

Université des Sciences et Technologies de Lille

**THESE DE DOCTORAT**  
**Ecole doctorale Biologie Santé**

Présentée par

**Charlotte Plancke**

En vue de l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université de Sciences et Technologies de Lille

**Etude du métabolisme de l'amidon chez  
les Archaeplastida : le cas de l'algue  
glaucophyte modèle unicellulaire  
*Cyanophora paradoxa* et de l'algue rouge  
multicellulaire *Chondrus crispus*.**

Présentée le 3 octobre 2008 devant la commission d'examen :

<b>Président :</b>	DR Jean-Claude MICHALSKI
<b>Rapporteurs :</b>	DR Catherine BOYEN Pr Wolfgang LÖFFELHARDT
<b>Examineurs :</b>	Pr Martin STEUP Pr Alan MYERS Pr Andreas WEBER Pr Christophe d'HULST
<b>Directeur de thèse :</b>	Pr Steven BALL
<b>Co-directeur de thèse :</b>	Dr Christophe COLLEONI

## REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle (UMR 8576 CNRS) à l'université des sciences et technologies de Lille I.

Je tiens à remercier le directeur de l'unité Jean-Claude Michalski de m'avoir accueillie au sein de la grande famille du C9 et d'avoir accepté de présider ma commission d'examen. Merci également à tout le personnel du C9 pour leur accueil, leur aide et leur présence.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté de juger de mon travail de thèse et plus particulièrement mes rapporteurs, Catherine Boyen et Wolfgang Löffelhardt, à qui je n'ai pas laissé beaucoup de temps pour la lecture de ma thèse et l'écriture de leur rapport.

Un grand merci à Steven Ball de m'avoir accueillie dès le master recherche au sein de son équipe et de m'avoir accompagnée jusqu'au bout de ces 4 années. Je le remercie également de m'avoir permis de travailler en collaboration dans d'autres équipes, ainsi que les laboratoires qui m'ont accueillie chaleureusement et m'ont permis de m'ouvrir à d'autres horizons.

So I'd like to thank Prof Martin Steup and all the Team for your welcoming, especially Gerard and Sophie for your help and the time when you dedicated me. Thank you also to Neha and Zina for your welcoming, your kindness and your friendship. I was afraid of the language barrier by arriving, but you quickly made it disappear.

Merci à Catherine Boyen pour m'avoir accueillie dans son UMR, à Jonas pour m'avoir, entre autre, cédée pendant ces quelques mois sa paillasse, ainsi que toutes les personnes qui travaillent à la station biologique de Roscoff, qui m'ont aidée dans mes recherches et m'ont sortie pendant mes week-end, je ne me lancerai pas dans une liste de noms qui serait je pense trop longue mais je suis sûre que toutes les personnes à qui je pense s'y retrouveront. Merci à tous (et également à l'AJC).

Revenons du côté du C9 !

Merci Christophe pour m'avoir encadrée pendant ces années et d'avoir supporté de temps à autres mes sautes d'humeur (j'espère qu'il n'y en a pas eu trop).

Merci à l'homme de l'ombre qui même s'il joue les gros durs est toujours là pour nous aider et nous accompagner. Et oui David c'est de toi que je parle.

Un petit clin d'œil à tous les membres des labos 005 et 002 (même si votre numéro a changé cette année !) qui sont passés à mes côtés pendant ces 4 années. Je ne peux cette fois me permettre d'aller outre la liste, même si elle va être incomplète et résumée à l'essentiel (désolée merci à tous quand même). Merci Philippe d'avoir toujours été là pendant plus de 3 ans, Thierry d'être venu soulager notre travail, Jeni de m'avoir obligée à parler anglais, Jean-phi de répondre toujours présent même s'il est parti, Nico, Fabrice, Christophe pour les coups de mains en cas de besoin, et bien sûr le meilleur pour la fin : Aline pour la solidarité féminine, son amitié, et toute l'aide qu'elle m'a apportée, surtout à la fin.

Merci tout simplement à anf, bibi(1), bibi(2), vivi, gaby, maion et fab.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir permis de faire de telles études, m'avoir laissée jouer les « Tanguis » et être toujours là, tout simplement. Merci à Guillaume et Johanne pour votre aide, votre patience, et pour avoir déserté la maison pour me laisser rédiger.

Je remercie également Etienne qui m'a permis d'appréhender la soutenance de façon plus détendue :p.

Merci à tous ceux que je n'ai pas nommés mais qui, volontairement ou non, ont contribué à mon orientation et à ma présence ici aujourd'hui.

Mes dernières pensées vont à ma grand-mère qui n'est plus là aujourd'hui mais qui, j'en suis certaine aurait été très fière de tous ses petits-enfants.

## RESUME

### **Etude du métabolisme de l'amidon chez les Archaeplastida : le cas de l'algue glaucophyte modèle unicellulaire *Cyanophora paradoxa* et de l'algue rouge multicellulaire *Chondrus crispus*.**

L'amidon et le glycogène définissent les deux polysaccharides de réserve les plus répandus dans le monde vivant. L'apparition de l'amidon chez les eucaryotes coïncide avec un événement d'endosymbiose unique qui s'est déroulé il y a 1,6 milliards d'années entre une cyanobactérie et un eucaryote primitif. De cet événement sont apparues trois lignées photosynthétiques : les Chloroplastida (plantes terrestres et algues vertes), les Rhodophyceae (algues rouges et organismes qui en sont dérivés par endosymbiose secondaire) et les Glaucophyta.

La voie de biosynthèse de l'amidon chloroplastique chez les Chloroplastida est relativement bien caractérisée. Pour celle des Rhodophyceae (amidon cytoplasmique) des études ont déjà été entreprises mais les informations obtenues sont encore incomplètes et non représentatives de la lignée en général. Enfin pour les Glaucophyta, qui ont divergé de façon plus précoce après l'évènement d'endosymbiose aucune information sur le métabolisme de son amidon (cytoplasmique) n'était disponible.

Afin d'appréhender la voie de biosynthèse utilisée par ces organismes nous avons entrepris la caractérisation de la voie métabolique de l'amidon de *Cyanophora paradoxa* (Glaucophyta) ainsi que celle de *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). Ce manuscrit de thèse présente essentiellement des informations sur le métabolisme de l'amidon floridéen chez *Cyanophora paradoxa*, l'étude entreprise chez *Chondrus crispus* étant encore à l'état préliminaire.

## SUMMARY

**Starch metabolism in Archaeplastida: the case of the glaucophyte unicellular model algae *Cyanophora paradoxa* and of the multicellular red algae *Chondrus crispus*.**

Starch and glycogen both define the most wide-spread storage polysaccharide in the world. The starch appearance in the eukaryotic lineage coincides with a single endosymbiotic event occurring 1,6 billion years ago between a cyanobacteria and a primitive eukaryotic host. From this event appeared three photosynthetic lines: Chloroplastida (land plants and green algae), Rhodophyceae (red algae and organisms which are diverted from the Rhodophyceae by secondary endosymbiosis) and Glaucophyta.

The plastid starch biosynthesis pathway in Chloroplastida is relatively well characterized. For the Rhodophyceae (cytosolic starch) studies have already been initiated but the information obtained is still incomplete and not representative of the lineage. Finally for the Glaucophyta, which diverged in a more premature way after the event of endosymbiosis no information about this (cytosolic) starch metabolism was available.

To discover the biosynthesis pathway used by these organisms, we decided to perform the complete characterization of the starch biosynthetic pathway for two different organisms: The Glaucophyta named *Cyanophora paradoxa* and the Rhodophyceae named *Chondrus crispus*. This manuscript of PhD mainly presents information on the Floridian starch metabolism of *Cyanophora paradoxa*. The starch characterisation of *Chondrus crispus* is currently at the preliminary stage and will require further development.

## ABREVIATIONS

3PGA :	3-phosphoglycérate
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg :	acide désoxyribonucléique génomique
ADP :	adénosine diphosphate
ADPglc/ADPG :	adénosine diphospho-glucose
ADPglc-PPase :	adénosine diphospho-glucose pyrophosphorylase
AEC :	chromatographie échangeuse d'anions
AMP :	adénosine monophosphate
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AP :	amylopectine
ARNr :	acide ribonucléique ribosomal
ATP :	adénosine triphosphate
BSA :	bovine serum albumin
BE :	enzyme de branchement
BLD :	b- limite dextrine
DBE :	enzyme de débranchement
D-enzyme/DPE1 :	enzyme disproportionnante 1
DNS :	acide-3,5-dinitrosalicylique
dNTP :	un des quatre désoxyribonucléotide
DO :	densité optique
DP :	degré de polymérisation
DPE2 :	enzyme disproportionnante 2
DPM :	désintégrations par minute
DTT(DTE) :	dithiothréitol (dithioerythritol)
EST :	expressed sequence tag
Et coll. :	et collaborateur
F6P :	fructose-6-phosphate
F1,6bisP :	fructose-1,6- bisphosphate
FPLC :	Fast Protein Liquid Chromatography
G1P :	glucose-1-phosphate
G16P :	glucose-1,6-bisphosphate

G6P :	glucose-6-phosphate
GBSS :	amidon-synthétase liée au grain
Glc :	glucose
GLY :	glycogène
GPC :	gel permeation chromatography
GWD :	glucan water dikinase
kDa :	kilo dalton
Ki :	constante d'inhibition
Km :	constante de Michaelis
$\lambda_{\max}$ :	longueur d'onde au maximum d'absorbance
LHC :	light-harvesting complex
MALDI-TOF :	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
MES :	acide-2-(N-Morpholino)-éthanesulfonique
MOS :	malto-oligosaccharides
MS/MS :	spectrométrie de masse en tandem
pb :	paires de bases
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne
pH :	le potentiel hydrogène
Pi :	phosphate inorganique, orthophosphate
PPi :	pyrophosphate inorganique
PUL :	pullulan
PWD :	phosphoglucan water dikinase
RMN :	résonance magnétique nucléaire
SEM :	microscopie électronique à balayage
SS :	amidon synthétase soluble
TBST :	TRIS Buffer Saline Tween
UDP :	uridine diphosphate
UDPglc/UDPG :	uridine diphospho-glucose
UTP :	uridine triphosphate
Vmax :	vitesse maximale

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>4</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>14</b>
<b>I.STRUCTURE DES POLYSACCHARIDES DE RESERVE.....</b>	<b>15</b>
I.1 Le glycogène .....	16
I.2 L'amidon .....	17
<b>II.LES VOIES METABOLIQUES DES POLYSACCHARIDES DE RESERVE.....</b>	<b>18</b>
II.1 Présentation des grandes étapes du métabolisme des glucanes de réserve. ....	19
II.1.1 <i>La synthèse des nucléotide-sucres : UDP-glucose et ADP-glucose.....</i>	<i>19</i>
II.1.2 <i>L'élongation des chaînes glucaniques.....</i>	<i>20</i>
II.1.3 <i>La formation des liaisons <math>\alpha</math>-1,6.....</i>	<i>20</i>
II.1.4 <i>L'organisation des ramifications .....</i>	<i>20</i>
II.2 Le métabolisme du glycogène .....	21
II.2.1 <i>Chez les procaryotes .....</i>	<i>21</i>
II.2.1.1 La synthèse du nucléotide-sucres.....	22
II.2.1.2 L'initiation et l'élongation des chaînes.....	22
II.2.1.3 La ramification de chaînes .....	23

II.2.1.4	Le catabolisme.....	23
<b>II.2.2</b>	<b><i>Chez les opisthocontes</i></b> .....	<b>24</b>
II.2.2.1	La synthèse du nucléotide sucre .....	25
II.2.2.2	L'initiation et l'élongation des chaînes.....	25
II.2.2.3	La ramification des chaînes.....	26
II.2.2.4	Le catabolisme.....	27
<b>II.2.3</b>	<b><i>Chez les amibes</i></b> .....	<b>28</b>
II.2.3.1	La synthèse du nucléotide sucre .....	28
II.2.3.2	L'initiation et l'élongation .....	28
II.2.3.3	La ramification .....	29
II.2.3.4	Le catabolisme.....	29
<b>II.3</b>	<b>Le métabolisme de l'amidon chez les algues et les plantes vertes..</b>	<b>31</b>
II.3.1.1	La synthèse du nucléotide sucre .....	31
II.3.1.2	L'initiation et l'élongation .....	32
II.3.1.3	La ramification .....	34
II.3.1.4	Le catabolisme.....	35
<b>III.L'</b>	<b>ORIGINE DU REGNE VEGETAL ET LES CONSEQUENCES SUR</b>	
<b>L'EVOLUTION</b>	<b>DU POLYSACCHARIDE DE RESERVE .....</b>	<b>37</b>
<b>IV.LE</b>	<b>METABOLISME DE L'AMIDON FLORIDEEN.....</b>	<b>39</b>
IV.1	Le métabolisme de l'amidon chez les algues rouges et leurs dérivés endosymbiotiques .....	40
IV.2	Le métabolisme de l'amidon chez les glaucophytes .....	43
<b>V.PRESENTATION</b>	<b>DES MODELES.....</b>	<b>44</b>
V.1	Le glaucophyte <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	45
V.2	Le rhodophyte <i>Chondrus crispus</i> .....	46
<b>PARTIE 1 : VOIE DE SYNTHESE DE L'AMIDON CYTOPLASMIQUE CHEZ LE</b>	<b>MODELE GLAUCOPHYTE <i>CYANOPHORA PARADOXA</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>.....</b>	<b>49</b>
<b>RESUME</b>	<b>.....</b>	<b>50</b>

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>51</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>53</b>
Produits .....	53
Souche, milieu et condition de culture .....	53
Extraction de l'amidon, production d'extraits bruts, cytoplasmiques et de cyanelles.....	55
Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique.....	56
Distribution de la longueur de chaînes de l'amylopectine .....	57
Microscopie électronique à transmission et mesures de diffraction aux rayons X.....	57
Extraction et visualisation de protéines liées aux grains d'amidon .....	58
Western blot dirigé contre la petite sous unité de l'ADPglc pyrophosphorylase .....	58
Zymogrammes.....	59
Zymogramme des activités amidon-synthétases solubles et phosphorylases.....	59
Zymogramme des activités modifiant l'amidon .....	60
Mesure de l'activité GBSS.....	60
Purifications et dosages d'activités.....	61
<i>Dosage des activités ADP- et UDP-glucose pyrophosphorylases dans le sens synthèse .....</i>	<i>61</i>
<i>Purification des activités synthétases et phosphorylase.....</i>	<i>61</i>
<i>Dosage des activités synthétases .....</i>	<i>62</i>
<i>Dosage de l'activité phosphorylase .....</i>	<i>62</i>
<i>Purification des activités hydrolysant l'amidon.....</i>	<i>63</i>
Analyse RMN.....	64
Clonage d'une partie de l'ADN génomique de la GBSS de <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	65

Criblage et clonage des ADNc d'une amidon-synthétase, d'une amidon-phosphorylase, et de la GBSS de <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	66
<i>Préparation des souches bactériennes</i> .....	66
<i>Titrage de la banque</i> .....	66
<i>Extraction de l'ADNc de la banque</i> .....	67
<i>Réalisation des sondes</i> .....	67
<i>Criblage de la banque</i> .....	67
<i>Excision des phages</i> .....	68
<b>RESULTATS .....</b>	<b>70</b>
Caractérisation des grains d'amidon de <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	70
Etude de l'amidon-synthétase liée au grain .....	73
Etude des activités amidon-synthétases.....	77
Etude de la présence d'une ADPglc pyrophosphorylase .....	81
Etude des enzymes de débranchement .....	83
Etude des amidon-phosphorylases .....	84
Conséquences des approches menées chez <i>Cyanophora paradoxa</i> sur notre connaissance du métabolisme des polysaccharides de réserve. .	88
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>93</b>
<b>PARTIE 2 : ETUDE PRELIMINAIRE DU METABOLISME DE L'AMIDON CHEZ L'ALGUE ROUGE MULTICELLULAIRE CHONDRUS CRISPUS. ....</b>	<b>98</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>99</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>101</b>
Produits .....	101
Souche et condition de culture .....	101
Extraction d'amidon et production d'extrait bruts.....	101
Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique, extraction et visualisation des protéines liées au grain. ....	102

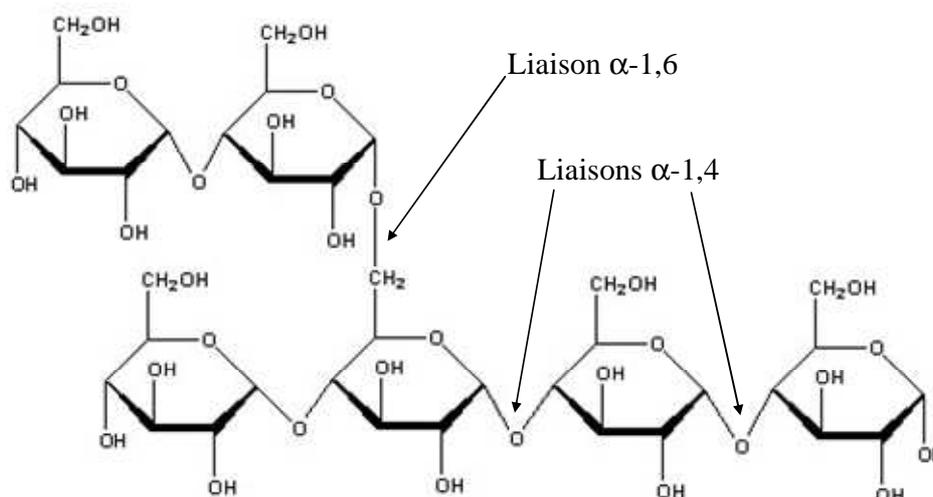
Dosage des activités ADP- et UDP-glucose pyrophosphorylases dans le sens synthèse .....	102
Dosage des activités synthétases .....	102
<b>RESULTATS .....</b>	<b>104</b>
Caractérisation des grains d'amidon de <i>Chondrus crispus</i> .....	104
Etude des activités NDPglc pyrophosphorylases. ....	106
Etude des activités amidon-synthétases solubles.....	108
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>111</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>113</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>118</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>132</b>
Annexe 1 : ADNc complet et séquence protéique de la GBSSI de <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	133
Annexe 2 : ADNg partiel de la GBSS de <i>Cyanophora paradoxa</i> montrant l'alternance importante d'introns (surlignés) et d'exons de petites tailles.....	135
Annexe 3 : ADNc partiel et séquence protéique de l'amidon synthétase soluble de <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	136
Annexe 4 : ADNc complet et séquence protéique de la phosphorylase de <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	138
Annexe 5 : Alignement de la séquence protéique de la GBSS de <i>Cyanophora paradoxa</i> avec celles de <i>Porphyridium purpureum</i> , <i>Guillardia theta</i> , <i>Crocospheara watsonii</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ,	

Oryza sativa, Arabidopsis thaliana, Solanum tuberosum, Populus trichocarpa, et Escherichia coli. ....	140
Annexe 6 : Alignement de la séquence protéique correspondant à la partie de l'ADNc de l'amidon synthétase soluble de <i>Cyanophora paradoxa</i> avec celles de <i>Tetrahymena thermophila</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Cyanidischyzon merolae</i> , <i>Galdieria sulphuraria</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> SSIII et <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> SSII. ....	142
Annexe 7 : Alignement de la séquence protéique de la phosphorylase de <i>Cyanophora paradoxa</i> avec celles de <i>Homo sapiens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Cyanidioschyzon merolae</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i> et <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	147
Annexe 8 : Pathway of Cytosolic Starch Synthesis in the Model Glaucophyte <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	150

# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Structure des polysaccharides de réserve

Il existe différents polysaccharides de réserve classés en fonction du ou des unités saccharidiques utilisées et de la nature des liaisons glycosidiques. Les polysaccharides de réserve principaux sont des homopolymères de glucose. On distingue les  $\alpha$ -glucanes des  $\beta$ -glucanes. Les premiers sont les plus répandus et comprennent les deux principaux polysaccharides de réserve : le glycogène et l'amidon. Ceux-ci sont constitués de chaînes de D-glucose liées en  $\alpha$ -1,4 ( $\alpha$ -1,4-glucanes) et ramifiées en  $\alpha$ -1,6 par des liaisons O-glycosidiques (figure 1). La formule générale des  $\alpha$ -1,4-glucanes est  $(D-Glc \alpha-1,4-D-Glc)_n$  avec n le nombre de répétition du motif précédent qui correspond au maltose. Ces chaînes glucaniques peuvent aussi être mesurées en fonction de leur degré de polymérisation ou DP, qui correspond au nombre de résidus de glucose. Dans ce cas le maltose est qualifié de DP2 et ainsi de suite. Cette nomenclature sera utilisée ultérieurement.

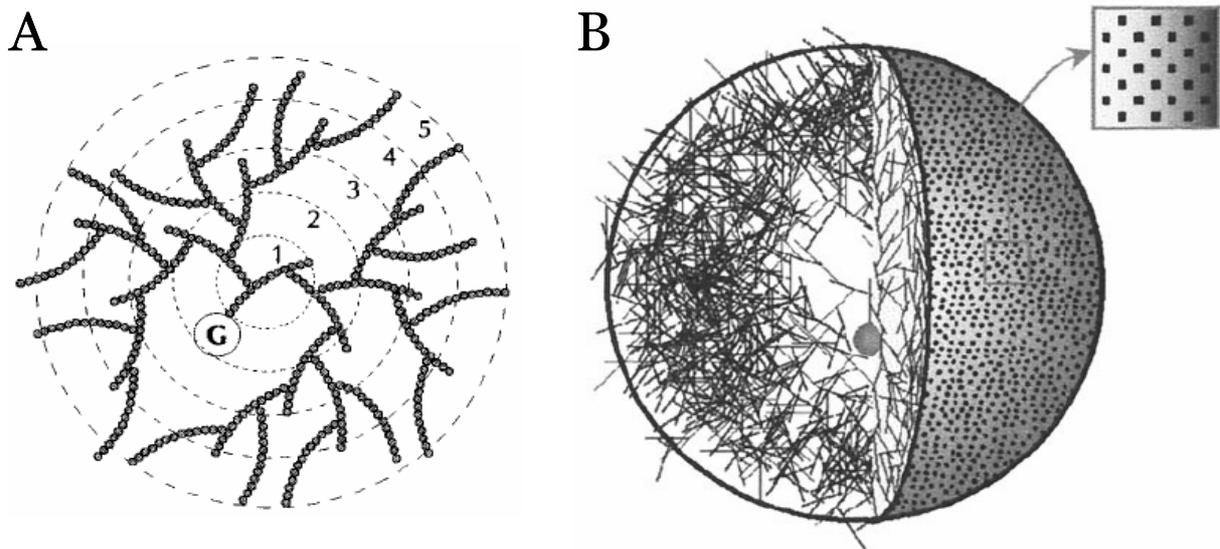


**Figure 1.** Formule semi-développée d'un  $\alpha$ -1,4 glucane ramifié une fois en  $\alpha$ -1,6.

Le glycogène et l'amidon, bien qu'étant tous les deux des  $\alpha$ -1,4-glucanes, présentent une structure et donc des propriétés physico-chimiques très différentes.

## I.1 Le glycogène

Le glycogène se présente sous forme de particules sphériques hydrosolubles dans le cytoplasme des cellules de mammifères, de bactéries et de champignons. L'étude structurale de différentes sources de glycogène révèle des caractéristiques communes : un taux de branchement compris entre 8 et 10 % et une longueur moyenne des chaînes glucaniques de 13 résidus de glucose (10 à 11 résidus chez les bactéries et de 11 à 16 unités chez les animaux, Melendez et coll., 1997) (figure 2A).



**Figure 2. Représentation schématique de la structure d'une particule de glycogène (d'après Melendez et coll, 1999).**

A : Schéma exposant la glycogénine, premier de la molécule de glycogène, ainsi que les premières chaînes de glucoses.

B : Vue générale de la molécule de glycogène. La coupe permet de voir l'intérieur avec la glycogénine, mais également les extrémités non réductrices du dernier tiers, accessibles aux enzymes de dégradation.

Un modèle mathématique basé sur différents paramètres observés *in vivo* (une longueur des chaînes de 12 résidus, deux points de branchement par chaîne et douze tiers composant la molécule) montre que la structure du glycogène se révèle être le meilleur compromis entre l'accessibilité des enzymes hydrolytiques et un empilage maximum de résidus de glucose dans un volume minimum (Melendez-Hevia et coll., 1993). Plus récemment, ces mêmes auteurs ont proposé que les particules de glycogène présenteraient une organisation de type fractale (répétition itérative d'un motif). Cet arrangement particulier des chaînes de glucose entraîne une augmentation exponentielle des extrémités non réductrices au cours de la synthèse

du glycogène, et conduit à un encombrement stérique à la surface de ces particules (figure 2B). La perte d'accessibilité des chaînes de glucose pour les enzymes d'élongation et de branchement conduit alors une limitation de la taille des particules de glycogène à 40 nm. Toutefois ces nombreuses extrémités non-réductrices restent accessibles au site catalytique de la phosphorylase, qui est la principale enzyme impliquée dans la dégradation du glycogène (Melendez et coll., 1999).

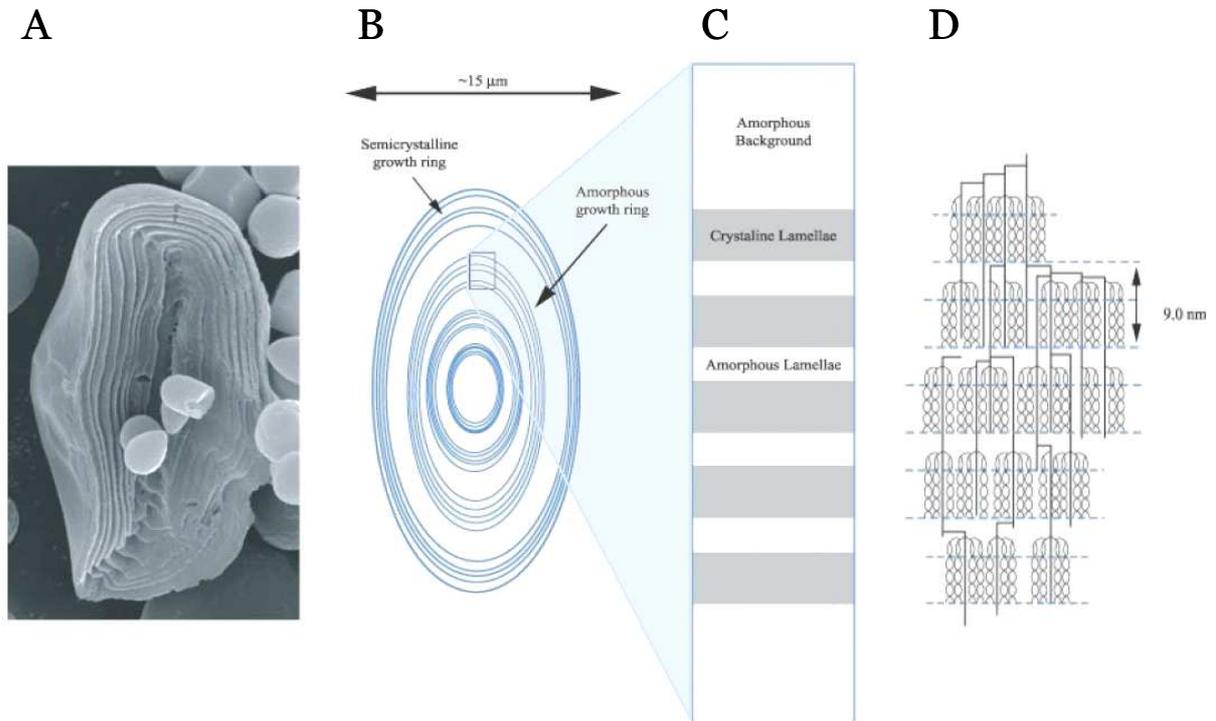
## I.2 L'amidon

L'amidon forme un grain semi-cristallin, insoluble dans l'eau, pouvant mesurer de 1 à 100  $\mu\text{m}$  selon les organismes (Buléon et coll., 1998). On peut distinguer deux types d'amidon : l'amidon dit « transitoire », formé lors de la photosynthèse et qui s'accumule dans les chloroplastes des plantes et des algues vertes, ou dans le cytoplasme des algues rouges (amidon floridéen), et l'amidon dit « de réserve » qui est localisé dans les amyloplastes des organes de réserve (graines, tubercules...).

L'amidon est composé de deux homopolymères de glucoses branchés : l'amylopectine (4 à 6 % de points de branchement) et l'amylose (moins de 1 %). Ces polysaccharides sont en proportions différentes. L'amylopectine représente en général chez les plantes vertes 70 à 80 % du poids du grain d'amidon et l'amylose 20 à 30%. L'étude de mutants dépourvus d'amylose chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Delrue et coll., 1992), le maïs (Tsai, 1974) et d'autres organismes, montre que la molécule d'amylose n'est pas nécessaire pour l'édification normale du grain d'amidon.

Le grain croît à partir du centre ou hile par une alternance de couches concentriques amorphes et cristallines visibles après une hydrolyse ménagée à l'acide (Buléon et coll., 1998) (figure 3A). L'analyse des couches cristallines montre que celles-ci sont elles-mêmes constituées par une succession de lamelles cristallines et amorphes (figure 3B et 3C). Cette alternance vient de l'organisation particulière des chaînes glucaniques de l'amylopectine dite « en grappe » (figure 3D), dans laquelle les lamelles cristallines sont constituées des doubles hélices de glucanes, et les lamelles amorphes contiennent les points de branchement. Contrairement au glycogène, ces structures en grappe permettent, en théorie, un accroissement illimité

de la taille des grains d'amidon et lui confèrent ses propriétés physico-chimiques (cristallinité, insolubilité dans l'eau, densité élevée).



**Figure 3. Illustrations de l'organisation hiérarchique du grain d'amidon (d'après Ball et Morell, 2003).**

A : Photographie d'un grain d'amidon observé au microscope électronique à balayage après hydrolyse ménagée à l'acide.

B, C, D : Représentation schématique des différents niveaux d'organisation du grain d'amidon.

B : Grain formé d'une alternance de régions cristallines (cercles bleus), résistantes à l'hydrolyse ménagée à l'acide, et de régions amorphes.

C : Agrandissement d'une région cristalline montrant une alternance de lamelles cristallines et amorphes.

D : Correspondance des lamelles cristallines et amorphes respectivement avec les zones contenant les doubles hélices de glucanes et les points de branchement de la grappe d'amylopectine.

## II. Les voies métaboliques des polysaccharides de réserve

Nous avons montré précédemment que le glycogène et l'amidon présentaient des différences au niveau de leur structure et de leurs propriétés physicochimiques, malgré une structure primaire identique. Les voies métaboliques de ces glucanes

présentent un grand nombre de points communs, cependant la structure particulière de l'amidon nécessite au moins une étape enzymatique supplémentaire.

## **II.1 Présentation des grandes étapes du métabolisme des glucanes de réserve.**

La biosynthèse des  $\alpha$ -glucanes de réserve peut se résumer en trois grandes étapes enzymatiques communes :

- la synthèse du nucléotide-sucre précurseur ;
- l'allongement des chaînes de glucoses liés en  $\alpha$ -1,4 ;
- la formation des liaisons  $\alpha$ -1,6 ou points de branchement.

La synthèse de l'amidon nécessite de façon supplémentaire l'intervention d'une enzyme permettant l'organisation des points de branchement dans la fraction d'amylopectine.

### **II.1.1 La synthèse des nucléotide-sucres : UDP-glucose et ADP-glucose**

Le glucose n'est utilisable pour la biosynthèse des polysaccharides de réserve que s'il est sous forme activée. Pour cela, il est couplé à un nucléotide-triphosphate par la réaction suivante :



L'ADP-glucose (ADPglc) ou l'UDP-glucose (UDPglc) seront, suivant les organismes, les précurseurs utilisés pour la synthèse des glucanes. Ce sont les adénosine diphospho-glucose pyrophosphorylase (ADPglc-PPase, EC 2.7.7.9) et uridine diphospho-glucose pyrophosphorylase (UDPglc-PPase, EC 2.7.7.27) qui catalysent la formation de ces précurseurs.

L'UDPglc-PPase et la synthèse de l'UDPglc ne seront pas étudiées car ce métabolite est utilisé dans d'autres processus cellulaires et sa synthèse est indépendante de la synthèse des polysaccharides de réserve.

### **II.1.2 L'élongation des chaînes glucaniques.**

Les résidus de glucose des nucléotide-sucres précédemment synthétisés sont transférés grâce aux enzymes d'élongation, aussi appelées amidon/glycogène-synthétases (EC 2.4.1.21), sur l'extrémité non-réductrice d'une chaîne glucanique préexistante.



Il existe de multiples isoformes des enzymes d'élongation chez les végétaux. Celles-ci seront détaillées ultérieurement.

### **II.1.3 La formation des liaisons $\alpha$ -1,6**

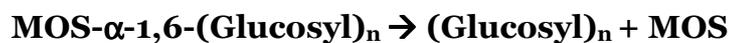
Le branchement des polysaccharides de réserve est réalisé par les enzymes de branchement (BE) (EC 2.4.1.18) selon la réaction suivante :



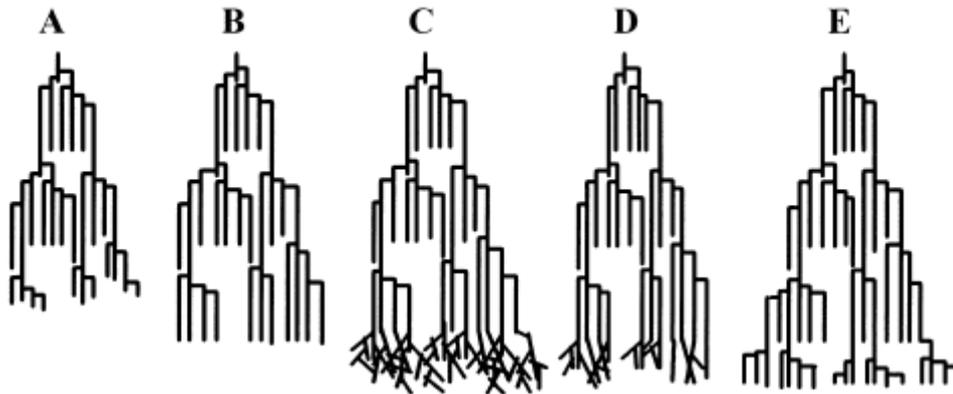
Les enzymes de branchement clivent une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un glucane et transfèrent le fragment libéré sur une chaîne acceptrice via une liaison  $\alpha$ -1,6. Ce transfert se fait généralement sur le glucane de départ (comme dans la formule ci-dessus) ou sur un glucane adjacent.

### **II.1.4 L'organisation des ramifications**

L'organisation des liaisons  $\alpha$ -1,6 est régulée par l'intervention d'enzymes de débranchement (DBE) appelées isoamylases (EC 3.2.1.68) selon la réaction suivante :



Les enzymes de débranchement clivent les liaisons  $\alpha$ -1,6 trop éloignées afin de regrouper les points de branchement et de former les lamelles amorphes de l'amylopectine. Le modèle de la synthèse discontinue proposé par Ball et coll. (1996) explique comment la distribution asymétrique des points de branchement de l'amylopectine peut être obtenue chez les végétaux (figure 4).



**Figure 4. Modèle de synthèse discontinue de la biosynthèse de l'amylopectine (d'après Ball et coll, 1996).**

Modèle à deux dimensions de la biosynthèse de l'amidon se produisant à la surface du grain. L'élongation démarre à la base de la lamelle amorphe (A) et passe par la forme B jusqu'à une longueur critique permettant aux enzymes de branchement d'agir. Les activités de branchement conduisent à une structure intermédiaire hyperbranchée (C). L'activité de débranchement est simultanément en jeu pour éliminer certains points de branchement et donner la structure D. C'est cette activité qui prévient la synthèse de phytyloglycogène et qui épargne les points de branchement proches qui génèrent la nouvelle lamelle amorphe.

## **II.2 Le métabolisme du glycogène**

La synthèse du glycogène, suivant les types d'organismes, peut se faire à partir d'ADPGlc ou d'UDPGlc et avec des variations enzymatiques importantes. Par exemple, en fonction du nucléotide-sucré utilisé, la régulation du métabolisme n'a pas lieu au même niveau. Dans ce chapitre, nous allons décrire le métabolisme du glycogène chez les procaryotes (les bactéries) et les eucaryotes. Pour ces derniers nous le développerons chez les opisthocontes (animaux et champignons) et chez les amibes.

### **II.2.1 Chez les procaryotes**

Le métabolisme du glycogène chez les bactéries est connu depuis longtemps notamment chez *E. coli* (pour revue Preiss et Romeo, 1989). Cet organisme nous servira de modèle pour notre étude. Pour le métabolisme du glycogène, on trouve : une ADPGlc pyrophosphorylase (GlgC) ; une glycogène-synthétase ADPGlc dépendante (GlgA) ; une enzyme de branchement (GlgB) ; une phosphorylase (GlgP) ; et une enzyme de débranchement (GlgX) (figure 5). Les gènes codant ses enzymes sont organisés en deux opérons contenant respectivement *glgCAP* et *glgBX*. Ces opérons font partie d'un cluster (Romeo et coll., 1988). Des maltodextrine phosphorylases peuvent aussi intervenir dans le métabolisme du glycogène en

libérant du G1P à partir de maltodextrines (Preiss, 1984). Enfin, on trouve également une  $\alpha$ -amylase dans le cytoplasme d'*E.coli*, mais son rôle n'est pas connu.

### **II.2.1.1 La synthèse du nucléotide-sucre**

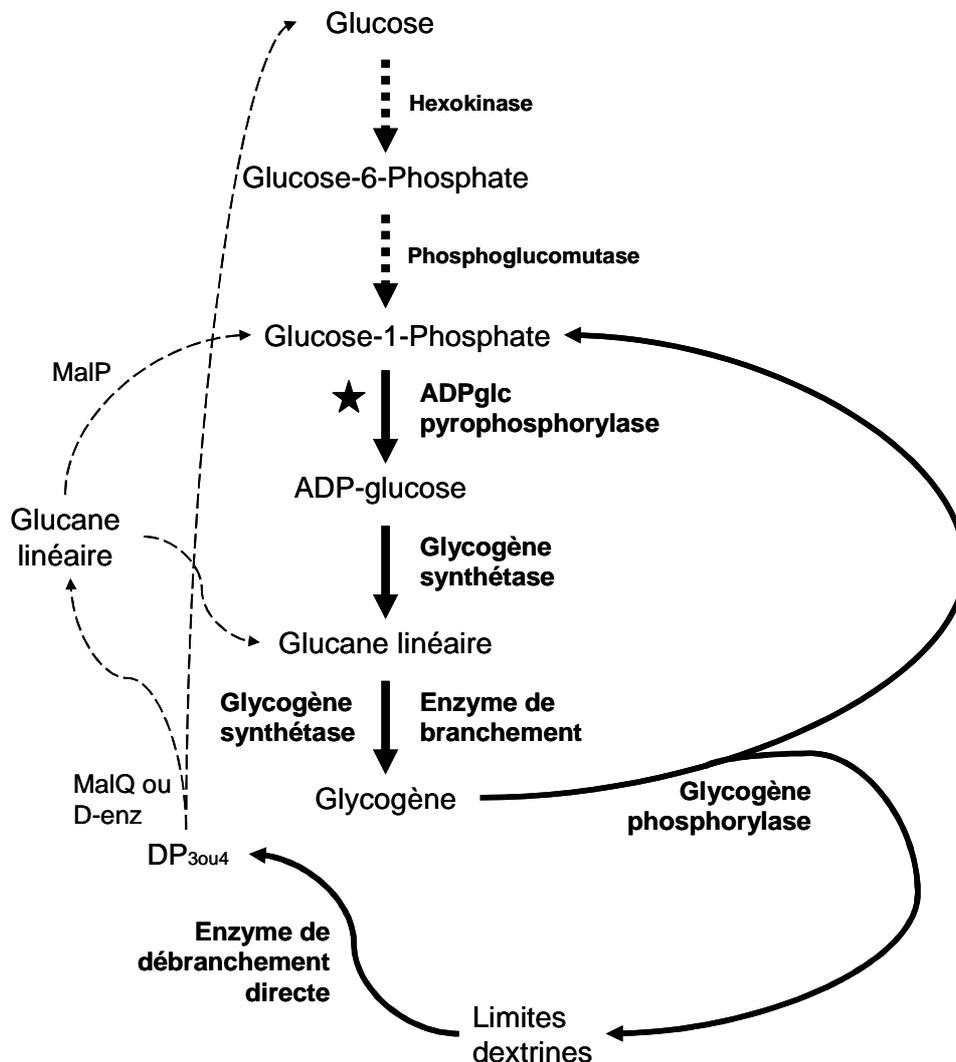
L'ADPglc pyrophosphorylase est une enzyme très importante puisqu'elle permet la synthèse du nucléotide-sucre précurseur, celui-ci étant utilisé uniquement pour le métabolisme du glycogène (Ballicora et coll., 2003). C'est l'étape régulatrice du métabolisme du glycogène chez les procaryotes, avec une régulation de type allostérique de l'ADPglc pyrophosphorylase. Cette enzyme se trouve généralement sous forme d'homotétramère chez les bactéries, et peut être activée par le pyruvate, le fructose-6-phosphate, et le fructose-1,6-bisphosphate. Ces métabolites reflètent la disponibilité en glucides de la cellule afin d'entreprendre leur stockage le cas échéant. Chez les entérobactéries, le principal activateur est le fructose-1,6-bisphosphate, le NADPH et le pyridoxal phosphate fonctionnant également (mais ces deux derniers ne fonctionnent pas chez les autres bactéries). Chez les bactéries photosynthétiques anaérobies, l'ADPglc-PPase est activée par le pyruvate. Certaines sont aussi activées par le fructose-6-phosphate, et quelques unes par le fructose-1,6-bisphosphate. Dans le cas des cyanobactéries, le métabolisme du glycogène est couplé à la photosynthèse et c'est alors le 3-phosphoglycerate (3PGA) qui joue le rôle d'activateur de l'enzyme. L'inhibition de l'activité de l'ADPglc-PPase se fait par la présence de métabolites associés à des métabolismes d'énergie tels que l'AMP, l'ADP et le phosphate inorganique (Pi). L'ADPglc pyrophosphorylase des bactéries entériques est très sensible à l'AMP, alors que celle des cyanobactéries est plus sensible au phosphate inorganique. Les autres ADPglc pyrophosphorylases étant sensibles aux trois métabolites (AMP, ADP et Pi).

### **II.2.1.2 L'initiation et l'élongation des chaînes**

Les glycogène-synthétases utilisent l'ADPglc comme donneur de sucre et permettent l'allongement des chaînes de glucose. Contrairement aux enzymes des animaux et des champignons, elles ne présentent ni régulation ni modification post-traductionnelle. On ne trouve qu'une seule synthétase chez les bactéries mais on peut en trouver deux chez les cyanobactéries. Par ailleurs, la glycogène-synthétase, chez *Agrobacterium tumefaciens*, est également capable d'initier la synthèse du glycogène (Ugalde et coll., 2003), ce qui explique l'absence d'une enzyme d'initiation, appelée glycogénine, chez les bactéries.

### II.2.1.3 La ramification de chaînes

Les bactéries semblent ne posséder qu'une seule enzyme de branchement (GlgB). Par contre chez certaines cyanobactéries on peut en trouver deux.



**Figure 5 : Schéma illustrant le métabolisme du glycogène chez les procaryotes.**

L'étoile indique l'étape limitante du métabolisme, celle où les enzymes sont régulées. Les lignes pointillées correspondent aux premières étapes qui ne sont pas spécifiques au métabolisme du glycogène. Les lignes discontinues correspondent aux voies cataboliques utilisées uniquement chez certains organismes (voie non générale) ou appartenant à un autre métabolisme (métabolisme du maltose).

### II.2.1.4 Le catabolisme

Le catabolisme du glycogène chez les bactéries requiert 4 enzymes : la glycogène phosphorylase (GlgP), l'enzyme de débranchement (GlgX), l'amyломaltase (MalQ) et la maltodextrine phosphorylase (MalP) (les deux dernières faisant partie du métabolisme du maltose).

La glycogène phosphorylase transfère un orthophosphate sur le carbone 1 d'un résidu de glucose présent à l'extrémité non réductrice d'une chaîne externe, et permet la libération de celui-ci sous la forme de G1P. Cette enzyme est la plus importante dans le catabolisme du glycogène chez les bactéries. Cependant cette enzyme n'est pas capable de lyser les liaisons  $\alpha$ -1,6, c'est pourquoi le catabolisme du glycogène nécessite la présence d'une enzyme de débranchement. De plus la plupart des phosphorylases sont incapables de dégrader des glucanes de taille égale ou inférieure à 4. La glycogène phosphorylase bactérienne s'arrête donc à 4 résidus de glucose (de distance) d'un point de ramification.

L'enzyme GlgX, de type isoamylase, intervient dans le processus de dégradation du glycogène en hydrolysant, de façon directe, avec une haute spécificité des chaînes de 3 ou 4 résidus de glucose (Dauvillée et coll., 2005). Cette spécificité permet de ne pas créer un cycle futile dans lequel l'enzyme de débranchement hydrolyserait immédiatement les produits de l'enzyme de branchement. Ce débranchement s'effectue donc sur les chaînes ayant été préalablement dégradées par la glycogène phosphorylase.

L'enzyme de débranchement libère donc des chaînes de 3 à 4 résidus de glucose qui ne peuvent plus être hydrolysées par la phosphorylase car les chaînes sont trop courtes pour être prise en charge par cette enzyme. Chez les bactéries, ces maltotrioses et maltotétraoses vont être pris en charge par des  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases comme l'amyломaltase (MalQ) chez *E. coli*, afin de former d'un côté des chaînes plus longues et de permettre de l'autre la libération d'un glucose. Les malto-oligosaccharides plus longs ainsi formés, sont ensuite digérés en maltotétraose par l'action de la maltodextrine phosphorylase (MalP) qui libère des glucose-1-phosphates. Ces enzymes n'existent pas chez les cyanobactéries mais on trouve des homologues de MalQ assez différents, que nous qualifierons de D-enzyme, et qui sont spécifiquement impliquées dans le métabolisme du glycogène.

## **II.2.2 Chez les opisthocontes**

Le métabolisme du glycogène chez les animaux et les champignons est certainement le mieux étudié. Il est pratiquement identique chez tous les organismes et présente 5 à 6 enzymes. Pour le métabolisme du glycogène chez les opisthocontes on trouve la glycogénine, la glycogène-synthétase qui est ici sujette à la régulation,

l'enzyme de branchement (similaire à celle des bactéries), la phosphorylase (qui est également une enzyme régulée), l'enzyme de débranchement, et parfois une glucosidase (Figure 6). Pour une revue générale sur le métabolisme du glycogène chez la levure, voir François et Parrou (2001).

### **II.2.2.1 La synthèse du nucléotide sucre**

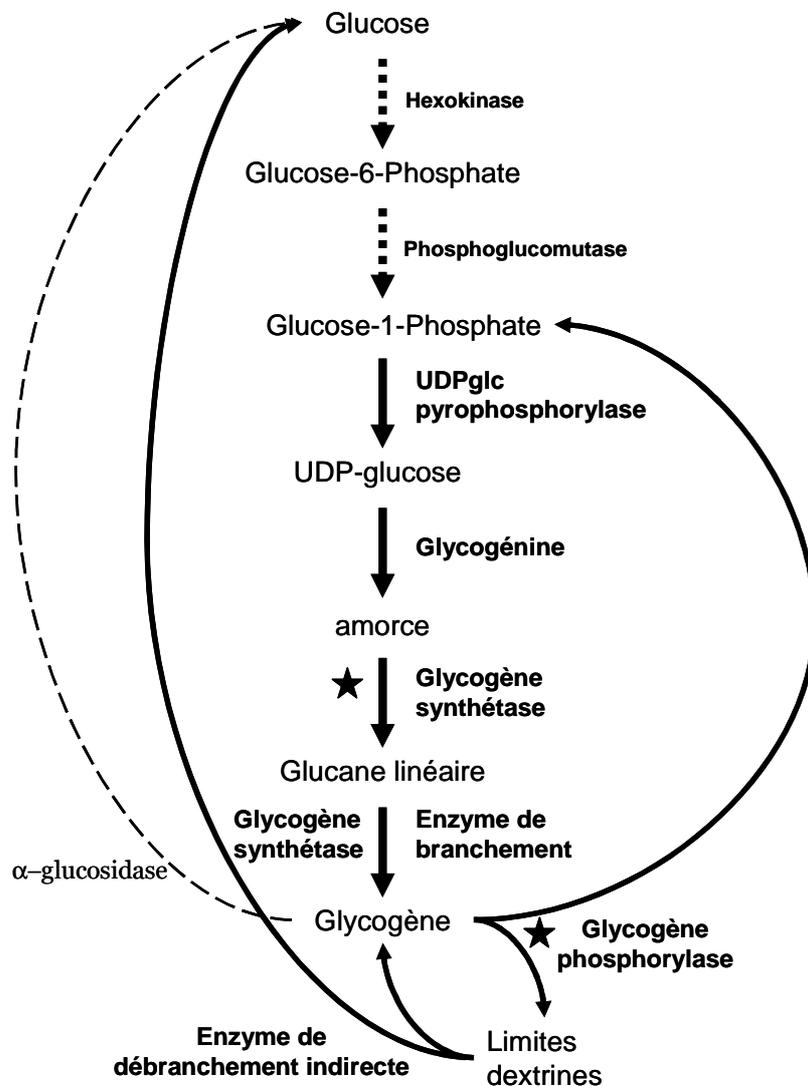
L'UDPglc pyrophosphorylase qui permet la synthèse du nucléotide sucre précurseur, ici l'UDPglc, n'est pas une enzyme spécifique du métabolisme de l'amidon, contrairement à l'ADPglc pyrophosphorylase chez les bactéries. En effet ce métabolite est également utilisé dans d'autres métabolismes dans la cellule, c'est pourquoi nous ne détaillerons pas cette étape enzymatique.

### **II.2.2.2 L'initiation et l'élongation des chaînes**

La glycogénine (enzyme d'initiation) présente une activité d'autoglycosylation : elle hydrolyse des molécules d'UDPglc afin de former une courte chaîne de résidus de glucose attachés de façon covalente à un résidu de tyrosine (Mu et coll., 1996). Cette chaîne sera allongée par la glycogène-synthétase. La glycogénine fut d'abord découverte chez les mammifères, puis retrouvée chez la levure qui possède deux gènes la codant : *glg1p* et *glg2p*. Cheng et coll. (1995) ont montré que le double mutant n'accumule presque plus de glycogène. Toute molécule de glycogène synthétisée par cette voie présente une glycogénine au centre de la particule, en effet la glycogénine reste toujours attachée à l'extrémité réductrice de la molécule de glycogène (pour revue : Lomako et coll., 2004)

L'élongation est l'étape limitante de la synthèse du glycogène chez les eucaryotes alors que la synthèse du nucléotide-sucre joue ce rôle chez les bactéries. Les glycogène-synthétases (il en existe plusieurs isoformes) utilisent l'UDPglc comme donneur pour polymériser les glucanes. La régulation de l'enzyme est double, avec une régulation de type allostérique et une régulation de type phosphorylation/déphosphorylation. Il existe donc deux formes de l'enzyme qui se distinguent par leur sensibilité à l'activation allostérique par le G6P. La forme active (déphosphorylée) est peu sensible au glucose-6-phosphate, alors que la forme phosphorylée (inactive) est plus sensible à la régulation allostérique. La phosphorylation de la glycogène-synthétase, et donc son inactivation, est catalysée par des protéines kinase AMPc dépendantes organisées en cascades qui permettent

de coupler la synthèse de glycogène à l'état physiologique de la cellule. Contrairement aux synthétases des bactéries, celles des opisthocontes sont incapables d'initier la synthèse du glycogène, étape qui est effectuée par la glycogénine comme nous l'avons expliqué précédemment.



**Figure 6 : Schéma illustrant le métabolisme du glycogène chez les Opisthocontes.**

Les étoiles indiquent les étapes limitantes du métabolisme, celles où les enzymes sont régulées. Les lignes pointillées correspondent aux premières étapes qui ne sont pas spécifiques au métabolisme du glycogène. La ligne discontinue correspond à la voie catabolique des  $\alpha$ -glucosidases qui n'est pas toujours présente chez les Opisthocontes.

### II.2.2.3 La ramification des chaînes

Après l'initiation par la glycogénine et l'élongation par la glycogène-synthétase, les chaînes linéaires de glucose sont ramifiées par les enzymes de branchement qui

transfèrent un bloc de 6 à 8 résidus, provenant de l'extrémité d'une chaîne linéaire, sur un résidu interne d'une chaîne adjacente par l'intermédiaire d'une liaison  $\alpha$ -1,6. Ces enzymes ne sont pas régulées chez les opisthocontes.

#### **II.2.2.4 Le catabolisme**

La régulation du catabolisme du glycogène s'effectue au niveau de la phosphorylase. La régulation est ici encore double : de type phosphorylation/déphosphorylation et de type allostérique. Il existe donc deux formes de la phosphorylase chez les animaux : une phosphorylase b (état déphosphorylé) qui se présente sous forme dimérique et qui est inactive, et une phosphorylase a (état phosphorylé) qui peut passer de la forme dimérique (active) à la forme tétramérique (inactive). Cette régulation s'effectue de la même façon que celle de la glycogène-synthétase mais avec les formes actives et inactives à l'opposé de celle-ci. Les régulateurs allostériques sont l'AMP comme activateur et le glucose comme inhibiteur chez les animaux, et le G6P (inhibiteur) chez les levures, celles-ci n'étant pas sensibles à l'activation par l'AMP (pour revue : chez la levure, Francois et Parrou, 2001, chez les mammifères, Lipscomb W., 1983). La phosphorylase peut raccourcir la longueur des chaînes à 4 résidus de glucoses.

Les enzymes de débranchement permettent de poursuivre le catabolisme du glycogène. Ce sont des enzymes de débranchement indirect, renfermant deux sites catalytiques distincts, la réaction s'effectuant en deux étapes avec dans un premier temps le transfert des 3 résidus externes sur l'extrémité d'une chaîne adjacente, puis l'hydrolyse de la liaison  $\alpha$ -1,6 permettant la libération du glucose restant. Cette réaction génère donc des glucanes plus longs qui restent attachés à la particule de glycogène et qui seront dégradés par la phosphorylase. Le métabolisme du glycogène eucaryote ne conduit jamais donc contrairement aux bactéries à la libération de malto-oligosaccharides. Chez ces organismes on ne retrouvera donc pas d'amylomaltase (MalQ) ni de maltodextrine phosphorylase (MalP) qui ne sont plus nécessaires lors de la dégradation.

Les dernières enzymes que l'on peut trouver sont les  $\alpha$ -glucosidases. Ce sont des enzymes lysosomales qui dégrade le glycogène en glucose (pour revue Ryman BE, 1974). Il semble bien que chez les eucaryotes la voie hydrolytique du glycogène soit cantonnée soit au lysosome ou à la vacuole qui joue ce rôle chez les levures. Les

signaux responsables de l'adressage des particules de glycogène à ce compartiment sont encore inconnus.

### **II.2.3 Chez les amibes**

Dans cette partie, nous détaillerons les connaissances actuelles disponibles sur le métabolisme du glycogène chez les amibes, organismes ayant une parenté proche avec les Opisthocontes. Les génomes de *Dictyostelium discoideum* et *Entamoeba histolytica* ont été complètement séquencés et annotés (Eichinger et coll., 2005 ; Loftus et coll., 2005) On y trouve : une UDPglc pyrophosphorylase, une glycogénine chez *Dictyostelium discoideum*, une à deux glycogène-synthétases UDPglc dépendante, une enzyme de branchement, une enzyme de débranchement indirecte, deux phosphorylases, une à deux enzymes du type DPE2, plusieurs  $\alpha$  et  $\beta$ -amylases, sauf chez *Dictyostelium discoideum* qui ne possèdent pas de  $\beta$ -amylases (Figure 7).

