ionisation Secondaire (SIMS). Cette dernière technique a permis de montrer que le Zn était essentiellement concentré au niveau du mésophylle. Afin d'analyser quelques déterminants de la tolérance aux métaux, des mesures d'expression et de caractérisation fonctionnelle de transporteurs appartenant à la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator) ont été réalisées dans différents tissus et dans différentes conditions physiologiques. La spécificité des gènes exprimés et leur localisation ont été étudiées, respectivement par complémentation fonctionnelle et par expression hétérologue à la suite d'une fusion GFP, chez la levure. Ces techniques ont permis de mettre en évidence un transporteur de Zn (PtMTP2) et un transporteur de Mn (PtMTP9).

Mots-clés: Cation diffusion facilitator, métaux lourds, phytoremédiation, *Populus* spp., transporteurs

Accumulation of heavy metals in Poplar: Tissue localization and expression of some transporters

Abstract- In plants, non-essential elements such as Cd and Pb can be absorbed and constitute a potential hazard because they enter the food chain. Trace elements such as Zn, Fe, Cu, Co, Mn, Mo and Ni are necessary biological processes, but their excessive accumulation can be toxic. In this study it was shown that the poplar (*Populus* spp.) could accumulate relatively high concentrations of some metals (Cd, Zn and Ni) compared to other woody species. Different cultivars were tested in hydroponics and it was shown that hybrids of *Populus trichocarpa* accumulated more than others. These hybrids were implanted in two polluted sites, and it follows that, combined to produce a high biomass that can be used to produce energy, the character accumulator Poplar, makes this tree a good candidate for phytoremediation. A study of tissue localization of metals in leaves and stems of poplars subjected to polycontamination metal was also taken by scanning electron microscopy (SEM) and Mass Spectrometry Secondary Ion (SIMS). The latter technique showed that Zn was mostly concentrated in the mesophyll. To analyze some determinants of metal tolerance, measures of expression and functional characterization of transporters belonging to the CDF family (Cation Diffusion Facilitator) were conducted in different tissues and under different physiological conditions. The specificity of genes expressed and their localization were studied respectively by functional complementation and heterologous expression following GFP fusion in yeast. These techniques allowed to identify a carrier of Zn (PtMTP2) and a transporter of Mn (PtMTP9).

Keywords: Cation diffusion facilitator, heavy metals, phytoremediation, *Populus* spp., transporters

Introduction

Par définition, les métaux lourds ont une masse volumique supérieure à 6 g par mL et ont un numéro atomique supérieur à 20. En outre ils forment des précipités insolubles avec les sulfures. L'appellation est cependant discutée car les métaux lourds sont réputés toxiques alors que certains sont des oligo-éléments (Cu, Fe, Zn) et que d'autres sont en réalité des métalloïdes (Se, As).

Des espèces ligneuses comme le Peuplier et le Saule sont fréquemment rencontrées sur les sites contaminés par les métaux lourds [1]. Leur forte biomasse et leur croissance rapide en font d'excellents candidats à la phytoremédiation et sont une alternative aux plantes hyperaccumulatrices de faible taille. Des peupliers hybrides ont souvent été utilisés dans des études de phytoremédiation pour la décontamination des sols ou d'eaux résiduaires, pollués par le zinc [2, 3], le cadmium [4], le sélénium [5], le chrome [6] ou des composés organiques [7].

Les ions métalliques sont mobilisés par la sécrétion de chélateurs et par l'acidification du sol, puis sont absorbés grâce à des systèmes de transport localisés sur la membrane plasmique. Ensuite, les métaux sont transportés des racines vers les parties aériennes via le xylème et sont accumulés principalement dans des organites cellulaires comme la vacuole, le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi [8].

Les plantes diffèrent dans leur capacité à transférer les métaux lourds de la racine à la feuille. C'est ainsi que le plomb, le chrome et le cuivre sont plutôt retrouvés dans les racines alors que le cadmium, le nickel et le zinc s'accumulent au niveau des tissus aériens [7].

1. Matériel et méthodes

1.1. Recherche de clones de peuplier présentant un caractère de tolérance aux métaux lourds

Différents cultivars de peuplier ont été prélevés sur des sites contaminés notamment par le Zn, le Cd et le Pb (site de Micheville – Lorraine ; site Metaleurop – Nord Pas de Calais). Le peuplier a dans un premier temps été comparé aux autres essences trouvées sur les sites.

