

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA LIGNIFICATION, L'ART DE FAIRE DES LIGNINES A FAÇON

par Lise Jouanin¹

Les lignines sont des constituants de la paroi secondaire des cellules des végétaux. Il peut être stratégique de moduler la quantité et la composition de ces composés pour des utilisations agro-industrielles. Pour mener à bien cette entreprise, il est indispensable d'en connaître la voie de biosynthèse au niveau moléculaire afin de disposer d'outils pour l'amélioration génétique (génétique classique et transgénèse). L'objectif de cet exposé est de présenter cette voie de biosynthèse des lignines et quelques stratégies possibles pour obtenir des lignines « à façon » permettant d'améliorer les propriétés d'usage des lignocelluloses.

1) Biosynthèse des lignines

Les lignines sont issues de la polymérisation des alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique (voir présentation de Catherine Lapierre). Après polymérisation, ces monolignols conduisent respectivement aux unités *p*-hydroxyphényles (H), guaïacyles (G) et syringyles (S), dont les cycles portent respectivement aucun, un ou deux groupes méthoxyles.

La composition des lignines varie avec l'espèce végétale (conifères, feuillus, graminées...), les tissus (fibres, xylème...), la strate pariétale (lamelle moyenne, couches S1, S2, S3), l'âge des cellules et l'environnement (lignines de stress). Les lignines G, les plus simples, sont celles des plantes lignifiées les plus anciennes dans l'évolution et les plus élaborées sont celles de plantes plus récentes, angiospermes dicotylédones, puis angiospermes monocotylédones graminées. Les séquences des gènes codant les différentes étapes de la voie de biosynthèse des lignines sont bien conservées ce qui permet une identification facile d'une espèce à une autre. Les premiers travaux d'identification des gènes ont été réalisés chez les arbres ou le tabac mais rapidement des espèces modèles ont été utilisées comme *Arabidopsis thaliana*, petite crucifère modèle au génome séquencé en 2000 (Fig. 1), et le peuplier au génome séquencé en 2004.

