

Acquisition et gestion du fer par les plantes

Jean-François Briat
Grégory Vert

Biochimie et physiologie moléculaire
des plantes,
Centre national de la recherche scientifique
(UMR 5004),
Université Montpellier-II,
Institut national de la recherche agronomique
et École nationale supérieure d'agronomie,
Place Viala,
F-34060 Montpellier cedex 1
<briat@ensam.inra.fr>

Résumé

L'homéostasie du fer doit être contrôlée tant au niveau cellulaire que de l'organisme entier pour fournir suffisamment de ce métal essentiel à la croissance et au développement des plantes, tout en évitant un excès qui pourrait être toxique. La carence en fer conduit à la chlorose chez les plantes, caractérisée par un jaunissement internervaire. Ce phénotype révèle l'impact du manque de fer sur le contenu des feuilles en chlorophylle et en caroténoïdes. La diminution de l'abondance en pigments photosynthétiques corrèle avec la perte des capacités photochimiques des chloroplastes. La carence en fer altère également la respiration mitochondriale et la fixation de l'azote atmosphérique dans les nodules des légumineuses. Ces perturbations métaboliques sont étroitement liées au fait que le fer est un métal de transition indispensable comme cofacteur de nombreuses réactions redox cellulaires. Pour assurer l'acquisition du fer à partir du sol, sa distribution aux différents organes et tissus d'une plante, et sa distribution intracellulaire entre les différents organites, plusieurs membranes doivent être traversées par ce métal. De nombreux transporteurs impliqués dans ces fonctions ont été caractérisés au niveau moléculaire ces dix dernières années. La nécessité d'une régulation intégrée de ces différents systèmes de transport requis pour la circulation du fer dans la plante entière est évidente, et plusieurs mutants altérés dans ces processus de signalisation ont été décrits. À l'inverse, les plantes se trouvant confrontées à un excès de fer mettent en place des possibilités de stockage de ce métal pour contrôler sa réactivité toxique avec l'oxygène. À ce titre, l'apoplasme, les vacuoles et les ferritines des plastes jouent un rôle important.

Mots clés : Productions végétales ; métabolisme.

Summary

Iron homeostasis in plants

Iron homeostasis at cellular level and in the whole organism must be balanced in order to supply enough iron for the plant growth and development, and to avoid excessive, toxic levels. Iron deficiency in plants leads to the chlorosis syndrom, characterized by a leaf interveinal yellowing. Such a phenotype reveals the impact of iron deficiency on chlorophyll and carotenoid concentrations. This decrease in photosynthetic pigment abundance correlates with a lowering of the chloroplast photochemical capacities. Iron deficiency also alters mitochondrial respiration and nitrogen fixation in the nodule of legumes. These defects are mainly due to the fact that iron is a major cofactor in many cellular redox processes. In order to perform iron uptake from the environment, iron distribution to various organs and tissues, and iron intracellular compartmentalization, various membranes must be crossed by this metal. Many transporters involved in these functions have been characterized at molecular level this last decade. An integrated regulation of these transport systems required for iron trafficking in the whole organism is therefore necessary, and various mutants affected in these signaling processes have already been characterized. On the opposite, in case of iron excess iron must be buffered because of its high reactivity with oxygen. This is achieved through its storage in the apoplasm and vacuoles and by way of the iron storage protein ferritin found within the plastids.

Key words: Vegetal productions; metabolism.

Tirés à part : J.-F. Briat

D' un point de vue anthropomorphique, l'importance biologique du fer est associée aux pathologies diverses dont souffrent les êtres humains possédant un métabolisme du fer anormal. Parmi ces pathologies, l'anémie liée à la carence en fer constitue le problème nutritionnel le plus courant, affectant quatre à cinq milliards d'êtres humains, dont une grande partie dans les pays du Sud. La principale source de fer dans les régimes alimentaires des pays en développement provient des végétaux. La compréhension des mécanismes assurant la régulation de l'homéostasie du fer chez les plantes apparaît ainsi indispensable, non seulement à l'amélioration de la productivité de celles-ci, mais aussi à la santé des êtres humains.

Rôles métaboliques du fer chez les végétaux

Le fer constitue le quatrième élément le plus abondant à la surface de notre planète. Malgré cette relative abondance au niveau des roches constituant la croûte terrestre, le fer n'est présent qu'en faible quantité dans la matière vivante (de 50 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche dans les feuilles, par exemple [1]). Cependant, le fer demeure un élément essentiel participant à de nombreux processus métaboliques indispensables à la vie de la plante. L'importance métabolique de l'élément fer provient de ses propriétés chimiques. Il peut former jusqu'à six liaisons de coordination en acceptant une paire d'électrons sur chacune de ses six orbitales atomiques. Des éléments électronégatifs comme l'oxygène, l'azote et le soufre auront la capacité de se lier avec le fer. Cette propriété fondamentale permet au fer de s'associer à des protéines. Sa nature de métal de transition lui confère la capacité d'exister sous deux formes, l'une réduite (Fe^{2+} , le fer ferreux), l'autre oxydée (Fe^{3+} , le fer ferrique). Cette capacité de pouvoir accepter ou donner alternativement un électron, fait du fer le cofacteur de choix de nombreuses réactions enzymatiques d'oxydoréduction. En association avec des protéines, le fer est ainsi impliqué dans de nombreuses réactions de transfert d'électrons dans la plante.

Les protéines à fer

Les protéines à fer peuvent être regroupées en trois classes, correspondant à la façon dont le métal est coordonné aux protéines : les protéines fer-soufre, les protéines à hème et les protéines dans lesquelles le fer est directement lié à la chaîne protéique.

Les protéines à centre fer-soufre

Ce type de protéines contient ce que l'on appelle un centre (ou *cluster*) fer-soufre,

constitué d'une association en stoechiométrie variable entre des atomes de fer et de soufre [2]. Ces centres fer-soufre sont associés à la protéine par l'intermédiaire de groupements thiols de certains résidus cystéine. Le nombre d'atomes de fer dans les centres fer-soufre varie de un à quatre, les centres $[\text{2Fe-2S}]$ et $[\text{4Fe-4S}]$ étant les plus répandus (figure 1). Au sein de ces structures, la valence du fer peut varier, permettant aux centres fer-soufre et aux protéines correspondantes de former un

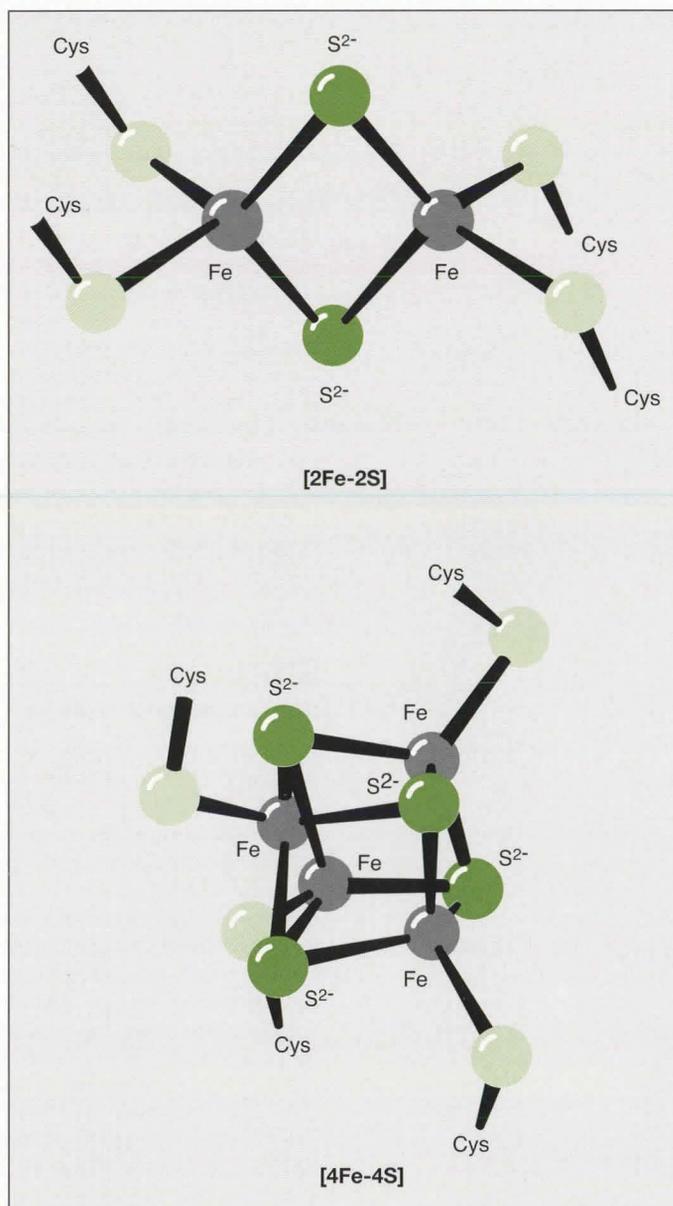


Figure 1. Représentation schématique des centres fer-soufre $[\text{2Fe-2S}]$ et $[\text{4Fe-4S}]$.

Les atomes de soufre de résidus cystéine sont représentés en vert clair et ceux impliqués dans la formation du centre fer-soufre en vert foncé. Les deux types de centres fer-soufre sont unis à la protéine par liaison avec les groupements thiols de certains résidus cystéine de la protéine (d'après [3]).

Figure 1. Schematic representation of iron-sulfur clusters $[\text{2Fe-2S}]$ and $[\text{4Fe-4S}]$.

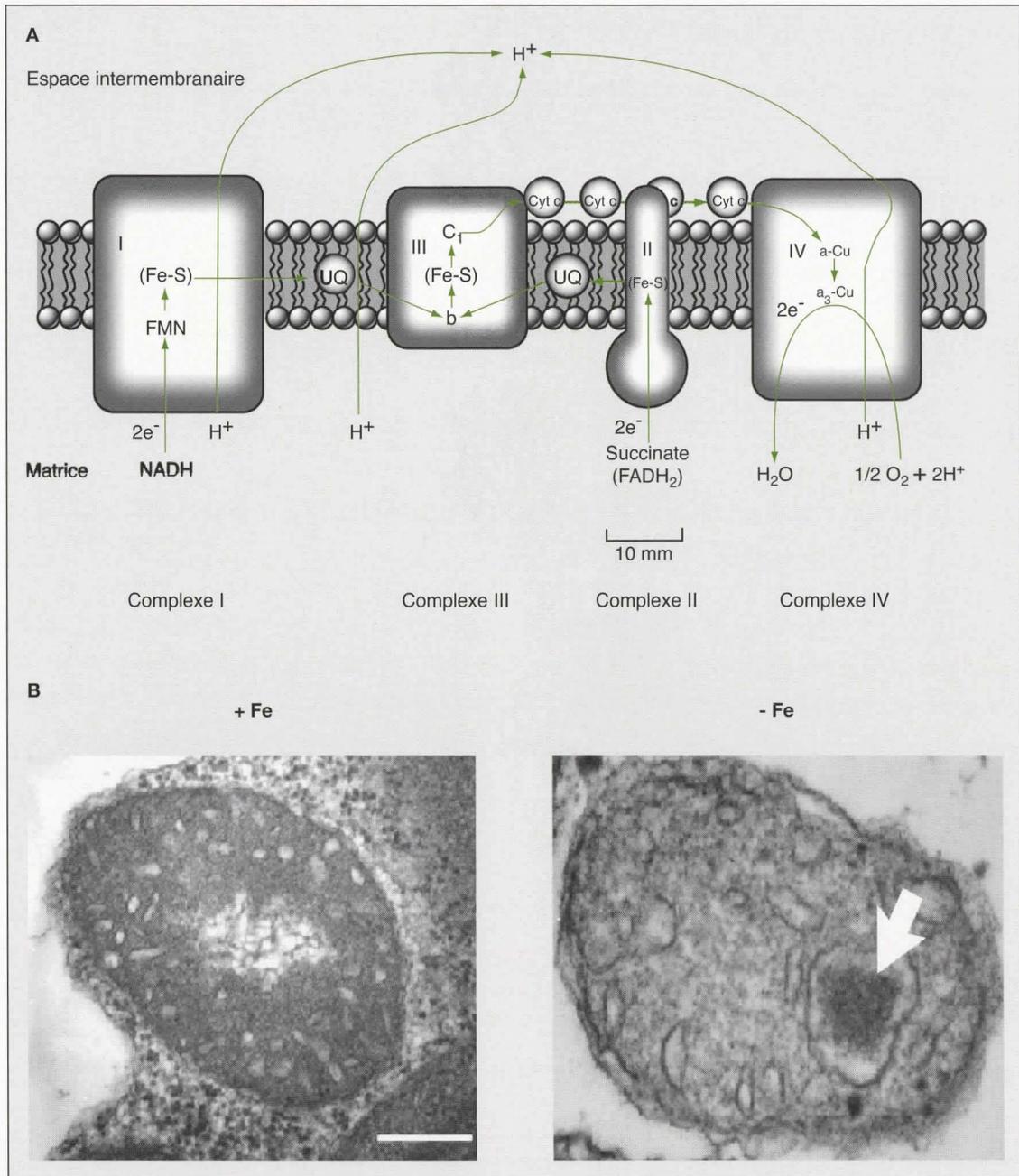


Figure 2. Importance du fer pour la structure et la fonction respiratoire des mitochondries.

A) Organisation des éléments de la chaîne de transport d'électrons dans la membrane mitochondriale interne. La chaîne respiratoire est formée de quatre complexes de transporteurs d'électrons et de deux transporteurs (l'ubiquinone et le cytochrome c) dont la localisation est indépendante. Fe-S : protéine à centre fer-soufre ; cyt : cytochrome (d'après [3]).

B) Images de microscopie électronique de mitochondries de feuilles de plantes de tabac cultivées en présence (+ Fe) ou en absence (- Fe) de fer. La flèche sur l'image - Fe indique des inclusions denses aux électrons fréquemment observées dans les mitochondries de plantes carencées en fer.

Figure 2. Iron requirements for the structure and respiratory function of mitochondria.

couple d'oxydoréduction. L'environnement des protéines à centre fer-soufre leur confère une gamme de potentiels redox très étendue.