Les cultivars de Peuplier provenant des sites pollués ainsi que d'autres issus de collections et fournis par l'INRA Orléans, ont été également cultivés en milieu hydroponique sur film nutritif en présence ou non de différentes concentrations en métaux.

La tolérance est estimée par mesure de biomasse produite ainsi que par mesure des teneurs en métaux par ICP-AES (Spectrométrie d'absorption atomique par plasma d'argon induit).

Des recherches de localisation des métaux lourds ont été réalisées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et par Spectrométrie de Masse à Ionisation Secondaire (SIMS) selon des protocoles décrits précédemment [9].

1.2. Etude des transporteurs de métaux

Afin de mettre en évidence des déterminants de la tolérance aux métaux, les transporteurs de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator) ont été étudiés.

Ces études nécessitent d'extraire les ARNs, puis d'amplifier les gènes des transporteurs par RT-PCR afin d'étudier leur expression.

L'étude de l'expression des gènes est testée en fonction du tissu (feuille, tige, racine) mais aussi en comparant les expressions d'échantillons provenant d'un site pollué par rapport à un site témoin.

Certains gènes exprimés sont étudiés plus en détail par complémentation fonctionnelle chez la levure.

La localisation intracellulaire d'un transporteur de manganèse (MTP9) a été réalisée après son clonage dans le vecteur d'expression pYES2 en fusion avec la GFP, selon des techniques décrites antérieurement [10].

2. Résultats

2.1. Teneur en métaux des végétaux prélevés sur le site pollué de Métaeurop

En ce qui concerne l'accumulation de Cd trois espèces se distinguent: *Arabidopsis halleri* avec des concentrations bien supérieures aux autres espèces puisqu'elles atteignent 300 $\mu\text{g/g}$ de matière sèche, contre 70 $\mu\text{g/g}$ pour *Salix caproea* et 50 $\mu\text{g/g}$ pour *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* (fig. 1). Hormis un autre saule (*Salix alba*) qui a une valeur intermédiaire, les autres espèces végétales présentent des concentrations largement inférieures. Ainsi le chêne (*Quercus rubra*) accumule 40 fois moins de Cd que le peuplier.

