

## Des plantes transgéniques surproductrices de ferritine : un remède à l'anémie ?

Le fer, co-facteur de nombreuses enzymes et protéines impliquées dans le transfert d'électrons, est indispensable aux fonctions vitales. Chez les humains, la transferrine le transporte entre les sites d'absorption, de stockage et d'utilisation. Cette protéine a une relation privilégiée avec les cellules synthétisant l'hémoglobine puisqu'elle est la seule source physiologique de fer pour la synthèse d'hème érythrocytaire [1]. La ferritine, stockant le fer en excès, est aussi une protéine importante de l'homéostasie du fer [2]. En effet, ce métal peut activer les formes réduites de l'oxygène et engendrer des radicaux hydroxyle, dommageables pour l'intégrité cellulaire ; il doit donc être séquestré pour ne pas être réactif.

### Le contrôle de l'homéostasie du fer chez les mammifères

L'homéostasie du fer chez les mammifères est essentiellement établie par la régulation intégrée, post-transcriptionnelle, de la synthèse des récepteurs de la transferrine (TfR) et de la ferritine [3, 4] (figure 1A). L'entrée de fer dans la plupart des cellules s'effectue par la liaison de la transferrine, portant deux atomes de fer ferrique, au récepteur de haute affinité TfR du plasmalemme. Un phénomène d'endocytose et de recyclage de récepteur en résulte, permettant la livraison des atomes de fer dans le cytoplasme à partir de la vésicule d'endocytose. L'acquisition du fer de la transferrine est contrôlée par la modulation du nombre de molécules de TfR, résultant d'une régulation du temps de demi-vie de l'ARNm codant pour le TfR en fonction du statut en fer des cellules (*m/s*

1988, n° 8, p. 527). En situation de faible concentration intracellulaire de fer, TfR s'accumule en raison d'une augmentation de la stabilité de son ARNm ; une augmentation de l'acquisition de fer s'observe alors. A l'inverse, dans le cas d'une concentration intracellulaire en fer élevée, l'ARNm codant pour le TfR est dégradé. Parallèlement, la ferritine s'accumule à cause d'un recrutement massif des ARNm correspondant sur les polysomes et de leur traduction. Des structures secondaires identiques, nommées IRE (*iron responsive element*), localisées respectivement dans la région 3' transcrite non traduite de l'ARNm du TfR et dans la région 5' transcrite non traduite de l'ARNm de la ferritine, sont impliquées dans les régulations post-transcriptionnelles évoquées ci-dessus. Lorsque la concentration intracellulaire de fer est faible, deux protéines (IRP1 et IRP2, *iron regulating protein*) sont capables de se lier aux IRE des ARNm du TfR et de la ferritine. Il en résulte une inhibition de la dégradation de l'ARNm du TfR et une répression de la traduction de l'ARNm ferritine. La conséquence biologique est une activation de l'acquisition du fer pour satisfaire les besoins métaboliques, son stockage n'ayant pas lieu en raison de l'absence de synthèse de ferritine. IRP1 et IRP2 sont donc deux facteurs de régulation senseurs de fer. IRP1 contient un complexe [4Fe-4S] et est identique à l'aconitase cytosolique (*m/s* 1999, n° 11, p. 1314). Ce complexe [4Fe-4S] est important pour la régulation par le fer puisque IRP1 contenant le complexe a une faible affinité pour les IRE et possède une activité aconitase, alors que IRP1 dépourvu du complexe se lie forte-

ment aux IRE et ne possède plus d'activité aconitase. IRP2 ne possède ni complexe ni activité aconitase ; son temps de demi-vie et sa dégradation sont réglés par le contenu en fer des cellules.

