

Université de Lille 1 – Sciences et technologies
École Doctorale Biologie Santé

DOCTORAT

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Hande TUNÇAY

La génétique formelle chez *Chlamydomonas reinhardtii* :
Un outil puissant de dissection du catabolisme de l'amidon.

Thèse dirigée par Dr. David DAUVILLEE

Soutenue le 12 Décembre 2013

Jury

D'HULST C., Professeur, Université de Lille 1	Président
MOUILLE G., DR INRA HDR, Centre INRA Versailles	Rapporteur
REMACLE C., Professeur, Université de Liège	Rapporteur
PELTIER G., Directeur de laboratoire, CEA Cadarache	Examineur
BULÉON A., Directeur de recherche, INRA Nantes	Examineur
DAUVILLÉE D., Chargé de recherche, CNRS UGSF	Examineur

*À mes parents,
À ma soeur et mon frère,
À mes grands-parents.*

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier mon directeur de thèse, le Dr. David DAUVILLEE, pour m'avoir confié ce travail de recherches, pour son encadrement scientifique, pour son aide et ses précieux conseils au cours de ces années, ainsi que pour sa sympathie, sa disponibilité, ses idées, ses encouragements et son soutien. Je te remercie particulièrement de l'accueil que tu m'as réservée, du temps que tu m'as consacré et surtout pour la confiance que tu m'as accordée. J'ai énormément appris à tes côtés. Merci pour tout.

Je remercie le Prof. Christophe D'HULST, actuel directeur de l'Unité de Glycobiologie Structurale et fonctionnelle (UMR8576 CNRS/USTL), d'avoir accepté de présider le jury de thèse.

Je tiens à remercier le Dr. Grégory MOUILLE du Centre INRA de Versailles, et le Prof. Claire REMACLE, Professeur à l'Université de Liège, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et pour le temps et l'intérêt qu'ils vont dédier à son évaluation.

Je remercie le Dr. Gilles PELTIER, directeur de laboratoire au CEA Cadarache, d'avoir accepté de participer à ce jury, ainsi qu'à mes comités de suivi de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir guidé dans ce domaine.

J'aimerais également remercier le Dr. Alain BULEON, directeur de recherche à l'INRA de Nantes, d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je tiens à remercier le Dr. Agathe SUBTIL, de l'Unité de Biologie des Interactions Cellulaires à l'institut PASTEUR Paris, d'avoir participé à mes comités de thèse, et aux discussions qui ont suivi.

Je tiens également à remercier l'ancien directeur de l'unité Jean-Claude MICHALSKI de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à l'Université des Sciences et Technologies de Lille pendant mes deux premières années de doctorat et lors de mon année de master recherche.

Je voudrais particulièrement remercier notre technicien, Thierry DUCHENE, qui m'a énormément aidé pendant toutes ces années, pour sa disponibilité et sa réactivité lors de mes demandes de milieux de culture, pour son humour, et pour nos discussions pendant les pauses déjeuner ou autour d'un pot.

Remerciements

J'aimerais aussi remercier notre thésard Justin FINDINIER pour ses encouragements et pour son aide précieuse tout le long de ces années.

Je voudrais remercier le Dr. Virginie COGEZ pour son aide, pour ses conseils et pour son soutien.

Je remercie également le Prof. Steven BALL de m'avoir accueillie au sein de son équipe lors de ces 3 années. Je tiens également à remercier le Dr. Christophe COLLEONI et le Dr. Maria-Cécilia ARIAS, Maîtres de Conférences à Lille I, pour leur gentillesse et leur soutien tout au long de ces années.

Merci aussi, à nouveau à Justin, Ugo, Mathieu, Derifa et Sophie avec qui j'ai partagé mon bureau et beaucoup de fous-rires au cours de ces trois années. Merci à tous pour votre bonne humeur, pour votre amitié qui m'est très chère, pour toutes ces séances de rires et de sourires, et pour toutes ces discussions autour d'un café ou d'un barbecue!

J'aimerais également remercier le Prof. Jean-Marie LACROIX de m'avoir proposée quelques heures de TD et TP lors de ses cours de microbiologie. Merci aussi aux Dr. Olivier VIDAL et Edwige MADEC pour leurs aides et conseils lors de ces TD et TP.

J'aimerais adresser un remerciement particulier au Dr. Brigitte DELRUE pour son soutien énorme et ses conseils si précieux ! Merci pour le temps que tu m'as consacré et pour la confiance que tu m'as accordée.

J'adresse des remerciements également à l'ensemble du personnel de l'unité pour leur accueil sympathique et pour leur sourire chaleureux tous les matins tout au long de ces trois années de doctorat : Martine RATAJCZAK, Gaëlle VANSTAEVEL, Yvon HU, Nadège VEREECKE, merci pour vos aides et vos encouragements, sans oublier nos merveilleuses conversations ! Merci à Jacqueline, Peggy, Fred, Andrée, Céline, Marie, Florent, Aurélie, Fabrice, Xavier, Adeline, Aline, Maud et Laura et tous ceux que j'oublie. Merci à tous.

Je voudrais aussi faire un clin d'œil à Agata, ma version polonaise, en la remerciant pour son rire franc, pour son aide, pour son soutien et ses encouragements. C'est surtout sur le plan humain que je voudrais te remercier. Il est vrai que je n'oublierai pas les discussions scientifiques, et encore moins l'entraide, tous les services, les petits mots de réconfort, les discussions de paillasse, au club d'escalade, au café etc...

Remerciements

Un énorme merci à mes amis de CADARACHE : Stéphan Monsieur Gentil, Patrick Monsieur Gentil II, Pascaline ma sauveuse, Miriam ma guide, Gaëtane Monsieur l'Afrique, Anthony le footballeur, Mélissa la conseillère, Mai la cuisinière, Caroline Madame la neige, Jean-Marc Monsieur le « bondour », Audrey et ses petites princesses, Van la petite, Agathe la coquine et Ludovic le coquin ! J'espère que je n'ai oublié personne, si c'est le cas, je m'excuse de tout mon cœur ! Un énorme merci à vous tous d'être là pour moi pendant la période la plus difficile de ma vie ! Merci pour votre bonne humeur, votre soutien, vos propositions de sortie et de soirée sans oublier nos pauses cafés (2=20)!!

Je tiens également à remercier le Prof. Andreas WEBER et son équipe de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire de botanique à l'Université de Heinrich-Heine à Düsseldorf, en Allemagne. Enfin, un remerciement particulier au Dr. Nicole LINKA pour son aide, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

J'adresse un immense merci à mes parents, Iclâl et Ümit TUNCAY, qui m'ont énormément aidée à réaliser mon rêve de continuer mes études supérieures à l'étranger et qui n'ont jamais arrêté de m'encourager pour réussir dans la vie. Je remercie également ma sœur jumelle, Hilâl, et mon frère aîné, Deniz, pour leurs soutiens infinis. Je tiens à remercier particulièrement mes grands-parents qui m'ont encouragé sans arrêt pendant ces années et qui m'ont soutenu de loin.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que me pardonnent celles que j'oublie ici, mais j'adresse une pensée particulière à la FIN EQUIPE RUNNING (FER) !! Merci à mes coachs Mickaël, Anthony, Esteban, Damien et Vincent ! Un énorme merci à mes amis Franck, Isa, Séb, Anso, Pierre, Fabrice, Magalie, Jimmy, Nathalie, Fred, Sylvie, Emilie, Jéré... Sachez que vous m'avez tous apporté beaucoup de choses pour la réalisation de cette thèse. On se voit à To-Loose !!

J'aimerais tout particulièrement remercier ma jumelle française, Stéphanie SERROUX, d'être là pour moi à tout moment, de me soutenir, de m'aider à me relever aux moments difficiles de la vie, de me faire penser à me vider la tête de temps en temps, d'avoir toujours les bonnes idées pour tout ! Je te remercie simplement d'être la meilleure copine qu'une personne peut avoir!

Une immense merci à Malika CHABI, une amie très spéciale, qui m'aura énormément fait rire, m'aura soutenu dès le début et m'aura beaucoup aidé dans les périodes de doute. Merci pour tout ton soutien et tes conseils.

Remerciements

Je voudrais également remercier Zineb LAHFAJ, enfin thésarde à Nancy, pour son aide précieuse du début à la fin et son soutien infini lors de ce travail ! Tu m'es très chère ! Dans 3 ans, ce sera ton tour !

Je tiens également à remercier la famille DERREUMAUX qui m'a beaucoup aidée pour mon adaptation à la vie en France et qui m'a soutenu pendant ces cinq années passées en France. Vous avez, tous, vos places dans mon cœur.

J'aimerais également remercier mes chers amis turcs à Bruxelles ! Merci pour vos messages d'encouragement et de soutien. Je tiens particulièrement à remercier Evrim TASKIRAN d'être là pour moi pendant cette période très difficile et de m'avoir aidé à gérer le stress du début à la fin.

Un dernier mot à dédier à DD : « HUNI ».

Abréviations

3PGA: acide-3-phosphoglycérique.
ADN: acide **déoxyribonucléique**.
ADNc: **ADN complémentaire**.
ADNg: **ADN génomique**.
ARN: acide ribonucléique.
ADP-glucose: adénosine-5'-**diphosphoglucose**.
AGPase: ADP-glucose pyrophosphorylase.
aphVIII: gène de résistance contre la paromomycine.
ATP: adénosine-5'-triphosphate.
BAM: β -amylase.
BE: **branching enzyme**.
BLAST: **basic local alignment search tool**.
C: complété pour CAT15**C**13.
CL-2B: gel de tamisage moléculaire de type sepharose.
CTAB: **cetyl trimethyl ammonium bromide**, bromure de cetrimonium.
DBE: **debranching enzyme**, enzyme de débranchement.
DMSO: **diméthylsulfoxyde**.
dNTP: **déoxy nucléotide triphosphate**
DPE2: l'enzyme D cytosolique.
DTT: 1,4-dithio-DL-thréitol.
EDTA: **ethylenediaminetetraacetic acid**, l'acide éthylène diamine tetra acétique
Enzyme D: l'enzyme disproportionnante.
G1P: glucose-1-phosphate.
GBSS: **granule bound starch synthase**, amidon- synthétase liée au grain.
GWD: **glucan water dikinase**.
HCl: acide chloridrique.
HSP70: **Heat Shock Protein 70**, une protéine chaperone.
I₂: iode.
ISA3: l'enzyme de débranchement de type isoamylase 3.
KI: potassium d'iodure.
 λ max: longueur d'onde au maximum d'absorption.
MEX1: transporteur de maltose.
min: minute.
MOS: **maltooligosaccharide**.
mt: **mating type**, polarité sexuelle.
NaCl: chlorure de sodium.
NADP: le **nicotinamide adénine dinucléotide phosphate**
NADPH₂: la forme réduite de NADP.
NC: Non complété pour CAT15**NC**1.
nit1, nit2: gènes intervenant dans le métabolisme du nitrate chez *Chlamydomonas reinhardtii*.
pb: paire de base.
PCR: **polymerase chain reaction**, réaction de polymérisation en chaîne.
PGM: **phosphoglucomutase**.
PhoB: **phosphorylase B**.
P_i: phosphate inorganique.
PWD: **phospho water dikinase**.
rpm: rotations **par minutes**.
SDS: **sodium dodécylsulfate**.
sec: secondes
SS: soluble starch synthases, les amidon-synthétases solubles.