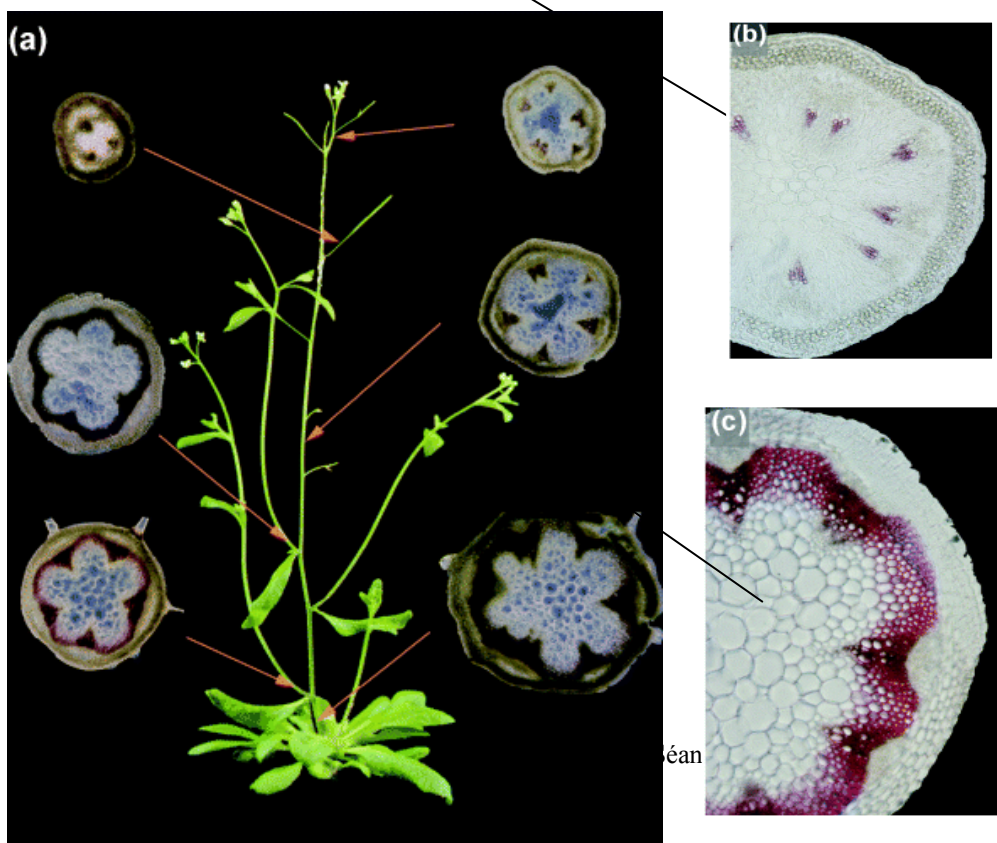


Figure 1 :
La lignification chez
Arabidopsis

a : plante entière,
b : xylème lignifié
en haut de hampe,
c : xylème et fibres
lignifiées en bas
de hampe.
Les tissus lignifiés
sont colorés en
rouge (coloration de
Wiesner).

Biosynthèse des monolignols, les précurseurs des lignines

Les premières étapes de la biosynthèse des monolignols, sont réalisées dans le cytosol. Ces précurseurs dérivent d'un acide aminé, la phénylalanine. Trois groupes de réactions permettent de convertir cet acide aminé en monolignols: (i) la désamination de la chaîne latérale avec formation d'une double liaison, suivie de l'hydroxylation de ce cycle en position para de la chaîne et de la thioestérification du groupe carboxyle par le Coenzyme A (formation du *p*-coumaroyl-CoA), (ii) la réduction de la fonction thioester en aldéhyde, puis en alcool, (iii) l'introduction de deux groupements méthoxyles (Fig. 2).

Les premières étapes allant de la phénylalanine au *p*-coumaroyl-CoA constituent la voie commune de biosynthèse des phénylpropanoïdes, dont font partie les lignines avec d'autres phénols végétaux tels que flavonoïdes ou dérivés d'acides *p*-hydroxycinnamiques. Les étapes suivantes sont spécifiques de la lignification (Boerjan *et al.*, 2003). La formation des alcools précurseurs des unités H et G implique la réduction des dérivés cinnamoyl-CoA en cinnamaldéhydes par la cinnamoyl-CoA réductase (CCR), puis celle des cinnamaldéhydes en alcools cinnamyliques par la cinnamyl alcool deshydrogénase (CAD). L'alcool sinapylique serait majoritairement formé à partir du coniféraldéhyde grâce à l'hydroxylation en position 5 catalysée par la férulate-5-hydroxylase (F5H), puis la méthylation du groupe hydroxyle par l'acide caféique *O*-méthytransférase (COMT). Les gènes codant ces différentes étapes ont été identifiés chez des espèces d'intérêt comme le maïs, la luzerne, l'eucalyptus... Ils appartiennent souvent à de petites familles multigéniques.