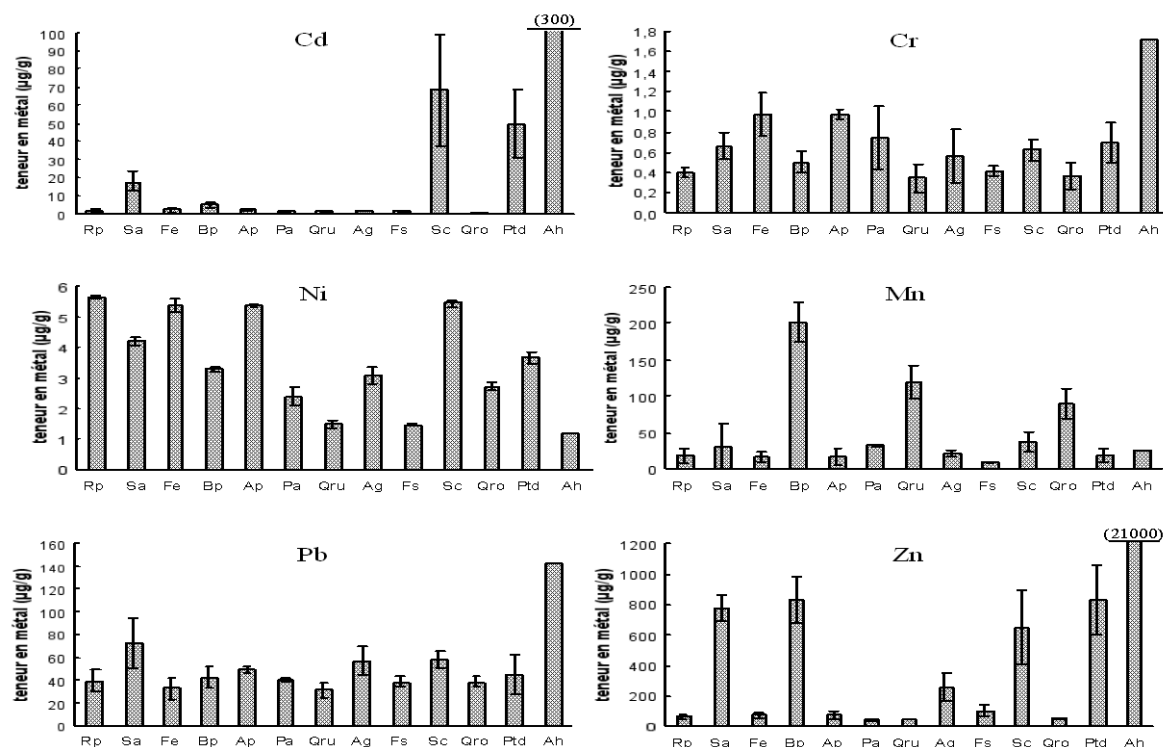


Figure 1- Concentrations des métaux dans les feuilles de différentes espèces végétales prélevées sur le site pollué de Métaeurop

(Ag: *A. glutinosa*, Ah: *A. halleri*, Ap: *A. pseudoplatanus*, Bp: *B. pendula*, Fe: *F. excelsior*, Fs: *F. sylvatica*, Pa: *P. avium*, Ptd: *P. trichocarpa* x *P. deltoides*, Qro: *Q. robur*, Gru: *Q. rubra*, Rp: *R. pseudoacacia*, Sa: *S. alba*, Sc: *S. caproea*. Les barres verticales indiquent les écart-types calculés sur les 3 réplicats de chaque espèce végétale)

Le manganèse présente de fortes variations interspécifiques et le peuplier n'est pas le plus gros accumulateur de cet élément.

En ce qui concerne le nickel, les concentrations varient d'un facteur 5 entre les extrêmes. Par exemple le peuplier accumule 2,5 fois plus que le hêtre mais 1,5 fois moins que le saule.

Certains métaux comme le chrome et le plomb ne présentent pas de fortes différences entre espèces tout au plus un facteur 2 entre les extrêmes.

2.2. Teneur en métaux des végétaux prélevés sur site pollué et site témoin

Une différence significative entre les arbres poussant sur site pollué et leurs témoins est trouvée dans la plupart des cas : pour le Cd, le Ni, le Mn, le Pb et le Zn (Fig. II). Il n'y a pas de différence significative pour le chrome. Ces différences entre site pollué et site témoin peuvent être importantes. En effet, *P. trichocarpa* x *P. deltoides* montre une concentration 30 fois supérieure en cadmium sur le site pollué. Pour le plomb, c'est *P. tremula* x *P. tremuloïdes* qui est 8 fois plus concentré sur le site pollué. De fortes différences sont aussi observées pour le zinc et pour le nickel.

Cependant les différences entre clones de peuplier varient selon les métaux. Par exemple le clone *P. tremula* x *P. tremuloïdes* accumule davantage le plomb et le nickel que les autres clones.