Abstract

During the last two decades of research, efforts have been focused on the understanding of the complex pathway of starch biosynthesis with comparatively less emphasis on the genes and regulatory networks responsible for mobilization *in planta* of this important source of storage polysaccharide. However the starch metabolism network includes over 40 genes highly conserved from green algae to land plants. This comes as a surprise when one considers that this storage polysaccharide is made solely of glucose residues with only two types of chemical linkages. In addition to its central importance in food and material science, a particular interest in the understanding of starch mobilization in green algae rather than crops has been generated from recent developments in the production of bioenergies. While successful reverse genetic approaches have been mostly applied to *Arabidopsis*, we propose to complete and reassess our vision of starch catabolism by applying a high throughput forward genetic strategy in the system which among all model plants is most suited for such an approach: the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The mutant selection we used relies mostly on the highly specific interaction of iodine with α -1,4 linked glucans. In addition, my laboratory has gained a widely acclaimed scientific reputation in the field of starch metabolism thanks to the systematic use of comparable forward genetic approaches aimed at understanding the pathway of starch biosynthesis. We thus constructed and screened an insertional mutant bank and identified more than 40 mutant strains altered in their ability or in the kinetics of starch mobilization. The combination of biochemical, enzymological and molecular approaches allowed us to identify several of the mutations responsive of the catabolic phenotype. We focused our work on three of them which are defective for a maltose transporter called Mex1, a kinase activity and a type I branching enzyme which could be involved in the regulation of the catabolic process. Our “without a priori” approach demonstrated the importance of our work in order to identify new functions involved in starch catabolism which would probably not be possible to study through the use of inverse genetics.

Ces 20 dernières années ont été consacrées à la dissection du réseau enzymatique complexe aboutissant à l'édification de l'amidon alors que bien moins de données ont été obtenues en ce qui concerne la dégradation ou les phénomènes de régulation de cette voie métabolique. Le métabolisme de ce polysaccharide de réserve nécessite plus de 40 gènes aussi bien chez la microalgue la plus primitive que chez les plantes les plus évoluées. Ce résultat est surprenant si on considère que l'amidon n'est composé que d'un seul sucre, le glucose, et contient uniquement que deux types de liaisons chimiques. En sus de son intérêt pour les industries alimentaire et des matériaux, un intérêt grandissant pour la compréhension des phénomènes de mobilisation de l'amidon chez les microalgues est apparu du fait de l'importance de ces organismes pour la production de bioénergies. Une majorité des données disponibles à ce jour proviennent d'approches de génétique inverse chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Dans ce travail, nous nous proposons de compléter ces travaux par le biais d'une approche de génétique formelle chez un modèle particulièrement adapté à ce type de démarche : la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. La sélection de mutants déficients pour la dégradation de l'amidon a été ainsi effectuée à l'aide d'un crible phénotypique tirant avantage de l'interaction naturelle que possèdent l'iode et les polysaccharides. Nous nous sommes basés sur l'expérience de notre laboratoire qui par le passé a prouvé l'efficacité d'une telle démarche afin d'appréhender les phénomènes de synthèse du polysaccharide de réserve. La construction et le crible d'une banque de mutants d'insertion chez la microalgue nous ont permis d'isoler plus de quarante souches déficientes pour la mobilisation de l'amidon. Les caractérisations biochimiques, enzymologiques et moléculaires effectuées sur ces mutants nous ont permis d'identifier un nombre appréciable de fonctions impliquées plus ou moins directement dans le processus. Trois de ces mutants déficients pour un transporteur de maltose dénommé Mex1, une activité de type kinase et une activité de branchement de type I pouvant jouer un rôle de régulation de la voie catabolique ont fait l'objet de caractérisations approfondies. Notre démarche sans a priori nous a permis de démontrer l'importance de ces travaux afin de mettre à jour des fonctions essentielles au catabolisme de l'amidon qui sont difficilement accessibles via les approches de génétique inverse.

<u>INTRODUCTION</u>	1
I. GÉNÉRALITES ET STRUCTURE	4
1. L'amylopectine	5
2. L'amylose	6
3. La nature cristalline de l'amidon	6
4. Les différents types d'amidon	7
5. Les autres constituants de l'amidon	8
6. L'interaction de l'amidon avec l'iode	8
II. GENERALITE ET STRUCTURE	10
1. Le métabolisme du glycogène chez les bactéries	10
2. Le métabolisme de l'amidon chez les Archéplastides :	
<i>Les endosymbioses primaire et secondaires</i>	13
3. Le métabolisme de l'amidon chez les plantes supérieures	14
3.1. La synthèse de l'amylose	15
3.2. La synthèse de l'amylopectine	16
3.2.1. La production de l'ADP-glucose	16
3.2.2. L'élongation des α -1,4 glucanes	18
3.2.3. La formation des liaisons α -1,6	20
3.3. La production de la structure semi-cristalline:	
<i>L'implication d'autres enzymes</i>	21
3.3.1. Les enzymes de débranchement	21
3.3.2. L'enzyme Disproportionnante	23
3.3.3. Les amidons phosphorylases	24
3.4. La dégradation de l'amidon	24
3.4.1. La phosphorylation des glucanes	25
3.4.2. La déphosphorylation des glucanes	26
3.4.3. La dégradation des glucanes	27
3.4.3.1. La voie hydrolytique	27
3.4.3.2. La voie phosphorylitique	31
3.4.4. Le devenir des produits de dégradation	32
3.4.5. La différence entre la dégradation dans les feuilles d'Arabidopsis et dans l'albumen des céréales	35
III. L'ORGANISME MODELE ETUDIE: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	38

1. Le chloroplaste de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	38
2. La génétique formelle chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	39
V. OBJECTIF DE LA THESE	42
<u>MATERIELS & METHODES</u>	44
I. SOUCHES	44
II. MILIEUX DE CULTURE	45
1. Les précultures	45
2. Les cultures de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	45
III. PRODUCTION DE LA BANQUE DE MUTANTS	47
1. Préparation de l'autolysine	47
2. Vérification de la qualité de l'autolysine	47
3. Transformation nucléaire	48
4. Crible à l'iode en deux étapes	48
IV. CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES	50
1. Extraction et dosage de l'amidon	50
2. Dosage des polysaccharides solubles	50
3. Mesure de la λ_{max}	50
4. Chromatographie de tamisage moléculaire (CL-2B)	51
5. Analyse de la distribution en longueurs de chaînes (CLD) de l'amylopectine	51
V. CARACTERISATIONS ENZYMATIQUES	53
1. Préparation des extraits bruts	53
2. Dosage des protéines	53
3. Les gels d'activité de type zymogramme	53
3.1. Préparation de l'échantillon et du gel	53
3.2. Le zymogramme révélant les activités hydrolytiques	54
3.3. Les zymogrammes révélant les activités amidon-synthétases solubles et les amidon phosphorylases	54
3.4. Le zymogramme révélant les enzymes de branchement	55
4. Western Blotting	55
5. Semi-purification et caractérisation de l'enzyme de branchement de type 1	56
VI. CARACTERISATIONS MOLECULAIRES	57
1. Extraction et dosage de l'ADN génomique	57
2. Extraction de l'ADN plasmidique	57

3.	La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	58
4.	Extraction et dosage des ARNs	58
5.	RT-PCR « one step »	59
6.	Identification du lieu d'insertion du plasmide	59
6.1.	« Plasmid Rescue »	59
6.2.	PCR inverse	60
6.3.	TAIL-PCR	60
7.	Hybridation de type Southern	61
7.1.	Synthèse de la sonde marquée par PCR	61
7.2.	Digestion et séparation des fragments d'ADN	62
7.3.	Hybridation de la sonde et lavages de la membrane	62
7.4.	Détection des signaux	63
8.	Technique de clonage	63
8.1.	Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	63
8.2.	Ligation	64
8.3.	Préparation des bactéries compétentes	64
8.4.	Transformation des bactéries compétentes	65
VII.	COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE	66
VIII.	ANALYSE DE COSEGREGATION	67
IX.	COMPLEMENTATION HETEROLOGUE DU TRANSPORTEUR DE MALTOSE (MEX1)	68
1.	Chez <i>Escherichia coli</i>	68
1.1.	Construction des vecteurs	68
1.2.	Transformation de la souche TST6 d' <i>E. coli</i>	68
1.3.	Étude de la croissance des bactéries TST6 d' <i>E. coli</i>	69
2.	Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
2.1.	Construction des vecteurs	69
2.2.	Préparation des levures compétentes	70
2.3.	Transformations des levures	70
2.4.	Isolement des membranes de levure	71
2.5.	Étude de la croissance chez les levures W303RKO	71
2.6.	Étude du transporteur de maltose	71
2.6.1.	Purification des phospholipides	71
2.6.2.	Préparation des liposomes	72

2.6.3. Reconstitution des protéoliposomes	72
2.6.4. Étude du flux de maltose radioactif	72
3. Chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
3.1. Construction du vecteur	73
3.2. Extraction d'ADN génomique d' <i>Arabidopsis</i>	74
3.3. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	75
3.4. Transformation des plantes <i>mex1</i>	75
3.5. Sélection des transformants	76
<u>RESULTATS</u>	77
<u>CHAPITRE I</u>	77
PRODUCTION D'UNE BANQUE DE MUTANTS DEFICIENTS DANS LE CATABOLISME DE L'AMIDON CHEZ LA MICROALGUE VERTE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> VIA UNE APPROCHE DE GENETIQUE FORMELLE.	
<u>CHAPITRE II</u>	92
ETUDE DU MUTANT CAT15 DEFICIENT POUR UNE SERINE / THREONINE KINASE.	
I. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DU MUTANT CAT15	
II. IDENTIFICATION DE LA DEFECTUOSITE CHEZ LE MUTANT CAT15	95
1. Zymogrammes	95
2. Plasmid Rescue	96
III. CARACTERISATION MOLECULAIRE DU MUTANT CAT15	97
IV. COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE	98
1. Obtention des complémentants	98
2. Analyses du complémentant CAT15C13	98
V. ROLE PROBABLE POUR LA SERINE / THREONINE KINASE DANS LE CATABOLISME DE L'AMIDON	100
<u>CHAPITRE III</u>	102
ETUDE DU MUTANT CAT3 DEFICIENT POUR LE TRANSPORTEUR DE MALTOSE (MEX1).	102
I. ISOLEMENT ET CARACTERISATIONS PRELIMINAIRES DU MUTANT CAT3	103
1. Dosage de l'amidon	103
2. Cinétique de dégradation	104
3. Analyse de la structure de l'amidon	105
II. CARACTERISATIONS ENZYMATIQUE ET MOLECULAIRE DU MUTANT CAT3	106