#### **II.2.3.1 La synthèse du nucléotide sucre**

Comme chez les autres eucaryotes, le précurseur utilisé pour la synthèse du glycogène, chez ces organismes, est l'UDPglc. Celui-ci est également utilisé dans différents métabolismes de la cellule et l'UDPglc pyrophosphorylase n'est donc pas spécifique du métabolisme du glycogène. Nous ne détaillerons donc pas son mécanisme d'action.

#### **II.2.3.2 L'initiation et l'élongation**

Dans le génome de *Dictyostelium discoideum*, on trouve la présence d'une glycogénine contrairement au génome d'*Entamoeba histolytica*, mais aucune étude ni caractérisation de l'enzyme n'ont été publiées à ce jour.

La glycogène-synthétase UDPglc dépendante d'*Entamoeba* a été étudiée par Takeuchi et coll. (1977 [A]) et ils ont pu mettre en évidence une activation de l'enzyme par le pyrophosphate (PPi) mais pas d'effet notable de la présence de glucose-6-phosphate. Le seul gène supposé coder la glycogène-synthétase dans le génome d'*Entamoeba* aboutit à une protéine de très haut poids moléculaire (supérieur à celle de la levure) qui semble plus proche de celle des bactéries que de celle des autres eucaryotes.

Dans le génome de *Dictyostelium* on peut prédire deux gènes codant des glycogène-synthétases. L'un correspond à l'enzyme clonée et caractérisée par

Williamson et coll. en 1996 et présente de fortes homologues avec les glycogène-synthétases des Opisthocontes au niveau de sa séquence, mais également au niveau de la double régulation de type allostérique et de type phosphorylation/déphosphorylation. Le deuxième gène semble coder une protéine de haute masse moléculaire semblable à celle d'Entamoeba.

### **II.2.3.3 La ramification**

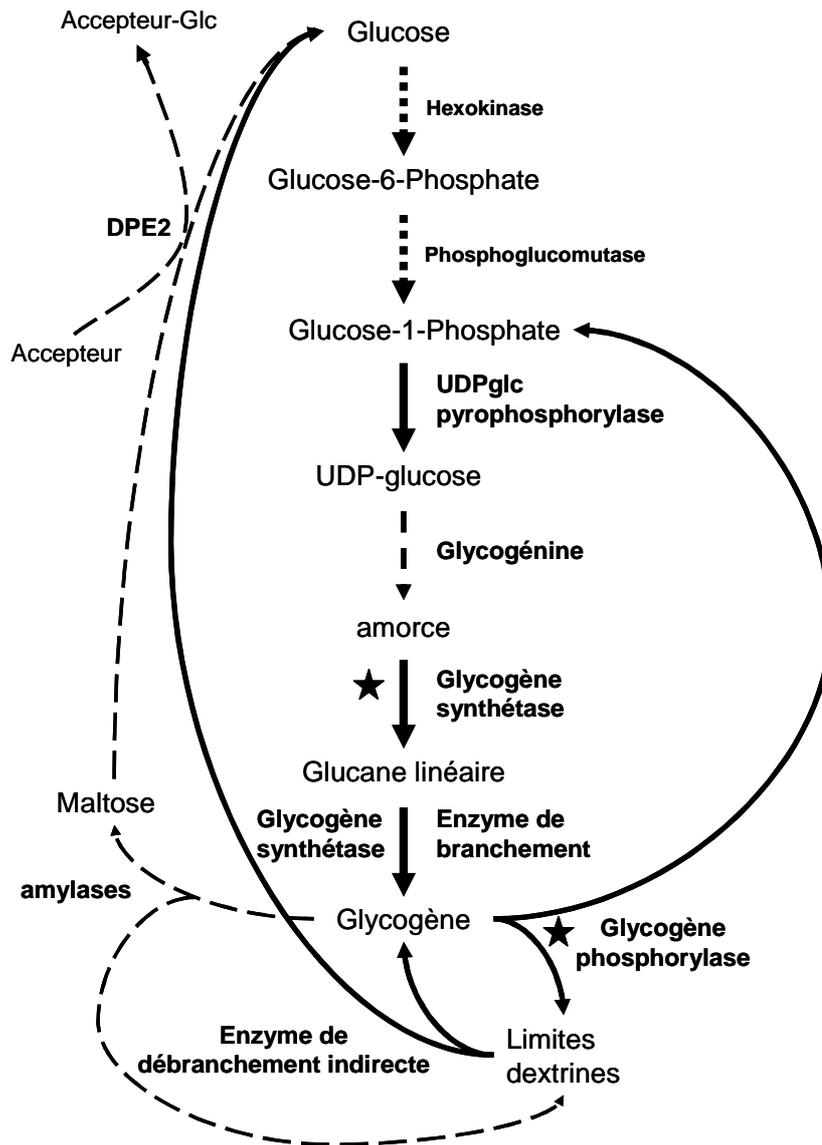
Dans le génome de nos deux amibes on trouve un gène codant sûrement une enzyme de branchement. Malheureusement celles-ci n'ont pas été caractérisées mais leurs séquences sont assez proches de celles des Opisthocontes.

### **II.2.3.4 Le catabolisme**

Dans le génome de ces deux amibes on trouve deux phosphorylases.

Chez Entamoeba, Takeuchi et coll. purifient et caractérisent une phosphorylase en 1977 (B). Celle-ci nécessite la présence de phosphate inorganique pour être active mais elle n'est sensible à la présence d'aucun adénine-nucléotide, ni d'AMPc. Cette phosphorylase sera également étudiée par Werries et Thurn en 1989 qui montrent que la phosphorylase travaille sous forme d'un dimère, de haut poids moléculaire, capable de dégrader le glycogène mais aussi l'amylopectine et l'amylose en glucose-1-phosphate. Il n'existe pas d'études publiées sur la deuxième phosphorylase.

Chez Dictyostelium, Rutherford et coll. (1988) décrivent plusieurs formes de phosphorylases et émettent l'hypothèse que l'enzyme est régulée par des cascades de phosphorylations dépendantes de l'AMPc. Chez cet organisme le métabolisme du glycogène est couplé à la différenciation cellulaire (Wright et coll. 1973), et la glycogène phosphorylase a été utilisé par la suite comme outil pour suivre cette différenciation. Les deux isoformes de la phosphorylase ont été clonées et leurs inactivations entraînent une suraccumulation du glycogène comme chez les levures (Rogers et coll., 1994).



**Figure 7 : Schéma illustrant le métabolisme du glycogène chez les amibes.**

Les étoiles indiquent les étapes limitantes du métabolisme, celles où les enzymes sont régulées. Les lignes pointillées correspondent aux premières étapes qui ne sont pas spécifiques au métabolisme du glycogène. Les lignes discontinues correspondent à la glycogénine qui n'est pas toujours présente chez les amibes, et aux amylases et DPE2 dont les rôles dans le métabolisme du glycogène n'ont pas été démontrés (elles joueraient plutôt un rôle dans la dégradation de polysaccharides exogènes).

Chez ces deux amibes on trouve également une enzyme de débranchement indirect. Werries et coll. en 1990 ont purifié et caractérisé l'enzyme de débranchement d'*Entamoeba histolytica* et celle-ci contrairement aux enzymes de débranchement indirect des Opisthocontes ne transfère que des résidus uniques de glucose provenant de liaisons  $\alpha$ -1,4, et non directement le maltotriose avant de libérer le dernier glucose (celui lié en  $\alpha$ -1,6).

Dans le génome de ces organismes, on peut également prédire l'existence d'amylases : des  $\alpha$ -amylases, deux gènes chez *Dictyostelium* et un chez *Entamoeba*, et quatre  $\beta$ -amylases chez *Entamoeba* mais aucune chez *Dictyostelium*. Chez *Entamoeba* il existe de nombreuses études sur ces enzymes, effectuées essentiellement par Werries et Nebinger en 1984, et 1986 (Werries et Nebinger, 1984, Werries et Müller, 1986, Nebinger, 1986 (A et B), mais il semble que ces enzymes ne soient pas directement impliquées dans le catabolisme du glycogène endogène, mais plutôt dans la dégradation de polysaccharides exogènes et que ce soient les phosphorylases qui aient le rôle principal dans le catabolisme du glycogène endogène (Werries et Thurn, 1989).

Enfin on trouve le gène d'une glucanotransférase de type DPE2. Cette enzyme pourrait travailler avec les amylases mais on ne sait pas si la cible de cette enzyme est exogène ou non.

## **II.3 Le métabolisme de l'amidon chez les algues et les plantes vertes**

Le métabolisme de l'amidon a été très fortement étudié chez les algues et les plantes vertes (passé en revue dans Ball et Morell, 2003 ; James et coll., 2003 ; Lu et Sharkey, 2006 ; Tetlow et coll., 2004 ; Zeeman et coll., 2007). Chez ces organismes, il a lieu dans les chloroplastes des feuilles et les amyloplastides des organes de réserve à partir d'ADPglc. Il existe de nombreuses isoformes enzymatiques dans ce métabolisme et cette multiplicité existe des algues vertes les plus primitives (avec par exemple *Ostreococcus tauri* (Ral et coll., 2004)) aux plantes vertes les plus évoluées. Le métabolisme de l'amidon, détaillé ici, sera restreint à l'amidon chloroplastique (pour revues : Smith et coll., 2005) (Figure 8).

### **II.3.1.1 La synthèse du nucléotide sucre**

Le métabolisme de l'amidon est essentiellement régulé par le biais de l'ADPglc pyrophosphorylase qui est l'enzyme maîtresse de ce système (Lin et coll., 1988 ; Zabawinski et coll., 2001). Cette enzyme chloroplastique est présente sous forme hétérotétramérique avec deux grandes sous-unités régulatrices (~55 kDa) et deux petites sous-unités catalytiques (~50 kDa). La régulation de cette enzyme s'effectue par des effecteurs allostériques : le phosphate inorganique (Pi) (inhibiteur) et le 3

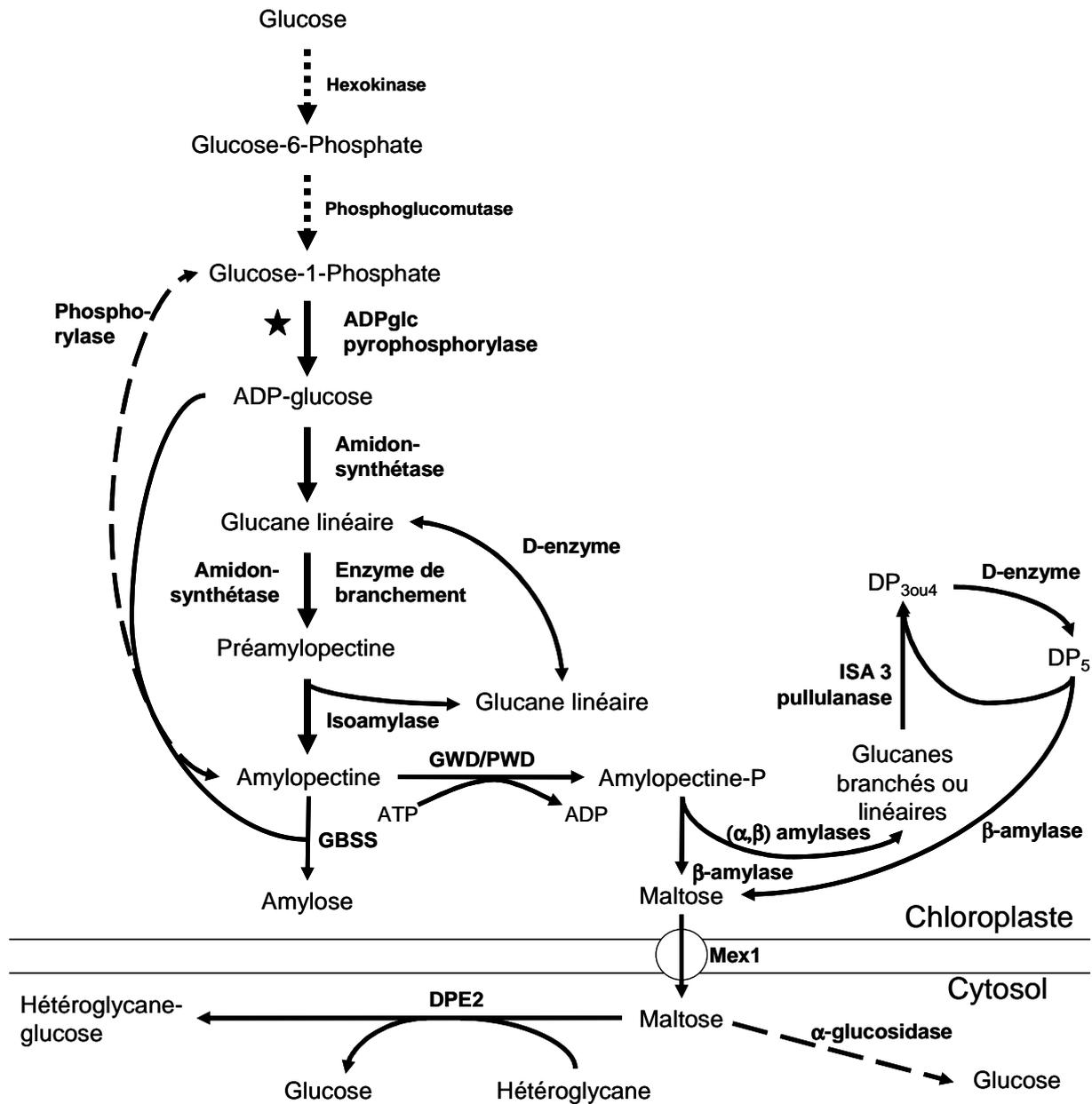
phosphoglycerate (3PGA) (activateur), la concentration des effecteurs étant liée à l'activité photosynthétique du chloroplaste (pour revue : Ball SG, 2002).

### **II.3.1.2 L'initiation et l'élongation**

En règle générale, on trouve dans les génomes de la lignée verte 5 classes majeures de gènes codant les amidon-synthétases, appelées GBSS, SSI, SSII, SSIII et SSIV. Elles peuvent cependant être regroupées en deux grands groupes d'amidon-synthétases : les « granule-bound starch synthases » (GBSS) qui permettent la synthèse de l'amylose et sont retrouvées liées au grain d'amidon, et les « soluble starch synthases » (SS) qui sont des enzymes solubles impliquées dans la synthèse de l'amylopectine (pour revue : Ball et Morell, 2003).

La parenté des amidon-synthétases avec la glycogène-synthétase des bactéries laisse penser qu'elles seraient capables d'initier *de novo* la synthèse des glucanes. En effet, certains organismes dont le génome a été séquencé tels *Ostreococcus* et *Chlamydomonas* ne présentent pas de gènes homologues aux glycogénines, et bien que certaines plantes supérieures présentent des homologues de ce gène, aucun mutant pour ces gènes n'a pu être étudié. Il semble donc peu probable que la synthèse de l'amidon soit initiée par des glycogénines. La SSIV joue d'ailleurs un rôle important dans l'initiation de la synthèse du grain d'amidon puisqu'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* dépourvu d'activité SSIV présente un nombre très restreint de grain d'amidon. On n'y dénombre, par chloroplaste, uniquement un à deux grains de très grosses tailles avec modification de la structure du hile (centre du grain) contrairement au sauvage qui possède environ 5 grains (Roldan et coll., 2007).

Les amidon-synthétases solubles interviennent uniquement dans la synthèse de l'amylopectine. Elles ont été classées en 4 groupes phylogénétiques : SSI, SSII, SSIII et SSIV. La définition du rôle spécifique de chaque isoforme dans la synthèse de l'amylopectine reste un défi. On sait cependant qu'elles ne sont que très peu redondantes et qu'elles jouent chacune un rôle dans l'élaboration des chaînes d'un degré de polymérisation précis. De plus suivant l'organisme étudié, l'activité d'une des isoformes prédomine. Avec par exemple la SSI qui est l'activité majoritaire chez le maïs, la SSII chez les embryons de pois ou encore la SSIII chez la pomme de terre.



**Figure 8 : Schéma illustrant le métabolisme de l'amidon dans la lignée verte.**

L'étoile indique l'étape limitante du métabolisme, celle où les enzymes sont régulées. Les lignes pointillées correspondent aux premières étapes qui ne sont pas spécifiques au métabolisme de l'amidon. Les lignes discontinues correspondent aux enzymes dont le rôle dans le métabolisme de l'amidon n'est pas certain.

Quant à elle, la GBSS est l'unique enzyme responsable de la synthèse de l'amylose. En effet les mutants défectueux pour cette enzyme (mutant dit « *waxy* ») ne synthétisent que de l'amylopectine avec une absence totale d'amylose. Cette enzyme est capable de synthétiser de très longues chaînes dans la fraction d'amylopectine. Elle l'utilise d'ailleurs comme amorce pour la synthèse de l'amylose

(van de Wall et coll., 1998). *In vitro* cette synthèse s'effectue en deux temps et en présence de forte concentration d'ADPglc : les chaînes d'amylopectine sont allongées très fortement puis une liaison  $\alpha$ -1,4 est clivée afin de libérer les longues chaînes synthétisées qui vont rester associées au grain d'amidon mais qui seront retrouvées après fractionnement dans les fractions correspondantes à l'amylose. La GBSS peut également utiliser comme amorce des malto-oligosaccharides (MOS) (Leloir et coll., 1961). En effet *in vitro*, leur présence provoque une forte augmentation de la synthèse d'amylose, ce qui a été également observé *in vivo* chez un mutant d'*Arabidopsis thaliana* présentant une grande quantité de MOS (Zeeman et coll., 2002).

### **II.3.1.3 La ramification**

Les enzymes de branchement assurent la formation des liaisons de type  $\alpha$ -1,6 dans le grain d'amidon. Il existe là encore plusieurs isoformes. Les BE sont classées en deux types en fonction de la longueur des chaînes transférées (Guan et Preiss, 1993): les BEI (préfèrent les longues chaînes de type amylose) et les BEII (préfèrent les chaînes plus courtes d'amylopectine). Il existe par ailleurs deux isoformes pour les BEII ; BEIIa et BEIIb. Le rôle précis de chaque isoforme et leur spécificité varient beaucoup en fonction des espèces.

Les enzymes de débranchement (DBE) ont un rôle bien différent de celui des enzymes de débranchement dans le catabolisme du glycogène. En effet elles jouent ici un rôle dans la formation du grain d'amidon et non dans sa dégradation. Chez les plantes il existe deux types d'enzymes de débranchement qui ont été classées en fonction de leur capacité à hydrolyser le pullulan : les pullulanases et les isoamylases. Les pullulanases clivent préférentiellement les liaisons  $\alpha$ -1,6 du pullulan (polysaccharide inexistant pourtant dans les plantes) et avec une plus faible efficacité l'amylopectine. Elles s'avèrent incapables de débrancher le glycogène. Les isoamylases quant à elles se révèlent très actives sur l'amylopectine et le glycogène mais incapables de digérer le pullulan. Il existe 2 à 3 isoamylases par organisme dans la lignée verte et elles vont être soit impliquées dans l'anabolisme soit dans le catabolisme. Les pullulanases et les isoamylases coexistent dans la plupart des cellules végétales. Ce sont toutes les deux des enzymes de débranchement direct comme celles des procaryotes, cependant la pullulanase et ISA3 (une des 3 isoamylases présentes chez *Arabidopsis*) sont plutôt impliquées dans le catabolisme de l'amidon. L'absence d'isoamylases chez les plantes vertes provoque une disparition

de l'amidon au profit d'un polysaccharide de réserve soluble fortement ramifié appelé phytoglycogène. Ball et coll. ainsi que Mouille et coll. en 1996 proposent un modèle de l'action de l'isoamylase dans l'épissage de la préamylopectine, afin de permettre une organisation suffisante des points de branchement pour obtenir l'édification de l'amylopectine. Ce modèle de synthèse discontinue fait intervenir de façon successive les enzymes de branchement (qui créent de nombreuses liaisons  $\alpha$ -1,6) et les isoamylases (qui clivent sélectivement les liaisons  $\alpha$ -1,6) (Figure 4).

#### **II.3.1.4 Le catabolisme**

La catabolisme de l'amidon chez les plantes n'est, à ce jour, pas complètement élucidé (pour revue : Smith et coll., 2005).

Deux enzymes jouent un rôle important dans ce catabolisme, ce sont GWD (glucan water dikinase) et PWD (phosphoglucan water dikinase) (Ritte et coll., 2006). Ces deux enzymes transfèrent le  $\beta$ -phosphate d'un ATP sur un résidu de glucose de l'amylopectine. Cette phosphorylation a lieu de jour comme de nuit avec une fréquence assez basse (1/2000 Glc). GWD phosphoryle des chaînes d'amylopectine qui sont ou non phosphorylées contrairement à PWD qui ne peut le faire que sur des chaînes déjà phosphorylées. Cette phosphorylation est indispensable au mécanisme de dégradation et semble le réguler. En effet les chaînes non phosphorylées ne sont pas prises en charge par les enzymes de dégradation car la phosphorylation semble rendre l'amylopectine accessible à ces enzymes.

Le catabolisme de l'amidon se présente ensuite sous deux grandes voies : La voie hydrolytique et la voie phosphorolytique. Dans la voie hydrolytique on trouve les  $\alpha$ - et les  $\beta$ -amylases et dans la voie phosphorolytiques les phosphorylases qui sont l'amidon phosphorylase et la maltodextrine phosphorylase (similaire à celle des procaryotes).

Les  $\alpha$ -amylases ou endo-amylases sont capables de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,4 de manière aléatoire dans une molécule d'amylopectine solubilisée. Deux mécanismes d'attaque sont proposés : l'attaque multiple et l'attaque préférentielle. Lors de l'attaque multiple l'enzyme rencontre au hasard une liaison  $\alpha$ -1,4 et celle-ci va être hydrolysée, puis un des deux produits de la réaction est libéré et l'autre est retenu au sein de l'enzyme. Ce dernier glisse le long du site actif avant de subir une autre hydrolyse. Après quelques répétitions de cet évènement l'enzyme libère les deux

produits de la réaction. Lors de l'attaque préférentielle il n'y a qu'un évènement unique d'hydrolyse les deux produits étant immédiatement libérés. Cette démarche concerne préférentiellement les malto-oligosaccharides, les extrémités du glucane étant plus résistantes à ce type d'attaque.

Les  $\beta$ -amylases (ou exo-amylases) hydrolysent les chaînes linéaires de glucose à partir de l'extrémité non-réductrice en libérant des maltoses. Il en existe 9 différentes dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* mais d'après leurs séquences nucléotidiques seules 4 sont potentiellement chloroplastiques : trois codent pour une  $\beta$ -amylase active dans le chloroplaste et la dernière jouerait un rôle dans la régulation des autres  $\beta$ -amylases chloroplastiques (Fulton et coll., 2008). Ces enzymes seraient les enzymes majeures responsables de la dégradation de l'amidon, mais elles sont arrêtées par les points de branchement libérant ainsi des  $\beta$ -limites dextrines de haut poids moléculaire. Le maltose libéré est ensuite exporté vers le cytosol par un transporteur de maltose, Mex1.

Les maltoses ainsi transportés sont métabolisés de différentes façons : dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, 5  $\alpha$ -glucosidases cytoplasmiques ont été trouvées et sont potentiellement capables d'hydrolyser le maltose en glucose.

Le maltose peut aussi être métabolisé par une réaction de transglucosylation par DPE2 qui est une enzyme structurée comme une amyloamylase. Celle-ci libère un glucose qui sera réactivé en G6P par une hexokinase, et le 2<sup>e</sup> glucose sera transféré sur un accepteur glucidique cytosolique, comme c'est le cas chez les bactéries. Cette dernière voie semble la plus utilisée.

Chez les plantes, on trouve comme chez les bactéries et les eucaryotes des phosphorylases. Celles-ci, chloroplastiques, peuvent dégrader les chaînes linéaires de glucose en les attaquant avec du phosphate inorganique et ainsi libérer du G1P. Cependant elles ne semblent pas jouer un rôle important dans le catabolisme de l'amidon puisque des mutants dépourvus de cette enzyme ne présentent aucun phénotype particulier. Les phosphorylases sont également capables *in vitro* d'effectuer la réaction en sens inverse en présence de G1P.

L'enzyme disproportionnante (D-enzyme ou DPE1), ou  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase, clive une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un petit glucane et transfère le fragment sur un autre oligosaccharide en reformant le même type de chaîne. Cette enzyme joue

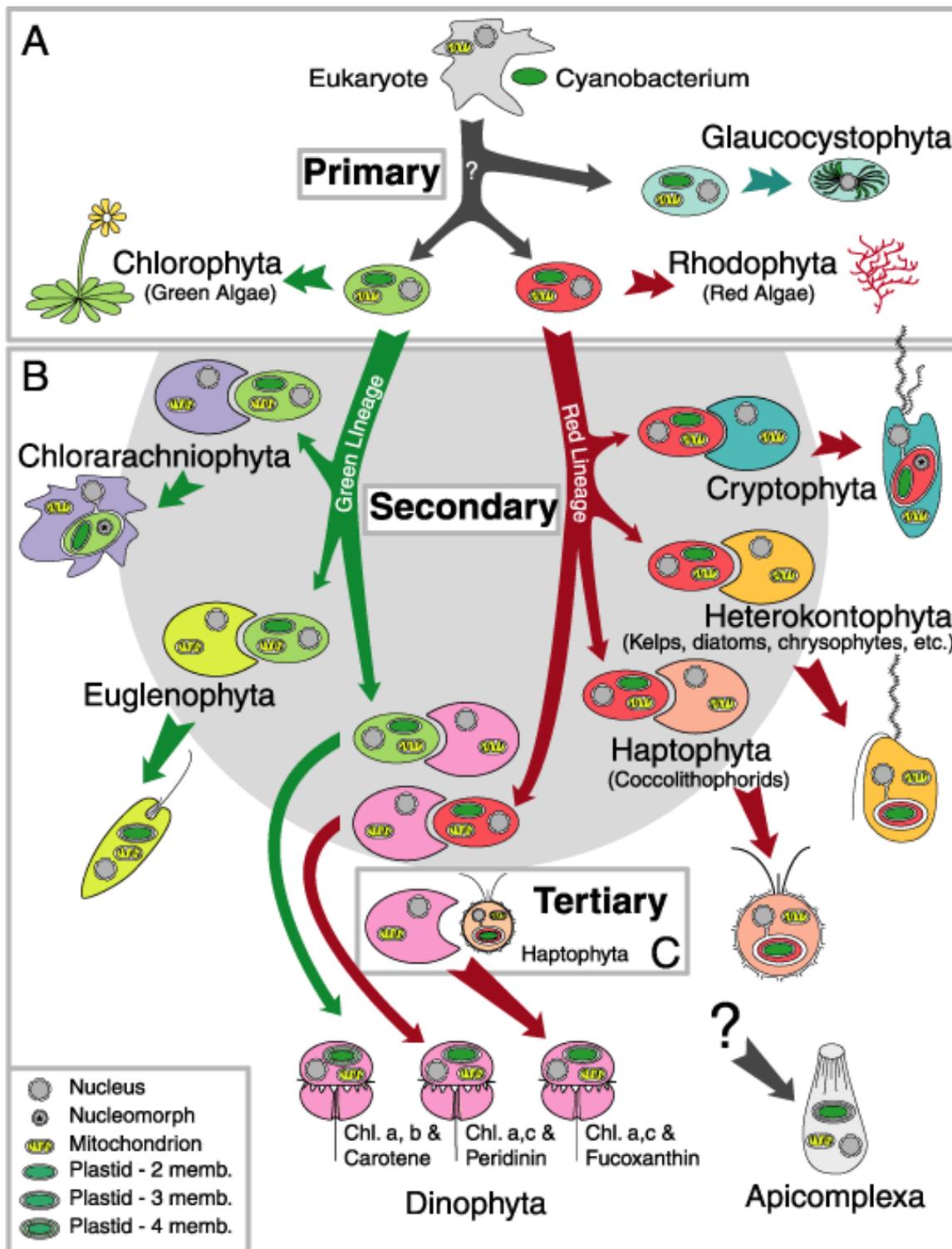
un rôle important dans la dégradation des oligosaccharides libérés lors de l'épissage de la préamylopectine par l'isoamylase et lors de la dégradation des chaînes par la  $\beta$ -amylase, qui ne peut dégrader des chaînes de moins de 4 résidus. En effet la D-enzyme peut former un maltopentaose à partir de deux maltotriose tout en libérant un glucose, les maltopentaoses pouvant être repris en charge par la  $\beta$ -amylase.

Tous les mécanismes décrits ne suffisent pas à permettre la dégradation de l'amidon puisque les  $\beta$ -amylases et les phosphorylases ne peuvent hydrolyser les points de branchement. D'après Wattebled et coll. (2005), les points de branchement seraient franchis par l'enzyme de débranchement ISA3 qui enlèverait les courtes chaînes à la surface du grain d'amidon. Cependant en absence de celle-ci, les points de branchement seraient franchis par la limit-dextrinase ou pullulanase.

### **III. L'origine du règne végétal et les conséquences sur l'évolution du polysaccharide de réserve**

Tous les organismes eucaryotes photosynthétiques proviennent d'un évènement d'endosymbiose entre un eucaryote et une cyanobactérie (Palmer J.D., 2000). Outre la capacité de réaliser la photosynthèse oxygénique, les eucaryotes dérivés de cette endosymbiose ont pour la plupart acquis simultanément un nouveau polysaccharide de réserve : l'amidon.

L'évènement d'endosymbiose serait un évènement unique qui aurait eu lieu il y a environ 1,56 milliards d'années (Yoon et coll., 2004). De cet évènement sont issues trois lignées anciennement regroupées sous le terme « Règne Végétal » et désormais désignées par le groupe des Archaeplastida. Ces lignées sont constituées par les Chloroplastida (anciennement chlorophytes comprenant algues vertes et plantes terrestres), les Rhodophyceae (anciennement rhodophytes qui regroupent les algues rouges) et les Glaucophyta (anciennement glaucophytes ou glaucocystophytes) (Figure 8A).



**Figure 8 : Illustration sur les lignées photosynthétiques issues des endosymbioses primaire et secondaires (D'après Delwiche 1999 ; <http://www.life.umd.edu/labs/Delwiche/pubs/endosymbiosis.gif>).**

A : Représentation simplifiée de l'endosymbiose primaire et de la séparation des 3 grandes lignées photosynthétiques : les algues et plantes vertes, les algues rouges et les glaucophytes.

B : Représentation simplifiée des endosymbioses secondaires et tertiaires, entre des eucaryotes et des algues (vertes ou rouges), et présentation des différentes lignées cellulaires apparues après ces événements.

Lors de cet évènement une cyanobactérie diazotrophe aurait alors été phagocytée par un eucaryote unicellulaire hétérotrophe biflagellé (Moreira et Philippe, 2001), et lentement transformée pour servir d'organite fixateur de carbone. Le processus de transformation de la cyanobactérie en plaste a nécessité le transfert d'une partie du génome de la cyanobactérie vers l'hôte. La fréquence de ces transferts serait élevée avec une fréquence expérimentale observée aujourd'hui dans les plastes des plantes vertes de l'ordre de  $2.10^{-5}$  évènements par cellule et par génération (Stegemann et coll., 2003). Il a donc existé à un moment donné un organisme qui possédait des gènes de fonction apparentée dans deux compartiments (le noyau et le plaste), le temps de mettre en place un système d'adressage des protéines au plaste et d'intégrer le fonctionnement de l'organite en émergence. Ainsi la rencontre des deux métabolismes, celui du glycogène de l'hôte eucaryote et celui de l'amidon de la cyanobactérie, a eu lieu et la réorganisation de gènes issus de chaque partenaire a pu aboutir à de multiples combinaisons, suivi ou non du ré-adressage des protéines au plaste. Cette intégration des deux voies a abouti au sein de la lignée verte à l'accumulation d'amidon dans le plaste à partir d'ADPglc comme chez les cyanobactéries. Par contre chez les Glaucophyta et les Rhodophyceae un processus analogue abouti à la synthèse d'amidon dans le cytoplasme. Les premières caractérisations d'amidons cytosoliques ayant été réalisées sur le groupe des algues rouges Florideophycidae, ce type de polysaccharide a été baptisé d'amidon floridéen. Nous utiliserons le terme d'amidon floridéen pour toutes les formes cytosoliques du polysaccharide retrouvées chez les Glaucophyta, les Rhodophyceae et les taxa qui en dérivent par endosymbiose secondaire. Les algues rouges semblent utiliser l'UDPglc, alors que le nucléotide sucre utilisé chez les glaucophytes est incertain car aucune étude n'a été effectuée chez ces organismes. Le chapitre suivant expose les connaissances actuelles sur la synthèse de l'amidon floridéen.

#### **IV. Le métabolisme de l'amidon floridéen**

L'amidon floridéen, trouvé dans le cytoplasme des algues rouges, a été caractérisé par Meeuse et coll. en 1960. C'est un polymère plus proche de l'amylopectine que du glycogène, avec des caractéristiques structurales semblables à celles de l'amidon des plantes supérieures, comme l'organisation en cercles concentriques des couches de croissance. Avant 1981 l'amidon floridéen n'avait été

observé que sous forme d'amylopectine et ne présentait pas d'amylose. Ce sont McCracken et Cain qui cette année là font état d'un amidon floridéen pourvu d'amylose chez des algues rouges unicellulaires porphyridiales.

#### **IV.1 Le métabolisme de l'amidon chez les algues rouges et leurs dérivés endosymbiotiques**

Très peu d'études enzymatiques sur le métabolisme de l'amidon ont été effectuées chez les algues rouges (pour revue : Viola et coll., 2001).

On en trouve deux sur *Gracilaria gracilis* : la première par Sesma et Iglesias en 1998 présente la voie ADPglc comme celle utilisée pour la synthèse de l'amidon chez cet organisme. En effet ils mettent en évidence l'existence d'une activité ADPglc pyrophosphorylase, ainsi que l'utilisation préférentielle par l'amidon-synthétase de l'ADPglc, cette dernière enzyme pouvant être activée par le 3PGA, le G6P, le F6P, le PEP et le F1,6bisP et inhibée par le Pi et légèrement par le pyruvate. La deuxième effectuée par Lluisma et Ragan (1998) est une étude basée sur le clonage et la caractérisation du gène de l'enzyme de branchement. Celui-ci ne comporte pas d'intron mais présente des éléments de régulation en 5'. L'étude phylogénique de cette protéine de 766 acides aminés suggère une origine eucaryote.

Par ailleurs Nyvall et coll. en 1999 présente une étude enzymatique sur une amidon-synthétase soluble chez *Gracilaria tenuistipitata*. Cette enzyme (de 145 kDa) se présente sous la forme d'un homotétramère utilisant préférentiellement l'UDPglc. Cette enzyme est activée par le citrate et inhibée par l'UDP.

Enfin une étude récente de Shimonaga (2007) sur *Porphyridium purpureum* montre un amidon floridéen contenant de l'amylopectine plus proche de la semi-amylopectine que de l'amylopectine des plantes vertes, et de l'amylose. De plus ils ont mis en évidence une GBSS de 60 kDa qui *in vitro* incorpore 4 à 5 fois plus vite le glucose provenant de l'UDPglc que de l'ADPglc.

Un problème se pose ici sur le choix du nucléotide sucre précurseur utilisé chez les algues rouges, même si l'UDPglc semble le plus utilisé, ainsi que sur les enzymes impliquées dans ce métabolisme. Aucune autre étude sur le métabolisme de l'amidon chez les algues rouges n'a pu être à ce jour référencée. Cependant quelques informations supplémentaires ont pu être obtenues grâce au séquençage de deux

génomés de cyanidiales définissant un groupe d'algues rouges thermo-acidophyles ayant divergé à la base des Rhodophyceae : *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki et coll., 2004) et *Galdieria sulphuraria* (Michigan State University Galdieria Database – <http://genomics.msu.edu/galdieria> - non publié). En effet Coppin et coll. (2005) et subséquemment Barbier et coll. (2005) ont comparé les génomes de ces deux algues rouges. Ces deux organismes présentent un set d'enzymes proche de celui retrouvé chez les Chloroplastida :

- Un gène codant pour une glycogénine putative, mais un gène similaire a été trouvé chez *Arabidopsis Thaliana* et son rôle initiateur dans la synthèse de l'amidon n'a pu être démontré.
- Des amidons-synthétases qui allongent les chaînes de glucose et qui sont homologues aux glycogène-synthétases UDPglc dépendantes.
- Des enzymes de branchement et isoamylases sont également présentes chez ces algues rouges. Elles sont assez similaires à celles des algues et plantes vertes.
- Enfin les enzymes impliquées dans la dégradation de l'amidon telles que GWD, les  $\beta$ -amylase, la D-enzyme (glucanotransférase) et les phosphorylases sont retrouvées chez Cyanidioschyzon, mais GWD n'a pu être retrouvée pour l'instant dans le génome de Galderia.
- Le gène de la GBSS n'a pas été observé dans le génome de ces organismes, ce qui corrèle avec l'absence d'amylose.

Les algues rouges ont également donné naissance à un nombre important de lignées par endosymbiose secondaire (Figure 8B). Vu sous l'angle des polysaccharides de réserves ces endosymbioses secondaires nous semblent multiples. En effet tous les chromistes à l'exception des cryptophytes accumulent des  $\beta$ -glucanes de réserve à l'extérieur du plaste alors que tous les alvéolés accumulent de l'amidon ou du glycogène. Ceci plaide pour l'existence d'au minimum deux lignées hôtes différentes ayant conduit par endosymbiose secondaire à la phagocytose d'une algue rouge. L'hôte de l'endosymbiose ayant conduit aux chromistes devait accumuler des  $\beta$ -glucanes alors que celui qui a conduit aux alvéolés accumulait du glycogène. Les cryptophytes synthétisent de l'amidon floridéen, localisé dans le cytoplasme de cellules ou dans l'espace périplastidial qui correspond au vestige du cytoplasme de

l'algue rouge capturée tandis que les dinoflagellées et les parasites apicomplexa accumulent pour la plupart de l'amidon dans le cytoplasme alors que les ciliés synthétisent le plus souvent du glycogène..

Ainsi Coppin et coll. en 2005 montre l'existence chez le parasite apicomplexa *Toxoplasma gondii* d'un amidon floridéen composé uniquement d'amylopectine. Chez le toxoplasme, l'amidon n'est retrouvé que dans le cytoplasme des cellules différenciées en bradyzoïtes, et l'étude de l'activité synthétase sur des extraits cytoplasmiques privilégie l'utilisation de l'UDPglc comme substrat. Enfin la présence des séquences codant GWD dans le génome du toxoplasme, et leurs présences chez les algues rouges confirme la corrélation existant entre la présence de GWD et l'existence de polysaccharides de réserves de type amidon.

*Cryptocodium cohnii* présente également un amidon floridéen contenant de l'amylose (Coppin et coll., 2005). Deschamps et coll. (2008 [B]) ont repérés deux activités amidon-synthétases solubles et une liée au grain. Les solubles utilisent préférentiellement l'UDPglc, et la GBSS exclusivement ce nucléotide-sucre comme substrat, contrairement à ce qui est observée chez *Guillardia* et chez l'algue rouge *Porphyridium purpureum* où une moindre sélectivité avait été notée. Des zymogrammes dévoilent la présence d'activités phosphorylases, hydrolases, d'enzymes de branchement distinctes, d'amylases et d'une enzyme de débranchement direct, mais ces enzymes n'ont pas été caractérisées.

Deschamps en 2006 montre l'existence chez *G. theta* d'un amidon floridéen composé d'amylopectine et d'amylose. L'étude des protéines liées au grain ainsi que le clonage du gène correspondant à la protéine majeure, ont permis d'identifier une GBSS de même type que celle retrouvée chez les plantes. L'étude enzymatique de cette protéine montre sa double capacité à utiliser l'ADPglc et l'UDPglc, avec une affinité équivalente pour ces deux substrats mais une Vmax double pour l'UDPglc. Son rôle dans l'élaboration des chaînes longues d'amylose a également été confirmé. Par ailleurs aucune activité ADPglc pyrophosphorylase n'a été détectée, et l'amidon-synthétase soluble observée n'accepte que l'UDPglc comme substrat. *Guillardia theta* utilise donc la voie UDPglc pour la synthèse de son polysaccharide de réserve. Par ailleurs Haferkamp en 2006 a montré une régulation transcriptionnelle de la synthèse de la GBSS (et donc de l'amylose) et de deux enzymes de dégradation ( $\alpha$ -amylase 1 et  $\alpha$ -amylase 2), basée sur la présence ou l'absence de lumière mais

indépendamment de l'horloge circadienne, la synthèse de la GBSS ayant lieu le jour et celle des  $\alpha$ -amylases la nuit.

Le métabolisme de l'amidon floridéen chez les organismes de la lignée rouge semble privilégier la voie UDPglc à la voie ADPglc. En première analyse, ces organismes renfermeraient le même complément d'enzymes que chez les algues et les plantes vertes, mais leurs caractéristiques sont encore à définir. Malgré tout, notre connaissance du métabolisme de l'amidon chez les Rhodophyceae et les lignées qui en sont dérivées reste très parcellaire. Un biais important trouve sa source dans la connaissance des génomes des seules cyanidiales qui nous semble de plus présenter un échantillon particulièrement atypique. En effet les cyanidiales vivent dans des environnements (pH2 et température supérieure à 45°C) pour le moins inhabituels. Ces environnements ont sans doute conduit à la perte et l'acquisition par transfert latéral d'un grand nombre de fonctions. Par ailleurs, l'amidon classique gonfle et se gélifie à des températures proches de celles où ces organismes se multiplient. Il nous a donc semblé judicieux dans ce contexte d'entamer la caractérisation d'une algue rouge ne faisant pas preuve de semblables biais et dont la séquence du génome devrait bientôt être disponible : l'algue marine Florideophycideae *Chondrus crispus*.

## **IV.2 Le métabolisme de l'amidon chez les glaucophytes**

Les glaucophytes synthétisent de l'amidon dans le cytoplasme des cellules. A ce jour aucune caractérisation structurale poussée de ce polysaccharide et aucune étude enzymatique sur son métabolisme n'ont été rapportées. Les seules informations disponibles résident dans des banques d'ESTs (environ 28000 séquences) de *Cyanophora paradoxa* disponible en ligne sur Genbank, et une étude effectuée par Fredrick (1977) chez *Glaucocystis nostochinearum*.

Au niveau des EST, nous ne pouvons retrouver que 6 séquences relatives à la biosynthèse de l'amidon :

- Une amidon-synthétase soluble qui semble homologue à celle des algues rouges et des amibes.
- Une séquence fortement semblable à la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*.

- Deux séquences de phosphorylase à rapprocher de celles des eucaryotes.
- Une séquence fortement semblable aux enzymes de branchement des eucaryotes.
- Une  $\alpha$ -glucanotransférase dont la séquence semble plus proche des D-enzymes des bactéries que des DPE2 des eucaryotes.

Toutes ces informations basées sur de simples analyses de séquences donnent une première approche sur la biosynthèse de l'amidon chez les glaucophytes mais il est impossible d'expliquer réellement le déroulement du métabolisme de l'amidon chez ces organismes.

Dans l'étude de Fredrick (1977) qui compare des enzymes contenues dans la cyanelle de *Glaucocystis nostochinearum* avec celles contenues dans la cyanobactérie *Anacystis nidulans*, deux phosphorylases, deux synthétases utilisant de l'ADPGlc et deux enzymes de branchement sont mises en évidence par des gels d'activités chez le glaucophyte contre respectivement deux, deux et trois enzymes chez la cyanobactérie. L'auteur montre également la particularité des enzymes de branchement de *Glaucocystis*, où deux bandes d'activité observées sur trois ne semblent pouvoir brancher que l'amylose et pas l'amylopectine contrairement à celles présentes chez la cyanobactérie. Cependant il est surprenant de voir ces enzymes dans les cyanelles du glaucophyte alors que nous savons actuellement que l'amidon y est cytoplasmique.

De nouvelles études fonctionnelles sont nécessaires pour l'établissement d'un modèle métabolique chez les glaucophytes, ce qui fut l'objet de ce travail.

## V. Présentation des modèles

Le travail de thèse s'articule autour de deux modèles : le glaucophyte *Cyanophora paradoxa* (la majorité du travail de thèse porte sur cet organisme) et le rhodophyte *Chondrus crispus*.

## V.1 Le glaucophyte *Cyanophora paradoxa*

Les glaucophytes ou glaucocystophytes sont un petit groupe de protistes photosynthétiques d'eau douce qui comprennent 8 genres principalement monotypiques : *Chalarodora azurea*, *Cyanophora spp.*, *Cyanoptyche gloeocystis*, *Glaucocystis nostochinearum*, *Glaucocystopsis africana*, *Gloeochaete wittrockiana*, *Peliaina cyanea* et *Strobilomonas cyaneus*. Ces organismes ont été un système modèle pour étudier l'évolution du plaste. En effet elles ont longtemps été considérées comme des fossiles vivants à cause des propriétés de ce que l'on sait aujourd'hui constituer leur plaste appelé cyanelle mais qui a longtemps été considéré comme une véritable cyanobactérie endosymbiotique. En effet la présence d'une couche épaisse de peptidoglycane entre ses enveloppes, celle de phycobilisomes, l'absence de LHC et l'organisation des membranes photosynthétiques, tout rappelle la morphologie d'une cyanobactérie ordinaire et paraît bien différent d'un plaste d'algue rouge ou verte. Cette caractéristique commune à tous les glaucophytes est exclusive chez les plastes des eucaryotes et suggère une évolution mineure des cyanelles. L'étude du génome de cet organelle a montré que celui-ci était de taille réduite, très proche de ceux des plastes des autres eucaryotes photosynthétiques. Le génome de la cyanelle de *Cyanophora paradoxa* contient 192 gènes ce qui est plus que le génome du chloroplaste des plantes vertes, mais 2000 polypeptides additionnels sont encore importés à partir du cytoplasme (pour revue Steiner et Löffelhardt, 2005). Ces statistiques sont à rapprocher des 1000 gènes décrits récemment pour le chromatophore de *Paulinella*, véritable endosymbionte cyanobactérien qui ne semble pas encore avoir évolué en organelle (Nowack et coll., 2008). La cyanelle des glaucophytes est donc bel et bien un plaste et non un cyanobionte

Le système de translocation des protéines au plaste a également été étudié chez *Cyanophora paradoxa*, et est assez similaire à celui des plastes des autres eucaryotes photosynthétiques. Il requiert comme chez les algues rouges la présence d'une phénylalanine dans la partie N-terminal du peptide de transit (Steiner et coll., 2005). Cette similitude semble logique sachant que les 3 lignées sont issues d'un même et unique événement d'endosymbiose. L'origine commune est également confirmée par la présence de clusters dans le génome de la cyanelle qui sont retrouvés

dans le génome des plastes des algues vertes et rouges, mais pas dans le génome des cyanobactéries (Löffelhardt et Bohnert, 1994).

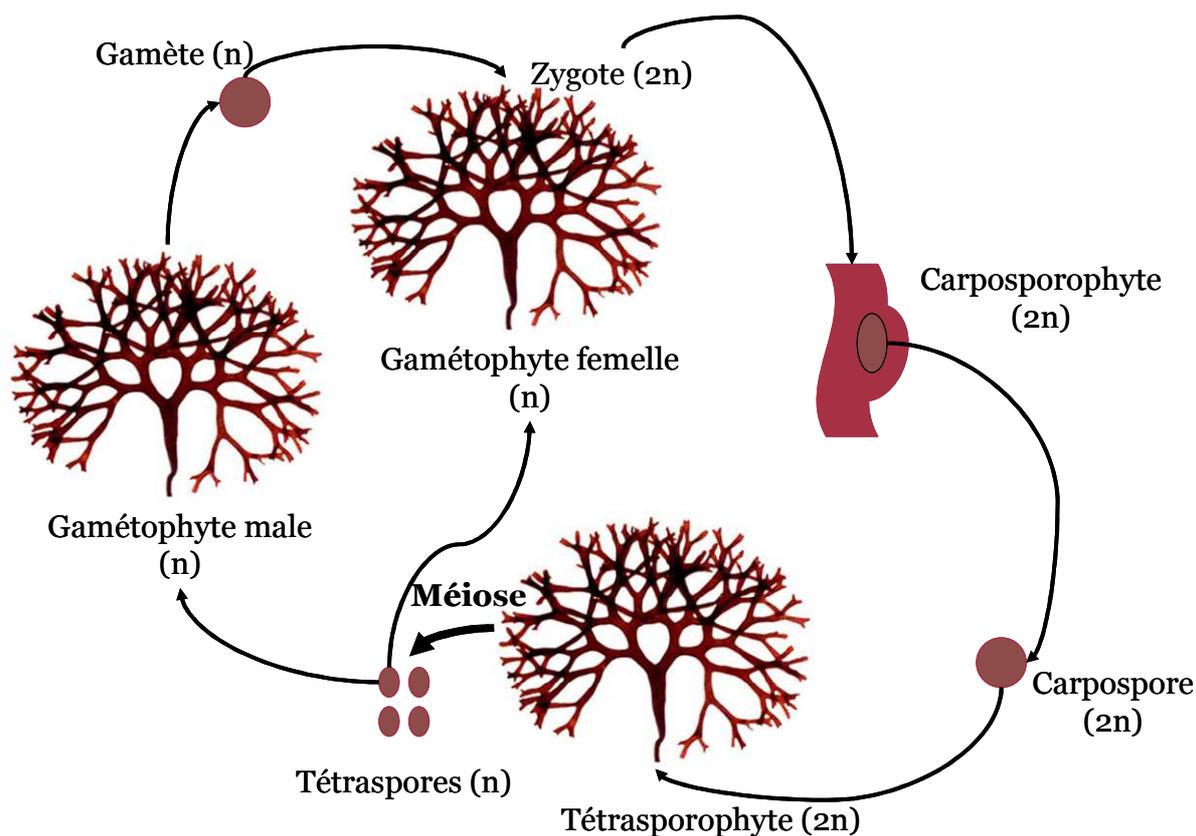
Les cyanelles présentent d'autres caractéristiques primitives, dont la présence uniquement en pigment de la chlorophylle A, de phycocyanines et d'allophycocyanines fixés au niveau des phycobilisomes, mais aussi l'existence de thylakoïdes concentriques (non empilés) et d'un système de concentration du carbone qui semble plus proche de celui de procaryotes. En effet la présence de carboxysomes « eucaryotes » semble privilégiée aux pyrénoides (comme observé chez les autres eucaryotes), mais la décision finale entre carboxysome et pyrénouïde devrait être apportée avec l'identification de l'anhydrase carbonique de la cyanelle (pour revue, Fathinejad et coll. 2008).

Le regroupement des glaucophytes en un unique phylum a également été confirmé par l'analyse phylogénétique des ARNr 16S et 18S effectuée par Bhattacharya et Schmidt (1997) chez *Cyanophora paradoxa*, *Glaucocystis nostochinearum* et *Gloeochaete wittrockiana*.

La plupart des informations décrites ci-dessus ont été obtenues chez *Cyanophora paradoxa* qui est l'espèce glaucophyte qui a été le plus étudiée. C'est donc naturellement que nous nous sommes tournés vers cette espèce modèle pour entreprendre la caractérisation du métabolisme de l'amidon chez les glaucophytes. Ce travail est présenté dans la première partie de ce manuscrit et en annexe 8.

## **V.2 Le rhodophyte *Chondrus crispus***

*Chondrus crispus* est une algue rouge appartenant à la classe des Florideophyceae et à l'ordre des Gigartinales. C'est une algue pluricellulaire qui possède un cycle de vie plus complexe que les algues unicellulaires. Le cycle biologique de l'algue est de type haplodiplophasique trigénétique avec succession d'une génération gamétophytique haploïde, d'une génération carposporophytique diploïde qui se développe sur les gamétophytes femelles et d'une phase tétrasporophytique diploïde indépendante (figure 9).



**Figure 9 : Cycle biologique de l'algue rouge *Chondrus crispus*.**

Cette algue est utilisée dans l'industrie pour sa production de carraghénanes qui est un gélifiant alimentaire très utilisé sous le nom E407. Il existe trois types de carraghénanes : kappa, iota et lambda que l'on retrouve pour les deux premiers chez les gamétophytes femelles et le 3<sup>ème</sup> chez les sporophytes (Bouarab, 2000). Le gamétophyte mâle est peu représenté dans son milieu naturel, et les données sur les carraghénanes le concernant sont inexistantes dans la littérature.

Aucune étude sur le métabolisme de l'amidon n'a été effectuée chez cet organisme. Par ailleurs, et surtout, son génome en cours de séquençage devrait nous apporter très prochainement des informations sur le nombre d'enzymes impliquées dans ce métabolisme, ainsi que la voie utilisée et l'origine phylogénétique de ses enzymes. Une étude enzymatique de ce métabolisme permettrait de compléter utilement les informations obtenues par l'étude du génome. Les résultats actuellement très préliminaires (3 mois de travail) effectués chez *Chondrus crispus* sont détaillés dans la deuxième partie de ce travail thèse.

**PARTIE 1 :**

**VOIE DE SYNTHÈSE DE L'AMIDON**

**CYTOPLASMIQUE CHEZ LE MODÈLE**

**GLAUCOPHYTE *CYANOPHORA PARADOXA***

## **Avant-propos**

Nous avons choisi de reprendre un format de publication incluant résumé, introduction, matériel et méthodes, résultats et discussion pour l'exposé de nos résultats. Ce format correspond à notre manuscrit désormais publié dont il est la traduction mais qui est ici complété par un certain nombre de résultats supplémentaires non rapportés.

## Résumé

La voie de biosynthèse de l'amidon cytosolique a été étudiée dans le modèle glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. Les grains de polysaccharide de réserve sont composés de fractions d'amylose et d'amylopectine, avec une distribution en longueur de chaîne et une organisation cristalline semblable à celles de l'amidon des algues vertes et des plantes terrestres. Une caractérisation préliminaire de la voie de synthèse de l'amidon démontre que *Cyanophora paradoxa* contient plusieurs activités amidon-synthétases solubles utilisant l'UDP-glucose, apparentées à celles des Rhodophyceae. De plus, *Cyanophora paradoxa* synthétise de l'amylose avec une amidon-synthétase liée au grain affichant une préférence pour l'UDP-glucose. Une enzyme de débranchement de spécificité isoamylasique et de multiples amidon-phosphorylases ont également été mises en évidence chez ce glaucophyte. La caractérisation biochimique et moléculaire de la voie de synthèse basée sur l'UDP-glucose est similaire à celle proposée récemment pour les algues rouges, les cryptophytes, et les alvéolés. La présence corrélée de l'isoamylase et de l'amidon parmi les eucaryotes photosynthétiques est discutée.

## Introduction

Les glaucophytes sont des algues unicellulaires d'eau douce, elles comportent des plastes, appelés cyanelles, qui contiennent des peptidoglycanes et ressemblent étrangement aux cyanobactéries ancestrales. Un évènement d'endosymbiose unique commun aux Rhodophyceae, aux Chloroplastida et aux Glaucophyta a été démontré (Rodriguez- Ezpeleta et coll., 2005). Cette endosymbiose a impliqué un cyanobionte (lié aux cyanobactéries actuelles) et un hôte eucaryote unicellulaire hétérotrophique biflagellé. En plus de l'acquisition de la photosynthèse oxygénique, les trois lignés ont gagné la capacité de synthétiser l'amidon, une nouvelle forme de polysaccharide de réserve apparenté au glycogène, l'autre forme par ailleurs la plus répandue retrouvée dans une grande diversité d'organismes.

