

# **Synthèse globale relative à l'habilitation universitaire** **du Dr. MAHROUG Samira**

## **RESUME DE THESE**

**Titre:** Compartimentation cellulaire et sub-cellulaire de la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques monoterpéniques anticancéreux chez la Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*)

**Directeurs de thèse:** Pr. Benoit St-Pierre et Pr. Vincent Burlat

Cette thèse concerne l'étude spatio-temporelle de la voie de biosynthèse de biomolécules d'intérêt, les alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) de *C. roseus*, aussi appelés Vinca-alcaloïdes. Cette plante tropicale constitue en effet depuis plusieurs dizaines d'années la source unique de production de vinblastine et vincristine, deux AIM hétérodimères utilisés dans le traitement de nombreux cancers. Outre l'extraction de ces hétérodimères, dont les rendements sont très faibles, la production actuelle de cette classe d'anticancéreux repose sur l'extraction des deux AIM monomères précurseurs (vindoline et catharanthine) à partir de la plante cultivée en champs, puis sur l'hémisynthèse par couplage radicalaire des monomères pour former les hétérodimères actifs et des dérivés semi-synthétiques. Le faible rendement d'extraction des monomères (100-200 ppm), est à l'origine d'études visant à produire ces biomolécules *in vitro* par des suspensions cellulaires de *C. roseus*. A ce jour, ces suspensions se sont révélées incapables de synthétiser les dimères et un des monomères (vindoline). Seuls des intermédiaires métaboliques ou des produits latéraux de la voie de biosynthèse des AIM sont produits. Une des raisons de cet échec est le haut degré de compartimentation multicellulaire de cette voie de biosynthèse mis en évidence par des travaux antérieurs de l'équipe. En effet, des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie ont récemment permis de mettre en évidence l'expression spécifique de 9 gènes impliqués dans la voie des AIM au niveau de trois populations cellulaires différentes dans les organes aériens de *C. roseus*. Quatre gènes des étapes précoces de la voie sont exprimés dans le parenchyme associé au phloème interne, trois gènes des étapes intermédiaires sont exprimés dans l'épiderme, et les deux derniers gènes impliqués dans les deux dernières étapes de la synthèse du précurseur monomère vindoline sont exprimés dans des cellules spécialisées: les laticifères et les idioblastes. Autrement dit, les suspensions cellulaires ne sont pas capables de réaliser les dernières étapes de la voie du fait de leur indifférenciation.

Le but de cette thèse concerne principalement la poursuite de la cartographie d'expression tissulaire de gènes impliqués dans la voie des AIM. Une cartographie plus complète devrait permettre à terme d'identifier deux étapes successives se déroulant dans deux tissus différents, identifiant ainsi les intermédiaires métaboliques candidats à un transport intercellulaire. Ces travaux constituent également le préalable indispensable à une amélioration de la production des AIM dans les suspensions cellulaires par ingénierie métabolique.

Les travaux réalisés ont ainsi permis de localiser l'expression spécifique de 13 nouveaux gènes impliqués dans la voie de synthèse ou potentiellement impliqués dans cette voie, ou encore impliqués dans des voies latérales. Cette étude a également concerné le degré de complexité supplémentaire de cette voie que constitue la compartimentation sub-cellulaire (immunocytochimie en microscopie électronique en transmission).

**Mots clés :** alcaloïdes indoliques monoterpéniques ; Vinca-alcaloïdes ; anticancéreux ; biosynthèse ; voie MEP ; hybridation *in situ* ; immunocytochimie ; compartimentation multicellulaire; *Catharanthus roseus* ; Pervenche de Madagascar ; phloème interne ; épiderme ; laticifères ; idioblastes.

**SYNTHESE  
DES TRAVAUX THESE  
2002- 2006**

**PRESENTATION DETAILLEES DES TRAVAUX DE D.E.A ET DE THESE DE DOCTORAT**

L'objectif scientifique principal de l'équipe E.A 2106 est d'analyser les processus qui interviennent dans la différenciation métabolique des végétaux, en particulier dans la biosynthèse des métabolites secondaires ou produits naturels. Les recherches sont focalisées sur l'analyse des voies de biosynthèse des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) afin d'identifier les processus responsables de la régulation de ces voies et d'exploiter, par des approches biotechnologiques, les potentialités des métabolites à activités thérapeutiques. Les activités de recherche du laboratoire sont centrées essentiellement sur la biosynthèse de composés qui possèdent un intérêt thérapeutique majeur : Les Vinca-alcaloïdes (vincristine et vinblastine), produits en très faible concentration par la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), et leurs dérivés hémisynthétiques, sont largement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Ces composés phares font partie de la classe des AIM, une classe structurale riche en composés physiologiquement actifs d'intérêt commercial (ex. camptothécine, ajmaline, strychnine, physostigmine, réserpine, yohimbine), caractéristique des Apocynacées, Gentianacées et Rubiacées. Les mécanismes découverts chez *C. roseus* pourraient donc très certainement s'appliquer à plusieurs autres plantes médicinales.

**I. Présentation des travaux de recherche effectués en D.E.A**

*Contribution à l'étude de compartimentation sub-cellulaire des étapes centrales de la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques monoterpénique chez la Pervenche de Madagascar (Catharanthus roseus)*

Dans le cadre du stage de DEA « Contribution à l'étude de multicompartimentation sub-cellulaire de l'étape centrale de la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques monoterpéniques » sous la direction du Pr. Benoit St-Pierre et Dr. Vincent Burlat au sein de l'équipe EA2106 « Biotechnologies et Biomolécules végétales » à l'université François Rabelais, Tours France. Le sujet de ce stage portait sur une étude préliminaire des localisations sub-cellulaires des 4 enzymes impliquées dans l'étape centrale de biosynthèse des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* G. Don). La réalisation des plasmides recombinants ces 4 ADNc en fusion avec la *gfp*<sup>\*</sup> permettrait de détecter la fluorescence de ces protéine de fusions par microscopie. Ces résultats préliminaires sont en cours de discussion par l'équipe EA 2106.

**II. Présentation des travaux de recherche effectués en Thèse**

Cette thématique porte sur l'étude de l'architecture du métabolisme -la recherche de nouvelles étapes enzymatiques et des gènes qui les codent- et son intégration dans les compartiments sub-cellulaires, cellulaires et tissulaires ainsi qu'aux mécanismes de transport qui assurent les échanges entre ces compartiments.

