

Architecture des voies terpéniques impliquées dans la biosynthèse des alcaloïdes chez la pervenche de Madagascar

Catharanthus roseus

A. Oudin¹ K. Chahed¹
B. Veau¹ J.-C. Chenieux¹
M. Courtois¹ M. Rideau¹
N. Guivarc'h¹ M. Clastre¹

Introduction

Catharanthus roseus (L.) G. Don (Apocynacée), la pervenche de Madagascar est une plante médicinale répandue dans toutes les régions tropicales. L'importance pharmaceutique de cette plante est due à la présence d'alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM). Ainsi les alcaloïdes dimères, tels la vincristine et la vinblastine, accumulés dans les feuilles, sont des antitumoraux. L'ajmalicine, un alcaloïde monomère, produit dans les racines, possède des effets

¹ EA2106 Biomolécules et biotechnologies végétales, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.

anti-hypertenseurs (Levêque *et al.*, 1996). La culture de suspensions cellulaires de *C. roseus* est une voie alternative pour la production de ces alcaloïdes. Toutefois, les taux de synthèse restent trop faibles pour permettre une exploitation commerciale (Moreno *et al.*, 1995). L'optimisation de la production passe par une connaissance plus approfondie des voies de biosynthèse des AIM et de leurs mécanismes de régulation.

La voie de biosynthèse des AIM est composée de nombreuses étapes, toutes n'étant pas encore élucidées, localisées dans divers compartiments cellulaires (Verpoorte *et al.*, 1998) et dans différents organes de la plante (Saint-Pierre *et al.*, 1999). Elle comporte deux voies d'entrées : celle des indoles et celles des terpènes séco-iridoïdes (fig. 1). Celles-ci fournissent respectivement, la tryptamine et la sécologanine qui sont condensées en strictosidine, le premier alcaloïde monomère de la chaîne et le précurseur universel des AIM. La tryptamine dérive du métabolisme primaire par décarboxylation du tryptophane. La biosynthèse de la sécologanine nécessite plusieurs étapes enzymatiques, pour partie localisée dans le compartiment plastidial, à partir de l'isopentényl diphosphate (IPP), le précurseur universel de tous les isoprénoïdes (McGarvey et Croteau, 1995).

Jusqu'à une période récente, il était admis que la biosynthèse de l'IPP se déroulait exclusivement dans le cytoplasme *via* la voie du mévalonate. En étudiant l'incorporation de précurseurs marqués au ^{13}C (glucose et acétate) dans les isoprénoïdes bactériens, le groupe de Rohmer a mis en évidence une voie alternative de biosynthèse de l'IPP dénommée voie de Rohmer ou voie du 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) (Rohmer *et al.*, 1993). Elle débute par la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate produisant le désoxyxylulose 5-phosphate (DXP), une réaction catalysée par la DXP synthase. Le gène correspondant (*dxs*) a été isolé chez les bactéries (Sprenger *et al.*, 1997 ; Lois *et al.*, 1998) et quelques plantes (Bouvier *et al.*, 1998 ; Lange *et al.*, 1998) dont *C. roseus* (Chahed *et al.*, 2000). Lors d'une seconde étape, le DXP est converti en MEP. Cette réaction est catalysée par la DXP réductoisomérase codée par le gène *dxr* qui a été caractérisé chez les bactéries (Takahashi *et al.*, 1998), et deux plantes, *Arabidopsis thaliana* (Schwender *et al.*, 1999) et *Mentha x piperita* (Lange et Croteau,