Du fait des propriétés citées précédemment, les protéines à centre fer-soufre sont un constituant majeur des chaînes de transport d'électrons, en particulier au

niveau de la mitochondrie. De nombreuses protéines à centre fer-soufre ont été identifiées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (figure 2). Ainsi, le complexe I chez les animaux contient au moins quatre protéines à centre fer-soufre (N-1 à N-4), et le complexe II au moins trois (S1 à S3). Le complexe IV

renferme une protéine à centre fer-soufre : la protéine de Rieske. Les mêmes raisons expliquent la présence de protéines à centre fer-soufre au niveau de la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques des chloroplastes (figure 3). Ces protéines à centre fer-soufre trouvées au niveau de la membrane des thylakoïdes

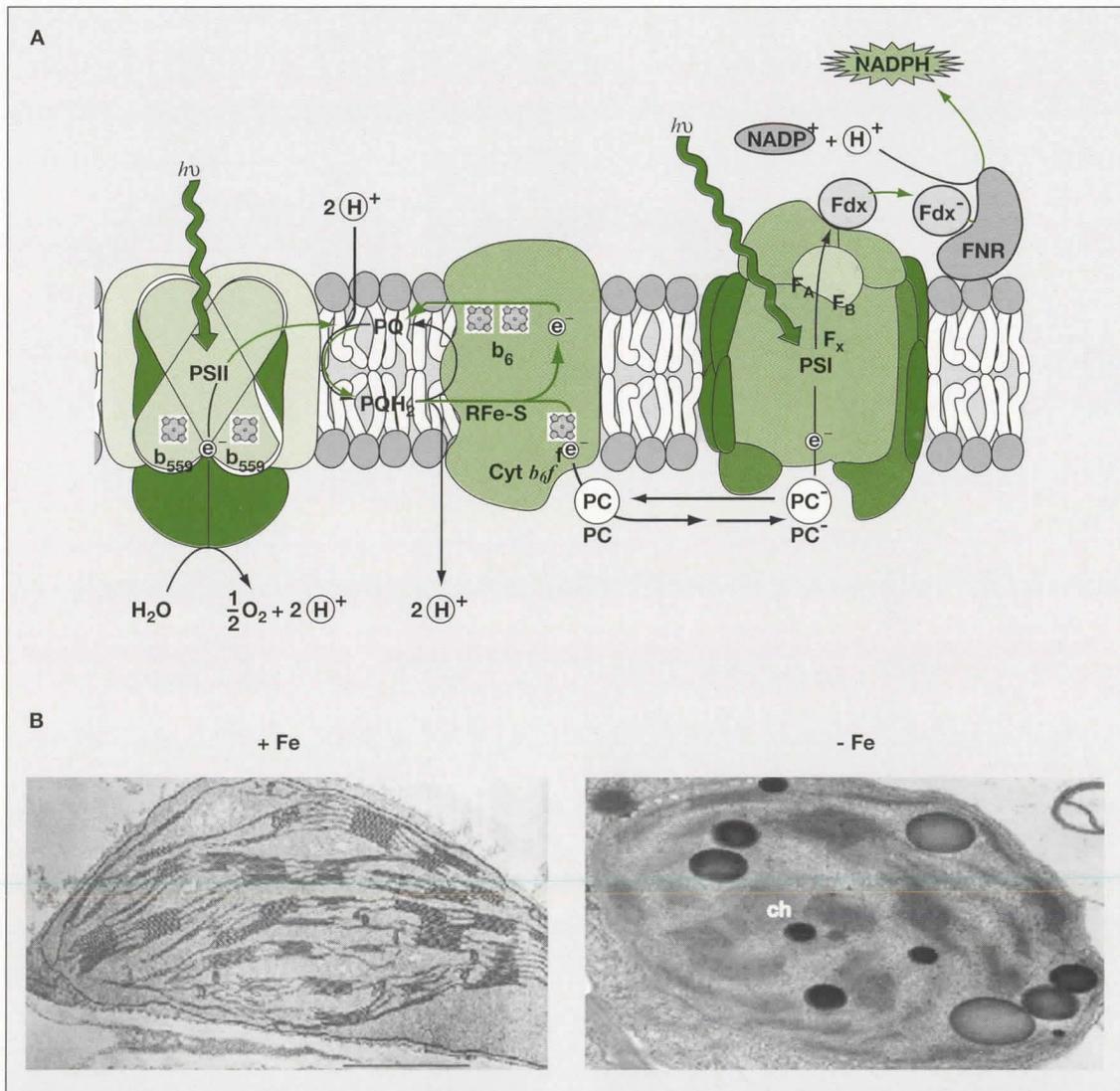


Figure 3. Importance du fer pour la structure et la fonction photosynthétique des chloroplastes.

A) Organisation de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons.

Trois complexes membranaires sont représentés : le photosystème II, le complexe cytochrome b_6/f , et le photosystème I. Le chemin suivi par les électrons est indiqué par la flèche verte. b_{559} : cytochrome b_{559} ; PQ : plastoquinone ; PQH₂ : plastoquinol ; RFe-S : protéine de Rieske ; b_6 : cytochrome b_6 ; f : cytochrome f ; PC : plastocyanine ; F_X : accepteur X ; F_A : accepteur A ; F_B : accepteur B ; Fdx : ferredoxine ; FNR : ferredoxin-NAD⁺ reductase. Les protéines de Rieske, F_X, F_A, F_B, et Fdx contiennent un centre Fe-S. (d'après [149]).

B) Images de microscopie électronique de chloroplastes de feuilles de plantes de tabac cultivées en présence (+ Fe) ou en absence (- Fe) de fer.

Figure 3. Iron requirements for the structure and photosynthetic function of chloroplasts.

sont les accepteurs d'électrons A, B et X associés au photosystème I et la protéine de Rieske associée au complexe cytochrome b_6/f .

Les protéines à centre fer-soufre, prépondérantes dans les processus de transfert d'électrons associés aux membranes de la mitochondrie ou du chloroplaste, possèdent également d'autres localisations intracellulaires et d'autres rôles tout aussi fondamentaux pour la cellule et pour l'organisme. La ferredoxine est une petite protéine à centre fer-soufre localisée dans le stroma des plastes. C'est un réducteur puissant permettant le transfert d'élec-

trons à différentes entités, chimiques ou biologiques. Ainsi, lors de la photosynthèse, la ferredoxine permet le transfert d'électrons vers le NADP, accepteur final de la photophosphorylation acyclique (figure 3). Elle fournit également des électrons à la nitrite réductase, la glutamine synthase, ainsi qu'à la GOGAT (glutamine α -cétoglutarate aminotransférase), enzymes plastidiales impliquées dans la voie d'assimilation du nitrate chez les végétaux. Chez les bactéries symbiotiques de type *Rhizobium*, la ferredoxine cède des électrons à la nitrogénase, protéine à centre fer-soufre possédant une

activité enzymatique, et permet ainsi la fixation de l'azote atmosphérique lors des symbioses *Rhizobium*-légumineuses [4]. L'assimilation de l'azote apparaît donc fortement dépendante des enzymes à centre fer-soufre.

Chez les eucaryotes, les aconitases, enzymes du cycle de Krebs catalysant la formation d'isocitrate à partir de citrate, sont des protéines à centre [4Fe-4S]. Par ailleurs, et dans certaines conditions, l'isoforme cytosolique de l'aconitase possède aussi un rôle régulateur de l'homéostasie du fer chez les mammifères. Ainsi, lors d'une carence en fer, l'aconitase cytosoli-

que perd son centre fer-soufre, entraînant la disparition de l'activité aconitase. Le changement de conformation associé à cette perte du centre fer-soufre permet la fixation de l'aconitase au niveau de séquences spécifiques d'ARN, et modifie ainsi l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez les mammifères [5]. Une carence en fer engendre une altération importante de la structure des mitochondries (*figure 2B*) et des chloroplastes (*figure 3B*).

Les hémoprotéines

Ces protéines possèdent un noyau tétrapyrrolique au centre duquel est encaissé un atome de fer. Lorsque l'atome de fer est sous la forme réduite, le groupement prosthétique est appelé hème, alors qu'il est appelé hémine lorsque l'atome de fer est sous la forme ferrique. Le fer est associé par quatre liaisons de coordination avec des atomes d'azote présents dans le noyau tétrapyrrolique. Le groupement hème est généralement lié de façon non covalente à la protéine. Néanmoins, dans certains cas, c'est le fer lui-même qui assure la liaison avec des acides aminés de la protéine comme l'histidine ou la méthionine, grâce aux deux orbitales atomiques restant disponibles [2]. Le fer, élément constitutif de l'hème, est incorporé au sein du noyau porphyrinique par une réaction catalysée par la ferrochélatase. Le fer est aussi directement impliqué dans différentes étapes de la voie de biosynthèse des noyaux porphyriniques, précurseurs des groupements hèmes et des chlorophylles.

Les cytochromes, principales hémoprotéines rencontrées chez les végétaux, sont des transporteurs d'électrons. Pour les mêmes raisons que les protéines à centre fer-soufre, les cytochromes constituent un composant majeur des chaînes de transfert d'électrons de la mitochondrie (cytochromes a, b, c) et du chloroplaste (cytochromes b et f) (*figures 2 et 3*). D'autres cytochromes sont indépendants des chaînes respiratoires et photosynthétiques, comme les cytochromes b du réticulum endoplasmique. Ainsi, les cytochromes b sont impliqués notamment dans le métabolisme des acides gras. Dans tous les cas, le fer passe successivement de l'état réduit à l'état oxydé au cours du transfert des électrons. Les cytochromes P450 possèdent, eux, une activité de type mono-oxygénase et sont impliqués dans un grand nombre de processus dans la plante : synthèse de composés tels que certains régulateurs de

croissance, détoxification de divers xénobiotiques...

D'autres protéines à hème importantes sont impliquées dans l'assimilation de l'azote. La nitrate réductase possède, outre un groupement hème, un groupement FAD et un atome de molybdène. Les électrons nécessaires à la réduction du nitrate proviennent du NAD(P)H et sont transportés selon les potentiels redox croissants par le FAD, le fer, puis le molybdène. Le nitrite ainsi produit sert alors de substrat à la nitrite réductase, enzyme à *cluster* fer-soufre mais aussi à hème qui réduit les nitrites en ions ammoniums. Comme cité précédemment, les électrons nécessaires à la réduction des ions nitrites proviennent de la ferrédoxine, une protéine fer-soufre.

Les peroxydases et catalases sont des hémoprotéines jouant un rôle fondamental chez les végétaux. En effet, elles participent à l'élimination d'entités chimiques dangereuses pour l'intégrité de la cellule : les espèces réactives de l'oxygène.

Autres protéines à fer

Cette classe de protéines se caractérise par la présence d'atome(s) de fer directement associé(s) à la protéine. La ribonucléotide réductase catalyse la réduction d'un ribonucléoside diphosphate en désoxyribonucléoside phosphate nécessaire lors de la phase S de la synthèse de l'ADN [6]. Chez *Escherichia coli*, la levure, et les mammifères, la ribonucléotide réductase contient deux atomes de fer réagissant avec une tyrosine impliquée dans la formation du site actif pour donner un radical tyrosyl nécessaire à la réaction catalytique [2]. Les lipoxygénases contiennent un atome de fer dont l'oxydation permet leur activation [7]. Elles catalysent l'oxydation des acides gras et participent à la synthèse de l'acide jasmonique chez les végétaux [8]. Parmi ces protéines à fer, les ferritines jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie du fer. En effet, les ferritines sont capables de stocker le fer sous une forme non toxique et remobilisable selon les besoins de la plante [9].

Conséquences métaboliques de la carence en fer

Les protéines à fer constituent la base de processus métaboliques majeurs chez les végétaux, notamment la photosynthèse (cytochromes et protéines fer-soufre de la chaîne de transport d'électrons du thy-

lakoïde, ferrédoxine), la respiration (cytochromes et protéines fer-soufre de la chaîne de transport de la membrane interne mitochondriale, aconitase et succinodéshydrogénase du cycle de Krebs), le métabolisme azoté (nitrate et nitrite réductase, glutamine synthase, nitrogénase bactérienne, ferrédoxine, ribonucléotide réductase) et soufré (sulfite réductase).

La carence en fer est donc susceptible d'affecter de tels processus physiologiques ainsi que d'autres voies métaboliques pour lesquelles cet élément est nécessaire, limitant de ce fait la croissance et le développement de l'organisme dans son ensemble. Les plantes possédant une concentration de fer inférieure à $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche dans leurs tissus sont considérées comme carencées [10]. Il est toutefois important de noter que la nutrition optimale des plantes dépend plus d'un rapport équilibré entre les différents éléments minéraux que de la concentration absolue de chacun de ces éléments considérés séparément.

Impacts de la carence en fer sur la photosynthèse

Le chloroplaste est un lieu majeur d'utilisation du fer chez les végétaux chlorophylliens puisqu'il contient 80 % du fer cellulaire [11]. Plus particulièrement, l'appareil photosynthétique contient 21-22 atomes de fer, ce qui représente l'un des processus cellulaires exigeant le plus de fer. De ce fait, le chloroplaste et l'activité photosynthétique constituent les principales cibles affectées lors d'une carence en fer. Le symptôme caractéristique d'une carence en fer chez les végétaux est une chlorose du limbe, particulièrement entre les nervures. On parle ainsi de chlorose internervaire. Cette chlorose est due à une diminution de la quantité de chlorophylles dans les parties aériennes des végétaux. Comme nous l'avons évoqué précédemment, malgré l'absence de composés contenant directement du fer, différentes étapes de la voie de biosynthèse des chlorophylles nécessitent la présence de ce métal (*figure 4*). Ainsi, dès le début de la voie de biosynthèse, la formation d'acide δ -aminolévulinique requiert du fer, sans que son rôle soit clairement identifié [12]. De même, le fer est nécessaire aux étapes d'oxydation du coproporphyrinogène III en protoporphyrinogène IX et de la conversion du Mg-protoporphyrine monométhyle ester en protochlorophyllide [13]. Enfin, la carence en fer provoque, chez le maïs et le citron, une augmentation de la dégradation des chlorophylles [14]. En parallèle,

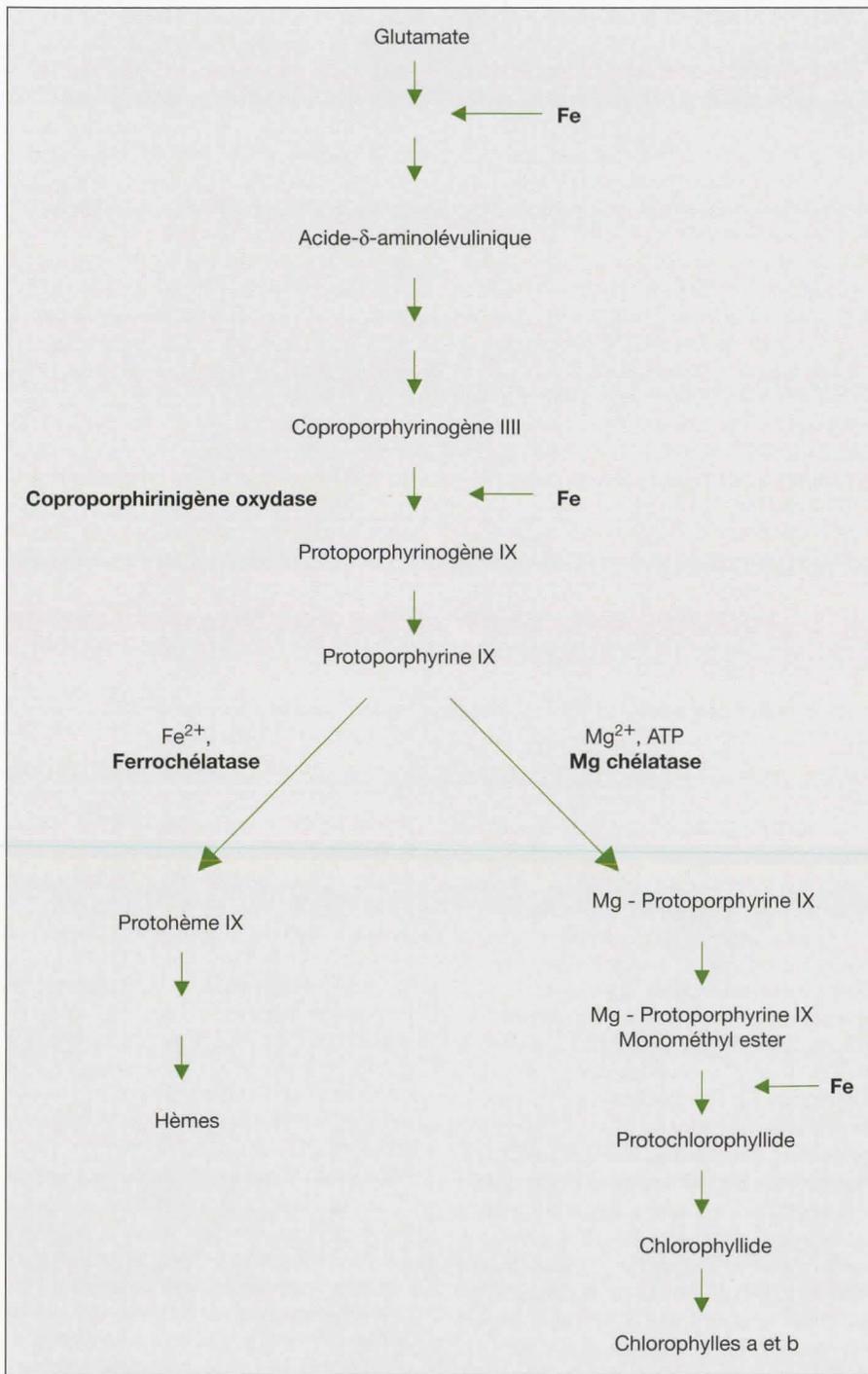


Figure 4. Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles et étapes faisant intervenir le fer.