*Multicompartimentation cellulaire et sub-cellulaire des voies métaboliques des alcaloïdes indoliques monoterpéniques anticancéreux chez la Pervenche de Madagascar (Catharanthus roseus).*

Au cours de mes travaux de doctorat : Multicompartimentation cellulaire et sub-cellulaire des voies métaboliques des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) anticancéreux chez la Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*). J'ai pu approfondir mes recherches sur la complexité de la compartimentation cellulaire en termes d'expression de quelques différents gènes codants l'intégralité de la biosynthèse des AIM. L'ensemble des travaux est énuméré sous forme de chapitre et sous chapitre contenant principalement des publications scientifiques. L'ensemble de ce travail a donné lieu à 4 publications et a permis une meilleure compréhension des étapes fondamentales mises en jeu dans la cartographie cellulaire d'expression des gènes de la voie. Je tiens à décrire brièvement Chaque chapitre séparément.

**1°) Introduction générale**

Revue de Synthèse « Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpene indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. » (S. Mahroug, V. Burlat, B. St-Pierre, Revue d'introduction publiée dans Phytochemistry Reviews (2006).

2°) Caractérisation cellulaire et sub-cellulaire de la voie de Méthyl Erythritol Phosphate (MEP) chez *Catharanthus roseus*.

3°) Rôle de l'épiderme dans la biosynthèse des AIM et d'autres métabolites secondaires chez *Catharanthus roseus*.

4°) Utilisation de l'hybridation *in situ* pour la caractérisation de clones impliqués ou potentiellement impliqués dans la voie des AIM chez *Catharanthus roseus*

**Liste des articles de recherche : par ordre d'apparition, publiés avec comité de lecture :**

**Diane Leménager, Lazhar Ouelhazi, Samira Mahroug, Bertrand Veau, Benoit St-Pierre, Jone Aguirreolea, Vincent Burlat and Marc Clastre.**

Purification, molecular cloning, and cell-specific gene expression of the alkaloid-accumulation associated protein CrPS in *Catharanthus roseus*. *Journal of Experimental Botany* (2005) 56: 1221-1228 [IF2004: 3,366] indexed for MEDLINE.

**Samira Mahroug, Vincent Courdavault, Martine Thiersault, Benoit St-Pierre et Vincent Burlat.**

Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. *Planta* (2005) DOI: 10.1007/s00425-005-0167-y [IF2004: 3,113] indexed for MEDLINE.

**Samira Mahroug, Vincent Burlat, Benoit St-Pierre.**

Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews* (2006) DOI: 10.1007/s11101-006-9017-1 indexed for MEDLINE.

**Travaux publiés après la soutenance de thèse de Doctorat par ordre d'apparition :**

**Audrey Oudin, Samira Mahroug, Vincent Courdavault, Nadège Hervouet, Charles Zelwer, Manuel Rodríguez-Concepcion, Benoit St-Pierre and Vincent Burlat**

Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. (2007) *Plant Mol Biol*. DOI: 10.1007/s11103-007-9190-7. indexed for MEDLINE.

**Pierre Poutrain Grégory Guirimand, Samira Mahroug, Vincent Burlat, Céline Melin, Olivia Ginis, Audrey Oudin, nathalie. Giglioli-Guivarc'h, Olivier Pichon, Vincent Courdavault.**

Molecular cloning and characterisation of two calmodulin isoforms of the Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*. (2009) *Plant Biology*. ISSN 1435-8603.

**Grégory Guirimand, Anthony Guihur, Pierre Poutrain, Francois Héricourt, Samira Mahroug, Benoit St-Pierre, Vincent Burlat, Vincent Courdavault.**

Spatial organization of the vindoline biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. (2010) *Journal of Plant Physiology*. DOI:10.1016/j.jplph.2010.08.018.

**Grégory Guirimand, Vincent Courdavault, Arnaud Lanoue, Samira Mahroug, Anthony Guihur, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Benoit St-Pierre, Vincent Burlat.**

Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"? (2010) *BMC Plant Biology*. 10:182, Open Access : 1471-2229/10/182.

### Techniques utilisées : au cours des stages de DEA et de Thèse

- Microscopie à lumière transmise.
- Extraction et purification de l'ADN génomique,
- Electrophorèse sur gel d'agarose
- Constructions plasmidiques
- Constructions des protéines de Fusion- GFP\*
- Fixation des ARNm et inclusion des échantillons en paraffine
- Inclusion dans la résine.
- Immunocytochimie « Western blot »
- Hybridation in situ
- Microscopie à Epifluorescence/UV
- Microscopie électronique en transmission

### 1°) Introduction

Ce résumé de la revue publiée dans *Phytochemistry Reviews* présente l'état des lieux des résultats obtenus sur l'organisation cellulaire et sub-cellulaire des AIM chez la Pervenche de Madagascar avant la réalisation des travaux de cette thèse.

#### **Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpene indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. (S. Mahroug, V. Burlat, B. St-Pierre, publiée dans *Phytochemistry Reviews* (2006))**

Cette plante a quitté son pays natal; Madagascar au XVIIIème pour envahir les laboratoires du monde entier, elle est utilisée pour ses qualités ornementales puis largement diffusée en France, en Europe et dans le monde. Elle produit de nombreux alcaloïdes à noyau indole, dont deux agents anti- mitotiques: la vinblastine et la vincristine sont connues. Ces molécules ont un intérêt pharmaceutique considérable et le prix de ces molécules est de l'ordre du million de dollars par kilogramme. Elle remplit parfaitement les critères qui justifient le développement accru de la recherche scientifique pour la compréhension de son métabolisme. Les travaux menés sur *C. roseus* permettent d'isoler en 1952 le premier alcaloïde, la vincéine. Depuis lors environ 130 alcaloïdes ont été identifiés chez cette espèce (van der Heijden et al., 2004). Ces métabolites secondaires font partie des vinca-alcaloïdes (nommés d'après l'ancien nom de la plante, *Vinca rosea*), et sont aujourd'hui référencés dans la famille des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM). Une source d'alcaloïdes utilisés en chimiothérapie: depuis plus de quarante ans, certains AIM hétérodimères de *C. roseus* tels que la vinblastine (commercialisé sous le nom Velbé®) et la vincristine (commercialisée sous le nom Oncovin®). La vincristine est actuellement prescrite dans le traitement des cancers de l'enfant, des cancers lymphoïdes comme la leucémie aiguë lymphoïde, les lymphomes et la maladie de Hodgkin. La vinblastine est prescrite dans le traitement des tumeurs à cellules germinales, dans la maladie de Hodgkin et les lymphomes, et d'autres cancers. (Levêque et al., 1996; van der Heijden et al., 2004). Des informations partielles des enzymes sont disponibles sur la localisation des étapes subséquentes de la biosynthèse des AIM (cf. page 12) chez *C. roseus*. La D4H (Désacétoxyvindoline 4-hydroxylase) et la DAT (Désacétylvindoline 4-O-acétyl transférase) sont vraisemblablement localisées dans le cytosol (Vasquez-Flota et al., 1997; St-Pierre et al., 1998). L'activité NMT (N-méthyl transférase) est, quant à elle, associée aux thylacoïdes des chloroplastes (De Luca, 1987). Des travaux suggèrent que la condensation de la catharanthine et de la vindoline, première étape de la synthèse des AIM dimères, s'effectuerait dans la vacuole (Sottomayor et al., 1998; Sottomayor et Ros Barcelo, 2003).