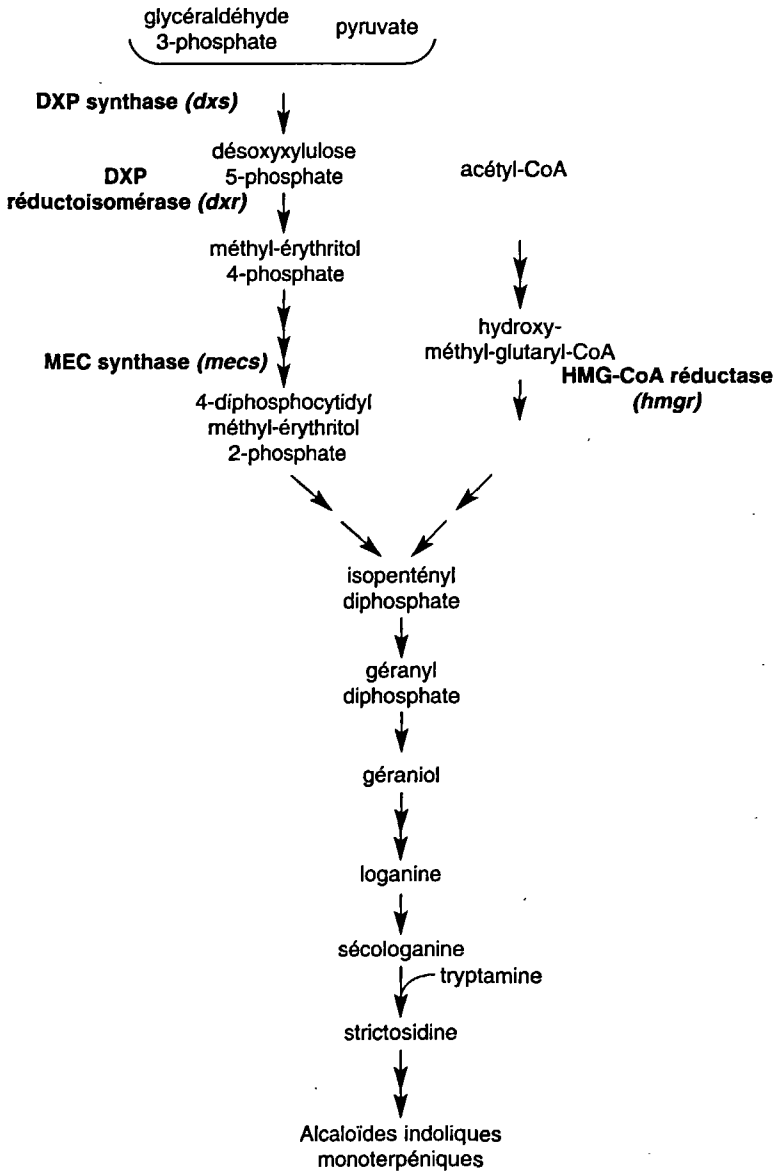


Figure 1
Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) chez *Catharanthus roseus*. Les deux voies (celles du MEP et du mévalonate) conduisant à l'isopentényl diphosphate sont représentées. Les AIM dérivent majoritairement de la voie du MEP.

1999). Les trois étapes suivantes ont été élucidées uniquement chez *Escherichia coli*. L'action séquentielle de deux enzymes codées par les gènes *ygbP* et *yhbB* convertit le MEP en 4-diphosphocytidyl-2C-méthyl-D-érythritol 2-phosphate (Rohdich *et al.*, 1999 ; Lüttgen *et al.*, 2000). Ce dernier est ensuite transformé en 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (MEC) par la MEC synthase codée par le gène *ygbB* (Herz *et al.*, 2000). Les étapes suivantes menant à l'IPP ne sont pas encore identifiées.

Dans le présent article, nous décrivons la caractérisation des ADNc de *C. roseus* codant trois enzymes de la voie du MEP et montrons qu'il existe une forte corrélation entre l'expression des gènes correspondants et l'accumulation alcaloïdique. Par ailleurs, des travaux utilisant des inhibiteurs montrent que les AIM dérivent de la voie du MEP et que celle-ci peut être régulée *via* des protéines prénylées.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et conditions de culture

Les suspensions cellulaires de *C. roseus* (lignée C20) sont entretenues dans un milieu de Gamborg *et al.* (1968) supplémenté en saccharose (58 mM) et contenant 4,5 μ M d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (milieu d'entretien, ME). Afin d'induire la synthèse alcaloïdique, les cellules âgées de sept jours sont repiquées dans un milieu dépourvu de 2,4-D (milieu d'induction, MI). L'ajout de zéatine (5 μ M) au 3^e jour de culture au milieu MI stimule l'accumulation alcaloïdique définissant le milieu producteur (MP) (Décendit *et al.*, 1992). Les cellules sont récoltées par filtration sous vide avant dosage des alcaloïdes et extraction des ARN. La matière sèche (exprimée en mg) est déterminée à partir d'une fiole contenant 50 ml de suspension cellulaire. Les traitements par l'alcool périllylique (1 mM) ainsi que par la fosmidomycine (concentrations comprises entre 0,1 μ M et 100 μ M) sont réalisés au 3^e jour de culture.

Isolement et clonage des ADNc

Oligonucléotides

Pour chaque ADNc isolé, un couple d'oligonucléotides dégénérés a été choisi à partir des motifs conservés présents dans les séquences protéiques homologues de procaryotes et de plantes (tabl. 1).

Nom des gènes	Nom des amorces	Séquences 5'-3'
<i>crdxs</i>	TKT1 (s)	TGG GAY GTI GGI CAY CAR
	TKT2 (as)	CIG CRT GYT GYT CIG CIA T
	TKT3 (as)	CCA GAA GTC TGA CGA ATT GTA T
	TKT4 (s)	AAC AGG CCT TCT TCC TGT TAA
	TKT5 (as)	TTT AGA CCT TCT TCC TGT TAA
	TKT6 (s)	CGA TTT CCA GAC CGA TGT TTT
	TKT22 (s)	pATG GCG GTT TCC GGG GCT GT
	TKT23 (s)	pATG ATC AGT ATA AAG AAA GAA AAA GAT
	TKT24 (as)	pCTC ATT GAA GTT TAA GGG CTT CTT
	<i>crdxr</i>	DXR4 (as)
DXR5 (s)		ATHGGIACICARACIYTIGA
DXR10 (as)		TGACAGAACTAACTGAGGCTTGA
DXR12 (s)		GCTTTGAAGCATCCCCAACTGGAAT
<i>crmeCs</i>	YB2 (s)	GAYMGIGGITGYGARGC
	YB4 (as)	TAICCIGCYTCRTSCAT
	YB6 (as)	TGAAGAAGGTGCTCCTTTCCATT
	YB8 (s)	GGGTTACCGGACATAGGGCAAA

Tableau 1

Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées lors des expériences de PCR, RT-PCR et 3'-RACE-PCR.

TKT1, TKT2, DXR4, DXR5, YB2 et YB4 sont des amorces dégénérées

(H = A, T, C ; K = G, T ; M = A, C ; R = A, G ; S = G, C ; Y = C, T ; I = Inosine).

Les amorces sens (s) et antisens (as) sont indiquées.

