

MODIFICATION DES LIGNINES EN VUE D'AMELIORER LES PRODUITS VEGETAUX : EXEMPLES CHEZ LE MAÏS ET LE PEUPLIER

Lise JOUANIN
Biologie cellulaire, INRA
78026 Versailles cedex

1 - INTRODUCTION

Les lignines (du latin *lignum*, bois) constituent environ 30% du carbone organique de la biosphère. Ces polymères spécifiques des plantes terrestres vasculaires ont permis la conquête du milieu terrestre par les végétaux. Elles renforcent les propriétés mécaniques des tissus de soutien des tiges et des troncs et imperméabilisent les parois des tissus conducteurs où circule la sève. Elles participent à la défense des plantes en constituant une barrière moléculaire efficace contre les microorganismes pathogènes. Les lignines représentent environ 15 à 35% du poids sec des troncs et racines d'arbres et 5 à 20% des tiges des plantes vasculaires herbacées. Elles se déposent essentiellement dans certaines cellules qui forment une paroi secondaire. Ces polymères aromatiques améliorent la valeur calorifique du bois de chauffage et assurent la qualité mécanique du bois utilisé comme matériau. En revanche, elles rendent difficile la transformation du bois en pâte à papier par voie chimique et représentent le principal facteur de réduction de la valeur alimentaire des fourrages.

1.1. Structure des lignines

Les lignines sont issues de la polymérisation de trois types d'alcools *p*-hydroxycinnamyliques ou monolignols, les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique. Après polymérisation, ces monolignols conduisent respectivement aux unités *p*-hydroxyphényles (H), guaiacyles (G) et syringyles (S), dont les cycles aromatiques portent respectivement aucun, un ou deux groupes méthoxyyles (BOERJAN *et al.*, 2003). Les lignines de bois de conifères (gymnospermes) comportent surtout des unités G accompagnées d'une faible proportion d'unités H. Celles de bois de feuillus (angiospermes dicotylédones) sont constituées d'unités G et S, les unités H n'y étant qu'à l'état de traces. Enfin, les lignines de tiges de graminées (angiospermes monocotylédones) sont constituées d'unités G et S, accompagnées d'unités H en faible proportion et, spécificité structurale qui leur est propre, d'acides *p*-coumarique et férulique associés aux lignines. 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.

Comme chaque unité peut être liée aux unités voisines par une, deux ou trois liaisons, les lignines sont des polymères réticulés. Les liaisons les plus fréquentes dans les lignines natives sont des liaisons éthers, dénommées β -O-4. Ces liaisons sont la cible du procédé kraft, procédé industriel majeur de délignification chimique utilisé pour transformer

le bois en pâte à papier. A côté de ces liaisons β -O-4 présentant une certaine labilité, il existe des liaisons inter-unités résistantes, dénommées liaisons condensées. Les unités S sont surtout engagées dans des liaisons β -O-4 tandis que les unités G ou H, dont les carbones 5 ne sont pas méthoxylés, peuvent participer à des liaisons biphenyles. C'est en raison de ces spécificités de liaisons des unités S et G qu'il est plus difficile de produire de la pâte à papier par le procédé kraft à partir de bois de conifère, sans unités S, qu'à partir de bois de feuillus. Le rapport S/G de la fraction des lignines engagée dans des liaisons labiles est le principal paramètre structural employé pour classer les lignines ou prédire leur dégradabilité physico-chimique ou biologique.

1.2. Biosynthèse des lignines

Les monolignols précurseurs des lignines dérivent d'un acide aminé, la phénylalanine. 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. 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 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 est initiée par un mécanisme d'oxydation enzymatique générant des radicaux, radicaux qui se couplent ensuite spontanément sans catalyse enzymatique. Cette oxydation est catalysée par des peroxydases et peut-être des laccases.

2 - RESULTATS

2.1. Modification de la voie de biosynthèse des lignines

La possibilité de réduire l'expression d'un gène par transgènes a été largement employée pour modifier le taux ou la structure des lignines par les stratégies dites « antisens » et « sens ». Dans la première stratégie, une construction comportant tout ou partie de la séquence codante du gène cible en orientation inverse est introduite dans la plante, ce qui diminue la biosynthèse de la protéine codée par ce gène dans certaines lignées régénérées. L'obtention d'une gamme de lignées transgéniques antisens avec des niveaux de répression variable peut conduire à des phénotypes plus ou moins marqués et permet d'étudier le rôle d'une enzyme dans une voie métabolique donnée. La stratégie « sens » consiste à introduire des copies supplémentaires d'un gène déjà présent dans la plante pour surexprimer l'enzyme correspondante. Toutefois, si l'endogène et le transgène ont une forte homologie, l'accumulation d'une forte quantité de l'ARN messager due à l'expression des 2 gènes peut induire un mécanisme de dégradation de ces ARN et bloquer ainsi la biosynthèse de la protéine cible.

La première plante génétiquement transformée dès 1983 fut le tabac et les premières lignées de tabac transgéniques dérégulées au niveau des gènes de lignification codant pour la COMT, la CAD ou la CCR ont été obtenues à partir de 1994 (BOERJAN *et al.*, 2003). Plus récemment, *Arabidopsis thaliana* a été utilisé comme plante modèle car elle est facile à transformer et son cycle de croissance court permet d'analyser rapidement les conséquences des transformations. Pour les espèces forestières, c'est le peuplier qui est employé comme

modèle en Europe, aux USA, ou au Japon. D'autres résultats concernent l'obtention de plantes transgéniques chez d'autres plantes ligneuses, comme l'Eucalyptus, ou de plantes herbacées comme la luzerne, le maïs et la fétuque.