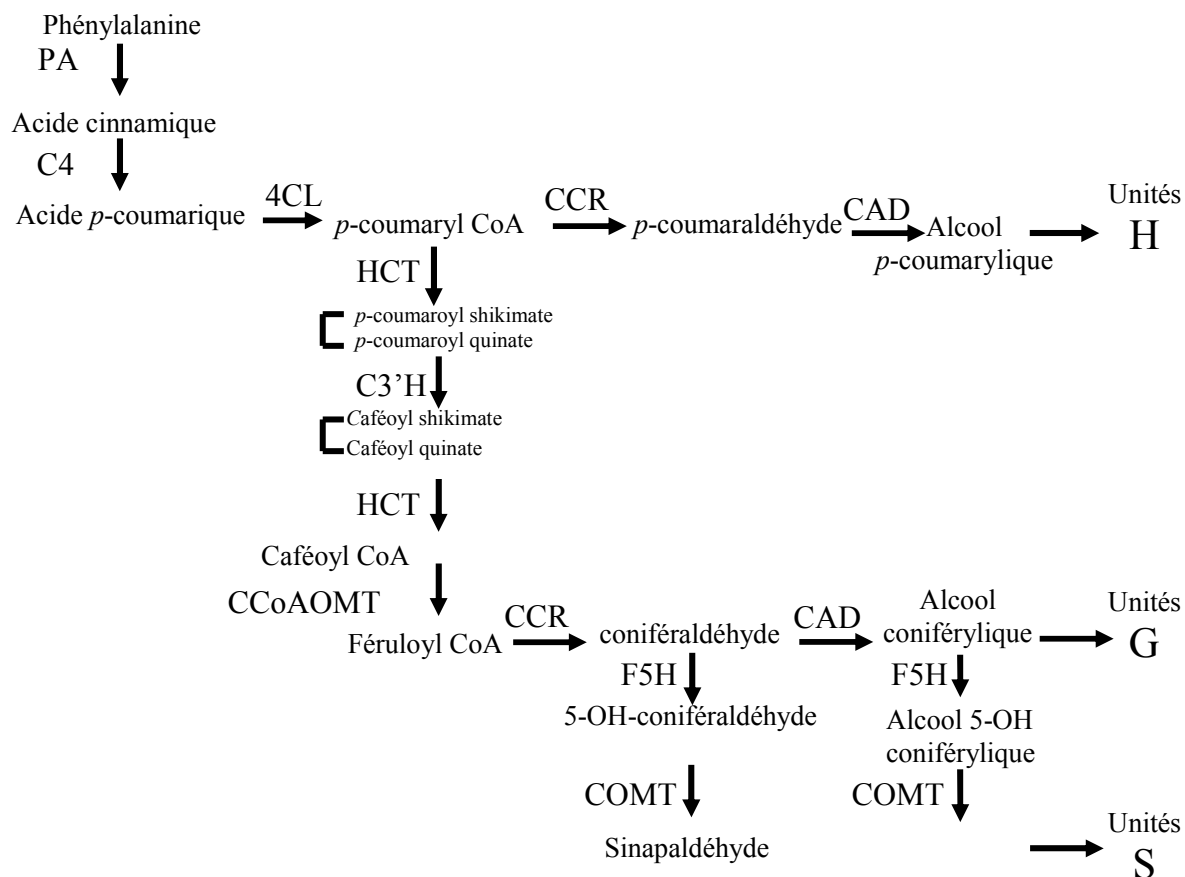


Figure 2 : Voie de biosynthèse des lignines chez les angiospermes dicotylédones (adapté de Boerjan *et al.*, 2003).

Les sigles des enzymes responsables des différentes étapes sont : PAL, phénylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; C3'H, ester de quinate/shikimate coumarate-3'-hydroxylase; 4CL, 4-hydroxycinnamate CoA ligase; CCR, cinnamoyl CoA réductase; CCoAOMT, caféoyl-CoA O-méthyltransférase; COMT ou AldOMT, caféate/5-hydroxyfêrulate ou 5-hydroxyconifêraldêhyde O-méthyltransférase; F5H ou Cald5H, fêrulate ou conifêraldêhyde 5-hydroxylase; CAD, alcool cinnamylique deshydrogénase.

Polymérisation des monolignols en lignines au sein d'une matrice polysaccharidique

Les monolignols synthétisés dans le cytosol seraient stockés sous forme de glucosides. Leurs modes de glycosylation/déglycosylation et de transport vers la paroi ne sont pas élucidés. Leur polymérisation dans la paroi est initiée par un mécanisme d'oxydation enzymatique générant des radicaux qui se couplent ensuite spontanément sans catalyse enzymatique. Des oxydases pariétales, peroxydases et laccases, catalysent l'oxydation des monolignols en radicaux phénoxy. Ces enzymes font partie de familles fortement multigéniques associées à diverses voies métaboliques et l'identification de celles impliquées dans la lignification n'est pas encore entièrement réalisée. Toutefois, des résultats récents du laboratoire démontrent l'importance de plusieurs laccases dans la polymérisation des lignines.