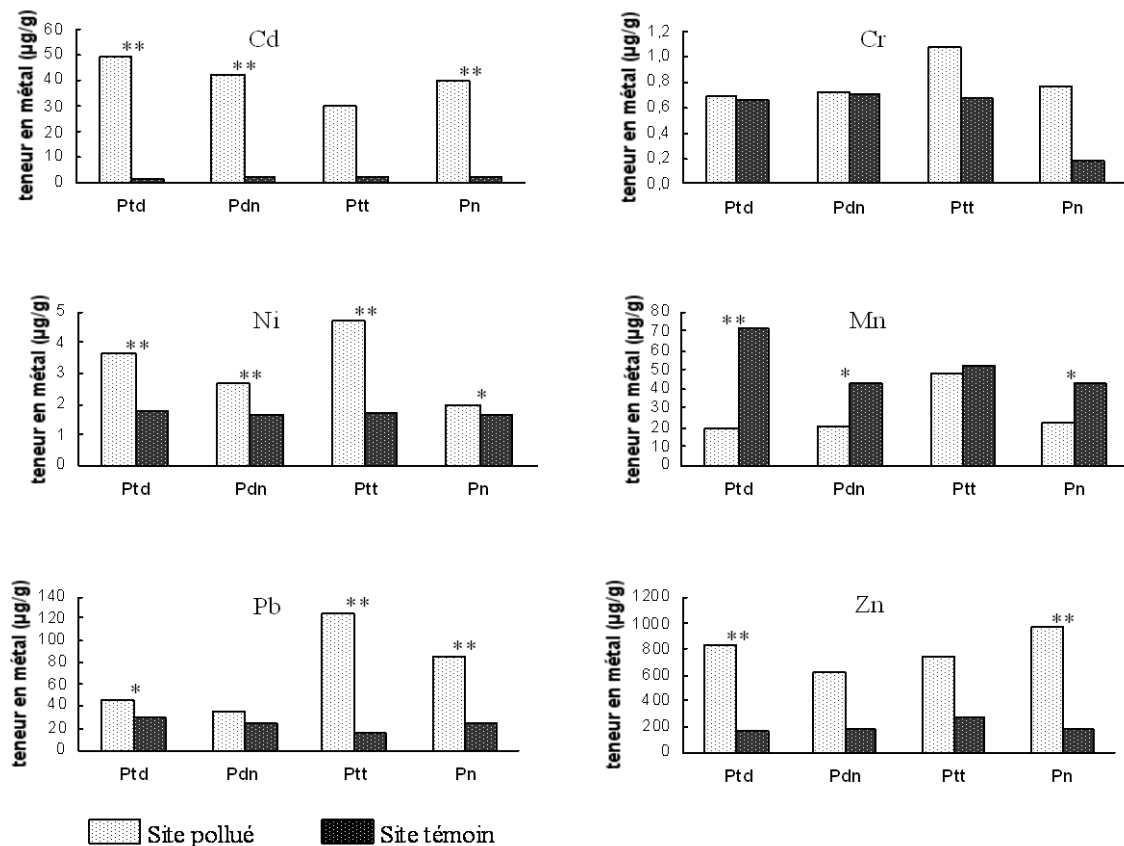


Figure II- Evolution de la concentration en métaux chez différents clones ou hybrides de peupliers entre le site pollué et son témoin
(Ptd: *P. trichocarpa* x *P. deltoides*; Pdn: *P. deltoides* x *P. nigra*; Ptt: *P. tremula* x *P. tremuloïdes*;

Pn: *P. nigra*)

Les différences statistiques de concentration en métaux entre le site pollué et son témoin sont montrées par de simples astérisques ($P < 0,05$) ou doubles astérisques ($P < 0,01$) et ont été déterminées par un test t de student sur des données normalisées.

2.3. Teneur en métaux de cultivars de peuplier cultivés en hydroponique

En culture hydroponique, les cultivars qui accumulent le mieux le Cd appartiennent à l'espèce *trichocarpa* puisque les 4 cultivars en tête de ce classement sont des hybrides de *P. trichocarpa* ou des *trichocarpa* purs (Tableau I). Un facteur de l'ordre de 15 est observé entre les cultivars qui accumulent le plus (Skado, Raspalje, Bakan et Fritzi Pauley) et celui qui accumule le moins (L155A56).

Si on se réfère à la quantité de Cd accumulée par plante, Raspalje, Bakan et Skado sont les cultivars les plus accumulateurs de Cd en conditions de culture hydroponique (non montré).

Tableau I- Concentrations en Cd des cultivars testés en culture hydroponique

Cultivar	teneur en Cd (ppm)
Skado (TxM)	108,19
Raspalje (TxD)	63,13
Bakan (TxM)	34,91
Fritzi Pauley (T)	25,60
AFO 676 (N)	24,54
Dvina (D)	18,20
Koster (DxN)	18,10
Lena (D)	16,28
Muur (DxN)	16,26
Eridano (DxM)	15,96
Blc de Garonne (N)	15,67
Sile (DxC)	13,86
Rochester (MxN)	7,47
L155 A56 (D)	7,19

Les concentrations en zinc dans les différents cultivars vont de 400 à 1400 ppm. Les 3 cultivars qui accumulent le plus le zinc sont dans l'ordre Skado, Raspalje et Fritzi Pauley. Quand on considère la biomasse, les 3 cultivars les plus intéressants sont Raspalje, Bakan et Eridano (non montré).