### L'anémie et son traitement

Un défaut de fer assimilable dans notre alimentation épuisera nos réserves et conduira à l'anémie. Ce syndrome concerne 30 % de la population mondiale. Il est responsable de fatigue, d'une augmentation de sensibilité aux infections et de troubles de la croissance et du développement psychomoteur. Une des causes majeures de cette maladie nutritionnelle dans les pays en voie de développement est la malnutrition. Remédier à ce problème de santé publique est, en théorie, simple et peu onéreux. La prise orale et quotidienne d'une dose de 100 à 200 mg de sulfate de fer, associé à de l'acide ascorbique pour maintenir le fer sous une forme ferreuse soluble et assimilable, est suffisante pour supprimer l'anémie après quelques semaines de traitement. Cependant, en raison de l'importante réactivité du fer ferreux avec les formes réduites de l'oxygène, et de l'implication des radicaux libres ainsi engendrés dans de nombreuses maladies, la supplémentation en fer est remise en cause [5]. Pour éviter une augmentation du *stress oxydatif* pendant le traitement de l'anémie, l'utilisation de fer ferreux est déconseillée. Les complexes ferriques de potentiel de réduction supérieur à -324 mV à pH 7 devraient également être écartés, à cause de leur capacité d'être réduits, au moins par le NAD(P)H. En fait, seuls des chélates ferriques de potentiels de réduction

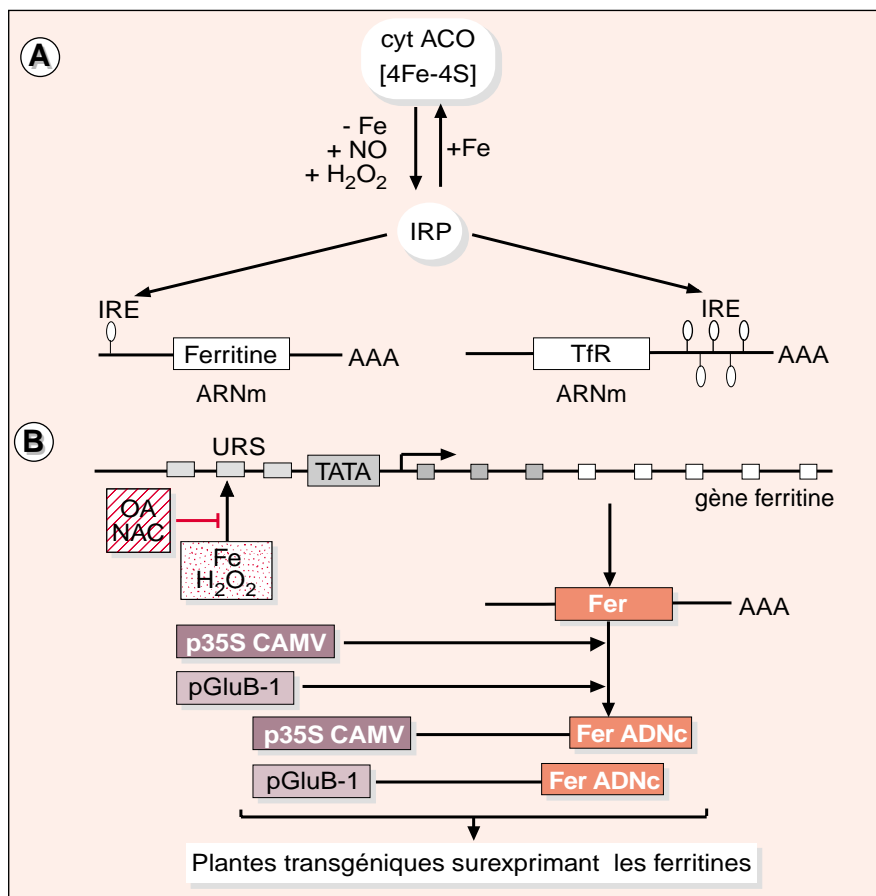


Figure 1. **Représentation schématique de quelques contrôles de l'homéostasie du fer.** **A.** Chez les animaux, ces contrôles sont essentiellement intégrés dans des régulations post-transcriptionnelles de la synthèse des ferritines (*Fer*) et du récepteur de la transferrine (*TfR*). L'affinité de certaines protéines (*IRP*) pour des structures secondaires (*IRE*) est modulée par la concentration intracellulaire en fer ou des agents pro-oxydants ( $\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) afin d'adapter la traduction des ARNm *Fer* et la stabilité de l'ARNm *TfR*. Une des *IRP* est identique à l'aconitase cytosolique (*cytACO*), illustrant le rôle régulateur des complexes  $\text{Fe-S}$  dans le contrôle de l'expression génique. **B.** Chez les végétaux, les ferritines (*Fer*) sont codées par une petite famille de gènes et leur transcription est réglée, différemment, par des hormones, mais également par le fer et  $\text{H}_2\text{O}_2$  au niveau de séquences régulatrices en cis (*URS*) situées en amont des boîtes *TATA*. Il a été possible de modifier ces régulations et de provoquer la suraccumulation de ferritine dans des plantes transgéniques en plaçant un ADNc de ferritine de plante (*Fer ADNc*) sous le contrôle du promoteur du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (*p35S CAMV*), ou du promoteur du gène *GluB-1* de glutéline de riz permettant une expression spécifique dans les graines.