Amplification des ADNc

Les amorces ont été utilisées pour amplifier un fragment interne de chaque ADNc par RT-PCR en utilisant le kit « Access RT-PCR System » (Promega) selon les instructions du fournisseur. Chaque fragment est cloné dans le vecteur pGEM-T (Promega). L'analyse des séquences a permis de choisir d'autres amorces qui ont été utilisées pour isoler le cadre ouvert de lecture complet de chaque

ADNc (tabl. 1). Ainsi, l'extrémité 3' des ADNc a été isolée par 3'RACE-PCR (Gibco Brl) avec une amorce sens couplée à un adaptateur- (dT) antisens. Pour isoler la région 5' terminale, des PCR asymétriques ont été réalisées sur une banque ADNc orientée λ -ZAPII de *C. roseus* avec un oligonucléotide antisens choisi à partir de la séquence des fragments internes *dxs*, *dxr* ou *mecs* et l'amorce universelle M13 reverse (orientation sens). Les fragments PCR résultants ont été clonés et séquencés. Les cadres ouverts de lecture complets des ADNc, dénommés respectivement *crdxs*, *crdxr* et *crmecs*, ont été obtenus par une PCR finale à partir d'amorces spécifiques.

Séquençage

Le séquençage des ADNc est effectué par la société Génome Express. Les séquences ont été comparées en interrogeant les banques de données avec l'algorithme BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Les alignements ont été réalisés avec le programme ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). La localisation des protéines a été prédite grâce au logiciel ChloroP (Emanuelson *et al.*, 1999).

Analyse par Northern blot

Les cellules congelées sont broyées en poudre fine dans l'azote liquide. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit « Qiaquick gel extraction » (Qiagen), séparés sur un gel d'agarose 1,6 % contenant 2,2 M de formaldéhyde. Ils sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond N⁺, Amersham-Pharmacia Biotech). La membrane est incubée dans une solution de préhybridation (6 × SSC, 50 % formamide, 0,5 % SDS, 5 × Denhardt's et 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de sperme de saumon dénaturé) pendant 4 h à 42 °C puis dans une solution d'hybridation (6 × SSC, 50 % formamide, 0,5 % SDS, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de sperme de saumon dénaturé) contenant une sonde spécifique radioactive dénaturée. Cette dernière étape se déroule à 42 °C pendant une nuit. La membrane est lavée à température ambiante par deux bains de 20 mn dans une solution composée de 2 × SSC, 0,1 % SDS, puis à 65 °C dans une solution

0,1 × SSC, 0,1 % SDS pendant 10 mn. La membrane est séchée puis mise au contact d'un film autoradiographique (XR-Omat LS Films, Kodak). L'incorporation du nucléotide radiomarqué [α - 32 P]-dCTP dans la sonde ADNc est réalisée à l'aide du kit « Megaprime Labelling kit » (Amersham-Pharmacia Biotech).

Expression de la DXP synthase recombinante

Construction du vecteur d'expression recombinant

Un ADNc tronqué (*tcrdxs*) de la séquence codant le peptide signal en N-terminal a été amplifié avec le couple d'amorces TKT23/TKT24. Le fragment ADNc a été cloné dans le vecteur d'expression PKK223-3 (Amersham-Pharmacia Biotech) au site *Sma*I. Le plasmide résultant, pTCRDXS, est utilisé pour transformer une souche XL1-Blue d'*E. coli*. Les bactéries recombinantes sont cultivées à 37 °C pendant 6 h dans le milieu de Luria-Bertani (LB) contenant 50 μ g.ml⁻¹ d'ampicilline avant d'être induites par 0,5 mM d'IPTG à 25 °C durant une nuit.

Purification partielle

Les cellules recombinantes sont récoltées par centrifugation (5000 × g pendant 10 mn) puis reprises dans un tampon 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) contenant 2,5 mM DTT, 0,5 mM thiamine diphosphate et 2,5 mM MgCl₂. Les cellules sont soniquées puis centrifugées 10 mn à 12 000 × g. Du sulfate d'ammonium solide est ajouté à l'extrait enzymatique brut pour atteindre 40 % de saturation. Après une centrifugation de 30 min à 12000 × g, le culot est dissout dans un tampon A (50 mM Tris-HCl (pH 7,6) contenant 2,5 mM DTT, 0,5 mM thiamine diphosphate, 2,5 mM MgCl₂ et 1 mM PMSF) puis dessalé sur une colonne NAP-10 (Amersham-Pharmacia Biotech). L'extrait protéique est déposé sur une colonne échangeuse d'anions ResourceQ (6 ml) (système AKTApurifier, Amersham-Pharmacia Biotech) prééquilibrée dans le tampon A. Les protéines sont éluées par 60 ml d'un gradient linéaire de NaCl (de 0 à 0,25 M) dans le tampon A. Les fractions recueillies sont utilisées pour les essais enzymatiques et sont analysées par SDS-PAGE.

Essai enzymatique

Un mélange réactionnel composé de 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM thiamine diphosphate, 5 mM D-glycéraldéhyde 3-phosphate, 5 mM [2-¹⁴C]-pyruvate (37 kBq), et un échantillon d'extrait protéique dans un volume final de 100 µl sont incubés pendant 2 h à 37 °C. La réaction est arrêtée par chauffage à 80 °C pendant 3 mn. Après centrifugation, le surnageant est traité par 1 unité de phosphatase alcaline pendant 1 h à 37 °C. Une fraction est déposée sur une plaque de silice (Silica gel 60, Merck). La migration s'effectue dans un solvant acétone/eau/chloroforme/méthanol (50/5/35/10, v/v/v/v). La radioactivité est quantifiée avec un système de détection AMBIS 4000.

