APPEL d'OFFRE INTERNE 2009
Fédération de Recherche ECCOREV 3098

Projet EVO-LIGNINE

Evolution de la structure de la lignine ou des précurseurs depuis les Atrachéophytes jusqu'aux Spermaphytes, et Recherche de la voie de biosynthèse chez une Bryophyte, étape préalable à l'apparition des premières plantes terrestres vasculaires.

Contexte de la recherche

La conquête du milieu terrestre par les végétaux, datant d'environ 400 millions d'années, est considérée comme un des évènements marquants de l'histoire des plantes terrestres. Les organismes ont dû faire face dans ce nouvel environnement à des contraintes majeures comme, notamment, la déshydratation ou la gravité. Dès lors, des tissus structurellement et fonctionnellement spécialisés se sont progressivement mis en place afin de limiter l'évapotranspiration, assurer le transport de l'eau et renforcer la résistance mécanique des axes.

Parallèlement, le caractère sessile de ces organismes végétaux les a également contraint à déployer des stratégies nouvelles pour s'adapter à de nombreux autres stress abiotiques tels que les températures extrêmes ou les rayonnements U.V. et biotiques comme les champignons, les bactéries ou les virus.

La voie du métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes s'est élargie à cette occasion. Les phénylpropanoïdes sont spécifiques du règne végétal et possèdent comme précurseur l'acide *t*-cinnamique dérivant de la phénylalanine.

Cette large famille de composés participe à de multiples fonctions impliquées dans le développement et les intéractions de la plante avec son environnement telles que les réactions de défense contre des agents biotiques ou abiotiques, la pigmentation, la fertilité, la lignification, ou encore les voies de transduction du signal.

Parmi toutes ces fonctions, la lignification est considérée comme ayant joué un rôle prépondérant dans l'adaptation des végétaux au milieu terrestre. L'incrustation de la paroi végétale par de la lignine lui confère une rigidité et une résistance mécanique accrue indispensable à l'acquisition d'un port dressé contrecarrant la gravité. Du fait de ses propriétés hydrophobes, les parois lignifiées imperméables du système vasculaire permettent le transport de l'eau et des solutés des racines jusqu'à l'appareil aérien. Par ailleurs, la lignification stimulée lors d'agression par des phytoparasites ou en cas d'herbivorie constitue une barrière mécanique et un moyen de défense efficace.

Ce biopolymère constitue après la cellulose le deuxième composé végétal le plus abondant sur Terre en terme de biomasse, représentant 15 à 30% du carbone organique de la biosphère. La lignine est formée par polymérisation de trois unités monomériques H (*p*-hydroxyphényl), G (guaiacyl) et S (syringyl) respectivement dérivés des alcools *p*-coumarylique, coniferylique et sinapylique issus de la voie des phénylpropanoïdes.

Le terme de lignine englobe en fait un ensemble de polymères caractérisés par une très grande diversité structurale :

La principale hétérogénéité est liée à la composition monomérique révélée par le ratio H:G:S. Ce ratio varie selon l'appartenance taxonomique de la plante, le type de tissu, voire la portion de paroi considérée. Des facteurs exogènes tels que les conditions environnementales et certains facteurs de stress peuvent également être à l'origine de lignines particulières.

Une autre hétérogénéité est attribuée aux différents types et à la répartition des liaisons établies entre ces unités monomériques (liaisons éther, liaisons carbone-carbone).

Le dernier type d'hétérogénéité trouve son origine dans les intéractions de la lignine avec son environnement moléculaire au sein de la paroi cellulaire, en particulier, avec les celluloses, les hémicelluloses et avec certains polymères complexes tels que les tannins [1].

Le but du projet EVO-LIGNINE soumis à ECCOREV permet d'associer des aspects fonctionnels des plantes à des considérations évolutives. Il se décline en 2 parties :

1- l'analyse de la biodiversité structurale de la lignine au cours de l'évolution,

2- l'identification de lignine ou de précurseurs de la lignine chez une Atrachéophyte par une démarche multidisciplinaire.

Objectifs de la demande

Descriptif du projet

1- Structure de la lignine et Biodiversité

La structure de cette macromolécule hétérogène reste non résolue. Elle est actuellement réévaluée sur la base d'une discussion des méthodes d'extraction et d'analyse. Les méthodes classiquement utilisées conduisent à un modèle de structure en réseau polymérique réticulé et tridimentionnel. Cependant, les conditions drastiques employées lors de ces protocoles d'extraction seraient susceptibles d'entraîner des modifications structurales. L'application du procédé d'extraction Avidel dans le cadre d'une étude structurale des lignines a d'ailleurs révélé une structure originale en chaînes dans le polymère. Cette méthode d'extraction moins agressive dégrade de manière très sélective les liaisons entre la lignine et les polysaccharides pariétaux et préserve intégralement la plupart des liaisons intermonomériques [2].

Au vu de ces données et afin de mieux caractériser la diversité de structure au cours de l'évolution, une étude comparée des lignines non extraites et extraites par cette méthode ou de composés phénoliques préfigurant la lignine chez différents taxons Atrachéophytes et Trachéophytes est proposée dans cette première partie du projet.