L'amidon est composé de chaînes organisées avec les mêmes liens chimiques que dans le cas du glycogène. Il définit cependant une organisation beaucoup plus complexe (pour revue sur la structure de l'amidon : Buléon et coll., 1998). Il consiste en deux fractions de polysaccharides distinctes : l'amylose et l'amylopectine. La première, l'amylose, est surtout composée de chaînes linéaires de glucose liées en  $\alpha$ -1,4. Elle est synthétisée par l'amidon synthétase liée au grain (GBSS), une enzyme d'élongation liée et active dans le grain d'amidon (Ball et coll., 1998). La seconde est un polymère modérément branché (5 à 6%) qui présente une distribution asymétrique des branches ce qui permet la formation de groupes de chaînes, accrochés entre eux par un certain nombre de chaînes traverses plus longues. Cette organisation permet au polymère de cristalliser partiellement en forme de gros grain semi-cristallin insoluble, présentant une grande variété de formes et de tailles spécifiques dans le règne végétal. À la différence de la GBSS, les enzymes synthétisant l'amylopectine sont surtout actives dans la phase soluble (pour revue se référer à Ball et Morell, 2003). Les voies de synthèse des polysaccharides de réserve ont été intensivement étudiées chez les animaux, les champignons et les bactéries (pour revues François et Parrou, 2001 ; Preiss et Romeo, 1989 ; Roach, 2002). Les voies de synthèses bactériennes et eucaryotes du glycogène se distinguent par un certain nombre de caractéristiques très importantes, incluant la nature du nucléotide sucre donneur utilisé pour la polymérisation. En effet, on retrouve respectivement l'UDP-glucose et l'ADP-glucose chez les eucaryotes hétérotrophes et les bactéries.

Le métabolisme de l'amidon a été fortement étudié chez les plantes et les algues vertes (pour revue se référer à Ball et Morell, 2003 ; James et coll., 2003 ; Lu et Sharkey, 2006 ; Tetlow et coll., 2004 ; Zeeman et coll., 2007). Tandis que 6 à 12 gènes sont généralement retrouvés chez les eucaryotes hétérotrophes ou les bactéries pour le métabolisme du glycogène, les algues vertes et les plantes terrestres synthétisent l'amidon à partir d'ADP-glucose (Lin et coll., 1988 et Zabawinski et coll., 2001) avec l'aide de 30 à 40 gènes qui sont phylogénétiquement apparentés aux séquences des cyanobactéries et des eucaryotes hétérotrophes (Coppin et coll., 2005 et Patron et Keeling, 2005).

Les algues rouges et les glaucophytes peuvent être distingués des algues vertes et des plantes terrestres par le fait qu'ils synthétisent l'amidon dans leur cytoplasme et non dans leurs plastes.

Chez les algues rouges et leurs dérivés d'endosymbioses secondaires stockant de l'amidon tels que les cryptophytes et les alvéolés, des données tant biochimiques que bioinformatiques suggèrent la présence d'une voie basée sur l'utilisation de l'UDP-glucose (Nyvall et coll, 1999 ; Viola et coll., 2001, Deschamps et coll., 2006). Cependant cette voie reste à valider par des approches génétiques.

Dans les résultats qui suivent, nous apportons la première caractérisation détaillée de la structure et du métabolisme de l'amidon chez les glaucophytes. Soutenu par une combinaison d'approches biochimiques et moléculaires, nous proposons que le modèle glaucophyte *Cyanophora paradoxa* synthétise l'amidon par une voie UDP-glucose semblable à celle que l'on a récemment proposée pour les rhodophytes, les cryptophytes et les alvéolés (dinoflagellés et parasites apicomplexa). La présence d'un complexe isoamylase fonctionnel chez les glaucophytes renforce la corrélation établie entre cette activité et la synthèse de l'amidon chez les eucaryotes photosynthétiques.

## Matériel et méthodes

### Produits

L'ADP[U-<sup>14</sup>C]glucose, l'UDP[U-<sup>14</sup>C]glucose, et le Percoll® proviennent de GE healthcare (anciennement Amersham, UK et Pharmacia, Suède). L'ADP-glucose, l'UDP-glucose, le glycogène de foie de lapin, l'amidon « soluble », l'amylopectine, le pullulan, la résine de Sepharose® CL-2B viennent de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri), les β limites dextrines de Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd). Le kit de dosage de protéines est produit par Biorad (München, Germany). Le kit de dosage d'amidon est produit par Diffchamb (Lyon, France).

### Souche, milieu et condition de culture

La souche de *Cyanophora paradoxa* a été commandée dans la collection d'EPSAG (University of Gottingen, Germany) et est cataloguée sous la référence 29.80M, correspondant à l'indice UTEX 555.

Deux milieux de cultures liquides riches ont été utilisés : le milieu DY-V (mis au point par R.A. Anderson et M.D. Keller, données non publiées) et le milieu C (<http://www.nies.go.jp/biology/mcc/medium.htm#C>).

DY-Trace metal solution	Quantité en milligramme pour 1L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	200
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	40
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	20

F/2 vitamine solution	concentration
Vitamine B12	1.10 <sup>-10</sup> M
Biotine	1.10 <sup>-9</sup> M
Thiamine. HCl	1.10 <sup>-7</sup> M

Quantité en milligramme pour 1L	Milieu DY-V	Milieu C
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	50	40
KNO <sub>3</sub>		100
KCl	3	
NH <sub>4</sub> Cl	2,68	
NaNO <sub>3</sub>	20	
β-glycerophosphate	2,16	50
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,8	
Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	8	3
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1	0,6
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O		150
CaCl <sub>2</sub>	75	
MES	200	
Tris		500
DY-Trace metal	1 mL	1 mL
F/2 vitamine solution	0,5 mL	1 mL
pH	6,8 / NaOH	7,5 / HCl

Les cellules sont conservées en milieu liquide, entre 18 et 20°C et soumises à une lumière continue (~3000 lux). Elles sont réensemencées dans un milieu neuf tous les 8 à 10 jours.

Les cellules sont cultivées à une température de 25°C et avec un cycle 12h de jour/ 12h de nuit avec une lumière importante (~4500 lux). Dans tous les cas, les cultures sont placées sur une table d'agitation permettant une rotation de 100 tours/min avec un excentrique de 3 cm.

Le comptage des cellules s'effectue grâce à un détecteur de particules Coulter Counter Z3. Seules les particules de 3 à 15 µm sont comptabilisées, ce qui couvre l'intervalle de diamètre des cellules de *Cyanophora paradoxa*.

## **Extraction de l'amidon, production d'extraits bruts, cytoplasmiques et de cyanelles**

Les cultures de Cyanophora sont extraites en phase exponentielle de croissance (environ  $2 \cdot 10^6$  cellules par mL). Les cellules sont centrifugées à 3000g pendant 15 minutes. Le culot est repris dans différents tampons en fonction de l'utilisation ultérieure. Pour extraire l'amidon le culot est repris dans son volume de tampon d'extraction (50 mM HEPES/KOH pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,05% Triton X 100, 2 mM benzamidine, 2 mM  $\epsilon$ -amminocaproic acid, 0,5 mM PMSF, 5 mM DTT ou DTE). Les cellules sont détruites par sonication (3 cycles de 30 secondes à 50% d'intensité) ou par un double passage à la presse de French (10 000 PSI) suivant le volume utilisé. L'extrait cellulaire est centrifugé à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot contenant les débris cellulaires et l'amidon est repris dans une solution de Percoll® (90% v/v) et est centrifugé pendant 30 minutes à 10 000g à 4°C. Le Percoll® forme un gradient de densité lors de la centrifugation qui permet à l'amidon, très dense, de sédimenter au fond du tube tandis que les débris cellulaires restent en surface. Le culot d'amidon est enfin rincé à l'eau ou avec le tampon d'extraction s'il est destiné à des études protéomiques. Si les grains sont destinés à servir à des mesures enzymologiques, ils sont gardés en l'état à 4°C, sinon ils seront conservés à -20°C. L'amidon est envoyé dans 20% d'éthanol pour être analysé aux rayons X et pour la microscopie électronique. Le dosage de l'amidon se fait en suivant le protocole du kit « starch assay » de Differchamb.

Pour les extraits bruts et cytoplasmiques, le culot cellulaire est repris dans du tampon Tris-HCl pH8. Pour les extraits bruts, le culot obtenu à partir de 3 L à  $2 \cdot 10^6$  cellules par mL de culture est repris dans 10 mL de Tris 0,25 M et les cellules sont lysées par sonication. Le lysat est centrifugé 10 minutes à 10 000 g pour culoter les débris cellulaires et le surnageant est récupéré. Pour les extraits cytoplasmiques un tel culot est repris dans 2 mL de tampon Tris 1 M et laissé reposer 4 minutes à 4°C. Pour effectuer le choc osmotique 8 mL de tampon Tris 0,05 M sont ajoutés au 2 mL précédents et le tout est laissé 6 minutes dans la glace (le bon déroulement du choc osmotique est vérifié par observation au microscope). L'extrait cellulaire est centrifugé 5 minutes à 750 g pour ne pas lyser les cyanelles puis le surnageant est centrifugé 10 minutes à 10 000 g pour se débarrasser de tous les débris cellulaires. Le surnageant récupéré correspond à l'extrait cytoplasmique. Le culot contenant les

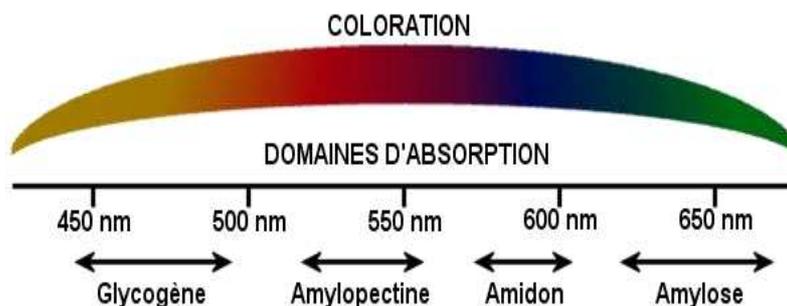
cyanelles est soumis une deuxième fois au choc osmotique pour lyser les dernières cellules qui ne l'auraient pas été et le nouveau culot obtenu est traité comme l'extrait brut afin d'étudier le contenu enzymatique des cyanelles.

## **Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique**

Ce fractionnement est réalisé, par chromatographie d'exclusion stérique sur une matrice de Sepharose® CL-2B (Sigma-Aldrich). L'amidon (2 mg) est dissout dans 100  $\mu$ L de DMSO 100 % à 100°C pendant 30 minutes, puis précipité avec 4 volumes d'éthanol pur à température ambiante. L'amidon précipité peut être conservé à -20°C. Après une centrifugation à 4 000 g, on récupère le culot d'amidon dans 500  $\mu$ L de NaOH 10mM (éluant de la colonne), puis celui-ci est déposé sur la colonne préalablement équilibré dans le NaOH 10mM. La colonne possède un diamètre de 0,5 cm et une hauteur de 65 cm, et son débit est 12 mL/heure. Les fractions en sortie de colonne ont un volume de 300  $\mu$ L.

Les fractions obtenues peuvent être utilisées pour déterminer la longueur d'onde au maximum d'absorbance ou pour un comptage radioactif.

Pour déterminer la longueur d'onde au maximum d'absorbance, 80  $\mu$ L de chaque fraction sont mélangés à 20  $\mu$ L d'une solution d'iode (0,1% I<sub>2</sub>, 1% KI). Le spectre d'absorbance entre 500 nm et 700 nm est mesuré sur chaque fraction afin d'obtenir la densité optique maximale et la  $\lambda_{max}$ . En effet l'interaction de l'iode avec les polymères de glucose produit une coloration qui dépend du degré de polymérisation (DP) des chaînes. Le DP doit être au minimum de 10 unités de glucose pour que le complexe iode/polysaccharide se forme, et plus le DP augmente et plus la  $\lambda_{max}$  se rapprochera des 670 nm. Cette interaction peut également être utilisée pour caractériser les polymères de glucose (Thorn et Mohazzeb, 1990) (figure 10). Les pourcentages d'amylopectine et d'amylose sont déterminés en regroupant d'un côté les fractions contenant l'amylopectine (fractions contenant les hauts poids moléculaires) et de l'autre celles contenant l'amylose (fractions sortant plus tardivement). Chaque pool de fractions est ensuite dosé par le kit de dosage d'amidon permettant ainsi de déterminer les pourcentages d'amylopectine et d'amylose.



**Figure 10 : Domaines d'absorption et colorations des complexes iode-polysaccharides.**

### **Distribution de la longueur de chaînes de l'amylopectine**

L'amylopectine purifiée par chromatographie d'exclusion stérique est dialysée contre l'eau, puis lyophilisée. Le lyophilisat est solubilisé dans 50  $\mu$ L de DMSO 30 %. L'équivalent de 200  $\mu$ g d'amylopectine solubilisée est débranché en présence de 0,2 U d'isoamylase (laboratoire biochimique Hayashibara, Japon) et d'acétate de sodium 55 mM pH 3,5 pendant une nuit à 42°C, dans un volume final de 50  $\mu$ L. La réaction est arrêtée 5 min à 100°C. L'échantillon est analysé par chromatographie d'échanges d'anions à haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD). 10  $\mu$ l sont injectés sur une colonne analytique CarboPAC-PA100 DIONEX (hauteur : 250 mm, diamètre : 4 mm, débit : 1 mL/min, solvant NaOH 100 mM). Les glucanes sont élués en fonction de leur degré de polymérisation à 0,5 mL/min par un gradient linéaire d'acétate de sodium de 50 mM à 350 mM d'une durée de 35 min. La surface de chaque pic est calculée par l'intégrateur C-R8A Chromatopac de Shimadzu, ce qui permet de quantifier chaque classe de glucanes relativement à la surface totale mise en jeu.

### **Microscopie électronique à transmission et mesures de diffraction aux rayons X**

La diffraction aux rayons X grand angle et les analyses par microscopie électronique à balayage ont été effectuées respectivement par les équipes d'Alain

Buléon et de Jean-Luc Putaux. Les méthodes sont détaillées dans Buléon et coll. (1997).

## **Extraction et visualisation de protéines liées aux grains d'amidon**

20 mg d'amidon sont nettoyés extérieurement par 80 µl de tampon dénaturant (62,5 mM Tris, 10% glycérine, 2% SDS, 20 mM DTE, 0,007% bleu de bromophénol) à 30°C pendant 10 minutes avec agitation forte, puis centrifugés. L'amidon est repris dans 160 µl du même tampon mais cette fois-ci chauffé à 95°C pendant 5 minutes avec agitation. Les échantillons sont centrifugés et le surnageant déposé sur un gel de type SDS-PAGE (7,5% final de monomère (Laemmli, 1970), à partir d'une solution de Rotiphorese® Gel 30 de chez Roth). Après 2 heures de migration à 25 mA par gel dans un tampon 25 mM Tris, 192 mM glycine et 0,1% (p/v) SDS, les protéines sont colorées au bleu de coomassie colloïdale Roti®-blue (Roth) et les gels sont décolorés par une solution de méthanol 25% (v/v).

## **Western blot dirigé contre la petite sous unité de l'ADPglc pyrophosphorylase**

Les conditions de préparation du gel, de l'échantillon (extrait brut avec tampon dénaturant), du tampon de migration et de l'électrophorèse sont les mêmes que celles décrites précédemment. Lorsque la migration est terminée, le gel est incubé 30 minutes dans le tampon de transfert (glycine 39 mM, TRIS 49 mM, SDS 0,037 % et méthanol 20 %). Ce Western-Blot a été effectué sur des extraits bruts de *Chlamydomonas reinhardtii* sauvage et mutant (BAF J5 mutant dépourvu de la petite sous unité de l'ADPglc pyrophosphorylase), et de *Cyanophora paradoxa*.

Les protéines sont ensuite électrotransférées à 4°C pendant 1 heure à 250 mA sur une membrane de nitrocellulose (Protan BA 85 Shleider & Schuell, Bromma, Suède) à l'aide d'un appareil d'électrotransfert. On effectue ensuite un blocage pendant 1 heure à température ambiante dans le tampon de blocage (TBST : TRIS Buffer Saline Tween : TRIS/HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 500 mM, et 0,1 % (v/v) de Tween 20, 5 % (p/v) de lait). La membrane est rincée trois fois avec le tampon de rinçage (TBST, 1 % de lait), puis incubée à 4°C toute une nuit avec la solution

d'anticorps primaire de lapin dirigé contre la petite sous-unité de l'ADPglc pyrophosphorylase de maïs, diluée à 1/1000 (v/v) dans le tampon de blocage. Trois lavages de 10 minutes sont entrepris avec le tampon de rinçage. L'anticorps secondaire, dilué au 1/1000 (v/v) dans du TBST contenant 1 % de lait et dirigé contre l'antisérum de lapin, est ajouté pour une incubation à température ambiante pendant 1 heure. Deux lavages de 5 minutes sont réalisés, puis un dernier lavage avec du TBST uniquement. Une réaction de chimioluminescence (kit western lightning™ chemiluminescence reagent *plus* de Perkin Elmer) permet de révéler les protéines grâce à l'activité peroxydase du deuxième anticorps. Une autoradiographie est réalisée sur un film développé par la suite.

## **Zymogrammes**

Tous les zymogrammes sont préparés comme suit : les gels de concentration et de séparation ont une concentration finale en monomère de 2,5% et 7,5% (p/v) respectivement et sont tamponnés par le Tris/HCl 125 mM pH 6,8 et le Tris/HCl 375 mM pH 8,8. La composition du tampon de chargement est la suivante : saccharose 25% (p/v), bleu de bromophénol 0,001%. Il est dilué au 10<sup>ème</sup> (v/v) avec les échantillons de protéines. Les électrophorèses sont réalisées à l'aide du système Mini Protean II de BioRAD (Richmond, CA, USA). Elles s'effectuent dans le tampon de migration suivant : Tris 25 mM, Glycine 192 mM, DTT 0,015% (p/v) pendant 2 heures, à 4°C et à 25 mA par gel.

Les activités sont révélées lors de la coloration du gel par une solution d'iode (I<sub>2</sub> 0,1 %, KI 1 %).

## **Zymogramme des activités amidon-synthétases solubles et phosphorylases**

50µl d'extraits bruts, cytoplasmiques ou de cyanelles sont déposés sur gel non dénaturant contenant 0,15% (p/v) de glycoène de foie de lapin. L'électrophorèse est réalisée à 25 mA par gel à 4°C pendant 2 heures. Après migration, les gels amidon-synthétases sont incubés une nuit à température ambiante dans un tampon contenant 25 mM HEPES/KOH pH 7,5, 30 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM β-mercaptoéthanol, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5mg/mL de sérum albumine bovine, et 1,2 mM

ADP-glucose ou UDP-glucose. Les gels phosphorylases eux sont rincés dans un tampon 25 mM Tris/acétate pH 7,5, puis incubés à température ambiante une nuit dans le tampon 25 mM Tris-acétate pH 7,5 pour le témoin, avec en plus 10 mM de glucose-1-phosphate pour travailler dans le sens synthèse ou 10 mM Pi (orthophosphate, sous forme  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) pour favoriser le sens dégradation.

### **Zymogramme des activités modifiant l'amidon**

Les protéines de 50  $\mu\text{l}$  d'extrait brut ou de chaque fraction (après semi-purification) sont séparées sur un zymogramme classique (sans polysaccharide ; voir précédemment). Après l'électrophorèse les protéines sont électro-transférées toute la nuit à température ambiante avec voltage constant 10V sur un gel de polyacrylamide contenant 0,3% (p/v) de polysaccharide (amidon ou BLD). Les activités modifiant l'amidon sont visualisées par coloration des gels à l'iode ( $\text{I}_2$  0,1 %, KI 1 %).

### **Mesure de l'activité GBSS**

Pour le dosage de l'activité GBSS on suit l'incorporation de glucose sur les extrémités non réductrices de l'amidon à partir d'ADP/UDP-glucose radiomarqué. 250  $\mu\text{g}$  d'amidon natif fraîchement purifié sont mélangés à 100  $\mu\text{L}$  du mélange réactionnel suivant : glycylglycine 50 mM pH 9,0 (ou Tris HCl pH 7,5 22 mM),  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5 mM, ADP-glucose ou UDP-glucose 3 mM et 2  $\mu\text{M}$  d'ADP/UDP-[U- $^{14}\text{C}$ ]Glc. Dans certains cas 50 mM de maltotriose pourront être ajoutés. La réaction est menée à 30°C pendant des durées différentes puis arrêtée par addition de 3 mL d'éthanol 70 %. L'échantillon est filtré sur « Wathman Glass Fiber » puis rincé 4 fois par 5 mL d'éthanol 70 %. Une fois séchés, les filtres sont placés dans une fiole de comptage contenant 3,5 mL de liquide scintillant. La scintillation est mesurée au compteur à scintillation Beckman instrument Inc.

Pour la détermination du  $K_m$  apparent, l'expérience est refaite comme précédemment dans le tampon glycylglycine à 30°C cependant la durée est ici fixée à 2 heures et ce sont les concentrations en ADP- et UDP-glucose qui varient (0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 mM). Le  $K_m$  apparent est déterminé à l'aide du logiciel « GraphPad Prism 5 ».

De plus, un fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique est effectué afin de localiser l'incorporation du glucose radioactif au sein des fractions du grain d'amidon. Dans ce cas, 100 µL de chaque fraction sont mis en présence de 3 mL de liquide scintillant dans des fioles de comptage.

## **Purifications et dosages d'activités**

### **Dosage des activités ADP- et UDP-glucose pyrophosphorylases dans le sens synthèse**

Ces enzymes sont dosées par leur capacité à catalyser la formation d'ADP-glucose ou d'UDP-glucose à partir de glucose-1-phosphate (G1P) et respectivement d'ATP ou d'UTP. A 40 µL d'extraits bruts sont ajoutés 210 µL de tampon de la composition suivante : Hepes/KOH pH 7,5, 75 mM, ATP ou UTP 0,5 mM, MnCl<sub>2</sub> 3,5 mM, BSA 25 µg/mL, 3PGA 1 mM, G1P froid 0,45 mM, C<sup>14</sup> G1P 0,05 mM, préalablement chauffé. La réaction est menée 15 minutes à 37°C puis arrêtée par chauffage 1 minute à 100°C. 20 µL de phosphatase alcaline d'*E. coli* (Sigma) diluée au 10ème sont ajoutés afin d'hydrolyser le G1P non utilisé. La réaction se fait à température ambiante pendant 1 heure, puis les échantillons sont rincés 5 fois avec 20 mL d'eau sur Filtre DE81 (Whatman) puis séchés. L'activité est mesurée au compteur à scintillation.

### **Purification des activités synthétases et phosphorylase**

Pour la purification des activités amidon-synthétases solubles et des phosphorylases, l'extrait cytoplasmique est préparé comme décrit précédemment. Le surnageant (17 mL) est déposé sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions (AEC) (MonoQ HR 5/5 ; volume de colonne 1 mL) pré-équilibrée dans le tampon A (25 mM Tris-acétate, pH 7,5, 10 mM DTT). Les protéines sont éluées à une vitesse de 1 mL par minute dans un gradient linéaire de 50 mL allant de 0 à 0,5 M NaCl dans du tampon A contenant 1 M NaCl. Les activités amidon-synthétases solubles et phosphorylases sont suivies par zymogramme (comme décrit précédemment). Les activités synthétases sont visualisées par des bandes noires après coloration des gels à l'iode, de même pour l'activité phosphorylase dans le sens synthèse. Les fractions contenant les activités amidon-synthétases (pic 1 et 2) et phosphorylases sont regroupées et concentré chacune à un volume de 0,1 mL par un

système de concentration de protéines par centrifugation (Amicon-Ultra ; Millipore). Les activités amidon-synthétases et phosphorylase ont ensuite été purifiées par chromatographie de gel filtration (colonne Superose 6 pré-paquet ; 1 cm par 30 cm ; Amersham Biosciences). Les échantillons (0,1 mL) sont déposés sur la colonne Superose 6 pré-équilibrée dans le tampon A et élués à 0,3 mL par minute en utilisant un système rapide de chromatographie liquide de protéines (FPLC). Les activités amidon-synthétases et phosphorylase sont suivies par la technique du zymogramme. Les fractions contenant les activités désirées (sans activités hydrolytiques contaminantes) sont rassemblées et utilisées pour la caractérisation enzymatique.

### **Dosage des activités synthétases**

Les activités amidon-synthétases sont mesurées dans le sens synthèse. Les essais standards ont été effectués pendant 15 minutes à 35°C avec 20 µl de fractions semi-purifiées, et 80 µl de mélange contenant HEPES/KOH (50 mM ; pH 7,5), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 mM), β-mercaptoéthanol (5 mM), sérum albumine bovine (BSA) (0,5 mg par mL), glycogène ou amylopectine (10 mg par mL), UDPglc (2 mM), et UDP-[U-<sup>14</sup>C]Glc (2 µM). A la fin de l'incubation, le glycogène ou l'amylopectine est précipité avec 1 mL de méthanol/KCl (75% v/v ; 1% p/v), incubé 10 minutes à -20°C, et collecté par centrifugation (3 000g, 5 minutes, 4°C). Le culot est resuspendu dans 0,2 mL d'eau distillé ; les précipitation, centrifugation et resuspension sont répétées deux fois de plus avant que le culot soit repris dans 0,2 mL d'eau distillée et mélangé à 2,5 mL de liquide de scintillation. La radioactivité incorporée est déterminée par le comptage du liquide de scintillation. L'activité spécifique est exprimée en micromoles de glucose incorporées par heure et par milligramme de protéines. Les valeurs de Km apparent ont été déterminées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.

### **Dosage de l'activité phosphorylase**

L'activité phosphorylase est mesurée dans le sens dégradation. La phosphorylase des polysaccharides est effectuée dans un volume final de 300 µl en incubant la phosphorylase semi-purifiée (0,4 mL) dans 25 mM Tris-acétate, pH 7,5, 10 mM Pi (orthophosphate), et 10 mg/mL de glycogène de foie de lapin ou d'amylopectine, pendant 1 heure à 30°C. La réaction est stoppée par chauffage 5 minutes à 95°C. La production de glucose-1-phosphate est suivie par addition de 300 µl de tampon 50 mM Tris-HCl, 120 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM glucose-1,6-diphosphate, et

0,5 mM NADP. La production de NADPH,H<sup>+</sup> est suivie par spectrophotométrie à 365 nm après addition de 4 unités de phosphoglucomutase (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri) et 2 unités de glucose-6-phosphate deshydrogénase (Sigma). L'activité phosphorylase est exprimée en nanomoles de G1P produites par minute et par milligramme de protéines. Les valeurs du Km apparent ont été déterminées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.

### **Purification des activités hydrolysant l'amidon**

Les activités hydrolysant l'amidon ont été purifiées à partir de 42 mL d'extraits cytoplasmiques déposés sur une colonne AEC (HiTrapQ FF [5 mL]) pré-équilibrée dans le tampon A. Les protéines sont éluées à 5 mL par minutes avec un gradient linéaire de 0 à 0,5 M NaCl dans du tampon A contenant 1 M NaCl. Les enzymes du métabolisme de l'amidon sont suivies par zymogramme. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées toute la nuit à température ambiante et à 10 mA sur des gels contenant 0,3% de polysaccharide (BLD ou amidon). Les gels sont révélés à l'iode. Comme l'activité de type isoamylase représenté par la coloration bleue migre doucement dans le gel sans substrat de façon similaire à l'isoamylase des algues et plantes vertes, nous avons choisi de purifier cette enzyme par chromatographie de tamisage moléculaire. Les deux fractions contenant l'isoamylase (fractions 10 et 11) sont assemblées (2 fois 2,5 mL) et concentrées jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,5 mL par centrifugation avec les filtres Amicon-Ultra (Millipore). 0,1 mL sont déposés sur une colonne Superose 6 (colonne pré-paquet ; 1 cm sur 30 cm ; Amersham Biosciences) pré-équilibrée dans du tampon A. L'isoamylase est éluee avec un débit de 0,3 mL par minutes grâce à un système FPLC. L'activité isoamylase est contrôlée suivant la procédure de Miller (1959) basée sur l'interaction chimique entre l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) et les extrémités réductrices des sucres. Pour chaque fraction (0,6 mL), 50 µl sont mélangées avec 50 µl d'amylopectine de pomme de terre 1% (p/v) dans du tampon A. La réaction réalisée à 37°C pendant une nuit est arrêtée par chauffage 10 minutes à 100°C, puis 100 µl de DNS sont ajoutés. La densité optique est mesurée à 570 nm. Le glucose est utilisé comme standard de valeur pour les extrémités réductrices. L'activité isoamylase est exprimée en équivalent d'extrémités réductrices pour 1 µg de glucose produites par minutes et par milligramme de protéines. L'absence d'autres activités hydrolytiques dans les fractions contenant l'isoamylase a été vérifiée par zymogramme. Les fractions

contenant l'isoamylase purifiée ont été regroupées et utilisées pour les caractérisations. L'activité de débranchement de l'enzyme envers l'amylopectine, le glycogène, les BLD, et le pullulan a été suivie en mesurant la production d'extrémités réductrices au cours du temps. Pour cela 50 µl d'isoamylases (20 µg d'extrémités réductrices produites par minutes) ont été incubées à 37°C dans 950 µl de tampon A contenant 1% (p/v) de polysaccharides. La production d'extrémités réductrices est suivie au cours du temps (de 0 à 3 heures) en prélevant 100 µl toutes les demi-heures. La réaction est à chaque fois arrêtée par chauffage 10 minutes à 100°C et 100 µl de DNS sont ajoutés afin d'effectuer le dosage. La quantité totale d'extrémités réductrices mises en jeu pour chaque polysaccharide a été déterminée en utilisant de l'isoamylase commerciale (*Pseudomonas amylodermosa* isoamylase). Le pourcentage de polysaccharides débranchés a été calculé par la formule suivante : (l'équivalent par µg de glucose des extrémités réductrices mesurées / l'équivalent par µg de glucose des extrémités réductrices libérées après débranchement complet du polysaccharide de réserve) x 100, réduisant ainsi toutes les erreurs dues aux différentes réactions du glucose et des MOS avec le DNS. L'activité relative de débranchement de l'amylopectine et des BLD a été déterminée par rapport au glycogène, qui a été choisi arbitrairement comme valeur de référence (mise à 1) après avoir pris en compte les différences de pourcentage de points de branchement de chaque polysaccharide observées par Manners (1991) : 4,17% pour l'amylopectine, 9,25% pour les BLD, et 7,12% pour le glycogène.

## **Analyse RMN**

50 µl de l'activité isoamylase semi-purifiée (20 µg d'extrémités réductrices produites par minute) sont mélangés avec 950 µl de tampon A contenant 5 mg de glycogène de foie de lapin et incubés une nuit à 37°C. La réaction est arrêtée par 5 minutes d'ébullition à 99°C. Les protéines sont enlevées en déposant l'échantillon sur une colonne Dowex 50:2 (1 cm sur 6 cm) immédiatement couplée à une colonne Dowex 1:2 (1 cm sur 6 cm), colonnes préalablement équilibrées dans l'eau. Les échantillons lyophilisés ont ensuite été soumis à la résonance nucléaire magnétique du proton (RMN) comme décrit dans Colleoni et coll. (1999) et Mouille et coll. (1996). Le spectre a été calibré sur δ-CH<sub>3</sub> du sulfoxyde diméthyl (2,6 ppm).

## **Clonage d'une partie de l'ADN génomique de la GBSS de *Cyanophora paradoxa*.**

Les séquences d'EST obtenues à partir du site internet du projet TbestDB (<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/searches/login.php>) (maintenant en accès libre sur NCBI) nous ont permis de dessiner des amorces pour la synthèse des sondes pour le criblage de la banque d'ADNc et pour le clonage d'une partie de l'ADNg de la GBSS de *Cyanophora*.

L'ADN génomique de *Cyanophora* a été extrait de la manière suivante : 400 mL de cultures de *Cyanophora* sont centrifugées et le culot est repris dans 1 mL d'eau, puis 1 mL de 2x Lysis solution (200 mM Tris-Cl pH8.0 ; 2 mM EDTA ; 6% SDS) sont ajoutés avec 120 µL de protéinase K (20 mg/mL). Le tout est incubé 15 minutes à température ambiante. 320 µL de NaCl (5M) et 280µL de CTAB/NaCl (10% CTAB ; 0,7M NaCl) sont ajoutés et l'ensemble est chauffé 10 minutes à 65°C. L'extraction est effectuée 3 fois par un volume identique d'un mélange phénol/ chloroforme/ alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) jusqu'à ce que le surnageant soit propre et l'interphase négligeable (5 minutes de centrifugation à 13000 rpm dans une centrifugeuse de paillasse à 4°C). Le surnageant est repris dans un volume identique d'isopropanol pour précipiter l'ADN, centrifugé 10 minutes à 14 000 rpm, et le culot est rincé avec de l'éthanol 70% puis repris dans 1 mL d'eau.

La séquence d'ADNg correspondant à l'EST de la GBSS a été obtenue par PCR sur ADNg à partir des primers suivants : TTCGTTCTCGGCCTTCGCGG (forward) et CGCATGGGGTTGTCCGGGTAGTCG (reverse). Le mélange réactionnel pour les PCR est le suivant : 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM dNTP, 0,2 µM de chaque amorce et 1U de Taq polymérase dans un volume finale de 20 µL de tampon Tris/HCl 10 mM pH9, KCl 50 mM, Triton X-100 0,1% (Promega).

Les PCR ont été effectuées suivant le cycle suivant :

5 minutes à 95°C (dénaturation)

29 cycles de :

30 secondes à 95°C (dénaturation)

30 secondes avec un gradient de 55 à 65°C (hybridation)

1 minute à 72°C (élongation)

2 minutes d'élongation finale à 72°C.

Les produits de PCR sont chargés sur gel d'agarose 1,5% dans un tampon de chargement (glycérol 50% ; EDTA 10 mM ; bleu de bromophénol 0,25%). Les produits de PCR sont excisés du gel, et les ADN synthétisés sont clonés dans le vecteur TOPO TA cloning produit par Invitrogen avant d'être amplifiés et séquencés.

## **Criblage et clonage des ADNc d'une amidon-synthétase, d'une amidon-phosphorylase, et de la GBSS de *Cyanophora paradoxa***

La banque d'ADNc  $\lambda$ ZAP de *Cyanophora paradoxa* nous a été fournie par Wolfgang Löffelhardt.

### **Préparation des souches bactériennes**

XL-1-blue MRF' est cultivée sur boîte contenant de la tétracycline et SOLR sur milieu Kanamycin. La veille de leur utilisation, des cultures liquides sont réalisées à partir d'une colonie isolée. Le milieu pour les XL-1-blue MRF' est supplémenté avec 10 mM de MgSO<sub>4</sub> et 0,2% de maltose (concentration finale). Le jour suivant les cultures sont diluées et relancées dans du milieu frais contenant les mêmes suppléments pour XL-1-blue MRF', toujours à 37°C pendant environ 3 à 4 heures de façon à ce que la DO<sub>600</sub> ne dépasse pas 1,0. Les cultures sont centrifugées 10 minutes à 2000 rpm puis le culot est repris dans 10 mM MgSO<sub>4</sub> stérile pour obtenir une DO<sub>600</sub> de 1,0. Les XL-1-blue MRF' peuvent ainsi être stockées quelques jours à 4°C. Les SOLR doivent être utilisées le jour même.

### **Titrage de la banque**

Le milieu NZY (5g NaCl ; 2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ; 5g yeast extract ; 10g NZ amine ; pH7,5 (NaOH) ; 7g agarose pour le top-agar ou 15g agar pour le milieu gélosé, par litre) est utilisé dans ce cas.

1  $\mu$ L de la suspension de phage et 1  $\mu$ L de dilution au 1/10 (dans tampon SM [ 5,8g NaCl ; 2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ; 50 mL 1 M Tris/HCl pH 7,5 ; 5 mL 2% (p/v) gélatine ] ) sont incubés avec 200  $\mu$ L de la souche XL-1-blue MRF' pendant 15 minutes. Ils sont rapidement mélangés à 3 mL de top-agar (48-50°C) et étalé sur des petites boîtes de NZY. Quand le top-agar est figé, les boîtes sont incubées sur l'envers 6 à 8 heures à 37°C. Le titre de la banque a été estimé à 20 000 phages / $\mu$ L.

## **Extraction de l'ADNc de la banque**

500 µL de la banque (10<sup>7</sup> phages) sont incubés 15 minutes à 37°C dans un falcon 50ml avec 125 µL de XL-1-blue MRF' (10<sup>8</sup> bactéries) et 100 µL de phages Helper (10<sup>9</sup> phages) pour permettre aux phages de s'attacher aux bactéries. 20 ml de LB broth complété par 10 mM de MgSO<sub>4</sub> et 0,2% de maltose sont ajoutés et l'incubation est prolongée 2h30 à 37°C avec cette fois-ci agitation. Les phages et les cellules sont ensuite lysés 20 minutes à 70°C et le tube est centrifugé 10 minutes à 1000 g pour faire tomber les débris. Le surnageant est récupéré et l'ADN ainsi libéré est dosé et servira de matrice à la réalisation des sondes

## **Réalisation des sondes**

Les sondes ont été réalisées sur l'ADN des phagemides par PCR (avec le même programme que précédemment) à partir des amorces suivantes :

- pour la GBSS :  
    primer forward : **CTGACTATCGTTTTTCGTTGGGAGC**  
    primer reverse : **CGGGACGAGGGCCGAGTGCC**
- pour la synthétase soluble :  
    primer forward : **CTCTTCGCGTTCGTGGGGC**  
    primer reverse : **CTCGGGGCCCCTCGCCCGCAT**
- pour la phosphorylase :  
    primer forward : **CGCAGCTCCTGCCCCGCC**  
    primer reverse : **GCGCTTGTACTCGTGGATGCGC**

La taille des produits de PCR a été vérifiée sur gel d'agarose et les produits de PCR ont été insérés dans un vecteur de type TOPO TA cloning et séquencés. Les sondes ont été réalisées sur les clones contenant les vecteurs avec le kit de détection luminescent DIG (Roche Molecular Biochemicals).

## **Criblage de la banque**

600 µL d' XL1-Blue MRF' sont infectées par environ 50 000 phages de la banque (2,5 µL) pendant 15 minutes à 37°C. 8 mL de NZY top agarose à 48°C sont ajoutés afin d'étaler les bactéries sur une grande boîte de pétri NZY. Les boîtes ainsi réalisées sont incubées toute la nuit à 37°C. Le lendemain elles sont refroidies à 4°C pendant 2 heures afin de transférer les plages de lyse sur des membranes Hydond-N+ (Amersham/ GE healthcare). Pour cela les membranes sont numérotées comme les

boîtes et déposées à la surface de celles-ci. Les membranes sont orientées par 3 points effectués avec une aiguille traversant la membrane et la gélose. Au bout d'une minute les membranes sont retirées, dénaturées 2 minutes dans un tampon de dénaturation (87,66g de NaCl, 20g de NaOH par litre), neutralisées 2 minutes dans un tampon de neutralisation (87,66g de NaCl, 60,5g de Trizma base par litre pH ajusté à 7,5 par HCl), et lavées dans du 2X SSC (20X SSC : 88,23g Tris sodium citrate, 175,32g de NaCl par litre avec un pH compris entre 7 et 8). L'ADN est ensuite fixé sur la membrane pendant 2 heures à 80°C.

Les membranes sont pré-hybridées, deux par deux, 2h à 42°C dans 10ml tampon d'hybridation (5X SSC ; 5X Denhardt's solution [2g BSA, 2g de Ficoll 400, 2g polyvinylpyrrolidone pour 100 ml] ; 1% (w/v) SDS ; 50% formamide désionisé ; 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé). 25 µL du produit de PCR dénaturé (10 minutes à 100°C puis dans la glace) sont ajoutés et l'hybridation à lieu pendant la nuit à 42°C. Enfin les membranes sont rincées deux fois 8 minutes dans du 2X SSC 0,1% SDS à température ambiante et deux fois 15 minutes dans du 0,5X SSC 0,1% SDS à 65°C. Les membranes sont révélées avec du CSPD (voir protocole fourni avec le CSPD de chez Roche Molecular biochemical) et visualisée sur film radiographique.

Les plages de lyse révélées sur le film sont extraites sur les boîtes d'origine, les phages sont élués dans 50 µL de SM buffer avec une goutte de chloroforme une nuit à 4°C. Puis de nouvelles infections sont réalisées et les boîtes sont criblées comme décrit ci-dessus jusqu'à l'obtention d'un phage pur, c'est-à-dire lorsque toutes les plages de lyse interagissent avec la sonde.

### **Excision des phages**

Les phages purs contenant potentiellement les ADNc d'intérêt ont été excisés de manière similaire à l'extraction de l'ADNc de la banque. Une plage de lyse (avec le milieu gélosé) est récupérée et mise dans 500 µl de tampon SM avec 20 µL de chloroforme. Le tout est mélangé avant de laisser à 4°C toute la nuit pour extraire les phages. Le lendemain 200 µL de XL1-Blue MRF' sont incubées avec 250 µL de phages (élués pendant la nuit) et 1 µL de phage Helper, pendant 15 minutes à 37°C. 3mL de LB broth complété sont ajoutés et la culture est agitée à 37°C pendant 2H30. Les phages et les bactéries sont lysés à 70°C pendant 20 minutes et les débris sont éliminés par centrifugation (comme précédemment). 10 µL de phagemides sont incubés en présence de 200 µL de SOLR 15 minutes à 37°C avant d'être étalés sur des

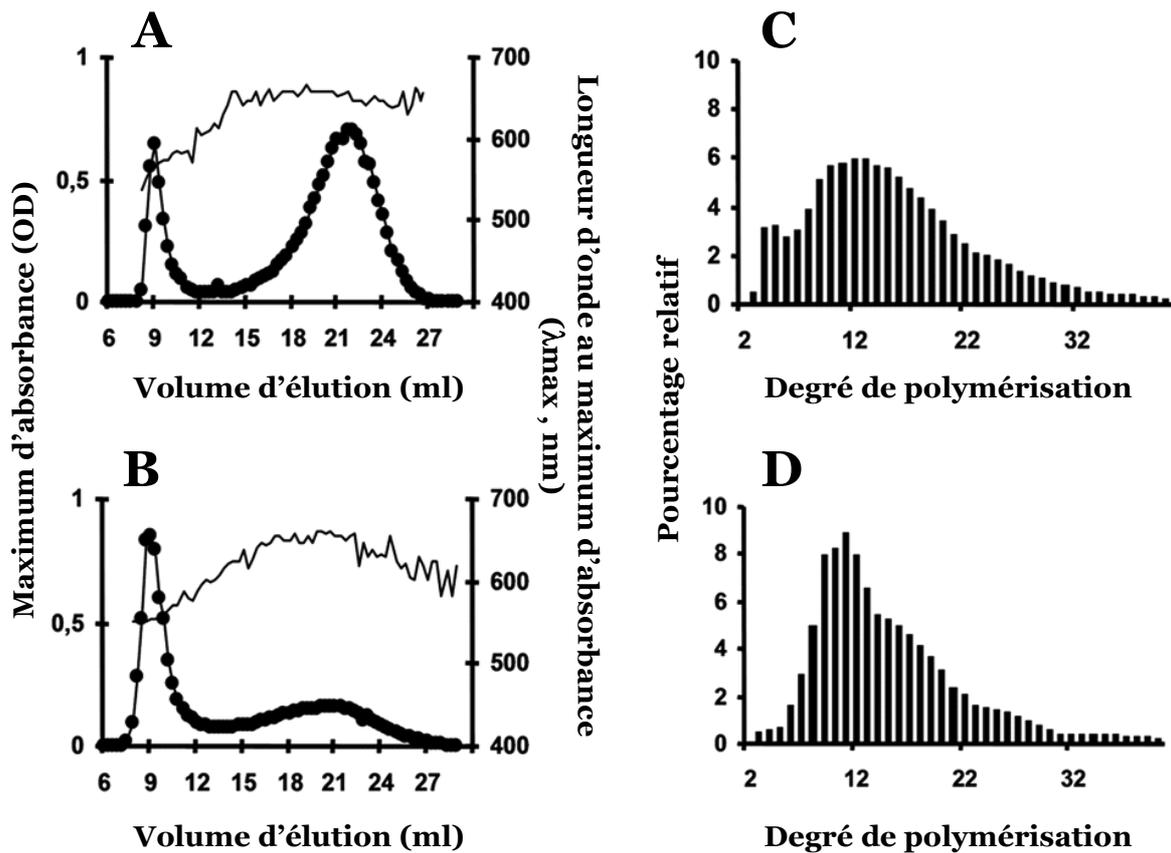
boites LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL). Les colonies obtenues après une nuit à 37°C seront cultivées afin d'extraire le phagemide avec le kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega (Madison ; Wisconsin ; USA) pour être envoyé à séquencer, et afin de faire un stock glycérol qui sera conservé à -80°C.

## Résultats

### **Caractérisation des grains d'amidon de *Cyanophora paradoxa***

L'amidon a été obtenu à partir de cellules de *C. paradoxa* en fin de phase exponentielle de croissance ( $2 \cdot 10^6$  cellules par ml) par sédimentation et purification par gradient de densité. Le polysaccharide a été dissout, et les fractions polysaccharidiques ont été séparées par chromatographie de tamisage moléculaire (GPC) sur une matrice de Sepharose® CL-2B. Les résultats montrés dans la figure 11A démontrent que ce matériel contient des fractions polysaccharidiques de haute ainsi que de basse masse semblables respectivement à l'amylopectine et l'amylose de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (figure 11B). Le ratio amylose/amylopectine a été calculé en récoltant leurs fractions respectives après GPC et en mesurant les deux fractions obtenues par un dosage à l'amyloglucosidase. Le contenu en amylose du glaucophyte est systématiquement important voir très important, variant de 30 à 60 % du poids total du polysaccharide dans un milieu fournissant de l'azote en conditions respectives d'alternance jour/nuit ou de lumière continue. Contrairement aux résultats obtenus chez les algues vertes, la carence en azote a peu d'impact sur le contenu relatif en amylose. La souche sauvage 137C de *Chlamydomonas reinhardtii* accumule de 2 à 10 % maximum d'amylose quand le milieu contient de l'azote et de 10 à 30 % en cas de carence azotée.

L'amylopectine de *Cyanophora paradoxa* a été collectée après GPC et soumise à un débranchement par l'action d'isoamylases. La distribution en longueur des chaînes débranchées a été obtenue par chromatographie d'échanges d'anions à haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAED-PAD). Les résultats montrés dans la Figure 11C montrent que *Cyanophora paradoxa* contient un amidon type présentant une distribution bimodale des glucanes qui est sélectivement enrichi pour des chaînes très courtes en comparaison de ce qui est observé chez *Chlamydomonas* (figure 11D).



**Figure 11 : Analyse de la structure de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique, et analyse de la distribution en longueur de chaîne de l'amylopectine.**

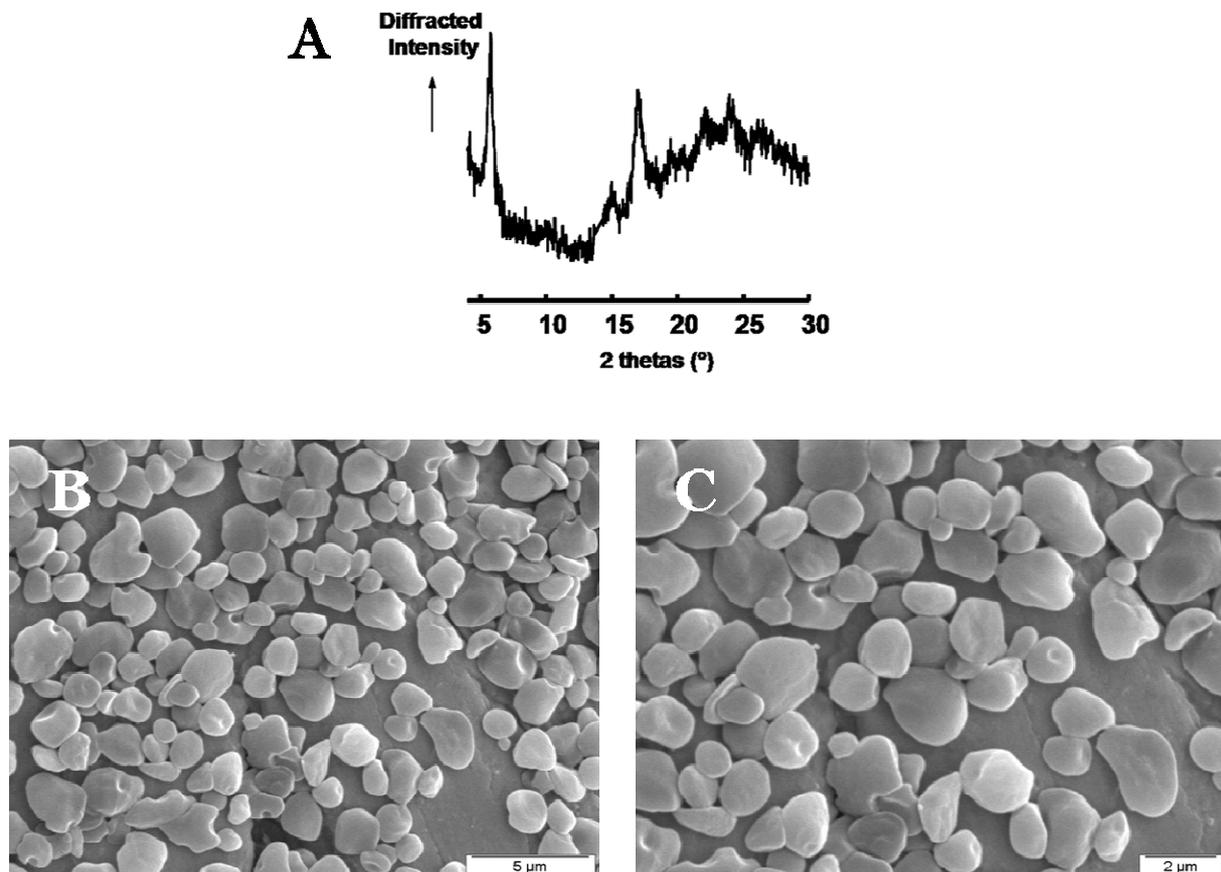
A et B : Les fractions constitutives du grain d'amidon ont été séparées par GPC (voir matériel et méthode). Les glucanes de chaque fraction ont été détectés par interaction avec l'iode. L'axe des abscisses représente le volume d'élution de la colonne correspondant à chaque fraction. L'axe des ordonnées gauche mesure le maximum absorbance du complexe d'iodo-polysaccharide (—●—) tandis que l'axe des ordonnées droite représente la longueur d'ondes au maximum absorbance ( $\lambda_{max}$  (exprimée en nm) : \_\_\_).

C et D : Les glucanes branchés de la fraction d'amylopectine ont été purifiés à partir de la colonne et ensuite analysés par débranchement effectué par l'isoamylase afin de déterminer la distribution en longueur de chaîne. Les longueurs de chaîne (DP) sont indiquées sur l'axe des abscisses. Le pourcentage de chaque classe de glucane est donné sur l'axe des ordonnées.

Les résultats des chromatographies d'exclusion stériques et des distributions en longueur de chaîne pour l'amidon de *Cyanophora* et de *Chlamydomonas* sont présentés respectivement en A et C, et en B et D.

Les grains d'amidon diffractent aux rayons X et donnent deux types de modèles de diffraction correspondant à deux géométries d'assemblée différente qui ont été nommées respectivement le type A et le type B (Buléon et coll., 1998). Le grain d'amidon est typiquement considéré comme semi-cristallin. En effet seules les sections de la molécule d'amylopectine se réunissent en cristaux. L'amylose est généralement pensé comme principalement amorphe. Néanmoins, un haut contenu

en amylose a tendance à donner un modèle de diffraction de type B pour le reste de l'amylopectine. Les grains d'amidon de *Cyanophora paradoxa* ont donc été analysés par diffraction au rayon X. Les échantillons utilisés pour l'analyse ont produit un diffractogramme de type B avec un pourcentage de cristallinité de l'ordre de 30 % (figure 12A).



**Figure 12 : Analyse aux rayons X et photographie au microscope électronique de grains d'amidon de *Cyanophora paradoxa*.**

A : Les pics de diffraction de valeur 2 $\theta$  (angle de Bragg) à 9.9°, 11.2°, 15°, 17°, 18.1°, et 23.3° caractérisent des amidons de type A, alors que des pics de diffraction de valeur 2 $\theta$  à 5.6°, 15°, 17°, 22°, et 24° sont typiques d'amidons de type B. Ce diagramme de rayons X aux grands angles est caractéristique d'un amidon de type B avec un degré de cristallinité de 31%  $\pm$  3%.

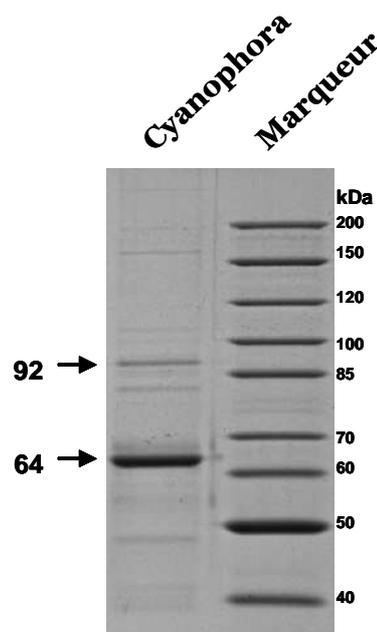
B et C : Micrographies électroniques de grains d'amidon purifiés de *Cyanophora paradoxa* (barre d'échelle respectivement de 5 $\mu$ m et de 2 $\mu$ m pour B et C).

La morphologie des grains d'amidon a également été étudiée par microscopie électronique à balayage (SEM) (figure 12B et 12C). *Cyanophora paradoxa* présente des grains d'amidon classiques avec des cavités occasionnelles ou des altérations de morphologie qui pourraient être dues à une dégradation *in vivo* du polysaccharide, ou à la croissance des grains en contact étroit avec d'autres structures cellulaires.

Cependant, quand elles sont présentes, les cavités ne correspondent pas à la taille et à la fréquence récemment observée sur les grains d'amidon floridéen du cryptophyte *Guillardia theta* (Deschamps et coll., 2006). La taille des grains de *Cyanophora* varie entre 0.5 à 2-3  $\mu\text{m}$  de diamètre, chiffre comparable à celui de l'amidon trouvé dans les algues vertes et les feuilles des plantes.

- De ces résultats nous pouvons conclure que *Cyanophora paradoxa* accumule des grains de polysaccharides de réserve semi cristallins riche en amylose semblables à l'amidon des plantes.

### Etude de l'amidon-synthétase liée au grain

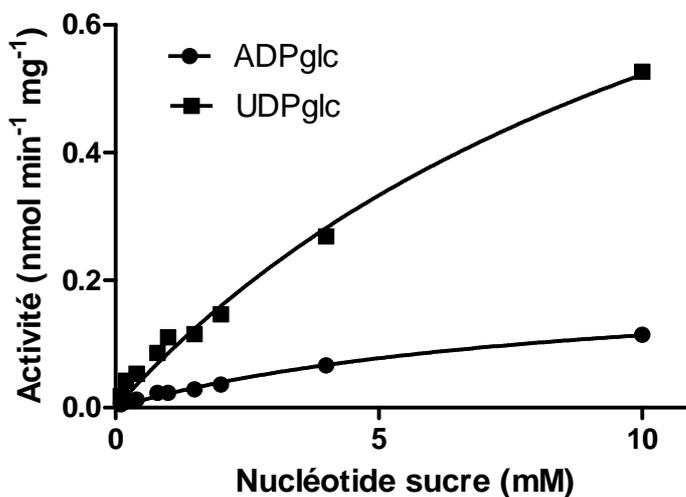


**Figure 13 : Visualisation des protéines liées au grain d'amidon de *Cyanophora paradoxa*.**

Les protéines du grain ont été extraites dans du SDS à ébullition et séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Deux protéines majeures sont observées et ont été hydrolysées avec de la trypsine. Les peptides élués du gel ont été identifiés et séquencés par MALDI-TOF et par MS-MS. Pour la protéine majeure de 64kDa les peptides YDQYFDAWDTSVR, VTFLHNLlyQGR, DLPVNALATR, VFYETK GKDR, SVPTTLLAFVGR ont été obtenus. Le premier est retrouvé dans la séquence de l'EST de la GBSS de *Cyanophora* et les autres dans l'ADNc complet obtenu par la suite. Pour la protéine de 92kDa un seul peptide identifié (MQAVQQRY) a pu être retrouvé dans une séquence d'amidon phosphorylase récemment trouvée dans une nouvelle ressource d'EST de *Cyanophora paradoxa* (EC661027) (O'Brien et coll., 2007).