Autres techniques

L'analyse des protéines est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (1970). Les concentrations en protéines sont estimées en utilisant le kit Bio-Rad (Bio-Rad assay kit). Enfin, l'ajmalicine est choisie comme marqueur de l'accumulation alcaloïdique et est quantifiée selon la méthode de Yahia *et al.* (1998).

Résultats

Caractérisation des ADNc

Au début de ce travail, seul le gène *dxs* (codant la DXP synthase) d'*E. coli* avait été caractérisé. Ce gène fait partie d'un opéron qui contient aussi le gène *ispA* codant la farnésyl diphosphate synthase. Des organisations similaires sont retrouvées dans d'autres génomes procaryotes comme *Bacillus subtilis* et *Haemophilus influenzae*. Nous avons comparé la séquence protéique de la DXP synthase d'*E. coli* à celles déduites des ORF YqiE et HI1439 adjacents au

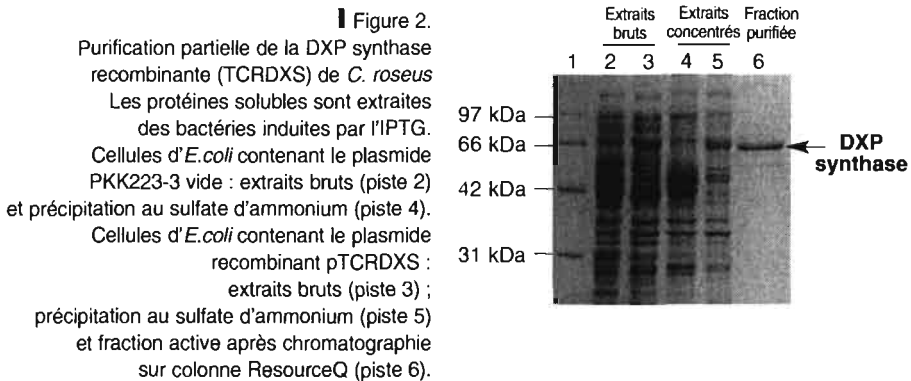
gène *ispA* chez *B. subtilis* et *H. influenzae*. Des amorces dégénérées ont ainsi été choisies, et nous avons amplifié un fragment interne de 930 pb. Les extrémités 5' et 3' ont été caractérisées, respectivement, par PCR asymétrique sur une banque ADNc et par 3'RACE PCR (Chahed *et al.*, 2000). La séquence complète, dénommée *crdxs* (numéro d'accèsion AJ011840), présente un cadre ouvert de lecture codant une protéine de 719 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 78 kDa. L'alignement de la séquence peptidique avec d'autres DXP synthases de plantes caractérisées récemment, a révélé de hauts degrés d'homologies incluant le motif de liaison à la thiamine diphosphate.

Afin d'isoler les ADNc *dxx* et *mecs* codant respectivement la DXP réductoisomérase et la MEC synthase de *C. roseus*, une approche similaire a été entreprise. Des analyses de séquences protéiques homologues au produit des gènes *dxx* et *mecs* d'*E. coli* ont permis d'amplifier les ADNc complets *crdxx* et *crmecs*. La séquence nucléique *crdxx* (numéro d'accèsion AF250235) présente un cadre ouvert de lecture codant un peptide de 474 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 51 kDa. La séquence protéique CRDXXR révèle respectivement 89 % et 76 % d'identité avec les DXP réductoisomérases d'*A. thaliana* (Schwender *et al.*, 1999) et *M. x piperita* (Lange et Croteau, 1999). Quant à l'ADNc *crmecs* (numéro d'accèsion AF250236), il code une protéine de 236 acides aminés de masse moléculaire calculée de 25 kDa. La séquence protéique CRMECS présente 48 % d'identité avec la MEC synthase d'*E. coli* (Herz *et al.*, 2000) et 90 % d'identité avec une protéine de fonction inconnue d'*A. thaliana* (numéro d'accèsion AAF07360). Une analyse réalisée à l'aide du programme ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) a montré que les régions N-terminales de ces trois enzymes possèdent les caractéristiques de séquences d'adressage plastidial (von Heijne *et al.*, 1989). Cette prédiction est en accord avec la localisation subcellulaire de la voie du MEP proposée chez les plantes (Lichtenthaler, 1999).

Expression et purification partielle de la DXP synthase recombinante

La littérature rapporte que l'expression d'une préprotéine complète présentant un peptide d'adressage plastidial n'est pas toujours sou-

haitable pour l'obtention d'une protéine biologiquement active (Williams *et al.*, 1998). Ainsi, un ADNc tronqué de ses 147 premières paires de bases (*tcrdxs*) a été inséré au niveau du site *Sma*I du vecteur d'expression PKK223-3. Le plasmide résultant a été transformé dans *E. coli*. Les protéines solubles ont été extraites de bactéries induites par l'IPTG et séparées par électrophorèse SDS-PAGE. La figure 2 montre la présence d'une bande correspondant à une protéine d'une masse moléculaire apparente de 66 kDa dans les extraits bruts de bactéries recombinantes. Des essais enzymatiques ont été réalisés avec les extraits bruts incubés en présence de pyruvate froid et de D-glycéraldéhyde 3-phosphate. Après déphosphorylation des produits de la réaction, l'analyse par chromatographie sur couche mince a révélé dans les essais enzymatiques réalisés avec les extraits bactériens contenant la protéine recombinante TCRDXS, la présence d'un produit majoritaire. Son rapport frontal est identique à celui du D-1-désoxyxylulose témoin. La quantification des extraits enzymatiques avec du [2-¹⁴C]-pyruvate a montré que ces extraits ont une activité DXP synthase trente fois supérieure (8 nmol.mn⁻¹.mg⁻¹) à ceux des bactéries témoins (0,26 nmol.mn⁻¹.mg⁻¹).