2- "Lignine" chez les Bryophytes ?

La lignine est actuellement considérée comme exclusivement présente chez les Trachéophytes. Des recherches effectuées au cours des années 90 suggèrent d'ailleurs que les Bryophytes ne contiennent pas de lignine [3]. Pourtant des études menées chez ces organismes ont mis en évidence la présence de lignine ou de polymères phénoliques structurellement proches accomplissant probablement des fonctions analogues [4,5]. Les avancées très récentes de la génomique chez certaines Bryophytes laissent également présager l'existence des enzymes de la voie de biosynthèse de la lignine chez ces organismes Atrachéophytes [6].

La seconde partie de ce projet est consacrée à la recherche de lignine ou de composés phénoliques préfigurant les lignines chez les Bryophytes. Certaines étapes considérées spécifiques de la voie de biosynthèse des lignines impliquant des CCRs ou des CADs seront caractérisées. Cette seconde partie sera menée chez Physcomitrella patens, première Bryophyte au génome récemment séquencé. Cette mousse bénéficie de nombreux atouts : (i) Elle présente la structure fondamentale de l'architecture d'une plante supérieure ; (ii) Le gamétophyte haploïde dominant son cycle de vie facilite les approches génétiques ; (iii) Les conditions de culture in vitro sont à ce jour maîtrisées permettant des expériences d'enrichissement en ^{13}C et des analyses spectroscopiques ^{13}C RMN 2D très résolutives ; (iv) Les approches de génétique inverse sont envisageables car le taux de recombinaison homologue est particulièrement élevé chez ce végétal [7].

Cette recherche multidisciplinaire associant des données histochimiques, spectroscopiques et génomiques devrait apporter un éclairage nouveau sur la structure et la synthèse de précurseurs de la lignine chez les Atrachéophytes, préalable indispensable à la conquête du milieu terrestre par les végétaux.

Description de la suite prévue pour le projet

La réalisation de ce projet permettra de mettre en place une coopération scientifique pluridisciplinaire entre plusieurs unités de recherche de la fédération ECCOREV travaillant notamment en écophysiologie végétale et écologie évolutive. Le groupement créé et les résultats obtenus constitueront une base intéressante pour répondre à un appel d'offre national de type ANR (*e.g.* Ecosystèmes et Développement Durable/Programme de génomique). Dans le cadre d'un tel projet, des collaborations feront appel à d'autres partenaires nationaux ou internationaux avec qui des contacts ont déjà été pris : ENSIACET Toulouse ; Fisheries & Oceans Dpt., Environmental Sciences Division, Science Branch, St. John's, Canada.

Réalisations prévues, plan financier succint, intéractions entre équipes

Plan de travail prévu:

Mai 2009 : Réunion de préparation du projet : choix du matériel végétal le plus pertinent sur lequel réaliser les analyses, choix du type d'extraction et des modalités d'analyse.

Juin 2009 : Mise en place des premières expériences sur *Physcomitrella*. Analyse d'expression des gènes candidats. Réalisation des constructions en vue de la localisation et de l'extinction des enzymes dans la plante.

Juillet-septembre 2009 : Analyses histochimiques, spectroscopiques RMN... sur les végétaux récoltés.

Novembre 2009-... : Analyses phénotypiques sur *Physcomitrella*.

Avril-Mai 2010 : Interprétations, discussions communes, rédactions d'articles scientifiques.

Plan financier succint :

Nature de la dépense :	Montant : €
Collecte matériel végétal	200 €
Analyses spectroscopiques (Extraction, ^{13}C RMN du solide, GPC-MS…)	1800 €
Culture (*Physcomitrella*, milieux, enceinte, ^{13}C,…)	800 €
Analyses moléculaires (Extraction ADN/ARN, PCR, séquençage...)	5200 €
Analyses histochimiques (histologie, microscopie…)	500 €
Petit matériel (boîtes de Petri, cônes pipetman,…)	500 €
Produits chimiques de base (N_2 liquide, solvants, eau ultrapure…)	200 €
Divers (frais de déplacement, bibliographie,...)	500 €
Montant total du projet (HT):	**9700 €**

Mode d'intéraction prévu entre les équipes:

La réalisation de ce projet multidisciplinaire va nécessiter la participation de chaque équipe reconnue pour son expertise dans des domaines ciblés :

- L'équipe IMEP apportera globalement son expérience en écophysiologie végétale et en écologie évolutive et, plus spécifiquement, en biologie moléculaire fonctionnelle (Génétique Adaptative & Ecophysiologie), en enzymologie (Ecologie Microbienne & Biotechnologies) ainsi qu'en analyse des composés organiques volatiles et phénylpropanoïdes (Diversité Fonctionnelle des Communautés Végétales).
- L'équipe BVME et notamment le Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes bénéficie d'une expérience reconnue en ce qui concerne *Physcomitrella patens*.
- En plus, sur l'aire Marseillaise, nous avons l'avantage de posséder une plateforme d'analyse spectroscopique (RMN, MS) basée sur le campus de St Jérôme, dont le personnel a déjà travaillé sur l'analyse structurale de certaines lignines.

