

Partenaires principaux (chercheurs et laboratoires) :

M. LE BRIS

Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie (I.M.E.P.) UMR 6116 CNRS-UPCAM-IRD-UP-UAPV

B. MENAND

Laboratoire de Génétique et de Biophysique des Plantes (L.G.B.P) UMR 6191 CNRS-CEA-Univ. Méditerranée

Fabio ZIARELLI

Spectropole – Fédération des Sciences Chimiques de Marseille CNRS-FR1739

Résultats principaux :

Les objectifs du projet EVO-LIGNINE étaient d'associer des aspects fonctionnels des plantes à des considérations évolutives. Ils se déclinaient en 2 parties :

(i)- l'analyse de la biodiversité structurale de la lignine au cours de l'évolution

Depuis la découverte récente de lignine chez une espèce d'algue rouge marine (*Calliarthron cheilosporioides*), la gamme de végétaux prévue initialement dans le projet a été élargie. En conséquence, aussi bien des algues de différents groupes que des végétaux atrachéophytes ou trachéophytes terrestres ont été pris en compte. Les échantillons végétaux sélectionnés et leur position dans la classification sont listés ci-dessous.

Lignée Brune

Straménopiles (*Laminaria rodriguezii*)

Lignée verte

Rhodobiontes (*Corallina elongata*, *Sphaerococcus coronopifolius*)

Chlorobiontes

Ulvophytes (*Codium bursa*)

Embryophytes – Marchantiophytes (*Scapania undulata*), Bryophytes (*Sphagnum denticulatum*, *S. capillifolium*, *S. papillosum*, *Physcomitrella patens*, *Ceratodon purpureus*), Lycophytes (*Selaginella denticulata*), Filicophytes (*Polypodium vulgare*), Pinophytes (*Pinus halepensis*, *Thuja plicata*), Angiospermes dicotylédones (*Quercus ilex*, *Quercus suber*, *Ludwigia lanceolata*, *Arabidopsis thaliana*), Angiospermes monocotylédones (*Triticum durum*)

Chez la majorité de ces végétaux une analyse spectroscopique ^{13}C RMN solide a été associée à une caractérisation anatomique et histochimique spécifique de la lignine.

(ii)- l'identification de lignine ou de précurseurs de la lignine chez une atrachéophyte par une démarche multidisciplinaire.

L'accent a surtout été porté sur ce second volet consacré à une espèce d'atrachéophyte modèle, *Physcomitrella patens* en tirant profit de la disponibilité récente d'outils de génomique fonctionnelle chez cette espèce. Un prérequis indispensable a été la mise en place de cultures axéniques de l'espèce et la construction d'enceintes *ad hoc* spécialement dédiées à l'enrichissement en $^{13}\text{CO}_2$. Cet enrichissement a rendu possible l'obtention de spectres ^{13}C RMN 2D pour affiner la caractérisation de la lignine. Des composés voisins de lignine riches en unités *p*-hydroxyphényl et guaiacyl ont alors pu être détectés.

Parallèlement, des CCRs et des CADs, enzymes spécifiques catalysant les 2 dernières étapes de la voie de biosynthèse des monolignols ont été recherchées chez *Physcomitrella*. A partir d'une analyse bioinformatique de données de séquence génomiques et ESTs disponibles, 11 gènes putatifs (3 CADs et 8 CCRs) ont été identifiés. Les profils d'expression établis par RT-PCR semi-quantitative dans différents organes (protonema, gamétophyte, sporophyte) coïncidant avec la présence attendue de lignine ont permis de retenir un gène de CCR et deux de CAD. Après clonage et séquençage, ces gènes présentent des analogies élevées de séquence et de structure avec des gènes déjà isolés chez les spermaphytes.

L'analyse fonctionnelle avancée de ces gènes a préalablement nécessité la construction de plasmides d'expression en système de clonage gateway® dédiés à *Physcomitrella*. Un profil d'expression détaillé tissulaire et une localisation sub-cellulaire ont été obtenus par fusions traductionnelles avec des gènes rapporteurs GUS et GFP respectivement. Des lignées knock-out ont également été générées pour caractériser l'incidence de la perte de fonction de ces gènes (histo-anatomie et RMN). Les résultats des analyses de ces différentes lignées sont cohérents avec une implication de ces gènes dans la biosynthèse de lignine. Cette caractérisation fine est en cours de finalisation (validation des localisations sub-cellulaires par co-localisation avec des marqueurs, achèvement des analyses RMN) et une production de protéine recombinante est envisagée afin de déterminer les propriétés de ces enzymes (spécificité de substrat...).

Chaque partie fera l'objet d'une publication dans une revue à comité de lecture. Le projet a permis de renforcer les collaborations entre les équipes partenaires, mais n'a pas encore donné lieu à une soumission à un programme plus conséquent de type ANR.