Une purification partielle de TCRDXS a été réalisée. Les protéines de l'extrait brut ont été concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium (40 % de saturation), puis dessalées. L'extrait protéique a été déposé sur une colonne échangeuse d'anions (ResourceQ). La protéine TCRDXS a été éluée par 0,2 M NaCl. Les

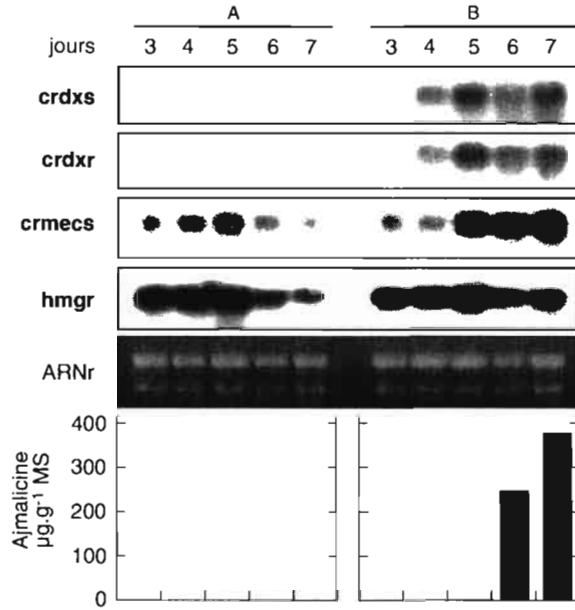
fractions analysées par SDS-PAGE ont montré la présence d'une bande fortement majoritaire vers 66 kDa (fig. 2).

Corrélation de l'expression des gènes *crdxs*, *crdxr* et *crmecs* avec la biosynthèse des AIM

Nous avons étudié l'expression des gènes correspondants par des expériences de Northern blot dans les cultures cellulaires de *C. roseus*. Nous disposons d'une souche (C20) qui n'accumule pas d'AIM lorsqu'elle est cultivée dans le milieu ME. Le transfert des cellules dans le milieu MI induit la production des AIM. L'expression des gènes a été étudiée dans les deux conditions de culture sur des cellules âgées de 3 à 7 jours. Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'expression du gène *hmgr* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1992) codant l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA réductase, une enzyme-clé de la voie du mévalonate. Comme le montre la figure 3, aucun transcrit *crdxs* et *crdxr* n'a été détecté dans les cellules cultivées dans le milieu ME. Par contre, dans les cellules cultivées dans un milieu MI, les transcrits s'accumulent dès le 4^e jour de culture. Les ARNm *crmecs* sont présents dans les cellules cultivées dans les deux types de milieu, mais leur quantité augmente fortement après la suppression de 2,4-D. Aucune différence significative n'a été observée entre les profils d'expression du gène *hmgr* des cellules cultivées dans le milieu ME ou MI. Ces résultats suggèrent qu'il existe une corrélation étroite entre l'expression des gènes *crdxs*, *crdxr* et *crmecs* et la biosynthèse des AIM.

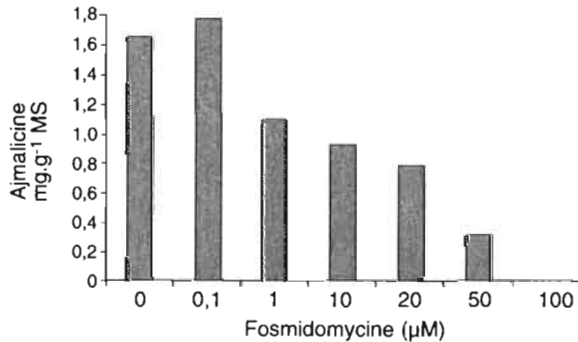
Inhibition de la biosynthèse des AIM par la fosmidomycine

(Schwender *et al.* 1999) ont montré qu'un antibiotique, la fosmidomycine, inhibe spécifiquement l'activité DXP réductoisomérase. Nous avons cultivé les cellules C20 de *C. roseus*, dans un milieu MP en présence de cet inhibiteur. La figure 4 révèle que la fosmidomycine inhibe de manière dose-dépendante la production d'AIM, sans affecter la croissance cellulaire. Ces résultats confirment ceux obtenus par l'étude de l'expression des gènes et montrent clairement une implication de la voie du MEP dans la production des AIM.



■ Figure 3

Cinétique d'accumulation des transcrits *crdxs*, *crdxr*, *crmecs* et *hmgr* dans les suspensions cellulaires de *C. roseus*. Les cellules ont été cultivées dans un milieu ME (A) ou MI (B). Le taux d'ajmalicine, utilisé comme marqueur de la production alcaloïdique, est exprimé en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche (MS). Les Northern blot ont été effectués à partir de 30 μg d'ARN. La visualisation des ARN ribosomiaux par le bromure d'éthidium est utilisée pour vérifier qu'une même quantité d'ARN a été déposée dans chaque puits.