plus bas que la valeur critique mentionnée, et avec une infrastructure équivalente au cœur minéral des ferritines, pourraient être utilisés pour traiter l'anémie en évitant les effets secondaires liés à la réaction de Fenton. Par ailleurs, même la supplémentation en fer de la ration quotidienne est difficile à organiser dans les pays

en voie de développement en raison des coûts associés et du faible nombre de programmes de santé publique.

Une alternative biotechnologique a récemment été proposée: la surproduction de ferritine végétale dans des plantes transgéniques [6]. Cette méthode pourrait contribuer à couvrir les besoins en fer d'un individu,

en introduisant ces plantes dans la ration alimentaire.

### Les ferritines végétales et leur surproduction dans des plantes transgéniques

Les ferritines de plantes ont une structure tridimensionnelle semblable à celle de la ferritine des animaux [7]. Elles sont cependant localisées dans les plastides des végétaux, et non dans le cytoplasme. Leur synthèse, en réponse à un excès de fer, est réglée au niveau de la transcription d'une petite famille de gènes nucléaires, et non au niveau de la traduction comme chez les animaux [8]. Des voies de transduction impliquant une hormone végétale, l'acide abscissique, le *stress oxydatif* et une phosphatase *PP12A* participent à cette régulation [9, 10] (figure 1B). La synthèse des ferritines végétales est également contrôlée au cours des différents stades du développement d'une plante: cette protéine s'accumule dans les graines et est dégradée au cours de la germination [11].

La surproduction de cette protéine a pu être obtenue dans des plantes transgéniques en plaçant un ADNc de ferritine de soja sous le contrôle d'un promoteur fort de virus de plante, le promoteur du gène 35S du CAMV, ou sous le contrôle du promoteur du gène *GluB-1* de glutéline de riz, spécifique d'une expression importante dans les graines [6, 12]. Cette surproduction s'accompagne d'une augmentation d'un facteur trois de la teneur en fer des feuilles ou des graines de plantes transformées. Par ailleurs, l'alimentation de rats anémiques complétement avec des ferritines de soja a permis de lever cette carence [13]. Goto *et al.* [6] ont donc proposé que l'introduction de plantes suraccumulatrices de ferritine dans la ration alimentaire pourrait prévenir l'anémie humaine.

### Les limites de l'enrichissement en fer de l'alimentation humaine par l'utilisation de plantes transgéniques surproductrices de ferritine

Le fer des végétaux n'est pas très disponible par le fait de la formation de

complexes avec des molécules phosphatées comme le phytate, particulièrement abondant dans les graines. Des essais de nutrition d'animaux anémiques avec des plantes surproductrices de ferritine seront donc nécessaires pour valider l'hypothèse émise par le groupe japonais. Par ailleurs, l'entrée du fer dans la biosphère, effectuée par les racines, résulte d'interactions complexes entre le sol et la plante, et pas uniquement du génotype du végétal. De plus, les mécanismes d'acquisition racinaire du fer sont partagés avec le transport d'autres métaux, certains comme le zinc et le cadmium pouvant être toxiques. La suraccumulation de ferritine dans des feuilles de tabac transgénique a pour conséquence une séquestration illégitime de fer. Ces plantes, bien que possédant davantage de fer, se comportent comme si elles se trouvaient en manque de fer. Il en résulte une activation des systèmes de transport racinaire qui pourraient enrichir les plantes non seulement en fer mais également en métaux indési-

rables [12]. Pour ces raisons, il sera essentiel de déterminer le comportement de ces plantes transformées en conditions de culture sur différents types de sol, afin d'évaluer la pertinence de leur utilisation pour l'alimentation humaine.