L'amylose est normalement associée à la présence d'une activité amidon-synthétase liée au grain, enzyme qui, chez les plantes, est responsable de la synthèse processive d'un tel long glucane (pour revue voir Ball et coll., 1998).

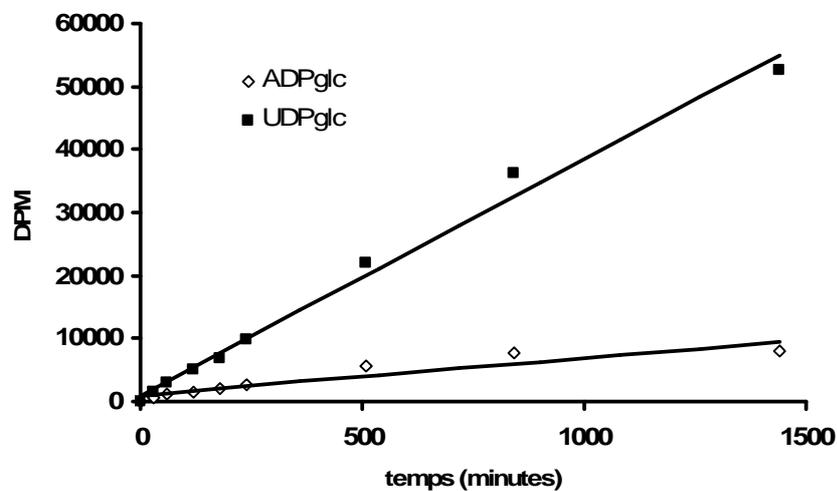
Nous avons étudié les protéines liées au grain et nous avons trouvé une protéine majeure de 64 kDa (figure 13) qui montre une homologie significative avec la séquence de la GBSSI des plantes. La protéine a été hydrolysée avec de la trypsine et les peptides ont été séquencés (YDQYFDAWDTSVR, VTFLHNLLYQGR, DLPVNALATR, VFYETK GKDR, SVPTTPLLAFVGR). Le premier d'entre eux corrèle avec l'EST qui semble correspondre à une GBSS. Nous avons alors entrepris le clonage de l'ADNc complet de cette protéine. Les différents peptides obtenus précédemment se relient à la séquence de la protéine déduite de l'ADNc que nous avons obtenue par criblage de notre banque d'ADNc de *Cyanophora paradoxa* (Genbank EU165054, annexe 1). Nous avons également réussi à obtenir une partie de l'ADN génomique de cette protéine (partie correspondante à l'EST) et celle-ci nous montre une alternance importante d'introns et de petits exons ayant une taille comprise entre 35 à 80 nucléotides (annexe 2).



**Figure 14: Courbe de Michaelis-Menten réalisée pour l'activité GBSS de Cyanophora.**

250 µg d'amidon ont été incubés 3 heures à 30°C et à pH 7,5 avec différentes concentrations d'ADP-glucose et d'UDP-glucose. Ces concentrations sont représentées sur l'axe des abscisses. L'activité mesurée en nanomoles de glucose incorporées par minute et par mg d'amidon est indiquée sur l'axe des ordonnées.

Nous avons également mesuré cette activité amidon-synthétase sur des grains d'amidon fraîchement purifiés. La GBSS est capable d'utiliser l'ADP-glucose et l'UDP-glucose avec des valeurs de  $K_m$  apparents de 8 mM pour l'ADPglc et de 15 mM pour l'UDPglc (figure 14). La radioactivité incorporée est proportionnelle au temps d'incubation (figure 15), avec toutefois une vitesse d'incorporation beaucoup plus importante pour l'UDPglc. En effet la  $V_{max}$  avec l'UDP-glucose est 6 fois plus importante qu'avec l'ADPglc (1.48±0.5 nmol d'UDPglc incorporé/min/mg d'amidon et 0.23±0.04 pour l'ADPglc) (figure 14).

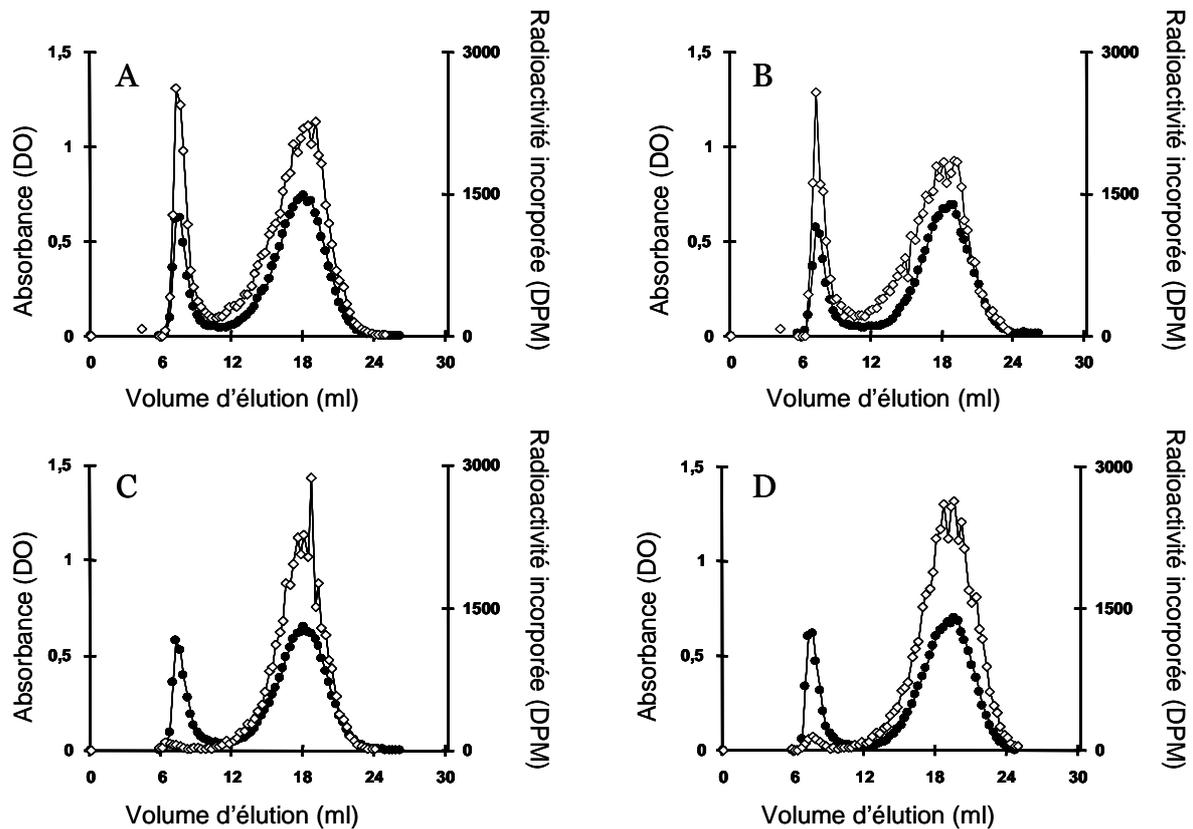


**Figure 15: Etude de l'incorporation du glucose à partir de l'ADP[U-<sup>14</sup>C]glucose ou de l'UDP[U-<sup>14</sup>C]glucose au cours du temps.**

250 µg d'amidon sont incubés dans un volume total de 100 µL à pH 7,5 comprenant une concentration d'ADP[U-<sup>14</sup>C]glucose ou d'UDP[U-<sup>14</sup>C]glucose de 2,2 µM à 10,5 GBq/mmol pour une concentration finale d'ADP-glucose ou d'UDP-glucose à 3,2 mM. L'incorporation du glucose chaud (axe des ordonnées) sur les grains d'amidon est mesurée au cours du temps (axe des abscisses (en minutes)).

Nous avons ensuite caractérisé la structure du polysaccharide produit à partir d'ADPglc et d'UDPglc. Les résultats montrés dans la figure 16 démontrent que le comportement de l'activité liée au grain d'amidon est identique en utilisant les deux nucléotides sucres, et est analogue avec celle mise en évidence pour la GBSSI chez les cryptophytes (Deschamps et coll., 2006), les algues vertes (van de Wal et coll., 1998) et les plantes (Denyer et coll., 1999). En effet, on sait que la GBSSI en absence de malto-oligosaccharides supplémentaires polymérise des résidus de glucose aux extrémités des chaînes extérieures de l'amylopectine. Ces chaînes sont par la suite

libérées de l'amylopectine pour produire l'amylose (figure 16A et 16B). D'autre part, la présence de malto-oligosaccharides agit comme des primers compétitifs de l'amylopectine. On observe alors que l'enzyme synthétise directement des molécules semblables à l'amylose, et très peu d'incorporation à lieu au niveau de l'amylopectine (figure 16C et 16D).



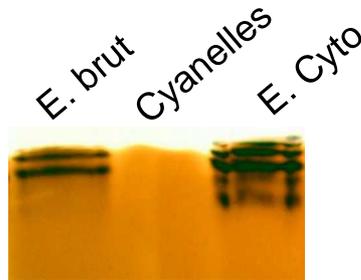
**Figure 16 : Fractionnement de grains d'amidon isolés de *Cyanophora* soumis à une synthèse in vitro d'amylose.**

Après incubation avec de l'ADP-glucose (A) ou l'UDP-glucose radiomarqué (B), les fractions d'amidon ont été séparées par chromatographie d'exclusion stérique (CL-2B) pour détecter dans quelles fractions les résidus de glucose radiomarqués ont été incorporés. La dilution isotopique pour l'ADP-glucose est trois fois plus faible que pour l'UDP-glucose. La même expérience d'incorporation à partir d'ADP-glucose (C) ou d'UDP-glucose (D) a été faite en présence de 50 mM de maltotriose. L'axe des abscisses indique le volume d'élution de la colonne, l'axe gauche montre l'absorbance du complexe iode-polysaccharide de chaque fraction éluée (●) et l'axe droit montre la radioactivité incorporée dans chaque fraction (◇).

- Conclusion : l'activité synthétase liée au grain d'amidon des glaucophytes est capable d'utiliser l'ADP-glucose et l'UDP-glucose et montre des propriétés analogues aux GBSS purifiées chez les Chloroplastida et les cryptophytes.

## Etude des activités amidon-synthétases

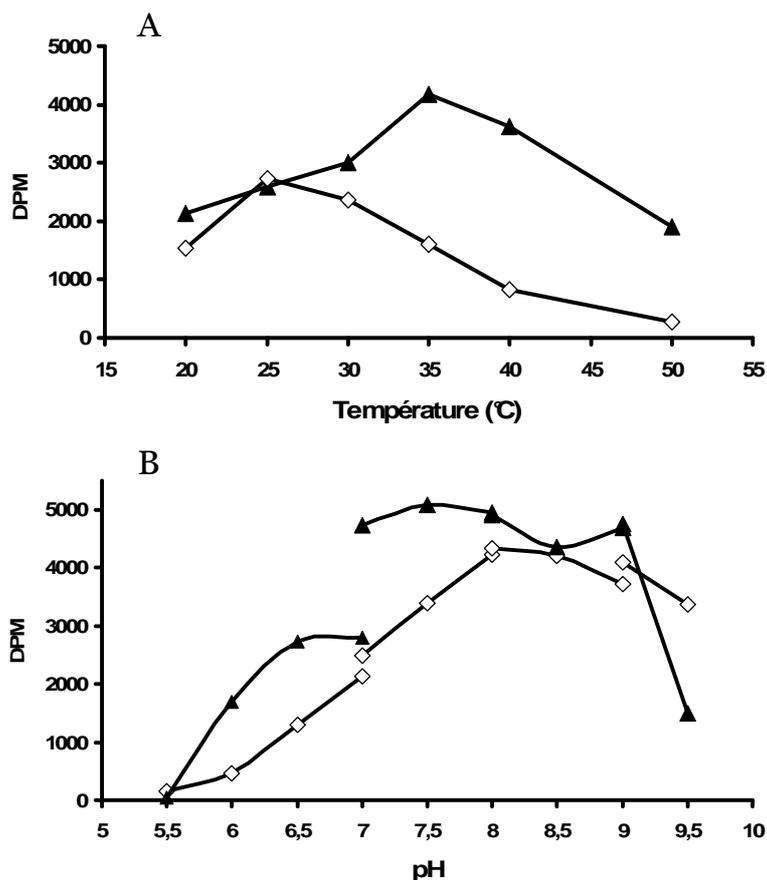
Comme la caractérisation cinétique de la GBSSI n'a pas montré de préférence très spectaculaire pour l'UDP-glucose par rapport à l'ADP-glucose, nous avons examiné les propriétés de l'amidon synthétase soluble. Nos zymogrammes contenant du glycogène montrent la présence de plusieurs bandes à mobilité faible correspondant à plusieurs activités amidon-synthétases solubles utilisant l'UDP-glucose. Ces activités ont été localisées dans le cytoplasme des cellules (figure 17). Aucune enzyme d'élongation utilisant l'ADP-glucose n'a pu être mise en évidence en utilisant cette procédure.



**Figure 17: Zymogramme révélant la localisation des activités amidon-synthétases solubles UDP-glucose dépendantes.**

100µg de protéines totales d'un extrait brut, d'un extrait de cyanelles purifiées et d'un extrait cytoplasmique sont déposés sur une gel natif contenant 0,15% de glycogène. Après migration le gel a été incubé une nuit avec 1,2mM d'UDP-glucose. Les activités amidon-synthétases solubles UDP-glucose dépendantes sont visualisées par une coloration brune, après coloration à l'iode, uniquement dans les extraits brut et cytoplasmique.

Nous avons voulu partiellement purifier ces activités enzymatiques et examiner leurs propriétés cinétiques. Les résultats montrés dans la figure 19 A démontrent que deux types d'activité amidon-synthétase soluble peuvent être partiellement purifiées, par colonne échangeuse d'anion suivi d'une chromatographie de gel filtration, sans être contaminées par des activités hydrolysantes. Les pics 1 et 2 (figure 19A) représentent 87 et 13 % de l'activité amidon synthétase totale avec une température optimale respectivement de 35°C et 25 °C, et un pH respectif de 7,5 et 8 (figure 18).



**Figure 18: Mesures de la température optimale et du pH optimum pour les deux pics d'activité amidon-synthétase.**

Le ratio UDP-14C-glucose/ UDP-glucose est 3,5 fois plus faible pour le pic 1 que pour le pic 2 afin d'avoir des valeurs de DPM du même ordre pour faciliter la lecture sur les graphiques.

Les courbes avec le triangle noir représentent les dosages effectués sur le pic 1 et celles avec le losange blanc représentent les résultats obtenus pour le pic 2.

A : Détermination de la température optimale. 10  $\mu$ L d'échantillon des deux pics sont incubées 15 minutes à pH 7,5 et à différentes températures. Les températures d'incubation sont indiquées par l'axe des abscisses.

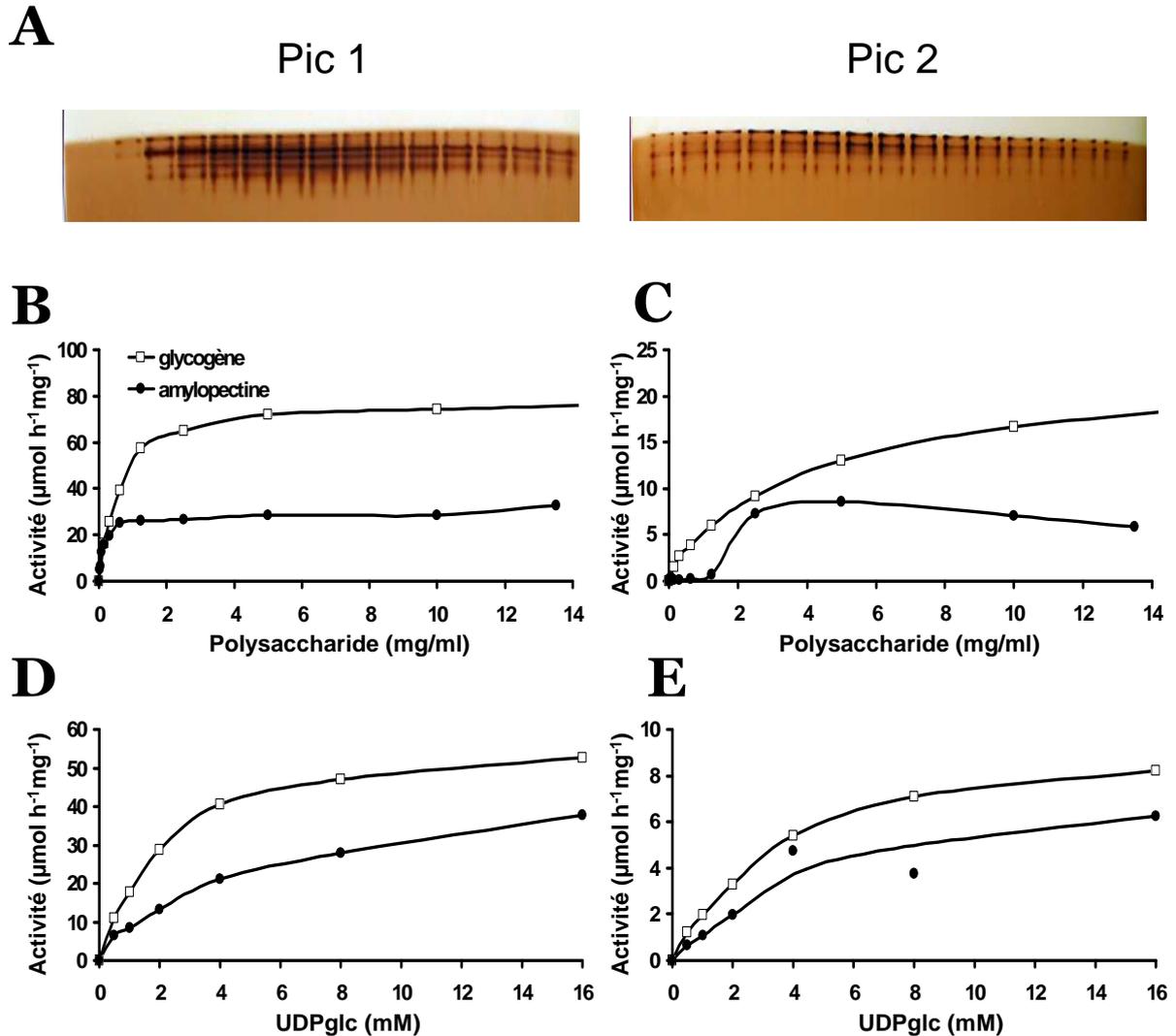
B : Détermination du pH optimum. 10  $\mu$ L d'échantillon des deux pics sont incubés 15 minutes à 35°C et à différents pH. Le pH est indiqué par l'axe des abscisses. Les tampons utilisés sont acide citrique/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 5,5, 6, 6,5, 7), HEPES/ $\text{NaOH}$  (pH 7, 7,5, 8), Tris/ $\text{HCl}$  (pH 8, 8,5, 9) et Glycine/ $\text{NaOH}$  (pH 9, 9,5)

Ces activités montrent une préférence marquée pour l'UDP-glucose et ne peuvent pas utiliser l'ADP-glucose de manière significative. Moins de 10 DPM d'écart sont mesurés entre les témoins négatifs et les tubes incubés avec l'ADPglc contre environ 5500 DPM et 510 DPM pour les pics 1 et 2 respectivement (pour la même expérience) soit moins de 2 % de l'activité mesurée en présence d'UDP-glucose. De façon intéressante la deuxième activité (pic 2) montre clairement une cinétique

sigmoïdale en présence des concentrations croissantes en amylopectine (figure 19C) tandis que le pic 1 en présence de glycogène et d'amylopectine montre une cinétique classique de type Michaelis-Menten, tout comme le pic 2 en présence de glycogène (figure 19B et 19C). Le comportement du pic 2 rappelle celui de l'amidon synthétase qui a été récemment étudié chez *Gracilaria tenuistipitata* (Nyvall et coll., 1999). Les concentrations croissantes d'UDP-glucose en présence de glycogène ou d'amylopectine nous ont permis de mesurer des Km apparents, pour le pic 1 de  $2.2 \pm 0.2$  mM en présence de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de glycogène et  $5.2 \pm 0.9$  mM en présence de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'amylopectine (figure 19D). Le pic 2 montre des valeurs de Km de  $4 \pm 0.3$  mM en présence de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de glycogène et  $4.6 \pm 2.6$  mM en présence de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'amylopectine (figure 19E).

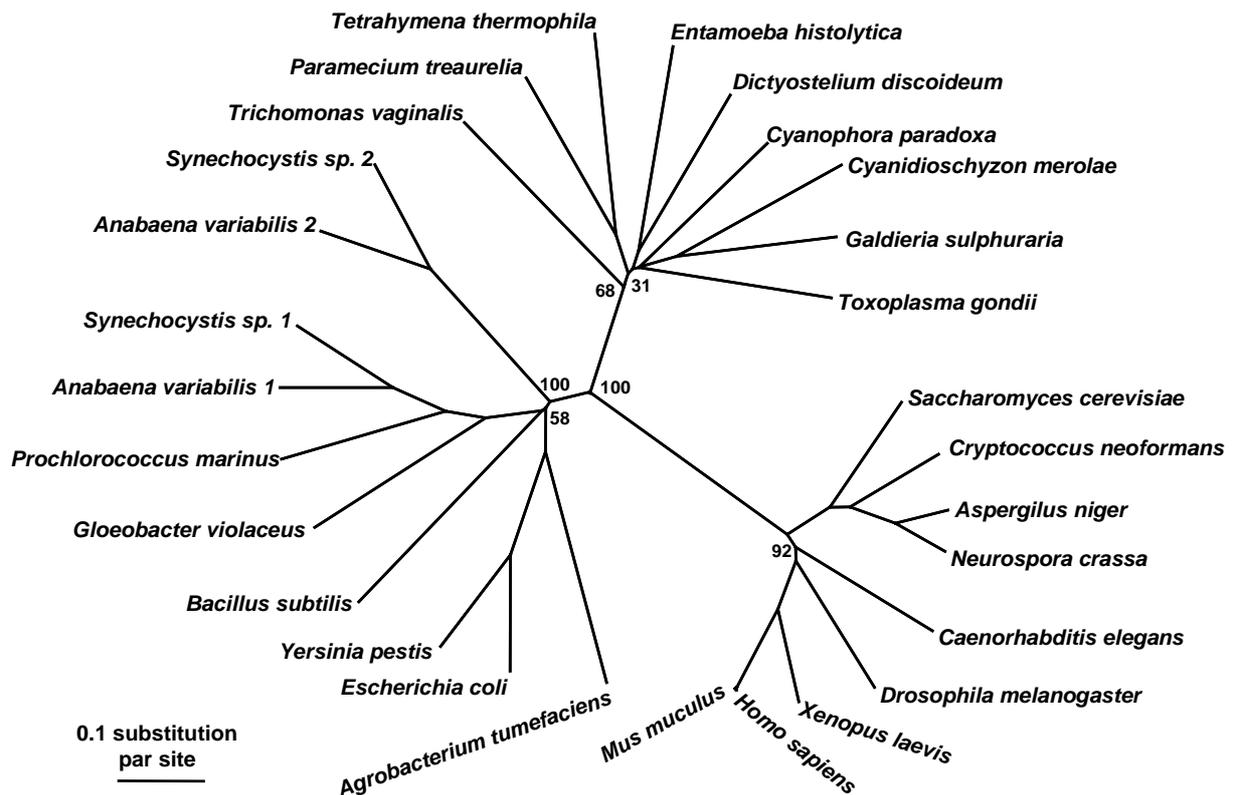
Nous avons alors cherché la présence d'un EST codant l'amidon synthétase soluble et nous avons trouvé une petite séquence qui a été utilisée pour cribler la banque d'ADNc et nous a permis d'obtenir un ADNc incomplet mais de 1669 pb. Cette séquence correspond au centre de la séquence des amidon-synthétases solubles de la famille des GT5 d'après la classification CAZY, cependant il nous manque l'extension N-terminale qui est variable tant chez les algues rouges que chez les algues et végétaux verts (numéro d'accèsion Genbank EU 165055, annexe 3). La construction d'un arbre phylogénétique incluant cette séquence, soutient clairement le groupement de cet ADNc avec ceux mis en évidence chez les rhodophycées et les alvéolés (figure 20). Après quelques essais infructueux, il ne nous a pas paru utile de poursuivre le clonage de l'extrémité N-terminale variable qui par définition ne porterait de toute manière pas une information phylogénétique exploitable.

- En conclusion, nous dirons que *Cyanophora paradoxa* contient au moins une amidon-synthétase soluble majeure de la famille des GT-5 utilisant l'UDP-glucose.



**Figure 19 : Caractérisation des activités amidon- synthétases solubles.**

A: Les protéines contenues dans l'extrait cytoplasmique ont été séparées par chromatographie échangeuse d'anions (MonoQ HR 5/5). L'analyse zymogramme effectuée sur chaque fraction (10 $\mu$ l) révèle la présence de deux pics d'activité amidon-synthétase. Les deux pics d'activités ont été soumis à une étape de purification supplémentaire par chromatographie de gel filtration avant de déterminer les paramètres cinétiques. 20 $\mu$ l d'amidon-synthétase semi-purifiée, pour le pic 1 (B et D) et le pic 2 (C et E), sont incubés avec différentes concentrations d'amylopectine ou de glycogène en présence de 16 mM d'UDP-glucose et de 2  $\mu$ M d'UDP[U-14C]Glc (B et C) ou avec différentes concentrations d'UDPglc en présence de 10 mg.mL<sup>-1</sup> de polysaccharide (amylopectine ou glycogène) (D et E). Les résultats sont exprimés en  $\mu$ mol de glucose incorporé par heure et par mg de protéine. Les facteurs de purification sont respectivement de 41,5 et de 8,1 pour le pic 1 et le pic 2.



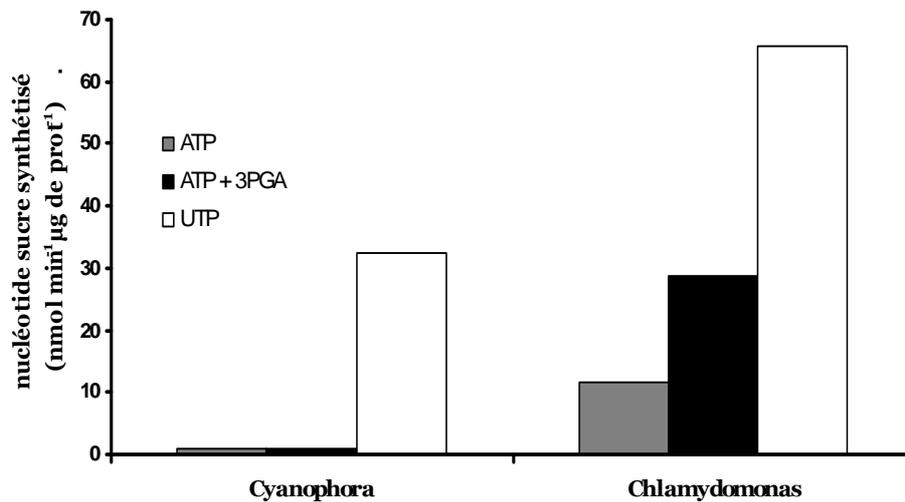
**Figure 20 : Arbre phylogénique dont la matrice des distances entre les glycogène-et amidon-synthétases a été générée par la méthode du Neighbor-joining.**

Les séquences d'acides aminés ont été alignées par ClustalW (Thompson et coll., 1994) et les zones vides d'alignement ont été manuellement retirées. Les arbres Neighbor-joining ont été calculés pour 10000 répétitions de bootstrap en utilisant Neighbor (programmes Phylip, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). L'arbre a été édité par Treeview (Roderic D. M. Page, Université de Glasgow, Ecosse, Royaume-Uni). Les nombres au niveau des noeuds représentent la valeur de bootstrap et la barre de légende montre l'unité de distance pour 0,1 substitution par site. Un arbre sans racine plus complet par la méthode du maximum de vraisemblance peut être trouvé dans Deschamps et coll. (2008 [A]).

## Etude de la présence d'une ADPglc pyrophosphorylase

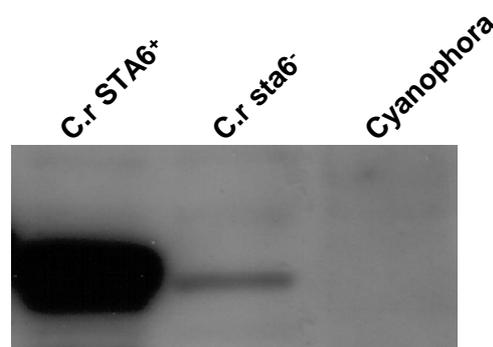
Nous avons effectué des dosages ADP/UDP-glucose pyrophosphorylase sur des extraits bruts de *Cyanophora paradoxa* (figure 21). Nous n'avons trouvé aucune preuve d'une telle activité enzymatique répondant à l'activation par le 3-PGA. De plus un anticorps dirigé contre la petite sous-unité de cette enzyme chez le maïs montre une réaction croisée évidente avec cette même enzyme trouvée chez *Chlamydomonas*. Cette réaction croisée disparaît dans les mutants *sta6* de *Chlamydomonas reinhardtii* qui ne possède plus la petite sous-unité correspondante. Nous avons été incapables de trouver une réaction croisée comparable avec des extraits de

Cyanophora suggérant ainsi l'absence de la protéine correspondante ou la présence d'une enzyme modifiée ne permettant pas de réaction croisée comme celle observée dans la lignée verte (figure 22). Enfin aucune séquence pouvant correspondre à cette enzyme n'a été trouvée dans les banques d'EST.



**Figure 21 : Dosage des activités ADP/UDP-glucose pyrophosphorylases**

Les activités ADPglc/UDPglc-pyrophosphorylases dans le sens synthèse sont dosées sur des extraits bruts en présence de glucose-1-phosphate radiomarqué. 40 µL d'extrait brut sont incubés dans 210 µL de tampon contenant 0,5 mM d'ATP (ou d'UTP pour doser l'activité UDP-glucose pyrophosphorylase) et 2 mM de glucose-1-phosphate et en présence ou en absence de 3PGA (2 mM). Les valeurs ont été ramenées en nmol de glucose incorporé par minutes et par mg de protéines.



**Figure 22 : Western blot effectué avec l'anticorps de lapin dirigé contre la petite sous unité de l'ADPglc-pyrophosphorylase de maïs.**

Un gel SDS-PAGE (10%) a été effectué sur 10 µg de protéines d'extraits bruts de *Chlamydomonas reinhardtii* sauvage (C.r STA6<sup>+</sup>) et du mutant dépourvu de la petite sous unité de l'ADPglc pyrophosphorylase (sta6<sup>-</sup>) et de *Cyanophora paradoxa*.

- En conclusion, aucune activité ADP-glucose pyrophosphorylase n'a pu être mise en évidence de manière convaincante chez *Cyanophora paradoxa*.

## **Etude des enzymes de débranchement**

Nous avons ensuite étudié l'existence d'amidon-hydrolases et nous avons trouvé par la méthode du zymogramme le set habituel de bandes observées sur gel contenant de l'amidon (figure 23A) à partir d'extraits bruts, et après semi purification (figure 23B). De plus nous avons cherché la présence de ces enzymes dans les cyanelles et n'avons trouvé aucune trace de telles activités. Finalement parmi les amidons hydrolases, nous avons mis en évidence, par des procédures classiques de zymogramme et de purification d'enzyme, l'existence d'une isoamylase (une enzyme de débranchement de l'amidon). Le travail effectué sur des mutants d'algues vertes et de plantes vasculaires suggère fortement que l'isoamylase soit impliqué dans la coupure des chaînes mal placées du précurseur d'amylopectine hydrophile pour produire la forme semi cristalline insoluble du polysaccharide (Ball et coll., 1996). Cette suggestion est soutenue par une richesse de données moléculaires et biochimiques obtenues chez les plantes et les algues vertes (Dauvillée et coll., 2001 (A) ; Dauvillée et coll., 2001 (B) ; Dauvillée et coll., 2000 ; James et coll., 1995 ; Mouille et coll., 1996 ; Nakamura et coll., 1997 ; Rahman et coll., 1998 ; Wattebled et coll., 2005).

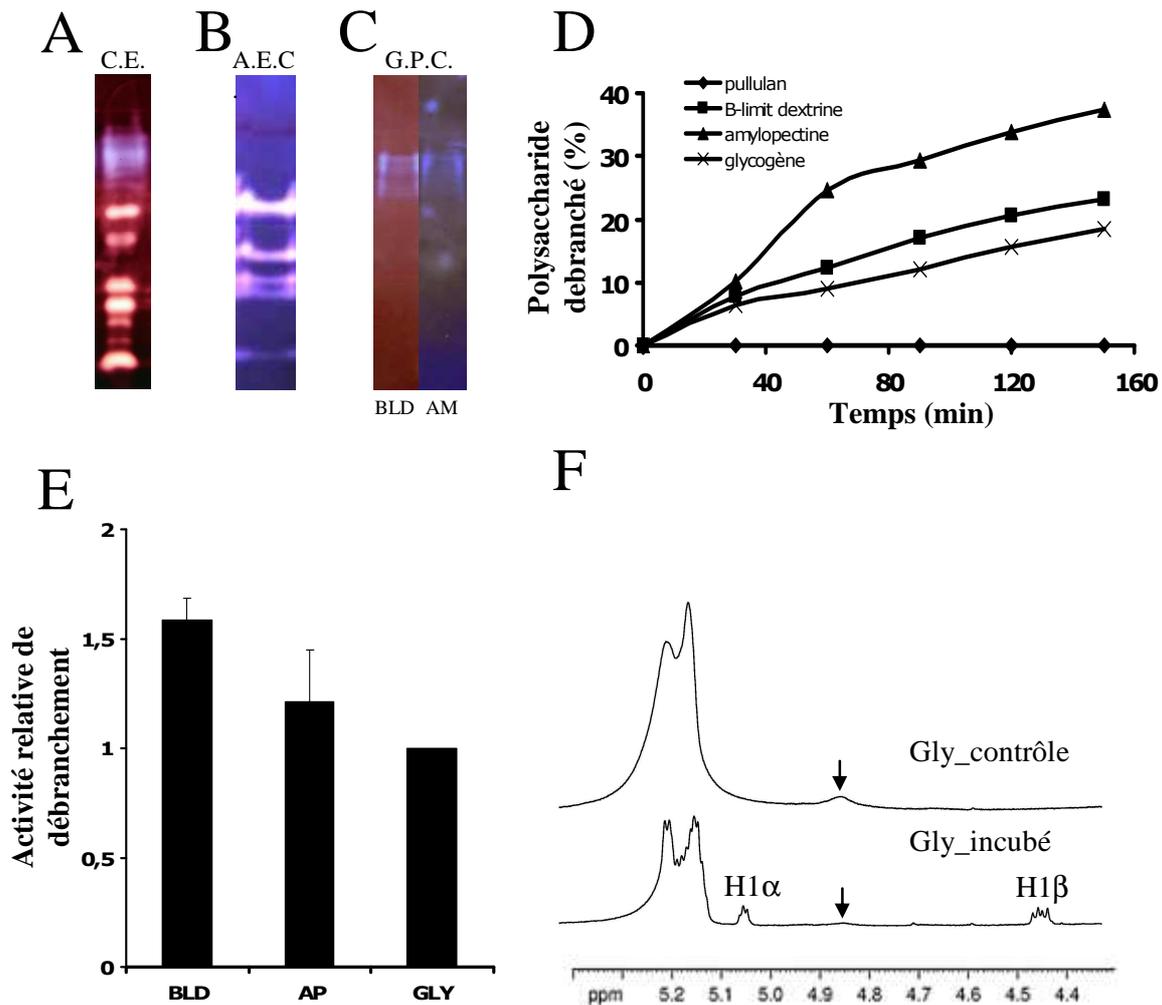
Nous avons cherché la présence d'isoamylase sur des gels incubés contenant de l'amylopectine ou de l'amidon en suivant un jeu de bandes migrant lentement et de couleur bleue après coloration à l'iode. Une bande colorée en bleue est indicative d'une enzyme de débranchement de type hydrolase digérant le polysaccharide pris au piège dans les gels. La coloration bleue est due au maintien des longs oligosaccharides débranchés diffusants lentement. Puisque ceci n'est qu'une indication de la présence d'enzyme de débranchement, nous avons purifié des extraits bruts (figure 23A) par chromatographie échangeuse d'anion (AEC) (figure 23B) suivi par une chromatographie de tamisage moléculaire jusqu'à ce que la fraction soupçonnée contenir l'enzyme de débranchement soit exempte de tous les autres types d'amidon hydrolases (amylases, enzymes de branchement, D-enzyme) (figure 23C). La spécificité de substrat de cette potentielle enzyme de débranchement a été

mesurée par des essais enzymatiques impliquant la production d'extrémités réductrices (figure 23D et 23E). La preuve définitive que la fraction semi purifiée contient seulement l'activité de l'enzyme de débranchement a été finalement obtenue par l'analyse par RMN du proton (figure 23F). Les signaux de 5.3 à 5.1 ppm et 4.85 ppm correspondent respectivement aux résonances des protons des atomes de carbone engagé dans les liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6. L'analyse RMN est exécutée à 70°C au lieu de 90°C. Le rendement est de ce fait sous estimé deux à trois fois lors de l'intégration des signaux révélant le nombre de points de branchement. Après l'incubation avec l'activité isoamylase, la résonance de protons des atomes de carbones des extrémités réductrices apparaissent comme deux signaux, à 5.05 ppm et à 4.45 ppm, correspondant respectivement à un  $\alpha$  ( $^1\text{H}\alpha$ ) et un  $\beta$  ( $^1\text{H}\beta$ ) anomères. Ceci est corrélé avec une diminution spectaculaire du signal à 4.85 ppm correspondant au  $^1\text{H}$  des atomes de carbone engagés dans les liaisons  $\alpha$ -1,6. Ces résultats indiquent clairement la présence dans *Cyanophora paradoxa* d'une activité isoamylase. Cette dernière fait d'ailleurs partie d'un complexe de haute masse (390 kDa) (figure 23C) dont la taille a pu être mesurée par GPC sur une colonne Superose 6. L'enzyme de Cyanophora est capable de débrancher le glycogène, l'amylopectine et les  $\beta$ -limites dextrines de l'amylopectine avec une efficacité comparable (figure 23D et 23E). Elle est cependant incapable de débrancher le pullulan à des taux significatif.

- En conclusion nous affirmons que *Cyanophora paradoxa* contient une enzyme de débranchement de type isoamylase assemblée en complexe de grande taille.

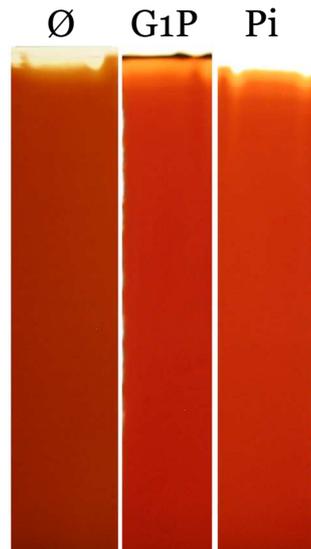
## **Etude des amidon-phosphorylases**

Les zymogrammes amidon-phosphorylases montrent des bandes d'activité qui entrent à peine dans les gels contenant des polysaccharides (figure 24). Nous avons suivi à la trace ces activités phosphorylase pendant notre semi purification et nous avons testé (les) l'enzyme(s) dans des fractions semi pures (sans activité amidon synthétase ou hydrolase visibles).



**Figure 23 : Caractérisation de l'activité de l'enzyme de débranchement chez *Cyanophora paradoxa*.**

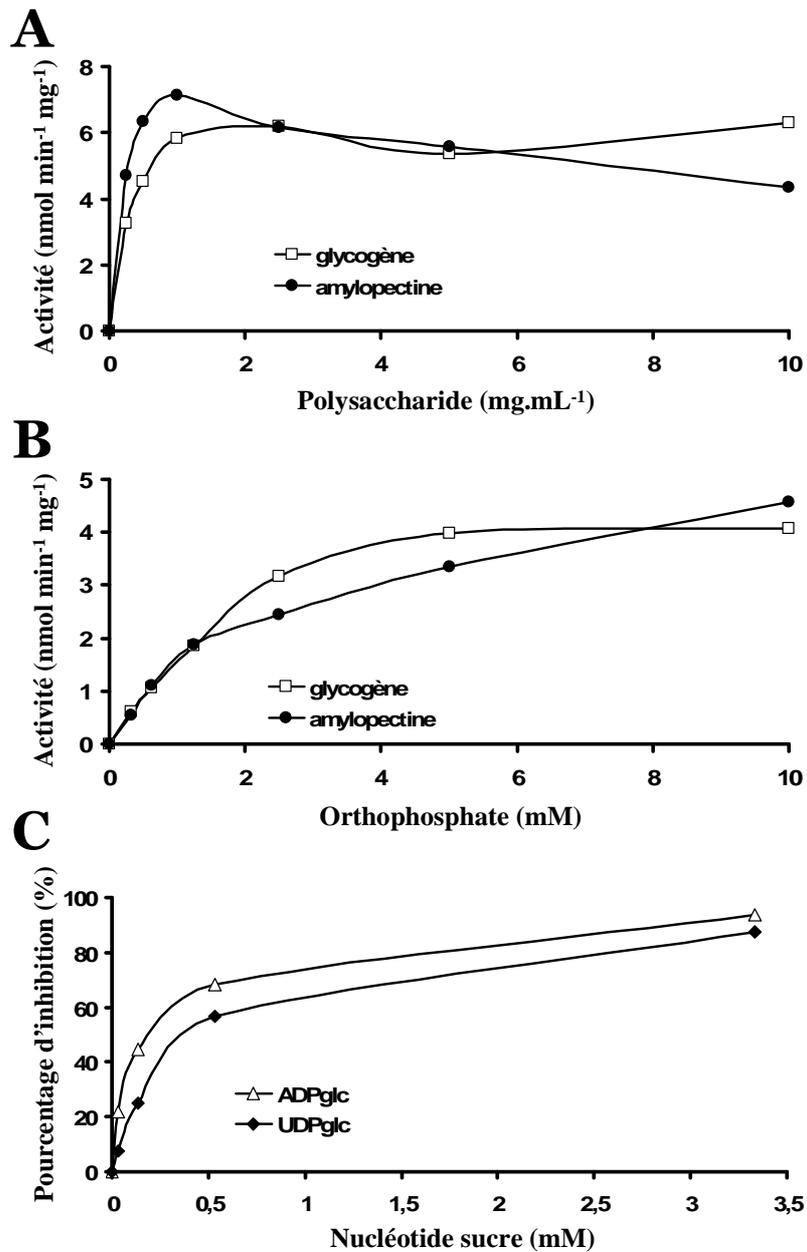
Les enzymes métabolisant l'amidon contenues dans l'extrait brut (A) ont été fractionnées par la chromatographie échangeuse d'anions (B) et par chromatographie de gel filtration (C). Les activités semi-purifiées sont séparées par gel PAGE non dénaturant et visualisées après leurs transferts sur gel  $\beta$ -Limite dextrine (BLD) (A), gel amidon (B) et gels BLD et amidon (C). Après coloration à l'iode, les gels contenant l'amidon et les BLD montrent une coloration de fond respectivement bleue (B et C) et pourpre (A et C). La taille de la bande bleue (C) a été estimée par chromatographie de tamisage moléculaire à environ 390 kDa. L'activité de débranchement de type isoamylase présente dans la fraction semi-purifiée (C) a été incubée en présence d'amylopectine (AP,  $\blacktriangle$ ), de BLD (BLD,  $\blacksquare$ ), de glycogène (GLY, x) et de pullulan (PUL,  $\blacklozenge$ ) (D). L'activité a été mesurée en suivant l'augmentation du nombre d'extrémités réductrices. Les résultats sont exprimés en pourcentage de polysaccharides débranchés. E : L'activité de débranchement relative de l'AP, des BLD et du GLY est déterminée vis-à-vis du GLY, qui a été arbitrairement choisi comme valeur de référence (mise à 1), après avoir pris en considération les différences de pourcentage de points de branchement de chaque polysaccharide. F : analyse RMN du glycogène de foie de lapin incubé ou non avec l'activité isoamylase. Le spectre  $^1\text{H}$  est réalisé dans du DMSO- $\text{D}_2\text{O}$  (80/20 [v/v]) à 70°C comme décrit dans Mouille et coll. (1996).



**Figure 24 : Zymogrammes permettant de visualiser des activités phosphorylases.**

3 fois 40  $\mu$ l d'extrait brut ont été déposés sur un gel contenant du glycogène. Après migration les différentes bandes ont été incubées dans un mix phosphorylase en présence ou non de glucose-1-phosphate (20 mM) et de phosphate inorganique (20 mM). Ø a été incubé sans substrat, G1P a été incubé avec le glucose-1-phosphate ce qui permet d'observer une activité de polymérisation (en haut du gel) et Pi a été incubé en présence de phosphate inorganique pour faire travailler la phosphorylase dans le sens dégradation.

La cinétique présentée dans la figure 25A démontre la présence d'activité amidon phosphorylase classique avec une haute affinité pour le glycogène (le  $K_m$  apparent :  $0.5 \pm 0.08$  mg.mL<sup>-1</sup>) et l'amylopectine ( $K_m$  apparent :  $0.65 \pm 0.05$  mg.mL<sup>-1</sup>). Cependant l'enzyme est clairement inhibée par de grandes concentrations en amylopectine comme substrat. La figure 25B montre une expérience similaire exécutée avec des concentrations croissantes en orthophosphate en présence de glycogène 10 mg.mL<sup>-1</sup> (le  $K_m$  apparent :  $2 \pm 0.8$  mM de Pi) ou d'amylopectine 10 mg.mL<sup>-1</sup> ( $K_m$  apparent :  $3 \pm 0.7$  mM de Pi). De façon intéressante, comme montré dans la figure 25C, cette activité est inhibée aussi bien par l'UDPglc ( $K_i$  :  $0.35 \pm 0.1$  mM) que par l'ADPglc ( $K_i$  :  $0.1 \pm 0.05$  mM) de façon semblable à ce qui a été observé chez les algues vertes (Dauvillée et coll., 2006 ; Nakamura et Imamura, 1983). Comme ce qui a été décrit pour d'autres phosphorylases, l'inhibition est compétitive en ce qui concerne l'orthophosphate.



**Figure 25 : Caractérisation de l'activité phosphorylase.**

L'activité phosphorylase a été mesurée dans le sens dégradation pour différentes concentrations de glycogène et d'amylopectine en présence de 10mM d'orthophosphate (A) mais aussi avec différentes concentrations d'orthophosphate en présence de 10mg.mL<sup>-1</sup> de polysaccharide (B). Le glucose-1-phosphate produit est mesuré à 365 nm. L'activité de la phosphorylase est exprimée en nanomoles de G1P produites par minute et par milligramme de protéines. Enfin l'inhibition de l'activité phosphorylase par les deux nucléotides sucres a été mesurée pour différentes concentrations de ces derniers (C).

La découverte d'un petit EST qui pourrait probablement coder l'amidon phosphorylase nous a permis d'obtenir une sonde pour cribler la banque d'ADNc et

ainsi d'obtenir la séquence complète de l'enzyme (Genbank EU165056, annexe 4). Une autre EST a été récemment observée dans les dernières ressources génomiques accessibles (Genbank EC661027) (O'Brien et coll., 2007). Celle-ci montre une séquence très clairement distincte de la première suggérant la présence de différentes sous unités de la phosphorylase ou de plusieurs enzymes. Les masses de plusieurs peptides produits par l'analyse de la protéine liée au grain d'amidon de 92 kDa (figure 13, page 70) correspondent à la séquence prédite par le codage de l'EST de cette seconde phosphorylase.

- En conclusion, *Cyanophora paradoxa* présente de multiples activités amidon-phosphorylases.

### **Conséquences des approches menées chez *Cyanophora paradoxa* sur notre connaissance du métabolisme des polysaccharides de réserve.**

La présence d'amidon corrèle avec l'endosymbiose plastidiale puisque ce polysaccharide n'a jamais été retrouvé à ce jour chez des clades eucaryotes qui ne soient directement (par endosymbiose primaire) ou indirectement (par endosymbiose secondaire) dérivés de cet évènement désormais considéré comme unique. Les études menées par notre laboratoire (Coppin et coll., 2005) et celui de Patrick Keeling (Patron et Keeling, 2005) montrent que les enzymes du réseau métabolique des polysaccharides de réserves ont une origine commune se ramenant soit au partenaire eucaryote de l'endosymbiose soit à la cyanobactérie ancêtre du plaste. Cette mosaïque phylogénique indique que les deux partenaires de l'endosymbiose avaient la capacité de synthétiser des  $\alpha$ -1,4 glucanes des réserves ramifiés en  $\alpha$ -1,6. La découverte récente par notre laboratoire de polymères de type amidon chez les cyanobactéries du sous-groupe V plaide pour l'existence de polysaccharides cristallins chez l'ancêtre du plaste alors que le partenaire eucaryote hôte synthétisait probablement du glycogène. Puisqu'aucune évidence de transferts latéraux autres que ceux que l'on peut attribuer à l'endosymbiose ne semble contaminer ce réseau métabolique, il devient légitime de tenter de reconstruire l'état

du métabolisme des polysaccharides de réserves dans l'ancêtre commun du « règne » végétal. Cette reconstruction est basée sur l'inventaire du nombre minimal de gènes pouvant expliquer la distribution présente des enzymes dans les trois lignées issues directement de l'endosymbiose. Ceci requiert une bonne connaissance des voies métaboliques utilisées dans les trois lignées. Notre travail définit la première caractérisation sérieuse de la voie de synthèse d'amidon chez les glaucophytes et constitue donc une étape importante en ce sens. La nature et l'origine phylogénique des différentes enzymes impliquées sont illustrées dans la figure 26.

Notre travail a mis en évidence chez le glaucophyte *Cyanophora paradoxa* un amidon typique, semblable à celui observé chez les Chloroplastida et les Rhodophyceae. Ce polysaccharide de réserve est synthétisé à partir d'UDPglc comme dans la lignée rouge et nous avons également lors de nos travaux réussi à cloner l'ADNc complet de la GBSS, d'une phosphorylase, et une partie de l'ADNc de l'amidon-synthétase soluble (annexes 1, 4 et 3). Cette étude prend d'autant plus d'importance que les glaucophytes auraient divergé les premiers après l'endosymbiose et semblent définir des organismes peu évolués.

Dans notre laboratoire, Philippe Deschamps a utilisé les séquences obtenues chez *Cyanophora*, les a intégrées dans une étude phylogénétique détaillée (2008A) et a pu attribuer l'origine des différentes enzymes aux deux partenaires endosymbiotiques (figure 26) (un alignement de séquence des trois ADNc obtenus avec les gènes correspondant chez d'autres organismes modèles sont présentés en annexe 5, 6 et 7). Ainsi les phosphorylases tout comme les enzymes de branchement ont une origine eucaryote unique et commune aux 3 lignées issues de l'endosymbiose (voir Deschamps et coll., 2008). De plus l'amidon-synthétase cloné chez *Cyanophora paradoxa* est une amidon-synthétase soluble UDPglc dépendante et elle est apparentée à celle des Rhodophyceae, des amibes, des ciliés et des trichomonades (figure 20 page 78). Cette synthétase est donc différente de celles des algues vertes et plantes terrestres même si une origine commune à ces enzymes avait été supposée au départ par Patron et Keeling, toutes deux faisant partie de la famille des GT5 (Deschamps et coll., 2008A). De fait cette synthétase définit très certainement la glycogène synthétase de l'hôte eucaryote avant l'endosymbiose.

<b>Cyanobactéries</b> <i>C. watsonii</i>	<b>Glaucophytes</b> <i>C. paradoxa</i>	<b>Lignée verte</b> <i>O. tauri</i>	<b>Lignée rouge</b> <b>Set minimum</b>	<b>Eucaryotes</b> <i>E. histolytica</i>	<b>Ancêtre commun</b> <b>Set minimum</b>
ADPG PPIase (1)	?	ADPG PPIase (2)	-	-	ADPG PPIase (1)
ADPG SS (2)	?	ADPG SS (5)	-	-	ADPG SS (2)
-	UDPG SS (1)	-	UDPG SS (1)	UDPG SS (1)	UDPG SS (1)
GBSS (1)	GBSS(1)	GBSS(1)	(GBSS(1))	-	GBSS (1)
BE (3)	BE (1)	BE (2)	BE (1)	BE (1)	BE (1)
Pho (2)	Pho (2)	Pho (2)	Pho (1)	Pho (2)	Pho (1)
Iso (1)	Iso (1)	Iso (3)	Iso (1)	-	Iso (1)
-	?	-	Indirect DBE (1)	Indirect DBE (1)	Indirect DBE (1)
D-enz (1)	?	D-enz (1)	D-enz(1)	-	D-enz(1)
-	?	$\beta$ -Amy (2)	$\beta$ -Amy (1)	$\beta$ -Amy (4)	$\beta$ -Amy (1)
-	?	GWD (4)	GWD (1)	-	GWD (1)

**Figure 26 : Sets d'enzymes impliquées dans le métabolisme des polysaccharides de réserve.**

Le nombre d'isoformes trouvées pour chaque enzyme du métabolisme du glycogène/amidon a été listé. En utilisant la phylogénie, nous pouvons déterminer l'origine de chaque isoforme dans les lignées rouge et verte à l'exception des GWD. Les enzymes d'origine phylogénique cyanobactérienne sont de couleur bleue, celles d'origine eucaryotique sont de couleur orange et celles d'origine incertaine sont noires. Les différents eucaryotes photosynthétiques issus de l'endosymbiose présentent un set d'enzymes hautement conservé. Nous avons choisi *Crocospaera watsonii*, *Entamoeba histolytica* et *Ostreococcus tauri* comme génomes modèles pour les cyanobactéries, les eucaryotes hétérotrophiques et les plantes vertes. Les informations concernant les Rhodophytes ont été compilées à partir des génomes disponibles. Les informations concernant les glaucophytes proviennent de ce travail et l'absence du génome séquencé de *Cyanophora paradoxa* nous empêche de nous prononcer clairement sur l'existence de quelques enzymes (ce qui est symbolisé par un point d'interrogation) ou sur l'origine de l'isoamylase.

ADPG PPIase : ADPglc pyrophosphorylase ; ADPG SS : synthétase soluble ADPglc dépendante ; UDPG SS : synthétase soluble UDPglc dépendante ; GBSS : synthétase liée au grain d'amidon ; BE : enzyme de branchement ; Pho : phosphorylase ; Iso : isoamylase ; Indirect DBE : enzyme de débranchement indirecte ; D-enz : enzyme disproportionnante ;  $\beta$ -Amy :  $\beta$ -amylase ; GWD : glucan water dikinase.

Enfin la séquence de la GBSS suggère une origine cyanobactérienne de cette enzyme. Cette dernière a été très récemment confirmée par la découverte d'une GBSS chez deux souches différentes de cyanobactéries du sous-groupe V (Deschamps et coll. 2008A). Sa localisation dans le cytosol de la cellule implique un transfert du gène du procaryote capturé vers le noyau de la cellule hôte, suivie par son expression au niveau du cytosol. Sa présence et son maintien dans les trois lignées issues de l'endosymbiose supposent l'existence immédiate d'une fonction. Or l'enzyme cyanobactérienne est incapable d'utiliser même avec inefficacité l'UDP-glucose. Ceci suggère que l'ADP-glucose était initialement présent dans le cytosol. L'enzyme bactérienne a donc pu utiliser ce substrat et subséquemment accumuler les mutations lui permettant également d'utiliser l'UDP-glucose.