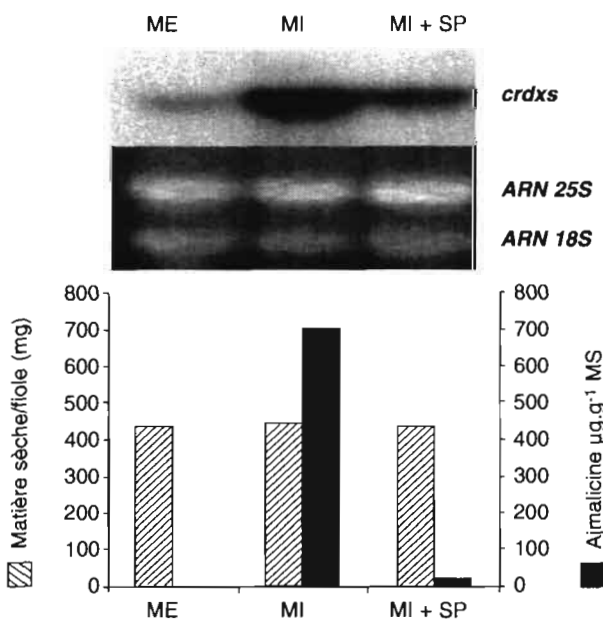


■ Figure 4

Inhibition de la biosynthèse des AIM par la fosmidomycine. Les cellules ont été cultivées dans un milieu MP. Le taux d'ajmalicine est exprimé en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche (MS).

Répression du gène *crdxs* dans les cellules traitées par l'alcool périllylique

Un traitement à l'alcool périllylique, un inhibiteur des prényltransférases (Morehead *et al.*, 1995), a été réalisé sur des cellules de *C. roseus* cultivées dans le milieu MI. Un suivi des taux de matière sèche des cellules a montré que ce traitement n'affectait pas leur croissance. La figure 5 montre que la teneur en AIM est considérablement réduite dans ces conditions. D'autre part, cette inhibition est associée à une diminution des taux de transcrits *crdxs*.



■ Figure 5

Répression du gène *crdxs* et inhibition de la biosynthèse des AIM dans les cellules de *C. roseus* traitées par l'alcool périllylique. Les cellules ont été cultivées dans un milieu ME, MI ou dans un milieu d'induction contenant 1 mM d'alcool périllylique (MI+SP). La quantité de matière sèche (MS) est exprimée en mg par feuille. Le taux d'ajmalicine est exprimé en µg.g⁻¹ MS. Les expériences de Northern blot ont été réalisées à partir de 30 µg d'ARN extraits au 5^e jour de culture. La visualisation des ARN ribosomiaux par le bromure d'éthidium est utilisée pour vérifier qu'une même quantité d'ARN a été déposée dans chaque puits.