2.4. Localisation tissulaire du Zn

La technique SIMS a permis de localiser le Zn, mais pas le Cd qui était insuffisamment concentré. La cartographie du Ca permet de définir les contours des tissus et par la suite de localiser le métal qui est trouvé au niveau du mésophylle et de l'épiderme (non montré).

2.5. Expression de quelques gènes transporteurs de métaux

L'expression de quelques transporteurs de métaux a été réalisée sur *Populus trichocarpa* cultivé en laboratoire (fig. 3).

La plupart des transporteurs sont exprimés dans toutes les parties de la plante. Cependant certains sont faiblement représentés dans la racine (MTP4.2, 5 8.1 et 12). Les autres déterminations sont conduites sur feuilles jeunes.

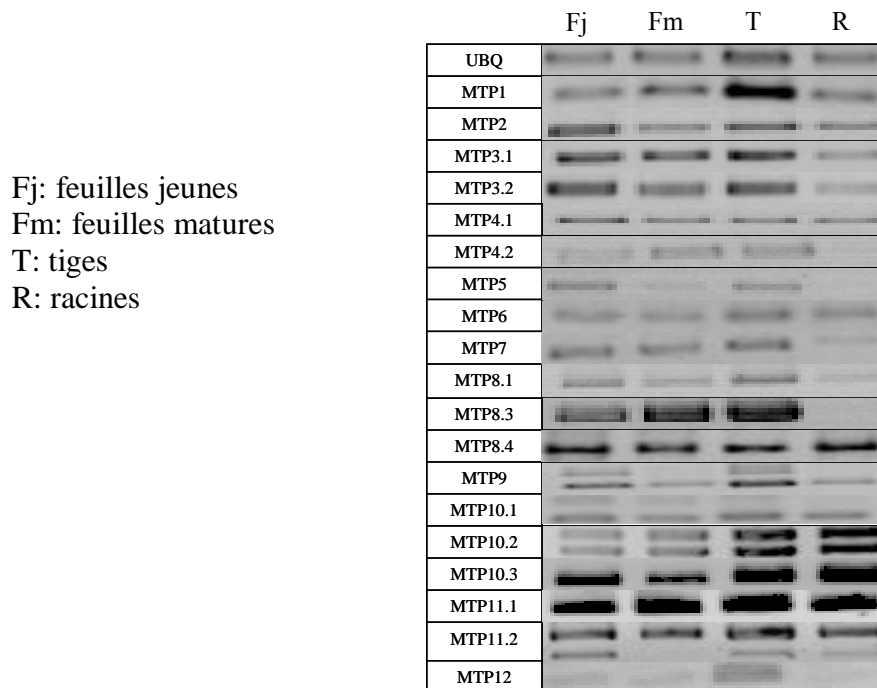


Figure 3- Expression des transporteurs de métaux chez *Populus trichocarpa* (MTP1, 2, 3 et 4 sont des transporteurs de Zn ; MTP8, 9 10 et 11 sont des transporteurs de Mn. MTP5, 6, 7 et 12 n'ont pas de spécificité connue. UBQ : ubiquitine (gène marqueur).

Les gènes des transporteurs de zinc MTP1, MTP3.1 ainsi que le gène du transporteur de manganèse MTP9 sont davantage exprimés dans les feuilles provenant du site contaminé en comparaison avec le site témoin (fig. 4). Ceci semble indiquer une augmentation d'expression en présence de fortes concentrations en métaux dans le sol et dans la feuille. A l'opposé le gène du transporteur MTP2 est plus exprimé sur les échantillons provenant du site témoin.