Tables des matières

1. Identification du nombre d'insertions chez le mutant CAT3	106
2. Zymogrammes	106
3. PCR inverse	107
III. IMPLICATION DE L'INSERTION DANS <i>MEX1</i>	109
1. Analyse de la coségrégation	109
2. Complémentation Fonctionnelle	110
IV. IMPLICATION DU TRANPORTEUR <i>MEX1</i> DANS LE CATABOLISME DE L'AMIDON	113
1. Le mutant homologue chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	113
2. Etude de l'expression de <i>MEX1</i> chez la levure	113
3. Etude de l'expression de <i>MEX1</i> chez <i>Escherichia coli</i>	114
4. Etude du transport de maltose par radioactivité	115
5. Etude de l'expression de <i>MEX1</i> de Chlamydomonas chez le mutant <i>mex1</i> d' <i>Arabidopsis</i>	117
5.1. Construction du vecteur d'expression	118
5.2. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	118
5.3. Génotypage des lignées d' <i>Arabidopsi</i>	119
5.4. Agroinfection des plantes <i>mex1</i> et sélection des transformants	119
5.5. Etudes des transformants	120
V. DISCUSSION DU ROLE DU TRANPORTEUR <i>MEX1</i>	121
<u>CONCLUSION & DISCUSSION</u>	124
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	129

INTRODUCTION

L'amidon est non seulement une forme majeure de réserve énergétique pour les végétaux supérieurs mais également une source essentielle de nutriments chez les êtres humains et les animaux puisqu'il est le constituant principal des céréales (riz, maïs, blé etc.) et de la pomme de terre. Sous sa forme native, l'amidon est utilisé en tant qu'épaississant et liant. Cependant, la plupart des applications industrielles nécessite sa modification par oxydation, estérification ou dextrinisation pour lui donner de nouvelles fonctions. Ces amidons modifiés sont utilisés dans quasiment tous les secteurs de l'industrie agroalimentaire, particulièrement dans les confiseries, la pâtisserie, les plats préparés, les boissons, les produits laitiers et la boulangerie ; et dans les secteurs de l'industrie non alimentaire, comme les traitements de surface, la formulation de colles, l'empesage des vêtements, l'encapsulation de produits pharmaceutiques, les cosmétiques, la papeterie, les matériaux thermoplastiques ou encore les matières plastiques biodégradables (**Delcour et al., 2010 ; Ramesh et Tharanathan, 2003 ; Weber et al., 2002**). En ce qui concerne l'industrie chimique, ce glucide complexe est utilisé comme une matière première renouvelable dans les procédés de fermentation pour la production de bioéthanol (**Röper, 2002**).

Les contextes économique et environnemental actuels d'épuisement des sources d'énergie fossile et d'augmentation de la teneur atmosphérique en gaz à effet de serre renforcent l'intérêt pour la recherche de sources d'énergies propres et renouvelables. Dans cette optique, les organismes photosynthétiques comme les plantes supérieures, les algues vertes et certaines bactéries, qui réalisent la transformation d'énergie solaire et la fixation du gaz carbonique via la photosynthèse représentent une alternative de choix pour la production renouvelable de carburants par voie biologique (biocarburants). Néanmoins, la production d'énergie à partir des végétaux ne représente pas une situation idéale puisqu'elle risque d'entraîner l'augmentation de la pénurie alimentaire et de la demande de terres cultivées. Contrairement aux végétaux, l'utilisation des microalgues afin de produire de l'énergie propre ne rentre ni en compétition avec les besoins alimentaires de la population mondiale ni avec l'usage des terres arables. L'utilisation de bassins ouverts ou de bioréacteurs clos permet de cultiver des microalgues dans des zones inadaptées à l'agriculture, et empêche l'évaporation de l'eau ce qui permet l'économie considérable de cette dernière. Il faut cependant noter que les coûts d'investissement et d'exploitation

interdisent à l'heure actuelle d'envisager une production de masse rentable (**Chisti, 2008a, b; Li et al., 2008; Reijnders, 2008 et 2009**).

Que ce soit sous la forme de biohydrogène ou d'huiles, la production de sources d'énergie par les microalgues passe par l'optimisation de l'utilisation du pool de carbone présent chez celles-ci et pour lequel l'amidon représente une part majeure (**Radakovits et al., 2010**). La microalgue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, dont on a découvert la capacité de produire de l'hydrogène il y a plus de soixante-dix ans (**Gaffron et Rubin 1942**) accumule ce type de polysaccharide de réserve. Chez cette algue, la production d'hydrogène passe par deux voies : la voie directe dépendante du photosystème II (PSII) et la voie indirecte dépendante du photosystème I (PSI). Les études cherchant à relier ces deux voies métaboliques montrent des avis partagés. **Melis et al., (2007)** ont proposé que la dégradation de l'amidon aboutit aux deux voies de production de l'hydrogène alors qu'une autre étude (**Chochois et al., 2009**) a montré que la présence de réserves d'amidon n'est pas indispensable à la production d'hydrogène (H₂) par la voie directe (PSII). En effet, le mutant *sta6* affecté pour la biosynthèse de l'amidon produit des quantités significatives d'H₂ dans un milieu dépourvu de soufre, mais la production d'H₂ est fortement réduite lorsque la voie directe (PSII) est inhibée chez ce mutant. Les auteurs ont conclu que la voie indirecte (PSI) nécessite strictement la dégradation d'amidon pour la production d'H₂ et que la voie directe (PSII) utilise soit l'amidon soit l'acétate comme substrat afin de maintenir l'anaérobiose.

La compréhension parfaite des mécanismes naturels de mise en réserve et de dégradation de l'amidon que ce soit chez les plantes terrestres ou chez les algues vertes permettra d'améliorer l'utilisation de ce polysaccharide de réserve dans des applications industrielles agroalimentaires et non alimentaires. C'est dans ce cadre que s'insèrent les activités de recherche de notre groupe menées au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF-UMR 8576) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Mon projet de thèse a consisté à mettre en place un crible phénotypique efficace dans le but d'identifier des fonctions clés du catabolisme de l'amidon. La complexité des phénomènes à l'œuvre lors de ce crible demandait en effet une validation afin de s'assurer que des mutants véritablement affectés dans la dégradation de l'amidon pouvaient être isolés. L'utilisation optimisée des microalgues en

tant que source d'énergie propre ne se fera de façon efficace que lorsque l'ensemble des facteurs intervenant et dont fait partie la dégradation de l'amidon seront totalement appréhendés.

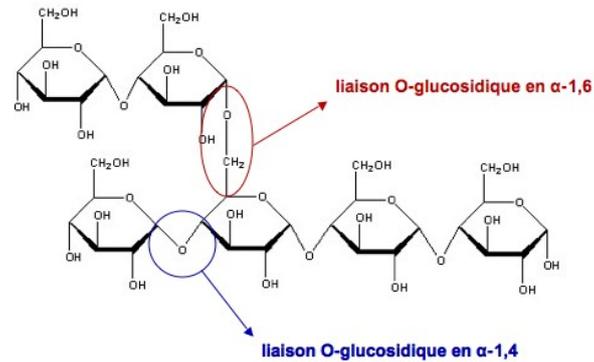


Figure 1 – Les liaisons de type O-glucosidiques des polysaccharides de réserve.

L'amidon, comme le glycogène, sont des polymères de glucoses liés entre eux par des liaisons O-glucosidiques de type α -1,4 (en bleu), c'est-à-dire que le glucose_(n+1) est lié par son 4^{ème} carbone au 1^{er} carbone du glucose_(n) via une liaison de type α , et ramifiés par des points de branchement qui sont des liaisons de type O-glucosidiques de type α -1,6 (en rouge).

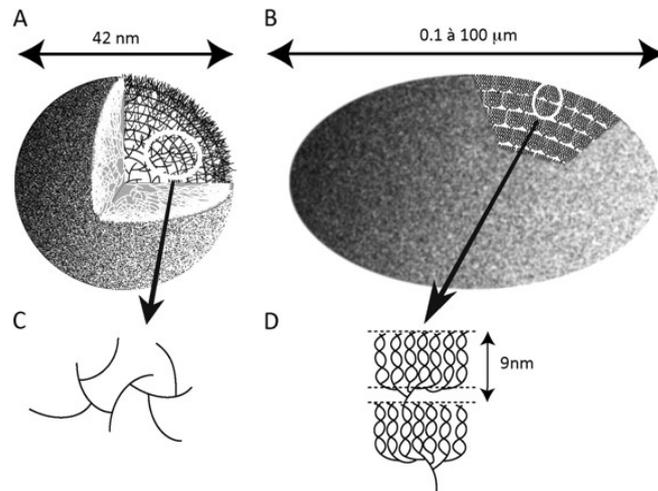


Figure 2 – Représentation schématique des grains de glycogène (A) et d'amidon (B) (Ball et al., 2011).

Les lignes représentent les chaînes de glucoses liés en α -1,4 et les intersections symbolisent les points de branchement en α -1,6. C et D correspondent aux vues agrandies des sections encerclées des grains de glycogène et d'amidon, respectivement. La répartition des branches illustrée en C, avec deux liaisons de type α -1,6 par glucane, conduit à l'augmentation exponentielle de la densité de chaînes lorsque l'on s'éloigne du centre de la particule vers la périphérie. Cela conduit à une taille maximale prédite de 42 nm pour la particule de glycogène représentée en A. Deux grappes typiques d'amylopectine sont schématisées en D. La structure en grappes est générée par la distribution asymétrique des branches qui sont situées à la base de chaque grappe. Les lignes pointillées délimitent les lamelles cristallines et les lamelles amorphes de la structure en grappes. Les doubles hélices de glucanes formées de 12 à 15 résidus de glucose sont responsables de la cristallinité de l'amylopectine. Elles sont séparées par les régions amorphes contenant les points de branchement. Il est remarquable de constater que la taille d'une grappe (région cristalline et amorphe) mesure précisément 9 nm quelle que soit l'origine végétale de l'amidon analysé.

I – GENERALITES ET STRUCTURE

Les polymères de glucoses liés en α -1,4 et ramifiés en α -1,6 (**Figure 1**) constituent la forme de stockage de l'énergie et du carbone la plus répandue chez les êtres vivants (**Ball et Morell, 2003**). Ils sont représentés principalement par deux macromolécules qui ne diffèrent que de par leur structure et leur organisation spatiale : le glycogène et l'amidon.

Le glycogène est un polymère soluble essentiellement homogène contenant 8 à 12 % de points de branchement (**Figure 2A**). C'est le polysaccharide de réserve des bactéries, des cellules animales et des champignons (**Manners, 1991**) chez lesquels il est stocké sous forme de particules pouvant atteindre au maximum un diamètre de 42 nm contenant 55 000 résidus de glucose (**Shearer et Graham, 2002**). En effet, la répartition régulière des points de branchement tout le long de la macromolécule crée un encombrement stérique important à sa périphérie, empêchant les enzymes de synthèse du glycogène de faire croître davantage la particule (**Figure 2C**). Le glycogène est synthétisé à partir d'UDP-glucose chez les cellules eucaryotes, et à partir d'ADP-glucose chez les bactéries (**Roach et al., 1998**).