A cette compartimentation sub-cellulaire s'ajoute, *in planta*, une compartimentation tissulaire de la biosynthèse des AIM. Ainsi, les transcrits des gènes codant les enzymes assurant les premières étapes enzymatiques de la voie MEP( Méthyl Erytritol Phosphate), en particulier la DXS (1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase), la DXR (1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ), MECS (2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase) et la G10H (Géranol 10-hydroxylase) , première enzyme de la voie des monoterpènes séco-iridoïdes, ont été spécifiquement localisés au niveau de cellules parenchymateuses associées au phloème interne (PPI), dans les parties aériennes (jeunes feuilles, tiges et bourgeons floraux) de *C. roseus* (Burlat et al., 2004, V. Burlat, communication personnelle). Les transcrits sls (Sécologanine synthase) sont localisés au niveau des épidermes et du parenchyme palissadique dans les feuilles, tandis que les protéines SLS (Sécologanine synthase) sont uniquement détectées dans les épidermes (Irmler et al., 2000). Les transcrits *str* (Strictosidine synthase) et *tdc* (Tryptophane décarboxylase) sont exclusivement localisés au niveau des tissus épidermiques dans les parties aériennes, alors que dans les racines, ils sont exprimés au niveau des cellules corticales (St-Pierre et al., 1999). L'expression du gène *sgd* (Strictosidine β-D-glucosidase), assurant la première modification de la strictosidine, a été également détectée au niveau de l'épiderme des jeunes feuilles (V. Burlat,

communication personnelle). Enfin, les gènes *d4h* et *dat*, catalysant les étapes terminales de la biosynthèse de la vindoline, s'expriment de façon restreinte dans les cellules spécialisées des laticifères et des idioblastes, dans les parties aériennes de la plante (St-Pierre et al., 1999). Au moins, trois types cellulaires distincts participent à la biosynthèse des AIM dans les parties aériennes. Le recrutement de ces différents types de cellules, pour les étapes précoces et tardives de la biosynthèse des AIM, implique des événements de transport de précurseurs d'un type cellulaire à l'autre, révélant un niveau de complexité supplémentaire. Au final, la biosynthèse des AIM chez *C. roseus* s'avère être un processus hautement compartimenté et spécialisé dont l'organisation complexe repose sur une différenciation métabolique et biochimique de différents types cellulaires au sein de la plante. Les cultures cellulaires de *C. roseus* demeurent un outil d'étude et source alternative pour la production d'AIM. L'utilisation importante des AIM de *C. roseus* et leur faible taux de biosynthèse *in planta*, ont conduit à la recherche de stratégies alternatives de production et à l'étude de leurs mécanismes de régulation. A ce titre, les cultures cellulaires de *C. roseus* représentent des outils particulièrement intéressants. En effet, ce sont des systèmes bien définis et homogènes rendant d'autant plus facile le traitement des cellules végétales par des hormones, des inhibiteurs ou par divers stress abiotiques, dans le but d'induire ou d'augmenter la synthèse d'AIM d'intérêts. En particulier, la recherche, dans une première étape, s'est orientée vers la sélection des lignées hautement productrices. L'influence de la modification de la teneur du milieu de culture en éléments carbonés, azotés, en phosphate ou en régulateurs de croissance, ainsi que l'influence des conditions de culture (température, pH, lumière), ou des traitements par des éliciteurs ont été étudiées très activement (voir pour revue, van der Heijden et al., 1989 ; Moreno et al., 1995, van der Heijden et al., 2004). Cependant, la vitesse de synthèse des métabolites d'intérêts reste trop lente et les taux de production encore insuffisants (van der Heijden et al., 1989). De plus, les lignées cellulaires obtenues à ce jour, se révèlent incapables de synthétiser des AIM dimères. En effet, les activités des enzymes NMT, D4H et DAT qui catalysent les trois dernières étapes de synthèse de la vindoline sont indétectables dans les suspensions cellulaires de *C. roseus* (De Luca et al., 1987). Seule la synthèse d'AIM monomériques comme l'ajmalicine, la serpentine ou la tabersonine a pu être montrée dans des cellules cultivées *in vitro* (Meijer et al., 1993 ; Hallard, 2000).

## 2°) **Caractérisation cellulaire et sub-cellulaire de la voie du méthyl érythritol phosphate (MEP) chez *Catharanthus roseus*.**

**2.1°)** Several cell populations that differentially accumulate MEP pathway-enzymes are revealed by extensive study of 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (hds) from *Catharanthus roseus*. (A. Oudin, S. Mahroug, V. Courdavault, N. Hervouet, C. Zelwer, M. Rodríguez-Concepcion, B. St-Pierre, V. Burlat : un travail de recherche présenté comme chapitre de la thèse; cet article a été soumis à *Plant Physiology*. **N.B :** des modifications et des ajouts ont été effectués sur cette article après la thèse, puis soumis une deuxième fois à *Plant Molecular Biology* sous l'intitulé : **Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*.** (A. Oudin, S. Mahroug, V. Courdavault, N. Hervouet, C. Zelwer, M. Rodríguez-Concepcion, B. St-Pierre, V. Burlat) (Article accepté en Juillet 2007)

Mon implication dans cet article entant qu'un co-auteur a concerné les travaux d'immunocytochimie, d'hybridation *in situ*, ces études ont permis de définir l'expression et la co-localisation d'épitopes de la protéine enzymatique et le gène correspondant 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (HDS) de la voie de Méthyl Erythritol Phosphate (MEP) respectivement par immunocytochimie et hybridation *in situ* au niveau des cellules spécialisées de parenchyme de phloème interne (PPI). Les travaux en microscopie électronique en transmission révèlent clairement la localisation de la protéine HDS au niveau de stroma des plastes dans les feuilles de *Catharanthus roseus*. Grâce à une analyse semi-quantitative de la densité des immunomarquages à l'or colloïdal observée en MET, des populations additionnelles d'épitopes de HDS ont été révélées au niveau des plastes de l'épiderme et du mésophylle, mais avec une densité bien moindre par rapport aux plastes du PPI (parenchyme associé au phloème interne).