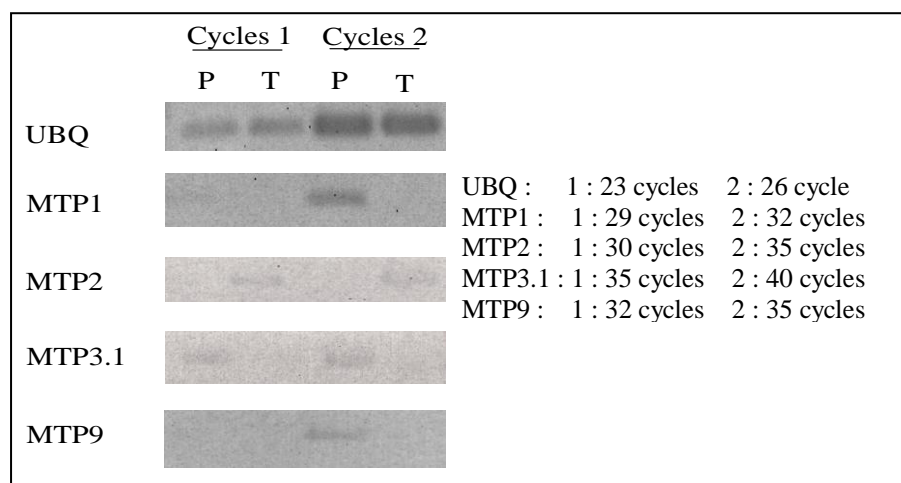


Figure 4- Expression des transporteurs MTP1, MTP2, MTP3.1, MTP9 et de l'ubiquitine sur des échantillons de *P. trichocarpa* x *P. deltoides* provenant du site pollué (P) et de son témoin (T)

2.6. Caractérisation fonctionnelle de quelques transporteurs de la famille CDF

La spécificité des transporteurs pour les métaux a été étudiée par complémentation fonctionnelle chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Un transporteur de cette famille a déjà été caractérisé dans le laboratoire, il s'agit de MTP1, un transporteur de zinc [10]. L'analyse de MTP2 et MTP9 a été réalisée via le clonage dans le vecteur d'expression pFL61 et l'expression hétérologue de ces transporteurs dans des souches de levures sensibles au Zn (*zrc1Δ*), au Mn (*pmr1Δ*) ou au Cd (*ycf1Δ*) (Fig. V).

Le témoin positif utilisé est la souche sauvage transformée par le vecteur vide (pFL61) alors que le témoin négatif est constitué par les souches mutantes transformées avec le vecteur vide.

MTP2 restaure la croissance de la souche mutante *zrc1Δ* ce qui indique que ce transporteur est spécifique du Zn. De même, MTP9 restaure la croissance de la souche mutante *pmr1Δ* ce qui indique que ce transporteur est spécifique du Mn. Les deux transporteurs ne restaurent pas la tolérance au Cd.

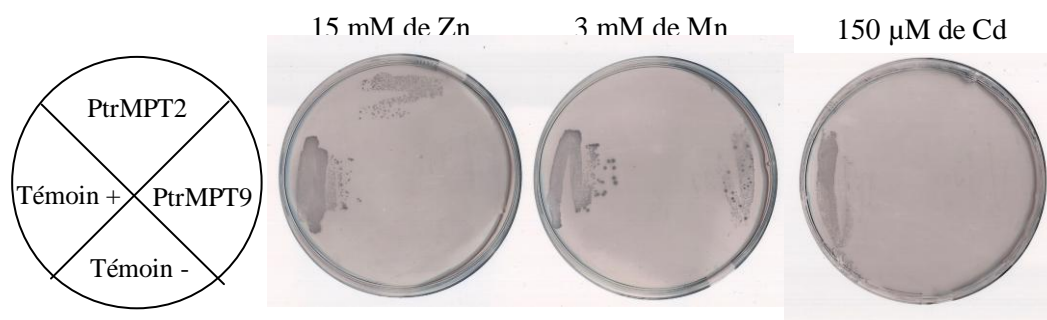


Figure 5- Caractérisation fonctionnelle de MTP2 et MTP9

2.7. Localisation du transporteur de manganèse MTP9

Le transporteur de manganèse MTP9 a été cloné dans le vecteur d'expression pYES2 en fusion avec la GFP dans but de mettre en évidence sa localisation cellulaire chez la levure.

Les résultats obtenus semblent indiquer une localisation au niveau de l'appareil de Golgi (fig. 6). Cette localisation rappelle en effet celles de MTP11.1 et MTP11.2 confirmées dans cet organe [11].