On observe l'amidon uniquement chez les organismes dérivant de l'endosymbiose primaire (la capture d'une cyanobactérie par un eucaryote unicellulaire il y a 0.7-1.5 milliards d'années, (**Cavalier-Smith, 2006 ; Yoon et al., 2004**)). Ainsi, l'amidon s'accumule dans le plaste des eucaryotes photosynthétiques tels que les plantes supérieures ou les algues vertes (**Ball et al., 1998**) mais également dans le cytosol chez les algues rouges (**Viola et al., 2001**) et les glaucophytes (**Plancke et al., 2008**). D'autres organismes qu'ils aient gardé ou non leur capacité photosynthétique accumulent de l'amidon tels que certains parasites apicomplexes (**Coppin et al., 2005**) ou certaines dinoflagellées (**Deschamps et al., 2008a**). Il est bon de noter que ces organismes dérivent d'événements d'endosymbioses secondaires. Chez les représentants de la lignée verte, l'amidon est synthétisé à partir d'ADP-glucose uniquement (**Recondo et Leloir, 1961**).

Bien que de structure primaire identique au glycogène, l'amidon présente un caractère semi-cristallin et apparaît en microscopie sous forme de gros grains insolubles

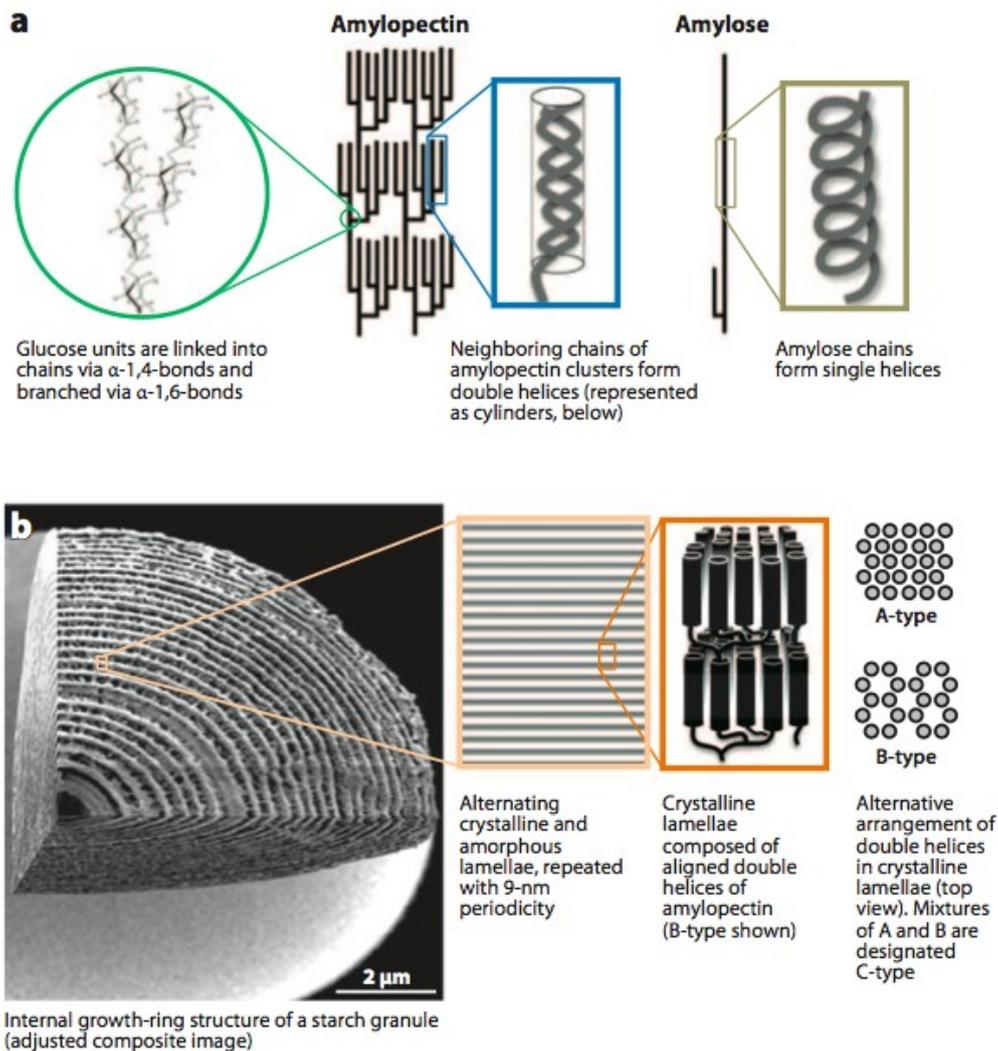


Figure 3 – Composition et Structure du grain d'amidon (Zeeman *et al.*, 2010).

(a) Représentation schématique de la structure de l'amylopectine et de l'amylose. Les points de branchement sont concentrés sur des anneaux concentriques contenant les doubles hélices afin de former les lamelles amorphes de la molécule d'amylopectine. La molécule d'amylose, linéaire, comporte moins de 1 point de branchement pour 100 glucoses. (b) Relation entre le grain d'amidon et la structure de l'amylopectine. L'hydrolyse acide ménagée d'un grain d'amidon de pomme de terre (à gauche) met en évidence l'alternance de zones résistantes (régions semi-cristallines) et sensibles (régions amorphes). Les zones résistantes deviennent visibles en microscopie électronique à balayage sous la forme d'anneaux de « croissance » concentriques (barre blanche = 2 μ m). L'agrandissement d'une région semi-cristalline (au milieu) montre une alternance de lamelles cristallines (les lignes grises) et amorphes (les lignes blanches). La disposition alternative des doubles hélices de la lamelle cristalline (à droite) permet de distinguer les trois types d'amidon : les types A, B et C. Le type C (non représenté sur cette figure) résulte d'un mélange des formes A et B au sein du même grain d'amidon.

de 0.1 à 100 μm de diamètre (**Buléon et al., 1998a**). La répartition non aléatoire des points de branchement laisse présager que le grain d'amidon peut atteindre des tailles jusqu'à 2000 fois supérieures à celles que peuvent atteindre les plus grosses particules de glycogène, soit 100 μm de diamètre (**Figure 2B**) (**Ball et Morell, 2003**). La proportion de ces points de branchement permet de différencier les deux sous-fractions de ce polysaccharide: l'amylopectine et l'amylose (**Figure 3A**) (**Buléon et al., 1998a**).

1. L' amylopectine

L'amylopectine est la fraction majoritaire de l'amidon et représente 65 à 85 % du poids sec du grain. Elle présente un degré de polymérisation de 10 000 à 500 000 résidus de glucose liés en α -1,4 et contient 4 à 6% de points de branchement en α -1,6 (**Buléon et al., 1998a ; Ball, 2002**). Le poids moléculaire de l'amylopectine est estimé entre 10^7 et 10^9 Daltons (**Buléon et al., 1998a**). Les points de branchement ne sont pas répartis de façon régulière le long de la molécule, mais plutôt concentrés au niveau des lamelles amorphes qui alternent avec les lamelles cristallines uniquement constituées de chaînes en α -1,4 (**Figure 3A**). Cette structure hautement agencée, caractéristique de l'amylopectine, est appelée structure en grappes, et confère à la molécule son caractère semi-cristallin et insoluble (**Ball et Morell, 2003**). Entre les zones de points de branchement, situées entre deux lamelles amorphes, les chaînes de glucose non-ramifiées s'enroulent en hélices à raison de six glucoses par tour, ce qui a pour conséquence une compaction accrue de la molécule (**Figure 2B**) (**Imberty et al., 1988**).

En règle générale, les chaînes dans les grappes sont formées en moyenne de 12 à 15 résidus de glucose. Les chaînes moins abondantes qui couvrent deux grappes contiennent environ 35 à 40 résidus, tandis que celles qui s'étendent sur trois grappes contiennent environ 70 à 80 résidus (**Buléon et al., 1998a**). Les molécules d'amylopectine sont organisées de telle manière que les extrémités non-réductrices des chaînes se dirigent vers la périphérie du grain d'amidon. Des paires de chaînes adjacentes dans les grappes forment des doubles hélices entre elles, donnant naissance à des lamelles cristallines séparées par des lamelles amorphes contenant les points de branchement (**Figure 2D**). Ces doubles hélices sont ainsi responsables du caractère semi-cristallin de l'amylopectine et donc du grain d'amidon. L'organisation de ces lamelles est répétée avec une périodicité de 9 nm quelle que soit l'origine végétale

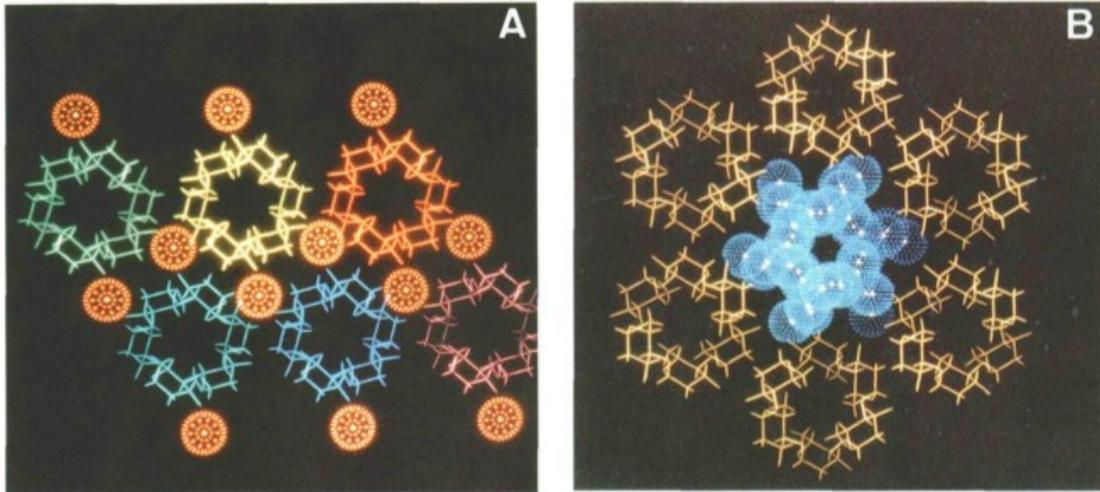


Figure 4 – Illustration de la disposition des doubles hélices de la lamelle cristalline (Buléon et al., 1997).

(A) Cristaux de type A. Les molécules d'eau sont représentées en orange. (B) Cristaux de type B. Les molécules d'eau figurent en bleu.

de l'amidon synthétisé. Cette structure semi-cristalline constitue la majorité de la matrice des grains d'amidon et elle est hautement conservée dans l'amidon des plantes supérieures (**Jenkins et al., 1993 ; Zeeman et al., 2002**). Il semble que cette organisation de l'amylopectine qui forme la matrice des grains repose plutôt sur un processus physique (**Zeeman et al., 2010**).