## **2.2°) Co-localisation cellulaire des huit étapes de la voie MEP chez *Catharanthus roseus*. (S. Mahroug, V. Courdavault, A. Oudin, B. St-Pierre, V. Burlat, Travaux non publiés)**

Ce deuxième sous-chapitre permet de terminer la caractérisation cellulaire chez *C. roseus* des huit étapes constituant la voie MEP, en étudiant par hybridation *in situ* la caractérisation cellulaire des quatre étapes de la voie MEP non encore étudiées (CMS : 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, CMK : 4-diphosphocytidyl-2C-méthyl-D-érythritol kinase, HDR 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate réductase, IDI : Isopentényl Diphosphate Isomérase) et d'un deuxième clone codant la première étape déjà caractérisée (DXS2).

Les résultats obtenus viennent confirmer que le parenchyme associé au phloème interne est le site unique de détection des transcrits de la voie MEP. Ceci vient confirmer les résultats précédents montrant l'expression de

*DXS*, *DXR*, *MECS*, *G10H* (Burlat et al., 2004) et *HDS* (Oudin et al. 2007) au niveau de ces cellules parenchymateuses associées au phloème interne. Un autre résultat intéressant est la co-expression de *DXS2* dans le PPI au même titre que les autres gènes de la voie MEP. Etant donné que toutes les étapes situées entre la *DXR* et *HDR* (4-hydroxy-3-méthylbut-2-enyl diphosphate (HMBPP) réductase) font appel à des enzymes codées par un seul gène et que les gènes correspondant sont co-exprimés dans le PPI des parties aériennes de la plante.

### 3°) **Rôle de l'épiderme dans la biosynthèse des AIM et d'autres métabolites secondaires chez *Catharanthus roseus*.**

L'épiderme, ce tissu où se déroule les trois étapes centrales de la voie des AIM de *C. roseus*, été plus particulièrement étudié. En effet, la dernière étape de la voie des indoles (tryptophane décarboxylase, TDC), la dernière étape de la voie de monoterpènes sécoiridoïdes (sécologanine synthase, SLS) ainsi que l'étape de condensation conduisant à la strictosidine, premier AIM (strictosidine synthase, STR) se déroulent dans ce tissu.

#### 3.1°) **Une quatrième étape de la partie centrale de la voie des AIM de *Catharanthus roseus* se déroule dans l'épiderme: Localisation de l'expression du gène de la strictosidine $\beta$ -D-glucosidase. (S. Mahroug, G. Charles, B. St-Pierre, V. Burlat, Travaux publiés)**

Au cours de la voie des AIM, et suite à la condensation du précurseur indolique (tryptamine) et du précurseur monoterpénique (sécologanine) en strictosidine sous l'action de la strictosidine synthase, le résidu glucose du premier métabolite de la série des AIM ainsi formé est hydrolysé par la strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase (SGD). L'étude de l'expression tissu-spécifique de ce gène, codant l'enzyme intervenant juste après la STR lors de la voie de biosynthèse des AIM, a été réalisée par hybridation *in situ*. Ce travail a en partie été réalisé lors d'un stage d'un étudiant en Maîtrise Biologie Cellulaire et Physiologie. Les résultats ont permis de montrer que ce gène était également spécifiquement exprimé au niveau de l'épiderme. Cette partie nous a permis de compléter la cartographie de l'expression tissulaire des gènes de la voie des AIM, constituant donc désormais un pool de quatre étapes centrales successives se déroulant au niveau de l'épiderme (TDC, SLS, STR, SGD). Pour compléter cette potentiellement transporté de l'épiderme vers les laticifères-idioblastes reste également à déterminer. Pour cela, il conviendra d'identifier deux étapes successives localisées dans deux tissus différents. Par ailleurs, en plus de la notion de transport intercellulaire, il convient de considérer également la notion de transport intracellulaire.

#### 3.2°) **Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. (S. Mahroug, V. Courdavault, M. Thiersault, B. St-Pierre, V. Burlat, Travaux publiés dans *Planta* (2006) 223: 1191-1200)**

Cette partie a donné lieu à un article de recherche publié dans *Planta*. Elle concerne l'étude de la localisation cellulaire de voies métaboliques latérales par rapport à la voie des AIM chez *C. roseus*. En effet le chorismate est le point d'embranchement entre la voie des indoles conduisant aux AIM et la voie des phénylpropanoïdes conduisant notamment à la biosynthèse des lignines et des flavonoïdes. Le profil d'expression de trois gènes de la voie des phénylpropanoïdes (phénylalanine ammonia lyase, PAL, cinnamate 4-hydroxylase, C4H, chalcone synthase CHS) a été étudié, permettant de voir que ces trois gènes pouvaient être co-exprimés au niveau de l'épiderme supérieur des feuilles et des pétales, avec la TDC, SLS et STR ; enzymes impliquées dans l'étape centrale des AIM. Ces résultats ainsi que la comparaison des profils alcaloïdiques et flavonoïdiques dans des suspensions cellulaires de *C. roseus* étudiées en termes de fluorescence alcalo-flavonoïques permettent de valider d'un point de vue spatio-temporel, l'hypothèse de mécanismes communs de régulation de quatre voies métaboliques secondaires différentes (phénylpropanoïdes, indoles, monoterpènes sécoiridoïdes, AIM).

### 4°) **Utilisation de l'hybridation *in situ* pour la caractérisation de clones impliqués ou potentiellement impliqués dans la voie des AIM chez *Catharanthus roseus***

#### 4.1°) **La localisation tri-cellulaire de la cytochrome P450 réductase prédit une localisation tri-cellulaire des enzymes à cytochrome P450 chez *Catharanthus roseus*. (S. Mahroug, B. St-Pierre, V. Burlat, Travaux non publiés)**