Figure 4. Simplified flowchart of the tetrapyrrole biosynthetic pathway and of the various stages involving iron.

la carence en fer engendre une diminution de la quantité de caroténoïdes [15], expliquée par le fait que la phytoène désaturase requiert la présence de fer pour convertir le phytoène en β -carotène [16]. Les chloroplastes de cellules carencées en fer montrent une diminution de la

densité de thylakoïdes, principalement les grana, due à la réduction de la teneur en galactolipides [17]. De plus, la carence en fer provoque une baisse de la proportion en acides gras insaturés du chloroplaste, et plus particulièrement de la membrane des thylakoïdes [18, 19]. Cette

dernière observation peut être reliée au besoin de fer dans la conversion de l'acide linoléique en acide linoléique [20].

Outre la diminution des capacités d'absorption de la lumière due à la baisse de la teneur en pigments photosynthétiques et à l'altération de la structure des chloroplastes (figure 3B), la carence en fer provoque une diminution des capacités photochimiques. Ainsi, les capacités de transport des électrons des photosystèmes II et I sont réduites, de même que les teneurs en cytochrome b_{559} (composant du photosystème II), en cytochrome f, en P700 (centre réactionnel du photosystème I) et en ferrédoxine [21-23].

Enfin, l'activité de certaines enzymes du stroma impliquées dans la fixation du CO_2 est elle aussi affectée par la carence en fer. Principalement, l'activité et la teneur en RUBISCO [24, 25], ainsi que la quantité d'ARNm *rbcS* et *rbcL* sont nettement diminuées [26, 27]. De plus, la régénération du ribulose 1,5-bisphosphate dans le cycle de Calvin apparaît perturbée chez la betterave à sucre carencée en fer, due à la diminution de l'activité ribulose-5-phosphate kinase [25].

Impacts de la carence en fer sur la respiration

L'impact de la carence en fer sur des processus autres que la photosynthèse a été très peu étudié. Dans la mitochondrie, la carence en fer conduit à une réduction du nombre de crêtes et à un affaiblissement de la densité de la matrice (figure 2B), reflet d'une diminution de l'activité métabolique. Ces données ont été observées chez des mitochondries de racines de riz et de cellules d'étable en culture carencées en fer [28, 29]. Ces altérations de structure résultent d'une perte des protéines à fer et d'une altération du métabolisme lipidique de la mitochondrie [20].

Importance du fer pour la fixation symbiotique de l'azote

Les légumineuses forment des associations symbiotiques avec des bactéries du sol fixatrices d'azote de la famille des *Rhizobium*. Ces bactéries évolueront en bactéroïdes capables de réduire l'azote atmosphérique en ammonium, au sein du cytoplasme des cellules corticales du nodule, organe se développant au niveau de la racine en réponse à cette symbiose. Les micronutriments comme le fer sont essentiels pour l'activité des bactéroïdes et le développement du nodule. La demande

en fer augmente au cours de la symbiose [30] et une carence en fer limitera l'initiation et le développement nodulaire [31]. Le fer est utilisé pour la synthèse de protéines à fer tant au niveau des cellules végétales du nodule qu'au niveau des bactéroïdes. Côté plante, le fer constitue une part importante de l'hème de la leghémoglobine qui facilite la diffusion de l'oxygène au symbiosome. Les ferritines, protéine de stockage du fer, voient leur concentration augmenter dans les étapes précoces de la nodulation et décroître dans les nodules actifs fixateurs d'azote [32]. Côté bactéroïdes, de nombreuses protéines à fer sont impliquées dans la fixation de l'azote, incluant la nitrogénase et des cytochromes. Les mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer par les bactéroïdes au sein du nodule impliquent trois activités : (i) Fe(III) est transporté à travers la membrane pér bactéroidienne complexé à des acides organiques comme le citrate, pour s'accumuler dans l'espace péri-bactéroïdien [33, 34] où il se liera à des composés de type sidérophores bactériens [35] ; (ii) des Fe(III)-chélate réductases sont présentes sur la membrane pér bactéroidienne et l'import de Fe(III) dans des symbiosomes isolés est stimulé par le NADH [32] ; et (iii) le Fe(II) est également transporté à travers la membrane pér bactéroidienne [36], vraisemblablement par l'intermédiaire du transporteur GmDMT1 [37] appartenant à la famille des protéines NRAMP.

Autres conséquences associées à la carence en fer

Dans les feuilles de maïs et de radis, les activités phosphatase acide, ribonucléase et transaminase augmentent suite à une carence en fer, alors que les activités catalase, peroxydase, aldolase et amidon phosphorylase décroissent [38]. Des études menées avec des feuilles de canne à sucre montrent une réduction des activités catalase, peroxydase, succinate déshydrogénase, cytochrome oxydase, glycolate oxydase et α -amylase en réponse à la carence en fer [39]. Outre les activités catalase et peroxydase, d'autres activités enzymatiques impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène sont affectées. Ainsi, une diminution de l'activité d'une superoxyde dismutase à fer, expliquée par une baisse du taux de l'apoprotéine et un défaut d'accumulation du transcrit correspondant, a été observée chez le tabac suite à une carence en fer [40]. Enfin, une forte accumulation de l'ARNm lysyl-ARNt synthétase dans les

racines de tomate a également été observée en réponse à une carence en fer [41], suggérant une adaptation de la synthèse protéique en réponse à cette carence.

Enfin, lorsque la quantité de fer disponible n'est pas suffisante, une accumulation de métaux lourds tels que le zinc, le manganèse, le cuivre, le cobalt ou encore le cadmium et le plomb a été mesurée au niveau des racines et des parties aériennes de pois [42, 43]. Cette accumulation de métaux lourds nocifs pose un certain nombre de problèmes de santé publique car les végétaux constituent le principal point d'entrée de ces polluants dans la chaîne alimentaire.

Les perturbations métaboliques provoquées par la carence en fer sont donc importantes, et non encore toutes élucidées. Elles se traduisent dans les cas les plus sévères par une inhibition de la croissance [38, 44]. Le fer, élément constitutif de toutes cellules vivantes, apparaît ainsi essentiel. Toutefois sa présence dans la cellule peut poser un certain nombre de problèmes dus à ses propriétés physico-chimiques.

L'excès de fer libre : un danger pour la cellule

L'oxygène, tout comme le fer, est indispensable à la vie de tous les organismes aérobies. Cependant, il peut être à l'origine de radicaux libres extrêmement dangereux pour la cellule s'il ne subit qu'une réduction partielle. Cette réduction peut être le fait d'une chaîne de transport d'électrons respiratoire ou photosynthétique, d'une enzyme telle qu'une oxydase, ou enfin d'un ion métallique tel que le fer, le cuivre, le nickel, le molybdène ou le manganèse [45]. Le peroxyde d'hydrogène et les ions superoxyde ne représentent qu'un danger limité pour la cellule. En revanche, en présence de fer libre, ces intermédiaires oxygénés donnent naissance aux radicaux hydroxyles par le cycle de Fenton.

Ceux-ci sont à l'origine de la majorité des dommages cellulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène [46]. Les radicaux hydroxyles sont des molécules très instables possédant un électron célibataire non apparié. Ce dernier, en s'appariant avec un électron d'une molécule avoisinante revient à l'état fondamental. Les molécules lipidiques, par exemple, réagissant avec ces radicaux sont donc endommagées car oxydées, et forment des radicaux alkyles (R^{\bullet}) qui propagent à

leur tour la réaction radicalaire et causent des dommages à des lipides ou d'autres molécules. Parmi ces autres molécules, on compte notamment les protéines et les acides nucléiques [47, 48]. Ainsi, lorsque le fer libre est présent en trop grande quantité dans la cellule, il est toxique et menace l'intégrité cellulaire.

La protection des cellules face aux radicaux libres a lieu soit en favorisant leur élimination soit en limitant leur formation. Cette dernière éventualité concerne plus spécifiquement la chélation et le stockage du fer dans la plante et sera traitée plus loin. L'élimination des espèces réactives de l'oxygène met en jeu de nombreux procédés, enzymatiques ou non. Les superoxyde dismutases (SOD) constituent une protection majeure contre les radicaux libres et catalysent la dismutation des ions superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Différents types de SOD existent, selon la nature du métal au cœur du site actif et leur localisation intracellulaire [49, 50]. Les SOD à fer se retrouvent au niveau des chloroplastes et des peroxysomes chez les végétaux. Les SOD à manganèse sont localisées dans la matrice mitochondriale et dans les peroxysomes. Les SOD à cuivre ou à zinc se retrouvent dans le cytoplasme, le stroma des chloroplastes et dans les peroxysomes.

Les peroxydases agissent en catalysant l'oxydation de nombreux substrats (phénols, ascorbate, glutathion) par le peroxyde d'hydrogène. Les catalases sont des peroxydases particulières catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Elles sont localisées dans les peroxysomes, lieu intense de production de peroxyde d'hydrogène lors de la photorespiration.

Le système thiorédoxine est également impliqué dans la protection de la cellule face aux peroxydes. Ce système, bien caractérisé chez la levure, est composé de trois protéines : une peroxydase thiorédoxine dépendante, une thiorédoxine, et une thiorédoxine réductase [51].

Des mécanismes non enzymatiques permettant de piéger les radicaux libres existent également, empêchant la propagation rapide des réactions radicalaires. La vitamine E (α -tocophérol), le glutathion et les flavonoïdes piègent de façon stœchiométrique les radicaux hydroxyles. La vitamine A (rétinol) et les molécules telles que les β -carotènes vont piéger les radicaux hydroxyles de façon non stœchiométrique.

La nutrition en fer chez les végétaux supérieurs

Problématique de la nutrition en fer

Bien que relativement abondant dans les sols, le fer, avec l'azote et le phosphore, est l'un des trois éléments limitant le plus la croissance des végétaux. En milieu aérobie, le fer existe principalement sous sa forme oxydée, Fe^{3+} . Les ions Fe^{3+} possèdent une très faible solubilité lorsque leur concentration dépasse 10^{-18} M, et ils réagissent avec les ions HO^- pour former des précipités d'hydroxydes ferriques $Fe(OH)_3$ très peu solubles. La concentration optimale en fer requise pour une croissance optimale des plantes est de 10^{-9} M [1]. Les végétaux évoluent donc dans un environnement où la quantité réellement disponible en fer est très faible. L'évolution a, de ce fait, sélectionné chez les êtres vivants, et en particulier chez les plantes, des mécanismes spécifiques permettant d'acquérir le fer par solubilisation et transport successif. La faible solubilité du fer dans l'environnement explique aussi la difficulté de recourir à une fertilisation en cet élément. En effet, une telle fertilisation nécessite l'emploi de fer chélaté à des molécules organiques afin de le maintenir soluble. Le coût d'un tel traitement le restreint aux cultures à forte valeur ajoutée (vigne ; cultures maraichères et ornementales).

Physiologie de l'absorption du fer du milieu extérieur par les racines

L'absorption du fer chez les végétaux se déroule au niveau de l'épiderme et du cortex racinaire, surface d'échange entre le milieu extérieur, source de fer, et la plante. Ce milieu extérieur peut être la solution du sol, une solution nutritive, ou bien, à une échelle plus réduite, l'apoplasme, compartiment extracellulaire compris entre la membrane plasmique et la paroi pecto-cellulosique qui, comme nous le verrons plus tard, constitue un important moyen de stockage du fer. Le mouvement radial des ions et de l'eau depuis l'épiderme et le cortex racinaire vers la stèle peut emprunter trois trajets [52] : la voie apoplasmique, la voie symplasmique, ou bien un trajet mixte entre

les deux voies précédentes. Au-dessus de la zone de différenciation de la racine, le trajet apoplasmique est interrompu par une assise cellulaire, l'endoderme, dont les parois cellulaires sont imprégnées de lignine et de subérine. Ces composés hydrophobes constituent une barrière au passage des ions et des solutés appelée cadre de Caspari. De ce fait, dans les zones où un cadre de Caspari fonctionnel est présent, les ions et l'eau sont obligés de franchir cette barrière par une étape symplasmique, en amont de l'endoderme, avant d'être sécrétés dans la sève brute, en aval de l'endoderme [52]. Dans un premier temps, il convient donc de s'intéresser aux mécanismes d'absorption depuis le milieu extérieur.

De façon générale, les propriétés du fer font que sa solubilité, et donc sa disponibilité, est plus grande lorsque le milieu extérieur est pauvre en oxygène et son pH est acide. Ce sont donc les caractéristiques physico-chimiques du milieu extérieur qui vont déterminer, outre la quantité intrinsèque de fer, sa biodisponibilité.

Absorption en conditions non limitantes en fer

Pour les raisons évoquées précédemment, le fer est majoritairement dans le milieu extérieur sous sa forme oxydée, Fe^{3+} . Outre la précipitation d'hydroxydes ferriques, une partie du fer peut être maintenue en solution en présence de chélateurs naturels (silice, acides organiques, acides fulviques, sidérophores bactériens) ou artificiels (EDTA, EDDHA...¹). Dans des conditions non limitantes en fer, toutes les plantes acquièrent le fer sous sa forme Fe^{2+} après réduction des ions Fe^{3+} du milieu extérieur par une réductase « standard » présente sur la membrane plasmique de toutes les cellules végétales. Cette réduction intervient par transfert d'électrons à travers la membrane plasmique depuis le NAD(P)H cellulaire, et s'accompagne d'une excretion de protons ($1H^+/1e^-$) [53]. Puis, les ions Fe^{2+} sont importés à l'intérieur des cellules de la racine, suite à l'intervention de transporteurs situés sur la membrane plasmique des cellules périphériques, principalement l'épiderme [54].

Certaines conditions pédologiques favorisent la formation des ions Fe^{2+} . Ainsi, dans les sols réducteurs, c'est-à-dire les sols acides et/ou inondés, le fer est princi-

palement présent sous sa forme réduite. Il est ainsi directement importé par l'intermédiaire de transporteurs à l'intérieur des cellules de la racine. Ces conditions peuvent engendrer des risques de toxicité ferreuse par stress oxydatif. C'est ce qui est rencontré notamment chez le riz, où l'on observe un phénomène de *bronzing* [55].

Absorption en conditions limitantes en fer

De telles conditions de déficience en fer sont fréquentes dans les sols de pH neutre ou basique, et particulièrement dans le cas des sols calcaires. Ces derniers représentent plus du tiers des surfaces cultivables de notre planète. Dans ce cas, les plantes utilisent des systèmes d'acquisition du fer plus performants et inductibles par la carence en fer, associés à des modifications morphologiques, pour satisfaire leurs besoins en fer. L'efficacité de ces systèmes d'acquisition varie selon les géotypes considérés. Les plantes supérieures peuvent être séparées en deux groupes, selon la stratégie qu'elles utilisent pour acquérir le fer dans un milieu extérieur limitant en fer [9].