2. L' amylose

L'amylose est très faiblement ramifiée, avec moins de 1% de points de branchement (**Figure 3A**). Cette caractéristique lui confère son caractère amorphe. Comme l'amylopectine, il s'agit d'un polymère de glucoses liés en α -1,4 et branchés en α -1,6. Le poids moléculaire de l'amylose est estimé entre 10^5 et 10^6 Daltons (**Buléon et al., 1998a**). Son rôle ainsi que son agencement au sein du grain d'amidon restent toujours inconnus puisque l'amidon de mutants accumulant uniquement de l'amylopectine conserve une cristallinité parfaite (**Delrue et al., 1992**). En conséquence, les propriétés physico-chimiques de l'amidon ne proviennent que de la structure en grappes de l'amylopectine.

3. La nature cristalline de l'amidon

La nature cristalline de l'amidon a été établie depuis plusieurs décennies (**Katz, 1930 ; Katz et Van Itallie, 1930**). L'étude de la diffraction aux rayons X montre l'existence de trois types d'amidon : les types A, B et C. Ces types diffèrent par la disposition des doubles hélices formées par les chaînes d' α -1,4 glucanes dans la molécule d'amylopectine (**Figure 3B**), et donc par la position relative des molécules d'eau au sein du polymère (**Figure 4**) (**Imberty et al., 1988 ; Buléon et al., 1997 ; Buléon et al., 1998b**).

L'amidon de type A (**Figure 4A**), la forme la plus compacte (**Whittam et al., 1990**), est retrouvé chez les céréales et chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* tandis que l'amidon de type B (**Figure 4B**) est rencontré dans les organes de réserve comme les racines ou les tubercules. Enfin, l'amidon de type C retrouvé chez des légumineuses ou chez les céréales, résulterait d'un mélange des formes A et B au sein du même grain (**Buleon et al., 1998 a et b**).

Les conditions climatiques et le contrôle génétique lors de la croissance des plantes agissent probablement sur la cristallinité de l'amidon (**Buléon et al., 1998a**). La longueur des chaînes intervenant dans la phase cristalline et dans le motif de ramification de molécules d'amylopectine, influence la cristallinité et le type de cristallite formé (**Hizukuri et al., 1997**). Néanmoins, les conditions de température et d'hydratation lors de la croissance peuvent aussi induire des changements importants dans la composition du ratio A:B (**Buléon et al., 1994**).

4. Les différents types d'amidon

On peut distinguer deux types d'amidon : l'amidon floridéen et l'amidon des plantes supérieures et des algues vertes. L'amidon floridéen est accumulé dans le cytoplasme des algues rouges et leurs dérivés (**Viola et al., 2001**). Les études cherchant à déterminer le précurseur utilisé chez ces organismes, semblent montrer qu'il est produit à partir d'UDP-glucose même si les enzymes semblent également être capables de fonctionner à partir d'ADP-glucose (**Deschamps et al., 2006; Deschamps et al., 2008a; Plancke et al., 2008**).

L'amidon des plantes supérieures et des algues vertes est synthétisé quant à lui à partir d'ADP-glucose (**Recondo et Leloir, 1961**). Il est stocké dans les plastes des végétaux supérieurs et inférieurs. On peut distinguer l'amidon transitoire, encore appelé photosynthétique, qui est produit dans le chloroplaste durant la journée afin de couvrir les besoins énergétiques de la plante pendant la nuit, de l'amidon de réserve, qui est accumulé dans un plaste non-chlorophyllien appelé amyloplaste pour un stockage à long terme ou en période de carence. C'est par exemple le cas de l'amidon présent au niveau des racines, des graines (le maïs, le blé, le riz, le pois) ou des tubercules (la pomme de terre) qui servira de source d'énergie lors de la germination et jusqu'à l'acquisition de la photo-autotrophie par la nouvelle plantule (**Fincher, 1989**).

5. Les autres constituants de l'amidon

Les α -glucanes constituent la majorité du grain d'amidon cependant on peut trouver une quantité non négligeable d'autres molécules comme des lipides et des protéines. Les lipides représentent environ 0.6 à 1.2 % du poids total du grain d'amidon

de céréales comme le blé, le maïs ou le riz. Il s'agit principalement de lipides internes constitués pour la majeure partie d'acides gras libres et de lysophospholipides, de lipides de surface composés de triglycérides et de glycolipides et phospholipides, reliquats membranaires de l'amyloplaste (**Buléon et al., 1998a**).

Certaines protéines sont purifiées avec les grains d'amidon. Elles peuvent être adsorbées à la surface du grain de manière plus ou moins spécifique, ou bien emprisonnées dans le grain d'amidon lors de sa croissance (**Buléon et al., 1998a**). Les protéines liées spécifiquement aux grains interviennent pour la plupart dans les processus de biosynthèse et/ou de mobilisation de l'amidon. En effet, une analyse du protéome de l'amidon de pois a permis de trouver parmi celles-ci des enzymes telles que les amidon synthétases I et II, ou une enzyme de branchement (**Boren et al., 2004**). Il faut également évoquer la GBSSI (l'amidon synthétase I liée au grain, Granule-Bound Starch Synthase I) responsable de la biosynthèse de l'amylose, qui représente à elle seule 0.1 % du poids du grain d'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii* (**Wattebled et al., 2002**).

La friabiline, une autre protéine associée aux grains d'amidon, a été abondamment étudiée, notamment chez le blé, en raison de son association variable au grain d'amidon en fonction de sa texture (**Oda et Schofield, 1997; Buléon et al., 1998a; Kosourov et al., 2007**). Cependant, son rôle est encore largement méconnu et son association aux grains d'amidon pourrait n'être qu'un artefact.

6. L'interaction de l'amidon avec l'iode

Une propriété physico-chimique d'intérêt de l'amidon repose sur sa capacité d'interaction avec l'iode. La coloration à l'iode est une technique couramment utilisée pour visualiser la présence d'amidon dans des tissus végétaux. L'interaction des α -glucanes avec l'iode a été décrite pour la première fois en 1971 (**Banks et al., 1971**). Les chaînes de glucose longues de plus de 12 résidus adoptent une conformation en hélices au centre desquelles se placent les molécules d'iode (I_2). La valeur de la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) de ce complexe iode/glucanes augmente lorsque le degré de polymérisation (nombre de glucoses constitutifs de la

chaîne) s'accroît. Cette caractéristique permet d'effectuer très rapidement des analyses qualitatives de la structure et de la composition de l'amidon.

Ainsi, chez *Chlamydomonas*, la coloration à l'iode de patches cellulaires a permis par le passé d'isoler de nombreux mutants déficients pour la synthèse du polysaccharide de réserve (**Hicks et al., 2001**). Cette interaction permet également de détecter des défauts structuraux du polysaccharide après séparation grâce à la chromatographie d'exclusion stérique des deux sous-fractions de l'amidon. En effet, la λ_{max} de l'amylopectine, chez une souche sauvage, est de l'ordre de 550 nm et celle de l'amylose aux alentours de 620 nm. Une modification de ces valeurs est souvent le fruit d'une modification de la structure du polysaccharide.

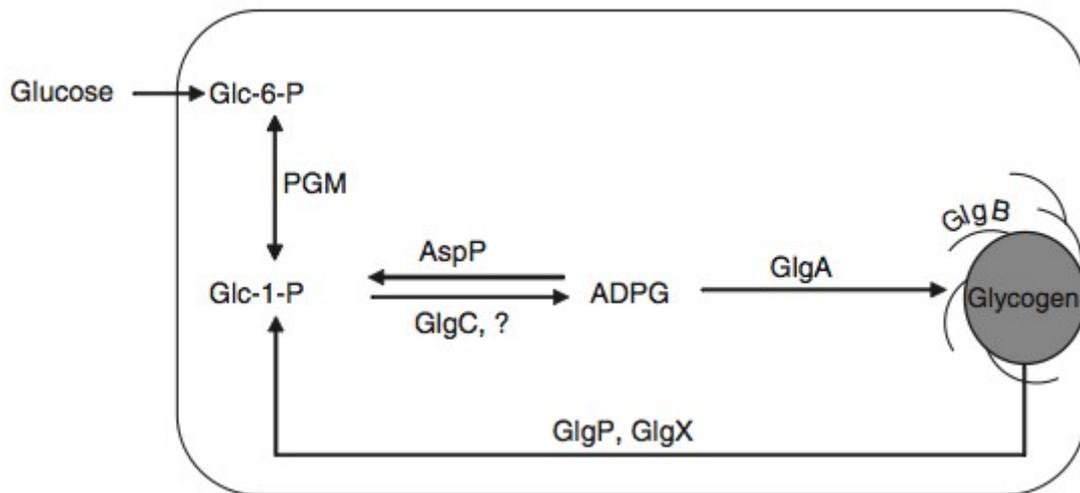


Figure 5 – Modèle schématique du métabolisme du glycogène chez *Escherichia coli* (Moran-Zorzano et al., 2008).

Le glucose est incorporé dans la cellule et transformé respectivement en glucose-6-phosphate, glucose-1-phosphate, ADP-glucose et glycogène. La biosynthèse du glycogène implique les réactions couplées par différentes enzymes (PGM, GlgC, GlgA et GlgB). La dégradation de ce polysaccharide est contrôlée à la fois par GlgP et par GlgX. Il est important de noter que les enzymes de branchement et de débranchement coexistent en même temps dans le cytosol des cellules bactériennes (**Ball et Morell, 2003**). L'AspP est capable d'empêcher la biosynthèse du glycogène en détournant le flux de carbone à partir d'ADP-glucose vers d'autres voies métaboliques en fonction des besoins de la bactérie. Glc-6-P : Glucose-6-phosphate ; PGM : phosphoglucomutase ; Glc-1-P : Glucose-1-phosphate ; AspP : ADP-glucose pyrophosphatase ; GlgC : ADP-glucose pyrophosphorylase ; ADPG : ADP-glucose ; GlgP : glycogène phosphorylase ; GlgX : enzyme de débranchement ; GlgA : glycogène synthétase ; GlgB : enzyme de branchement.

II – METABOLISME DES POLYSACCHARIDES DE RESERVE

Même si l'amidon et le glycogène partagent une structure primaire identique (ces deux polymères sont simplement composés de chaînes de glucose liées par des liaisons O-glucosidiques en α -1,4 et branchées en α -1,6), la synthèse de ces deux polysaccharides de réserve nécessite un ensemble d'enzymes complètement différent. Plus de 40 fonctions différentes sont impliquées dans la synthèse et la mobilisation de l'amidon (**Deschamps et al., 2008b**) alors que le métabolisme du glycogène des bactéries n'exige pas plus de 5 activités enzymatiques (**Wilson et al., 2010**).