Chez les plantes supérieures, les CYP450 sont des monooxygénases, utilisées dans de nombreux métabolismes tels que la biosynthèse des lignines, des flavonoïdes, des stérols, des acides gras, ou des gibbérélines, ainsi que dans de nombreux processus de détoxification (Schuler and Werck-Reichhart, 2003). Trois clones d'enzymes à cytochrome P450 ont un patron d'expression établi chez *C. roseus* [géraniol 10-hydroxylase (CYP76B6, G10H),

sécologanine synthase (CYP72A1, SLS), cinnamate 4-hydroxylase (CYP73, C4H)]. Ces trois clones sont exprimés respectivement au niveau du parenchyme du phloème interne (CYP76B6, G10H), de l'épiderme (CYP72A1, SLS) et de l'épiderme (supérieur) et du xylème (CYP73, C4H). Les enzymes à cytochrome P450 nécessitent, pour être actives, l'activité conjointe d'une cytochrome P450 réductase (CPR) dont un clone est connu chez *C. roseus*. Pour être actives, les CYP450 ont besoin d'être couplées à des protéines donneuses d'électrons, les NADPH:cytochrome P450 réductases (CPR) ou le cytochrome b5, également ancrées à la surface du réticulum endoplasmique. Dans ce sous-chapitre, nous nous intéressons donc à la localisation de l'expression de CPR dans les organes aériens jeunes de *C. roseus*. Le profil d'expression de la CPR a révélé une expression spécifique au niveau de la somme des trois tissus dans lesquels les trois enzymes à cytochrome P450 sont exprimées (parenchyme du phloème interne, épidermes et xylème). Ce résultat est discuté dans un contexte plus large, notamment en considérant la possibilité que cela puisse indiquer une expression dans l'un de ces trois tissus de l'ensemble des enzymes à cytochromes P450 chez la pervenche, ou de façon encore plus prospective, une expression des nombreuses enzymes à cytochrome P450 végétales dans un nombre restreint de cellules.

Les résultats obtenus par hybridation *in situ* indiquent clairement que le seul gène connu de CPR de *C. roseus* présente un patron d'expression tri-cellulaire en plein accord avec l'expression tissu-spécifique des trois gènes de CYP450 du métabolisme secondaire de *C. roseus* déterminée par la même technique à ce jour (Mahroug *et al.*, 2006a; Burlat *et al.*, 2004; Irmeler *et al.*, 2000).

#### **4.2°) Recherche de clones d'UDP-glucose glucosyl transférases potentiellement impliqués dans la biosynthèse des AIM chez *Catharanthus roseus*: Criblage de 8 clones par hybridation *in situ*. La localisation d'UGT2 et de 10HGO indiquerait l'intervention d'une quatrième population cellulaire dans la voie des AIM. (S. Mahroug, R. Joubert, B. St-Pierre, V. Burlat, Travaux non publiés en partie issus du M2R en 2006)**

Dans ce sous-chapitre, une utilisation beaucoup plus systématique de l'hybridation *in situ* a été entreprise. La caractérisation de la voie de biosynthèse des AIM de *C. roseus* progresse de façon considérable mais de larges plages de cette voie restent encore inconnues. Certaines étapes contrôlées par les glucosyltransférases. C'est cette dernière famille qui a fait l'objet de l'étude présentée ici. Lors de la voie des monoterpènes sécoiridoïdes un clone codant l'enzyme de la troisième étape (10-hydroxygéraniol oxydoréductase, 10HGO) a été isolé mais n'a pas encore été formellement identifié fonctionnellement. De plus, une activité enzymatique a été décrite pour l'avant dernière étape (désoxyloganine 7-hydroxylase, DL7H) mais le clone correspondant n'a pas été isolé. Dans le cadre du stage d'un étudiant de Master II Recherche réalisé au Laboratoire lors de ma dernière année de thèse, une approche de génomique fonctionnelle a donc été entreprise. A l'aide d'une amorce dégénérée consensus sept ADNc de la famille multigénique des UDP-glucose glucosyl transférases (UGT) ont été clonés. Le clonage de 7 nouvelles UGTs a par la suite reposé sur l'utilisation d'une amorce dégénérée définie sur la partie 5' de la séquence consensus PSPG-box et d'une amorce du vecteur de la banque, devant permettre d'amplifier environ les deux tiers d'UGTs du côté 5' (N-terminal).

Le patron d'expression tissu-spécifique uniquement de 5 de ces clones a déjà été étudié par hybridation *in situ* dans le but de faire un premier tri des clones exprimés dans des tissus "alcaloïde-spécifiques". Le profil d'expression commun d'UGT2 et de 10HGO au niveau de la partie supérieure du parenchyme lacuneux pourrait indiquer l'intervention d'un quatrième groupe cellulaire lors de la voie de biosynthèse des AIM.

L'analyse par hybridation *in situ* de l'expression tissu-spécifique des UGTs et la comparaison des patrons d'expression obtenus avec ceux de gènes de la voie des monoterpènes sécoiridoïdes indique le fait qu'UGT2 et 10HGO soient co-exprimés dans un tissu jusque là non impliqué dans la synthèse des AIM, semblerait venir ajouter une complexité supplémentaire à cette voie de biosynthèse.

#### **4.3°) Purification, molecular cloning and cell-specific gene expression of the alkaloid-accumulation associated protein CrPS in *Catharanthus roseus*. (D. Lemenager, L. Ouelhazi, S. Mahroug, B. Veau, B. St-Pierre, M. Rideau, J. Aguirreola, V. Burlat, M. Clastre, Travaux publiés dans *Journal of Experimental Botany* (2005) 56: 1221-1228)**

Ce dernier sous-chapitre concerne un dernier exemple de l'utilisation de la "base de donnée" des profils d'hybridation connus des gènes de la voie des AIM, pour réaliser des comparaisons avec le patron d'expression de gènes de fonction inconnue. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. M. Clastre EA 2106 à Tours. La protéine S est un polypeptide qui a été identifié il y a une dizaine d'années au laboratoire par une approche protéomique en comparant les profils d'électrophorèse bidimensionnelle d'extraits protéiques de suspensions cellulaires de *C. roseus* cultivées en milieu de maintenance de la croissance cellulaire et en milieu d'induction de la production d'AIM. La protéine S correspondait à un spot apparaissant de façon nette en condition de

production des AIM. Ce spot a été microséquencé puis l'ADNc correspondant a été cloné. Il s'agit d'une protéine de la famille des  $\alpha\beta$ -hydrolases dont certains membres présentent une activité estérase, mais dont le substrat reste inconnu à ce jour chez *C. roseus*. Ma participation à cet article a consisté à montrer par hybridation *in situ* que ce clone était co-exprimé avec les gènes de la voie MEP et la G10H au niveau du parenchyme associé au phloème interne. Ce résultat permet de définir des pistes potentielles pour la recherche de la fonction de ce gène dans la voie de biosynthèse des AIM ou, plus probablement, dans une étape de régulation de cette voie.


### **5°) Conclusion des travaux**


Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de compléter de façon significative la cartographie d'expression tissulaire de gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) mais également dans la voie de biosynthèse d'autres métabolites secondaires, les phénylpropanoïdes. Une vision globale des 13 gènes dont le patron d'expression a ainsi pu être déterminé est présentée sur la Figure ci-dessus. Il apparaît que ces gènes se positionnent à différents niveaux de la voie de biosynthèse (voie MEP, voie des monoterpènes sécoiridoïdes, voie des AIM à proprement parler et voie des phénylpropanoïdes), mais également en parallèle de la voie avec un rôle de régulation supposé.