1. Ponka P. Tissue specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 1997; 89: 1-25.
2. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1275: 161-203.
3. Klausner RD, Rouault TA, Harford, JB. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 1993; 72: 19-28.
4. Hentze MW, Kühn LC. 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.
5. Reiser P. Iron therapy. St Gallen, Switzerland: Vifor International Inc, 1998; 142 pages.
6. Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F. Iron fortification of rice seed by soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 282-6.
7. Lobreux S, Yewdall S, Briat JF, Harrison PM. Amino-acid sequence and predicted three-dimen-

- sional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochem J* 1992; 288: 931-9.
8. Lescure AM, Proudhon D, Pesey H, Ragland M, Theil EC, Briat JF. Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8222-6.
  9. Lobreux S, Hardy T, Briat JF. Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO J* 1993; 12: 651-7.
  10. Savino G, Briat JF, Lobreux S. Inhibition of the iron-induced ZmFer1 maize ferritin gene expression by antioxidants and Ser/Thr phosphatase inhibitors. *J Biol Chem* 1997; 272: 33319-26.
  11. Lobreux S, Briat JF. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem J* 1991; 274: 601-6.
  12. Van Wuytswinkel O, Vansuyt G, Grignon N, Fourcroy P, Briat JF. Iron homeostasis alteration by ferritin overexpression in transgenic tobacco. *Plant J* 1999; 17: 93-8.
  13. Beard JL, Burton JW, Theil EC. Purified ferritin and soybean meal can be sources of iron for treating iron deficiency in rats. *J Nutr* 1996; 126: 154-60.

### Jean-François Briat

*Biochimie et physiologie moléculaire des plantes, Cnrs URA 2133, Inra et École nationale supérieure d'agronomie, place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.*

## COMMENT VALORISER LES RECHERCHES ET DÉVELOPPER UN PROJET INNOVANT AVEC L'INDUSTRIE ?

Un diplôme d'Université de Génie Biologique et Médical est organisé au sein de la Faculté Saint-Antoine et de l'Université Paris VI, pour répondre à cette question.

Cette formation se propose d'enseigner : la protection des recherches (prise de brevet...), la valorisation de la recherche appliquée, les règles de l'innovation et de l'évaluation biomédicale. Les possibilités de financement privé des recherches, les modes de contrats entre chercheurs et industriels, les procédures réglementaires européennes qui obligent à modifier certains choix pour le déroulement des recherches, le choix du meilleur partenaire industriel, les contraintes mais aussi les avantages à innover et à évaluer des produits nouveaux en collaboration avec les industriels, les enjeux de la thérapie génique et de la télémédecine, le partenariat entre universités et écoles technologiques, ingénieurs et médecins nécessaires à la recherche appliquée biomédicale, seront enseignés de façon pratique (visites d'industries GBM, nombreux exemples concrets, dialogue avec les conférenciers, rencontres avec les industriels susceptibles de développer des innovations...). Les aspects juridiques (loi pour la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale, les structures adéquates pour développer l'innovation) ainsi que l'informatique médicale et la télémédecine seront abordés. Enfin, les carrières offertes par des industriels de santé et les structures juridiques pour innover seront envisagées.

L'enseignement se clôturera par un « jeu de rôle » qui simulera à partir de cas concrets, les stratégies de veille technologique et de transfert d'innovations.

L'autre originalité de cette formation est un télé-enseignement par visioconférences avec le Canada et Strasbourg.

Cet enseignement organisé par le Professeur Alain Sezeur avec l'aide du Docteur Jean-Pierre Thierry s'adresse aux professionnels de santé soucieux de trouver des partenaires pour développer des innovations biomédicales (Dates : Session I : 17, 18, 19 janvier 2000 ; Session II : 26, 27, 28 janvier 2000 ; Session III : 15, 16 mars 2000 et Session IV : 17, 18 mars 2000)

Le rôle des incubateurs et des pépinières d'entreprises comme moteur pour la recherche sera également traité.

### RENSEIGNEMENTS ET INSCRIPTIONS :

S'adresser au secrétariat du Professeur Alain Sezeur, Hôpital Rothschild  
33, boulevard de Picpus, 75012 PARIS, France. Tél. : 01 40 19 36 46. Site internet : [www.ccr.jussieu.fr/gbm](http://www.ccr.jussieu.fr/gbm). E-mail : [dominique.flanquart@rth.ap-hop-paris.fr](mailto:dominique.flanquart@rth.ap-hop-paris.fr)  
Possibilités de restauration et d'hébergement à proximité du lieu des cours.