1. Le métabolisme du glycogène chez les bactéries

Le métabolisme du glycogène est extrêmement conservé chez certaines espèces bactériennes (**Ballicora et al., 2003 ; Preiss, 2009**). Chez les bactéries non-pathogènes et les bactéries pathogènes légèrement parasites, la présence du glycogène est souvent associée à une ADP-glucose pyrophosphorylase, une glycogène synthétase, une glycogène phosphorylase, une enzyme de branchement, et une enzyme de débranchement. Ces enzymes sont organisées en deux opérons voisins chez *Escherichia coli* (**Preiss et Romeo, 1989 ; 1994**).

Chez *E. coli*, le glucose extracellulaire est importé et transformé en glucose-6-phosphate (Glc-6-P) par le système de transport de type phosphotransférase (PTS) des glucides (**Figure 5**). Le glucose-6-phosphate est ensuite transformé en glucose-1-phosphate par la phosphoglucomutase (PGM). En présence d'ATP et de Mg^{2+} , le glucose-1-phosphate est converti en ADP-glucose et en pyrophosphate inorganique (PP_i) via l'action de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (GlgC) (**Ballicora et al., 2003**). L'ADP-glucose est utilisé comme nucléotide-sucré précurseur afin de produire le glycogène bactérien par l'action de la glycogène synthétase appelée « GlgA » (**Preiss, 2009**). La seule exception connue à cette règle est la bactérie Gram négative, *Prevotella bryantii*, déficiente pour GlgC et dont GlgA reconnaît exclusivement l'UDP-glucose en tant que précurseur (**Lou et al., 1997**). Après l'élongation des chaînes par la GlgA, l'enzyme de branchement GlgB clive d'abord une chaîne linéaire de six à neuf unités de glucose à partir d'une extrémité non-réductrice de la molécule de glycogène, puis transfère le malto-oligosaccharide (MOS) libéré sur le groupe hydroxyle C-6 d'un autre résidu de

glucose (**Preiss, 2009**). **Ugalde et al., (2003)** ont montré que la glycogène synthétase d'*Agrobacterium tumefaciens* ne sert pas uniquement à allonger les chaînes de glucanes liés en α -1,4, mais aussi à former le précurseur nécessaire au processus d'élongation par sa propre glucosylation.

Le métabolisme du glycogène est soumis à une régulation allostérique des enzymes (**Deutscher et al., 2006 ; Preiss, 2009**). Le point de contrôle majeur se fait au niveau de l'enzyme GlgC (ADP-glucose pyrophosphorylase) (**Ball et Morell, 2003**), à l'exception des GlgC de certains types de *Bacillus spp.* qui possèdent des enzymes non-régulées (**Ballicora et al., 2003**). En ce qui concerne *E. coli*, la GlgC est activée par le fructose-1,6-bisphosphate alors que l'AMP est un puissant inhibiteur de cette enzyme. Le mutant d'*E. coli* portant une forme défectueuse de GlgC insensible à la modulation allostérique par l'AMP (**Govons et al., 1973**) et le mutant *purA* déficient dans les premières étapes de la biosynthèse de l'AMP (**Montero et al., 2009**) accumulent des quantités excessives de glycogène, démontrant l'importance de la modulation allostérique de GlgC dans la régulation du métabolisme du glycogène.

La glycogène phosphorylase (GlgP) qui libère les unités de glucose à partir de l'extrémité non-réductrice de la molécule de glycogène, et l'enzyme de débranchement (GlgX) participent à la dégradation du polysaccharide (**Figure 5**) (**Dauvillée et al., 2005 ; Alonso-Casajus et al., 2006**). La GlgP est activée par son interaction avec une forme non-phosphorylée de HPr, un composant du système de transport PTS (**Seok et al., 2001 ; Deutscher et al., 2006**). Toutes les α -1,4 glucanes phosphorylases connues à ce jour sont incapables d'hydrolyser les liaisons α -1,6 et nécessitent la présence simultanée des enzymes de débranchement (GlgX) afin de dégrader entièrement la molécule de glycogène. L'enzyme bactérienne GlgX est une enzyme hydrolytique très exigeante qui agit uniquement sur les branches d'une chaîne qui a été complètement digérée par la glycogène phosphorylase. Cette spécificité assure que l'enzyme de débranchement n'entre pas en compétition avec le processus de biosynthèse du glycogène. Les enzymes de branchement et de débranchement peuvent ainsi coexister en même temps dans le cytosol des cellules bactériennes (**Ball et Morell, 2003**).

La plupart des α -1,4 glucanes phosphorylases sont incapables de digérer les glucanes contenant moins de cinq unités de glucose. La glycogène phosphorylase limite

dextrine (un glycogène entièrement digéré par la phosphorylase) contient donc essentiellement des chaînes externes de quatre résidus de glucose qui peuvent être facilement débranchées par l'enzyme de débranchement GlgX. Cela aboutit à la production du maltotétraose, qui doit être métabolisé ultérieurement. Les bactéries comme *E. coli* ou *Synechocystis* vont utiliser ces malto-oligosaccharides (MOS) afin de former des chaînes plus longues par l'action des α -1,4 glucanotransférases telles que l'amyloamylase d'*E. coli*, MalQ,, générant ainsi une série de malto-oligosaccharides de longueur croissante. Les plus longues chaînes de malto-oligosaccharides (MOS) seront ensuite digérées via l'action de la maltodextrine phosphorylase (MalP) afin de produire du glucose-1-phosphate (**Boos et Shuman, 1998**).

L'ADP-glucose pyrophosphatase (AspP : Adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase) catalyse la dégradation hydrolytique de l'ADP-glucose (**Figure 5**), le nucléotide-sucre précurseur nécessaire à la biosynthèse du glycogène (**Moreno-Bruna et al., 2001**). L'AspP est non seulement activée par le glucose-1,6-bisphosphate et les nucléotides-sucres mais aussi par l'encombrement macromoléculaire (**Moran-Zorzano et al., 2007**). L'encombrement macromoléculaire accru peut affecter l'activité, le statut de l'assemblage, la formation de complexes et l'adhésion à des structures cellulaires de nombreuses enzymes. Cet encombrement devient plus important lorsque les cellules entrent dans la phase stationnaire (**Makinoshima et al., 2003**). L'AspP est strictement régulée dans la cellule bactérienne, jouant probablement un rôle important dans la prévention de l'accumulation de l'ADP-glucose en détournant le flux de carbone de la biosynthèse du glycogène vers d'autres voies métaboliques en réponse aux besoins de la bactérie (**Moran-Zorzano et al., 2008**).

Une différence majeure entre plantes et bactéries repose dans les étapes menant à l'agrégation du polysaccharide en état semi-cristallin et insoluble. Le métabolisme de l'amidon est une voie conservée du plus petit eucaryote photosynthétique (l'algue unicellulaire *Ostreococcus tauri* dont la taille est comparable à celle des plus petites bactéries photosynthétiques) jusqu'aux plantes supérieures (**Rai et al., 2004; Derelle et al., 2006; Deschamps et al., 2008b**). L'implication de plus de 40 gènes dans la synthèse et la mobilisation de l'amidon comparée aux 5 gènes du métabolisme du glycogène peut être expliquée par le nombre important d'isoformes qui catalysent chaque étape bien que cette explication ne soit pas suffisante. En effet, des

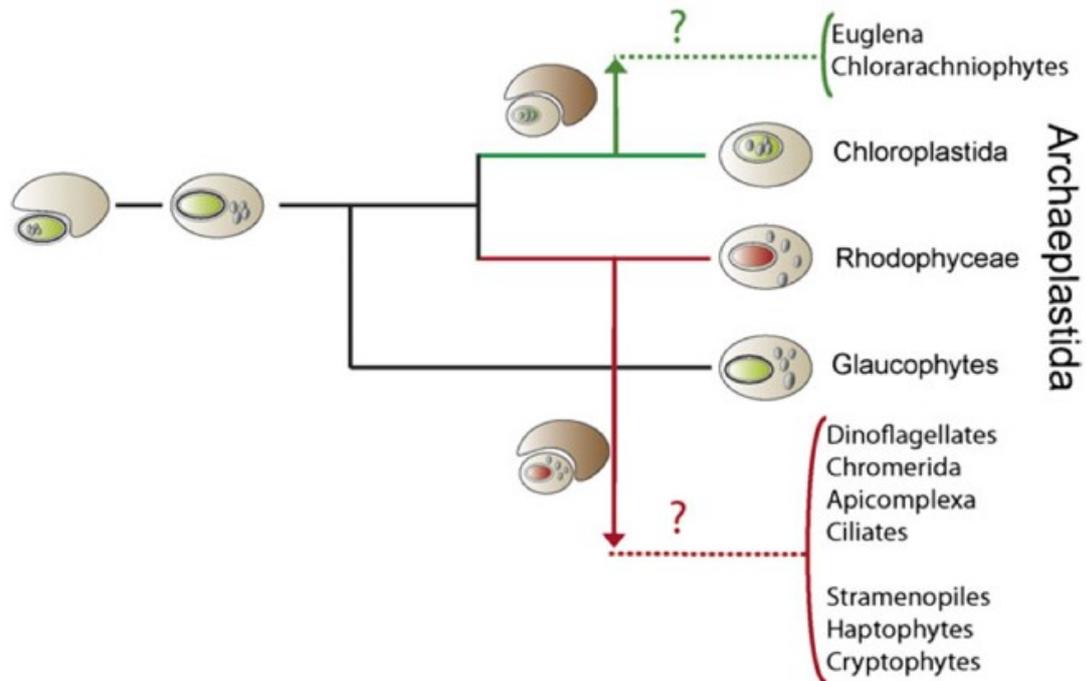


Figure 6 – Les endosymbioses primaire et secondaires (Ball et al., 2011).

Les eucaryotes photosynthétiques dérivent d'un événement unique qui implique la phagocytose d'un ancêtre des cyanobactéries par un hôte eucaryote hétérotrophe. Suite à l'endosymbiose primaire, trois lignées contenant un plaste sont apparues : les Chloroplastida (les plantes terrestres et les algues vertes), les Rhodophyceae (les algues rouges) et les Glaucophyta (les glaucophytes). Ces trois lignées, en plus de la photosynthèse, ont acquis la capacité de produire de l'amidon. L'amidon se trouve dans le cytosol de toutes les glaucophytes et des algues rouges alors qu'il est retrouvé dans les plastides de toutes les algues vertes et des plantes terrestres. Le nombre exact des événements d'endosymbiose secondaire est encore sujet à débat. Cependant, l'amidon est toujours présent dans le cytosol de la plupart des dinoflagellées et certains parasites apicomplexes et entre la 2^e et 3^e membrane des plastides secondaires des cryptophytes.

fonctions spécifiques à la biosynthèse de l'amidon se sont greffées au modèle de base que représente le métabolisme du glycogène.