Les plantes développant une réponse nommée stratégie I sont les dicotylédones et les monocotylédones non graminées. Ces plantes, lorsque les conditions de nutrition en fer sont limitantes, montrent une acidification de la rhizosphère. L'activité H^+ -ATPase, responsable en partie de cette diminution du pH extracellulaire, assure l'énergisation du transport à travers la membrane plasmique et la solubilisation des chélateurs ferriques du sol (figure 5). Une diminution de 3 unités pH peut être observée en quelques heures [56]. L'acidification est la résultante d'une excretion accrue de protons provenant de l'activité H^+ -ATPase au niveau de la racine et de la sécrétion d'acides organiques, ces derniers favorisant également la chélation, et donc la solubilisation, du fer. L'acidification observée dans de telles conditions est un processus localisé à la partie apicale de la racine [10, 57]. Une fois les chélateurs ferriques solubilisés, la seconde étape propre à cette stratégie d'acquisition du fer est la réduction des ions Fe^{3+} en Fe^{2+} , assurée par une activité réductase membranaire inductible par la carence en fer. Cette réduction permet d'abaisser la constante de dissociation des complexes avec les ions Fe^{2+} , ce qui permet de dissocier ceux-ci et de les libérer pour leur prise en charge par des transporteurs spécifiques. Dans la plupart

¹ EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique ; EDDHA : acide éthylène diamine dilo-hydroxyphenyl acétique.

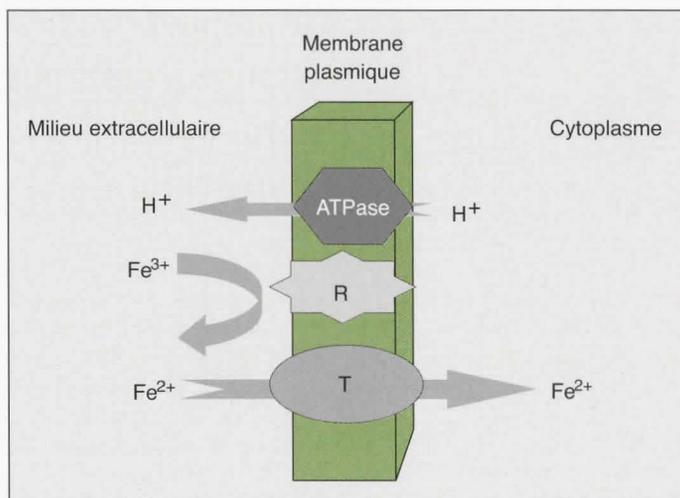


Figure 5. Stratégie d'acquisition du fer chez les dicotylédones et les monocotylédones non graminées (stratégie 1).

Les plantes développant des réponses à la carence en fer de type stratégie I acidifient le sol par excrétion de protons et absorbent les ions Fe^{2+} après une étape de réduction.
R : réductase ; T : transporteur.

Figure 5. Iron uptake strategy in dicotyledonous and non-grasses monocotyledonous plants (strategy 1).

des sols aérés, l'étape de réduction est le facteur limitant du processus d'acquisition du fer [58]. La réduction se produit au niveau des cellules épidermiques [59] de la zone subapicale [10, 42]. Parallèlement à ces phénomènes majeurs de réduction, la racine sécrète divers composés phénoliques (flavine, acide caféique) dans des conditions d'insuffisance en fer qui participeraient à la réduction, mais aussi à la chélation des ions Fe^{3+} , et donc à leur meilleure solubilisation [56, 60, 61]. Toutefois, la sécrétion de substances réductrices ne semble représenter qu'une part très limitée du pouvoir réducteur total de la racine [59]. Le fer est transporté sous sa forme Fe^{2+} à travers la membrane plasmique des cellules de la racine, par des transporteurs de fer inductibles par la déficience en fer.

Des travaux de mutagenèse fondés sur l'utilisation de l'éthylméthylsulfonate (EMS) chez *Arabidopsis thaliana* ont permis l'identification des mutants, appelés *frd1* (pour *ferric reductase defective*) ne montrant pas d'induction de l'activité de réduction des ions Fe^{3+} lors d'une carence en fer [62]. En revanche, les mutants *frd1* sont capables d'acidifier la rhizosphère, ce qui indique que les activités d'acidification et de réduction sont indépendantes. La mutation *frd1* est monogénique, récessive et se trouve localisée sur le chromosome 1.

Il existe par ailleurs un certain nombre de modifications morphologiques associées

à la croissance en milieu pauvre en fer chez les plantes non graminées, toutes ayant pour but d'augmenter les surfaces d'échange avec l'extérieur. Ainsi, en cas de carence en fer, on note une augmentation du nombre de racines latérales, une réduction de la distance entre elles, une diminution de leur longueur, et une augmentation du diamètre de la racine due à l'épaississement des cellules corticales [63]. Une augmentation de la quantité de poils absorbants et un épaississement du cortex racinaire sont aussi observés suite à une limitation en divers éléments minéraux, dont le fer. Deux types cellulaires alternent au niveau de l'épiderme racinaire : la lignée atrichoblastique et la lignée trichoblastique. Les poils absorbants apparaissent, selon un déterminisme génétique en voie d'élucidation, à la base de cellules de la lignée trichoblastique [64]. Des études pharmacologiques et génétiques ont mis en évidence la connexion entre le développement des poils absorbants et les hormones [65]. Des poils absorbants surnuméraires peuvent apparaître en position atrichoblastique lors d'une carence en fer [66, 67]. Le rôle des poils absorbants vis-à-vis de l'homéostasie du fer a toutefois été questionné à plusieurs reprises. Le mutant RM57 d'*A. thaliana*, dépourvu de poils absorbants, ne montre pas d'altération de l'activité réductase ferrique racinaire comparé à son sauvage [68]. De plus, l'utilisation de chélateurs a permis d'établir que

les poils absorbants apparaissent lors d'une carence sévère alors que l'induction de l'activité de réduction du fer intervient lors d'une carence modérée [69]. Ces observations ont amené certains auteurs à suggérer que les poils absorbants sont une simple conséquence de la chlorose induite par la carence en fer et qu'ils ne constitueraient pas la réponse primaire à la carence en fer.

Chez certaines espèces comme la tomate, le pois, le concombre, apparaissent suite à une carence en fer des structures originales, appelées cellules de transfert [70]. Ce type de modification morphologique s'observe au niveau des cellules associées aux vaisseaux, des cellules compagnes des tubes criblés, des synergides... Dans le cas d'une limitation de la nutrition en fer, les cellules de transfert apparaissent au niveau de l'épiderme racinaire. Ces cellules se caractérisent par une invagination de la paroi cellulaire formée de protubérances de type labyrinthique chez la tomate, et de type papillaire chez le pois [71]. Ces dépôts de parois sont constitués dans un premier temps de callose, puis sont remplacés par des pectines estérifiées et des xyloglucanes [72]. La forte augmentation de surface de la membrane plasmique, jusqu'à 250 fois, favorise les échanges pour assurer la nutrition en fer [73]. Les cellules de transfert possèdent une forte capacité d'efflux de protons [57], ainsi qu'une synthèse accrue d'acides organiques et une activation de la PEP carboxylase [73, 74]. La carboxylation du PEP permet, par la synthèse d'acides organiques, de rétablir le pH cytoplasmique alcalinisé par l'efflux massif de protons vers la rhizosphère. L'importante accumulation d'acide citrique pourrait augmenter l'activité isocitrate déshydrogénase du cycle de Krebs et ainsi fournir le pouvoir réducteur nécessaire à la réduction du fer. Ces acides organiques, impliqués aussi dans le transport du fer *in planta*, pourraient chélater les ions Fe^{2+} transportés dans le cytoplasme depuis la solution du sol, et ainsi prévenir tout risque de toxicité ferreuse.

Certaines plantes, comme le lupin par exemple, possèdent une autre particularité morphologique associée à la carence en phosphore et en fer : les racines en *cluster* [75]. Ce type de racine permet une augmentation de la surface d'échange avec le milieu extérieur et possède quelques particularités métaboliques permettant la solubilisation du fer.

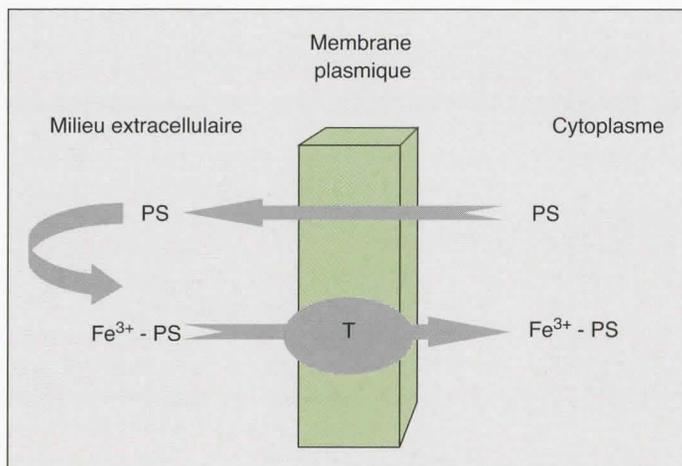


Figure 6. Stratégies d'acquisition du fer chez les monocotylédones graminées (stratégie 2).

Les plantes développant des réponses à la carence en fer de type stratégie 2 transportent les ions Fe^{3+} du sol sous formes de chélats avec les phytosidérophores.
PS : phytosidérophores ; T : transporteur.

Figure 6. Iron uptake strategy in grasses monocotyledonous plants (strategy 2).

Les graminées utilisent une stratégie totalement différente de ce qui est décrit ci-dessus, nommée stratégie 2, pour acquérir le fer du sol. Dans ce cas, la synthèse et l'excrétion de composés appelés phytosidérophores en conditions de limitation en fer remplace les phénomènes d'acidification et de réduction à l'œuvre dans le cas de la stratégie 1 [76] (figure 6). Les phytosidérophores identifiés à ce jour appartiennent tous à la famille des acides muginéiques, et sont dérivés d'un acide aminé particulier, la nicotianamine (NA). Les phytosidérophores possèdent une très forte affinité pour les ions Fe^{3+} qu'ils chélatent par l'intermédiaire de leurs groupements amine, carboxyle et hydroxyle. Des expériences de double marquage à l'aide de ^{59}Fe et de ^{14}C -phytosidérophore ont permis de montrer que le complexe phytosidérophore-métal était transporté dans la cellule [77]. La stratégie 2 assure aux plantes une meilleure résistance à la chlorose poussant sur des sols calcaires. En effet, les étapes biochimiques sensibles au pH et à la concentration en ions HCO_3^- (réduction) ne sont pas nécessaires à l'acquisition du fer par les racines.

La biosynthèse des acides muginéiques est intéressante car elle met en œuvre à la fois des processus communs aux dicotylédones et aux monocotylédones, et des processus propres aux plantes développant une réponse à la carence en fer de type stratégie 2. La première étape, catalysée par la nicotianamine synthase (NAS), permet la synthèse de NA par condensation de trois molécules de

S-adenosylméthionine (figure 7). La NA est donc un dérivé d'acide aminé non protéogène que l'on retrouve chez toutes les plantes et qui joue un rôle important dans l'homéostasie du fer chez les végétaux, comme nous le verrons plus tard. Les étapes suivantes de la biosynthèse des acides muginéiques sont propres aux graminées. La NA est déaminée sous l'action d'une nicotianamine aminotransférase, puis réduite en acide déoxymuginéique (DMA), phytosidérophore principal chez le maïs [78]. Les autres phytosidérophores identifiés chez les graminées sont produits par hydroxylations successives du DMA.

Deux mutants de maïs présentant des phénotypes de chlorose internervaire, appelés *ys1* et *ys3* (pour *yellow stripe*) ont été décrits. La mutation *ys3* est monogénique récessive et localisée sur le chromosome 3 [79]. Le mutant *ys3* possède un défaut d'excrétion des phytosidérophores dans la rhizosphère. Le mutant *ys1* a été plus largement étudié. La mutation *ys1* est, tout comme *ys3*, monogénique récessive et localisée sur le chromosome 5 du maïs. Cette mutation n'affecte pas la synthèse ni la sécrétion de phytosidérophores, mais le transport des complexes DMA-Fe à travers la membrane plasmique [80]. La protéine YS1 semble donc être le transporteur ou une de ses sous-unités, des complexes phytosidérophore-Fe. Le gène *YS1* a été récemment cloné [81] (voir paragraphe « Identité moléculaire des transporteurs de fer chez les plantes »).

Transport à longue distance et répartition du fer dans la plante

Une fois le fer transporté à l'intérieur de la racine, il doit être acheminé aux sites d'utilisation. Cela nécessite sa chélation quasi permanente pour éviter la précipitation et la dégradation des structures cellulaires, ainsi que des mécanismes de stockage et de régulation.

Les chélateurs de fer dans la cellule végétale

Une fois absorbé par la plante, le fer est complexé dans les cellules, en partie par des acides organiques pour limiter tout risque de toxicité ferreuse. Parmi ces acides organiques, les acides citrique et malique représentent les principaux vecteurs de fer.

La NA, précurseur direct de la synthèse des acides muginéiques, présent chez tous les végétaux supérieurs, est biochimiquement proche des phytosidérophores. Ainsi, la NA a la capacité de chélater les ions comme Fe^{2+} et Fe^{3+} [82, 83], ainsi que Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , et Zn^{2+} [82]. Considérant la stabilité du complexe associant la NA aux ions Fe^{2+} dans les conditions physiologiques, et la faible auto-oxydation du fer au sein de ce complexe, il semble que le complexe NA- Fe^{2+} soit prépondérant *in vivo* [83]. Les complexes associant la NA au fer sont des agents non Fentoniens, dans le sens où le fer ainsi complexé ne provoque pas de dommages oxydatifs dans la cellule.