La figure 26 nous montre que l'ancêtre commun du règne végétal contenait un set complet de gènes du métabolisme du glycogène eucaryote (à l'exception de l'enzyme de débranchement indirect qui n'a pas été maintenu) et un set incomplet de gènes du métabolisme des polysaccharides de réserves des cyanobactéries puisqu'aucune des trois lignées ne contient d'enzymes de branchement ou de phosphorylases d'origine procaryote. Il est donc logique de penser que ces gènes perdus l'ont été à un stade très précoce de l'endosymbiose avant même l'émergence des trois lignées d'Archaeplastida. Pour peu que ces pertes aient précédé l'acquisition d'un système d'adressage de protéines cela reviendrait à dire que le plaste ne contenait plus d'amidon et que les polysaccharides de réserves étaient uniquement présents dans le cytosol. En effet la présence des enzymes de branchement est indispensable à la synthèse de ces polysaccharides alors que des mutants de levure dépourvus d'enzyme de débranchement indirect restent capables d'accumuler du glycogène et de métaboliser ses chaînes externes. Cette hypothèse est considérablement confortée par un faisceau d'autres arguments. En effet l'amidon cytosolique est retrouvé dans deux lignées sur les trois issues de l'endosymbiose. De plus l'ensemble des bactéries endosymbiotiques rapportées (plus d'une dizaine aujourd'hui) montre la perte précoce des gènes du métabolisme des polysaccharides de réserve de l'endosymbiote. Bernard Henrissat (2002) a par ailleurs montré une corrélation nette entre la perte de ce métabolisme et le degré de parasitisme des bactéries. Les endosymbiotes étant des parasites intracellulaires obligatoires cette corrélation prévoit la perte de ces gènes par l'endosymbiote. Enfin aucun organisme actuel connu n'accumulant des polysaccharides de réserves importants et

comparables dans deux compartiments cellulaires distinct, nous ne pensons pas que l'amidon et le glycogène puissent avoir été maintenus même transitoirement respectivement dans le plaste et le cytosol de l'ancêtre commun. Nous aboutissons par conséquent à la compartimentation illustrée dans la figure 27. Le maintien dans le plaste de l'ADP-glucose pyrophosphorylase se justifie par le fait que cette enzyme est en prise directe sur le cycle de calvin et la charge énergétique du plaste par l'entremise de substrats (G1P et ATP) et effecteurs allostériques (3PGA et Pi). Ce maintien requiert l'existence d'un translocateur de nucléotide sucre dont la fonction serait de permettre l'exportation de l'ADP-glucose vers le cytosol. La réalité de ce transporteur ancestral à l'origine entièrement hypothétique s'est vue considérablement renforcée très récemment. La voie métabolique illustrée dans la figure montre que le transporteur de nucléotide sucre définit la voie d'exportation principale du carbone photosynthétique après endosymbiose. Or une analyse phylogénétique récente des TPT (translocateurs de triose -P) et des translocateurs d'hexoses du plaste montre que l'origine phylogénétique de ces transporteurs de carbone chez les algues vertes et rouges est unique et se ramène à un ancêtre commun. Il nous semble très encourageant de noter que les protéines les plus proches de cet ancêtre commun constituent la famille des NST qui ne sont rien d'autre que des transporteurs de nucléotide-sucres !

On voit donc que l'étude du métabolisme de l'amidon chez les glaucophytes fait partie d'une histoire beaucoup plus étendue susceptible d'aboutir à la connaissance des mécanisme métaboliques précis ayant permis l'endosymbiose du plaste. La description que nous en avons faite reste parcellaire et ne pourra être complétée que par l'acquisition de la séquence complète du génome de *Cyanophora paradoxa*. Il sera plus qu'intéressant de savoir si cet organisme contient d'autres traces de la voie ancestrale décrite figure 27.

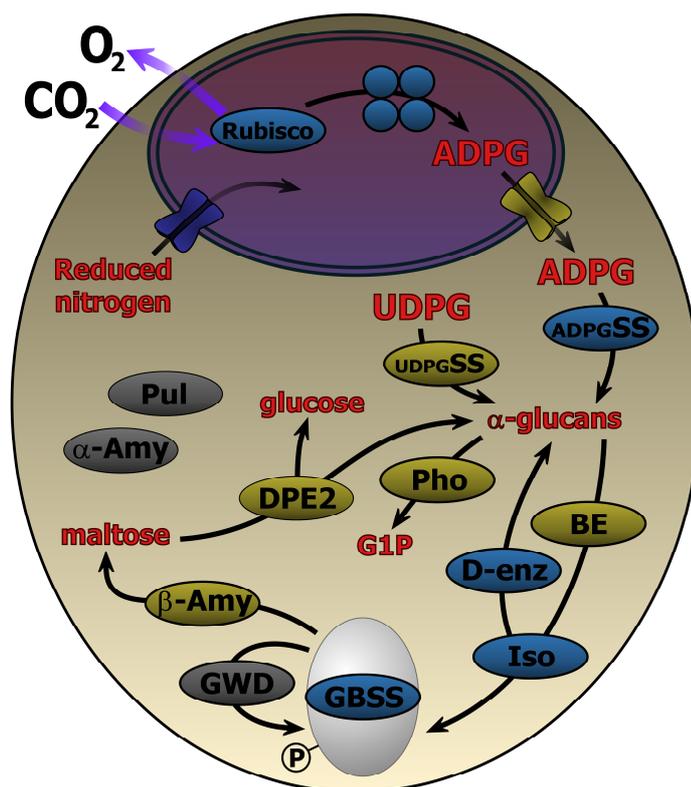


Figure 27 : Compartimentation hypothétique des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon chez l'ancêtre commun aux Archaeplastida.

## Discussion

Notre caractérisation des amidons-synthétases solubles de *Cyanophora paradoxa* montre clairement que ces activités sont capables d'allonger des glucanes en utilisant l'UDP-glucose comme substrat. Cependant, ces enzymes sont incapables d'utiliser l'ADP-glucose à des taux significatifs.

L'existence unique d'une voie de métabolisme de l'amidon basée sur l'UDPglc fut de nouveau vérifiée en testant la présence d'activité ADP-glucose pyrophosphorylase ainsi que celle de la protéine. Aucune activité enzymatique répondant à l'activation par le 3-PGA ainsi qu'aucune réaction croisée lors du Western blot n'ont été observées pour l'ADPglc pyrophosphorylase chez *Cyanophora* ce qui suggère l'absence de cette protéine, ou la présence d'une protéine modifiée.

Seule la disponibilité prochaine du génome de *Cyanophora* dont le séquençage est en cours pourra confirmer ou non cette conclusion.

Nous avons cloné une séquence codant une protéine qui présente une forte ressemblance avec les séquences d'amidon-synthétases solubles identifiées chez les algues rouges cyanidiales et les alvéolés, y compris chez les ciliés stockant du glycogène et chez les apicomplexes stockant de l'amylopectine. De façon intéressante, les alvéolés semblent également provenir d'algues rouges par un événement d'endosymbiose secondaire (pour une revue générale voir Bhattacharya et coll., 2004). La spécificité de substrat qui est la même que celle décrite pour la glycogène-synthétase des eucaryotes hétérotrophes, argumente en faveur d'une origine eucaryote du gène de cette enzyme. Cependant, l'arbre phylogénétique produit dans ce travail distingue clairement les enzymes des glaucophytes, des rhodophycées et des alvéolés, de celles de champignons et des animaux. En effet, selon la classification CAZY, ces dernières appartiennent à une famille de glycosyltransférases (la famille GT3) distinctes de celles incluant la glycogène-synthétase des bactéries et l'amidon-synthétase des plantes vertes (la famille GT5). Les transférases des rhodophycées et des glaucophytes décrites ici sont toutes les deux des enzymes de type GT5 et présentent donc plus de ressemblances avec les glycogène-synthétases bactériennes et les amidon-synthétases des plantes vertes qu'avec les glycogène-synthétases des champignons et des animaux. De façon intéressante, tant *Dictyostelium discoideum* qu'*Entamoeba histolytica* et que le parabasalide, *Trichomonas vaginalis* montrent un type d'enzymes semblables, soutenant que ces gènes ont une origine eucaryote (voir Deschamps et coll., 2008 [A]). Plusieurs amidon-synthétases solubles distinctes ont été mises en évidence lors de notre étude de purification. Actuellement nous ne savons pas si ces activités reflètent des états régulés de la même enzyme ou si elles sont codées par des protéines distinctes.

Une autre découverte importante annoncée dans ce travail consiste en la caractérisation de la GBSS d'un glaucophyte, responsable de la synthèse d'amylose. Cette enzyme pourrait utiliser aussi bien l'ADP-glucose que l'UDP-glucose mais avec une activité spécifique mesurée pour l'UDPglc 6 fois plus grande. La sélectivité ambiguë de la GBSSI pour l'ADPglc et l'UDPglc est un trait commun aux gènes des GBSSI actuellement rapportées. En effet l'enzyme de maïs a été initialement détectée pour son activité UDP-glucose dépendante (Leloir et coll., 1961)) tandis que l'ADP-

glucose comme substrat préféré fut reconnu peu de temps après (Recondo et Leloir, 1961). De même dans le laboratoire nous avons récemment caractérisé la GBSSI du cryptophyte *Guillardia theta* qui avait montré uniquement une préférence légère pour l'UDPglc (Deschamps et coll., 2006). La raison de la faible sélectivité de la GBSS comparée à celle de l'amidon-synthétase soluble est discutée dans Deschamps et Coll. (2008 [A]).

La caractérisation cinétique des enzymes tant solubles que liées au grain montre que les deux activités présentent des propriétés comparables envers l'UDP-glucose. Ceci distingue les glaucophytes de leurs parents chloroplastida. Chez les algues vertes et les plantes terrestres, l'affinité de l'enzyme soluble pour l'ADPglc est quatre à dix fois plus haute que celle de l'activité liée au grain (Ball et coll., 1998). Quand le stock d'ADPglc dans la cellule est limité, la synthèse d'amylopectine est relativement favorisée par rapport à celle de l'amylose. Ceci explique pourquoi les mutants en partie défectueux pour la synthèse de l'ADPglc montrent un enrichissement relatif significatif en amylopectine par rapport à l'amylose (van den Koornhuysse et coll., 1996). Dans *Chlamydomonas*, les cultures fournissant des niveaux normaux de substances nutritives contiennent peu d'amylose (< 5 %) tandis que les cultures faiblement nutritives accumulent entre 10 à 25 % de cette fraction dans l'amidon (Libessart et coll., 1995). Dans *Cyanophora paradoxa*, la quantité relative d'amylose reste toujours à un très haut niveau (entre 30 à 60 %) ce qui est atteint uniquement chez quelques mutants de plantes. De plus ce haut niveau n'est pas significativement affecté par la concentration en substances nutritives. Le taux d'amylose est trois à six fois plus haut que ceux annoncés pour les algues vertes et les plantes. Nous croyons que ceci pourrait être dû uniquement à l'affinité comparable qu'ont les amidon-synthétases solubles et liées au grain pour l'UDPglc. En effet la quantité de protéine dans le grain et l'activité spécifique de l'enzyme sont significativement inférieures à celles mesurées chez *Chlamydomonas* et ne peuvent donc pas expliquer le contenu en amylose.

La découverte que nous apportons sur la GBSSI des glaucophytes reflète la description qui a été récemment faite pour les rhodophytes (Shimonaga et coll., 2007). La GBSSI est ainsi retrouvée dans les trois lignées que définissent actuellement les Archaeplastida, et était très probablement présente dans l'ancêtre de toutes les plantes. Ceci a des implications importantes en ce qui concerne notre

compréhension de l'évolution du métabolisme du polysaccharide de réserve. Il a été précédemment démontré que la GBSSI nécessite la présence d'un grain d'amidon semi cristallin préformé pour être normalement active (Dauvillée et coll., 1999). Cela suggère également que l'ancêtre de toutes les plantes ait synthétisé une telle structure probablement dans son cytoplasme. Un emplacement cytoplasmique ancestral pour la synthèse de l'amidon est suggéré par la découverte d'une telle compartimentation du polysaccharide de réserve chez les rhodophytes et les glaucophytes. Bien que certaines phylogénies de gènes nucléaires n'aient pas été capables de résoudre l'ordre de divergence des trois lignées d'archaeplastida, des phylogénies plus récentes de gènes nucléaires et de plastes indiquent que les glaucophytes ont divergés les premiers après l'ancêtre commun (Reyes-Prieto et Bhattacharya, 2007 ; Rodriguez-Ezpeleta et coll., 2005). De plus une étude récente concernant l'émergence des protéines LHC (light-harvesting complex) peut être expliquée uniquement avec un ordre de divergence similaire (Koziol et coll., 2007). L'hypothèse d'une localisation cytoplasmique de la synthèse de l'amidon dans l'ancêtre commun de toutes les plantes semble ainsi plus probable.

Il doit être souligné que la phylogénie de toutes les séquences obtenues dans ce travail ou dans l'analyse bioinformatique (voir Deschamps et coll., 2008 [A]) des ressources génomiques croissantes de *C. paradoxa* sont en accord complet avec une origine monophylétique des plantes. Une grande pertinence est observée pour les séquences d'enzymes des phosphorylases qui chez les algues rouges comme chez les vertes montrent une origine eucaryote commune.

Toutes les découvertes annoncées dans ce travail soutiennent l'existence d'une voie basée sur l'UDP-glucose pour la synthèse de l'amidon chez les glaucophytes, très semblable à celle proposée pour les rhodophytes. Nous ne pouvons cependant pas exclure l'existence de formes mineures d'amidon-synthétases solubles capables d'utiliser l'ADP-glucose et qui seraient phylogénétiquement liées aux enzymes chloroplastidiales ou cyanobactériennes, particulièrement quand on pense à la sensibilité excessive que montre la phosphorylase de *C. paradoxa* lors de l'inhibition par l'ADP-glucose. Une conclusion négative définitive pourra être atteinte lorsque le génome complet de *C. paradoxa* sera disponible. Enfin nous annonçons la découverte d'un complexe isoamylasique multimérique dans le cytoplasme de *Cyanophora paradoxa*, l'isoamylase étant suggérée comme impliquée dans la

maturation et l'accumulation de l'amylopectine des grains semi cristallins (Ball et coll., 1996). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'organisation de l'isoamylase en grand complexe hétéromultimérique a été démontrée comme nécessaire pour le bon fonctionnement de cette enzyme dans la synthèse de l'amylopectine (Dauvillée et coll., 2001 A ; Dauvillée et coll., 2001 B). La présence d'une isoamylase de grande taille dans le cytoplasme de *Cyanophora paradoxa* définit le premier témoignage d'une telle enzyme dans des eucaryotes non verts. La présence de cette activité, dont les gènes sont clairement de phylogénie cyanobactérienne, corrèle avec la présence d'amidon chez *C. paradoxa*. Bien que nous ayons identifié cette activité uniquement par la voie biochimique, l'existence de gènes, chez les Rhodophyceae, présentant de fortes homologues avec l'isoamylase des plantes renforce la corrélation entre la présence d'amidon et celle de l'isoamylase. À son tour, cette corrélation appuie la fonction essentielle suggérée pour l'isoamylase dans la biogenèse et l'accumulation du grain d'amidon (Ball et coll., 1996).

**PARTIE 2 : ETUDE PRELIMINAIRE DU  
METABOLISME DE L'AMIDON CHEZ  
L'ALGUE ROUGE MULTICELLULAIRE  
CHONDRUS CRISPUS.**

## Introduction

Le métabolisme de l'amidon est retrouvé chez la plupart des organismes photosynthétiques issus d'un évènement d'endosymbiose unique qui aurait eu lieu il y a environ 1,56 milliards d'années (Yoon et coll., 2004). De cet évènement sont apparues 3 grandes lignées photosynthétiques : les Chloroplastida, les Rhodophyceae et les Glaucophyta. Le métabolisme de l'amidon est relativement bien caractérisé chez les Chloroplastida (lignée verte) (passé en revue dans Ball et Morell, 2003 ; James et coll., 2003 ; Lu et Sharkey, 2006 ; Tetlow et coll., 2004 ; Zeeman et coll., 2007). Dans la première partie de notre mémoire nous avons rassemblés des éléments relatifs au métabolisme des polysaccharides de réserve chez les glaucophytes et plus particulièrement chez *Cyanophora paradoxa* (Plancke et coll., 2008). Pour ce qui est des Rhodophyceae plusieurs études ont porté sur des clades dérivés d'algues rouges par endosymbiose secondaire notamment sur la dinoflagellée hétérotrophe *Cryptothecodinium cohnii* (Deschamps et coll., 2008 B), sur le Cryptophyte *Guillardia theta* (Deschamps et coll., 2006 ; Haferkamp et coll., 2006) et sur le parasite apicomplexa *Toxoplasma gondii* (Coppin et coll., 2005). Il ne faut toutefois pas oublier que dans ces cas, l'endosymbiose secondaire n'a pas impliqué que le partenaire Rhodophyceae mais aussi un hôte hétérotrophe eucaryote de nature inconnue qui lui aussi a pu transférer ses gènes du métabolisme des polysaccharides de réserves compliquant de ce fait les interprétations. La connaissance du métabolisme des polysaccharides de réserves chez les Rhodophyceae proprement dites se limite aux seules études bioinformatiques menées chez les cyanidiales (Coppin et coll., 2005 ; Barbier et coll., 2005) et également à une série d'études diverses très préliminaires (pour revue voir Viola et coll., 2001) dont la plus étayée a été menée chez *Gracilaria tenuistipitata* (Nyvall et coll., 1999). Ces études ont permis de suggérer la voie UDPglc comme voie de synthèse de l'amidon floridéen. Comme nous l'avons souligné auparavant, les cyanidiales constituent un échantillon peu représentatif de la diversité des Rhodophyceae. Les génomes types sont probablement très évolués dans le sens de la compaction et de l'adaptation aux milieux extrêmes et à l'hétérotrophie (surtout pour *Galderia*). Des évènements de pertes de gènes et de transferts latéraux non représentatifs des Rhodophyceae au sens

large se sont probablement produits. Deschamps et coll. (2008 A et C) ont supposé que l'ancêtre commun des Archaeplastida renfermait une ADP-glucose pyrophosphorylase plastidiale et synthétisait de l'amidon dans le cytoplasme à partir d'ADP-glucose et d'UDP-glucose. Deschamps et coll. ont proposé que le rapatriement du métabolisme de l'amidon dans le plaste chez les Chloroplastida s'est réalisé par étapes impliquant d'abord la synthèse de maltooligosaccharides, ensuite de glycogène et enfin d'amidon. Ce n'est que consécutivement à cette dernière phase d'évolution du glycogène en amidon plastidial dans la lignée verte que le pool de polysaccharides cytosoliques (l'amidon floridéen) aurait été perdu. Mon laboratoire d'accueil s'intéresse à retrouver dans la biodiversité des algues actuelles des témoins de ce processus évolutif. Il semble bien que les algues Florideophycidae en particulier puissent définir de tels intermédiaires. En effet une ADP-glucose pyrophosphorylase activable par le 3-PGA a été rapportée par Sesma et Iglesias chez *Gracilaria* (1998). De plus la purification d'une glucane lyase chez les gracilaires et la localisation de cette dernière dans le rhodoplaste (Yu et coll., 1993) pose le problème de l'existence d'un pool de malto-oligosaccharides dans le plaste des Florideophycidae. En effet il n'y a à priori pas d'autres substrats possibles pour cette enzyme. La présence de malto-oligosaccharides plastidiaux pose en retour la question de leur synthèse. Cette dernière s'accorderait particulièrement bien de la présence d'ADP-glucose pyrophosphorylase et d'amidon synthétase utilisant ce substrat dans le plaste. Les gènes codant de tels enzymes devraient pouvoir être identifiés dans la séquence complète du génome d'une Florideophycidae telle que *Chondrus crispus*. Nous avons donc entrepris l'étude du métabolisme de l'amidon chez l'algue rouge multicellulaire *Chondrus crispus*, dont la séquence du génome devrait être bientôt disponible et devrait ainsi permettre de compléter les informations obtenues par la voie expérimentale.

# Matériel et méthodes

## Produits

Les produits sont décrits dans la première partie à l'exception du  $\alpha$ -D-[ $^{14}\text{C}$ (U)]-glucose-1-phosphate (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) et du Miracloth (Calbiochem, filiale de Merck, Darmstadt, Germany).

## Souche et condition de culture

Les expériences ont été réalisées sur des gamétophytes et des sporophytes sauvages de *Chondrus crispus* récoltés sur l'estran de Roscoff, et nettoyés avec de l'eau de mer stérilisée avant d'être rincés à l'eau milliQ, séchés et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Extraction d'amidon et production d'extrait bruts

Les algues sont broyées à froid dans l'azote liquide, manuellement au mortier et pilon ou mécaniquement au mixeur, en fonction de la quantité de matériel (au mixeur à partir de 100 grammes de poids frais).

Pour l'extraction d'amidon, le broyat est repris dans son propre volume de tampon d'extraction (50 mM HEPES/KOH pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,05% Triton X 100, 2 mM benzamidine, 2 mM  $\epsilon$ -amminocaproic acid, 0,5 mM PMSF, 5 mM DTT ou DTE), filtré sur deux couches de Miracloth et centrifugé 10 minutes à 4 000 rpm. Le culot est repris dans 10ml de percoll 90% et centrifugé 30 minutes à 10 000g. Le culot est repris dans le tampon d'extraction afin de le laver.

Pour la production d'extraits bruts, le broyat est repris dans un volume équivalent de tampon A (50 mM Tris/HCl pH 9,5 ; 10 mM DTT) contenant en plus 0,5 M KCl et du cocktail d'inhibiteur de protéase (1% v/v) (SIGMA) et agité doucement pendant une heure à  $4^{\circ}\text{C}$ , avant d'être centrifugé 10 minutes à 4000 rpm et filtré sur papier Whatman. L'extrait brut est conservé à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Afin de pouvoir commencer une semi-purification des enzymes, 55 mL d'extraits bruts ont été dessalés sur colonnes PD-10 pré-équilibrés dans le tampon A. 75 mL d'extraits dessalés sont déposés sur la colonne AEC (HiTrapQ FF [5 mL]) pré-équilibrée également dans le tampon A. Les protéines sont éluées à 5 mL par minutes avec un gradient linéaire de 0 à 0,5 M NaCl dans du tampon A contenant 1 M NaCl. Les activités enzymatiques sont suivies par dosage radioactif.

### **Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique, extraction et visualisation des protéines liées au grain.**

Les méthodes utilisées pour ces étapes sont les mêmes que celles décrites dans le matériel et méthode de la partie 1.

### **Dosage des activités ADP- et UDP-glucose pyrophosphorylases dans le sens synthèse**

Ces enzymes sont dosées par leur capacité à catalyser la formation d'ADP-glucose ou d'UDP-glucose à partir de glucose-1-phosphate (G1P) et respectivement d'ATP ou d'UTP.

A 20 µL d'extraits bruts, ou de fractions issues de la colonne échangeuse d'anions, sont ajoutés 200 µL de mélange réactionnel de la composition suivante : Hepes/KOH pH 8 100 mM, BSA 250 µg/mL, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP ou UTP 1,75 mM, G1P froid 0,45 mM, C<sup>14</sup> G1P 0,05 mM, pyrophosphatase inorganique 1,5 unités par mL, préalablement préchauffé à 37°C. La réaction est menée 20 minutes à 37°C puis arrêtée par chauffage 1 minute à 100°C. 20 µL de phosphatase alcaline d'*E. coli* (Sigma) diluée au 10ème sont ajoutés afin d'hydrolyser le G1P non utilisé. La réaction se fait à température ambiante pendant 1 heure, puis les échantillons sont déposés sur Filtre DE81 (Whatman), rincés 5 fois avec 20 mL d'eau puis séchés. L'activité est mesurée au compteur à scintillation.

### **Dosage des activités synthétases**

Les activités amidon-synthétases sont mesurées dans le sens synthèse. Les essais standards ont été effectués pendant 15 minutes à 30°C avec 20 µL d'extrait brut

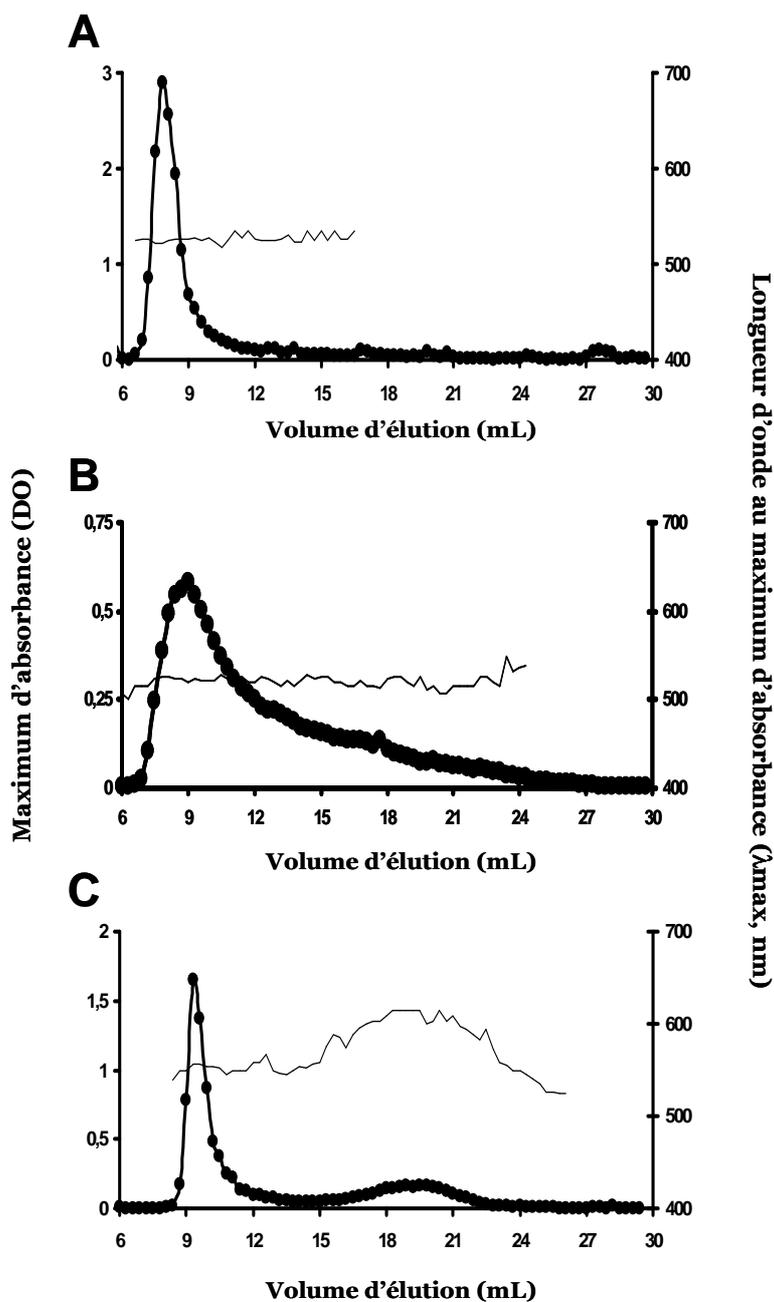
ou de fractions semi-purifiées, et 80 µl de mélange réactionnel contenant Bicine/KOH (50 mM ; pH 8), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 mM), β-mercaptoéthanol (5 mM), sérum albumine bovine (BSA) (0,5 mg par mL), glycogène (10 mg par mL), UDP-glc (2 mM), et UDP-[U-<sup>14</sup>C]Glc (2 µM). A la fin de l'incubation, le glycogène est précipité avec 1 mL de méthanol/KCl (75% v/v ; 1% p/v), incubé 10 minutes à -20°C, et collecté par centrifugation (3 000g, 5 minutes, 4°C). Le culot est resuspendu dans 0,2 mL d'eau distillé ; les précipitation, centrifugation et resuspension sont répétées deux fois supplémentaires avant que le culot ne soit repris dans 0,2 mL d'eau distillée et mélangé à 2,5 mL de liquide de scintillation. La radioactivité incorporée est déterminée par le comptage du liquide de scintillation.

## Résultats

### Caractérisation des grains d'amidon de *Chondrus crispus*

L'amidon a été obtenu à partir d'algues de *Chondrus crispus* par sédimentation et purification par gradient de densité. Il est intéressant de noter que les gamétophytes produisent environ 6 fois moins d'amidon que les sporophytes (respectivement 35 mg contre 217 mg pour 200 grammes d'algues broyées de manière identique au niveau mécanique et au niveau du temps). Le polysaccharide obtenu chez les deux différents stades de vie du Rhodophyceae a été dissout, et les fractions polysaccharidiques ont été séparées par chromatographie de tamisage moléculaire. Les résultats montrés dans la figure 28A et 28B démontrent que ce matériel ne contient que des fractions polysaccharidiques de haute masse semblables à l'amylopectine de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (figure 28C) qui nous sert de modèle pour la lignée verte. Cependant au niveau de l'amidon des sporophytes on observe un élargissement important de la base du pic vers les basses masses. La présence de ces chaînes doit résulter d'une dégradation de l'amylopectine ou d'une structure en formation (figure 28B). En effet aucune modification de la longueur d'onde n'est observée au niveau des plus basses masses, donc le degré de branchement des chaînes et la structure du polysaccharide sont typiques de l'amylopectine. Une étude de la distribution en longueur de chaînes du pic d'amylopectine et des chaînes sortant plus tardivement lors de la chromatographie de tamisage moléculaire ont été entreprises mais les résultats ne sont pas encore disponibles.

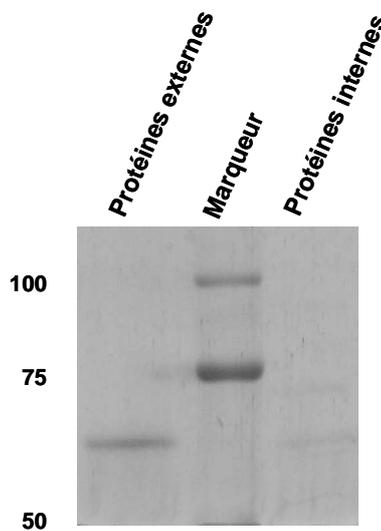
La présence uniquement d'amylopectine est typique de l'amidon floridéen tel qu'il avait été historiquement décrit par Meuse et coll. en 1960. Viola et coll. (2001) présente également l'amidon floridéen comme un polymère plus proche de l'amylopectine que du glycogène, avec des caractéristiques structurales similaires. L'amylose a cependant été observé chez des algues rouges unicellulaires et chez des dérivés d'algues rouges par endosymbiose secondaire (McCracken et coll., 1981 ; Coppin et coll., 2005 ; Deschamps et coll., 2006 ; Deschamps et coll., 2008B).



**Figure 28 : Analyse de la structure de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique.**

Les fractions constitutives du grain d'amidon ont été séparées par GPC (voir matériel et méthode). Les glucanes de chaque fraction ont été détectés par interaction avec l'iode. L'axe des abscisses représente le volume d'élution de la colonne correspondant à chaque fraction. L'axe des ordonnées gauche mesure le maximum absorbance du complexe d'iode-polysaccharide (—●—) tandis que l'axe des ordonnées droite représente la longueur d'ondes au maximum absorbance ( $\square_{max}$  (exprimée en nm) : \_\_\_). Les chromatographies ont été réalisées sur de l'amidon de gamétophytes (A) et de sporophytes (B) de *Chondrus crispus* et sur l'amidon de *Chlamydomonas reinhardtii* (C).

L'absence d'amylose dans le grain d'amidon de *Chondrus* s'expliquerait par l'absence de GBSS à l'intérieur du grain d'amidon. L'étude des protéines liées au grain n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'une telle protéine à l'intérieur du grain (figure 29). Cependant une protéine se trouvant à la surface du grain présente une taille de 69kDa ce qui est assez proche de celles des GBSS. Nous avons donc entrepris une identification des peptides de cette protéine après digestion trypsique par MALDI-TOF et MS-MS. Nous n'avons pas encore pu obtenir ces résultats. Ceux-ci pourront par la suite également être complétés par un dosage de l'activité GBSS sur les grains d'amidon.



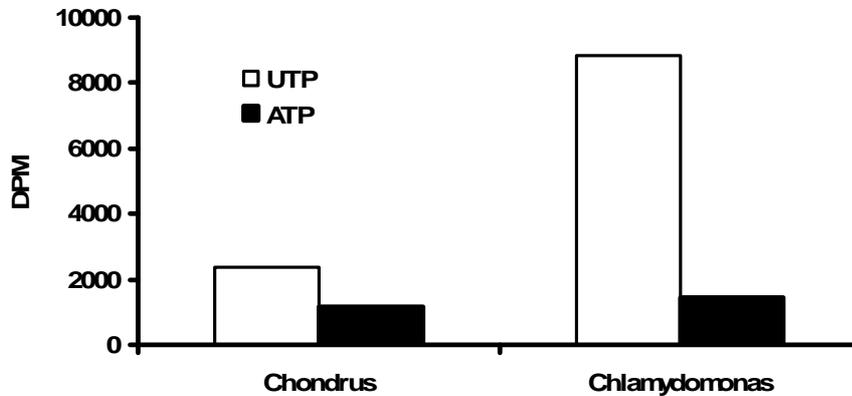
**Figure 29 : Visualisation des protéines liées au grain d'amidon de *Chondrus crispus*.**

Les protéines du grain ont été extraites dans du SDS à 37°C 30 minutes pour les protéines externes et à 95°C 5 minutes pour les protéines internes après élution des protéines externes. Les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Une protéine majeure de 69kDa est observée à la surface du grain.

### **Etude des activités NDPglc pyrophosphorylases.**

Les activités ADPglc et UDPglc pyrophosphorylases ont été dosées sur des extraits bruts de *Chondrus* ou après une première étape de purification. Les expériences n'ont pas été réalisées suffisamment de fois pour avoir des résultats concrets cependant il semble y avoir deux activités pyrophosphorylases : une ADPglc et une UDPglc. L'activité ADPglc pyrophosphorylase est moins importante que celle

UDPglc PPase, comme ce qui est observé chez l'algue verte modèle *Chlamydomonas reinhardtii* (figure 30).

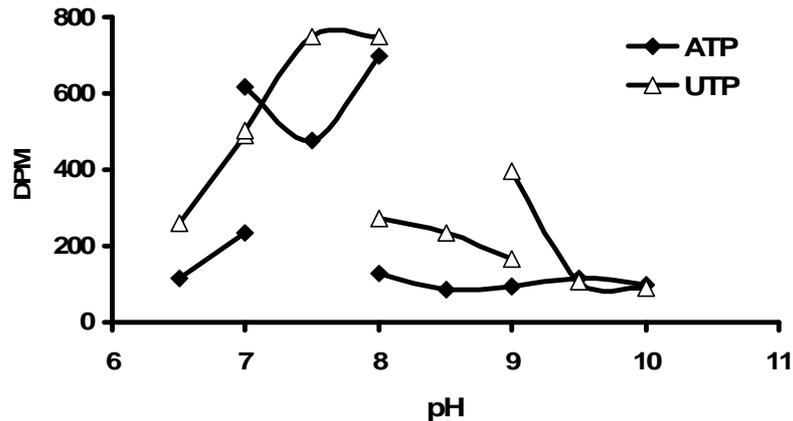


**Figure 30 : Dosage des activités ADPglc et UDPglc pyrophosphorylases sur des extraits bruts de *Chondrus crispus* et de *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Les activités ADPglc/UDPglc-pyrophosphorylases sont dosées dans le sens synthèse sur des extraits bruts en présence de glucose-1-phosphate radiomarqué. 20  $\mu$ L d'extrait brut sont incubés avec 200  $\mu$ L de tampon contenant 1,75 mM d'ATP (noir) ou d'UTP (blanc) et 0,5 mM de glucose-1-phosphate. Les valeurs sont données en DPM.

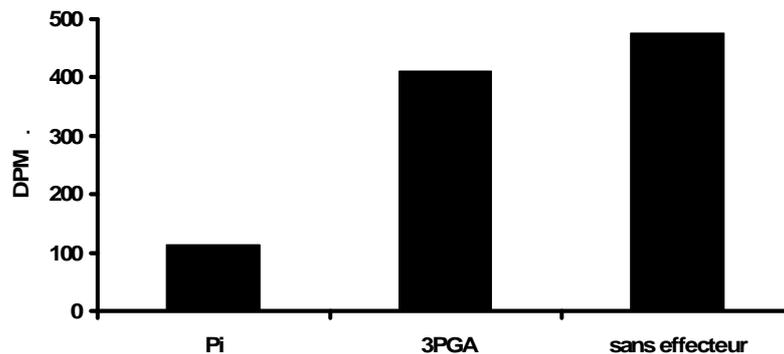
Les déterminations de pH optimum en présence d'ATP et d'UTP ont été effectuées sur extraits bruts et pour les deux activités les pH optimum obtenus sont respectivement de 8 et entre 7,5 et 8 (figure 31).

Les dosages d'activité ADPglc PPase ont également été effectués en présence de différents effecteurs (figure 32). Aucune activation par le 3PGA n'a pu être mise en évidence (dosages effectués une fois sur extrait brut et une fois sur les fractions obtenues après chromatographie échangeuse d'anions HiTrapQ FF). Pour l'inhibition par le phosphate inorganique, le dosage effectué sur extrait brut présente une inhibition par le Pi, mais celle-ci n'a pas été observée lors du dosage sur les différentes fractions issues de la chromatographie (AEC). Cette inhibition par le phosphate inorganique est donc à vérifier.



**Figure 31 : Détermination du pH optimum des activités ADPglc et UDPglc pyrophosphorylases.**

20  $\mu$ L d'extrait brut sont incubés 20 minutes à 37°C avec 200  $\mu$ L de tampon en présence d'ATP ou d'UTP et à différents pH. Le pH est indiqué par l'axe des abscisses. Les tampons utilisés sont MOPS (pH 6.5, 7), HEPES/NaOH (pH 7, 7.5, 8), Tris/HCl (pH 8, 8.5, 9) et CHES (pH 9, 9.5, 10). Les dosages sont indiqués en DPM.



**Figure 32 : Dosage d'activité ADPglc pyrophosphorylase en présence d'effecteurs.**

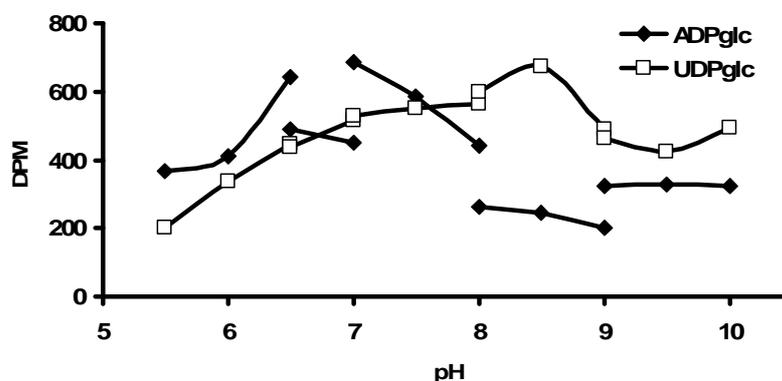
20  $\mu$ L d'extrait brut ont été incubés dans 200  $\mu$ L de tampon sans effecteur et en présence de 10 mM de phosphate inorganique (Pi) ou de 3PGA (3 phosphoglycérate). Les résultats sont exprimés en DPM.

## Etude des activités amidon-synthétases solubles

Les activités amidon-synthétase solubles ADPglc et UDPglc dépendantes ont également été dosées sur des extraits bruts de Chondrus ou après une première étape de purification. Nous n'avons pas réussi à adapter la méthode des zymogrammes aux extraits de Chondrus donc les activités sont toujours détectées par dosages radioactifs

dans le sens synthèse. Comme précédemment les expériences n'ont pas été réalisées un nombre de fois suffisant pour avoir des résultats clairs cependant il semble y avoir deux activités synthétases solubles : une ADPglc et une UDPglc dépendante.

Les dosages effectués sur extrait brut et sur les fractions montrent deux activités synthétase solubles. Le pH optimum pour chaque activité a été mesuré sur extrait brut, et les deux activités présentent des pH optimum différents de 7 et de 8.5, respectivement pour l'activité ADPglc dépendante et UDPglc dépendante (figure 33).



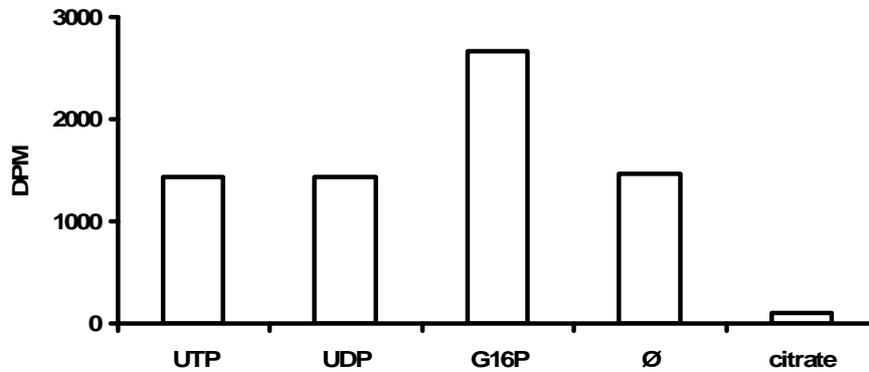
**Figure 33 : Détermination du pH optimum des activités synthétases solubles ADPglc et UDPglc dépendantes.**

20  $\mu$ L d'extraits bruts sont incubés avec 80  $\mu$ L de mélange réactionnel contenant de l'ADPglc ( $\blacklozenge$ ) ou de l'UDPglc ( $\square$ ) et dont le pH, indiqué sur l'axe des abscisses, est réalisé à partir des tampons suivants : MES/HCl (pH 5.5, 6, 6.5), Bis Tris/HCl (pH 6.5, 7), HEPES/NaOH (pH 7, 7.5, 8), Bicine/KOH (pH 8, 8.5, 9), CHES/NaOH (pH 9, 9.5, 10).

Des dosages en présence d'effecteurs (G16P, UTP, UDP, citrate) ont été réalisés pour l'activité amidon-synthétase soluble UDPglc dépendante. Cette activité semble être activée par le G16P, insensible à la présence d'UTP et d'UDP, et inactivé par le citrate (figure 34).

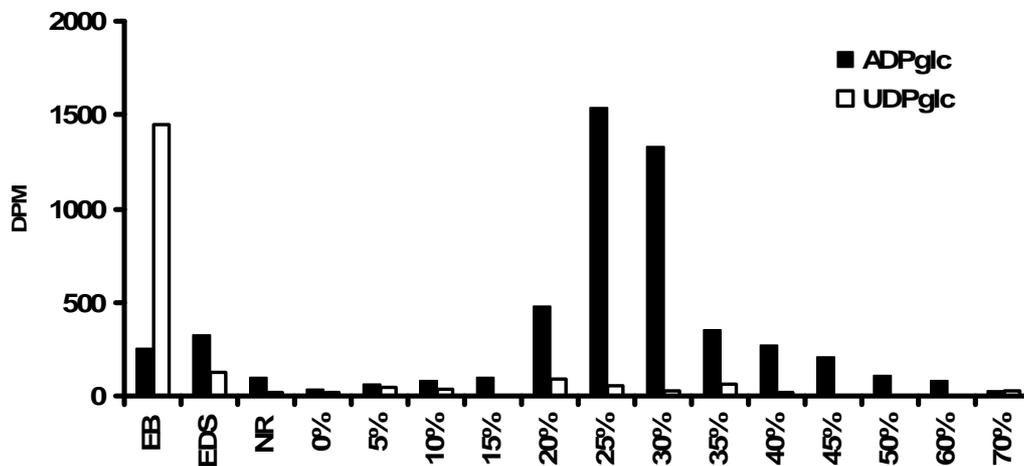
Enfin les activités synthétases solubles UDPglc et ADPglc dépendantes semblent provenir de deux protéines ou complexes différents. En effet l'activité UDPglc dépendante n'est pas retrouvée dans les fractions après la colonne de chromatographie d'échange d'anions alors que l'activité ADPglc dépendante a été retenue et présente un profil d'éluion classique (figure 35). Le fait que l'amidon-synthétase soluble UDPglc dépendante ne soit pas détecté après la colonne est

surprenant, soit la protéine ou le complexe n'ont pas été retenus ou élués, soit ils ont été déstabilisés et ont perdu l'activité synthétase UDPglc dépendante.



**Figure 34 : Dosage d'activité amidon-synthétase soluble UDPglc dépendante en présence d'effecteurs.**

20  $\mu$ L d'extrait brut sont incubés avec 80  $\mu$ L de mélange réactionnel contenant 2 mM d'UTP, d'UDP ou de G16P, aucun effecteur ( $\emptyset$ ), ou 500 mM de citrate de sodium. Les résultats sont exprimés en DPM.



**Figure 35 : Dosage d'activité amidon-synthétase soluble ADPglc ou UDPglc dépendante.**

20  $\mu$ L d'extrait brut (EB), d'extrait dessalé (EDS), d'extrait non retenu sur la AEC (NR) ou de fractions éluées de la colonne échangeuse d'anions grâce à un gradient de NaCl (exprimé en pourcentage de NaCl 1M) sont incubées 15 minutes à 30°C dans un mélange réactionnel contenant de l'ADPglc ou de l'UDPglc radiomarqués. Les tampons utilisés sont ici la Bicine/KOH pH8,5 avec l'UDPglc et l'HEPES/NaOH pH 7 avec l'ADPglc. Les résultats sont exprimés en DPM.

## Discussion

Cette étude sur le métabolisme de l'amidon chez le Rhodophyceae *Chondrus crispus* reste à un état très préliminaire. Il ne nous est pas possible pour l'instant d'en tirer de véritables conclusions. Contrairement à *Guillardia theta* où notre laboratoire a pu effectuer une première caractérisation satisfaisante en un semestre, notre étude a immédiatement buté sur des problèmes de préparation d'extraits bruts et de concentration en protéines

Néanmoins, lors des dosages d'activités nous avons pu détecter des activités ADP et UDP-glucose pyrophosphorylase ainsi que des amidon-synthétases utilisant l'ADPG ou (et) l'UDPG.

Pour l'activité ADPglc pyrophosphorylase, l'activation par le 3PGA et l'inhibition par le Pi sont caractéristiques des ADPglc pyrophosphorylases de la lignée verte (et donc eucaryotes) et des cyanobactéries. L'absence d'activation par le 3PGA et l'inhibition par le Pi incertaine (à confirmer) semblent plus représentatifs des activités ADPglc pyrophosphorylases de bactéries mais cette absence peut aussi résulter d'une déstabilisation de l'enzyme. Rappelons toutefois que l'activité détectée par Sesma et Iglesias (1998) chez la gracilaire restait activable par le 3-PGA. L'arrivée prochaine de la séquence du génome de *Chondrus crispus* ainsi que des expériences complémentaires sur des algues produites en milieu stérile devrait valider ou invalider l'existence d'une telle enzyme chez cette algue rouge.

En ce qui concerne les activités amidon-synthétases solubles, la différence de comportement des deux activités (ADPglc et UDPglc dépendantes) semble favoriser l'existence de deux protéines ou complexes différents, à la présence d'une protéine unique sachant utiliser les deux nucléotide-sucres (comme observé classiquement pour les amidon-synthétases liées au grain). De la même façon que décrit précédemment l'existence d'une activité synthétase soluble contaminante, provenant de bactéries, ne peut pas être exclue. Ici encore l'arrivée du génome devrait pouvoir nous éclairer, et des expériences sur des algues de culture (ne provenant pas du milieu naturel) devront compléter cette étude. Une caractérisation cinétique des deux activités purifiées ou semi-purifiées (c'est-à-dire sans activité de dégradation dans la même fraction) devra également être effectuée.

Enfin l'étude structurale des grains d'amidon doit être complétée. L'amidon de *Chondrus* semble assez proche de l'amidon floridéen tel qu'il a été peint à ses débuts, c'est-à-dire un amidon cytosolique composé uniquement d'amylopectine. Cependant la chromatographie de tamisage moléculaire réalisée sur l'amidon des sporophytes montre un profil un peu particulier de l'amylopectine avec un pic présentant une base très large du côté des plus basses masses moléculaires. Cependant pour ces chaînes de plus faible poids moléculaire la longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe iode-polysaccharide reste toujours au alentour de 520 nm ce qui est typique d'une structure d'amylopectine. Nous avons donc entrepris de déterminer la distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine pour la fraction de haute masse, et pour cette traîne présente derrière le pic. La présence de ces chaînes de plus basses masses peut-être expliquée par la présence de produits de dégradation de l'amylopectine ou au contraire par la formation de nouvelles structures. De telles structures ont été observées chez *Chlamydomonas* pour un double mutant dépourvu d'activité GBSS et SSIII (Maddelein et coll., 1994). Dans ce cas aucune enzyme d'élongation ne pouvait se substituer à la fonction de ces deux enzymes pour la synthèse des plus longues chaînes regroupant les grappes de l'amylopectine. Dans ces circonstances les molécules d'amylopectine forment un continuum de haute et basse masse du au caractère limitant des chaînes responsables de l'assemblage des grappes entre elles. Il est bon de rappeler que l'amylopectine de ce double mutant avait une longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe polysaccharide iode (environ 520 nm) semblable à celle de *Chondrus* et très différente de celle qui caractérise une amylopectine « normale » (540 à 560 nm). La présence de la GBSS n'a justement pas encore été démontrée chez *Chondrus crispus*. Il nous faut toutefois rester prudents puisqu'une protéine de taille compatible avec la présence de cette enzyme est en cours de caractérisation par spectrométrie de masse (des fragments tryptiques). La cristallinité du grain doit également être effectuée par diffraction au rayon X grands angles afin de confirmer la structure semi-cristalline et de voir le type (A ou B) de cristallinité de notre amylopectine.

Le travail préliminaire rapporté dans cette thèse nous donne des pistes intéressantes mais requiert un approfondissement considérable. Ce dernier ne pourra être mené utilement et efficacement que s'il est appuyé au préalable de l'analyse du génome nous confortant ou non dans la purification de certaines activités qui ne sont pour l'instant qu'hypothétiques.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Dans cette thèse nous proposons d'utiliser *Cyanophora paradoxa* comme modèle d'étude du métabolisme de l'amidon chez les Glaucophyta afin de mettre en évidence la voie métabolique utilisée par ces organismes, ainsi qu'une étude du métabolisme chez le Rhodophyceae *Chondrus crispus* dans le but d'enrichir les informations présentes dans la littérature sur le métabolisme de l'amidon dans cette seconde lignée.

Chez *C. paradoxa* notre travail de thèse a mis en évidence l'utilisation de la voie basée sur l'UDPglc pour la synthèse de l'amidon floridéen chez cet organisme. Ce choix métabolique est observé à différentes étapes de la synthèse de l'amidon : au niveau des pyrophosphorylases et des amidon-synthétases solubles. En effet aucune ADPglc pyrophosphorylase n'a pu être mise en évidence à ce jour que ce soit au niveau des dosages d'activités ou de la mise en évidence de la protéine par Western Blot. En ce qui concerne les amidon-synthétases solubles, celles-ci ne semblent pas capables d'utiliser l'ADPglc comme nucléotide sucre donneur.

Cependant une certaine ambiguïté persiste, en effet la GBSS est capable d'utiliser les deux nucléotides sucres comme substrat et nous ne pouvons exclure l'existence de formes mineures d'amidon-synthétases solubles capables d'utiliser l'ADPglc, particulièrement quand on pense à la très grande sensibilité que montre la phosphorylase de *Cyanophora* à l'inhibition par l'ADPglc. De même l'existence d'une ADPglc pyrophosphorylase ne peut pas être totalement exclue. En effet cette activité chez *Cyanophora* serait susceptible d'afficher une sensibilité aux effecteurs allostériques bien différente de celles qui caractérisent les cyanobactéries et les Chloroplastida, compliquant de ce fait sa détection. Une conclusion négative définitive pourra seulement être obtenue lorsque la séquence du génome sera disponible.

Lors de notre étude chez *Cyanophora paradoxa*, nous avons également découvert dans le cytoplasme de celle-ci la présence d'un complexe isoamylasique multimérique. La présence d'un tel complexe dans le cytoplasme de *Cyanophora* est le premier rapport d'activité d'une telle enzyme chez des eucaryotes n'appartenant pas aux Chloroplastida. La présence de cette protéine chez les Glaucophyta et l'existence de gènes présentant de fortes homologies avec l'isoamylase des plantes chez les Rhodophyceae renforcent la fonction essentielle suggérée pour l'isoamylase

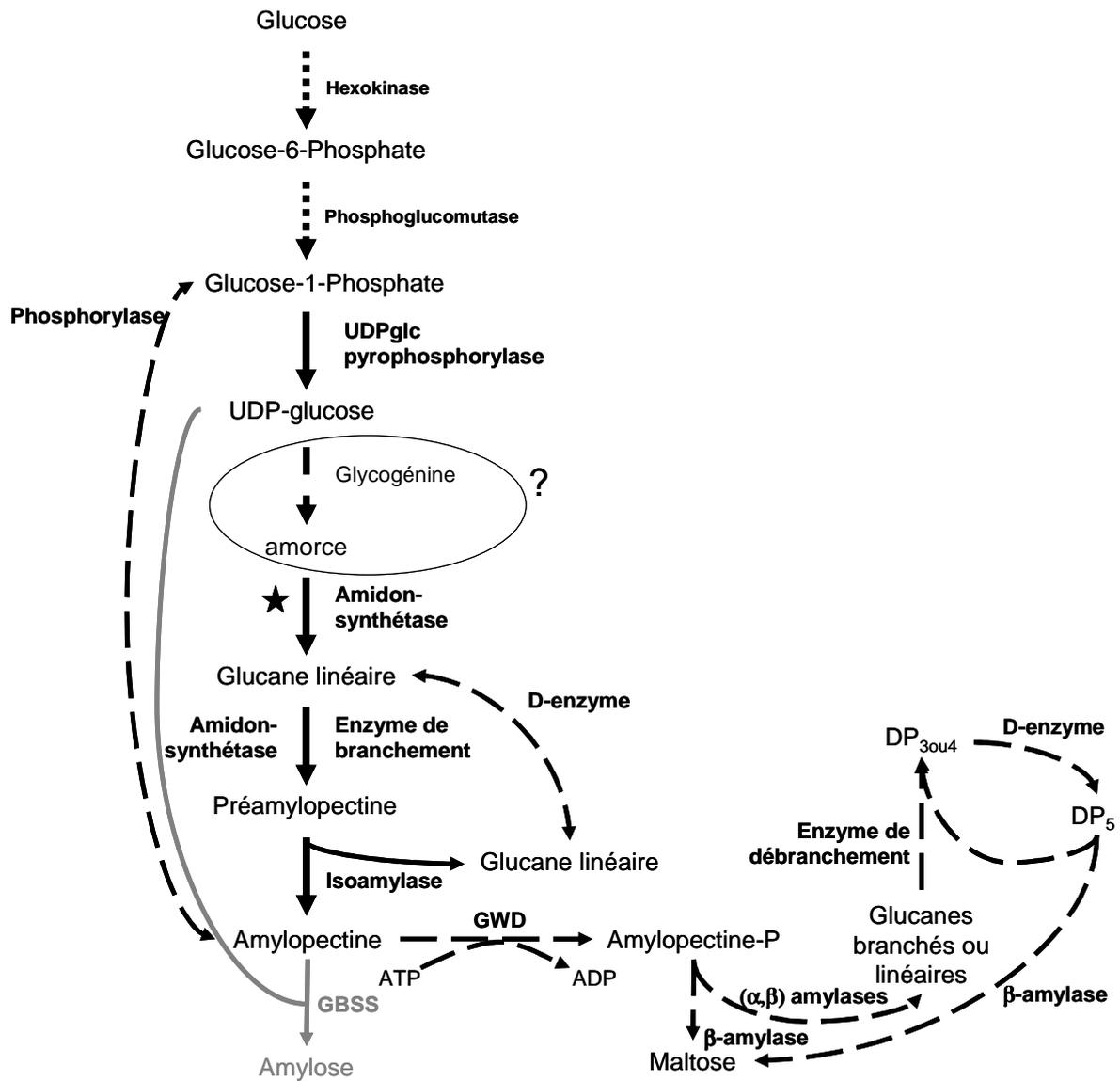
dans la cristallisation de la molécule d'amylopectine et par là même dans la synthèse du grain d'amidon (Ball et coll., 1996).