2. Le métabolisme de l'amidon chez les Archéplastides :

Les endosymbioses primaire et secondaires

Un ancêtre des cyanobactéries actuelles a été internalisé, probablement par phagocytose (**Raven et al., 2009**), par un hôte unicellulaire hétérotrophe il y a 0.7-1.5 milliards d'années (**Cavalier-Smith, 2006 ; Yoon et al., 2004**). Cet événement unique a entraîné le développement de trois lignées contenant un plaste (**Figure 6**) : les Chloroplastida (les plantes terrestres et les algues vertes), les Rhodophyceae (les algues rouges) et les Glaucophyta (les glaucophytes) (**Rodriguez-Ezpeleta et al., 2005**). Ces trois lignées engendrées par l'endosymbiose primaire contiennent le plaste d'origine entouré par deux membranes et ont donc été nommées « Archaeplastida » (les Archéplastides) (**Adl et al., 2005**). Les ancêtres de ces lignées ont également été phagocytés par d'autres eucaryotes hétérotrophes, générant ainsi une variété de lignées d'endosymbiose secondaire avec des plastes dérivés (**Keeling, 2009**). Les algues rouges (Rhodophyceae) et vertes (Chloroplastida) contiennent des plastes sans peptidoglycane appelés, respectivement, des rhodoplastes et des chloroplastes. Ils se distinguent par la structure et la composition de leurs antennes photosynthétiques qui, chez les Chloroplastida, contiennent de la chlorophylle b tandis que les algues rouges utilisent encore les phycobilines bactériennes. Lors de l'endosymbiose secondaire, la vacuole de phagocytose a été soit conservée soit fusionnée avec le réticulum endoplasmique, donnant dans la plupart des cas, des plastes «secondaires» à quatre membranes. Ce type d'événement a engendré un certain nombre d'eucaryotes photosynthétiques importants telles que les algues brunes, les diatomées, les dinoflagellées, les cryptophytes et les haptophytes (**Ball et al., 2011**).

En dehors de la photosynthèse, les eucaryotes ont acquis un certain nombre de caractéristiques biochimiques que l'on ne retrouve pas chez les eucaryotes hétérotrophes non-liés aux Archéplastides. Parmi ceux-ci, on peut citer la capacité de synthétiser de l'amidon, une forme insoluble et semi-cristalline de polysaccharide de réserve, qui a été retrouvée uniquement chez les Archéplastides et chez certains de leurs dérivés par endosymbiose secondaire. L'amidon n'a pas été universellement

Activity	Cyanobacteria (<i>Crocospaera watsonii</i>)	Eukaryotes (<i>Entamoeba histolytica</i>)	Common ancestor	Green lineage (<i>Ostreococcus tauri</i>)	Red lineage (<i>Cyanidioschizon merolae</i>)
ADP-glucose pyrophosphorylase	1	0	1	2	0
Soluble starch synthase (ADPG) SSIII-SSIV	2	0	1	3	0
Soluble starch synthase (ADPG) SSI-SSII			1	2	
Soluble starch synthase (UDPG)	0	1	1	0	1
GBSS I	1	0	1	1	1
Branching enzyme	3	1	1	2	1
Isoamylase	1	0	2	3	2
Indirect debranching enzyme	0	1	0	0	0
Phosphorylase	2	2	2	2	1
Glucanotransferase	1	0	1	1	0
Transglucosidase	0	2	1	1	1
β-Amylase	0	4	1	2	1
Glucan water dikinase	0	?	1	3	1
Phosphoglucan water dikinase	0	?	1	2	1
Laforin or Sex4 type phosphatases	0	1	1	1	1

Tableau 1 – Nombre minimal d'isoformes pour chaque classe d'enzymes du métabolisme du glycogène et de l'amidon (Ball et al., 2011).

À l'aide d'analyses phylogénétiques, il a été possible de déterminer l'origine de chaque isoforme dans les lignées rouges et vertes à l'exception des GWDs (Glucan-water dikinase). Les enzymes provenant des cyanobactéries sont surlignées en bleu. Les enzymes d'origine eucaryote sont affichées en beige et celles qui ont sans doute été transférées par une bactérie de type Chlamydia sont illustrées en rose. Les enzymes dont l'origine est incertaine sont colorées en gris. *Crocospaera watsonii*, *Entamoeba histolytica*, *Cyanidioschizon merolae* et *Ostreococcus tauri* ont été choisis comme génomes modèles pour les cyanobactéries, les eucaryotes hétérotrophes, les algues rouges, et les plantes vertes, respectivement. La reconstruction du métabolisme de l'amidon chez l'ancêtre commun est encadrée en noir.

transmis aux lignées d'endosymbiose secondaire qui peuvent également accumuler des β -glucanes (**Ball et al., 2011**).

Au cours de ces dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension de la synthèse et la dégradation de l'amidon chez les différentes lignées des Archéplastides. Il a été prouvé que le métabolisme de l'amidon était constitué d'un mélange mosaïque de gènes provenant d'au moins trois partenaires de l'endosymbiose primaire (**Ball et al., 2011**). Le métabolisme de l'amidon chez l'ancêtre commun des Archéplastides a été reconstruit en définissant l'ensemble minimal d'enzymes nécessaires (**Tableau 1**) qui doit être présent chez celui-ci et qui permet d'expliquer la répartition actuelle des enzymes impliquées dans cette voie métabolique chez les Chloroplastida, les Rhodophyceae et les Glaucophyta (**Coppin et al., 2005 ; Patron et Keeling, 2005 ; Plancke et al., 2008 ; Deschamps et al., 2008b, c ; Ball et al., 2011**).

Deschamps et al., (2008d) a proposé que le symbionte a perdu sa capacité de produire de l'amidon à un stade très précoce après l'endosymbiose, et plusieurs des gènes bactériens ont été transférés du cyanobionte et de la bactérie de type Chlamydia vers le noyau de l'hôte qui ont été exprimés dans le cytosol. Certains de ces gènes transférés (par exemple, l'isoamylase et l'amidon synthétase liée au grain d'amidon) sont essentiels pour transformer les voies existantes de la biosynthèse de glycogène des cellules eucaryotes en biosynthèse d'amidon.

3. Le métabolisme de l'amidon chez les plantes supérieures

Le métabolisme de l'amidon diffère du métabolisme du glycogène des cyanobactéries par deux points majeurs : Premièrement, la biosynthèse de l'amidon chez les végétaux nécessite l'implication de plusieurs isoformes qui catalysent chaque étape de cette voie. Par exemple, cinq classes différentes d'amidon synthétases participent à l'élongation du polymère, trois enzymes de branchement sont responsables de la formation des liaisons α -1,6 ou encore quatre enzymes de débranchement sont impliquées dans le métabolisme de ce polysaccharide semi-cristallin. Deuxièmement, la dégradation de l'amidon nécessite la modification du polysaccharide puisque sa structure insoluble empêche son accès aux enzymes du catabolisme (**Ball et al., 2011**).

Dans les chapitres suivants, nous allons décrire pas à pas le rôle de chacune des enzymes de biosynthèse et de dégradation du polysaccharide décrit à ce jour.

3.1. La synthèse de l'amylose

L'amylose est synthétisé par une forme spécifique d'amidon synthétase (ADP-glucose α -1,4 glucane α -1,4 glucosyltransférase, EC 2.4.1.21) appelée la « GBSS » (Granule-bound starch synthase) qui est la protéine majoritaire du grain d'amidon. Elle représente, à elle seule, 95% de l'ensemble des protéines liées aux grains (**Leloir et al., 1961 ; Recondo et Leloir, 1961**). C'est une protéine de 60kDa chez les plantes, complétée d'une extension de 11kDa spécifique chez *Chlamydomonas* (**Wattebled et al., 2002**). Il existe deux isoformes fonctionnelles de GBSS: la GBSSI exprimée dans les tissus de réserve comme l'albumen et la GBSSII plutôt localisée dans le chloroplaste d'autre type de tissus (**Edwards et al., 2002 ; Fujita et Taira, 1998 ; Vrinten et Nakamura, 2000**).

Les plantes mutantes déficientes pour cette activité enzymatique sont capables de produire des quantités normales d'amidon sauf que celui-ci est complètement dépourvu d'amylose (**Denyer et al., 2001**). L'étude des mutants *waxy* chez le maïs (**Nelson et Rines, 1962 ; Tsai, 1974**), *amylose-free* chez la pomme de terre (**Hovenkamp-Hermelink et al., 1987**) ou *sta2* chez la microalgue verte *Chlamydomonas* (**Delrue et al., 1992**) chez lesquels la production d'amylose est abolie, démontre l'implication de la GBSS dans la synthèse de la sous-fraction minoritaire du polysaccharide. Les travaux effectués sur ces mutants prouvent que la synthèse de l'amylose n'est pas essentielle à la biosynthèse du grain d'amidon.

La GBSS diffère des autres classes d'amidon synthétase de par sa localisation sur le grain d'amidon et son mode d'action. Les études réalisées chez *Chlamydomonas* et chez *Arabidopsis* proposent que la nature de l'amorce utilisée par la GBSSI puisse être soit de l'amylopectine elle-même soit des malto-oligosaccharides libres (**Van de Wal et al., 1998 ; Zeeman et al., 2002**). Il est important de noter que la présence d'amylopectine est indispensable à la synthèse d'amylose et que les malto-oligosaccharides possèdent un rôle activateur sur la GBSSI (**Ball et al., 1998 ; Van de Wal et al., 1998**). Une étude récente montre que la suppression simultanée des gènes

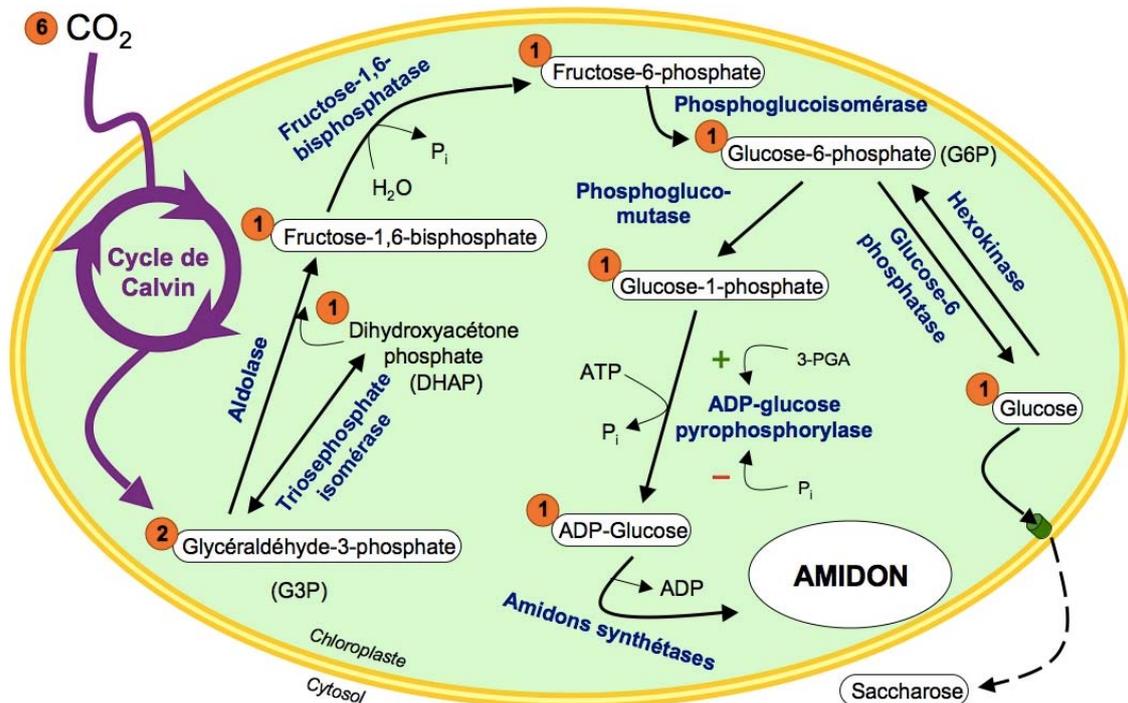


Figure 7 – Contribution du cycle de Calvin à la synthèse d'amidon.