Nos connaissances sur le rôle physiologique de la NA proviennent de l'étude d'un mutant de tomate auxotrophe pour la NA : le mutant *chloronerva (chl)*. La mutation *chl* se traduit par l'absence de NA due à une mutation ponctuelle dans le seul gène de tomate codant la NAS [89]. Le phénotype de telles plantes est relativement complexe et montre les multiples rôles attribués à la NA. Le mutant *chl* montre une chlorose internervaire des jeunes feuilles malgré une forte accumulation de métaux dont le fer, le manganèse, le zinc dans les feuilles matures et les racines, et une accumulation de cuivre dans les racines uniquement. Les grandes quantités de fer présentes au niveau des parties aériennes matures des plantes *chl*

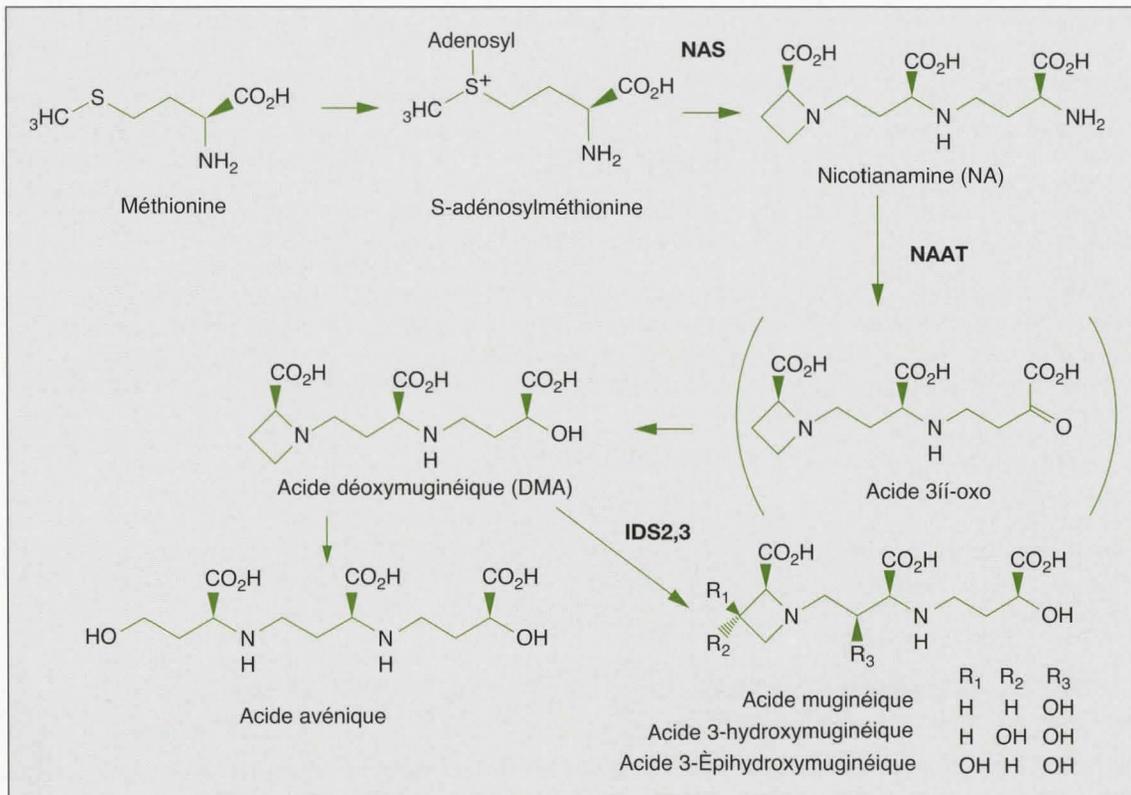


Figure 7. Voie de biosynthèse supposée des phytosidérophores membres de la famille des acides muginéiques.

NAS : nicotianamine synthase ; NAAT : nicotianamine aminotransférase.

Figure 7. Biosynthetic pathway of phytosiderophores of the mugineic acid family.

sont symplasmiques, sous forme de précipités dans le cytoplasme [85, 86]. Ainsi, en l'absence de NA, l'excès de fer précipite avec les ions phosphate pour former ces inclusions denses, empêchant tout risque de toxicité ferreuse. Cette observation a été imputée à la capacité de la NA à chélater et à maintenir le fer cellulaire sous une forme soluble.

Transport du fer dans les sèves

Une fois complexé à son entrée dans les cellules de l'épiderme et du cortex racinaire, le fer est conduit jusqu'à la stèle. Ce transport fait intervenir obligatoirement une étape symplasmique pour le franchissement de l'endoderme, du fait des dépôts de lignine et de subérine au niveau du cadre de Caspari. Cet acheminement du fer jusqu'aux éléments conducteurs s'effectue sous forme chélatée aux acides organiques ou bien à la NA. Le fer pénètre ensuite dans les cellules du parenchyme xylémien par diffusion simple et/ou drainage par le flux centripète

d'eau, conséquence de la transpiration. Après sécrétion dans l'apoplasme stélaire, le fer est transporté aux parties aériennes par le flux de sève brute. Une fois sécrété dans le xylème, le fer est transporté sous sa forme chélatée au citrate [87].

La croissance des végétaux repose sur la translocation des assimilats depuis les sites de production (organes sources : feuilles matures) jusqu'aux sites d'utilisation (organes puits : racines, feuilles non matures, organes de stockage) [88]. Ce transport à longue distance est assuré par le phloème, ensemble de cellules spécialisées dans la conduction de la sève élaborée. Des données biochimiques et physiologiques indiquent que la NA est un chélateur important des métaux dans la sève élaborée [89-91]. La constante d'affinité de la NA pour Fe, Zn, Mn, et Cu dans les conditions de concentrations et de pH de la sève élaborée suggèrent que ces métaux y circulent complexés à la NA et non au citrate [83]. De plus, il a été montré que la NA et ces métaux sont présents en quantité stoechiométrique proche de 1 : 1 dans la sève élaborée de *Ricinus commu-*

nis [90], confortant l'hypothèse d'un transport de ces métaux par la NA dans le phloème.

Toutefois, des expériences de dialyse de sève élaborée indiquent que les métaux sont complexés à des entités dont le poids moléculaire est plus élevé que celui produit avec la NA, suggérant que ces mêmes métaux seraient transportés par des polypeptides [92]. Très récemment, une protéine appelée ITP a été purifiée à partir d'exsudats de sève élaborée chez *Ricinus communis*, grâce à sa capacité à fixer des métaux [93]. Des études conduites *in vivo* et *in vitro* indiquent que ce sont préférentiellement les ions Fe³⁺, et très peu les ions Fe²⁺ qui sont fixés par la protéine ITP. L'ADNc ITP a été cloné à partir de micro-séquences de la protéine ITP, et son produit appartient à la famille des protéines LEA (*Late Embryogenesis Abundant*). L'ensemble de ces résultats est difficilement interprétable et pourrait laisser supposer un chargement du fer dans le phloème *via* la NA, suivi d'un échange du fer dans les tubes criblés vers un autre ligand, l'ITP.

Par ailleurs, une protéine de 31 kDa a été identifiée dans la sève élaborée de *Cucurbita maxima* par sa proximité immunologique avec des protéines de mouvements du virus de la mosaïque nécrotique du trèfle rouge telles RCNMV et CmPP16 [94]. Cette protéine phloémienne est la forme tronquée de la protéine CmPP36 de 36 kDa apparentée aux cytochromes b_5 réductase, et est localisée dans les cellules compagnes des tubes criblés. L'expression du gène *CmPP36* est activée lors d'une carence en fer. Les deux isoformes de cette protéine possèdent une activité de réduction des ions Fe^{3+} en présence de NADH. Le rôle d'une telle protéine dans l'homéostasie du fer reste à démontrer, mais sa découverte est particulièrement intéressante dans le cadre du transport du fer dans le phloème. En effet, un chargement de complexes NA-Fe, et un transport de complexes ITP-Fe nécessiterait une réduction des ions Fe^{3+} en Fe^{2+} pour libérer le fer de la protéine ITP, et donc une distribution du fer aux organes cibles par le phloème. La protéine CmPP36 phloémienne est un bon candidat pour jouer ce rôle.

Distribution du fer aux parties aériennes et utilisation

L'intervention d'une étape de réduction a été suggérée pour le déchargement du xylème, et donc la distribution du fer aux cellules du mésophylle [95]. Cependant, à la différence des racines, l'activité de réduction des ions ferriques dans les feuilles ne serait pas associée à l'excrétion de protons.

Les mécanismes de compartimentation du fer dans les organites sont très peu connus. Seule la caractérisation biochimique d'un transport d'ions Fe^{2+} dans le chloroplaste a été décrite [96]. Ce transport est inhibé par la présence d'ions Zn^{2+} , Mn^{2+} , et Cu^{2+} . Par ailleurs, la mitochondrie représente à l'heure actuelle le lieu majeur de synthèse des centres fer-soufre dans la cellule eukaryote [97]. Toutefois, chez les plantes, les chloroplastes contiennent des protéines connues pour leur rôle dans la biogenèse de *clusters* fer-soufre, indiquant que ces organites pourraient présenter une autonomie de synthèse de ces groupements prosthétiques [98, 99]. Des protéines apparentées au transporteur ABC ATM1p [100], nécessaire au transport de *clusters* fer-soufre des mitochondries vers le cytoplasme chez *Saccharomyces cerevisiae*, ont été

identifiées chez *A. thaliana*. L'une d'elles, STA1, pourrait être impliquée dans la distribution de *clusters* fer-soufre depuis la mitochondrie vers le cytoplasme [101].

Stockage du fer

Certaines conditions environnementales peuvent conduire à une absorption trop importante de fer depuis le sol. Cette sur-accumulation de fer dans les tissus nécessite des systèmes de stockage efficaces de cet élément sous une forme stable, afin d'éviter tout risque de toxicité liée à sa réactivité.

Stockage dans l'apoplasme

L'apoplasme est un lieu privilégié de stockage du fer, principalement au niveau du cortex racinaire. Le fer y est présent sous différentes formes. La nutrition nitrique entraîne une excrétion d'ions HO^- , aboutissant à la formation d'hydroxydes de fer. D'autre part, les ions phosphate ont la capacité de former des précipités de phosphate de fer dans l'apoplasme. Enfin, le fer se retrouve lié ioniquement aux groupements carbonate et hydroxyle présents au niveau des constituants de la paroi cellulaire comme les acides pectiques. Le fer ainsi stocké dans les racines ou les parties aériennes peut être ultérieurement utilisé par la plante lors de la mise en place des réponses physiologiques à la carence en fer. Ce phénomène provoque l'apparition de fer disponible pour la plante [102]. Ainsi, le stockage dans ce compartiment est associé à l'efficacité des plantes vis-à-vis de conditions limitantes en fer [103].

Outre le stockage proprement dit, l'apoplasme constitue un véritable tampon entre le sol et la cellule. Cela est particulièrement vrai dans des sols inondés où les ions Fe^{2+} prédominent. Ainsi, la précipitation de ces ions permet à la cellule de se protéger contre les effets délétères d'une toxicité ferreuse [104, 105].

Stockage intraplastidial : les ferritines

Les ferritines sont capables de stocker le fer ferrique sous une forme soluble, non toxique, et remobilisable selon les besoins de la cellule. Les ferritines se retrouvent de façon ubiquitaire chez les êtres vivants, excepté chez la levure [9], leur quantité étant accrue lors d'une surcharge en fer. Les ferritines animales sont localisées dans le cytoplasme et dans les plastides chez les végétaux [106]. Les ferritines sont toutes constituées de 24 sous-unités protéiques formant une sphère creuse au sein de laquelle s'élabore un cœur miné-

ral d'oxyhydrophosphate ferrique. Chaque protéine de ferritine peut stocker jusqu'à 4 500 atomes de fer. Des études *in vitro* ont montré que l'incorporation du fer dans la ferritine se fait après réduction du fer ferrique complexé par des chélats comme le citrate. Deux gènes, *ZmFer1* et *ZmFer2*, ont été clonés chez le maïs, et quatre gènes, *AtFer1-4*, chez *A. thaliana*. L'expression des ferritines a constitué un modèle d'étude, animal et végétal, de la régulation des gènes par le fer. Chez les animaux, la régulation de l'expression des gènes de ferritines est traductionnelle, et fait intervenir les régulateurs IRP1 et IRP2 [5]. Chez les végétaux, la quantité de ferritines varie au cours du développement [107]. Depuis, l'analyse de l'expression des gènes codant les différentes isoformes de ferritines a mis en évidence des régulations par différents facteurs développementaux et environnementaux, dont la surcharge en fer, le stress oxydatif et l'acide abscissique (ABA) [9].

Des études récentes ont permis d'identifier des séquences promotrices, appelées FRE (*Fe Response Element*) chez le soja [108] et IDRS (*Iron-Dependent Regulatory Sequence*) chez le maïs et *A. thaliana* [109]. Ces séquences sont impliquées dans la répression de l'expression des gènes *ZmFer1* et *AtFer1*, ainsi que du gène orthologue de soja, lors de conditions de carence en fer.

La vacuole : compartiment de stockage du fer ?

Pendant de nombreuses années, nos connaissances des modes de stockage du fer chez les végétaux se limitaient à la synthèse de ferritines dans les plastides d'une part, et à la présence de précipités du fer dans l'apoplasme, d'autre part. Les levures sont capables de se diviser pendant plusieurs générations dans un milieu totalement dépourvu de fer car elles ont la possibilité de stocker cet élément dans la vacuole sous une forme remobilisable pour la cellule [110]. Des gènes codant des transporteurs de fer ont été clonés chez *S. cerevisiae*, et leurs produits caractérisés comme étant impliqués dans l'influx [111] et l'efflux [112, 113] d'ions Fe^{2+} vacuolaire. Les premiers éléments en faveur d'un stockage du fer vacuolaire chez les végétaux proviennent de l'étude de la localisation sub-cellulaire de la NA. Cette molécule, nécessaire à la chélation et au maintien du fer sous une forme soluble dans la cellule, pourrait également jouer un rôle dans sa compartimentation dans la vacuole, ou elle se trouve localisée

lorsque des plantes sont traitées par un excès de fer [114]. Une cytochrome b5 réductase de maïs localisée sur le tonoplaste et impliquée dans la réduction du fer a été récemment identifiée [115]. Son rôle physiologique est inconnu, mais ouvre de nouvelles perspectives concernant les mécanismes assurant le maintien de l'homéostasie du fer chez les végétaux. Ainsi, il est concevable qu'un système de transport d'ions Fe^{2+} (d'influx et/ou d'efflux) existe aussi sur le tonoplaste. Une telle hypothèse est renforcée par la récente démonstration de la localisation du transporteur Nramp3 sur le tonoplaste des cellules végétales, et de l'induction de sa synthèse en réponse à la carence en fer [116].

Identité moléculaire des transporteurs de fer chez les plantes

Comme mentionné ci-dessus, l'étude de la physiologie du transport du fer chez les plantes a permis la mise en évidence de deux stratégies, selon les végétaux considérés. Pour les dicotylédones et les monocotylédones non graminées, le transport d'ions Fe^{2+} requiert une activité d'acidification et de réduction avant le transport proprement dit. Les données moléculaires actuelles indiquent que l'acidification du sol en condition de carence en fer résulterait probablement de l'activité d'un des douze membres de la famille AHA (*Arabidopsis* H^+ -ATPase) [117]. Des travaux récents ont permis d'identifier le gène codant la réductase ferrique impliquée dans la réduction du fer du sol. Le gène *FRO2* d'*A. thaliana* a été cloné par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par homologie avec les gènes codant les réductases ferriques *FRE1* et *FRE2* de la levure [118]. L'expression du gène *FRO2* est induite en réponse à la carence en fer dans les racines et sa fonction a été démontrée par complémentarité du mutant *frd1* d'*A. thaliana* déficient pour l'activité de réduction du fer. Le gène *PsFRO1* codant une réductase ferrique de pois a été très récemment cloné [119]. Il est exprimé dans les racines et dans les parties aériennes de plantes carencées en fer, indiquant un rôle global de cette réductase dans l'homéostasie du fer.

Transporteurs de la famille NRAMP

Des gènes codant les transporteurs de métaux NRAMP ont été identifiés depuis les bactéries jusqu'aux êtres humains. L'origine de la famille NRAMP remonte à l'identification du gène *NRAMP1*, dont la mutation confère à la souris une sensibilité accrue aux bactéries et a donné le nom à cette famille [120]. La fonction de membre de cette famille a été démontrée plus tard, par des études électrophysiologiques et génétiques. Ainsi, les membres DCT1/NRAMP2 et leurs homologues de levure, les protéines SMF, transportent un large spectre de cations divalents métalliques [121-124].