Ces travaux ont parfois permis une étude exhaustive d'une portion de voie comme par exemple la caractérisation quasi finale du patron d'expression de tous les gènes de la voie MEP. Cette approche globale a en effet permis de localiser la co-expression de 9 gènes dans le parenchyme associé au phloème interne (PPI), confirmant ainsi l'importance réelle de ce type cellulaire particulier pour le début de la synthèse des AIM.



**CODES DES PATRONS  
D'EXPRESSION TISSU-SPECIFIQUE  
DANS LES ORGANES AERIENS DE *C. roseus***

 parenchyme associé  
au phloème interne

 partie supérieure du  
parenchyme lacuneux

 épiderme

 laticifères et idioblastes

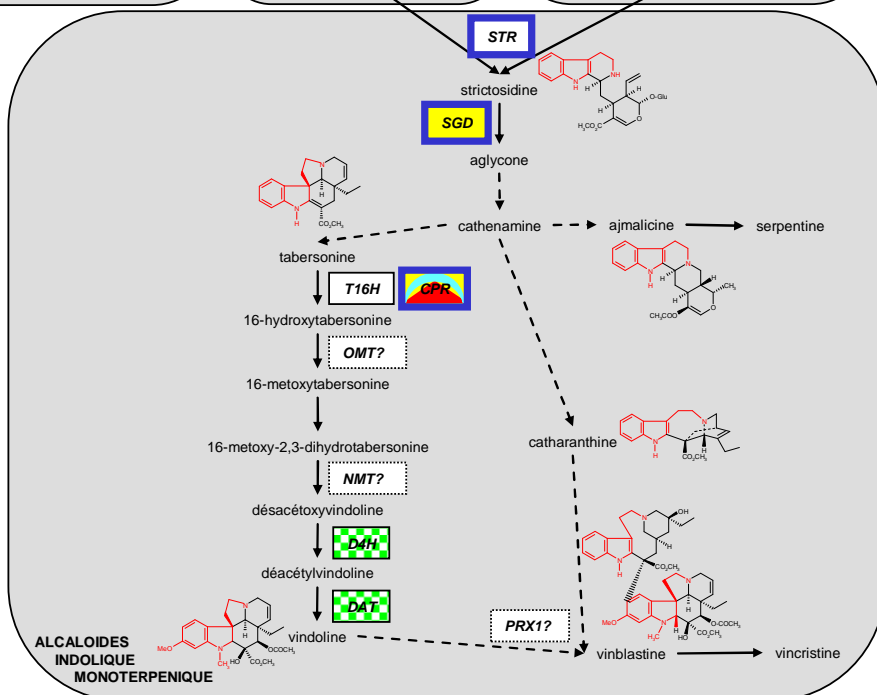
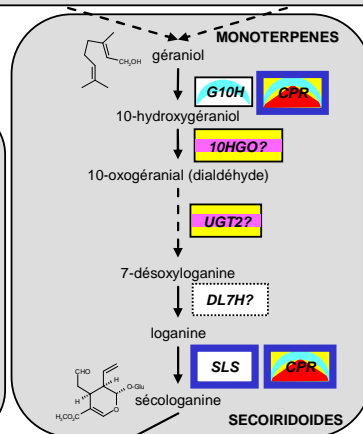
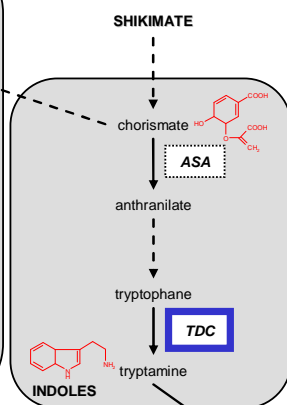
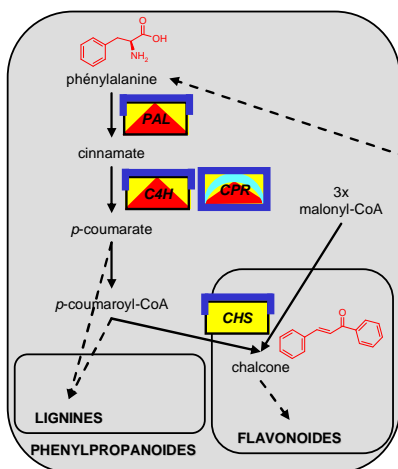
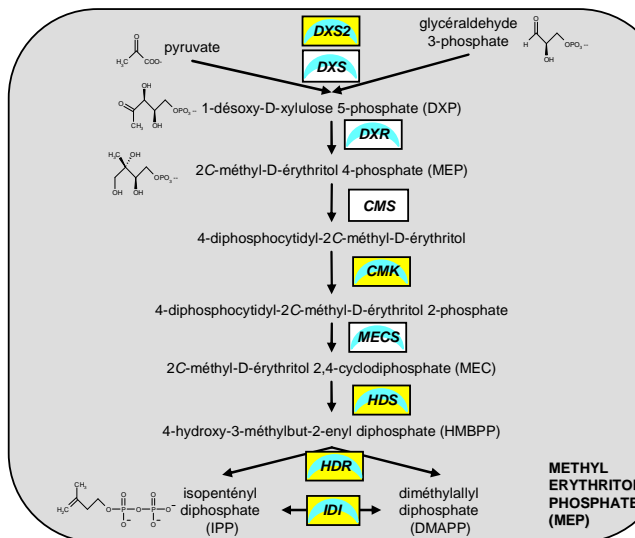
 localisation non reporté chez *C. roseus*

 absence d'expression

 ? gène non cloné ou activité non  
caractérisée

 localisation déterminée  
au cours de cette thèse

 PS



**Figure 1: État des lieux en fin de thèse de la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIMs) anti-cancéreux dans les organes aériens de *Catharanthus roseus*, précisant le patron d'expression tissu-spécifique des gènes clonés.**

Les clones surlignés en jaune sont ceux dont les patrons d'expression ont été définis au cours de cette thèse. Les flèches en traits pleins indiquent des étapes enzymatiques définies, les flèches en traits interrompus indiquent que plusieurs étapes enzymatiques interviennent.