Description du consortium

Equipe	NOM, prénom	Statut	% d'implication
IMEP-GAE	LE BRIS Manuel*	MCF	20
IMEP-GAE	FOLZER Hélène	MCF	5
IMEP-EMB	LE PETIT Jean	PR	5
IMEP-DFCV	FERNANDEZ Catherine	MCF, HDR	5
BVME-LGBP	MENAND Benoît*	CR, HDR	10
Spectropole CNRS-FR1739	ZIARELLI Fabio*	IR	10

* porteurs du projet par équipe

Manuel LE BRIS

MCF Université Paul Cézanne
38 ans
Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie (IMEP)
UMR 6116 CNRS-UPCAM-IRD-UP-UAPV, Faculté des Sciences de St Jérôme, Avenue Escadrille Normandie-Niemen 13397 Marseille Cédex 20.

Publications liées au projet :

Roudier F., Fedorova E., Le Bris M., Lecomte P., Gyorgyey J., Vaubert D., Horvath G., Abad P., Kondorosi A. & Kondorosi E. 2003. The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. **Plant Physiology** 131: 1091-1103.

Diadema K., Baumel A., Le Bris M. & Affre L. 2003. Genomic DNA isolation and amplification from callus culture for DNA isolation in succulent plants, Carpobrotus species. **Plant Molecular Biology Reporter** 21: 1-5.

Favery B., Chelysheva L.A., Le Bris M., Jammes F., Marmagne A., de Almeida-Engler J., Lecomte P., Vaury C., Arkowitz R.A. & Abad P. 2004. Arabidopsis formin AtFH6 is a plasma membrane–associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. **Plant Cell** 16: 2529-2540.

Responsabilités administratives :

Animateur de l'équipe Génétique Adaptative et Ecophysiologie et Co-responsable du Service Commun de Biologie Moléculaire (IMEP-UMR 6116).

Encadrement d'un étudiant en thèse (2006-2009), co-encadrement d'un étudiant en thèse.

Benoît MENAND

CR2 CNRS (HDR)
33 ans
Laboratoire de Génétique et de Biophysique des Plantes (L.G.B.P)
UMR 6191 CNRS-CEA-Univ. Méditerranée, 163 Avenue de Luminy, 13009 Marseille

Publications liées au projet :

Menand B., Yi K., Jouannic S., Hoffmann L., Ryan E., Linstead P., Schaefer D. & Dolan L. 2007. An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. **Science** 316: 1477-80.
Article recommandé "Must Read" par Faculty of 1000 Biology.

Menand B., Calder G. & Dolan L. 2007. Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. **Journal of Experimental Botany** 58: 1843-9.

Responsabilités administratives :

PEPS du CNRS (2009) Crimousse : Identification de nouveaux senseurs des stress environnementaux chez les plantes par la mise en place d'un crible génétique chez la mousse *Physcomitrella patens*.
ANR Jeunes Chercheuses et Jeunes Chercheurs (2009-2011) : ENVI-DEVO ; Evolution de l'intégration entre la réponse à l'environnement et le développement des plantes terrestres.
Encadrement d'un post-doc, d'une étudiante en thèse (2008-2011), co-encadrement d'un étudiant en thèse.

Fabio ZIARELLI

IR2 CNRS
36 ans
Spectropole – Fédération des Sciences Chimiques de Marseille
CNRS-FR1739 - Campus St. Jérôme – 13013 Marseille

Publications liées au projet :

Alarcon-Gutierrez E., Floch C., Ziarelli F., Albrecht R., Le Petit J., Augur C. & Criquet S. 2008. Characterization of a mediterranean litter by 13C CPMAS NMR: relationships between litter depth, enzyme activities and temperature. **European Journal of Soil Science** 59: 486-495.

Banoub J.H., Benjelloun-Mlayah B., Ziarelli F., Nicolas J. & Delmas M. 2007. Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 21: 2867-2888.

Ziarelli F., Viel S., Sanchez S., Cross D. & Caldarelli S. 2007. Precision and sensitivity optimization of quantitative measurements in solid state NMR. **Journal of Magnetic Resonance** 188: 260–266.

Responsabilités administratives :

Responsable Service RMN Solide (Spectropole - CNRS-FR1739)

Mots-clés : adaptation, environnement terrestre, végétal, phénylpropanoïdes, Bryophytes

Références bibliographiques

[1] **Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M.** (2003) *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 519-46.
[2] **Banoub J. & Delmas M.** (2003*) Journal of Mass Spectrometry* **38**, 900-903.
[3] **Higuchi T.** (1990) *Wood Science and Technology* **24**, 23-63.
[4] **Wilson, M. A., Sawyer, J., Hatcher, P. G. & Lerch III, H. E.** (1989) *Phytochemistry* **28**, 1395-1400.
[5] **Erickson, M. & Miksche, G. E.** (1974) *Phytochemistry* **13**, 2295-2299.
[6] **Rensing, S.A. *et al.*** (2007) *Science*, **319**, 64-69.
[7] **Cove, D., Bezanilla, M., Harries, P. & Quatrano, R.** (2006) *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 497-520.