Chez *Chondrus* les premières expériences n'ont pas permis de favoriser une voie plutôt que l'autre. Les deux types d'activités d'élongation requérant d'une part l'ADP-glc et d'autre part l'UDP-glc ont été mises en évidence. Si ce résultat venait à être confirmé il revêterait une importance considérable pour notre compréhension de l'évolution de ce métabolisme. Soulignons cependant que ces observations ont été réalisées, sur des extraits bruts ou très partiellement purifiés, à partir d'algues récoltées dans leur environnement naturel et qui sont susceptibles d'héberger des organismes « contaminants ». Il n'en reste pas moins que ces résultats sont en accord avec les observations elles aussi très préliminaires réalisées par d'autres notamment chez la gracilaire (Nyvall et coll., 1999 ; Viola et coll., 2001). L'arrivée de la séquence du génome nous permettra ici de valider un système sur les deux ou peut être même les deux voies métaboliques chez cet organisme. La présence d'un amidon composé uniquement d'amylopectine ainsi que l'absence de protéines de type GBSSI à l'intérieur du grain semble privilégier un amidon floridéen tel que décrit à l'origine par Meuse et coll. (1960). La GBSSI qui a été récemment rapportée chez les cyanobactéries du sous-groupe V et est retrouvée chez les glaucophytes (Plancke et coll., 2008) et chez certaines algues rouges (Shimonaga et coll., 2007) et organismes dérivés par endosymbiose secondaire (Coppin et coll., 2005 ; Deschamps et coll., 2006), n'est pas nécessaire à l'élaboration de l'amidon. Cependant sa conservation dans les 3 lignées issues de l'endosymbiose primaire et son adaptation pour utiliser l'UDPglc dans les lignées d'endosymbiose secondaire (dinoflagellées et cryptophytes) ainsi que chez les glaucophytes et les algues rouges porphyridiales semble lui conférer un rôle important. Est-ce son rôle dans la synthèse des longues chaînes traverses (comme la SSIII) de l'amylopectine (Ral et coll., 2006) qui a joué en faveur de cette conservation et de cette adaptation, ou peut-être simplement le besoin de stocker toujours plus de carbone dans un volume minimum. Les raisons de cette conservation sont encore en suspens.

Des trois lignées eucaryotes issues de l'endosymbiose plastidiale, deux semblent partager le même schéma métabolique (figure 36). En effet au vue des

différentes études publiées la voie UDPglc serait la voie principale pour la synthèse de l'amidon floridéen que ce soit chez les Glaucophyta ou les Rhodophyceae. Les amidon-synthétases solubles utiliseraient exclusivement l'UDPglc (en tous cas en ce qui concerne les cyanidiales) alors que les GBSS lorsqu'elles sont présentes seraient capables d'utiliser les deux nucléotides sucres à l'exception de celle de *Cryptocodinium cohnii* qui utilise exclusivement l'UDPglc (contrairement à celles des Chloroplastida) (Deschamps et coll., 2008 [B]). Les génomes disponibles ainsi que des gels d'activités chez *Cryptocodinium* montrent l'existence chez les algues rouges d'enzymes de branchement, d'isoamylases, et d'enzymes impliquées dans la dégradation comme GWD, des amylases, la D-enzyme ou encore des phosphorylases, mais aucune étude poussée n'a été effectuée sur ces enzymes. Chez *Cyanophora paradoxa*, l'isoamylase ainsi qu'une phosphorylase ont été caractérisées dans ce travail de thèse. L'étude des banques d'EST ont également permis de trouver des séquences pouvant correspondre à une enzyme de branchement, à une D-enzyme et à une deuxième phosphorylase (observée également sur les protéines liées au grain d'amidon).

L'arrivée des génomes de *Cyanophora paradoxa* et de *Chondrus crispus* devrait nous apporter des réponses quand à l'existence ou non d'une voie ADPglc parallèle qui a priori semble peu probable chez *Cyanophora*, contrairement à *Chondrus* où les premiers résultats obtenus sont assez surprenant, avec la présence des deux voies métaboliques.



**Figure 36 : Schéma illustrant le métabolisme de l'amidon floridéen chez les Rhodophyceae et les Glaucophyta.**

L'étoile indique l'étape limitante du métabolisme, celle où les enzymes sont régulées. Les lignes pointillées correspondent aux premières étapes qui ne sont pas spécifiques au métabolisme de l'amidon. Les lignes discontinues correspondent aux enzymes dont le rôle dans le métabolisme de l'amidon n'a pas encore été vérifié dans ces deux lignées cellulaires. L'étape entourée est peu probable car un gène pouvant coder une telle enzyme a été observé uniquement dans le génome de *Cyanidioschyzon merolae*. L'étape réalisée par la GBSS (gris) est une étape qui n'est pas présente chez tous les organismes.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Adl, S. M.; Simpson, A. G. B.; Farmer, M. A.; Andersen, R. A.; Anderson, O. R.; Barta, J. R.; Bowser, S. S.; Brugerolle, G.; Fensome, R. A.; Fredericq, S.; James, T. Y.; Karpov, S.; Kugrens, P.; Krug, J.; Lane, C. E.; Lewis, L. A.; Lodge, J.; Lynn, D. H.; Mann, D. G.; McCourt, R. M.; Mendoza, L.; Moestrup, O.; Mozley-Standridge, S. E.; Nerad, T. A.; Shearer, C. A.; Smirnov, A. V.; Spiegel, F. W. & Taylor, M. F. J. R. (2005)**  
The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists.

*J Eukaryot Microbiol* **52**, 399-451.

**Ball, S. (2002)**

The Intricate Pathway of Starch Biosynthesis and Degradation in the Monocellular Alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Aust. J. Chem.* **55**, 49-59.

**Ball, S.; Guan, H. P.; James, M.; Myers, A.; Keeling, P.; Mouille, G.; Buléon, A.; Colonna, P. & Preiss, J. (1996)**

From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule.

*Cell* **86**, 349-352.

**Ball, S. G. & Morell, M. K. (2003)**

From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule.

*Annu Rev Plant Biol* **54**, 207-233.

**Ball, S.; van de Wal, M. & Visser, R. (1998)**

Progress in understanding the biosynthesis of amylase.

*Trends in plant science* **3**, 462-467.

**Ballicora, M. A.; Iglesias, A. A. & Preiss, J. (2003)**

ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis.

*Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 213-225.

**Barbier, G.; Oesterhelt, C.; Larson, M. D.; Halgren, R. G.; Wilkerson, C.; Garavito, R. M.; Benning, C. & Weber, A. P. M. (2005)**

Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae.

*Plant Physiol* **137**, 460-474.

**Bhattacharya, D. & Schmidt, H. (1997)**

Division Glaucocystophyta

*Plant Systematics and Evolution* **11**, 139-148.

**Bhattacharya, D.; Yoon, H. S. & Hackett, J. D. (2004)**

Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots.

*Bioessays* **26**, 50-60.

**Bouarab (2000)**

Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus* *Acrochaete operculata*.

PhD thesis, Université Paris 6.

**Buléon, A.; Colonna, P.; Planchot, V. & Ball, S. (1998)**

Starch granules: structure and biosynthesis.

*Int J Biol Macromol* **23**, 85-112.

**Buléon, A.; Gallant, D. J.; Bouchet, B.; Mouille, G.; D'Hulst, C.; Kossmann, J. & Ball, S. (1997)**

Starches from A to C. *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal.

*Plant Physiol* **115**, 949-957.

**Cheng, C.; Mu, J.; Farkas, I.; Huang, D.; Goebel, M. G. & Roach, P. J. (1995)**

Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Mol Cell Biol* **15**, 6632-6640.

**Colleoni, C.; Dauvillée, D.; Mouille, G.; Morell, M.; Samuel, M.; Slomiany, M.C.; Liénard, L.; Wattebled, F.; d'Hulst, C. & Ball, S. (1999)**

Biochemical characterization of the *chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis.

*Plant Physiol* **120**, 1005-1014.

**Coppin, A.; Varré, J.; Lienard, L.; Dauvillée, D.; Guérardel, Y.; Soyer-Gobillard, M.; Buléon, A.; Ball, S. & Tomavo, S. (2005)**

Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry.

*J Mol Evol* **60**, 257-267.

**Dauvillée, D.; Mestre, V.; Colleoni, C.; Slomianny, M.C.; Mouille, G.; Delrue, B.; d'Hulst, C.; Bliard, C.; Nuzillard, J.M. & Ball, S. (2000)**

The debranching enzyme complex missing in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* displays an isoamylase-type specificity.

*Plant Sci* **157**, 145-156.

**Dauvillée, D.; Chochois, V.; Steup, M.; Haebel, S.; Eckermann, N.; Ritte, G.; Ral, J.; Colleoni, C.; Hicks, G.; Wattebled, F.; Deschamps, P.; d'Hulst, C.; Liénard, L.; Cournac, L.; Putaux, J.; Dupeyre, D. & Ball, S. G. (2006)**

Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Plant J* **48**, 274-285.

**Dauvillée, D.; Colleoni, C.; Mouille, G.; Buléon, A.; Gallant, D. J.; Bouchet, B.; Morell, M. K.; d'Hulst, C.; Myers, A. M. & Ball, S. G. (2001)**

Two loci control phytoglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Plant Physiol* **125**, 1710-1722.

**Dauvillée, D.; Colleoni, C.; Mouille, G.; Morell, M. K.; d'Hulst, C.; Wattedled, F.; Liénard, L.; Delvallé, D.; Ral, J. P.; Myers, A. M. & Ball, S. G.** (2001)

Biochemical characterization of wild-type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation.

*Plant Physiol* **125**, 1723-1731.

**Dauvillée, D.; Colleoni, C.; Shaw, E.; Mouille, G.; D'Hulst, C.; Morell, M.; Samuel, M. S.; Bouchet, B.; Gallant, D. J.; Sinskey, A. & Ball, S.** (1999)

Novel, starch-like polysaccharides are synthesized by an unbound form of granule-bound starch synthase in glycogen-accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Plant Physiol* **119**, 321-330.

**Dauvillée, D.; Kinderf, I. S.; Li, Z.; Kosar-Hashemi, B.; Samuel, M. S.; Rampling, L.; Ball, S. & Morell, M. K.** (2005)

Role of the *Escherichia coli glgX* gene in glycogen metabolism.

*J Bacteriol* **187**, 1465-1473.

**Delrue, B.; Fontaine, T.; Routier, F.; Decq, A.; Wieruszeski, J. M.; Koornhuysse, N. V. D.; Maddelein, M. L.; Fournet, B. & Ball, S.** (1992)

Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin.

*J Bacteriol* **174**, 3612-3620.

**Delwiche, C.F.** (1999)

Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life.

*Am Nat* **154**, S164-S177.

**Denyer, K.; Waite, D.; Motawia, S.; Møller, B. L. & Smith, A. M.** (1999)

Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively.

*Biochem J* **340** (Pt 1), 183-191.

**Deschamps, P.; Colleoni, C.; Nakamura, Y.; Suzuki, E.; Putaux, J.; Buléon, A.; Haebel, S.; Ritte, G.; Steup, M.; Falcón, L. I.; Moreira, D.; Löffelhardt, W.; Raj, J. N.; Plancke, C.; d'Hulst, C.; Dauvillée, D. & Ball, S.** (2008 A)

Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom.

*Mol Biol Evol* **25**, 536-548.

**Deschamps, P.; Guillebeault, D.; Devassine, J.; Dauvillée, D.; Haebel, S.; Steup, M.; Buléon, A.; Putaux, J.; Slomianny, M.; Colleoni, C.; Devin, A.; Plancke, C.; Tomavo, S.; d'Herelle, E.; Moreau, H. & Ball, S.** (2008 B)

The heterotrophic dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* defines a model genetic system to investigate cytoplasmic starch synthesis.

*Eukaryot Cell* **7**, 872-880.

**Deschamps, P.; Moreau, H.; Worden, A. Z.; Dauvillée, D. & Ball, S. G.**  
(2008 C)

Early gene duplication within chloroplastida and its correspondence with relocation of starch metabolism to chloroplasts.

*Genetics* **178**, 2373-2387.

**Deschamps, P.; Haferkamp, I.; Dauvillée, D.; Haebel, S.; Steup, M.; Buléon, A.; Putaux, J.; Colleoni, C.; d'Hulst, C.; Plancke, C.; Gould, S.; Maier, U.; Neuhaus, H. E. & Ball, S.** (2006)

Nature of the periplastidial pathway of starch synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*.

*Eukaryot Cell* **5**, 954-963.

**Eichinger, L.; Pachebat, J. A.; Glöckner, G.; Rajandream, M.; Sugang, R.; Berriman, M.; Song, J.; Olsen, R.; Szafranski, K.; Xu, Q.; Tunggal, B.; Kummerfeld, S.; Madera, M.; Konfortov, B. A.; Rivero, F.; Bankier, A. T.; Lehmann, R.; Hamlin, N.; Davies, R.; Gaudet, P.; Fey, P.; Pilcher, K.; Chen, G.; Saunders, D.; Sodergren, E.; Davis, P.; Kerhornou, A.; Nie, X.; Hall, N.; Anjard, C.; Hemphill, L.; Bason, N.; Farbrother, P.; Desany, B.; Just, E.; Morio, T.; Rost, R.; Churcher, C.; Cooper, J.; Haydock, S.; van Driessche, N.; Cronin, A.; Goodhead, I.; Muzny, D.; Mourier, T.; Pain, A.; Lu, M.; Harper, D.; Lindsay, R.; Hauser, H.; James, K.; Quiles, M.; Babu, M. M.; Saito, T.; Buchrieser, C.; Wardroper, A.; Felder, M.; Thangavelu, M.; Johnson, D.; Knights, A.; Loulseged, H.; Mungall, K.; Oliver, K.; Price, C.; Quail, M. A.; Urushihara, H.; Hernandez, J.; Rabbinowitsch, E.; Steffen, D.; Sanders, M.; Ma, J.; Kohara, Y.; Sharp, S.; Simmonds, M.; Spiegler, S.; Tivey, A.; Sugano, S.; White, B.; Walker, D.; Woodward, J.; Winckler, T.; Tanaka, Y.; Shaulsky, G.; Schleicher, M.; Weinstock, G.; Rosenthal, A.; Cox, E. C.; Chisholm, R. L.; Gibbs, R.; Loomis, W. F.; Platzer, M.; Kay, R. R.; Williams, J.; Dear, P. H.; Noegel, A. A.; Barrell, B. & Kuspa, A.** (2005)

The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*.

*Nature* **435**, 43-57.

**Fathinejad, S.; Steiner, J. M.; Reipert, S.; Marchetti, M.; Allmaier, G.; Burey, S. C.; Ohnishi, N.; Fukuzawa, H.; Löffelhardt, W. & Bohnert, H. J.**  
(2008)

A carboxysomal carbon-concentrating mechanism in the cyanelles of the 'coelacanth' of the algal world, *Cyanophora paradoxa*?

*Physiol Plant* **133**, 27-32.

**François, J. & Parrou, J. L.** (2001)

Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

*FEMS Microbiol Rev* **25**, 125-145.

**Fredrick, J.** (1977)

Protein and isozyme patterns of the cyanelles of *Glaucocystis nostochinearum* compared with *Anacystis nidulans*.

*Phytochemistry* **16**, 1571-1573.

**Fulton, D. C.; Stettler, M.; Mettler, T.; Vaughan, C. K.; Li, J.; Francisco, P.; Gil, M.; Reinhold, H.; Eicke, S.; Messerli, G.; Dorken, G.; Halliday, K.; Smith, A. M.; Smith, S. M. & Zeeman, S. C. (2008)**

Beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in Arabidopsis chloroplasts.  
*Plant Cell* **20**, 1040-1058.

**Guan, H. P. & Preiss, J. (1993)**

Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*).  
*Plant Physiol* **102**, 1269-1273.

**Haferkamp, I.; Deschamps, P.; Ast, M.; Jeblick, W.; Maier, U.; Ball, S. & Neuhaus, H. E. (2006)**

Molecular and biochemical analysis of periplastidial starch metabolism in the cryptophyte *Guillardia theta*.  
*Eukaryot Cell* **5**, 964-971.

**Henrissat, B.; Deleury, E. & Coutinho, P. M. (2002)**

Glycogen metabolism loss: a common marker of parasitic behaviour in bacteria?  
*Trends Genet* **18**, 437-440.

**James, M. G.; Denyer, K. & Myers, A. M. (2003)**

Starch synthesis in the cereal endosperm.  
*Curr Opin Plant Biol* **6**, 215-222.

**James, M. G.; Robertson, D. S. & Myers, A. M. (1995)**

Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels.  
*Plant Cell* **7**, 417-429.

**Koziol, A. G.; Borza, T.; Ishida, K.; Keeling, P.; Lee, R. W. & Durnford, D. G. (2007)**

Tracing the evolution of the light-harvesting antennae in chlorophyll a/b-containing organisms.  
*Plant Physiol* **143**, 1802-1816.

**Laemmli, U. K. (1970)**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* **227**, 680-685.

**Leloir, L. F.; Fekete, M. A. D. & Cardini, C. E. (1961)**

Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose.  
*J Biol Chem* **236**, 636-641.

**Libessart, N.; Maddelein, M. L.; Koornhuyse, N. V.; Decq, A.; Delrue, B.; Mouille, G.; D'Hulst, C. & Ball, S. (1995)**

Storage, Photosynthesis, and Growth: The Conditional Nature of Mutations Affecting Starch Synthesis and Structure in Chlamydomonas.  
*Plant Cell* **7**, 1117-1127.

**Lin, T.; Caspar, T.; Somerville, C. & Preiss, J. (1988)**  
Isolation and Characterization of a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Lacking ADPglucose Pyrophosphorylase Activity.  
*Plant Physiol* **86**, 1131-1135.

**Lipscomb, W. N. (1983)**  
Structure and catalysis of enzymes.  
*Annu Rev Biochem* **52**, 17-34.

**Lluisma, A. O. & Ragan, M. A. (1998)**  
Cloning and characterization of a nuclear gene encoding a starch-branching enzyme from the marine red alga *Gracilaria gracilis*.  
*Curr Genet* **34**, 105-111.

**Loftus, B.; Anderson, I.; Davies, R.; Alsmark, U. C. M.; Samuelson, J.; Amedeo, P.; Roncaglia, P.; Berriman, M.; Hirt, R. P.; Mann, B. J.; Nozaki, T.; Suh, B.; Pop, M.; Duchene, M.; Ackers, J.; Tannich, E.; Leippe, M.; Hofer, M.; Bruchhaus, I.; Willhoeft, U.; Bhattacharya, A.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; Hance, Z.; Harris, B.; Harris, D.; Jagels, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Ormond, D.; Squares, R.; Whitehead, S.; Quail, M. A.; Rabbino-witsch, E.; Norbertczak, H.; Price, C.; Wang, Z.; Guillén, N.; Gilchrist, C.; Stroup, S. E.; Bhattacharya, S.; Lohia, A.; Foster, P. G.; Sicheritz-Ponten, T.; Weber, C.; Singh, U.; Mukherjee, C.; El-Sayed, N. M.; Petri, W. A.; Clark, C. G.; Embley, T. M.; Barrell, B.; Fraser, C. M. & Hall, N. (2005)**  
The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*.  
*Nature* **433**, 865-868.

**Lomako, J.; Lomako, W. M. & Whelan, W. J. (2004)**  
Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis.  
*Biochim Biophys Acta* **1673**, 45-55.

**Lu, Y. & Sharkey, T. D. (2006)**  
The importance of maltose in transitory starch breakdown.  
*Plant Cell Environ* **29**, 353-366.

**Löffelhardt, W. & Bohnert, H. J. (1994)**  
Structure and function of the cyanobacterial genome.  
*Int Rev Cytol* **151**, 29-65.

**Maddelein, M. L.; Libessart, N.; Bellanger, F.; Delrue, B.; D'Hulst, C.; den Koornhuyse, N. V.; Fontaine, T.; Wieruszkeski, J. M.; Decq, A. & Ball, S. (1994)**  
Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis.  
*J Biol Chem* **269**, 25150-25157.

**Manners, D. (1989)**  
Recent developments in our understanding of amylopectin structure.  
*Carbohydrate Polymers* **11**, 87-112.

**Matsuzaki, M.; Misumi, O.; Shin-I, T.; Maruyama, S.; Takahara, M.; Miyagishima, S.; Mori, T.; Nishida, K.; Yagisawa, F.; Nishida, K.; Yoshida, Y.; Nishimura, Y.; Nakao, S.; Kobayashi, T.; Momoyama, Y.; Higashiyama, T.; Minoda, A.; Sano, M.; Nomoto, H.; Oishi, K.; Hayashi, H.; Ohta, F.; Nishizaka, S.; Haga, S.; Miura, S.; Morishita, T.; Kabeya, Y.; Terasawa, K.; Suzuki, Y.; Ishii, Y.; Asakawa, S.; Takano, H.; Ohta, N.; Kuroiwa, H.; Tanaka, K.; Shimizu, N.; Sugano, S.; Sato, N.; Nozaki, H.; Ogasawara, N.; Kohara, Y. & Kuroiwa, T. (2004)**  
Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D.  
*Nature* **428**, 653-657.

**McCracken, D. & J.R., C. (1981)**  
Amylose in floridean starch.  
*New Phytol* **88**, 67-71.

**Meeuse, B.J., A. M. & Wood, J. (1960)**  
Floridean starch  
*J. Exp. Bot.* **11**, 129-140.

**Meléndez, R.; Meléndez-Hevia, E. & Canela, E. I. (1999)**  
The fractal structure of glycogen: A clever solution to optimize cell metabolism.  
*Biophys J* **77**, 1327-1332.

**Meléndez, R.; Meléndez-Hevia, E. & Cascante, M. (1997)**  
How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building.  
*J Mol Evol* **45**, 446-455.

**Meléndez-Hevia, E.; Waddell, T. G. & Shelton, E. D. (1993)**  
Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule.  
*Biochem J* **295** (Pt 2), 477-483.

**Miller, G. L. (1959)**  
Cardiac arrest.  
*Miss Doct* **37**, 149-151.

**Moreira, D. & Philippe, H. (2001)**  
Sure facts and open questions about the origin and evolution of photosynthetic plastids.  
*Res Microbiol* **152**, 771-780.

**Mouille, G.; Maddelein, M. L.; Libessart, N.; Talaga, P.; Decq, A.; Delrue, B. & Ball, S. (1996)**  
Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants.  
*Plant Cell* **8**, 1353-1366.

- Mu, J.; Cheng, C. & Roach, P. J.** (1996)  
Initiation of glycogen synthesis in yeast. Requirement of multiple tyrosine residues for function of the self-glucosylating Glg proteins in vivo.  
*J Biol Chem* **271**, 26554-26560.
- Nakamura, Y. & Imamura, M.** (1983)  
Characteristics of a glucan phosphorylase from *Chlorella vulgaris*.  
*Phytochemistry* **22**, 835-840.
- Nakamura, Y.; Kubo, A.; Shimamune, T.; Matsuda, T.; Harada, K. & Satoh, H.** (1997)  
Correlation between activities of starch debranching enzymes and alpha-polyglucan structure in endosperms of sugary-1 mutants of rice.  
*The Plant Journal* **12**, 143-153.
- Nebinger, P.** (1986 A)  
Separation and characterization of four different amylases of *Entamoeba histolytica*. I. Purification and properties.  
*Biol Chem Hoppe Seyler* **367**, 161-167.
- Nebinger, P.** (1986 B)  
Separation and characterization of four different amylases of *Entamoeba histolytica*. II. Characterization of amylases.  
*Biol Chem Hoppe Seyler* **367**, 169-176.
- Nowack, E. C. M.; Melkonian, M. & Glöckner, G.** (2008)  
Chromatophore genome sequence of Paulinella sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes.  
*Curr Biol* **18**, 410-418.
- Nyvall, P.; Pelloux, J.; Davies, H. V.; Pedersén, M. & Viola, R.** (1999)  
Purification and characterisation of a novel starch synthase selective for uridine 5'-diphosphate glucose from the red alga *Gracilaria tenuistipitata*.  
*Planta* **209**, 143-152.
- O'Brien, E. A.; Koski, L. B.; Zhang, Y.; Yang, L.; Wang, E.; Gray, M. W.; Burger, G. & Lang, B. F.** (2007)  
TBestDB: a taxonomically broad database of expressed sequence tags (ESTs).  
*Nucleic Acids Res* **35**, D445-D451.
- Palmer, J. D.** (2000)  
A single birth of all plastids?  
*Nature* **405**, 32-33.
- Patron, N. & Keeling, P.** (2005)  
Common evolutionary origin of starch biosynthetic enzymes in green and red algae.  
*Journal of Phycology* **41**, 1131-1141.

**Plancke, C.; Colleoni, C.; Deschamps, P.; Dauvillée, D.; Nakamura, Y.; Haebel, S.; Ritte, G.; Steup, M.; Buléon, A.; Putaux, J.; Dupeyre, D.; d'Hulst, C.; Ral, J.; Löffelhardt, W. & Ball, S. G. (2008)**  
Pathway of cytosolic starch synthesis in the model glaucophyte *Cyanophora paradoxa*.  
*Eukaryot Cell* **7**, 247-257.

**Preiss, J. (1984)**  
Bacterial glycogen synthesis and its regulation.  
*Annu Rev Microbiol* **38**, 419-458.

**Preiss, J. & Romeo, T. (1989)**  
Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis.  
*Adv Microb Physiol* **30**, 183-238.

**Rahman, A.; Wong, K.; Jane, J.; Myers, A. M. & James, M. G. (1998)**  
Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in maize.  
*Plant Physiol* **117**, 425-435.

**Ral, J.; Colleoni, C.; Wattedled, F.; Dauvillée, D.; Nempont, C.; Deschamps, P.; Li, Z.; Morell, M. K.; Chibbar, R.; Purton, S.; d'Hulst, C. & Ball, S. G. (2006)**  
Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*.  
*Plant Physiol* **142**, 305-317.

**Ral, J.; Derelle, E.; Ferraz, C.; Wattedled, F.; Farinas, B.; Corellou, F.; Buléon, A.; Slomianny, M.; Delvalle, D.; d'Hulst, C.; Rombauts, S.; Moreau, H. & Ball, S. (2004)**  
Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*.  
*Plant Physiol* **136**, 3333-3340.

**Recondo, E. & Leloir, L. F. (1961)**  
Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis.  
*Biochem Biophys Res Commun* **6**, 85-88.

**Reyes-Prieto, A. & Bhattacharya, D. (2007)**  
Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae.  
*Mol Biol Evol* **24**, 2358-2361.

**Ritte, G.; Heydenreich, M.; Mahlow, S.; Haebel, S.; Kötting, O. & Steup, M. (2006)**  
Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases.  
*FEBS Lett* **580**, 4872-4876.

**Roach, P. J.** (2002)

Glycogen and its metabolism.

*Curr Mol Med* **2**, 101-120.

**Rodríguez-Ezpeleta, N.; Brinkmann, H.; Burey, S. C.; Roure, B.; Burger, G.; Löffelhardt, W.; Bohnert, H. J.; Philippe, H. & Lang, B. F.** (2005)

Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes.

*Curr Biol* **15**, 1325-1330.

**Rogers, P. V.; Sucic, J. F.; Yin, Y. & Rutherford, C. L.** (1994)

Disruption of glycogen phosphorylase gene expression in *Dictyostelium*: evidence for altered glycogen metabolism and developmental coregulation of the gene products.

*Differentiation* **56**, 1-12.

**Roldán, I.; Wattedled, F.; Lucas, M. M.; Delvallé, D.; Planchot, V.;**

**Jiménez, S.; Pérez, R.; Ball, S.; D'Hulst, C. & Mérida, A.** (2007)

The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation.

*Plant J* **49**, 492-504.

**Romeo, T.; Kumar, A. & Preiss, J.** (1988)

Analysis of the *Escherichia coli* glycogen gene cluster suggests that catabolic enzymes are encoded among the biosynthetic genes.

*Gene* **70**, 363-376.

**Rutherford, C. L.; Naranan, V.; Brickey, D. A.; Sucic, J. F.; Rogers, P. V. & Selmin, O.** (1988)

Glycogen phosphorylase in *Dictyostelium discoideum*: demonstration of two developmentally regulated forms, purification to homogeneity, immunochemical analysis, cAMP induction, in vitro translation, and molecular cloning.

*Dev Genet* **9**, 469-481.

**Ryman, B. E.** (1974)

The glycogen storage diseases.

*J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **8**, 106-121.

**Sesma, J. I. & Iglesias, A. A.** (1998)

*Synthesis of floridean starch in the red alga Gracilaria gracilis occurs via ADP-glucose.*

Kluwer Academic Publishers, chapter Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Vol V, pp. 3537-3540.

**Shimonaga, T.; Fujiwara, S.; Kaneko, M.; Izumo, A.; Nihei, S.; Francisco, P. B.; Satoh, A.; Fujita, N.; Nakamura, Y. & Tsuzuki, M.** (2007)

Variation in storage alpha-polyglucans of red algae: amylose and semi-amylopectin types in Porphyridium and glycogen type in Cyanidium.

*Mar Biotechnol (NY)* **9**, 192-202.

- Smith, A. M.; Zeeman, S. C. & Smith, S. M. (2005)**  
Starch degradation.  
*Annu Rev Plant Biol* **56**, 73-98.
- Stegemann, S.; Hartmann, S.; Ruf, S. & Bock, R. (2003)**  
High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8828-8833.
- Steiner, J. M. & Löffelhardt, W. (2005)**  
Protein translocation into and within cyanelles.  
*Mol Membr Biol* **22**, 123-132.
- Steiner, J. M.; Yusa, F.; Pompe, J. A. & Löffelhardt, W. (2005)**  
Homologous protein import machineries in chloroplasts and cyanelles.  
*Plant J* **44**, 646-652.
- Takeuchi, T.; Weinbach, E. C. & Diamond, L. S. (1977 A)**  
*Entamoeba histolytica*: localization and characterization of phosphorylase and particulate glycogen.  
*Exp Parasitol* **43**, 107-114.
- Takeuchi, T.; Weinbach, E. C. & Diamond, L. S. (1977 B)**  
*Entamoeba histolytica*: localization and characterization of phosphoglucomutase, uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase, and glycogen synthase.  
*Exp Parasitol* **43**, 115-121.
- Tetlow, I. J.; Morell, M. K. & Emes, M. J. (2004)**  
Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants.  
*J Exp Bot* **55**, 2131-2145.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994)**  
CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.  
*Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Thorn, W. & Mohazzeb, S. (1990)**  
 $\alpha$ -D-polyglucane-iodine complexes.  
*Starch/Stärke* **42**, 455-459.
- Tsai, C. Y. (1974)**  
The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm.  
*Biochem Genet* **11**, 83-96.
- Ugalde, J. E.; Parodi, A. J. & Ugalde, R. A. (2003)**  
De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10659-10663.

- Viola, R.; Nyvall, P. & Pedersén, M.** (2001)  
The unique features of starch metabolism in red algae.  
*Proc Biol Sci* **268**, 1417-1422.
- Van den Koornhuise, N.; Libessart, N.; Delrue, B.; Zabawinski, C.; Decq, A.; Iglesias, A.; Carton, A.; Preiss, J. & Ball, S.** (1996)  
Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*.  
*J Biol Chem* **271**, 16281-16287.
- van de Wal, M.; D'Hulst, C.; Vincken, J. P.; Buléon, A.; Visser, R. & Ball, S.** (1998)  
Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin.  
*J Biol Chem* **273**, 22232-22240.
- Wattebled, F.; Dong, Y.; Dumez, S.; Delvallé, D.; Planchot, V.; Berbezy, P.; Vyas, D.; Colonna, P.; Chatterjee, M.; Ball, S. & D'Hulst, C.** (2005)  
Mutants of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phyto glycogen and an abnormal form of amylopectin.  
*Plant Physiol* **138**, 184-195.
- Werries, E.; Franz, A. & Geisemeyer, S.** (1990)  
Detection of glycogen-debranching system in trophozoites of *Entamoeba histolytica*.  
*J Protozool* **37**, 576-580.
- Werries, E. & Müller, F.** (1986)  
Studies on the substrate specificity of alpha- and beta-amylase of *Entamoeba histolytica*.  
*Mol Biochem Parasitol* **18**, 211-221.
- Werries, E. & Nebinger, P.** (1984)  
The occurrence of beta-amylase in *Entamoeba histolytica*.  
*Mol Biochem Parasitol* **11**, 329-336.
- Werries, E. & Thurn, I.** (1989)  
Breakdown of glucopolysaccharides in *Entamoeba histolytica* by phosphorylase.  
*J Protozool* **36**, 607-612.
- Williamson, B. D.; Favis, R.; Brickey, D. A. & Rutherford, C. L.** (1996)  
Isolation and characterization of glycogen synthase in *Dictyostelium discoideum*.  
*Dev Genet* **19**, 350-364.
- Wright, B. E.; Rosness, P.; Jones, T. H. & Marshall, R.** (1973)  
Glycogen metabolism during differentiation in *Dictyostelium discoideum*.  
*Ann N Y Acad Sci* **210**, 51-63.
- Yoon, H. S.; Hackett, J. D.; Ciniglia, C.; Pinto, G. & Bhattacharya, D.** (2004)  
A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes.  
*Mol Biol Evol* **21**, 809-818.

**Yu, S.; Kenne, L. & Pedersén, M. (1993)**

Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. I. Efficient purification and characterization from red seaweeds.

*Biochim Biophys Acta* **1156**, 313-320.

**Zabawinski, C.; Koornhuyse, N. V. D.; D'Hulst, C.; Schlichting, R.;**

**Giersch, C.; Delrue, B.; Lacroix, J. M.; Preiss, J. & Ball, S. (2001)**

Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase.

*J Bacteriol* **183**, 1069-1077.

**Zeeman, S. C.; Smith, S. M. & Smith, A. M. (2007)**

The diurnal metabolism of leaf starch.

*Biochem J* **401**, 13-28.

**Zeeman, S. C.; Smith, S. M. & Smith, A. M. (2002)**

The priming of amylose synthesis in Arabidopsis leaves.

*Plant Physiol* **128**, 1069-1076.

# **ANNEXES**

**Annexe 1 : ADNc complet et séquence protéique de la GBSSI de *Cyanophora paradoxa*.**

Les codons start et stop sont signalés en gras soulignés, et les primers ayant servis à la synthèse de la sonde utilisée lors du criblage de la banque ont été surlignés en gris sur la séquence nucléotidique.

```

1  ATGAATATCG CACCGGTTTC CGAGCTTCAG GCCGCCATCG ACCAGGCCGA
   M N I A P V S E L Q A A I D Q A E
51 GAAGAAGCTG ACTATCGTTT TCGTTGGGAG CGAATGCACT CCGTGGTCCA
   K K L T I V F V G S E C T P W S K
101 AGACCGGCGG TCTGGGCGAC GTCATGCGCG ATCTTCCCGT CAATCTGGCT
   T G G L G D V M R D L P V N L A
151 CAGCGTGGCC ACCGCGTGAT GTCCATCCAG CCCCAGTACG ACCAGTACTT
   Q R G H R V M S I Q P R Y D Q Y F
201 CGACGCCTGG GACACCGCCG TCCGCTCCTC CATTAAAGGTG AACGGCAAGC
   D A W D T A V R S S I K V N G K L
251 TCGAGGACGT CGGCTTCTTC CACATCACCT CCAAGGGCGT CGACCGCATC
   E D V G F F H I T S K G V D R I
301 TTCATCGATC ACCCGTGGTT CCTCGCCAAG GTCTGGGGCA TCACCGGCAA
   F I D H P W F L A K V W G I T G N
351 CAAGCTGTAC GGCGCCAAGA CCGGCGTCGA CTACCCGGAC AACCCCATGC
   K L Y G A K T G V D Y P D N P M R
401 GCTTCGCTCT GATGTGCCAG GCGGCGCTGG AGGCGCCCCT GCGCATCCCC
   F A L M C Q A A L E A P L R I P
451 CTGCCAGACC CGGCTGGCAC AGTCTACGGC GAGGACGTCA TCTTCGTCTG
   L P D P A G T V Y G E D V I F V C
501 CAACGACTGG CACTCGGCGC TCGTCCCCAT CTACCTGAAG GCCAACTACA
   N D W H S A L V P I Y L K A N Y K
551 AGACCCGCGG CCTCTACCAG AACCGGAAGA GCATCTTCCT CCTCCACAAC
   T R G L Y Q N A K S I F L L H N
601 ATCATCTACC AGGGCCGCTT CCCGCTCGAG TTCTGGCCGG CGCTGAACCT
   I I Y Q G R F P L E F W P A L N L
651 CCCCAGGGCG GCCAAGAAGG ACCTCGTCTT CGAGTCCTGC TTCGCGCCCC
   P E A A K K D L V F E S C F A P P
701 CGCCCCTCGA CGGCATCTCC GAGCAGCCGA TCATCTCGCT GAAGCCGATG
   P L D G I S E Q P I I S L K P M
751 GCCATGATGA ACTTCCTCCA GGCCGGCTTC ATCCACGCGG ACCGCATCTG
   A M M N F L Q A G F I H A D R I C
801 CACGGTCTCG CCCAGTTCG CCGCCGAGGT CGCCTCGGGC CCCCAGCGCG
   T V S P Q F A A E V A S G P R G G
851 GCGTCGAGCT CGACAAGTAC ATCCGCGCCA AGGGCATCAC CGGCATCATG
   V E L D K Y I R A K G I T G I M
901 AACGGGATGG ACATCGAGAT GTGGGACGCG AGCAAGGACA AGTTCCTCGT
   N G M D I E M W D A S K D K F L V
951 GACCAAGTAC ACCGCCTCGT CGGTGGACGA GGGCAAGGCC GCCAACAAGG
   T K Y T A S S V D E G K A A N K A
1001 CCGTCCTCCA GGCCGAGATG GGCCTCAAGG TCTCCCCCAC GACCCCTCCT
   V L Q A E M G L K V S P T T P L
1051 ATCGCCTTCG TCGGCCGCCT CGACGACCAG AAAGGGGCCG ACTGCATGGT
   I A F V G R L D D Q K G A D C M V
1101 GGAGGCGATG CCGTACCTGG TGAACACGCT CGGGGCGCAG GTCGTGTGCT
   E A M P Y L V N T L G A Q V V C Y

```

1151 ACGGCTCGGG CCGTGAGGAC ATGGCAGCCA AGTTCAAGGC CCTCGAGAAG  
G S G R E D M A A K F K A L E K  
1201 CAGTTCCCGG GCATGGCCAA GGGTAAGACC GCCTTCGTCC CCAAGGAGGA  
Q F P G M A K G K T A F V P K E E  
1251 GCACACGCTG ATGGCCGGCG CCGACTACGT GCTGATGCCG TCGCGCTTCG  
H T L M A G A D Y V L M P S R F E  
1301 AGCCGTGCGG GCTGGTGCAG CTGCACGCGA TGAAGTACGG CGCGGTGCCG  
P C G L V Q L H A M K Y G A V P  
1351 ATCGTGTTCG GCACGGGCGG CCTCAAGGAC AGCGTCATCC CGGAGTGCGG  
I V S C T G G L K D S V I P E C G  
1401 CTTACCTTC GAGGAGATCC CCTCGCCCGA GTACCCCGGC ATGAAGATCT  
F T F E E I P S P E Y P G M K I S  
1451 CCCCCGAGCT CATCGCCAAG GGCACCAAGA TCATCGAGGA GGGCTGCAAG  
P E L I A K G T K I I E E G C K  
1501 GAGGCCCTCG CCGGCTACGG CTCCAAGGCC TTCGCCGGCA TCGCGCCCGC  
E A L A G Y G S K A F A G M R A A  
1551 CTGCATGAAG CAGGACTTCG CCTGGAAGAA GCGCGTCCTC GTCTACGAGA  
C M K Q D F A W K K R V L V Y E K  
1601 AGGTCTTCTA CGAGACCCTC GGCATCGACC GCGGCGCCCC GGTACCGGCC  
V F Y E T L G I D R G A P V T A  
1651 AAGGCCTCGC CCGTCGCCCC GGAACCCTCG GCGGCCCCCC CCCC GGCGAC  
K A S P V A P E P S A A P A P A T  
1701 CATCTCGGCG GCCACCTCCG GGGGCATCCT CCCC GTCCCC AAGCGGCCG  
I S A A T S G G I L P V P K A A A  
1751 CCCCCAAGGC CCCCAAGGTC GCGCGCTAA  
P K A P K V G A \*

**Annexe 2 : ADNg partiel de la GBSS de *Cyanophora paradoxa* montrant l'alternance importante d'introns (surlignés) et d'exons de petites tailles.**

```

1  TGTGACTATA  TGTCGTACGT  AGACAAGTGC  CGTCGCAGCA  ATCCAGCGCG
51 GACCGTGCCG  ACTGCATCAT  AGCCATTCAC  AGCGTCAGAT  CCCGTTGACG
101 CGTCGAACGG  CTCGGCGCCC  GCTGCGCTTG  CGAGGCGCGG  TCCGCGCGCC
151 AGCTTTCTAA  CTGCTTTCGC  TAGCAGGCAA  ATCCACCCGA  CTCAACCATG
201 AATATCGCAC  GGTTAGCACC  TTTGGGATGC  CTTCTAAAAT  GTCAAACAGC
251 GCGCGACGGC  CCGTGTGCAG  ATTTCCGAGC  TTCAGGCCGC  CATCGACCAG
301 GCCGAGAAGA  AGCTGACTAT  CGTTTTCGTT  GGGAGCGAAT  GTGAGTCTGT
351 GTACCTGCCC  TTTTAGCCTG  GCTAGAGGCG  GCGGCGCCGG  CGCTCGTAAC
401 GTCGGCACTG  CCACGCAAAC  TTGCAACTCG  CCAGCGTGGC  TGCGCCGCC
451 GTCGCCGCAA  GCTCTGTTCT  GCTTGTCTGA  CCATTAGGCA  GGC ACTCCGT
501 GGTCCAAGAC  CGGCGGTCTG  GGCGACGTGA  GCGCATCTCA  GTCGCATCTC
551 GGCCTTACGC  ACGCCGCTTA  CCTGCCCGCG  CCCGCCCGCA  GTCATGCGC
601 GATCTTCCCG  TCAATCTGGC  TCAGCGTGGC  CACCGCGTGA  TGTCCATCCA
651 GCCCCGGTAC  GACCAGGTAC  GAAAAAACC  GCTGGCGCGC  GAATTCGAAC
701 TGCCCGGTCG  CCGACGCCCG  CGCAGTACTT  CGACGCCTGG  GACACGCCCG
751 TCCGCTCCTC  CATTAAAGTG  AACGGCAAGC  TCGAGGACGT  CGGCTTCTTC
801 CACATGTGCG  CCGCCGCTTG  CTTTGACCGC  ACCGCCCGCC  GCCGTCTGAC
851 TCCGCGCCCG  CAGCACCTCC  AAGGGCGTCG  ACCGCATCTT  CATCGATCAC
901 CCGTGGTTCC  TCGCCAAGGC  GCGGCCTTCT  TCCTTCTGCT  CCCTTTCGCC
951 GCGCTGACGT  TCCTTCCCGC  CAGGTCTGGG  GCATCACCGG  CAACAAGCTG
1001 TACGGGCCCA  AGACCGGCGT  CGACTACCCG  GACAACCCCA  TGCG

```

### Annexe 3 : ADNc partiel et séquence protéique de l'amidon synthétase soluble de *Cyanophora paradoxa*.

Les codons start et stop sont signalés en gras soulignés, et les primers ayant servis à la synthèse de la sonde utilisée lors du criblage de la banque ont été surlignés en gris sur la séquence nucléotidique.

```

1  GCGGAAGGGC GCGCTCGAGG TCCTCTGCGC CTACGGCATC CACCCCGCTG
   A K G A L E V L C A Y G I H P A V
51 TCGTCTGCTC CAACGACTGG TTCACGGGGC TGACGGCGGC GTACGCGAAG
   V C S N D W F T G L T A A Y A K
101 CACGGGCACT TCGGGACCTA CTTTAACGGG ACGAGCTTCA TGCACATCGT
   H G H F G T Y F N G T S F M H I V
151 CCACAACCTC GACCCAGCT ACGAGGGGCG CTTCTACCCG AAGGAGGAGG
   H N L D P S Y E G R F Y P K E E E
201 AGGGCACGAT GGACCAAGTG CACCGGCTGC CGACGTACCT CATGTGCGAC
   G T M D Q V H R L P T Y L M C D
251 ACCTCGTGGG AGCGCATCAT CCTGAACCCC TCGCGCTGCG CCATCCTCGC
   T S W E R I I L N P S R C A I L A
301 CTCGTGCCAG TGGGGCACCG TCTCGCGCTC CTACCGCGAG GACCTCCTCC
   S C Q W G T V S R S Y R E D L L R
351 GCTCGAGCCC CCTCAGCGGC CTCCTGCGGA ACCACGCGCA GCCGTTCCGGC
   S S P L S G L L R N H A Q P F G
401 TTCCCAACG GCATCCCCGT CAAGGAGCGG GAGCGGATCA TGCGGGAGAA
   F P N G I P V K E R E R I M R E K
451 GGTGGGGAGC GACCACAACG TGGCCAAGGG CATCCTGCAG ACGCGCTACT
   V G S D H N V A K G I L Q T R Y F
501 TCGGGTACGG GGAGCCGGAC CTGGCGGTGC CGCTCTTCGC GTTCGTGGGG
   G Y G E P D L A V P L F A F V G
551 CGCATCACGG AGCAGAAGGG CGTGCACCTG ATCGCCAACG CCATCGAGGA
   R I T E Q K G V H L I A N A I E E
601 GCTCATCGGC CACTTCCAGG GCCGCGTCCA GTTCCTCGTC GGCGGCAAGG
   L I G H F Q G R V Q F L V G G K A
651 CGTCGGACGA CGACCCGTAC TCGAAGGGCG TGGCGGACAA GCTGCACTAC
   S D D D P Y S K G V A D K L H Y
701 CTGCGCCACA AGTACCCCTA CGCCGTCTGG GCCGCCCCCG GCGAGTTCTT
   L R H K Y P Y A V W A A P G E F F
751 CACCGACGGC CCCCTCGTCA ACCTGGGCGC CGACTTCGGC CTCATGCCGT
   T D G P L V N L G A D F G L M P S
801 CGCTCTTCGA GCCCGGCGGC ATCGTGCAGC AGGAGTTCTT CGTGGCGGGC
   L F E P G G I V Q Q E F F V A G
851 ACGCCCGTGA TCGCGTTCAA GACGGGGGGC CTGAAGGACA CGGTGCACGA
   T P V I A F K T G G L K D T V H E
901 GTACAACACG ACGACGCAGG AGGGCAACGG CTTACCTTC GAGGCCACA
   Y N T T T Q E G N G F T F E A H T
951 CGCACGGCGA CCTCGTCTAC GCGGTGAAGC GCGCGCAGGC CGTCTTCGCG
   H G D L V Y A V K R A Q A V F A
1001 GACCCCGCGC AGTACGCGAC GCTGCGGGCC CGGGCGCGGG CCTCGGTCAT
   D P A Q Y A T L R A R A R A S V I
1051 CGACGCCGAG GAGGTTGCGA TGGCGTGGTA CGCCGAGTTC GCCCGCCTCC
   D A E E V A M A W Y A E F A R L R
1101 GCGGCAAGGT CCCCGCCATG CGCCCAAGG AGGAGGACCT GGGTGCGCCG
   G K V P A M R P K E E D L G A P

```

1151 GAGGCGCTGG AGGAGGTGCG GGCGATGCGG GCGAGGGGCC CCGAGCCGCG  
E A L E E V R A M R A R G P E P R  
1201 CCCGCCCCCA GCCCGCCGTC TTCTTCCTCA ACAACACCCG CGCCCGCACC  
P P P A R R L L P Q Q H P R P H R  
1251 GTCCAGATCT CGGGCTCGTG GGACGCGTGG GCGCAGAAGA TCAGCCTGGA  
P D L G L V G R V G A E D Q P G  
1301 GCGGGGCCAG GCGCGCACG AGGACGACTG GATCATCGCG CTGAACCTCC  
A G P G R A R G R L D H R A E P P  
1351 CCGCCGGCTC CTACGTCTAC AAGTTCATCG TGGACGGGGA GTGGAAGCAC  
R R L L R L Q V H R G R G V E A R  
1401 GTCGAGGGGC AGCCGACGGT GCGCGACTCG GCCGGCATCG TCAACAACCT  
R G A A D G A R L G R H R Q Q P  
1451 CAAGGTCGTC GTCGGCCCCA CCGGCGAGAC CCGCAAGAAG TTCAACACGC  
Q G R R R P H R R D P Q E V Q H A  
1501 GCCTCCAGTG CTAGGCGCTA CGTATCAACA TTTACGAGTA GCTTTGTTTT  
P P V L G A T Y Q H L R V A L F F  
1551 TTGGGCCCCG CGGGCCTCTC GTAGCAGCAA CGCGCCCTTT CATTTCATA  
G P R G P L V A A T R P F I C I  
1601 GACGCATGGC GCACCAATTT TGAAGCTGTG GGCAGTGTGA AAATGTATAC  
D A W R T N F E A V G S V K M Y T  
1651 TACGGGGGTT TTCTCTTTAT **GA**  
T G V F S L \*

**Annexe 4 : ADNc complet et séquence protéique de la phosphorylase de *Cyanophora paradoxa*.**

Les codons start et stop sont signalés en gras soulignés, et les primers ayant servis à la synthèse de la sonde utilisée lors du criblage de la banque ont été surlignés en gris sur la séquence nucléotidique.

```

1 CAGGAATTCG GCACGAGGCT TATCTCGCAG CTCCTGCCCC GCCACATGCA
                                     M Q
51 GATCATCAAC GAGATCAACC GCCGTTGGCT CATGGAGGTC GAGAAGCGCT
   I I N     E I N R     R W L     M E V     E K R F
101 TCCGCGGGGA CGGCCGCAAG ATGGAGAAGC TCTCCATCTT CGAGGAGAGC
    R G D     G R K     M E K L     S I F     E E S
151 GGCTCCAAGA TGGTCCGCAT GGCCAACCTC GCCATCGTCG GGTCCCACGC
    G S K M     V R M     A N L     A I V G     S H A
201 CGTCAACGGT GTCGCTGCCA TCCACTCTGA GATCATCAAG TCGACCATCT
    V N G     V A A I     H S E     I I K     S T I F
251 TCCCCGACTT CGTCACCATC TTCCCCAACA AGTTCCAGAA CAAGACGAAC
    P D F     V T I     F P N K     F Q N     K T N
301 GGCATCACTC CCCGCCGCTG GCTCGGACAG TGCAACCCCG CCCTCACGTC
    G I T P     R R W     L G Q     C N P A     L T S
351 TCTGTGCACC AAGTGGCTCG AGGACGACTC GTTCCTCACC AACTTGGACG
    L C T     K W L E     D D S     F L T     N L D A
401 CGCTCAAGGG CCTGCGCGCG CACATTAACA ACCCTGACTT CCGCCGGGAG
    L K G     L R A     H I N N     P D F     R R E
451 TGGGCCGACG TCAAGCTGAA GAACAAGCAG CGCCTCGCGG CCCTCATCAA
    W A D V     K L K     N K Q     R L A A     L I N
501 CAAGACCGTC GGTGTGCAGG TCGACTGCAA CGCGCTCTTT GACATCCAGG
    K T V     G V Q V     D C N     A L F     D I Q V
551 TCAAGCGCAT CCACGAGTAC AAGCGCCAGT TCCTCAACAT CCTCTCGGTC
    K R I     H E Y     K R Q F     L N I     L S V
601 ATCCACCGCT ACCTCGTGAT CAAGGATGCC AGCCAGCAGG CCAAGGCTGA
    I H R Y     L V I     K D A     S Q Q A     K A D
651 CATGGTCCCC CGCGTCTGCG TCTTCGGAGG CAAGGCGGCC CCGTCTGACG
    M V P     R V C V     F G G     K A A     P S Y V
701 TCATGGCCAA GCGTGTTCATC CGCCTCATTG GCGGTGTCCA GCAGGCGGTC
    M A K     R V I     R L I G     G V Q     Q A V
751 AACAACGACC CCGCCGTTGG CAACCTCCTC AAGGTTGTCT TCCTTCCAAA
    N N D P     A V G     N L L     K V V F     L P N
801 CTACAATGTG TCCCAGTGCG AGGTCATTGT TCCAGCAAAC GACATCTCCC
    Y N V     S Q C E     V I V     P A N     D I S Q
851 AGCACATCTC TACTGCTGGC ACGGAGGCTT CGGGCACCAG CTGCATGAAG
    H I S     T A G     T E A S     G T S     C M K
901 TTCTCCCTCA ATGGTGGCAT CATCCTTGGC ACTCTCGACG GGGCCAACAT
    F S L N     G G I     I L G     T L D G     A N I
951 TGAGATTTCG GAAGAGGTTG GGGACGACAA CATGATCGTG TTCGGGCTGA
    E I R     E E V G     D D N     M I V     F G L K
1001 AGGCACACGA GATCGAGAAT GCCCGCCACG AGATGAAGTT CGGCGGCAAG
    A H E     I E N     A R H E     M K F     G G K
1051 CCCGTTGATG GCGGCCTGCA ACGCGTGGTT GACACCATCA ACAAGGGCTG
    P V D G     R L Q     R V V     D T I N     K G W
1101 GTTCGGTCCT GCGGACTACT ACGGCCCCCT CCTTGGGACT CTGTACAATG
    F G P     A D Y Y     G P L     L G T     L Y N G