1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (**DXS**), 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase homologue (**DXS2**), 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (**DXR**), 4-diphospho-cytidyl-2C-méthyl-D-érythritol synthase (**CMS**), 4-diphosphocytidyl-2C-méthyl-D-érythritol kinase (**CMK**), 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (**MECS**), 4-hydroxy-3-méthylbut-2-enyl diphosphate (HMBPP) synthase (**HDS**), HMBPP réductase (**HDR**), isopentényl diphosphate (IPP) isomérase (**IDI**), géraniol 10-hydroxylase (CYP76B6) (**G10H**), 10-hydroxygéraniol oxydo-réductase (**10HGO**), UDP-glucose-glycosyltransférase 2 (**UGT2**), 7-désoxyloganine 7-hydroxylase (**DL7H**), sécologanine synthase (CYP72A1) (**SLS**), sous unité  $\alpha$  de l'antranilate synthase (**ASA**), tryptophane décarboxylase (**TDC**), strictosidine synthase (**STR**), strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase (**SGD**), tabersonine 16-hydroxylase (CYP71D12) (**T16H**), 16-hydroxytabersonine O-méthyltransférase (**OMT**), 2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine-N-méthyl transférane (**NMT**), désacétoxyvindoline 4-hydroxylase (**D4H**), déacétylvindoline 4-O-acétyl transférase (**DAT**), peroxydase (**PRX1**), cytochrome P450 réductase (**CPR**), phénylalanine ammonia lyase (**PAL**), cinnamate 4-hydroxylase (CYP73) (**C4H**), chalcone synthase (**CHS**), protéine S (**PS**). Les patrons d'expression proviennent des références suivantes: *DXS*, *DXR*, *MECS*, *G10H* (Burlat et al., 2004), *TDC*, *STR*, *D4H*, *DAT* (St-Pierre et al., 1999), *SLS* (Irmler et al., 2000), *PAL*, *C4H*, *CHS* (Mahroug et al., 2006), protéine S (Lemenager et al., 2005) ou de résultats non encore publiés issus de cette thèse.

## **6°) Perspectives de recherches en cours**

Au sein de la faculté des Sciences, le département des sciences de l'environnement envisagera de réunir ses équipes de recherches sous une direction commune d'un laboratoire de recherche à fin d'établir une symbiose scientifique étroite entre les différents axes de recherche développés par les membres de ce département. Ces axes se définissent par des activités de recherche développées dans le laboratoire « Conservation et Biodiversité Végétale » dont la vocation est la valorisation des espèces et des espaces et l'étude des aspects écologiques des végétaux dans le contexte de l'amélioration et la conservation des plantes médicinales et des plantes d'intérêt.

L'approche méthodologique que j'envisage appliquer et développer au sein de cette équipe en collaboration avec les membres et les connaisseurs du domaine concerne les aspects physiologiques, moléculaires et cellulaires à savoir :

➤ L'application des techniques basiques de biologie moléculaire et cellulaire (PCR, immunocytochimie, cytobiologie, microscopie et ultra-microscopie,...) pour une meilleure identification des espèces.

➤ La mise en œuvre des techniques plus poussées de culture *in vitro* pour la multiplication, la régénération et le sauvetage de nombreuses espèces ou variétés rares du territoire de la région d'ouest algérien .

➤ L'étude des biomolécules végétales d'intérêt dans l'industrie et la santé liées aux voies de métabolisme secondaire chez les plantes initiées dont : le métabolisme phénolique (flavonoïdes, lignines, tanins, quinones,...), métabolisme des isoprénoides (terpènes, caroténoïdes,...), voies particulières du métabolisme azoté (amines, alcaloïdes,...) pour la compréhension de ses métabolismes en premier lieu, et de découvrir d'éventuelles molécules actives par le biais de diverses techniques de biologie moléculaire

➤ les techniques de transgénèse, et l'usage des protéines recombinantes dans la biothérapie, par approche de génomique fonctionnelle (études des protéines, localisation d'expression des gènes, techniques de l'ADN recombiné et le transfert de gènes, ...), ces derniers se sont parfaitement maîtrisés au cours de mes années de Doctorat.

➤ Il s'agit aussi de la mise en place des nouvelles biotechnologies en relation avec l'environnement et l'écologie comme la micropropagation d'espèces végétales en conditions difficiles, l'amélioration génétique d'espèces végétales (céréales, agrumes, maraîcher,...) pour l'agriculture en conditions difficiles marquées, entre autres, par la sécheresse, la salinité et les agents phytopathogènes, la bioconversion de déchets, la réutilisation des eaux usées et la dépollution des côtes maritimes.

En fin, il est judicieux d'encourager des collaborations internes et/ou externes à fin d'organiser l'exploitation, la gestion et la prospection de la biodiversité de la flore algérienne qui constitue un réservoir de gènes nécessaires pour le développement de toute sorte de biotechnologies ; bien que les ressources génétiques de la flore sont devenues de véritables enjeux industriels, dans les domaines de pharmacies, cosmétiques et d'agro-alimentaires.

## **7°) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Burlat V, Oudin A, Courtois M, Rideau M, St-Pierre B** (2004). Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10 hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant J.* **38**: 131-141.

**De Luca V, Cutler AJ** (1987). Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **85**: 1099-1102.

**Hallard D** (2000). Transgenic plant cells for the production of indole alkaloids. *PhD thesis, University of Leiden, The Netherlands*.

**Irmeler S, Schroder G, St-Pierre B, Crouch NP, Hotze M, Schmidt J, Strack D, Matern U, Schroder J** (2000). Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J.* **24**: 797-804

**Levêque D, Wihlm J, Jehl F** (1996). Pharmacology of *Catharanthus* alkaloids. *Bull. Cancer* **83**: 176-186.

**Mahroug S, Courdavault V, Thiersault M, St-Pierre B, Burlat V** (2006a). Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. *Planta* **223**: 1191-1200.

**Mahroug S, Burlat V, St-Pierre B** (2006b). Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Phytochem. Rev.* (in press)

**Meijer AH, Verpoorte R, Hoge JHC** (1993a). Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Res.* **3**: 145-164.

**Moreno PRH, van der Heijden R, Verpoorte R** (1995). Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: a literature survey. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **42**: 1-25.

**Schuler MA, Werck-Reichhart D** (2003). Functional genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 629-667.

**Sottomayor M, Lopez-Serrano M, DiCosmo F, Ros Barceló A** (1998). Purification and characterization of alpha-3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *FEBS Lett.* **428**: 299-303.

**Sottomayor M, Ros Barceló A** (2003). Peroxidase from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and the biosynthesis of alpha-3',4'-anhydrovinblastine: a specific role for a multifunctional enzyme. *Protoplasma* **222**: 97-105.