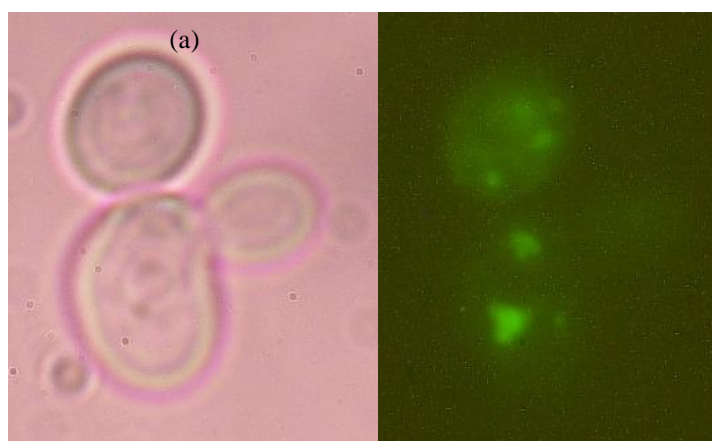


Figure 6- Observation des cellules de levure exprimant MTP9-GFP au microscope en lumière blanche (a) ou en fluorescence (b)

Conclusion

Les résultats indiquent que le peuplier est une espèce intéressante pour la phytoextraction du Cd et du Zn puisqu'il présente des concentrations en ces éléments plus élevées que celles des autres plantes ligneuses présentes sur les mêmes sites.

Le criblage de plusieurs cultivars montre que ceux qui accumulent le mieux le Cd sont des hybrides de *P. Trichocarpa* ou des *trichocarpa* purs. Un facteur de l'ordre de 15 est observé entre les cultivars qui accumulent le plus (Skado, Raspalje, Bakan et Fritzi Pauley) et celui qui accumule le moins (L155A56). Les hybrides de *P. Trichocarpa* sont également les plus forts accumulateurs de Zn avec un facteur de l'ordre 4 entre les cultivars extrêmes.

En ce qui concerne les transporteurs, les analyses d'expression montrent que tous les membres de la famille CDF sont exprimés, notamment dans les feuilles et les tissus vasculaires, certains plus exprimés sur sol pollué.

La spécificité des transporteurs MTP2 et MTP9 a été confirmée par expression hétérologue chez la levure. D'autre part, la localisation cellulaire par fusion GFP montre que MTP9 est localisé au niveau de l'appareil de Golgi quand l'expression est réalisée chez la levure. Ce résultat est à confirmer par expression transitoire *in planta*.

Références bibliographiques

- [1] Punshon T., Lepp N.W., Dickinson N. M. (1995) Resistance to copper toxicity in some British willows. *Journal of Geochemical Exploration* 52: 259-266.
- [2] Di Baccio D., Tognetti R., Sebastiani L., Vitagliano C. (2003) Responses of *Populus deltoides* x *Populus nigra* (*Populus* x *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *The New Phytologist* 159: 443-452.
- [3] Sebastiani L., Scebba F., Tognetti R. (2004) Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* x *maximowiczii*) and I-214 (*P. euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany* 52: 79-88.
- [4] Robinson B.H., Mills T.M., Petit D., Fung L.E., Green S.R., Clothier B.E. (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227: 301-306.
- [5] Pilon-Smits E.A.H., De Souza M.P., Lytle C.M., Shang C., Lugo T., Terry N. (1998) Selenium volatilization and assimilation by hybrid poplar (*Populus tremula* x *alba*). *Journal of Experimental Botany* 49: 1889-1892.
- [6] Pulford I.D., Watson C., McGregor S.D. (2001) Uptake of chromium by trees: Prospects for phytoremediation. *Environmental Geochemistry and Health* 23: 307-311.
- [7] Pulford I.D., Watson C. (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees. A review. *Environment International* 29: 529-540.

- [8] Clemens S. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7: 309-315.
- [9] Migeon A., Richaud P., Guinet F., Chalot M., Blaudez D. (2009) Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water, Air, & Soil Pollution* (publié en ligne, sous presse).
- [10] Blaudez D., Kohler A., Martin F., Sanders D., Chalot M. (2003) Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *The Plant Cell* 15: 2911-2928.
- [11] Peiter E., Montanini B., Gobert A., Pedas P., Husted S., Maathuis F.J.M., Blaudez D., Chalot M., Sanders D. (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 8532-8537.