2.2. Cas du maïs

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 (BARRIERE et ARGILLIER, 1993). Récemment, les gènes mutés pour les lignées *bm1* et *bm3* ont été identifiés comme correspondant respectivement aux gènes *CAD* et *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-hydroxyguaïacyles (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 (Boudet *et al.*, 2003). Des résultats similaires ont été publiés en utilisant une stratégie antisens *COMT* (PIQUEMAL *et al.*, 2002). Dans les deux cas (*bm3* et antisens *COMT*), une nette amélioration de la digestibilité a été observée. Dans le cas du maïs *bm1*, la déficience en activité *CAD* s'accompagne de l'incorporation de coniféraldéhyde et de sinapaldéhyde dans les lignines (LAPIERRE et BARRIERE, résultats non publiés). La digestibilité du maïs *bm1* est moins augmentée que celle du maïs *bm3*. A notre connaissance, aucune transformation génétique du maïs avec le gène *CAD* n'a été réalisée.

2.3. Cas du peuplier

Les résultats les plus avancés chez le peuplier concernent les conséquences de la réduction des activités *CAD* ou *COMT* puisque les essais papetiers réalisés sur des arbres jeunes cultivés en serre ont été confirmés sur des arbres de 4 ans cultivés aux champs dans 2 pays (UK 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). Ainsi, la sous-expression *COMT* a un impact négatif sur la transformation de ces arbres en pâte à papier Kraft en raison de la faible fréquence des unités S associée à un enrichissement des lignines en unités G et en liaisons condensées. Cet impact négatif est observé même en cas de réduction du taux de lignines, ce qui démontre le rôle majeur de la structure des lignines sur le procédé industriel kraft. Ceci est confirmé par les résultats de la sous-expression de l'activité *CAD*. Une déficience *CAD* modérée ne provoque qu'une légère diminution du taux de lignines, mais en modifie la structure de manière plus marquée, avec l'incorporation de sinapaldéhyde qui désorganise le réseau ligneux. Par rapport au témoin, les lignines obtenues sont enrichies en groupes phénoliques libres, caractéristique les rendant plus faciles à éliminer par le procédé kraft de délignification en milieu alcalin. 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. Selon les conditions du procédé kraft (pour éliminer 1 tonne de lignines de 4 tonnes de bois, il faut le traiter par plus d'une tonne de soude et de réactifs soufrés, pendant plusieurs heures et à près de 170°C) et la demande croissante en pâte à papier, un tel gain en énergie ou en réactifs présente un grand intérêt environnemental.

3- PERSPECTIVES

La stratégie a priori la plus simple pour faciliter la transformation du bois en pâte à papier par délignification chimique (procédé kraft) ou pour augmenter la digestibilité des

fourrages est de réduire le taux de lignines. Cependant, cette stratégie est délicate : 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 labiles, rend le bois de peuplier plus facile à délignifier par le procédé kraft.

Les lignines industrielles, co-produits de la pâte à papier obtenue par délignification chimique, sont actuellement utilisées comme combustible: brûler ces polymères au pouvoir calorifique élevé fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement du site industriel. En raison de l'abondance des parois lignifiées renouvelables et de la diminution des réserves fossiles, sources de carburants et de matières plastiques, il serait intéressant d'identifier d'autres usages aux parois lignifiées et aux lignines industrielles qui en sont dérivées (BOUDET *et al.*, 2003). Divers programmes de recherche prospectent les potentialités des lignines industrielles. Certains visent à améliorer la conversion enzymatique de la cellulose en glucose fermentescible en éthanol. Ce biocarburant renouvelable, qui est actuellement produit à partir de matières premières à vocation essentiellement alimentaire (amidon ou saccharose), pourrait être produit à partir de la cellulose présente en abondance dans des co-produits forestiers (résidus de scierie) et agricoles (paille) peu valorisés. Or l'obstacle majeur de cette conversion de la cellulose est la présence de lignines. Des lignines aux propriétés différentes, qui seraient mieux adaptées à ces nouveaux usages, pourraient être obtenues par des transformations génétiques ciblées reposant sur une meilleure connaissance des facteurs contrôlant la structure et l'assemblage pariétal des lignines.

« Journée de l'A.S.F. du 2 février 2006 »

BIBLIOGRAPHIE

BARRIERE, Y. et ARGILLIER, O. –1993- Brown-midrib genes of maize : a review. *Agronomie* 13, 865-876.

BOERJAN, W., RALPH, J. ET BAUCHER, M. –2003- Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 : 21-1-21-28.

BOUDET, A.M., KAJITA, S., GRIMA-PETTENATI, J. ET GOFFNER, D. –2003- Lignins and lignocellulosics : a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.* 8, 576-581.

LAPIERRE, C., TOLLIER, M.T. ET MONTIES, B. –1988- Mise en évidence d'un nouveau type d'unité constitutive dans les lignines d'un mutant de maïs *bm3*. *C.R. Acad. Sci. III* 307, 723-728.

PILATE, G., GUINEY, E., HOLT, E., PETIT-CONIL, M., LAPIERRE, C., LEPLÉ, J.-C., POLLET, B., MILA, I., WEBSTER, E., MARSTORP, H.G., HOPKINS, D.W., JOUANIN, L., BOERJAN, W., SCHUCH, W., CORNU, D. ET HALPIN, C. –2002- Field performance of transgenic trees with altered lignin metabolism. *Nature Biotech.* 20, 607-612.

PIQUEMAL, J., CHAMAYOU, S., NADAUD, I., BECKERT, M., BARRIÈRE, Y., MILA, I., LAPIERRE, C., RIGAU, J, PUIGDOMENECH, P., JAUNEAU, A., DIGONNET, C., BOUDET, A., GOFFNER, D., PICHON, M. –2002- Down-regulation of caffeic acid *O*-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. *Plant Physiol.* 130, 1674-1685.