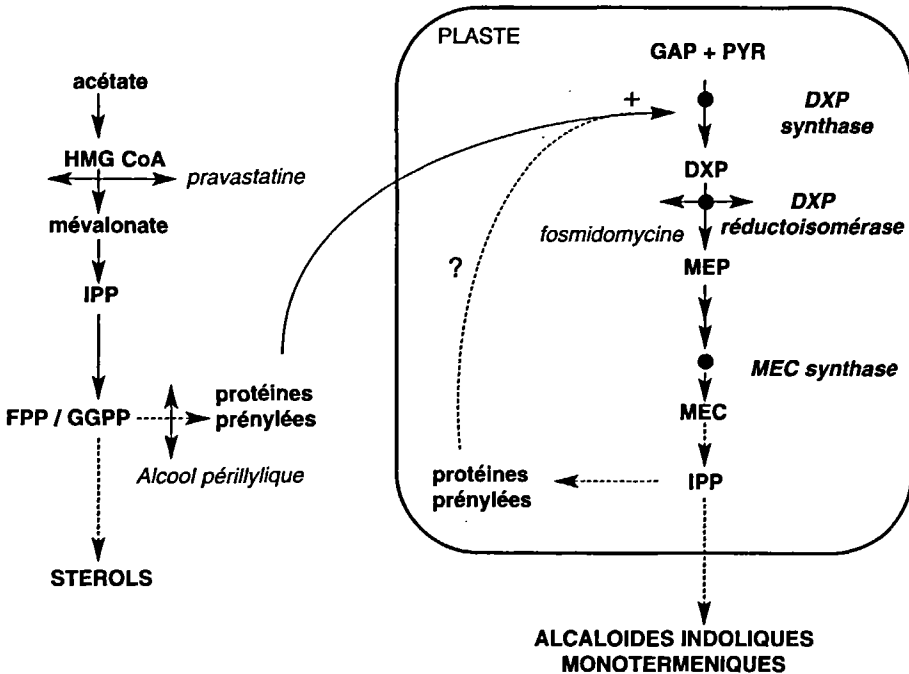
I Discussion

Les ADNc codant la DXP synthase, la DXP réductoisomérase et la MEC synthase, trois enzymes de la voie du MEP, ont été caractérisés chez *C. roseus*. L'expression hétérologue de la DXP synthase « pseudomature » (TCRDXS) a montré que cette enzyme catalyse la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate en DXP. L'expression des gènes *crdxs*, *crdxr* et *crmeCs* est fortement induite dans les cellules productrices d'AIM. Une telle observation est en accord avec l'idée que la voie du MEP est impliquée dans la biosynthèse des AIM, comme l'ont suggéré Contin *et al.* (1998) par des expériences fondées sur la ^{13}C RMN. Ce résultat se trouve renforcé par ceux obtenus avec un inhibiteur de la DXP réductoisomérase, la fosmidomycine, montrant que ce composé inhibe la production alcaloïdique. Une corrélation entre la production d'isoprénoïdes plastidiaux (chlorophylles, caroténoïdes...) et l'expression du gène *dxs* a été mise en évidence dans d'autres espèces végétales (Mandel *et al.*, 1996 ; Bouvier *et al.*, 1998). Dans les cellules sécrétrices de la menthe par exemple, l'accumulation des transcrits *dxs* précède l'augmentation de la production des monoterpènes (Lange *et al.*, 1998). Il est généralement admis que les monoterpènes comme le géraniol, l'un des précurseurs des AIM chez *C. roseus*, sont exclusivement synthétisés dans les plastes *via* la voie du MEP. En effet, de nombreux travaux indiquent que cette voie est localisée dans le compartiment plastidial (Lichtenthaler, 1999). Parmi ceux-ci, on peut citer les résultats obtenus par Araki *et al.* (2000) montrant que la GFP (Green Fluorescent Protein) couplée au peptide de transit de la DXP synthase d'*A. thaliana* est adressée vers les chloroplastes. Ainsi, le schéma qui prévaut actuellement montre que les monoterpènes sont biosynthétisés dans les plastes *via* la voie du MEP alors que les stérols dérivent de la voie du mévalonate localisée dans le cytoplasme (Lichtenthaler, 1999). Toutefois, dans certains cas, il semble qu'il n'y ait pas de séparation absolue entre les isoprénoïdes issus des deux voies de biosynthèse menant à l'IPP. Il en est ainsi des sesquiterpènes de la camomille dont deux unités isopréniques sont majoritairement formées *via* la voie du MEP alors que la troisième unité dérive de la voie du méva-

lonate (Adam *et al.*, 1999). Une coopération analogue pourrait exister dans la formation des AIM. Chez *Rauwolfia serpentina*, Eichinger *et al.* (1999) ont montré par des études d'incorporation de précurseurs marqués au ^{13}C , que la biosynthèse de loganine s'effectue *via* la voie du MEP. Cependant, d'après les auteurs, la faible incorporation de [2- ^{14}C]-mévalonate dans la loganine, rapportée dans des travaux antérieurs, pourrait être due à un échange de métabolites entre les deux voies de biosynthèse. Des résultats obtenus par notre équipe avec la pravastatine, un inhibiteur de l'HMGR, peuvent être interprétés dans ce sens. La littérature rapporte que la pravastatine (ou certains de ses analogues) bloque la synthèse des stérols sans affecter la production d'isoprénoïdes plastidiaux comme les caroténoïdes et les chlorophylles. Cependant, nos observations se démarquent de ces résultats. En effet, lorsque des cellules de *C. roseus* cultivées dans un milieu MI sont traitées par la pravastatine, on observe une diminution des teneurs en stérols et en AIM. L'effet de la drogue peut être contre-balancé par l'ajout de mévalonate exogène. Lorsque ce dernier est marqué au ^{14}C , la radioactivité se retrouve incorporée dans les stérols et dans les protéines prénylées, mais pas dans les alcaloïdes (Imbault *et al.*, 1996). Si l'on admet que les AIM dérivent majoritairement de la voie du MEP, comme l'ont montré Contin *et al.* (1998) et Eichinger *et al.* (1999) ainsi que les travaux utilisant la fosmydomicine dans le présent article, ces résultats suggèrent que la voie du mévalonate, dans une moindre mesure, pourrait également participer à leur synthèse. L'absence de marquage radioactif dans les alcaloïdes serait due, dans ce cas, à un faible taux d'incorporation de [2- ^{14}C]-mévalonate.

Une autre hypothèse n'est pas à exclure : elle repose sur la participation d'un dérivé terpénique issu de la voie du mévalonate dans la régulation de la voie de biosynthèse des AIM. Les protéines prénylées nous sont apparues comme pouvant être de bons candidats impliqués dans un tel mécanisme. Lors de traitements pravastatine/[2- ^{14}C]-mévalonate sur des cellules cultivées en milieu ME ou MI, des différences dans les profils électrophorétiques de protéines marquées ont été obtenus (résultats non publiés). Les protéines prénylées subissent une modification post-traductionnelle dans laquelle un groupement farnésyl ou géranylgeranyl est greffé à l'extrémité C-terminale du polypeptide. Cette réaction est catalysée par les prényltransférases (Clarke, 1992). Ces dernières peu-

vent être inhibées par certaines drogues comme l'alcool périllylique. Dans les cellules de *C. roseus* productrices d'alcaloïdes, ce composé inhibe fortement la biosynthèse des AIM tout en réprimant l'expression du gène *crdxs*. Ainsi, la voie du mévalonate, par l'intermédiaire des protéines prénylées pourrait exercer un contrôle sur la chaîne de biosynthèse des alcaloïdes et plus particulièrement sur la voie du MEP. Par ailleurs, on peut envisager que la voie du MEP participe également à l'élaboration de groupements terpényle incorporés dans des protéines prénylées plastidiales, assurant ainsi sa propre régulation (fig. 6). Enfin, la nature de ces protéines prénylées n'est pas élucidée. Chez les plantes, il a été montré que les petites protéines G (Yalovsky *et al.*, 1996) ainsi que le facteur de transcription APETALA-1 peuvent être prénylés (Gruissem, 1999).



■ Figure 6
Modèle supposé de l'architecture des voies terpéniques impliquées dans la biosynthèse des AIM chez *C. roseus*.

La découverte de la voie du MEP étant relativement récente, peu de données existent aujourd'hui quant à sa coopération avec la voie du mévalonate au sein d'une même cellule. Un dialogue doit s'instaurer entre ces deux voies et la régulation spatiale qui doit s'opérer dans la cellule végétale pourrait être le pendant de la régulation temporelle des deux voies que l'on observe chez la bactérie du genre *Streptomyces* (Seto *et al.*, 1996).