Chez les plantes, trois ADNc apparentés à la famille NRAMP ont été clonés chez *Oryza sativa*, mais aucune caractérisation fonctionnelle n'a été réalisée [125]. Le séquençage du génome d'*A. thaliana* a permis l'identification de six gènes membres de la famille NRAMP, appelés *AtNRAMP1-6*, et regroupés en deux sous-familles, l'une comprenant *AtNRAMP1* et *AtNRAMP6*, l'autre *AtNRAMP2-5*. L'implication de certains membres NRAMP d'*A. thaliana* dans le transport des métaux a été élucidée en système hétérologue et/ou *in planta*. L'expression des ADNc *AtNRAMP1*, 3, et 4 restaure la capacité de croissance de mutants de levure affectés dans le transport du fer et du manganèse [126, 127] et augmente la sensibilité d'une souche sauvage au cadmium [127]. Les transcrits *AtNRAMP1-3* d'une part, et *AtNRAMP4* d'autre part, sont détectés majoritairement dans les racines ou dans les parties aériennes respectivement [126, 127]. L'expression des gènes *AtNRAMP1*, 3 et 4 est induite par la carence en fer, alors que l'expression d'*AtNRAMP2* ne l'est pas [126, 127]. Le fait que la surexpression d'*AtNRAMP3* provoque une suraccumulation de fer lors d'un traitement par le cadmium, et que la surexpression d'*AtNRAMP1* confère une résistance accrue aux doses toxiques de fer confirme que ces membres sont impliqués dans l'homéostasie du fer *in planta*. Enfin, la surexpression d'*AtNRAMP3* augmente la sensibilité au cadmium présent dans le milieu, et une mutation affectant ce même gène améliore la résistance au cadmium, indiquant qu'*AtNRAMP3* pourrait transporter le cadmium chez *A. thaliana*. Les résultats les plus récents indiquent que la protéine *AtNRAMP3* est localisée sur le tonoplaste et serait impliquée dans la remobilisation du fer stocké dans la va-

cuole vers le cytoplasme lors d'une carence en fer [116]. De même, les protéines *AtNRAMP1* et *AtNRAMP6* possèdent un signal d'adressage dans les plastides. Nous avons vu précédemment qu'un transport d'ions Fe^{2+} , et probablement Zn^{2+} , Mn^{2+} , et Cu^{2+} existait au niveau de l'enveloppe interne des chloroplastes. Les transporteurs *AtNRAMP1* et *AtNRAMP6* représentent donc des candidats sérieux pour cette fonction.

Transporteurs de la famille ZIP

La caractérisation des transporteurs de fer de la famille ZIP chez les végétaux a débuté avec le clonage et la caractérisation de l'ADNc *IRT1* d'*Arabidopsis* en système hétérologue dans la souche mutante *fet3fet4* de *S. cerevisiae*, déficiente dans le transport haute et basse affinité du fer [128]. *IRT1* code une protéine de 339 acides aminés possédant huit segments transmembranaires putatifs.

L'expression de l'ADNc *IRT1* d'*A. thaliana* dans le mutant *fet3fet4* de *S. cerevisiae* provoque l'apparition d'une nouvelle activité de transport à haute affinité des ions $^{55}Fe^{2+}$. Ce transport d'ions $^{55}Fe^{2+}$ est inhibé lorsque des ions Cd^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , et Co^{2+} , sont présents dans le milieu réactionnel, évoquant la possibilité que la protéine *IRT1* soit également capable de transporter ces métaux. L'utilisation des mutants *zrt1zrt2* et $\Delta smf1$ de *S. cerevisiae*, respectivement déficients pour le transport du zinc et du manganèse, a permis de confirmer cette dernière observation. En effet, l'expression de l'ADNc *IRT1* dans ces souches provoque l'apparition d'influx à haute affinité d'ions Zn^{2+} , ou Mn^{2+} , toujours inhibés par la présence d'ions Co^{2+} et Cd^{2+} , mais non Cu^{2+} [129]. Enfin, l'expression de l'ADNc *IRT1* dans une souche sauvage de levure entraîne une sensibilité accrue au cadmium présent dans le milieu, indiquant que la protéine *IRT1* est également capable de transporter les ions Cd^{2+} [130].

Des études d'expression, réalisées par northern blot à partir d'ARN totaux extraits de plantes d'*A. thaliana* cultivées en conditions de carence métallique, montrent que la seule carence en fer provoque une forte induction de l'expression du gène *IRT1* dans les racines. *IRT1* apparaît donc comme un transporteur de fer racinaire induit par la carence en fer, et capable par ailleurs de transporter divers métaux dans ces mêmes conditions. Il est connu depuis longtemps que les plantes

carencées en fer accumulent dans leurs tissus des métaux lourds [42]. La caractérisation récente d'un mutant d'insertion ADN-T dans le troisième exon du gène *IRT1* a permis de démontrer que cette protéine était effectivement responsable du transport du fer, du zinc, du manganèse et du cadmium *in planta*, dans des conditions de déficience en fer. D'autre part, la localisation d'*IRT1* dans les couches cellulaires épidermique et du cortex de la racine, ainsi que sa localisation sur la membrane plasmique, démontrent qu'il s'agit du transporteur majeur responsable de l'acquisition du fer par les racines des dicotylédones [131, 132].

Des séquences similaires à *IRT1* ont été identifiées chez *A. thaliana* (*IRT2* et *IRT3*), chez la plante de la stratégie II *Oryza sativa*, et chez *S. cerevisiae*. Ces mêmes protéines de levure similaires à *IRT1* s'avèreront par la suite correspondre à *ZRT1p* et *ZRT2p*, respectivement les transporteurs à haute et à basse affinité de zinc chez *S. cerevisiae*. Ces protéines appartiennent à la famille des transporteurs de métaux ZIP (*ZRT-IRT1 related Protein*) [133]. Le transporteur *IRT2* est présent dans les mêmes territoires cellulaires qu'*IRT1* mais ne compense pas la mutation *irt1*. Il est capable de compléter la mutation *fet3fet4* de levure, est inductible par la carence en fer, mais son niveau d'expression est 100 fois inférieur à celui d'*IRT1* [134].

Les données actuelles de séquençage des génomes ont permis de montrer que la famille ZIP était formée d'au moins 85 membres, chez des organismes aussi variés que *Caenorhabditis elegans*, le trypanosome ou encore l'homme [135]. Les analyses de séquences des membres de la famille ZIP de divers organismes indiquent qu'ils possèdent tous huit segments transmembranaires putatifs, et une topologie identique avec les extrémités N- et C-terminales extracellulaires. Les protéines appartenant à cette famille possèdent de 326 à 425 acides aminés, différence due à un domaine variable entre les domaines transmembranaires III et IV. Cette portion contient un motif cytoplasmique, similaire au domaine putatif de fixation des métaux décrit chez les transporteurs appartenant à la famille CDF (*Cation Diffusion Facilitator*), riche en résidus histidine [136]. Les résidus histidine présents au sein des segments transmembranaires IV et V sont conservés chez les membres de la famille ZIP, et pourraient faire partie d'un site de fixation intramembranaire des métaux [133].

Une étude de mutagenèse dirigée d'*IRT1* a d'ailleurs permis d'identifier un certain nombre de résidus déterminants pour l'activité de transport et la spécificité de substrat dans la levure [130].

Transporteurs de la famille IREG

Divers travaux ont conduit au clonage de gènes impliqués dans l'efflux de fer chez les mammifères [137, 138] et chez le poisson zèbre [139]. Ces protéines sont localisées au niveau de la membrane basale des entérocytes, ainsi que dans d'autres tissus. L'expression des gènes correspondants est induite lors d'une privation de fer. Les produits de ces gènes seraient ainsi responsables de l'efflux dans la circulation générale du fer absorbé dans les entérocytes par *DCT1/NRAMP2*. Le séquençage du génome d'*A. thaliana* a permis d'identifier deux séquences homologues [137], nommées *AtIREG1* et *AtIREG2*. De façon très spéculative, ces deux protéines d'*A. thaliana* pourraient être impliquées dans l'efflux de fer depuis la cellule vers le milieu extérieur, ou vers un compartiment intracellulaire. Une perspective attrayante serait que de tels transporteurs d'efflux soient responsables de la sécrétion de fer dans le xylème.

Transporteurs de la famille YS-YSL

La mutagenèse du maïs par l'élément transposable *Ac/Ds* a permis d'isoler un mutant présentant le même phénotype de chlorose internervaire que le mutant spontané *ys1* de maïs. L'ADNc *YS1* a été cloné par criblage d'une banque d'ADNc de maïs provenant de racines carencées en fer, en utilisant une sonde génomique provenant de la région encadrant l'insertion du transposon dans le gène *YS1* [81]. Le produit du gène *YS1* possède dix à douze domaines hydrophobes, potentiellement transmembranaires. La protéine *YS1* est apparentée à la superfamille des OPT (*Oligopeptide Transporters*), décrite chez les bactéries et les champignons. Cela est cohérent avec le fait que la protéine *YS1*, comme nous le verrons ci-après, transporte des phytosidérophores. L'expression de l'ADNc *YS1* chez le mutant *fet3fet4* de levure restaure la croissance de celui-ci sur un milieu n'ayant pour source de fer que le complexe Fe-DMA. En accord avec les données physiologiques obtenues lors de la caractérisation du mutant *ys1* de maïs

[80], *YS1* est un transporteur de fer ferrique complexé à la molécule de phytosidérophore. L'expression du gène *YS1* est induite lors de la carence en fer, dans les racines et les parties aériennes, indiquant que la protéine correspondante jouerait un rôle, non seulement dans l'absorption, mais aussi dans la distribution des complexes fer-phytosidérophore dans la plante.

L'interrogation des bases de données montre l'existence d'une EST correspondant à un second gène *YS1* chez le maïs, ainsi que des séquences similaires chez d'autres espèces dont *A. thaliana*, plante développant des réponses de type stratégie I lors d'une carence en fer. *A. thaliana* possède huit gènes, nommés *ysL* (*ys1-Like*), dont les produits sont très similaires entre eux et à *YS1*. Ces protéines appartiennent à deux sous-familles distinctes phylogénétiquement, dont la première comprend *YSL1-3* et la seconde *YSL4-8*. Le fait que seules les graminées synthétisent et utilisent les phytosidérophores pour leur nutrition en fer pose la question du rôle de ces protéines *YSL* chez une plante dépendante de la stratégie 1 pour acquérir le fer par ses racines.

La NA, précurseur de la biosynthèse des acides muginéiques comme nous l'avons vu précédemment, est très semblable à ces derniers sur le plan de sa structure chimique (*figure 8 A et B*), et est présent chez tous les végétaux. Un certain nombre d'indications déjà évoquées suggèrent que cette molécule est impliquée dans l'homéostasie des métaux, dont le fer. Ainsi, les protéines *YSL* pourraient participer à la mobilisation des complexes NA-Fe entre les différents tissus, ou compartiments sub-cellulaires de la plante.

Régulation de l'absorption du fer chez les végétaux

La toxicité potentielle du fer ainsi que son importance pour le métabolisme impliquent l'existence d'une régulation très fine de l'homéostasie de ce métal. Toutefois, les mécanismes assurant la perception du statut en fer chez les végétaux, et permettant la régulation des gènes impliqués dans la réponse à la carence où à l'excès de fer sont peu connus.

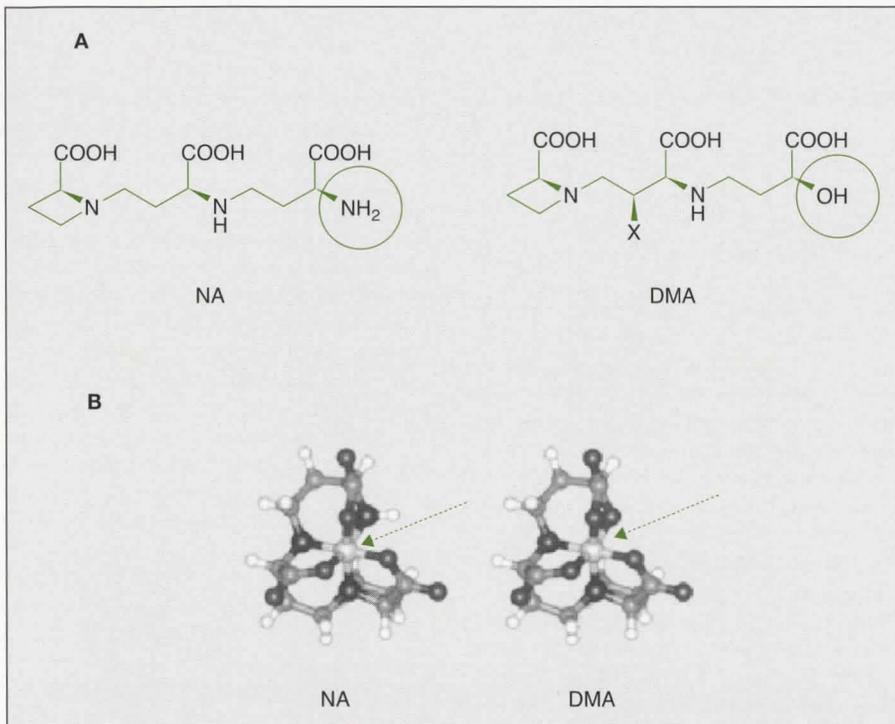


Figure 8. Structure chimique comparée de la nicotianamine et de l'acide déoxymuginéique.

A) Structure chimique de la NA et du DMA. B) Modélisation de la structure tri-dimensionnelle de la NA et du DMA. Les atomes de fer sont indiqués par la flèche en pointillés. Les groupements chimiques différents sont représentés par un cercle vert.

NA : nicotianamine ; DMA : acide déoxymuginéique (d'après [83]).

Figure 8. Comparative chemical structure of nicotianamine and deoxymugineic acid.

Mutants affectés dans la régulation de l'absorption du fer

Le mutant de tomate *chl*

Le phénotype des plantes *chl* comprend une dérégulation des activités de transport du fer. Outre une chlorose interveineuse, les plantes mutantes montrent une activation des réponses physiologiques et morphologiques à la carence en fer, même lorsqu'elles sont cultivées en sa présence. Parmi les dérégulations observées, on note une augmentation de l'excrétion de protons, une augmentation de l'activité réductase ferrique, une activité de transport de métaux accrue au niveau racinaire (Fe, Zn, Mn, Cu...), et une augmentation de l'apparition de poils absorbants [140]. Ainsi, les plantes *chl* présentent toutes les caractéristiques de plantes déficientes en fer, en même temps que des quantités de métaux, dont le fer, dans les parties aériennes deux à trois fois supérieures au cultivar de référence [140]. L'ensemble de ces observations est réversible par un apport exogène, dans le milieu, ou en pulvérisation foliaire, de

NA, mais non par l'apport de métaux, dont le fer. Ainsi, il apparaît que toutes les réponses à la carence en fer sont dérégulées chez les plantes *chl*. Cette incapacité à réguler ces mécanismes a conduit certains auteurs à suggérer que la NA était nécessaire à la signalisation du statut en fer [141, 142].

Les mutants de pois *brz* et *dgl*

Les mutants *brz* (*bronze*) et *dgl* (*degenerative leaflets*) se comportent comme des plantes cultivées en conditions de carence, même lorsqu'elles sont cultivées en présence de fer [143, 144]. De ce fait, ces plantes accumulent de grandes quantités de fer dans les parties aériennes, conduisant à un retard de croissance et à l'apparition de points nécrotiques. La mutation *brz* est localisée sur le chromosome 4 et n'est pas allélique à la mutation *dgl*. Ces mutants ont des capacités d'acidification, de réduction et de transport de fer accrues qui expliquent leur phénotype, mais ne présentent pas de mise en place des réponses morphologiques à la carence en fer.