2) Modification de la voie de biosynthèse des lignines : deux exemples de réalisations

Dérégulation de la COMT (acide caféique O-méthyltransférase)

Dès les années 1930, des maïs *bm* (pour *brown midrib*) possédant des nervures brunes ont été identifiés. Certains de ces mutants présentent une meilleure digestibilité pour les ruminants et des modifications au niveau du taux et de la structure des lignines (Barrière et Argillier, 1993). Récemment, le gène muté pour les lignées *bm3* a été identifié comme correspondant au gène *COMT*. La déficience en activité *COMT* chez le maïs *bm3* se traduit par l'absence quasi totale d'unités S et l'incorporation d'unités 5-hydroxyguaiacyles (5-OH G) en quantité substantielle dans les lignines. Ce résultat établi en 1988 (Lapierre *et al.*, 1988) constitue la première démonstration de la plasticité biochimique de la lignification: un précurseur inhabituel des lignines peut servir à leur élaboration en cas de déficit en précurseur conventionnel. Des résultats similaires ont été publiés en utilisant une stratégie antisens *COMT* chez le maïs (Piquemal *et al.*, 2002). Dans les deux cas (*bm3* et antisens *OMT*), une nette amélioration de la digestibilité des maïs a été observée. L'unité 5-OH G a également été observée chez toutes les plantes à l'activité *COMT* réduite, tel qu'un mutant nul d'*Arabidopsis* (Goujon *et al.*, 2003) et des peupliers antisens (Van Doorselaere *et al.*, 1995). Ces plantes ont un taux de lignines peu ou pas réduit, mais ces lignines sont appauvries en liaisons labiles de type \square -O-4. Leurs propriétés sont modifiées, les fourrages sont plus digestibles mais les lignines des peupliers antisens *COMT* sont plus difficiles à éliminer dans le procédé Kraft de fabrication du papier.

Dérégulation de la CAD (alcool cinnamylique deshydrogénase)

Dans le cas du maïs *bm1*, la mutation affecte l'activité de la CAD et s'accompagne de l'incorporation de conifêraldêhyde et de sinapaldêhyde dans les lignines. De même, le mutant spontané de pin (*Pinus taeda*) *cad-n1* possédant une activité CAD presque nulle, présente un taux de lignines faiblement réduit en raison de l'incorporation massive de conifêraldêhyde dans ces lignines. Ce pin mutant est plus apte à la fabrication de pâte à papier par voie chimique mais présente une croissance ralentie (cité dans Boerjan *et al.*, 2003). L'incorporation de conifêraldêhyde et de sinapaldêhyde et la réduction de la quantité de lignines ont également été observés chez des peupliers antisens CAD (Baucher *et al.*, 1996) et un double mutant CAD d'*Arabidopsis* (Sibout *et al.*, 2005). Par rapport au témoin, les lignines obtenues sont enrichies en groupes phénoliques libres, ce qui facilite leur élimination par le procédé Kraft de délignification en milieu alcalin.

Application de ces résultats

La stratégie *a priori* la plus simple pour faciliter la production de pâte à papier par délignification chimique (procédé Kraft) ou pour augmenter la dégradabilité enzymatique des polysaccharides (digestibilité des fourrages, saccharification pour le bioéthanol) est de réduire le taux de lignines. Cependant, une trop forte réduction du taux de lignines peut altérer la croissance et le développement de la plante, à l'image des mutants naturels de maïs *bm3* qui, avec 20% de lignines en moins, présentent de mauvaises performances agronomiques (ils « versent » à maturité, en raison des faibles propriétés mécaniques de leurs tiges hypolignifiées). L'autre stratégie consiste à modifier la structure des lignines. Ainsi, l'augmentation de la proportion d'unités S et donc de liaisons β -O-4 labiles, obtenue en surexprimant la F5H, rend le bois de peuplier plus facile à délignifier par le procédé Kraft. Les résultats les plus avancés concernent les conséquences de la réduction de l'activité CAD et de l'activité COMT chez le peuplier puisque les essais papetiers réalisés sur des arbres jeunes cultivés en serre ont été confirmés sur arbres de 4 ans cultivés au champ dans 2 pays (Royaume Uni et France). Ces essais ont démontré qu'il était possible de réduire de manière stable l'activité CAD ou COMT sans répercussion apparente sur la croissance de l'arbre ou sa résistance aux pathogènes et aux insectes, tout en modifiant de manière importante l'aptitude papetière des arbres (Pilate *et al.*, 2002). Ces premiers essais d'arbres génétiquement modifiés illustrent les potentialités des stratégies antisens et sens pour la production d'arbres plus faciles à transformer en pâte à papier par voie chimique.

