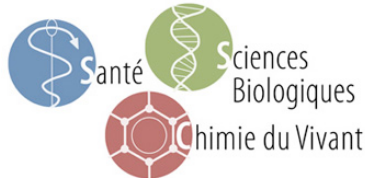




ECOLE DOCTORALE SSBCV



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : Marc CLASTRE
Unité : EA2106 « Biomolécules et Biotechnologie Végétales »
Equipe (si unité multi-équipes):
Filière de rattachement : Filière A, Physiopathologie humaine et animale
Email de l'encadrant : marc.clastre@univ-tours.fr

Co-encadrant : Vincent COURDAVAULT

2. Titre de la thèse : Elucidation et ingénierie de la biosynthèse d'alcaloïdes d'intérêt pharmaceutique originaires des Apocynacées

3. Résumé :

La pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) est une plante de la famille des Apocynacées produisant plus de 130 alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) dont certains présentent un intérêt thérapeutique majeur (antihypertenseur : ajmalicine ; anticancéreux : vinblastine et vincristine). *C. roseus* est considérée aujourd'hui comme une plante médicinale modèle en devenant la référence en matière d'étude d'un métabolisme spécialisé, celui des AIM. L'avancée des connaissances sur ce métabolisme a été impulsée par les développements de ressources transcriptomiques alliés à de nouvelles méthodes de caractérisation fonctionnelle des gènes comme la technique VIGS (Virus-Induced Gene Silencing). L'équipe BBV a significativement participé à l'avancée de ces connaissances. Fort de l'expertise acquise sur *C. roseus*, elle a initié, depuis peu, des travaux sur la biogenèse d'AIM d'intérêt pharmaceutiques produits par d'autres plantes de la famille des Apocynacées. Il s'agit notamment de la petite pervenche (*Vinca minor*) produisant la vincamine (vasodilatateur utilisé dans le traitement des troubles liés au vieillissement) et de deux espèces du genre *Rauwolfia* produisant l'ajmaline (antiarythmique).

L'objectif du sujet de thèse est d'élucider les voies de biosynthèse des AIM d'intérêt chez *C. roseus*, *V. minor* et le genre *Rauwolfia*. Cette approche est désormais rendue possible pour plusieurs raisons. La première a trait à la similitude des modules enzymatiques (agencement d'enzymes catalysant des étapes successives) opérant dans ces plantes pour produire les AIM qui dérivent tous d'un précurseur commun, la strictosidine. La seconde tient au fait que, outre *C. roseus*, BBV a généré de nombreuses données transcriptomiques de *Vinca minor* et du genre *Rauwolfia* et maîtrise déjà la technique VIGS pour les espèces du genre *Rauwolfia*.

Ainsi, l'identification des étapes enzymatiques qui ne sont pas encore élucidées sera réalisée via des études de co-expression de gènes en analysant les données transcriptomiques afin de sélectionner des gènes candidats. La validation fonctionnelle de ces gènes sera réalisée par des études de pertes de fonctions grâce à la technique VIGS. Dans cette approche, l'extinction des gènes dans les plantules est corrélée à la diminution des teneurs d'AIM

quantifiées par UPLC-MS/MS. Enfin, la fonction des gènes sera caractérisée par des études biochimiques effectuées sur les enzymes recombinantes correspondantes.

Ces travaux constituent des prérequis en vue d'implémenter des modules enzymatiques au sein de la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour produire les AIM d'intérêt par ingénierie métabolique. Ceci permettra de proposer un nouveau mode de sourcing de ces molécules en s'affranchissant des plantes. Cette approche de bio-ingénierie pourra être initiée dès les premiers gènes candidats caractérisés et se développer durant les trois années de la thèse.

Par ailleurs, ces travaux pourront également être mis à profit en exploitant la promiscuité enzymatique de certaines enzymes pour fabriquer, par ingénierie métabolique, des AIM biosynthétiques non naturels, offrant ainsi des perspectives innovantes pour le développement de nouvelles substances actives.

4. Résumé en anglais : Elucidation and engineering of the biosynthesis of Apocynaceae-alkaloids of pharmaceutical interest

The Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) belongs to the Apocynaceae family and produces more than 130 monoterpene indole alkaloids (MIA), some of which are of major therapeutic interest (antihypertensive drug: ajmalicine, anticancer drug: vinblastine and vincristine). *C. roseus* is considered today as a model medicinal plant and a reference in the study of a specialized metabolism. The advance of knowledge on the MIA metabolism has been driven by the development of transcriptomic resources combined with new methods of functional characterization of genes such as the Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) technique. The BBV research team has significantly contributed to the progress of this knowledge. With the expertise acquired on *C. roseus*, the team has recently initiated work on the biogenesis of MIA of pharmaceutical interest produced by other plants of the Apocynaceae family. These include the common periwinkle (*Vinca minor*) producing vincamine (vasodilator used in the treatment of age-related disorders) and two species of the genus *Rauwolfia* producing ajmaline (antiarrhythmic drug).

The objective of the thesis is to elucidate the biosynthetic pathways of MIA of interest in *C. roseus*, *V. minor* and the genus *Rauwolfia*. This approach is now made possible for two reasons. The first relates to the similarity of enzymatic modules (enzymes catalysing sequential reactions) operating in these plants to produce MIA which all derive from the common precursor strictosidine. The second is that BBV has generated a large amount of transcriptomic data of *Vinca minor* and the *Rauwolfia* genus and has already developed the VIGS technique for the *Rauwolfia* species.

Thus, the identification of enzymatic steps not yet elucidated will be performed via gene coexpression studies by analysing the transcriptomic data to select candidate genes. Functional validation of these genes will be performed by loss of function studies using the VIGS technique. In this approach, gene silencing in seedlings should be correlated with the decrease in MIA levels quantified by UPLC-MS/MS. Finally, gene function will be characterized by biochemical studies performed on the corresponding recombinant enzymes.

These works are prerequisites for implementing biosynthetic pathways into the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to produce the MIA of interest by metabolic engineering. This will provide a new supply method of these molecules without resorting to plants. This bioengineering approach can be initiated as soon as the first candidate genes have been characterized and will be developed during the three years of the thesis.

In addition, this work can also be exploited by using enzymatic promiscuity of certain enzymes to produce non-natural biosynthetic MIA, thus offering innovative perspectives for the development of new active substances.