Remerciements

Nous remercions Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd, de nous avoir fourni un échantillon de fosmidomycine. Nous remercions également le Dr J. Memelink pour la banque ADNc de *C. roseus* ainsi que le Pr M. H. Zenk pour le désoxyxylulose.

Bibliographie

- Adam KP, Thiel R, Zapp J 1999 — Incorporation of 1- [1-¹³C] Deoxy-D-xylulose in chamomile sesquiterpenes. *Arch Biochem Biophys* 369 : 127-132.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ 1990 — Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 : 403-410.
- Araki N, Kusumi K, Masamoto K, Niwa Y, Iba K 2000 — Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiol Plant* 108 : 19-24.
- Bouvier F, d'Arlingue A, Suire C, Backhaus RA, Camara B 1998 — Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol* 117 : 1423-1431.
- Chahed K, Oudin A, Guivarc'h N, Hamdi S, Chénieux JC, Rideau M, Clastre M 2000 — 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid-producing cells. *Plant Physiol Biochem* 38 : 1-9.
- Clarke S 1992 — Protein isoprenylation and methylation at carboxy terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* 61 : 355-386.
- Contin A, van der Heijden R, Lefeber AWM, Verpoorte R 1998 — The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett* 434 : 413-416.
- Décendit A, Liu D, Ouelhazi L, Doireau P, Mérillon J-M, Rideau M 1992 —

- Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures - The factors affecting the cytokinin response. *Plant Cell Rep* 11 : 400-403.
- Eichinger D, Bacher A, Zenk MH, Eisenreich W 1999 — Analysis of metabolic pathways via quantitative prediction of isotope labeling patterns: a retrobiosynthesis ¹³C NMR study on the monoterpene loganin. *Phytochemistry* 51 : 223-236.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G 1999 — ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8 : 978-984.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K 1968 — Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50 : 151-158.
- Gruissem W 1999 — Protein prenyltransferases-relay between isoprenoid synthesis and plant development. 4th European symposium on plants isoprenoids, Barcelona, 21-23 avril.
- Herz S, Wungsintaweekul J, Schuhr CA, Hecht S, Lüttgen H, Sagner S, Fellermeier M, Eisenreich W, Zenk MH, Bacher A, Rohdich F 2000 — Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 2486-2490.
- Imbault N, Thiersault M, Dupéron P, Benabdelmouna A, Doireau P 1996 — Pravastatin: A tool for investigating the availability of mevalonate metabolites for primary and secondary metabolism in *Catharanthus roseus* cell suspension. *Physiol Plant* 98 : 803-809.
- Laemmli UK 1970 — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Lange BM, Croteau R 1999 — Isoprenoid biosynthesis via mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* 365 : 170-174
- Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R 1998 — A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 2100-2104.
- Levêque D, Wihlm J, Jehl F 1996 — Pharmacology of *Catharanthus* alkaloids. *Bull Cancer* 83 : 176-186.
- Lichtenthaler HK 1999 — The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50 : 47-65.
- Lois LM, Campos N, Rosa Putra S, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A 1998 — Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyses the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 2105-2110.
- Lüttgen H, Rohdich F, Herz S, Wungsintaweekul J, Hecht S, Schuhr CA, Fellermeier M, Sagner S, Zenk MH, Bacher A, Eisenreich W 2000 — Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli*

phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 1062-1067.

Maldonado-Mendoza IE, Burnett RJ, Nessler CL 1992 — Nucleotide sequence of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 100 : 1613-1614.

Mandel MA, Feldman KA, Herrera Estrella L, Rocha-Sosa M, Leon P 1996 — CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J* 9 : 649-658.

McGarvey DJ, Croteau R 1995 — Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7 : 1015-1026.

Morehead TA, Biermann BJ, Crowell DN, Randall SK 1995 — Changes in protein isoprenylation during the growth of suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 109 : 277-284.

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.

Rohdich F, Wungsintaweekul J, Fellermeier M, Sagner S, Herz S, Kis K, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH 1999 — Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 11758-63.

Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H 1993 — Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* 295 : 517-524.

Saint-Pierre B, Vazquez-Flota FA, De Luca V 1999 — Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of pathway intermediate. *Plant Cell* 11 : 887-900.

Schwender J, Müller C, Zeidler J, Lichtenthaler HK 1999 — Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 455 : 140-144.

Seto H, Watanabe H, Furihata K 1996 — Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioouvifer*. *Tetrahedon Lett* 37 : 7979-7982.

Sprenger GA, Schörken U, Wiegert T, Grolle S, De Graaf AA, Taylor SV, Begley TP, Bringer-Meyer S, Sahn H 1997 — Identification of a thiamin dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 12857-12862.

Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H 1998 — A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalysing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 : 9879-9884.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997 — The clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24 : 4876-4882.

- Verpoorte R, van der Heijden R, Ten Hoopen HJG, Memelink J 1998 — Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tiss Cult Biotech* 4 : 3-20.
- von Heijne G, Steppuhn J, Hermann RG 1989 — Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* 180 : 535-545.
- Williams DC, McGarvey DJ, Katahira EJ, Croteau R 1998 — Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* 37 : 12213-12220.
- Yahia A, Kevers C, Gaspar T, Chénieux J-C, Rideau M, Crèche J 1998 — Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. *Plant Sci* 133 : 9-15.
- Yalovsky S, Loraine AE, Gruissem W 1996 — Specific prenylation of tomato Rab proteins by geranylgeranyl type-II transferase requires a conserved cysteine-cysteine motif. *Plant Physiol* 110 : 1349-1359.