Le mutant d'*A. thaliana* *frd3*

Le mutant d'*A. thaliana*, nommé *frd3* (*ferric reductase defective*), montre une activité réductase ferrique constitutive et une accumulation de métaux dans ses tissus. Ce mutant est allélique au mutant *man1* (*manganese accumulator*) [145], et montre par ailleurs une expression constitutive d'IRT1 [128]. Cette dernière observation explique la sur-accumulation de manganèse observée chez *man1*. De plus, *frd3* présente une activation constitutive des activités d'acidification et de réduction caractéristiques des plantes de la stratégie 1, quel que soit le statut en fer de la plante [146]. Le gène *frd3* code un transporteur de la famille MATE (*Multi-drug and Toxin Efflux*) exprimé dans la racine d'*A. thaliana*.

Les protéines MATE transportent de nombreux solutés depuis les bactéries jusqu'à *A. thaliana*. FRD3 pourrait être impliquée dans le transport d'une molécule jouant un rôle dans la signalisation du statut en fer aux racines. Toutefois, aucune donnée concernant la nature du substrat de FRD3 et sa localisation tissulaire dans la racine n'est disponible.

Le mutant de tomate *fer*

Le mutant de tomate T3238*fer* (*fer*) est chlorotique et totalement incapable de mettre en place les réponses à la carence en fer caractéristiques de la stratégie 1 [147]. Ainsi, en cas de carence en fer, les plantes *fer* ne développent pas de cellules de transfert, et ne stimulent pas l'excrétion de protons ni l'activité de réduction des ions Fe^{3+} . Les plantes *fer* se développent normalement, uniquement lorsque les plantes sont cultivées en présence d'une grande quantité de fer, ou greffées sur des racines de type sauvage. Le clonage récent du gène *fer* indique qu'il code un facteur de transcription à domaine bHLH, exprimé dans le cylindre central de l'apex racinaire et dans l'épiderme des zones plus âgées de la racine [148].

Signalisation du statut en fer chez les végétaux

Les premiers éléments concernant la régulation des réponses à la carence indiquent que les racines contrôlent les activités d'acidification, de réduction, ainsi que l'apparition des poils absorbants. En effet, les plantes de pomme de terre développées à partir des yeux présents sur un tubercule, et dont les parties aériennes ont été éliminées montrent toujours les

réponses tant physiologiques que morphologiques à la carence [149]. Toutefois, des expériences de greffes réciproques utilisant le mutant sur-accumulateur de fer *dgl* avec son cultivar sauvage ont été réalisées afin d'appréhender l'origine des signaux régulant l'activité réductase ferrique des racines chez le pois [150]. Les greffes de parties aériennes *dgl* sur le système racinaire sauvage entraînent l'apparition d'une activité réductase ferrique racinaire constitutive.

Les auteurs ont émis l'hypothèse que la mutation *dgl* autoriserait la transmission d'un signal, depuis les parties aériennes jusqu'aux racines, provoquant l'induction de l'activité de réduction du fer lors d'une carence. Des résultats similaires reposant sur des expériences de *split-root*, dans lesquelles une partie seulement du système racinaire est soumise à une carence en fer, montrent que l'activité réductase ferrique est induite dans le compartiment où le fer est toujours présent [70, 151].

En revanche, l'apparition de cellules de transfert et/ou des poils absorbants se produit dans le compartiment où le fer est absent. Ainsi, il semble que les réponses physiologiques soient sous le contrôle de signaux provenant des parties aériennes, alors que les réponses morphologiques répondent à des signaux locaux. Des données moléculaires récentes confortent cette intégration de signalisations locale et longue distance pour réguler le système d'acquisition du fer chez *Arabidopsis thaliana* [152].

En analysant la cinétique d'expression des gènes *IRT1* et *FRO2* pendant la récupération d'une carence en fer de plantes d'*Arabidopsis* dans des conditions où l'on fait varier les concentrations de fer apoplastique des racines, il a été montré que le fer lui-même constituait un signal local pour l'expression d'*IRT1* et de *FRO2*. Cette activation de l'expression se produit dans les douze heures qui suivent l'ajout de fer après une carence, et est suivie par une répression rapide. La présence locale de fer au niveau des racines après une période de carence n'est cependant pas suffisante pour induire l'expression des gènes *FRO2* et *IRT1*.

En effet, des expériences de *split-root* ont permis de montrer l'existence d'un signal provenant des parties aériennes, dominant sur le signal fer local. Cette signalisation longue distance informe le système racinaire du statut en fer des plantes et potentialise les effets du fer en tant qu'inducteur local.

Intervention des hormones dans la réponse à la carence ?

Une stimulation de la synthèse d'éthylène et d'auxine a été observée lors d'un épisode de carence en fer chez les plantes de la stratégie I et II [63, 153, 154]. La surcharge en fer, en revanche, provoque une accumulation d'ABA chez le maïs [155]. Des études biochimiques indiquent que les enzymes ACC oxydases ACO1-3 de tomate, et 9-cis-époxy-caroténoïde dioxygénase clonée à partir du mutant *vp14* de maïs, respectivement impliquées dans les voies de biosynthèse de l'éthylène et de l'ABA, requièrent du fer pour leur activité [156, 157]. Le fait que l'activité ACC oxydase nécessite du fer est en accord avec la diminution d'activité ACC oxydase lors d'une carence en fer [158].

Diverses études physiologiques plaident pour une implication des hormones dans la mise en place des réponses physiologiques à la carence en fer. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse ou d'action de l'éthylène provoque une diminution de l'activité réductase ferrique lors d'une carence en fer, alors qu'un traitement par l'acide 1-aminocyclopropane carboxylique (ACC) entraîne une augmentation de ce type de réponse physiologique lors d'une suffisance en fer [154, 159]. De même, un traitement par l'acide 2,3,5-triiodobenzoïque, inhibiteur du transport polaire de l'auxine depuis les parties aériennes jusqu'aux racines, provoque l'absence d'acidification de la rhizosphère. Une étude chez l'orge souligne l'implication de l'éthylène dans l'absorption des phytosidérophores [42]. Toutefois, l'application d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), analogue de l'auxine, ne provoque qu'une augmentation très modérée de l'activité de réduction des ions ferriques lors d'une suffisance en fer chez *Plantago lanceolata* [70].

Les outils de génétique n'ont pas permis de confirmer ou d'infirmer ces résultats contradictoires. En effet, les réponses physiologiques à la carence en fer s'établissent normalement dans des mutants d'*A. thaliana* affectés dans la synthèse, la perception, ou les signalisations hormonales [67].

Le même type d'approche a, en revanche, permis d'impliquer les hormones dans les modifications morphologiques consécutives à une carence en fer. Ainsi, l'application d'auxine, d'éthylène et d'ABA mime l'action d'une carence en provoquant l'apparition de poils absorbants et, ex-

cepté pour l'ABA, de cellules de transfert [66, 70, 158, 160]. De plus, les plantes sauvages traitées par l'ACC, et les mutants *eto* (surproducteur d'éthylène) et *ctr1* d'*Arabidopsis* (montrant constitutivement les réponses à l'éthylène) développent des poils absorbants ectopiques, comme lors d'une carence en fer, ce qui suggère encore une fois que l'éthylène est impliqué dans la transduction de l'information conduisant à l'apparition des poils absorbants en carence en fer [66]. Une étude fine concernant l'apparition des poils absorbants chez différents mutants de voies hormonales, lors de carence en fer ou en phosphore, a permis d'établir une voie de signalisation dépendante principalement de l'éthylène et aboutissant au développement des poils absorbants lors de la limitation en fer [71].

Le dernier élément montrant une relation entre les hormones et l'homéostasie du fer provient de l'étude des ferritines. En effet, une voie d'activation de l'expression de ferritine par le fer est dépendante de l'ABA. Des analyses génétiques fondées sur l'utilisation du mutant *vp2*, affecté dans la biosynthèse de l'ABA, montrent que l'induction de l'expression de gène de ferritines lors d'un excès de fer est perturbée dans ce mutant [155].

Conclusion

Une quantité importante d'information a été obtenue ces cinq dernières années concernant la caractérisation moléculaire des transporteurs impliqués dans le transport du fer chez les plantes. En particulier l'analyse des gènes *FRO2*, *IRT1* et *YS1*, a permis de comprendre les voies d'entrée de ce métal dans les racines. Plusieurs candidats appartenant à diverses familles de gènes constituent des éléments potentiels importants pour le transport longue distance du fer et pour sa compartimentation sub-cellulaire dans divers organites. Les futurs enjeux concernent la caractérisation de l'ensemble de ces transporteurs et la compréhension des mécanismes de leur régulation en réponse au statut nutritionnel en fer des plantes. De telles régulations opèrent en intégrant des voies de signalisation locales et des transport de signaux sur de longues distances, en particulier entre les parties aériennes et les racines. Enfin, déterminer comment ces activités de transport et ces événements de signalisation sont liés au stockage du fer et à son utilisation pour les besoins du

métabolisme sera très important pour comprendre les bases moléculaires de l'homéostasie du fer chez les plantes ■

Références

1. Guerinot ML, Yi Y. Iron : nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol* 1994 ; 104 : 815-20.
2. Karlin KD. Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science* 1993 ; 261 : 701-8.
3. Karp G. *Biologie Cellulaire et Moléculaire*. Bruxelles : De Boeck Université, 1998 : 177-240.
4. Kim J, Rees DC. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* 1992 ; 257 : 1677-82.
5. Hentze M, Kuhn L. Molecular control of vertebrate iron metabolism : mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 8175-82.
6. Reichard P. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases ? *Science* 1993 ; 260 : 1773-7.
7. Siedow JN. Plant lipoxygenase : structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991 ; 42 : 145-88.
8. Bell E, Creelman RA, Mullet JE. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 8675-9.
9. Briat JF, Lobreaux S, Grignon N, Vansuyt G. Regulation of plant ferritin synthesis : how and why ? *Cell Mol Life Sci* 1999 ; 56 : 155-66.
10. Marschner H, Romheld V, Kissel M. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J Plant Nutr* 1986 ; 9 : 3-7.
11. Smith BN. Iron in higher plants : storage and metabolic role. *J Plant Nutr* 1984 ; 7 : 759-66.
12. Pushnik JC, Miller GW, Manwaring JH. The role of iron in higher plant chlorophyll biosynthesis, maintenance and chloroplast biogenesis. *J Plant Nutr* 1984 ; 7 : 733-58.
13. Spiller SC, Castelfranco AM, Castelfranco PA. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol* 1982 ; 69 : 107-11.
14. Terry N, Zayed AM. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency. In : Abadia J, ed. *Iron nutrition in soil and plants*. Dordrecht (Netherlands) : Kluwer Academic Publishers, 1995 : 283-94.
15. Val J, Monge E, Heras L, Abadia J. Changes in photosynthetic pigments composition in higher plants as affected by iron nutrition status. *J Plant Nutr* 1987 ; 10 : 995-1001.
16. Pascal N, Block MA, Pallett KE, Joyard J, Douce R. Inhibition of carotenoids biosynthesis in sycamore cells deprived of iron. *Plant Physiol Biochem* 1995 ; 33 : 97-104.
17. Nishio JN, Taylor SE, Terry N. Changes in thylakoid galactolipids and proteins during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiol* 1985 ; 77 : 705-11.
18. Abadia A, Ambrad-Bretteville F, Rémy R, Trémoulières A. Iron deficiency in pea leaves : effect on lipid composition and synthesis. *Physiol Plant* 1988 ; 72 : 713-7.
19. Monge E, Perez C, Pequerul A, Madero P, Val J. Effect of iron chlorosis on mineral nutrition and lipid composition of thylakoid biomembrane in *prunus persica* (L.) Batsch. *Plant Soil* 1993 ; 154 : 97-102.
20. Pascal N, Dorne, AJ. Inhibition of fatty acid desaturation in sycamore cells deprived of iron. *FEBS Lett* 1994 ; 353 : 95-8.
21. Stocking CR. Iron deficiency affects the structure and the physiology of maize chloroplasts. *Plant Physiol* 1975 ; 55 : 626-31.
22. Spiller SC, Terry N. Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiol* 1980 ; 65 : 121-5.
23. Sharma S, Sanwal GG. Effect of iron deficiency on the photosynthetic system of maize. *Plant Physiol* 1992 ; 140 : 527-30.
24. Terry N. Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo. *Plant Physiol* 1980 ; 65 : 114-20.
25. Arulanantham AR, Rao IM, Terry N. Limiting factors in photosynthesis. IV. Regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate limits photosynthesis at low photochemical capacity. *Plant Physiol* 1990 ; 93 : 1465-75.
26. Spiller SC, Kaufman LS, Thompson WF, Briggs WR. Specific mRNA and rRNA levels in greening pea leaves during recovery from iron deficiency. *Plant Physiol* 1987 ; 84 : 409-14.
27. Winder TL, Nishio JN. Early iron deficiency stress response in leaves of sugar beet. *Plant Physiol* 1995 ; 108 : 1487-94.
28. Mori S, Nishizawa N, Hayashi H, Chino M, Yoshimura E, Ishihara J. Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency ? In : Chen Y, Hadar Y, eds. *Iron nutrition in soil and plants*. (Netherlands) : Kluwer Academic Publishers, 1991 : 175-88.
29. Pascal N, Douce R. Effect of iron deficiency on the respiration of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. *Plant Physiol* 1993 ; 103 : 1329-38.
30. Tang C, Robson AD, Dilworth MJ. A split root experiment shows that iron is required for nodule initiation in *Lupinus augustifolius* L. *New Phytol* 1990 ; 115 : 61-7.
31. O'Hara GW, Dilworth MJ, Boonkerd N, Parkian P. Iron deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium* sp. *New Phytol* 1988 ; 108 : 51-7.
32. Ragland M, Theil EC. Ferritin (mRNA, protein) and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Mol Biol* 1993 ; 21 : 555-60.
33. Levier K, Day DA, Guerinot ML. Iron uptake by symbiosomes from soybean root nodules. *Plant Physiol* 1996 ; 111 : 893-900.
34. Moreau S, Meyer JM, Puppo A. Uptake of iron by symbiosomes and bacteroids from soybean nodules. *FEBS Lett* 1995 ; 361 : 225-8.
35. Wittenberg JB, Wittenberg BA, Day DA, Udvardi MK, Appleby CA. Siderophore-bound iron in the peribacteroid space of soybean root nodules. *Plant Soil* 1996 ; 178 : 161-9.
36. Moreau S, Day DA, Puppo A. Ferrous iron is transported across the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta* 1998 ; 207 : 83-7.
37. Kaiser BN, Moreau S, Castelli J, Thomson R, Lambert A, Bogliolo S, Puppo A, Day DA. The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *Plant J* 2003 ; 35 : 295-304.
38. Agarwala SC, Sharma CP, Farooq S. Effect of iron supply on growth, chlorophyll, tissue iron and activity of certain enzymes in maize and radish. *Plant Physiol* 1965 ; 40 : 493-9.
39. Naik GR. Inactive iron in sugarcane leaves and its influence on enzymatic reactions in chloroplast metabolism. *J Plant Nutr* 1984 ; 7 : 785-98.
40. Kurepa J, Herouart D, Van Montagu M, Inze D. Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments. *Plant Cell Physiol* 1997 ; 38 : 463-70.
41. Giritch G, Herbig A, Balzer HJ, Ganai M, Stephan UW, Baumlein H.) A root specific iron regulated gene of tomato encodes a lysyl-tRNA-synthetase-like protein. *Eur J Biochem* 1997 ; 244 : 310-7.
42. Welch RM, Norvell WA, Schaefer SC, Shaff JE, Kochian LV. Induction of iron (III) and copper (II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status : does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake. *Planta* 1993 ; 190 : 555-61.
43. Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol* 1998 ; 116 : 1063-72.
44. Laulhère JP, Alquier-Bouffard A. La biodisponibilité du fer et la chlorose. *Physiol Veg* 1969 ; 7 : 277-96.
45. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989 ; 58 : 79-110.
46. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview. *Methods Enzymol* 1990 ; 186 : 1-85.
47. Davies KJ A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I : General aspects ; II : Modification of amino acids ; III : Modification of secondary and tertiary structure ; IV : Degradation of denatured protein. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 9895-920.
48. Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 1996 ; 19 : 651-8.
49. Bowler C, Slooten L, Vandenbranden, et al. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* 1991 ; 10 : 1723-32.
50. Alscher RG, Erurtuk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 2002 ; 53 : 1331-41.
51. Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 27670-8.
52. Clarkson DT. Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Philos Trans R Soc London* 1993 ; 341 : 5-17.
53. Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, et al. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol Cell* 1995 ; 84 : 69-81.
54. Fox TC, Shaff JE, Grusak MA, et al. Direct measurement of ⁵⁹Fe-labeled Fe²⁺ influx in roots of *Pisum sativum* using a chelator buffer system to control free Fe²⁺ in solution. *Plant Physiol* 1996 ; 111 : 93-100.
55. Ponnampereuma FN, Bradfield R, Peech M. Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. *Nature* 1955 ; 175 : 275.