Au niveau de la dégradabilité enzymatique, les résultats sont délicats à interpréter car la modification de la structure des lignines est souvent associée à une variation de leur quantité. Or une variation de quelques pour cents de lignines modifie considérablement la dégradabilité enzymatique des parois. En outre, les résultats concernent des plantes dicotylédones et des graminées, dont les lignifications au niveau tissulaire sont différentes. Ainsi, viser les enzymes de la voie de biosynthèse des lignines de graminées peut non seulement affecter le taux ou la structure des lignines, mais aussi modifier leur mode d'ancrage dans la paroi en affectant la synthèse des esters féruliques reliant les hémicelluloses de graminées aux lignines. La majorité des résultats indiquent une dégradabilité accrue en cas de sous-expression de la CCoAOMT ou de la COMT, accompagnée d'une diminution du rapport S/G avec baisse du taux de lignines dans le cas de la luzerne et du maïs ou sans baisse dans le cas du tabac et d'*Arabidopsis*. Toutefois, comme dans le cas du peuplier, il est important de confirmer que l'amélioration de la dégradabilité s'accompagne de bonnes performances agronomiques avant de pouvoir se prononcer sur l'intérêt de la stratégie.

3) Conclusion

Actuellement, la plupart des stratégies de modification de la quantité/structure des lignines concernent la voie de biosynthèse des monolignols. Une meilleure connaissance de toutes les étapes de cette voie de biosynthèse et de leur régulation (identification des facteurs de transcription contrôlant cette voie métabolique) devrait permettre de progresser et de disposer de plus d'outils pour faire « des lignines à façon ». De plus, l'identification des enzymes clés de cette voie comme la CCR ou la F5H, dont la dérégulation affecte considérablement et respectivement le taux de lignines ou leur structure, peut être utilisée dans des programmes d'amélioration utilisant le marquage moléculaire et une approche « gènes candidats » afin d'identifier des variétés plus aptes à certains usages agro-industriels. Ce type de recherche est particulièrement important dans le contexte actuel de l'utilisation de la biomasse lignocellulosique pour les biocarburants. En effet la présence des lignines constitue un frein à l'accès aux polysaccharides et s'il est certain que ce biopolymère est indispensable à une croissance normale des plantes, la sélection de plantes possédant des lignines adaptées à cet usage est primordiale. Cela peut être réalisé par recherche de plantes moins lignifiées dans les accessions naturelles, par l'identification de mutants ou par utilisation de la transgénèse. De plus, une connaissance de toutes les étapes de biosynthèse des

lignines sera utile dans l'optique de l'utilisation de ce polymère phénolique comme source de synthons pour la chimie verte (voir exposé de Stéphanie Baumberger).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) BARRIÈRE et ARGILLIER, 1993. – *Agronomie* **13**, 865-876.
- (2) BAUCHER *et al.*, 1996. – *Plant Physiol* **112**, 1479-1490.
- (3) BOERJAN *et al.*, 2003. – *Annu Rev Plant Biol* : **54**, 21-1-21-28.
- (4) GOUJON *et al.*, 2003. – *Plant Mol Biol*. **51**, 973-989.
- (5) LAPIERRE *et al.*, 1988. – *CR Acad Sci. III* **307**, 723-728.
- (6) PILATE *et al.*, 2002. – *Nature Biotech.* **20**, 607-612.
- (7) PIQUEMAL *et al.*, 2002. – *Plant Physiol*. **130**, 1675-1685.
- (8) SIBOUT *et al.*, 2005. – *Plant Cell* **17**, 2059-2076.
- (9) VAN DOORSELAERE *et al.*, 1995. – *Plant J.* **8**, 855-864.

¹ IJPB, INRA 78026 Versailles cedex.