```

1151 GGAACGATTT CTATCTTGTT GGTGCTGACT TCGCATCTTA TTTGGATGCC  
N D F Y L V G A D F A S Y L D A  
1201 CAGAACCGCG TCGACAACCT CTACAAGGAC AAGGAGAAGT GGATTCGTAT  
Q N R V D N L Y K D K E K W I R M  
1251 GTCGGTCATG AACACTGCTG GTGGTGGCAA GTTCAACTCG GATCGCACCA  
S V M N T A G G G K F N S D R T I  
1301 TCCACGAGTA CGCCCGCGAT ATCTGGAACA TCCAGCCATG CCCCCGCCCC  
H E Y A R D I W N I Q P C P R P  
1351 GCCCCCAGT GA  
A P Q \*







```

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
T. thermophila -----LCVHSIMDLQNTIDHQINELQESSKPSLQSLKISIIIMEDLQYDQGSNTLYIPYHILKLGIQAGK
T. gondii -----
C. merolae -----
G. sulphuraria -----
T. vaginalis -----GTSIGIGSLARRQQLGPGVGSFAQRSATAAPSNIIGSLTLTEVPKLERDEAAQAQPENLPA-----
E. histolytica -----AVPKVSIINEPEFKITEGSIL-----
D. discoideum SNNPLSTSFMGPRNSNSNNNNNFLTSTPFDPAGSLTSGGMPTRYPDSTFFSTASSRAPPACDAIPSSNVIQIPQSNINAGSSMLSVSPSPSSLNMM
A. thaliana SSIII -----
C. reinhardtii SSIII -----
C. paradoxa -----

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
T. thermophila L-----DIYLTSYIAHILNKNLKNLFAHAFSAKQGAQVYIENYHKM-----
T. gondii -----PMLEQDVQDA-----
C. merolae -----QDVLDEVQQLLERSTWVYIE-----
G. sulphuraria -----
T. vaginalis -----DYDPQHMFSTIQCGMQSPVFRATIAAILARGLLDVA--FAYTL-----
E. histolytica -----TIHQNLNALITGNRNDLMFYKIALDQLSLILFPSSSKQFNBA-----
D. discoideum IVGSLSSASNPLSSGGFNRMQSGGFELNQSNSIQPVIVPPTSSIPINVOSSSYSSNSNPISSSPNSQLLQOQQOQQOQQOQQOQQOQQO
A. thaliana SSIII -----
C. reinhardtii SSIII -----QVVTTSASQMSAQQLERFTAESYLNLAEEAGLAVDQKQKQI-----
C. paradoxa -----

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
T. thermophila LVQIYKGVSQLK-----
T. gondii -----
C. merolae -----
G. sulphuraria -----
T. vaginalis VNNYAKEIEDADI-----
E. histolytica ETSFTQTLKSINT-----
D. discoideum QQQLTPQMPAIGSTIVPASSFFKAPSQDLLSSQSTSSISTQSGVNTSSSSSSSSSSSSSTSTSTSTLTSVNGGNSNMNTINISKAHMDTVK
A. thaliana SSIII -----
C. reinhardtii SSIII TAPQA-----
C. paradoxa -----

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
T. thermophila -----FDKATYHYRQKVMVFAKDS-----
T. gondii -----
C. merolae -----
G. sulphuraria -----
T. vaginalis -----
E. histolytica -----
D. discoideum SLSKPIVGLSDHKFPWLDITIIYWRNDETSNVVVDDNDISNGINLEIKQILLTEQSAGRLDHYLESKLVTSIHNRLNIIESKTNEWVEPIYNYIKSV
A. thaliana SSIII -----
C. reinhardtii SSIII -----
C. paradoxa -----

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
T. thermophila KFFKTEVQATLLELERTLSDMIAR-----DPKLNHY-----
T. gondii -----VLGSPDDGTNGKFDLKSIIHQYAERR-----
C. merolae -----DGARGGASGRGANKPPAFFSSAGWER-----LQTLLE-----
G. sulphuraria QKTSPGDVAGILGAEYK-----
T. vaginalis KPATQNDSTSAFDNSYQTLNASMNI-----
E. histolytica KIQQVDEIAKEMVBEKKQFVELVNDKFPETLQKIVVFIKLMSNEFFLDSEHFQ-----
D. discoideum DIEYHNEITNSFQNIQEFNSHIWDRKQYQAFNLRIVNLRRQPPPPSSSHQAPANTPALLTTTKGIPPIPIQKNSQEEIEMSKIFQLELDIIYLVISVQ
A. thaliana SSIII NGEKDSNATSTATN-----
C. reinhardtii SSIII ASASRSSAASSTGRTEAAAGGSGYG-----
C. paradoxa -----

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
T. thermophila FEKLMIGMLGSPIQVTRDHWIMLNLIDYGVDSRRAP-FSTKISKV-----SKFLIDYLTESDQ-----YDENIVF
T. gondii -----KLRHTEPCLERRGRVILVDVR-----NPDGSSLTQAHRV-----YEQWPEALSDFD
C. merolae -----VEKALVSALCHHCEVDVDRVLLSVLYDGHPLQLAGDALPVAVTCV-----EPVTVCIPFASEADREAFQQRVAVLRLFRFPWPNKNKNGY
G. sulphuraria LERVLIPPLGHPVPEVRETVLPLANVLYDGHPLQLTES-LNVSVQCV-----ETADLEIPVHGLT-----DIREID
T. vaginalis EAQIYEFVAKDKINALFDQFNVDPLVCTPHARNFIESIIAPLCYHETPSSARRAAALYTNFLNYHN-----WDPSVTKV
E. histolytica IERLFSILGYPIDQESTCLILNCLDGHLLHQFTKPFIEKILQV-----DITLTLTNTFKHPL-----FEHTLKN
D. discoideum HYYSKYIEKLLIGTMCHTSADVRQSSVRLANVLYDSHTWQFEEP-LKPVIRVIG-----DAFRILELDDQL-----PENVLKR
A. thaliana SSIII EVSGHSLPAAKVDVQKSSVLAN-----ERNVL-----DRSDIED
C. reinhardtii SSIII YGRSSVSLVAEPPSAPPAASPPSYGASGSGGGGSPKGGATAFVSSRDYAKDMASLVELDATI-----DDEEEE
C. paradoxa -----

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
T. thermophila LVKSLIFLPSTRQNVLSIHKRIKEFAVVGK-----YISVQLDL-----
T. gondii ASLPALAAASACMHALSADVPSEK-----SRSRLRE-----
C. merolae TREVLKQATNSLQGGSRPERSPSDDGPQQRKPSLATETGPNATSTSPSREQTADQWNTNAEEEAQELPVGTHALWAACHGHWSYPIVQGESILVHL
G. sulphuraria NYVLCSETNRESYLAPCRWLRYSL-----YKNGYLKV-----
T. vaginalis TYKTFIPFPQGGSKLLITATK-----GKQFFLRQ-----
E. histolytica NKGLIAEVTVPQLPSLNVDSEVKRTTF-----YMPINMNI-----
D. discoideum IYITVQPPQRLTNFKSSSTIKIGTYGKNQNLQSSSAIFTKHKPKVD-----GCKLYIDL-----
A. thaliana SSIII GSDRLDKKTTDDDLLEQKLLERE-----
C. reinhardtii SSIII APPROVPEASTRTQPYAAAASR-----FEALLSER-----
C. paradoxa -----

```

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

T. thermophila | GFRKRC---GFDYDKLVKLMETGEI---MSVYKIADLDRS-----DKEDSEFTTRPVCGGRFVHVEDSKDQLMHEFTFDLQDGVPPD-  
T. gondii | AGVSFAFHDPDQGTVTGE-----CPEAEGGDKVVAEVRFFD-----  
C. merolae | GSFEQP---GFDYMYIARASD-----GVASPLVIAHPVV-----YADVPMGDFRRLRGGFVHVEDSKDQLMHEFTFDLQDGVPPD-  
G. sulphuraria | KGLPFGFSRSFDDWYFAEKPKDVKPESSVFVLPFVS-----LPPFCARLQKGRFVHVEDSKDQLMHEFTFDLQDGVPPD-  
T. vaginalis | TGKTYPTNTTGFDDVAYARILPSG-----EYEVKDNVQVVRVYVHVEDSKDQLMHEFTFDLQDGVPPD-  
E. histolytica | GNTIQP---GFDYVIGTILVNGQFV-----ECQCSGGVQTSRRTVHVEDSKDQLMHEFTFDLQDGVPPD-  
D. discoideum | PSFYRA---GFDYWRVVELKSNKGFVSFDFTFKLSSKDNKQTDSSASSSSSINDNQPMISDENIKQGRFVHVE-KLREEIMHVEVWDLQSDIWDP  
A. thaliana SSIII | -----NLRKKEIETLAAENLARQDRMFVYVPI-----  
C. reinhardtii SSIII | RPAGATVNGAQAMLEAREKKA-----SSSSSAGGVNCAAVNGAAADDEQAAKCAARAAVAEVEG  
C. paradoxa | -----

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500

T. thermophila | ERGKIVKRNFRKVKDRPAPYKQMLN-AYVLMGALERDNGIYLDEQTKQFNVKRPEVSPLSITCRSTPNSMLCGKQSKELTKKASST---GMRITVDC  
T. gondii | -----HRIKQQLQFSAACLS---TCLCHASR-----EKSQPTVGRQNRLTASRDRSRHAREASSVQSE  
C. merolae | TTGALLSRCSFSDAVQELPRLAASCIT-GHYVSCDTER-----RLDEHEPTPHVVDAMPATILGGVHRRRMCABARRH---QLATVDC  
G. sulphuraria | KTGELKRRSFDLVAQRPLDLRLDIT-HVYLMGALAT-----PTDDPEAPPEGAESQAPALIGCALAKFKVQSENRH---GKVTIVDG  
T. vaginalis | -----RFDALDAQEDLADNVEVT-AHVHFCALAT-----TKPYLLTHVTDHVSIVKSCGGLIELEKQFAEHRNH---KLRVLDLF  
E. histolytica | -----SEMCKYPELLTSELMEG-----IGANTVHLININASKRILEDDAPQQLTERVHVEFDVDPINIMVDF  
D. discoideum | YRGEMTKKRIQNLIDADHYHQECIT-TEVVMGLPEK-----LPSNQPLCPTRDLANRLTGGDQMSGLVNRKQI---GKIVIDS  
A. thaliana SSIII | -----VKPDEDI-EVFLNRNDST-----LNNEEDVLMGAFNEWRW---KSF  
C. reinhardtii SSIII | HRAVDVVAQREHWSIITVPEKPVACAPLQVFNRRQSE-----KLRNRPHIVMQYGFNHWLPEEAGNS---IDL  
C. paradoxa | -----

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

T. thermophila | LTRISSSRAEKK-MRNLIIHSLDQGGKQT---PVFGSGRAIFFE-DITLINVKPKKVDLMIEEITSTFTDTPVNSGLHT---DNGQAWPQFRLLDRDE  
T. gondii | SSRKKEVAGEE-VPVAVSSSV-----GVDFFERSGHSVMVVTNLSDRTHDKSVSLQALRPAFRQRI---KHWHLQI  
C. merolae | LDRVSLARARRR-VRRIYVYRIVDAKRVQVLPHPGTCHEVQWE-DTALINVRLESWYSLIEDISQMATHEGAGCGVRL---DNAQCVPCVLADPVE  
G. sulphuraria | FCRVSRNABRRK-VNPLVYTKNSEGLLI---PHAGIDGRELQWD-NICLQINRKFEEAWLDFYQDLYRLLIHEGLQCVRLL---DNAQSYPLMKADLEE  
T. vaginalis | EPLVSLMSSRK-VSMYNTVHIDFEGRLV-----TVVCPKTEVTLNVRSTKLWELFAKISTLAELPQVCSFFLL---GDVSHMDVYGRDLQE  
E. histolytica | PHEISVSSVSSPRAFMCKT-----INNEFAGNGDSVFMNRSIACWEKAVEEIKLETYKTRIDAVRITSDICSDIPIAAMNTITAKG  
D. discoideum | TRRLSSKAAERK-VKGVVCHTLDNNGQLS---RLGDTSSSEFTWN-DCVSMNMRKLSVWEVQVETLLWGRD-CVDGIRI---DSAITCPLLFRSNLDE  
A. thaliana SSIII | TRRLKWTWEDWLSCLLHPIKBEAY-----KMDVFVFNQGSVYDNDSDKDFVETIKGCMDKVDF---ENFLLEEKL---REQEK  
C. reinhardtii SSIII | FPAPTPKSDVTDFTCRMQVPEETY-----ELNFTLHDKAGAVENNNMGDMFTYFVEAGIDY---DVTWDTAAE-RIVAKE  
C. paradoxa | -----

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700

T. thermophila | MYRKTATADATTEKQTEEGELVEQNEED---CGYWASSYK---DILENPFVVKTCRN---LWSRYENFLILCEVWGSFGEQDVEVSVIQSGPTFR  
T. gondii | -----CQLRSCNCEANLAFLACHETLQ-----HPGLFNASLRSGGAH-----PCNASARTSIEPD  
C. merolae | LARIDNNGIAHDDDEEKAFGDVLNANVE---GGVWRTDAA---IDGYPNELLKLTRE---MHWNSDFVLVGHESHFH---RERNLIVSGLTIP  
G. sulphuraria | LFRVVDGGLHSLDDLHAKVVKTNEED---CGYWLTERAA---LDPGYNPFVRLTKR---TW---NGVITPH  
T. vaginalis | LTKIDPDEPHNRENTLQGTVVDIKSE---NCGLITRKA---RSPFLMGRMSM---IWAEPDTPVVMQCCPQ---QBAFCLESQVTPQ  
E. histolytica | ITGCEVRSQITVGNDAI-----TVGYNPFVRLTKR---IWSNNDPFLVFEAPAE---ELVSSIQSIVTIPF  
D. discoideum | MYRLSDDLPHYTNQQLFEGETVMKPSSEEGKNFSGWGTTPPSPKHSTFFVNFIFIKMTR---VWNRFBQVFLAEVYWD---RELHSIISCLVBY  
A. thaliana SSIII | IAKBBAERERQKEEKRIEAKAAEAD---RAQAKAETQKRRELLQPAIKKAVVSAENVYIEB-SDFKAEDTV---KLYYKRSGLPITN  
C. reinhardtii SSIII | LARREAKAAEEERKAAEAAMEEQAKE---FGERKPAELKNNLGSLOEGGTAALIRNGVVPVYKVTBALPVAGGKAVV---QYNRGGSPHAFPIE  
C. paradoxa | -----

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800

T. thermophila | TFKPIAIAISQIGENLRKDGITISIE---RKTIVSVFKWLAQREIIEGSLVQSTTYHTMYPALLYKKGWAVDFFTECDIEMT-FIGLGNFFS  
T. gondii | VISIEELPDEPHNRENTLQGTVVDIKSE---LPAMPYSSVIR-----CFTLLPLTPPSQAPAPVSLACSPSLYTFCC---SLLRQLCLR  
C. merolae | LTRVATLHAGISGKSLRRDGSVRLGENKHTVDFIARLRNDAAHAFSCAIMVGGTCSDTSPYPSVLYGRRAWLVDMLCFPDIPELL-LLQEDGRAY  
G. sulphuraria | TTRVAQLIASICGSLRRDGSVSKLPESRKSTARTLSRLRSCKYTMPCALIQCTCTHNSYPGVLYGRRAWLVDMLVPEPEVPEL-PEYENGRMY  
T. vaginalis | CSEFADLLINEINNASHTEDPHY-----IAASSNLKFFMEERQERLPEGLVVTVPFSSMTTGIAPLPIERYQL-RADLPEPHDVTPTGNCNLQTLVLP  
E. histolytica | IDDLNPLWSPNCKTMQILCSNDEKLENSKAPYYPDK---POCTTFAYQFQAMQP---SILHVFSSPILPCLTPLNSYDK  
D. discoideum | SSAIPKATASVSDKGISKGI VFDLRQ---RQSVKALYDYEMRMSTYONSIIILYPSSTHHSYPLQLYNAGAWAVDLMYFPEIPBIT-YIGENQWY  
A. thaliana SSIII | SKEL---WHDGGANNVVDGLSIVVKLVNAELKVDPKSGNNWFAEVVSGCALVIDWVFDAGPKGAFLYDNNYQDFHALVP-QKLPEELVLEENMIF  
C. reinhardtii SSIII | GESV-KLHYGFNGWQESGKAAMTRVFPVPAKPAAGAEDEENWEVEVDENIYAVAMNFVFNYYE---HYDNNKGADYKAVGFPAGTILEAWAAGLCEQY  
C. paradoxa | -----

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900

T. thermophila | IAKRIIEFLKTYLDGHAFKIKTTNIFSQVRIEQNDESDTLTTI-----KETEEDTNYIQEVQKQKRSRQIESQLFLSDEGQFGWGSYBPR  
T. gondii | RLHQSPGGSL-----  
C. merolae | RINMASVSRVDPDNLLEVPKSPRLGGHGLFRGSSVAGSMMLHLQOTSMGDVRLKRSQRETLGLARLSSTNLLGRNTNRNRADESGSMGAAAAMVR  
G. sulphuraria | RBNMATVQSIEHTEFFYDNYENVLKSPRSTDSPPADGISTL-----VLDELSHLDTDSPSKALTPSSAKKKKKKSLFSLKRSKSSGSSQLVR  
T. vaginalis | TAYDNTSKPKVY-----  
E. histolytica | NHIELNKKRAL-----  
D. discoideum | HVDIHTSRVKVG-----  
A. thaliana SSIII | RKLQEDRRLKEE-----  
C. reinhardtii SSIII | RVMLAKRRAE-----  
C. paradoxa | -----

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000

T. thermophila | TVSKRKSIVRVSSGQSFDDVNSLNEHTKSVFQSQGEWFGPSLQNSKHYESRRLRQTKKPKKQVFIPLLAHEKFG-WHTHTIACMTKQFCIUVLN  
T. gondii | -----AGVAQSRKSLRANMILHLSQVAG-----DTLFAKAGEKASVAEDL  
C. merolae | SRSTEDMLKLSIRSVSAEDIRQLDAEEDIRREIQPGEGYDIQIRGHYBHLRLRASYEALREGHVAT---VVREQAKYVLAFAFRSTDDLSIVLFTN  
G. sulphuraria | SQSIDVVRGMSIRSVVDDIGSLRLEEDTRKIGPGVGYDIRMTRGHYBHLRLRASYEALREGHVAT---VVREQAKYVLAFAFRSTDDLSIVLFTN  
T. vaginalis | -----RVNPSATKFNALCKQRAQSRSRADWIFNGDVQVVPATYNHE-VNNAVSATIRICEENNRALIT  
E. histolytica | -----IRBEVEHLMIF-CKIKVISMVNDIGTKSDRTIGIMREHSHSATAALVA  
D. discoideum | -----MSATPYQLQYQIRGHYAHVVALEKSHALRRGGMIPLCYHATG-WHDRVFGARFSGNEVAIILN  
A. thaliana SSIII | -----VNRKMKETARLKAETKERTLKKFLSKQKDVVT---EPLRIGQGNV  
C. reinhardtii SSIII | -----BAKBERORRADEKKKLAQDLVKAVERKVRH-VLYTVPEVVEAGEEV  
C. paradoxa | -----

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100

T. thermophila FNDAPV-----QAYINLKPQRQYFFNVEDSDLVVQMSW-----VKDEYEDNQLDHFVIGLINE-----RLFISLHNHSHHWGNLFDGDD--TKQR

T. gondii FAEFLDDELG-----ALNVRHCLGKQQRQEGPHAEBSR-----PSASLSLSCISDWSKIFRHEELACS

C. merolae VRGGHDGAPPVVDITVLDLRTAEALVAARFNGCTYFGPWDRITELRDCFTGARESRNAFESFLFR--RLQITIKLETRILELCPSSAAESSTDL

G. sulphuraria MKCDDLGNFRPCEVELDFKPLSETLRNE-----IYQNEKDKLFYELCFCTKESYPELLTFHLLFR--KYPVKLPLGLTIVL-----SPERSQSR

T. vaginalis SSFYYPHLIF-----ELSTSNLPIFKNTLSHE-----SIIEIVPLLETFQGGSSNSDRQYAYNBAASEGSQLFFDIPYATNLNLEIRLKSPPIEPTVQR

E. histolytica INTINSSSTTV-----HFDLHELKQKHEQPDD-----AVFEVIVDVVTHKRELMSTF--ELKNE--HIPKIKLEPFDIACQFSLYKPHANVRVAL

D. discoideum FNDTDT-----EFYVDCSPLAKICSD-----TIYRMVDLINPSNPPQYLSLNLLEHE--KHFVVVPGYSSICWGI--YHVQVGSFAAMR

A. thaliana SSIII TLYNPAITVNLNGRQEVWFRGFSFN-----RWTHRLPLPQKMEATDDESSHVKTTAK

C. reinhardtii SSIII TTYNPRDTPNLGRQQLVLMGGWN-----RWTHK-RSEGPVAMHPPEAGGEHWQATVM

C. paradoxa -----

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200

T. thermophila VAESHSPARFKQSLSLTIPMTIYSNDIASQLKLLSRK-PNLQDFVNGYAYLVNTKLDVNL--NNAIALLRDF--QKDNALCRKIFAYFQALINKNAEN

T. gondii DSSP-----LKRLLVAGKTLQAPPSSHSDFVPPG

C. merolae HQOQTV-----QRIDEDDEMLLDARANWLA--GYLARHCYDLKAFARALGFLQGLLAPGKQQLTEARARHLMCVCLRTALLAGBOEPFH--GFRVAVSG

G. sulphuraria ENEHLHLEQCLARQMDQVMDKDPRENALA-WKLTFRRAADSLQQRSNVYDIYSLMSASGLM--ESTIVLHCSVCLQRTATVPYEAFAKPLNLS--PPRG

T. vaginalis TRLEHVYTRLELAFNVNLSISVLANNELMIKILFRDDEENKDBALEKIIAMPLRANAQ-----QEIIFRNALFFATRHRSNRDLTKLSEKDEVIQAR

E. histolytica EHQCISIRRCMLLQV-SGESAVGNSIFEIEFTDLKENKAKDKSLYQLTQKSLKDGAAKNEQ-----NKLADLVQEPFHQIINIDGLNRNK

D. discoideum VLYEHSMTRLKQLADVDPSNN-----LIYSLIKKSLSSIEEFKGTLENILSNLNGTEK--TFSSVQSVLYTLTKTQFDGATLQYLDVLSKSKTQS

A. thaliana SSIII VPLDAYMDFVFSKEKDG-GIFDNK-----NGDQHLFPVGGISKEP

C. reinhardtii SSIII VPKDAYKMDPVFADVAGDGTYNR-----GGFDQHLFVPEGSPVRES

C. paradoxa -----

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300

T. thermophila PKIEKI-----EFFKKTQEVVES-NKLGPICFVTPYAKWTKTGGGLVMDELSSRGVLD-LGEDVYVYVTHIDNKLREK--PDLL-EKDCFKHT

T. gondii DSSP-----IALANEVLEK-NALGALCFVTPPELGRMSVGGGLGMVDELSTTLATELQORVMVWVSPYDRNRKGE--QDYI-ARDGIIHHA

C. merolae ERLLAYLMLVLSCCGIDAL-RTVARRITLGG-NRMGPIVLFSPPELGRFSSTGGGLGMVDELSSKGLAD-LGLDVIYVISPATFNRRGE--TRVY-ERDGIKWT

G. sulphuraria ERVLSLLIHLSCCAKDFQFRKTCQKILKNISELGPVIVPELGRFSSTAGGLGMVDELTKGQAA-LGSBVIYVISPYSVNRKGO--KRYL-EPDGIKWT

T. vaginalis EKILMARLAKCAQASKMVTPSQFAQKVLDS-NMLGPIVFPPELGRFSSTAGGLGMVDELAKBQVS-LGVDSVISPYSVNRKGO--KRYL-EPDGIKWT

E. histolytica IPIIGINTLQTSRESSVAGEICRIALFK-NMLGPIVFPPELGRFSSTAGGLGMVDELTKMAE-LGCEVVISVISPYSVNRKGO--QNYL-KNEGTQOI

D. discoideum PKIP-----KICREILQH-NMLGPIVFPPELGRFSSTAGGLGMVDELTRSQOL-LGCEVVISVISPYSVNRKGO--QNYL-KNEGTQOI

A. thaliana SSIII PLH-----IVTAVEMAPIARVGGGLGVVTSLSRAVQE-LNHNVDIVFPRKDCIKHNF--VKDQFNRSYHWG

C. reinhardtii SSIII PLY-----VAHTAVEMAPIARVGGGLGVVTSLSRAVQE-LNHNVDIVFPRKDCIKHNF--VKDQFNRSYHWG

C. paradoxa -----

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

T. thermophila DTISYYTGGTEY-QGVHFC-EYKGVKLYFLHNADMF-----PAPFAG-DDAVYTVKSIATVAVVTELELCKRGIHPALIVSNDNYSGLIPEIKKIKKTEGFT

T. gondii FNVTVNNGESI-TLGVHTGSVVSQVLEPLHCAVVF-----PCTYPD-VYGLEQIRFIVYPAKALELFCGLGTIPELITINDMPTGHPAYAKORFEGSV

C. merolae RNIDWRGQNVGVAITGIFEC-LENSVRLHFFENHSYF-----PRVYDQLSSQARMEMVLANRGVLELCHKQLRPSLLVTDNDWMLGVPAYSRGLVYGGY

G. sulphuraria RNIQVVRGSRDV-TVGVHFC-VVEGVHLEPLHGEYF-----PKVYADMANORRQLELITVLSLASELVCOKSLEPPALITINDWMLGVPAYSRGLVYGGY

T. vaginalis RTIIDYAPDKF-EVGVHFC-VVDGVKIDPLHNYTF-----STPYPT-GSTSXYKLOYLIMAKGALBELCOERLHFSVAVITINDWPTGLVAYARQT-FGVS

E. histolytica GSVIVVEVAHEPV-SCGVHFC-RENNVLDLPLHNYDF-----PMAYPP-FNAERHLRSAVLGKSSLOLCKDGHPSLITINDWPTGLVAYARQT-FGVS

D. discoideum RNVLYTVGPDV-EVGVHFC-MDKCIIHLEPLHFEYE-----PTHVNS-GSPIHQKTIIVLPAKASLELCOERLHFSVAVITINDWPTGLVAYARQT-FGVS

A. thaliana SSIII GT-----ETKVMHC-KVECLSVYVLPDQNGLEFORGCWYGCADDAE-----FGFFCHAALFELQCFHEDLHCHDSSAPVSMVLFQDHYTOYG

C. reinhardtii SSIII GT-----RIYVTA-VVENLRVFEPEKNGFAETIVYGRYDEVR-----DFDFCKAALEFLKTCRQDILHCHDSSAPVSMVLFQDHYTOYG

C. paradoxa -----AKGALVELCAYGHPAVVCSNDMPTGLVAYARQT-FGVS

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500

T. thermophila FSGTKIPIEHLAHLDTT-YEGRYVP-NPQOGLGWHLEPLHNLDPVYKMLVNPSCRCAFMTCNNGTVSHSKYQLLRE-----SALTPIHNSPNAF

T. gondii FDCIPIEHLAHLNDS-YEGRYVL-NKRD-VVWHLPLDLDVDPHWHFVNPSCRQVLLQDQGWTVSESRDELNNEGGKGNASLAPLRLRHHHFF

C. merolae FDDTFPHIHLNLDGDAVEGRVYF-SPAEGAFEAHOLPRDIDVPTNRRVVPNSRAAFKCAHNGTVSESRDELNNEGGKGNASLAPLRLRHHHFF

G. sulphuraria FENTTFPHIHLNLDGDAVEGRVYF-NESELEFEDVHRLVYSLVFPDSNQPIVNPSCRALCSDTNGTVSNVLEBELTF-----HPLKHLRLARQPF

T. vaginalis FEQTDFPHIHLNLEK-GYKLIWPSDQNTCALHYLHLEPLHNLDPVYKMLVNPSCRCAFMTCNNGTVSHSKYQLLRE-----SALTPIHNSPNAF

E. histolytica FKQCDFPHIHLNLEK-GYKLIWPSDQNTCALHYLHLEPLHNLDPVYKMLVNPSCRCAFMTCNNGTVSHSKYQLLRE-----SALTPIHNSPNAF

D. discoideum FNGTDFPHIHLNLEK-GYKLIWPSDQNTCALHYLHLEPLHNLDPVYKMLVNPSCRCAFMTCNNGTVSHSKYQLLRE-----SALTPIHNSPNAF

A. thaliana SSIII LKTRIVFTIHLNLEF-----ANALC-----KAMTFADKATVSEPTAKSVAGN-----SVISARVYKH

C. reinhardtii SSIII LHKPRVFTIHLNLYG-----QKKIC-----BAAHACQKFTVSEPTAKSVAGN-----SVISARVYKH

C. paradoxa FNGTDFPHIHLNLDPS-YEGRYVP-KEEECTMDVHRLVYSLVFPDSNQPIVNPSCRALCSDTNGTVSNVLEBELTF-----HPLKHLRLARQPF

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600

T. thermophila SFPNGI-----NIQERLQMKLNPSTDDHLKAKKIKQKYVGFQLLDNSFCLEFVGRITEQKQHLITLCAEDLTLRQSN-GRVQIHLGCGN

T. gondii ATPNGI-----PIKDRLERIKKLGFR-NHWBAKALQRHVFNFKEKDESIPLEAFITGRITQKGVHLIVELANLIRRYN-GRVQIHLGCGN

C. merolae GTSNGI-----RVQDRLATLRRVAS--SHEBAKALQRHVFNFKEKDESIPLEAFITGRITQKGVHLIVELANLIRRYN-GRVQIHLGCGN

G. sulphuraria GYNGI-----RKKEREALKTRGGG-SHLOAKTIHQREFQFTLDASIPLECFITGRVTSQKGVHLIVELANLIRRYN-GRVQIHLGCGN

T. vaginalis AFSNGI-----RFQERLKAENLKM--NHBAKALQRHVFNFKEKDESIPLEAFITGRITQKGVHLIVELANLIRRYN-GRVQIHLGCGN

E. histolytica ACSNGI-----SVVHREALKISPTLDHBECKRRLQKYFNN--VDSIPLCFVGRITQKGVHLIVELANLIRRYN-GRVQIHLGCGN

D. discoideum AHSNGI-----RVKERKOAMKAVST--DHSBAKALQRHVFNFKEKDESIPLEAFITGRITQKGVHLIVELANLIRRYN-GRVQIHLGCGN

A. thaliana SSIII GHLNGIDPDIWDPYNDNFIPTYSNVVE-----GKRAAKELOLR-LGLKSAE--FEVVGITIRLTHQKQHLKHAIRWTLERNG--QVVLGSG

C. reinhardtii SSIII CIRNGIDPDIWSPENIFLFRYSSEDDVE-----GKRAARALQR-LNLTGWDKF-IVAVVSRITQKGVHLIVELANLIRRYN-GRVQIHLGCGN

C. paradoxa GFPNGI-----FVKERERIMRKKVGS-DHNVAKGILQTRVYVYGEPLAVPLFAVGRITEQKQVHLIVELANLIRRYN-GRVQIHLGCGN

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700

T. thermophila ANKKEVAQICAKKINYLAKKHENNFQDDPLDFR-DGPIVNL-----GDRGLMPSFEPPGIVQEFFVVGTPVIAVITGGLKDTVFEEN

T. gondii ANNDQVYARCAVOMDLBARFHSFWADSEPPF-NGLVNL-----GADGCLMPSFEPPGIVQEFFVVGTPVIAVITGGLKDTVFEEN

C. merolae ANRADPYASCAVOMEYRSRYWQFWADSEPPF-DGPIVNL-----GADGCLMPSFEPPGIVQEFFVVGTPVIAVITGGLKDTVFEEN

G. sulphuraria APDRSFGQPVCGRMWLNKRVPESEFWADSEPPF-DGLACCH-----GADYFLVPSMFEPSGIVQEFVAGTCTIARFTGGLKDTVFEEN

T. vaginalis APMDPYAVASCMMKEMKQTFEPCFQCDTFFFA-DGPIVNL-----GDFTCMPSMFEPSGIVQEFVAGTCTIARFTGGLKDTVFEEN

E. histolytica ANMKDPYASSCAWSMOALCKQPESEFWADSEPPF-DGPIVNL-----GDRGLMPSFEPPGIVQEFFVVGTPVIAVITGGLKDTVFEEN

D. discoideum APD-----PRIQNDFVNLANQLHSSHGDRARLVYDPSI-SHLYVAGADETLVPSFEPCGLTQIAMRYGAVPVVITGGLKDTVFEEN

A. thaliana SSIII APD-----PRIQNDFVNLANQLHSSHGDRARLVYDPSI-SHLYVAGADETLVPSFEPCGLTQIAMRYGAVPVVITGGLKDTVFEEN

C. reinhardtii SSIII APD-----PRIQNDFVNLANQLHSSHGDRARLVYDPSI-SHLYVAGADETLVPSFEPCGLTQIAMRYGAVPVVITGGLKDTVFEEN

C. paradoxa ASDDDPYSGKGVADKHLHRLKHYAVVWRAEAGEPFI-DGPIVNL-----GADGCLMPSFEPPGIVQEFFVVGTPVIAVITGGLKDTVFEEN

```

      2710      2720      2730      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
T. thermophila  --EQT--EKQ-----SGFTFHHNSHGFAVAVTKALKL--FKNESLTKRKRKSSFOAAHIVSEVSKAYEGEYRMMFNKNEIDKQITLTAELQKI-----
T. gondii      SVESA--RQN-----NGFTFDAYTAGDFLEAIEPALRV--SDRAKTEOLRANRRLSVVSCESARAWLGEFARLRKTLFVNEKRVQEIFERLPDWSEA
C. merolae     --PVE--LTG-----SGFVFEHYTMDDFLAAACKRALRV--YAKPDEYQLRESTRETFVLDVACVABAWSREBHRVKNILPCRDDVLALDLEAV
G. sulphuraria --GDA--LEG-----NGFTFEDYALPQFVDAIKRALRV--SRQDEYQLRKRSMVESVLDVSCVAFAWYKEBHRVNLIPRRREALLQKEYVDC-----
T. vaginalis   --REK--RTG-----NGVVFWAHRHRDFIMAVRATAL--ENEPDLVNTMRKNAPESVLSLETVARAWAREFARLFCKTIWDDPVSN-----
E. histolytica --PID--KTG-----NGVVFQGFAGQDLVFAIQRAIKL--FNPEEYKVLRSNAKSVLDLTDVAIAWGTEBGRKIKKVFVFEL-----
D. discoideum  --TNT--ETG-----NGFTFSAHKHTDYVQAVRANI--FNNTHEKELRCAEESVLDMSVVAEAWAKESRMRRSLNSTNHQLQRLNEKQ-----
A. thaliana SSIII --HDK--ERAQAQVLEPNGFSDGADAFGVDYALNRAISAWYDGREWFNSFCRTVMEDQWSWNRPALEYLELYHSARK-----
C. reinhardtii SSIII YGSSDWQRC---IDANCGPAPCTDGGALDYAMNRAISAWYDRAWFHSCORRIMEQDWSWNRPAIDYIELYFSALKA-----
C. paradoxa    --TTT--QEG-----NGFTFSAHTHGDLVFAVMRAQAV--PADPAQVATLRARARASVLDABEVAMAWYAEFARLRCKVPA--MRPKEEDLGAPEALEE

      2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880      2890      2900
T. thermophila  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
T. gondii      -----DCTFDIEKYQPQMVGRVSGRIQTRTKTQQLFQNALNKVAKDDKKSIFKINVDSSKLP-----KQVQIIGSFDN
C. merolae     EWRLRRGTAPAFSSFLPSFSSESPVKPAGTVVASLPRGPIPTSPFPATLLGLLQFCEDREMHMHAADRAVQLGGRAGLSPRGDSFDVSPISEERTFDD
G. sulphuraria -----ASELSSAVKDGVCVPAVFPVDDWPDASA-----SSVSVKGSFDG
T. vaginalis   -----MSASCYSLSD--NCRYVLFYLLDDGGDRPVFLKKEKTLSTV---VIKASTRFVYFQVLGS-----RRMAELPEFEH
E. histolytica -----STE-----
D. discoideum  -----
A. thaliana SSIII -----
C. reinhardtii SSIII -----
C. paradoxa    VRAMRARGPEPRPPPARLLPQOHPRPHRPDLGLVGRVGAEDQPGAGPGRARGLDHRAEPPRRLLRLQVHRGRGVEARRGAADGARLGRHRQPQGRRR

      2910      2920      2930      2940      2950      2960      2970      2980      2990      3000
T. thermophila  WQNKRPDLK-----YDQFSREWKITLNLPRGDYFYKYITD-----DEW
T. gondii      WRVRRPLS-----WDNALQAFVLSLALRPGRYLYKLVVD-----GEW
C. merolae     WSREWPLR-----RDSKANAWERTFWLPPGTYEIKYRVD-----GEW
G. sulphuraria PLQKHPLNFTNIKQGSTFYSLTETQSLDFLLDVAPTTSPGIPSI SVDEEETPAYSGSIVSDEAPALFERPMT-----KSL
T. vaginalis   -----
E. histolytica -----
D. discoideum  -----
A. thaliana SSIII -----
C. reinhardtii SSIII -----
C. paradoxa    PHRRDQEVQHAPPVVGATYQHLRVALFFGPRGPLVAATRPFICIDAWRTNFEAVGSVKMYTTGVFSL-----

      3010      3020
T. thermophila  ICSDDDAKDTDIYGYLNNFISVD---
T. gondii      VCVSDAPQETDSLGNNTNLFQVP---
C. merolae     LVVHPKPV--TNTSGLNLLLEVPRQTP
G. sulphuraria SSSVVRQTVGIEVLLMRSVLSICVD-
T. vaginalis   -----
E. histolytica -----
D. discoideum  -VIDNRDNHSSSTQPLNSQIKQPPQQ-
A. thaliana SSIII -----
C. reinhardtii SSIII -----
C. paradoxa    -----

```





```

          1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
H. sapiens      NIMVLEKNIASGKFFSSDRTIIEYAKNIWNVE---PSDLKISLSNESNKVNGN-----|
S. cerevisiae   LKRSVLSVANVGEFSSDRTIIEYSDTIWNVE---EVT-----|
O. sativa H     TKMSILNTAGSGKFFSSDRTIIEYAKDIWDLT---ASPVS-----|
O. sativa L     TRMSILNTAGSGKFFNSDRTIIEYAKDIWDLT---EVILP-----|
A. thaliana H   LKMSILNTAGSGKFFSSDRTIIEYAKDIWNIE---ACPVP-----|
A. thaliana L   TRMSILNTAGSGKFFSSDRTIIEYAKDIWNIE---QVELP-----|
S. tuberosum L  TTMSILNTAGSGKFFSSDRTIIEYAKDIWNIE---AVEEA-----|
S. tuberosum H  LKMSILNTAGSGKFFSSDRTIIEYAKDIWNIE---ECRVP-----|
C. merolae      LAKCIIVSTARMGKFFSSDRTIIEYAKRIWRIT---ECAYTPSSITYKEPVEGVSEPTADGTAPKTLRGT---|
D. discoideum   AKKSIIMASVCCGKFFSSDRTIIEYAKQIWCIEEWKR---GPVDEVSNEEARSLLVPPPSGGSPNDINAIISIERLSPLTFVKQTSASPLSVISGGDKTNNTLKPQ---|
C. reinhardtii PhoA LRRSILMYTAGSGKFFSSDRTIIEYAKDIWHVK---PARPSA-----|
C. reinhardtii PhoB TRMSILNTAGSGKFFSDRTIIEYAKDIWHAE---ECQVPEPEAKSKSKPASS-----|
C. paradoxa     LRMSVMNTAGCGKFFNSDRTIIEYAKDIWNIE---ECPRPAPQ-----|

```

```

          1210
H. sapiens      ....|...|...|.
S. cerevisiae   -----
O. sativa H     -----
O. sativa L     -----
A. thaliana H   -----
A. thaliana L   -----
S. tuberosum L  -----
S. tuberosum H  -----
C. merolae      -----
D. discoideum   TTKGFNIGGQPGNPTN
C. reinhardtii PhoA -----
C. reinhardtii PhoB -----
C. paradoxa     -----

```

**Annexe 8 : Pathway of Cytosolic Starch Synthesis in the Model  
Glaucophyte *Cyanophora paradoxa***

## Pathway of Cytosolic Starch Synthesis in the Model Glaucophyte *Cyanophora paradoxa*<sup>∇</sup>

Charlotte Plancke,<sup>1</sup> Christophe Colleoni,<sup>1</sup>† Philippe Deschamps,<sup>1</sup>† David Dauvillée,<sup>1</sup>  
Yasunori Nakamura,<sup>2</sup> Sophie Haebel,<sup>3</sup> Gehrhardt Ritte,<sup>4</sup> Martin Steup,<sup>4</sup> Alain Buléon,<sup>5</sup>  
Jean-Luc Putaux,<sup>6</sup> Danielle Dupeyre,<sup>6</sup> Christophe d'Hulst,<sup>1</sup> Jean-Philippe Ral,<sup>1</sup>‡  
Wolfgang Löffelhardt,<sup>7</sup> and Steven G. Ball<sup>1\*</sup>

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576 CNRS/USTL, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, Cedex 59655, France<sup>1</sup>; Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Shimoshinjo-Nakano, Akita 010-0195, Japan<sup>2</sup>; Center of Mass Spectrometry of Biopolymers<sup>3</sup> and Plant Physiology,<sup>4</sup> Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, 14476 Potsdam-Golm, Germany; Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches Agroalimentaires, Rue de la Géraudière, BP71627, 44316 Nantes, Cedex 03, France<sup>5</sup>; Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS), BP 53, F-38041 Grenoble, Cedex 9, France<sup>6</sup>; and Max F. Perutz Laboratories, University of Vienna, Department of Biochemistry, Dr. Bohrgasse 9, 1030 Vienna, Austria<sup>7</sup>

Received 9 October 2007/Accepted 23 November 2007

**The nature of the cytoplasmic pathway of starch biosynthesis was investigated in the model glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. The storage polysaccharide granules are shown to be composed of both amylose and amylopectin fractions, with a chain length distribution and crystalline organization similar to those of green algae and land plant starch. A preliminary characterization of the starch pathway demonstrates that *Cyanophora paradoxa* contains several UDP-glucose-utilizing soluble starch synthase activities related to those of the Rhodophyceae. In addition, *Cyanophora paradoxa* synthesizes amylose with a granule-bound starch synthase displaying a preference for UDP-glucose. A debranching enzyme of isoamylase specificity and multiple starch phosphorylases also are evidenced in the model glaucophyte. The picture emerging from our biochemical and molecular characterizations consists of the presence of a UDP-glucose-based pathway similar to that recently proposed for the red algae, the cryptophytes, and the alveolates. The correlative presence of isoamylase and starch among photosynthetic eukaryotes is discussed.**

Glaucophyta are single-cell freshwater algae carrying peptidoglycan-containing plastids, called cyanelles, that strongly resemble their cyanobacterial ancestors. Together with the Rhodophyceae (red algae) and the Chloroplastida (green algae and land plants), they have been demonstrated to originate from a single endosymbiosis that gave birth to the Archaeplastida (including the plant kingdom) (1). This endosymbiosis involved a cyanobiont related to present-day cyanobacteria and a unicellular biflagellated heterotrophic eukaryotic host (43). In addition to acquiring photosynthesis, all three lines gained the ability to synthesize starch, a novel form of storage polysaccharide related to glycogen, the otherwise most widespread form of storage polysaccharide found in living cells.

Starch is composed of chains organized with the same chemical linkages as those of glycogen but defines a far more elaborate organization (for a review of starch structure, see reference 7). It consists of several distinct polysaccharide fractions. Amylose is composed of mostly linear  $\alpha$ 1,4-linked glucan chains. It is synthesized through the granule-bound starch syn-

thase (GBSS), an elongation enzyme bound to and active within the starch granule (reviewed in reference 4). The latter is mostly composed of amylopectin, a moderately (5 to 6%) branched polymer that has an asymmetrical distribution of branches that allows the formation of chain clusters hooked together through a number of longer spacer chains. This organization enables the polymers to partially crystallize in the form of huge insoluble semicrystalline granules that come in various highly specific shapes and sizes within the plant kingdom. Unlike GBSS, the enzymes of amylopectin synthesis are active mostly within the soluble phase (reviewed in reference 5). The pathways of storage polysaccharide synthesis have been intensively studied in animals, fungi, and bacteria (for reviews, see references 20, 37, and 42). The bacterial and eukaryotic pathways of glycogen synthesis can be distinguished by a number of very important features. These include, but are not limited to, the nature of the glycosyl nucleotide used for polymerization, UDP-glucose or ADP-glucose in heterotrophic eukaryotes and bacteria, respectively.

Starch metabolism has been intensively studied in green plants and algae (reviewed in references 5, 23, 28, 46, and 54). While 6 to 12 genes generally are found in heterotrophic eukaryotes or bacteria for glycogen metabolism, green algae and land plants synthesize starch from ADP-glucose only (27, 53), with the help of 30 to 40 genes that are phylogenetically related to both cyanobacterial and heterotrophic eukaryote sequences (10, 36).

\* Corresponding author. Mailing address: UMR8576 CNRS, Bât C9, Cité Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, Cedex 59655, France. Phone: 33 3 20 43 65 43. Fax: 33 3 20 43 65 55. E-mail: steven.ball@univ-lille1.fr.

† These authors contributed equally to this work.

‡ Present address: CSIRO Plant Industry, GPO Box 1600, Canberra, ACT 2601, Australia.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 30 November 2007.

Red algae and glaucophytes can be distinguished from the green algae and land plants by the fact that they synthesize starch in the cytoplasm and not in their plastids.

In red algae and their secondary endosymbiotic starch-storing derivatives, such as cryptophytes and alveolates, both biochemical and bioinformatic data suggest the presence of a UDP-glucose-based pathway (34, 50). However, this pathway remains to be validated by genetic approaches.

In this paper we report the first detailed characterization of glaucophyte starch structure and metabolism. Supported by a combination of biochemical and molecular approaches, we propose that the model glaucophyte *Cyanophora paradoxa* synthesizes starch through a UDP-glucose pathway similar to those that recently were proposed for rhodophyceae, cryptophytes, and alveolates (dinoflagellates and apicomplexan parasites). The presence of a functional isoamylase complex in glaucophytes further strengthens the correlation established between this activity and the synthesis of starch in photosynthetic eukaryotes.

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** ADP-[U-<sup>14</sup>C]glucose, UDP-[U-<sup>14</sup>C]glucose, and [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP were purchased from Amersham (Buckinghamshire, United Kingdom). ADP-glucose and UDP-glucose were obtained from Sigma. Sepharose CL-2B columns and Percoll were obtained from Amersham Pharmacia Biotech. The starch amyloglucosidase assay kit was obtained from Roche (Germany).

**Cyanophora strains, growth, and media.** *Cyanophora paradoxa* strain 29.80 M was purchased at the EPSAG (University of Göttingen, Germany). The alga was grown in DY-V medium (R. A. Anderson and M. D. Keller, unpublished data) at 25°C under a 12-h day/12-h night cycle (30  $\mu$ mol photons  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>) and vigorous shaking.

**Determination of starch levels, starch purification, and amylopectin structures.** A full account of amyloglucosidase assays, starch purification, and  $\lambda_{\max}$  (maximum wavelength of the iodine polysaccharide complex) measurements can be found in Delrue et al. (16). The separation of starch polysaccharides by gel permeation chromatography (GPC) on a Sepharose CL-2B column was performed as described in Wattedled et al. (51). The percentages of amylose and amylopectin were determined by pooling the large-mass amylopectin excluded from the column and the lower-mass amylose separately. The pooled amylopectin and amylose fractions each were assayed with the help of the amyloglucosidase assay. The chain length distributions of glaucophyte and chloroplastida amylopectins were obtained by debranching them with isoamylase and separating the chains through high-performance anion exchange with pulsed amperometric detection, as detailed in Fontaine et al. (19).

**Crude extract preparation and compartmentalization studies.** Cells (3 liters at  $2 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>) were harvested by centrifugation (4,000  $\times$  g for 15 min). The pellet was resuspended in 10 ml of 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0, and disrupted by sonication. The lysate was centrifuged for 10 min at 10,000  $\times$  g. This supernatant was taken as the crude extract. For compartmentalization studies, a similar cell pellet was lysed by an osmotic shock procedure. This procedure consisted of resuspending the pellet in 2 ml of 1 M Tris-HCl, pH 8.0, for 4 min and subsequently adding 8 ml of 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, to this suspension for another 6 min. After centrifugation at 750  $\times$  g for 5 min, the supernatant was spun at 10,000  $\times$  g for 10 min. This defined our cytosolic extract. A second osmotic shock was performed on the pellet centrifuged at 750  $\times$  g as described above to lyse the few remaining cells. This cyanelle pellet then was resuspended in 10 ml of 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0, and subjected to sonication as described above.

**Enzyme purification and assays.** GBSS was assayed as described previously (16). In vitro synthesis of amylose was performed by using a previously detailed method (49).

**Starch synthase and phosphorylase purifications.** The crude cytosolic extract for starch synthase and phosphorylase purifications was prepared as described above. The supernatant (17 ml) was loaded on an anion-exchange chromatography (AEC) column (MonoQ HR 5/5; 1-ml column volume) preequilibrated in buffer A (25 mM Tris-acetate, pH 7.5, 10 mM dithiothreitol [DTT]). The proteins were eluted at 1 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup> with a 50-ml linear gradient of 0 to 0.5 M NaCl in buffer A containing 1 M NaCl. Starch synthase and phosphorylase activities were monitored by zymogram analyses. Briefly, proteins from each fraction (0.5

ml) were separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) containing 0.15% of rabbit glycogen (Sigma). After electrophoresis, gels were incubated overnight at room temperature either in starch synthase buffer [25 mM HEPES, pH 7.5, 30 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1.2 mM UDP-glucose] or phosphorylase buffer (10 mM glucose-1-phosphate [G-1-P], 25 mM Tris-acetate, 10 mM DTT). The activities then were visualized as dark bands after the gels were stained with iodine solution. The fraction containing the starch synthase and phosphorylase activities were pooled and concentrated at 0.1 ml by using centrifugal filter devices (Amicon-ultra; Millipore). Starch synthase and phosphorylase activities were further purified by gel filtration chromatography (Superose 6 prepacked column; 1 cm by 30 cm; Amersham Biosciences). The samples (0.1 ml) were loaded onto a Superose 6 column preequilibrated in buffer A with a flow rate of 0.3 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup> using a fast-protein liquid chromatography system. Starch synthase and phosphorylase activities were monitored by zymogram analyses. The fractions (free of hydrolytic activities) were pooled and used for enzymatic characterization.

The starch synthase activities were measured in the synthesis direction. Standard assays were performed for 15 min at 35°C with 20  $\mu$ l of enzyme preparation and 80  $\mu$ l of a mixture containing HEPES-KOH (50 mM; pH 7.5), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.1 M),  $\beta$ -mercaptoethanol (5 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), bovine serum albumin (BSA) (0.5 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>), glycogen or amylopectin (10 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>), UDP-Glc (2 mM), and UDP-[U-<sup>14</sup>C]Glc (2  $\mu$ M). At the end of the incubation, glycogen or amylopectin was precipitated with 1 ml methanol-KCl (45), incubated at -20°C for 10 min, and collected by centrifugation (3,000  $\times$  g, 5 min, 4°C). The pellet was resuspended in 0.2 ml distilled water; the precipitation, centrifugation, and resuspension procedure was repeated twice more before the pellets were resuspended in 0.2 ml distilled water and mixed with 2.5 ml scintillation liquid. The radioactivity incorporated was determined by liquid scintillation counting.

The phosphorylase activity was measured in the degradation direction. The phosphorylase activity of polysaccharides was assayed in a final volume of 300  $\mu$ l by incubating purified phosphorylase (0.4 mg) in 25 mM Tris-acetate, pH 7.5, 10 mM P<sub>i</sub> (orthophosphate), and 10 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> of rabbit liver glycogen or amylopectin for 1 h at 30°C. The reaction was stopped by being boiled for 5 min at 95°C. The production of G-1-P was assayed by adding 300  $\mu$ l of 50 mM Tris-HCl, 120 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mM glucose-1,6-diphosphate, and 0.5 mM NADP buffer. The production of NADPH, H<sup>+</sup> was monitored spectrophotometrically at 365 nm after the addition of 4 U of phosphoglucomutase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 2 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma). The phosphorylase activity is expressed as nanomoles of G-1-P produced per minute per milligram of protein. Apparent  $K_m$  values were determined by using GraphPad Prism 5 software.

The starch hydrolase activities were purified by loading 42 ml of supernatant on an AEC column (HiTrapQ FF [5 ml]) preequilibrated in buffer A (25 mM Tris-acetate, pH 7.5, 10 mM DTT). The proteins were eluted at 5 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup> with a 15-ml linear gradient of 0 to 0.5 M NaCl in buffer A containing 1 M NaCl. Starch metabolism enzymes were monitored by zymogram analyses. Proteins from each fraction (2.5 ml) were separated by nondenaturing PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred overnight by electroblotting to a polyacrylamide gel containing 0.3% (wt/vol) polysaccharide (9). Starch synthase activities were monitored after being electrotransferred (2 h, 30 V, 300 mA) to glycogen-containing gels. The gels were incubated overnight at room temperature in the incubation buffer described above containing either 1.2 mM ADP-Glc or 1.2 mM UDP-Glc. The electroblots were stained with iodine solution. Because blue-staining isoamylase-like activities migrated very slowly in this zymogram system, in a fashion similar to that of isoamylase in green algae and plants, we chose to purify this enzyme by GPC. Isoamylase was purified by gel filtration chromatography (Superose 6 prepacked column; 1 cm by 30 cm; Amersham Biosciences). The isoamylase-containing fractions (2 ml by 2.5 ml) that were free of all other starch hydrolases were pooled and concentrated to 0.5 ml by using centrifugal filter devices (Amicon-ultra; Millipore). The sample (0.1 ml) was loaded onto a Superose 6 column preequilibrated in buffer A with a flow rate of 0.3 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup> using a fast-protein liquid chromatography system. The isoamylase activity was monitored according to the procedure of Miller (30) based on the chemical interaction between the 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) and sugar reducing ends. For each fraction (0.6 ml), 50  $\mu$ l of isoamylase activity was mixed with 50  $\mu$ l of 1% (wt/vol) potato amylopectin dispersed in buffer A. The reaction was stopped by adding 100  $\mu$ l of DNS. The mixtures were heated for 10 min at 100°C. The optical density was measured at 570 nm. The glucose was used as a standard for the reducing end value. The isoamylase activity is expressed as the equivalent of 1  $\mu$ g of glucose reducing end produced min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein. The isoamylase-containing fractions were checked for the absence of other starch hydrolytic enzymes by zymogram analysis. The fractions containing the purified isoamylase were pooled and used to perform further characterizations. De-

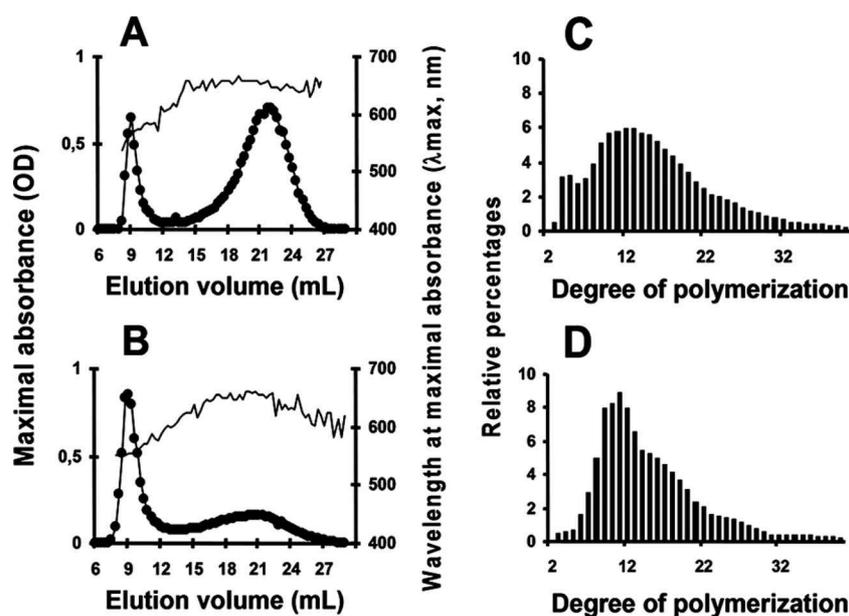


FIG. 1. Starch structure analysis by size-exclusion chromatography and chain length distribution analysis of amylopectin. Constituent fractions of starch granules were separated using GPC (see Materials and Methods). Amylopectin is a massive molecule that is excluded from the gel; linear amylose is eluted later. Glucans eluted in each fraction were detected by their interactions with iodine. (A and B) The x axis represents the column elution volume corresponding to each fraction. The left y axis measures the maximum absorbance (●) of the iodine-polysaccharide complex, while the right y axis represents the wavelength at which this maximum absorbance is measured ( $\lambda_{\max}$ ; thin unbroken line). (C and D) Branched glucans of the amylopectin fraction purified from the column then are analyzed by isoamylase-mediated debranching and the determination of the chain length distribution. Chain lengths (degrees of polymerization) are indicated on the x axis. The percentage of each class of glucans is presented on the y axis. Results of two exclusion chromatography and chain length distributions are presented for *Cyanophora* starch (A and C) and *Chlamydomonas reinhardtii* starch (B and D), respectively. OD, optical density.

branching enzyme activity toward amylopectin, glycogen, beta-limit dextrin (BLD), and pullulan was monitored by measuring the production of reducing ends over a time course. Fifty microliters of isoamylase activity (20  $\mu\text{g}$  of reducing ends produced/min) was incubated at 37°C in 950  $\mu\text{l}$  of 1% (wt/vol) polysaccharide dispersed in buffer A. The production of reducing ends was monitored over a time course of 0 to 3 h. Aliquots of 100  $\mu\text{l}$  were removed after each half hour and mixed with 100  $\mu\text{l}$  of DNS as described above. The total quantity of reducing ends released in the same experimental conditions for each polysaccharide was determined using commercial isoamylase (*Pseudomonas amylofermosa* isoamylase). The percentage of debranched polysaccharide was calculated by the formula (microgram of glucose equivalent of reducing ends measured/microgram of glucose equivalent of reducing ends released after complete debranching of the polysaccharide)  $\times$  100, thereby reducing all errors due to the different reactions of glucose and MOS with respect to DNS. The relative debranching activity toward AP and BLD was determined with respect to Gly, which was chosen arbitrarily as the reference value (set as 1) after taking into consideration the differences in the percentage of branching points for each polysaccharide for amylopectin (4.17%), BLD (9.25%), and Gly (7.12%) obtained from Manners (29).