56. Bienfait HF. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *J Bioenerg Biomembr* 1985 ; 17 : 73-83.
57. Romheld V, Müller C, Marschner H. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol* 1984 ; 76 : 603-6.
58. Grusak MA, Welch RM, Kochian LV. Does iron deficiency in *Pisum sativum* enhance the activity of the root plasmalemma iron transport protein. *Plant Physiol* 1990 ; 94 : 1353-7.
59. Buckhout TJ, Bell PF, Luster DG, Chaney RL. Iron-stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is localized on the plasma membrane. *Plant Physiol* 1989 ; 90 : 151-6.
60. Romheld V, Marschner H. Mechanism of iron uptake by peanut plants. I. FeIII reduction, chelate splitting, and release of phenolics. *Plant Physiol* 1983 ; 71 : 949-54.
61. Susin S, Abian J, Sanchez-Baeza F, et al. Riboflavin 3'- and 5'-sulfate, two novel flavins accumulating in the roots of iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris*). *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 20958-65.
62. Yi Y, Guerinot ML. Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J* 1996 ; 10 : 835-44.
63. Romheld V, Marschner H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Adv Plant Nutr* 1986 ; 2 : 155-204.
64. Dolan L. How and where to build a root hair. *Curr Opin Plant Biol* 2001 ; 4 : 550-4.
65. Masucci JD, Schiefelbein JW. Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the Arabidopsis root. *Plant Cell* 1996 ; 8 : 1505-17.
66. Schmidt W, Schikora A, Pich A, Bartels M. Hormones induce an Fe-deficiency-like root epidermal cell pattern in the Fe-inefficient tomato mutant *fer*. *Protoplasma* 2000 ; 213 : 67-73.
67. Schmidt W, Tittel J, Schikora A. Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* 2000 ; 122 : 1109-18.
68. Moog PR, Kooij TA, Bruggemann W, Schiefelbein JW, Kuiper PJC. Responses to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana*: the Turbo iron reductase does not depend on the formation of root hairs and transfer cells. *Planta* 1995 ; 95 : 505-13.
69. Chaney RL, ChenY, Green CE, et al. Root hairs on chlorotic tomatoes are an effect of chlorosis rather than part of the adaptive Fe-stress response. *J Plant Nutr* 1992 ; 15 : 1857-75.
70. Schmidt W, Bartels M. Formation of root epidermal transfer cells in *Plantago*. *Plant Physiol* 1996 ; 110 : 217-25.
71. Schmidt W, Schikora A. Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. *Plant Physiol* 2001 ; 125 : 2078-84.
72. Dahiya P, Brewin NJ. Immunogold localization of callose and other cell wall component in pea nodule transfer cells. *Protoplasma* 2000 ; 214 : 210-8.
73. Landsberg EC. Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response mechanism of *Capsicum annuum* L. *Plant Physiol* 1986 ; 82 : 511-7.
74. Rabotti G, De NisiP, Zocchi G. Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in cucumber roots. *Plant Physiol* 1995 ; 107 : 1195-9.
75. Neumann G, Martinoia E. Cluster roots-an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci* 2002 ; 7 : 162-7.
76. Ma J, Nomoto K. Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiol Plant* 1996 ; 97 : 609-17.
77. von Wiren N, Marschner H, Romheld V. Uptake kinetics of iron-phytosiderophores in two maize genotypes differing in iron efficiency. *Physiol Plant* 1995 ; 93 : 611-6.
78. Shojima S, Nishizawa NK, Fushiya S, Nozoe S, Infune T, Mori S. Biosynthesis of phytosiderophores. *In vitro* biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from L-methionine and nicotianamine. *Plant Physiol* 1990 ; 93 : 1497-503.
79. Basso B, Bagnaresi P, Bracale M, Soave, C. The yellow-stripe-1 and -3 mutants of maize: nutritional and biochemical studies. *Maydica* 1994 ; 39 : 97-105.
80. von Wiren N, Mori S, Marschner H, Romheld V. Iron inefficiency in maize mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv Yellow-Stripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. *Plant Physiol* 1994 ; 106 : 71-7.
81. Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 2001 ; 409 : 346-9.
82. Anderegg G, Ripperger H. Correlation between metal complex formation and biological activity of nicotianamine analogues. *J Chem Soc Comm* 1989 ; 1989 : 647-50.
83. von Wiren N, Klair S, Bansal S, et al. Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* 119 ; 1107-14.
84. Ling HQ, Koch G, Baumlein H, Ganai MW. Map-based cloning of *chlornerva*, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 7098-103.
85. Becker R, Fritz E, Manteuffel R. Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant *chlornerva*. *Plant Physiol* 1995 ; 108 : 269-75.
86. Liu DH, Adler K, Stephan UW. Iron-containing particles accumulate in organelles and vacuoles of leaf and root cells in the nicotianamine-free tomato mutant *chlornerva*. *Protoplasma* 1998 ; 201 : 213-20.
87. Tiffin LO. Iron translocation. I. Plant culture, exudate sampling, iron-citrate analysis. *Plant Physiol* 1966 ; 41 : 510-4.
88. Sonnewald U, Willmitzer L. Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiol* 1992 ; 99 : 1267-70.
89. Stephan UW, Scholz G. Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem. *Physiol Plant* 1993 ; 88 : 522-9.
90. Schmidke I, Stephan UW. Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. *Physiol Plant* 1995 ; 95 : 147-53.
91. Stephan UW, Schmidke I, Stephan VW, Scholz G. The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *Biomaterials* 1996 ; 9 : 84-90.
92. Schmidke I, Kruger C, Frommichen R, Scholz G, Stephan U. Phloem loading and transport characteristics of iron in interaction with plant-endogenous ligands in castor bean seedlings. *Physiol Plant* 1999 ; 106 : 82-9.
93. Kruger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R. A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 25062-9.
94. Xoconostle-Cazare B, Ruiz-Medrano R, Lucas WJ. Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b5 reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J* 2000 ; 24 : 735-47.
95. Bruggemann W, Maas-Kantel K, Moog PR. Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Planta* 1993 ; 190 : 151-5.
96. Shingles R, North M, McCarty RE. Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes. *Plant Physiol* 2002 ; 128 : 1022-30.
97. Lill R, Kispal G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000 ; 25 : 352-6.
98. Leon S, Touraine B, Briat JF, Lobreaux S. The *AtNFS2* gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochem J* 2002 ; 366 : 55764.
99. Leon S, Touraine B, Ribot C, Briat JF, Lobreaux S. Iron-sulfur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from Arabidopsis. *Biochem J* 2003 ; 371 : 823-30.
100. Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 1999 ; 18 : 3981-9.
101. Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, et al. A Mutation of the Mitochondrial ABC Transporter *Sta1* Leads to Dwarfism and Chlorosis in the Arabidopsis Mutant *stark*. *Plant Cell* 2001 ; 13 : 89-100.
102. Marschner H. Mechanisms of regulation of mineral nutrition in higher plants. In: Bieleski RL, Ferguson AR, Creswell MM, eds. *Mechanisms of Regulation of Plant Growth*. Wellington (New Zealand): Royal Society of New Zealand, 1974 : 99-109.
103. Longnecker N, Welch RM. Accumulation of apoplastic iron in plant roots. A factor in the resistance of soybeans to iron-deficiency induced chlorosis. *Plant Physiol* 1990 ; 92 : 17-22.
104. Foy CD, Chaney RL, White MC. The physiology of metal toxicity in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 1978 ; 29 : 511-66.
105. Green MS, Etherington JR. Oxidation of ferrous iron by rice (*Oryza sativa* L.) roots: a mechanism for waterlogging tolerance? *J Exp Bot* 1977 ; 28 : 678-90.
106. van der Mark F, van den Briel W, Huisman HG. Phytoferritin is synthesized *in vitro* as a high-molecular-weight precursor. Studies on the synthesis and the uptake *in vitro* of the precursors of ferritin and ferredoxin by intact chloroplasts. *Biochem J* 1983 ; 214 : 943-50.
107. Lobreaux S, Briat JF. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem J* 1991 ; 274 : 601-6.
108. Wei J, Theil EC. Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (soybean). *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 17488-93.

109. Petit JM, van Wuytswinkel O, Briat JF, Lobreaux S. Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of *AtFer1* and *Zm-Fer1* plant ferritin genes by iron. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 5584-90.
110. Bode HP, Dumschat M, Garotti S, Fuhrmann GF. Iron sequestration by the yeast vacuole. A study with vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1995 ; 228 : 337-42.
111. Li L, Chen OS, McVey Ward D, Kaplan J. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 29515-9.
112. Portnoy ME, Liu XF, Culotta VC. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* 2000 ; 20 : 7893-902.
113. Urbanowski JL, Piper RC. The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 38061-70.
114. Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, Scholz G, Schmidt W. Fe homeostasis in plant cells : does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration ? *Planta* 2001 ; 213 : 967-76.
115. Bagnaresi P, Mazars-Marty D, Pupillo P, Marty F, Briat JF. Tonoplast subcellular localization of maize cytochrome b5 reductase isoforms. *Plant J* 2000 ; 24 : 645-54.
116. Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* 2003 ; 34 : 685-95.
117. Palmgren MG. Plant plasma membrane H⁺-ATPases : Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001 ; 52 : 817-45.
118. Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 1999 ; 397 : 694-7.
119. Waters BM, Blevins DG, Eide DJ. Characterization of FRO1, a Pea Ferric-Chelate Reductase Involved in Root Iron Acquisition. *Plant Physiol* 2002 ; 129 : 85-94.
120. Cellier M, Govoni G, Vidal S, et al. Human natural resistance-associated macrophage protein : cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* 1994 ; 180 : 1741-52.
121. Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 5105-10.
122. Fleming MD, Trenor CC, Su MA, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 1997 ; 16 : 383-6.
123. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997 ; 388 : 482-8.
124. Chen XZ, Peng JB, Cohen A, Nelson H, Nelson N, Hediger MA. Yeast SMF1 mediates H⁺-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 35089-94.
125. Belouchi A, Kwan T, Gros P. Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Mol Biol* 1997 ; 33 : 1085-92.
126. Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat JF. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J* 2000 ; 347 : 749-55.
127. Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 4991-6.
128. Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 5624-8.
129. Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* 1999 ; 40 : 37-44.
130. Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 12356-60.
131. Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, et al. IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell* 2002 ; 14 : 1223-33.
132. Henriques R, Jasik J, Klein M, et al. Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol Biol* 2002 ; 50 : 587-97.
133. Eng BH, Guerinot ML, Eide D, Saier MH. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J Membr Biol* 1998 ; 166 : 1-7.
134. Vert G, Briat JF, Curie C. *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. *Plant J* 2001 ; 26 : 181-9.
135. Guerinot ML. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* 2001 ; 465 : 190-8.
136. Paulsen IT, Saier MH. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* 1997 ; 156 : 99-103.
137. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001 ; 291 : 1755-9.
138. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 19906-12.
139. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000 ; 403 : 776-81.
140. Stephan UW, Grun M. Physiological disorders of the nicotianamine-auxotroph tomato mutant *chloronerva* at different levels of iron nutrition. II. Iron deficiency response and heavy metal metabolism. *Biochem Physiol Pflanzen* 1989 ; 185 : 3-4.
141. Becker R, Grun M, Scholz G. Nicotianamine and the distribution of iron in the apoplast and symplast of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* 1992 ; 187 : 48-52.
142. Scholz G, Becker R, Pich A, Stephan UW. Nicotianamine - a common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants : a review. *J Plant Nutr* 1992 ; 15 : 1647-65.
143. Kneen BE, LaRue TA, Welch RM, Weeden NF. Pleiotropic effects of brz. A mutation in *Pisum sativum* (L.) cv. 'Sparkle' conditioning decreased nodulation and increased iron uptake and leaf necrosis. *Plant Physiol* 1990 ; 93 : 717-22.
144. Welch RM, LaRue TA. Physiological characteristics of Fe accumulation in the « bronze » mutant of *Pisum sativum* L., cv « Sparkle » E107 (brz brz). *Plant Physiol* 1990 ; 93 : 723-9.
145. Delhaize E. A metal-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1996 ; 111 : 849-55.
146. Rogers EE, Guerinot ML. FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2002 ; 14 : 1787-99.
147. Brown JC, Chaney RL, Ambler JE. A new tomato mutant inefficient in the transport of iron. *Physiol Plant* 1971 ; 25 : 48-53.
148. Ling HQ, Bauer P, Berezcky Z, Keller B, Ganai M. The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 13938-43.
149. Bienfait H, De Weger L, Kramer D. Control of the development of iron-efficiency reactions in potato as a response to iron deficiency is located in the roots. *Plant Physiol* 1987 ; 83 : 244-7.
150. Grusak MA, Pezeshgi S. Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the *dgl* mutant of pea. *Plant Physiol* 1996 ; 110 : 329-34.
151. Schikora A, Schmidt W. Iron stress-induced changes in root epidermal cell fate are regulated independently from physiological responses to low iron availability. *Plant Physiol* 2001 ; 125 : 1679-87.
152. Vert G, Briat JF, Curie C. Dual regulation of *Arabidopsis* root iron deficiency responses by local and long-distance signals. *Plant Physiol* 2003 ; 132 : 861-9.
153. Morgan PW, Hall WC. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum. *Physiol Plant* 1962 ; 15 : 420-7.
154. Romera FJ, Alcántara E, De la Guardia MD. Ethylene production by Fe-deficient roots and its involvement in the regulation of Fe-deficiency stress responses by strategy I plants. *Ann Bot* 1999 ; 83 : 51-5.
155. Lobreaux S, Hardy T, Briat JF. Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO J* 1993 ; 12 : 651-7.
156. Bidonde S, Ferrer MA, Zegzouti H, et al. Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. *Eur J Biochem* 1998 ; 253 : 20-6.
157. Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaert JA, McCarty DR. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 1997 ; 276 : 1872-4.
158. Bouzayen M, Felix G, Latché A, Pech JC, Boller T. Iron : an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Planta* 1991 ; 184 : 244-7.
159. Romera FJ, Alcántara E. Iron-deficiency stress responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. A possible role for ethylene. *Plant Physiol* 1994 ; 105 : 1133-8.
160. Landsberg EC. Hormonal regulation of iron-stress response in sunflower roots : a morphological and cytological investigation. *Protoplasma* 1996 ; 194 : 69-80.