**St-Pierre B, De Luca V** (1995). A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion

## **SYNTHESE DES TRAVAUX POST-THESE** **2007-2010**

Sur ce volet, l'ensemble des travaux publiés après les études de doctorat, sont présentés sous forme de résumé de chaque article de recherche

### **Travaux publiés après la soutenance de thèse de Doctorat par ordre d'apparition :**

**Audrey Oudin , Samira Mahroug , Vincent Courdavault , Nadège Hervouet , Charles Zelwer, Manuel Rodríguez-Concepción , Benoît St-Pierre and Vincent Burlat**

Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. (2007) *Plant Mol Biol.* DOI: 10.1007/s11103-007-9190-7. indexed for MEDLINE.

**Pierre Poutrain Grégory Guirimand , Samira Mahroug, Vincent Burlat, Céline Melin, Olivia Ginis, Audrey Oudin,nathalie. Giglioli-Guivarc'h, Olivier Pichon, Vincent Courdavault.**

Molecular cloning and characterisation of two calmodulin isoforms of the Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*. (2009) *Plant Biology*. ISSN 1435-8603.

**Grégory Guirimand , Anthony Guihur , PierrePoutrain , Francois Héricourt , Samira Mahroug , Benoit St-Pierre, VincentBurlat, Vincent Courdavault.**

Spatial organization of the vindoline biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. (2010) *Journal of Plant Physiology*. DOI:10.1016/j.jplph.2010.08.018.

**Grégory Guirimand, Vincent Courdavault, Arnaud Lanoue, Samira Mahroug, Anthony Guihur, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Benoit St-Pierre, Vincent Burlat.**

Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"? (2010) *BMC Plant Biology*. 10:182, Open Access: 1471-2229/10/182.

### 1. Strictosidine activation in *Apocynaceae*: towards a “nuclear time bomb”?

Grégory Guirimand, Vincent Courdavault, Arnaud Lanoue, **Samira Mahroug**, Anthony Guihur, Nathalie Blanc, Nathalie Giglioli-Guivarc’h, Benoit St-Pierre, Vincent Burlat.

Les enzymes impliquées dans la voie de biogenèse des AIMs sont localisées dans différents types cellulaires. Les étapes précoces de la branche terpénique sont localisées dans les cellules du parenchyme associées au phloème interne. Les étapes centrales et communes du métabolisme des AIMs se déroulent dans les épidermes. La méthode de détection des transcrits par l’hybridation *in situ* pourra être appliquée à plusieurs autres étapes enzymatiques de la voie de biosynthèse des AIM, pour lesquelles la localisation et les profils d’expression d’une réaction enzymatique de l’étape centrale de cette voie reste à déterminer. De cette façon, la meilleure compréhension de la compartimentation subcellulaire de cette voie de synthèse devrait permettre de mieux cerner les étapes où interviennent des mécanismes de transport de métabolites intermédiaires.

Sur cette publication apparue au *BMC Plant Biology*, ma participation personnelle comme co-auteur se présente sur la mise en évidence d’expression tissulaire de clone *SGD* au niveau des feuilles de la Pervenche passant par un clonage systématique de l’ADNc suivi par la synthèse *in vitro* des sondes froides correspondantes.

**Strictosidine bêta-D-GLUCOSIDASE (SGD)** : enzyme appartient à la famille des [hydrolases](#), spécifiquement ces glycosidases qui hydrolysent les composés O- et S-glycosyliques. Le nom systématique de cette classe d’enzymes est **strictosidine bêta-D-GLUCOHYDROLASE**. Cette enzyme participe à la biosynthèse d’indole et d’alcaloïdes.

Par des tests d’hybridation *in situ*, le transcrit *SGD* présente un profil d’expression au niveau des cellules épidermiques supérieures et inférieures. Tel résultat présente une similitude entre ce dernier et les profils d’expression des *TDC*, *SLS*, *STR* et explique la co-expression et la co-accumulation de ces quatre gènes potentiels au niveau de l’épiderme supérieur et inférieur des feuilles de *Catharanthus*. Aussi ce type cellulaire révèle l’hypothèse d’un éventuel transport cellulaire puisque les gènes intervenants dans les réactions enzymatiques tardives en occurrence le D4H et DAT sont accumulés de façon restreinte au niveau des laticifères et idioblastes.

### 2. Molecular cloning and characterisation of two calmodulin isoforms of the Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*

Pierre Poutrain, Grégory Guirimand, **Samira Mahroug**, Vincent Burlat, Céline Melin, Olivia Ginis, Audrey Oudin, Nathalie Giglioli-Guivarc’h, Olivier Pichon, Vincent Courdavault.

La vinorelbine est un nouvel alcaloïde extrait de la pervenche qui interfère avec les microtubules. Les alcaloïdes de la pervenche ont une structure similaire constituée de deux unités à cycles multiples, la vindoline et la catharanthine. La vinorelbine est un alcaloïde de la pervenche dans lequel l’unité catharanthine est le siège d’une modification structurale. Cette particularité lui confère des propriétés pharmacologiques uniques pouvant se traduire par des avantages cliniques dans le traitement de tumeurs malignes diverses. L’activité antitumorale de la vinorelbine semble principalement due aux effets inhibiteurs exercés sur la mitose, durant la métaphase, par interaction avec la tubuline. La vinorelbine peut en outre entraver le métabolisme des acides aminés, de l’AMP cyclique et du glutathion, l’activité de l’ATPase dans le transport des ions Ca<sup>++</sup> calmoduline-dépendants, la respiration cellulaire, ainsi que la biosynthèse des lipides. Deux isoformes des calmodulines sont étudiées par approche génomique et finie par une étude en hybridation *in situ*.

Les résultats obtenus montrent une absence de marquage épidermique et uniquement les vaisseaux conducteurs donnent un marquage bien présent.

### 3. Spatial organization of the vindoline biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*.

Grégory Guirimand, Anthony Guihur, Pierre Poutrain, François Héricourt, **Samira Mahroug**, Benoit St-Pierre, Vincent Burlat, Vincent Courdavault.

La Vindoline constitue un essentiel alcaloïde terpeno-indolique accumulé dans les feuilles de *Catharanthus roseus*, les travaux ultérieurs ont montrés que quatre gènes sont impliqués dans sa biosynthèse. Par contre, l’organisation spatio-temporelle de la voie de la tabersonine-vindoline est à présent incomplète, pour poursuivre

cette étude notamment de l'enzyme, 16-hydroxytabersonine 16-O-méthyltransférase (16OMT), les approches de construction plasmique, de PCR, de la transcription *in vitro* suivies par l'hybridation *in situ* du *16OMT* est entreprise pour élucider la localisation tissulaire au niveau de divers organes tels les grains en germination, les jeunes feuilles de la pervenche de Madagascar dont les tissus bien marqués sont l'épiderme supérieur et inférieur. Ce résultat est comparé avec des coupes sériées transversales testées avec les sondes de *sls* et *dat*.