**NMR analysis.** Fifty microliters of the purified isoamylase activity (20  $\mu\text{g}$  of reducing end produced  $\text{min}^{-1}$ ) was mixed with a 950- $\mu\text{l}$  solution containing 5 mg of rabbit liver glycogen dispersed in 25 mM Tris-acetate, pH 7, 10 mM DTT overnight at 37°C. The reaction was boiled for 5 min at 99°C. Proteins were removed by loading them onto a Dowex 50:2 (1 cm by 6 cm) column immediately coupled to a Dowex 1:2 (1 cm by 6 cm) column equilibrated with water as described previously. The lyophilized samples then were subjected to proton nuclear magnetic resonance (NMR) as described previously (8, 31). The spectra were calibrated on  $\delta\text{-CH}_3$  of dimethyl sulfoxide (2.6 parts/million).

**Apparent  $K_m$  determination of GBSSI.** The protocols used for the apparent  $K_m$  determination of granule-bound starch synthase I (GBSSI) were described by Ral et al. (39).

**cDNA screening and cloning for starch synthase, starch phosphorylase, and GBSS of *Cyanophora paradoxa*.** The *Cyanophora paradoxa*  $\lambda$  ZAP cDNA library was provided by W. Löffelhardt. The cDNA probes were designed using expressed sequence tag (EST) sequences obtained from the TbestDB project web site (<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/searches/login.php>). The protocol used for

cDNA library screening is described in Jakowitsch et al. (21) with the following modifications. DNA probe labeling and detection were performed with the DIG luminescent detection kit (Roche Molecular Biochemicals) using the protocol provided by the manufacturer.

**Nucleotide sequence accession numbers.** Sequences determined in the course of this work have been deposited in GenBank under accession numbers EU165054 to EU165056.

## RESULTS

***Cyanophora paradoxa* accumulates semicrystalline high-amylose storage polysaccharide granules that are similar to plant starch.** Starch was purified from late-log-phase *Cyanophora paradoxa* cells by sedimentation and density gradient purification. The dispersed polysaccharide was subjected to the separation of polysaccharide fractions through GPC. Results displayed in Fig. 1A demonstrate that this material contained both a high- and low-mass polysaccharide fraction similar to amylopectin and amylose, respectively, from the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Fig. 1B). The amylose/amylopectin ratio was calculated by harvesting their respective fractions after GPC and measuring the two pooled fractions with the amyloglucosidase assay. The amylose content of the glaucophyte was systematically high to very high, varying from 30% of the total polysaccharide in nitrogen-supplied medium in alternating day and night cultures to 60% in continuous light. At variance with the results obtained with green algae, nitrogen starvation had little impact on the relative amylose content. *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type strain 137C accumulates from 2% to at most 10% amylose when supplied with nitrogen and from 10 to 30% under nitrogen starvation.

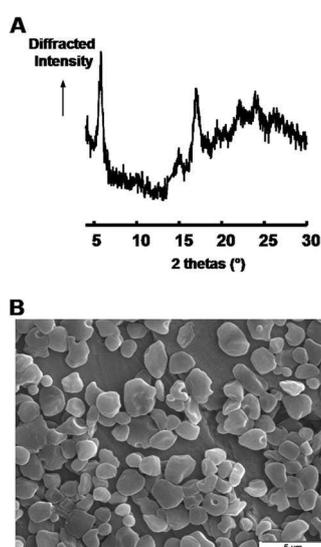


FIG. 2. X-ray analysis and scanning electron microscopy of the starch granules of *Cyanophora paradoxa*. (A) Diffraction peaks at 2 $\theta$  values (Bragg angles) of 9.9°, 11.2°, 15°, 17°, 18.1°, and 23.3° characterize the A-type starches, whereas diffraction peaks at 26 values of 5.6°, 15°, 17°, 22°, and 24° typify B-type starches. Thus, this wide-angle X-ray scattering diagram is characteristic of a pure B-type starch with a degree of crystallinity of 31%  $\pm$  3%. (B) Electron micrographs of purified starches from *Cyanophora paradoxa* (scale bar, 5  $\mu$ m).

Amylopectin from *Cyanophora paradoxa* was collected after GPC and subjected to debranching through the action of an isoamylase. The chain length distribution of the debranched chains then was examined by high-performance anion exchange with pulsed amperometric detection. Results displayed in Fig. 1C show that *Cyanophora paradoxa* contains a starch-type bimodal distribution of glucans that is selectively enriched in very short chains compared to those of *Chlamydomonas reinhardtii* (Fig. 1D). Starch granules diffract and give two types of X-ray diffraction patterns corresponding to two different assembly geometries that have been named A type and B type, respectively (7). The starch granule typically is considered semicrystalline. Indeed, only sections of the amylopectin molecule assemble into crystals. Amylose usually is thought to be mostly amorphous. Nevertheless, a high amylose content has a tendency to yield a B type of diffraction pattern for the remaining amylopectin. The *Cyanophora paradoxa* starch granules thus were further analyzed using X-ray diffraction. The samples used for the analysis produced clear B-type diffractograms with a crystallinity percentage around 30% (Fig. 2A). The morphology of the starch granules was further investigated by scanning electron microscopy (Fig. 2B). Classical starch granules were evidenced with occasional cavities or morphology alterations that could be due either to *in vivo* polysaccharide degradation or to the growth of granules in close contact with other cellular structures. However, when present, the cavities did not match the size and frequency recently observed in the cryptophyte floridean starch granules (18). The size of the *Cyanophora* granules varied between 0.5 and 2 to 3  $\mu$ m in diameter, figures comparable to those of the starch found in green algae and plant leaves.

Based on the results of all of these studies, we conclude that

*Cyanophora paradoxa* accumulates a typical semicrystalline high-amylose starch.

**Glucophyte granule-bound starch synthase activity can use both ADP-glucose and UDP-glucose.** Amylose generally is associated with the presence of granule-bound starch synthase, the enzyme that, in plants, is responsible for the processive synthesis of such long glucans (for a review, see reference 4). We thus measured the granule-associated starch synthase activity from freshly purified starch granules. The *Cyanophora paradoxa* GBSS was able to use both ADP-glucose and UDP-glucose (apparent  $K_m$  values of 8 mM ADP-Glc and 15 mM UDP-Glc) but displayed a sixfold higher  $V_{max}$  with UDP-glucose (0.23  $\pm$  0.04 nmol ADP-Glc incorporated/min/mg of starch and 1.48  $\pm$  0.5 nmol UDP-Glc incorporated/min/mg of starch). We further characterized the structure of the polysaccharide produced with both ADP-glucose and UDP-glucose. Results displayed in Fig. 3 demonstrate that the behavior of the starch-bound activity of the two glycosyl nucleotides was identical and was analogous to that evidenced for cryptophyte (18), green alga (49), and plant (17) GBSSI. Indeed, GBSSI is known in the absence of added malto-oligosaccharides to polymerize glucose residues to the outer chains of amylopectin. These chains subsequently are cleaved off amylopectin to generate mature amylose (Fig. 3A and B). On the other hand, in the presence of malto-oligosaccharides that act as competitive primers with amylopectin, the enzyme is observed to directly synthesize amylose-like molecules, and very little incorporation occurs in the amylopectin (Fig. 3C and D). In addition to this typical GBSS type of activity, we found a 64-kDa major granule-associated protein (Fig. 4) that displayed significant homology to plant GBSSI sequences. The protein was hydrolyzed with trypsin, and peptides were sequenced. This enabled us to correlate the protein with the full GBSSI-like sequence that we have cloned from our *Cyanophora paradoxa* cDNA bank (GenBank accession no. EU165054).

***Cyanophora paradoxa* contains a major GT5 family UDP-glucose-utilizing soluble starch synthase.** Because the kinetic characterization of GBSSI did not support a very dramatic preference for UDP-glucose over ADP-glucose, we investigated the properties of the soluble starch synthases. Our glycogen-primed zymogram gels demonstrated the presence of several UDP-glucose-utilizing soluble starch synthase activity bands with close mobility. These activities were localized in the cytoplasmic compartment (Fig. 5A). No ADP-glucose-utilizing elongation enzymes were evidenced by these procedures (results not shown). We chose to partly purify the enzyme activities and investigate their kinetic properties. Results displayed in Fig. 5B demonstrate that two types of soluble starch synthase activities could be purified free of contaminating starch hydrolases by AEC followed by GPC. Peaks 1 and 2 amounted to 87 and 13%, respectively, of the total assayable starch synthase activity, with an optimal temperature of 35 and 25°C, respectively, and an optimal pH of 7.5 and 8, respectively (data not shown). These activities display a marked preference for UDP-glucose and cannot use ADP-glucose at significant rates (<2% of the activity measured in the presence of UDP-glucose) (data not shown). Interestingly, the second activity (peak 2) displayed clear sigmoidal kinetics in the presence of increasing concentrations of amylopectin (Fig. 5D), while peak 1 showed a classical Michaelis-Menten type of kinetics in the

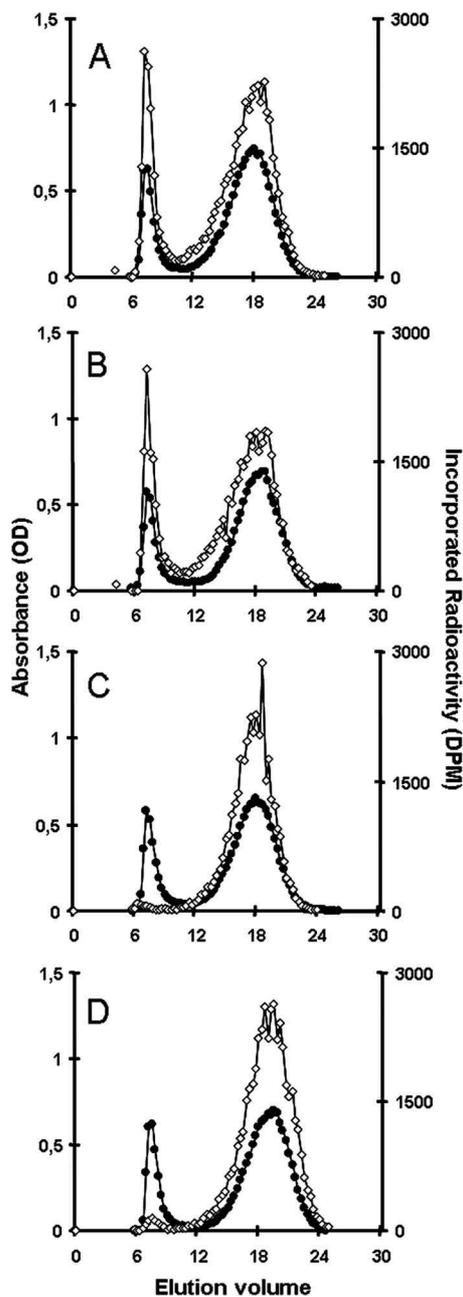


FIG. 3. Fractionation of starch granules isolated from *Cyanophora* and subjected to in vitro synthesis of amylose. After incubation with radiolabeled ADP-glucose (A) or UDP-glucose (B), starch granules were subjected to CL-2B size-exclusion chromatography in order to detect the fractions in which radiolabeled glucose residues were incorporated. The isotopic dilution for ADP-glucose was three times lower than that for UDP-glucose. The same experiment with ADP-glucose (C) or UDP-glucose (D) was done with the addition of 50 mM maltotriose. The x axis indicates the elution volume, the left axis shows the iodine-polysaccharide complex absorbance of each fraction eluted from the column (●), and the right axis shows the radioactivity of each fraction (◊). Without the addition of maltotriose (DP3), radioactive material was incorporated in both the excluded amylopectin fraction and the amylose fraction. The addition of DP3 restricts incorporation in the amylose fraction only. This behavior is a specific property of GBSS-like starch synthases. OD, optical density.

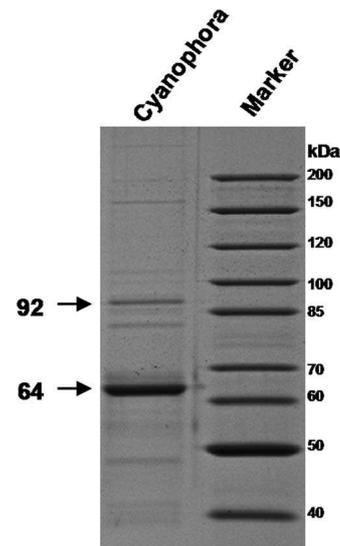


FIG. 4. Visualization of the proteins associated with *Cyanophora paradoxa* starch granules. Granule-bound proteins were extracted by boiling them in sodium dodecyl sulfate (SDS) and were separated by SDS-PAGE (18). A molecular mass marker also is displayed. The major band at around 64 kDa was hydrolyzed with trypsin, and the resulting peptides were eluted from the gel and identified by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) and mass spectrometry–mass spectrometry (MS-MS) sequencing. The peptides YDQYFDAWDTSVR, VTFLHNLLYQGR, DLPVNALATR, VFYETKGGKDR, and SVPTTPLLAFVGR correspond to a GBSS and were found in the sequence isolated by cDNA screening. The band at around 92 kDa was hydrolyzed with trypsin, and the resulting peptides were eluted from the gel and identified by MALDI-TOF and MS-MS sequencing. The peptide MQAVQORY corresponds to a starch phosphorylase and was found in recent *Cyanophora paradoxa* EST resources (GenBank accession no. EC661027) (35).

presence of glycogen or amylopectin, as did peak 2 in the presence of glycogen (Fig. 5C and D). The behavior of peak 2 recalls that of the starch synthase that recently was purified from *Gracilaria tenuistipitata* (34). For peak 1, increasing concentrations of UDP-glucose in the presence of either glycogen or amylopectin enabled us to measure apparent  $K_m$  values of  $2.2 \pm 0.2$  mM in the presence of  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  glycogen and  $5.2 \pm 0.9$  mM in the presence of  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  amylopectin (Fig. 5E). Peak 2 displayed  $K_m$  values of  $4 \pm 0.3$  mM in the presence of  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  glycogen and  $4.6 \pm 2.6$  mM in the presence of  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  amylopectin (Fig. 5F). We then searched for the presence of ESTs encoding soluble starch synthase and found a small sequence, which was used to select out longer cDNAs. We obtained an incomplete 1,669-bp cDNA containing most of the core sequence corresponding to soluble starch synthases of the GT5 family according to the CAZY classification, but it still lacked the variable N-terminal extension evidenced both in rhodophyceae and chloroplastida (GenBank accession no. EU165055). Phylogenetic trees built with this core sequence clearly support the grouping of this cDNA sequence with those evidenced in rhodophyceae and alveolates (Fig. 6).

*Cyanophora paradoxa* contains an isoamylase type of de-branching enzyme and multiple starch phosphorylases. Starch phosphorylase zymograms display activity bands that barely

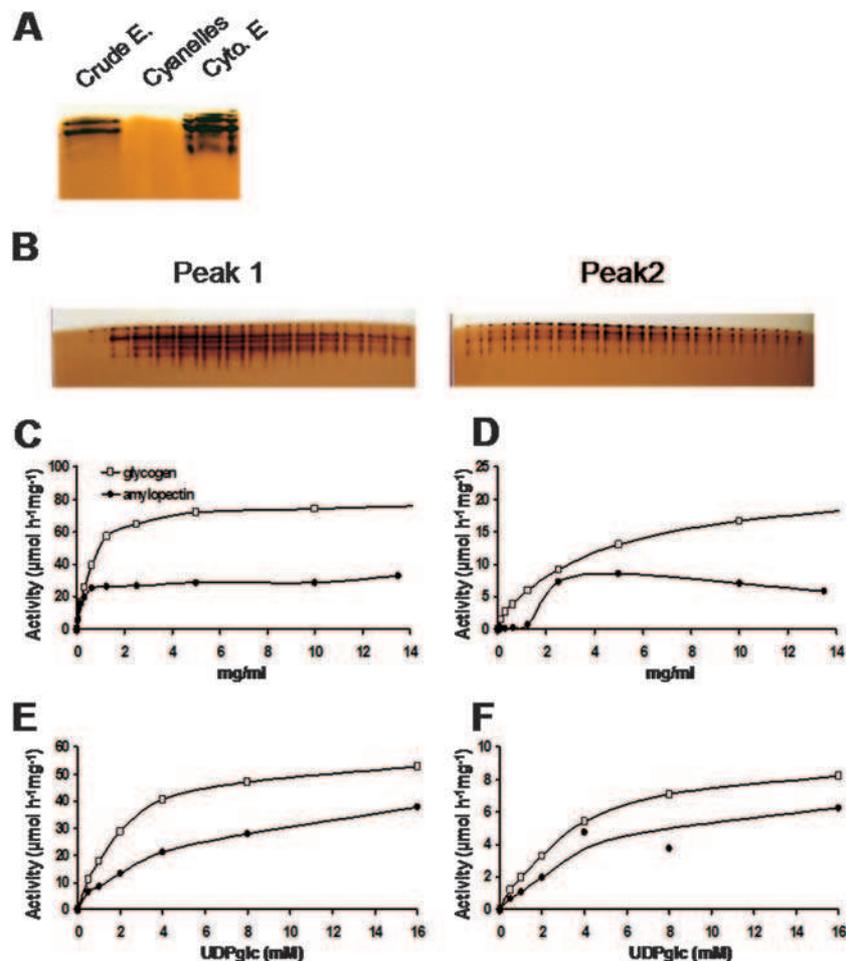


FIG. 5. Characterization of starch synthase activities. (A) One hundred micrograms of total protein from crude extract (Crude E.), purified cyanelles, and cytosolic extracts (Cyto. E) was loaded on a native PAGE containing 0.15% glycogen. After migration, the gel was incubated with 1.2 mM UDP-glucose. Starch synthase activities were visualized as brownish bands after iodine staining only in the crude extract and the cytosolic extract. (B) Cytosolic proteins were further fractionated on an AEC column (MonoQ HR5/5) with a gradient of 1 M NaCl. Zymogram analyses performed on each fraction (10  $\mu$ l) revealed the presence of two peaks of starch synthase activities. Fractions 15 to 29 (peak 1), which were very clearly separated from fractions 36 to 50 (peak 2), were subjected to an additional purification step by gel filtration chromatography in order to determine kinetic parameters (see Materials and Methods). Twenty microliters of purified starch synthases from peak 1 (specific activity, 61  $\mu$ mol  $\cdot$  h $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$  of protein) (C and E) and peak 2 (specific activity, 10  $\mu$ mol  $\cdot$  h $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$  of protein) (D and F) were incubated with 0, 0.08, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10, and 13.5 mg  $\cdot$  ml $^{-1}$  of amylopectin and glycogen in the presence of 16 mM UDP-Glc and 2  $\mu$ M UDP-[U- $^{14}$ C]Glc (C and D) or were incubated with 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, or 16 mM UDP-Glc and 2  $\mu$ M UDP-[U- $^{14}$ C]Glc in the presence of 10 mg  $\cdot$  ml $^{-1}$  of amylopectin or glycogen (E and F). [U- $^{14}$ C]Glc incorporated onto polysaccharides was measured after the precipitation and washing steps. The results are expressed as micromoles of glucose incorporated per hour per milligram of protein. Purification factors were 41.5 and 8.1 for peaks 1 and 2, respectively.

entered the polysaccharide-containing gels. We tracked this phosphorylase activity during the semipurification and assayed the enzyme(s) in semipure fractions lacking starch synthase or hydrolase activities. The kinetics displayed in Fig. 7A demonstrate the presence of classical starch phosphorylase activities with high affinity toward both glycogen (apparent  $K_m$ , 0.5  $\pm$  0.08 mg  $\cdot$  ml $^{-1}$ ) and amylopectin (apparent  $K_m$ , 0.65  $\pm$  0.05 mg  $\cdot$  ml $^{-1}$ ). However, the enzyme clearly was inhibited by high amounts of amylopectin substrate. Figure 7B displays a similar experiment performed with increasing concentrations of orthophosphate in the presence of either 10 mg  $\cdot$  ml $^{-1}$  glycogen (apparent  $K_m$ , 2  $\pm$  0.8 mM  $P_i$ ) or 10 mg  $\cdot$  ml $^{-1}$  amylopectin (apparent  $K_m$ , 3  $\pm$  0.7 mM  $P_i$ ). Interestingly, as displayed in Fig. 7C, this activity was inhibited by both UDP-glucose ( $K_i$ , 0.35  $\pm$  0.1 mM) and ADP-glucose ( $K_i$ , 0.1  $\pm$  0.05 mM) in a

fashion similar to that evidenced in green algae (2, 14, 32). As was described for other phosphorylases, the inhibition was competitive with respect to orthophosphate. The finding of a short EST that possibly could encode starch phosphorylase gave us a probe to select out the full-length cDNA and therefore enabled us to get the full enzyme sequence (GenBank accession no. EU165056). Another EST recently was selected from the growing genomic resources (GenBank accession no. EC661027) (35). This EST displayed a clearly distinct sequence, suggesting the presence of several different phosphorylase subunits or enzymes. The mass of several peptides generated by the analysis of a 92-kDa starch granule-associated protein (Fig. 4) matched that predicted by the EST encoding this second phosphorylase.

We then probed for the existence of starch hydrolases and

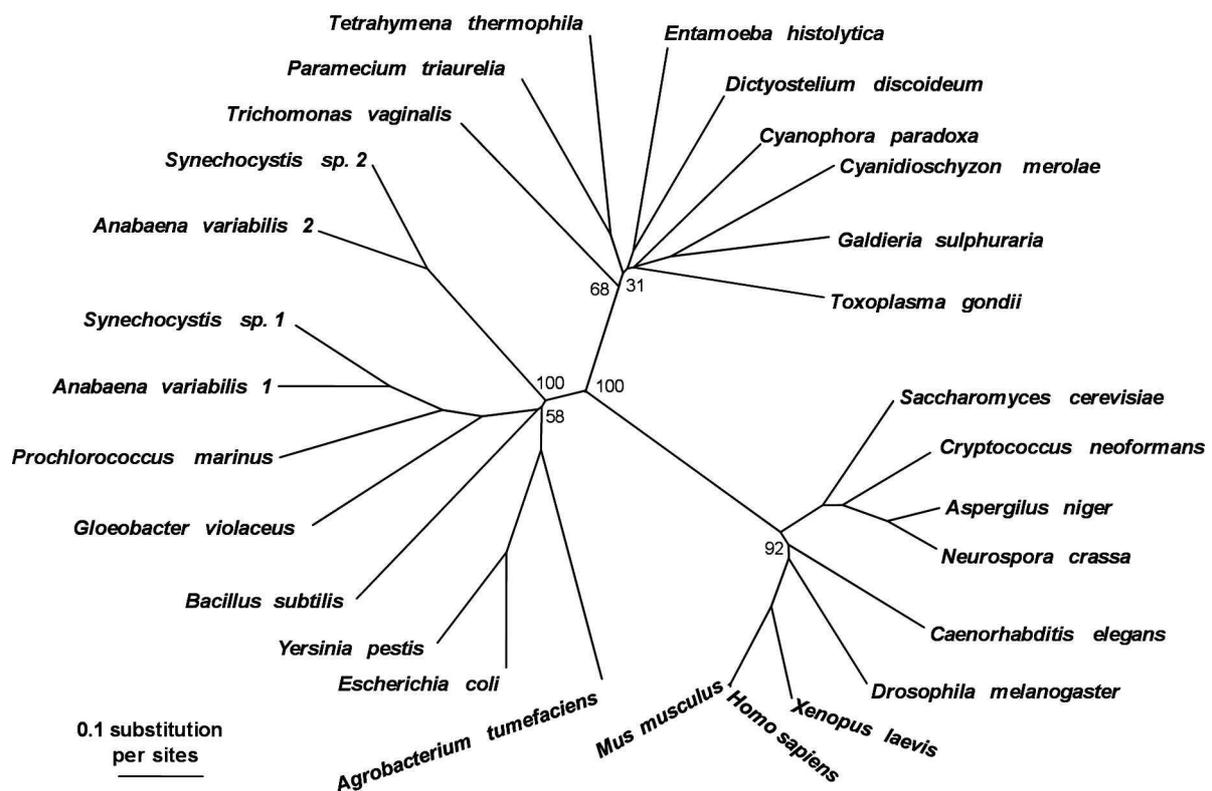


FIG. 6. Neighbor-joining distance tree inferred for glycogen synthases and starch synthases. Amino acid sequences were aligned using ClustalW (47), and alignment gaps were manually removed. Neighbor-joining trees were calculated for 10,000 bootstrap replicates using Neighbor (Phylip package; <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Trees were edited using Treeview (Roderic D. M. Page, University of Glasgow, Scotland, United Kingdom). Numbers at nodes represent bootstrap values. A more detailed unrooted maximum-likelihood tree can be found elsewhere (Deschamps et al., submitted).

found the usual set of zymogram bands on starch-containing gels from crude extracts (Fig. 8A) and after semipurification (Fig. 8B). In addition, we looked for the presence of these enzymes within cyanelles and found no traces of such activities. Finally, among the starch hydrolases, we probed for the existence of isoamylase, a starch debranching enzyme, through standard zymogram procedures and enzyme purification. Mutant work performed with green algae and vascular plants strongly suggested that isoamylase is involved in trimming the misplaced chains in a hydrophilic precursor of amylopectin to generate an insoluble semicrystalline form of the polysaccharide (3). This suggestion now is supported by a wealth of molecular and biochemical data obtained solely from green plants and algae (12, 13, 15, 22, 31, 33, 38, 52).

We searched for the presence of isoamylase by tracking a slow-migrating set of blue-stained bands evidenced on amylopectin- or starch-containing zymogram gels after iodine staining of the incubated gels. A blue-stained band is indicative of a debranching-type hydrolase digesting the polysaccharide trapped within the gels. The blue stain is due to the remaining slowly diffusing longer debranched oligosaccharides. Because this is only an indication of the presence of a debranching enzyme, we subjected crude extracts (Fig. 8A) to purification by AEC (Fig. 8B) followed by GPC until the fraction suspected to contain debranching enzyme was devoid of all other types of starch hydrolases (amylases, branching enzyme, and D-enzyme) (Fig. 8C).

The substrate specificity of the suspected debranching enzyme was measured with enzyme assays involving the production of reducing ends (Fig. 8D and E). Definitive proof that the purified fraction contained only debranching enzyme activity finally was obtained by proton NMR analysis (Fig. 8F). The signals at 5.3 to 5.1 ppm and 4.85 ppm correspond to the proton resonances from the carbon atoms engaged in an  $\alpha$ -1,4 linkage and an  $\alpha$ -1,6 linkage, respectively. The NMR analysis performed at 70°C instead of 90°C yields a two- to threefold underestimation of the number of branching points. After incubation with isoamylase activity, the proton resonances from the carbon atoms of the reducing end appear as two signals, at 5.05 and 4.45 ppm, corresponding to  $\alpha$  ( $^1\text{H}\alpha$ ) and  $\beta$  ( $^1\text{H}\beta$ ) anomers, respectively. This is correlated with a dramatic decrease of the signal at 4.85 ppm, corresponding to the  $^1\text{H}$  from the carbon atoms engaged in an  $\alpha$ -1,6 linkage. The results clearly indicated the presence in *Cyanophora paradoxa* of a high-mass (390 kDa) isoamylase complex (Fig. 8C), as measured by GPC on a Superose 6 column. The *Cyanophora* enzyme was able to debranch glycogen, amylopectin, and amylopectin  $\beta$ -limit dextrin with comparable efficiencies (Fig. 8D and E). It was, however, unable to debranch pullulan at significant rates.

## DISCUSSION

Our characterization of *Cyanophora paradoxa* soluble starch synthases clearly shows that these activities are able to elongate

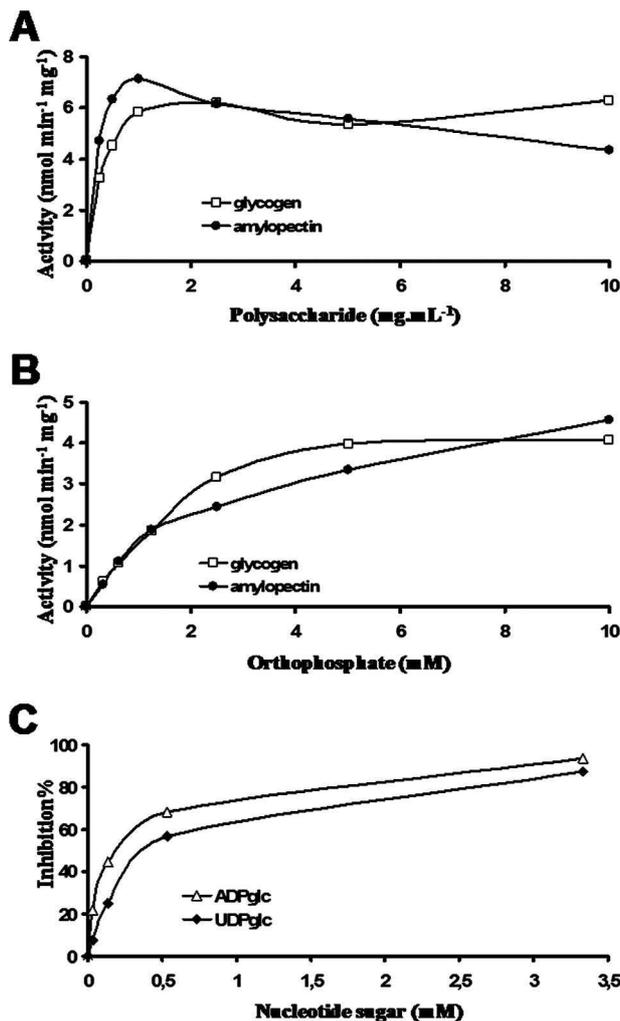


FIG. 7. Characterization of phosphorylase activity. Phosphorylase was assayed in the degradation direction by using 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  of glycogen or amylopectin in the presence of 10 mM orthophosphate (A) and by using 0, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mM orthophosphate in the presence of 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  of amylopectin or glycogen (B). The amount of G-1-P produced was determined by monitoring the production of  $\text{NADPH}, \text{H}^+$  at 365 nm after the addition of phosphoglucomutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The phosphorylase activity is expressed as nanomoles of G-1-P produced per minute per milligram of protein. The apparent  $K_m$  values for polysaccharides were determined at  $0.5 \pm 0.08 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  and  $0.65 \pm 0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  for glycogen and amylopectin, respectively. The apparent  $K_m$  values for  $\text{P}_i$  were determined at  $2 \pm 0.8 \text{ mM}$  and  $3 \pm 0.7 \text{ mM}$  in the presence of 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  of glycogen and amylopectin, respectively. (C) The inhibition of phosphorylase activity regarding nucleotide sugars was analyzed using 0, 0.033, 0.153, 0.533, and 3.3 mM of either UDP-Glc or ADP-Glc in the presence of 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  glycogen at 2 mM  $\text{P}_i$ . Both sugar nucleotides inhibit the phosphorylase activity ( $K_i$  for UDP-Glu,  $0.35 \pm 0.1 \text{ mM}$ ;  $K_i$  for ADP-Glu,  $0.1 \pm 0.05 \text{ mM}$ ).

glucans by the use of a UDP-glucose substrate. However, these enzymes are unable to use ADP-glucose at significant rates.

The sole existence of a UDP-glucose-based starch metabolism pathway was further ascertained by assaying for the presence of ADP-glucose pyrophosphorylase activity and protein (results not shown). We found no evidence for an enzyme activity responding to 3-phosphoglyceric acid activation in

crude extracts. In addition, an antibody directed against the maize small subunit yielded a clear cross-reaction with the enzyme found in *Chlamydomonas*. This cross-reaction disappears in *sta6* mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* that lack the corresponding small subunit. We were unable to find any comparable cross-reaction with *Cyanophora* extracts, thereby suggesting the absence of the corresponding protein or the presence of modified enzyme despite the conservation of cross-reactions throughout the green lineage.

We cloned a sequence encoding a protein that bears strong resemblance to the soluble starch synthase sequences identified in cyanidial red algae and in alveolates, including the glycogen-storing ciliates and the amylopectin-storing apicomplexans. Interestingly, alveolates also are currently thought to derive from red algae by a secondary endosymbiosis event (for a general review, see reference 6). The substrate specificity, which is the same as that described for the glycogen synthase of heterotrophic eukaryotes, argues in favor of a eukaryotic (host) origin of this enzyme gene. However, the phylogenetic tree produced in this work clearly distinguishes the glaucophyte, rhodophyceae, and alveolate enzymes from those of fungi and animals. Indeed, according to the CAZY classification, the latter belong to a family (family GT3) of glycosyltransferases distinct from that that includes bacterial glycogen synthases and green plant starch synthases (family GT5). The rhodophyceae and glaucophyte transferases described here both are GT5-type enzymes and therefore bear more resemblance to the bacterial glycogen synthases or the green plant starch synthases than to the fungal or animal enzyme. Interestingly, both *Dictyostelium discoideum* and *Entamoeba histolytica* and the very distantly related parabasalid *Trichomonas vaginalis* display a similar type of enzyme, arguing that these genes are of eukaryotic (host) origin (P. Deschamps, C. Coleoni, D. Moreira, Y. Nakamura, E. Suzuki, J. L. Putaux, A. Buléon, S. Haebel, G. Ritte, M. Steup, L. I. Falcón, W. Loffelhardt, J. Nirmal Raj, C. Plancke, C. d'Hulst, D. Dauvillée, and S. Ball, submitted for publication). Several distinct soluble starch synthases were evidenced by our purification studies. It is presently unknown if the activities reflect alternative regulated states of the same enzyme or if they are encoded by distinct proteins.

Another important finding reported in this work consists in the characterization of a glaucophyte GBSS responsible for amylose synthesis. This enzyme could use both ADP-glucose and UDP-glucose, but the specific activity measured with UDP-glucose was sixfold higher. The ambiguous selectivity of GBSSI toward ADP-glucose and UDP-glucose is a common trait for the GBSSI genes currently reported. Indeed, the maize enzyme initially was detected through its activity toward UDP-glucose (25), while ADP-glucose was recognized only later as the preferred substrate (40). Similarly, we have recently characterized a GBSSI from the cryptophyte *Guillardia theta* that showed only a slight preference for UDP-glucose (18). The reason for the low selectivity of the bound enzyme compared to that of the soluble starch synthases is discussed elsewhere (P. Deschamps et al., submitted).

Kinetic characterization of both soluble and granule-bound enzymes showed that both activities display comparable affinities toward their UDP-glucose substrate. This distinguishes glaucophytes from their chloroplastida relatives. In green algae

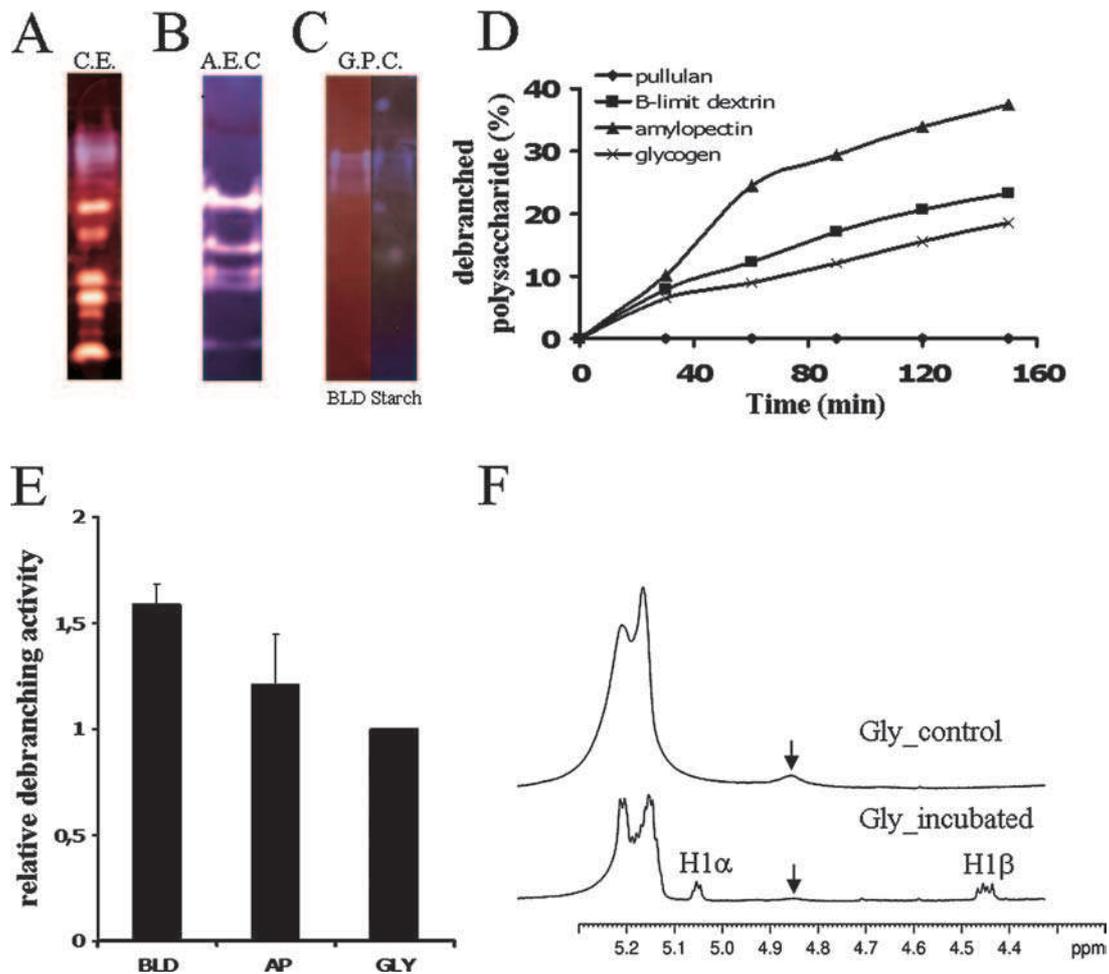


FIG. 8. Characterization of the debranching enzyme activity in *Cyanophora paradoxa*. Starch-metabolizing enzymes from crude extracts (A) were fractionated by AEC (B) and by gel filtration (C). The activities from crude extracts, from fraction F16 of the anion exchange, and from fraction F10 of the gel filtration were separated by nonreducing PAGE and visualized after their transfer to a BLD gel (A), a starch gel (B), or both a BLD and starch gel (C). After iodine staining, starch-containing and BLD-containing gels create a blue (A to C) and a purple (C) background, respectively. According to the specificity of the starch-metabolizing activities, the substrate in the gel becomes more branched (red-staining bands), completely hydrolyzed (white band), or completely debranched (blue band). The size of the blue bands was estimated to be around 390 kDa by GPC. (C) The debranching activity of isoamylase from fraction F10 of the gel filtration was incubated with amylopectin ( $\blacktriangle$ ), BLDs ( $\blacksquare$ ), GLY ( $\times$ ), and pullulan ( $\blacklozenge$ ). The activity was measured by monitoring the increase in the amount of reducing ends. The results are expressed as the percentage of debranched polysaccharides. (D) The relative debranching activity toward AP, BLD, and PUL was determined with respect to GLY (E), which was arbitrarily chosen as the reference (set as 1), after taking into consideration the differences in the percentages of branching points for each polysaccharide. (F) NMR analysis of rabbit liver glycogen polysaccharide incubated with or without isoamylase activity.  $^1\text{H}$  spectra were made in 80% (vol/vol) dimethylsulfoxide–20% (vol/vol)  $\text{D}_2\text{O}$  at  $70^\circ\text{C}$ , as described in Mouille et al. (31).

and land plants, the affinity of the soluble enzyme for ADP-glucose is at least 4-fold to more than 10-fold higher than that of the bound activity (4). When the supply of ADP-glucose is limited, amylopectin synthesis is relatively favored over that of amylose. This explains why mutants partly defective for ADP-glucose synthesis display a significant relative enrichment of amylopectin over that of amylose (48). In *Chlamydomonas*, cultures supplied with normal levels of nutrients contain little amylose (<5%), while nutrient-starved cultures accumulate between 10 to 25% of this starch fraction (26). In *Cyanophora paradoxa*, the relative amount of amylose always remains at a very high level (between 30 to 60%), which is only rarely reached in some plant mutants. Moreover, this high level is not significantly affected by the supply of nutrients. These levels

are three- to sixfold higher than those reported for green algae and plants. We believe this to be due solely to the comparable affinities of the granule-bound and soluble starch synthase toward UDP-glucose. Indeed, the amount of protein within the granule and the enzyme-specific activity are significantly inferior to those we measure for the *Chlamydomonas* enzyme and therefore cannot explain the relatively high amylose content.

The finding we report for GBSSI in glaucophytes echoes the description that was recently made for rhodophyceae (44). GBSSI thus is found in all three lineages that presently define the archaeplastida and very likely was present in the ancestor of all plants. This has important implications with respect to our understanding of the evolution of storage polysaccharide metabolism. It has been demonstrated previously that GBSSI

requires the presence of a preformed semicrystalline starch granule to be normally active (11). This in turn suggests that the ancestor of all plants synthesized such a structure, probably in its cytoplasm. An ancient cytoplasmic location for the synthesis of starch is suggested by the finding of a similar compartmentalization of storage polysaccharide in rhodophyceae and glaucophytes. Although some nuclear gene phylogenies have not been able to resolve the divergence order of the three archaeplastida lineages, both more recent nuclear gene phylogenies as well as plastid phylogenies indicate that glaucophytes diverged first from the common ancestor (41, 43). In addition, a recent study concerning the emergence of the light-harvesting complex (LHC) proteins can be explained only with a similar divergence order (24). The hypothesis of a cytoplasmic location of starch synthesis in the common ancestor of all plants thus is more parsimonious in this respect.

It must be stressed that the phylogeny of all sequences obtained either in this work or by bioinformatics analysis of the growing *Cyanophora paradoxa* (Deschamps et al., submitted) genomic resources are in complete agreement with the monophyletic origin of plants. Of special relevance are the phosphorylase enzyme sequences, which, as in red and green algae, display a common eukaryotic (host) origin.

All positive findings reported in this work support the existence of a UDP-glucose-based pathway of starch synthesis in glaucophytes that is very similar to that that has been proposed for rhodophyceae. We cannot exclude, however, the existence of minor forms of soluble starch synthases able to use ADP-glucose that would be phylogenetically related to the chloroplastidial or cyanobacterial enzymes, especially when faced with the exquisite sensitivity of the *Cyanophora paradoxa* phosphorylase to inhibition by ADP-glucose. A definitive negative conclusion in this respect can be reached only when the full genome sequence of *Cyanophora paradoxa* is available. Finally, we report the finding of a multimeric isoamylase complex within the cytoplasm of *Cyanophora paradoxa*. Isoamylase has been suggested to be involved in the maturation and aggregation of amylopectin into semicrystalline granules (3). In *Chlamydomonas*, the organization of isoamylase into large heteromultimeric complexes per se has been demonstrated to be required for the function of this enzyme in amylopectin synthesis (12, 13). Our report of a large-mass isoamylase in the cytoplasm of *Cyanophora paradoxa* defines the first report of such an enzyme in a nongreen eukaryote. The presence of this activity, the genes of which are clearly of cyanobacterial phylogeny, correlates with the presence of starch in *Cyanophora paradoxa*. While the activity was identified through biochemical means only, the existence of genes in rhodophyceae that bear strong homologies to plant isoamylases strengthens the correlation between the presence of starch and that of isoamylase. In turn, this correlation agrees with the critical function suggested for isoamylase in the biogenesis and aggregation of the starch granule (3).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the French Ministry of Education, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Institut National de la Recherche Agronomique, by the Region Nord Pas de Calais, the European Union, and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 429 TP B2 [M.S.] and SFB 429 TP B7 [G.R.]).

We thank Curtis Hannah for providing us with the antibody directed against the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. We thank Emmanuel Maes for performing the NMR analysis.

#### REFERENCES

- Adl, S. M., A. G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. Mc-Court, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel, and M. F. J. R. Taylor. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**:399–451.
- Ball, S., T. Marianne, L. Dirick, M. Fresnoy, B. Delrue, and A. Decq. 1991. A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**:17–26.
- Ball, S., H. P. Guan, M. James, A. Myers, P. Keeling, G. Mouille, A. Buléon, P. Colonna, and J. Preiss. 1996. From glycogen to amylopectin: a model explaining the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**:349–352.
- Ball, S. G., M. H. B. J. van de Wal, and R. G. F. Visser. 1998. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends Plant Sci.* **3**:462–467.
- Ball, S. G., and M. K. Morell. 2003. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**:207–233.
- Bhattacharya, D., H. S. Yoon, and J. D. Hackett. 2004. Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *Bioessays* **26**:50–60.
- Buléon, A., P. Colonna, V. Planchot, and S. Ball. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**:85–112.
- Colleoni, C., D. Dauvillée, G. Mouille, M. Morell, M. Samuel, M. C. Slomiany, L. Liénard, F. Wattebled, C. D'Hulst, and S. Ball. 1999. Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol.* **120**:1005–1014.
- Colleoni, C., A. M. Myers, and M. G. James. 2003. One- and two-dimensional native PAGE activity gel analyses of maize endosperm proteins reveal functional interaction between specific starch metabolizing enzymes. *J. Appl. Glycosci.* **50**:207–212.
- Coppin, A., J. S. Varre, L. Liénard, D. Dauvillée, Y. Guerardel, M. O. Soyer-Gobillard, A. Buléon, S. Ball, and S. Tomavo. 2005. Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J. Mol. Evol.* **60**:257–267.
- Dauvillée, D., C. Colleoni, E. Shaw, G. Mouille, C. D'Hulst, M. Morell, M. S. Samuel, B. Bouchet, D. J. Gallant, A. Sinskey, and S. Ball. 1999. Novel, starch-like polysaccharides are synthesized by an unbound form of granule-bound starch synthase in glycogen-accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **119**:321–330.
- Dauvillée, D., C. Colleoni, G. Mouille, A. Buléon, D. J. Gallant, B. Bouchet, M. K. Morell, C. D'Hulst, A. M. Myers, and S. Ball. 2001. Two loci control phytyloglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **125**:1710–1722.
- Dauvillée, D., C. Colleoni, G. Mouille, M. K. Morell, C. D'Hulst, F. Wattebled, L. Liénard, D. Delvallé, J. P. Ral, A. M. Myers, and S. Ball. 2001. Biochemical characterization of wild type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol.* **125**:1723–1731.
- Dauvillée, D., V. Chochois, M. Steup, S. Haebel, N. Eckermann, G. Ritte, J. P. Ral, C. Colleoni, G. Hicks, F. Wattebled, P. Deschamps, C. d'Hulst, L. Liénard, L. Cournac, J. L. Putaux, D. Dupeyre, and S. Ball. 2006. Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **48**:274–285.
- Dauvillée, D., V. Mestre, C. Colleoni, M. C. Slomiany, G. Mouille, B. Delrue, C. d'Hulst, C. Bliard, J. M. Nuzillard, and S. Ball. 2000. The debranching enzyme complex missing in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* displays an isoamylase-type specificity. *Plant Sci.* **157**:145–156.
- Delrue, B., T. Fontaine, F. Routier, A. Decq, J. M. Wieruszkeski, N. Van den Koornhuysse, M. L. Maddelein, B. Fournet, and S. Ball. 1992. Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* **174**:3612–3620.
- Denyer, K., B. Clarke, C. Hylton, H. Tatge, and A. Smith. 1996. The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.* **10**:1135–1143.
- Deschamps, P., I. Haferkamp, D. Dauvillée, S. Haebel, M. Steup, A. Buléon, J. L. Putaux, C. Colleoni, C. d'Hulst, C. Plancke, S. Gould, U. Maier, H. E. Neuhaus, and S. Ball. 2006. Nature of the periplastidial pathway of starch synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Eukaryot. Cell* **5**:954–963.
- Fontaine, T., C. D'Hulst, M. L. Maddelein, F. Routier, T. M. Pepin, A. Decq, J. M. Wieruszkeski, B. Delrue, N. Van den Koornhuysse, J. P. Bossu, B. Fournet, and S. Ball. 1993. Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II

- controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* **268**:16223–16330.
20. François, J., and J. L. Parrou. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:125–145.
  21. Jakowitsch, J., M. G. Bayer, T. L. Maier, A. Lüttke, U. B. Gebhart, M. Brandtner, B. Hamilton, C. Neumann-Spallart, C. B. Michalowski, H. J. Bohnert, H. E. A. Schenk, and W. Löffelhardt. 1993. Sequence analysis of pre-ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductase cDNA from *Cyanophora paradoxa* specifying a precursor for a nucleus-encoded cyanelle polypeptide. *Plant Mol. Biol.* **21**:1023–1033.
  22. James, M. G., D. S. Robertson, and A. M. Myers. 1995. Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**:417–429.
  23. James, M. G., K. Denyer, and A. M. Myers. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**:215–222.
  24. Koziol, A. G., T. Borza, K. I. Ishida, P. Keeling, R. W. Lee, and D. G. Durnford. 2007. Tracing the evolution of the light-harvesting antennae in chlorophyll *a/b*-containing organisms. *Plant Physiol.* **143**:1802–1816.
  25. Leloir, L. F., M. A. de Fekete, and C. E. Cardini. 1961. Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose. *J. Biol. Chem.* **236**:636–641.
  26. Libessart, N., M. L. Maddelein, N. Van Den Koornhuysse, A. Decq, B. Delrue, G. Mouille, C. D'Hulst, and S. G. Ball. 1995. Storage, photosynthesis and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **7**:1117–1127.
  27. Lin, T. P., T. Caspar, C. Somerville, and J. Preiss. 1988. Isolation and characterisation of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynath lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* **86**:1131–1135.
  28. Lu, Y., and T. Sharkey. 2006. The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ.* **29**:353–366.
  29. Manners, D. J. 1991. Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydrate Polymers* **16**:37–82.
  30. Miller, G. L. 1959. Cardiac arrest. *Miss. Doc.* **37**:149–151.
  31. Mouille, G., M. L. Maddelein, N. Libessart, P. Talaga, A. Decq, B. Delrue, and S. Ball. 1996. Preamylopectin processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**:1353–1366.
  32. Nakamura, Y., and M. Imamura. 1983. Characteristics of a glucan phosphorylase from *Chlorella vulgaris*. *Phytochemistry* **22**:835–840.
  33. Nakamura, Y., A. Kubo, T. Shimamune, T. Matsuda, K. Harada, and H. Satoh. 1997. Correlation between activities of starch debranching enzymes and  $\alpha$ -polyglucan structure in endosperms of sugary-1 mutants of rice. *Plant J.* **12**:143–153.
  34. Nyvall, P., J. Pelloux, H. V. Davies, M. Pedersen, and R. Viola. 1999. Purification and characterisation of a novel starch synthase selective for uridine 5'-diphosphate glucose from the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* **209**:143–152.
  35. O'Brien, E. A., L. B. Koski, Y. Zhang, L. Yang, E. Wang, M. W. Gray, G. Burger, and B. F. Lang. 2007. TBestDB: a taxonomically broad database of expressed sequence tags (ESTs). *Nucleic Acids Res.* **35**:D445–D451.
  36. Patron, N. J., and P. K. Keeling. 2005. Common evolutionary origin of starch biosynthetic enzymes in green and red algae. *J. Phycol.* **41**:1131–1141.
  37. Preiss, J., and T. Romeo. 1989. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv. Microb. Physiol.* **30**:183–238.
  38. Rahman, A., K. S. Wong, J. L. Jane, A. M. Myers, and M. G. James. 1998. Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in maize. *Plant Physiol.* **117**:425–435.
  39. Ral, J. P., E. Derelle, C. Ferraz, F. Wattedled, B. Farinas, F. Corellou, A. Buléon, M. C. Slomiany, D. Delvalle, C. d'Hulst, S. Rombauts, H. Moreau, and S. Ball. 2004. Starch division and partitioning: a mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol.* **136**:3333–3340.
  40. Recondo, E., and L. Leloir. 1961. Adenosine diphosphate glucose and starch biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**:85–88.
  41. Reyes-Prieto, A., and D. Bhattacharya. 2007. Phylogeny of nuclear encoded plastid targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae. *Mol. Biol. Evol.* **24**:2358–2361.
  42. Roach, P. J. 2002. Glycogen and its metabolism. *Curr. Mol. Med.* **2**:101–120.
  43. Rodríguez-Espeleta, N., H. Brinkmann, S. C. Burey, B. Roure, G. Burger, W. Löffelhardt, H. J. Bohnert, H. Philippe, and B. F. Lang. 2005. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr. Biol.* **15**:1325–1330.
  44. Shimonaga, T., S. Fujiwara, M. Kaneko, A. Izumo, S. Nihei, P. B. Francisco, A. Satoh, N. Fujita, Y. Nakamura, and M. Tsuzuki. 2007. Variation in storage  $\alpha$ -polyglucans of red algae: amylose and semi-amylopectin types in porphyridium and glycogen type in cyanidium. *Mar. Biotechnol.* **9**:192–202.
  45. Smith, A. M. 1990. Enzymes of starch synthesis, p. 93–102. *In* P. J. Lea (ed.), *Methods in plant biochemistry*, vol. 3. Academic Press, London, United Kingdom.
  46. Tetlow, E. J., M. K. Morell, and M. J. Emes. 2004. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Biol.* **55**:2131–2145.
  47. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
  48. Van den Koornhuysse, N., N. Libessart, B. Delrue, C. Zabawinski, A. Decq, A. Iglesias, J. Preiss, and S. Ball. 1996. Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **271**:16281–16288.
  49. Van de Wal, M., C. D'Hulst, J. P. Vincken, A. Buléon, R. Visser, and S. Ball. 1998. Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.* **273**:22232–22240.
  50. Viola, R., P. Nyvall, and M. Pedersen. 2001. The unique features of starch metabolism in red algae. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**:1417–1422.
  51. Wattedled, F., J. P. Ral, D. Dauvillée, A. Myers, M. James, R. Schlichting, C. Giersch, S. Ball, and C. D'Hulst. 2003. *STAI1*, a *Chlamydomonas reinhardtii* locus required for normal starch granule biogenesis, encodes disproportionating enzyme. Further evidence for a function of  $\alpha$ -1,4 glucanotransferases during starch granule biosynthesis in green algae. *Plant Physiol.* **132**:137–145.
  52. Wattedled, F., Y. Dong, S. Dumez, D. Delvallé, V. Planchot, P. Berbezzy, D. Vyas, P. Colonna, M. Chatterjee, S. Ball, and C. d'Hulst. 2005. Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytylglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol.* **138**:184–195.
  53. Zabawinski, C., N. Van den Koornhuysse, C. D'Hulst, R. Slichting, A. Decq, C. Giersch, B. Delrue, J. M. Lacroix, J. Preiss, and S. Ball. 2001. Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Bacteriol.* **183**:1069–1077.
  54. Zeeman, S. C., S. M. Smith, and A. M. Smith. 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem. J.* **401**:13–28.