Le carbone nécessaire à la synthèse du glucose, le seul sucre présent dans l'amidon, provient de la fixation du CO_2 par l'enzyme clé du cycle de Calvin, la RuBisCO. Au bout de six tours, douze molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) sont produites pour 6 molécules de CO_2 fixées. Alors que dix de ces molécules servent à régénérer le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP), l'accepteur de CO_2 , deux sortent du cycle afin d'être utilisées dans la synthèse des sucres. Une molécule de G3P est transformée par la triosephosphate isomérase en dihydroxyacétone phosphate (DHAP), ensuite ces deux trioses phosphates (G3P et DHAP) sont utilisés par une aldolase pour produire du fructose-1,6-bisphosphate. Après la déphosphorylation de ce dernier par une fructose-1,6-bisphosphatase, le fructose-6-phosphate formé est pris en charge par la phosphoglucoisomérase afin de produire du glucose-6-phosphate (G6P). Le G6P est ensuite converti en glucose par la glucose-6-phosphatase ou en glucose-1-phosphate (G1P) par la phosphoglucomutase. Le G1P est utilisé pour former l'ADP-glucose, le nucléotide-sucre précurseur de la biosynthèse de l'amidon. Il est d'ailleurs important de noter que le 3-phosphoglycéraldéhyde (3-PGA), premier intermédiaire du cycle de Calvin, est un activateur puissant de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase, qui synthétise le nucléotide-sucre précurseur. Le glucose formé, à son tour, est exporté vers le cytosol pour être converti en saccharose.

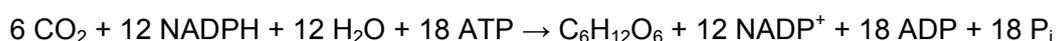
codant toutes les enzymes de branchement de l'amidon (BEs, voir II.c.2.2) par RNAi (interférence par ARN) provoque, chez l'orge, la production de grains d'amidon contenant uniquement de l'amylose (**Carciofi et al., 2012**). Cette étude propose que l'amylopectine n'est pas essentielle pour la cristallinité et l'intégrité du grain d'amidon, mais il est important de savoir que l'activité de branchement n'est pas totalement abolie mais est réduite de 82% chez ces mutants qui possèdent des grains d'amidon de morphologie altérée. Cette anomalie des grains laisse présager que l'amylopectine, qui possède une structure très ordonnée, joue, malgré la proposition des auteurs de cette étude, un rôle important dans la cristallinité et l'intégrité du polysaccharide.

3.2. La synthèse de l'amylopectine

L'amylopectine est une molécule chimique similaire au glycogène, le polysaccharide de réserve soluble produit par les animaux, les champignons et les bactéries. C'est un polymère de glucoses simplement liés par des liaisons α -1,4 et branchés en α -1,6. La première étape de la biosynthèse de l'amylopectine repose sur la production du nucléotide-sucre précurseur unique : l'ADP-glucose. Ce précurseur sera ensuite utilisé afin d'effectuer l'élongation des α -1,4 glucanes qui serviront à leur tour à l'introduction de points de branchement. Cette molécule diffère néanmoins du glycogène par son faible taux de points de branchement, qui sont de plus distribués d'une manière spécifique afin de conférer au polymère sa structure en grappes.

3.2.1. La production de l'ADP-glucose

Pendant la phase photochimique de la photosynthèse, l'énergie de la lumière est convertie en énergie chimique conservée dans l'ATP et le NADPH. Le cycle de Calvin, la phase non photochimique, utilise l'énergie de ces métabolites réducteurs pour transformer le CO₂ en glucose et autres composés organiques (saccharose, amidon (**Figure 7**) ou lipide). Pour la formation d'un hexose, 6 molécules de CO₂ doivent être fixées et ainsi la somme totale des réactions du cycle de Calvin sera :



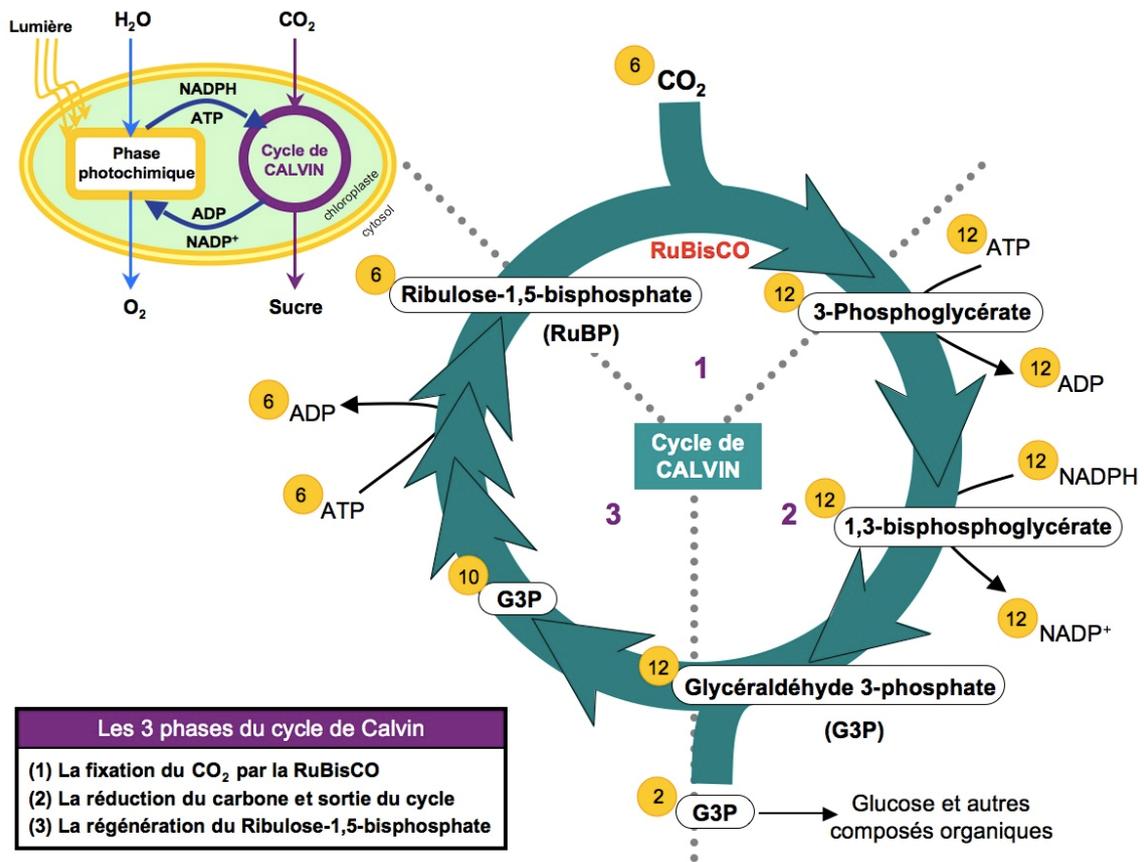


Figure 8 – Représentation schématique du cycle de Calvin.

La phase indépendante de la lumière utilise les molécules énergétiques, l'ATP et le NADPH, produites lors de la phase photochimique. Le cycle de Calvin se déroule dans le stroma du chloroplaste en 3 phases : la carboxylation, la réduction et la régénération. La première étape du cycle est la fixation du CO_2 sur le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) par la RuBisCO. Le 3-phosphoglycérate formé est ensuite phosphorylé par l'ATP et réduit par le NADPH pour donner respectivement le 1,3-bisphosphoglycérate et le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Le G3P formé peut avoir différentes destinations ; les 5/6èmes de celui-ci restent dans le cycle afin de régénérer l'accepteur du CO_2 , le RuBP et 1/6ème sort du cycle pour produire des sucres (hexoses, disaccharides ou amidon).

Ces réactions se déroulent dans le stroma du chloroplaste (**Figure 8**). La RuBisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase), l'enzyme clé du cycle, permet la fixation d'une molécule de CO₂ au ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) afin de former deux molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA). Le 3-PGA est ensuite phosphorylé par l'ATP et réduit par le NADPH pour former du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Le G3P formé soit reste dans le cycle pour la régénération du RuBP soit sort du cycle pour la synthèse des sucres (hexoses, disaccharides, amidon).

Au bout de six tours, deux molécules de G3P sortent du cycle et sont transformées respectivement en fructose-1,6-bisphosphate, fructose-6-phosphate et glucose-6-phosphate (**Figure 7**). Ce dernier est pris en charge par la phosphoglucomutase (PGM, EC 2.1.5.1) afin de produire du glucose-1-phosphate (G1P). Les mutants déficients pour cette activité chez *Arabidopsis thaliana* (**Caspar et al., 1985**), *Nicotiana tabacum*, (**Hanson et McHale 1988**), *Chlamydomonas reinhardtii* (**Van den Koornhuyse et al., 1996**) et *Pisum sativum* (**Harrison et al., 1998**) accumulent des quantités moindres d'amidon. En présence d'ATP, le G1P est ensuite converti en ADP-glucose, le précurseur de la chaîne de biosynthèse de l'amidon, et en pyrophosphate (PP_i) via l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27) qui nécessite le Mg²⁺ comme cofacteur (**Kavakli et al., 2001 ; Slattery et al., 2000 ; Ballicora et al., 2004**). Dans la lignée verte, la diminution ou l'abolition de l'activité AGPase s'accompagne toujours d'un effondrement drastique de la quantité d'amidon accumulée (**Ball et al., 1991 ; Zabawinski et al., 2001**) alors qu'une augmentation de cette activité est toujours couplée à une suraccumulation du polysaccharide (**Stark et al., 1992**). Ces résultats montrent l'importance de l'activité AGPase dans la synthèse d'amidon.

L'AGPase représente le point de régulation majeur de l'ensemble de la voie de biosynthèse de l'amidon (**Ball et Morell 2003**). Elle est régulée de manière allostérique par le ratio 3-PGA/P_i (3-PGA: 3-phosphoglycérate ; P_i: phosphate inorganique) (**Ghosh et Preiss, 1966 ; Sowokinos et Preiss, 1982 ; Ball et al., 1991 ; Tetlow et al., 2004 ; Ballicora et al., 2005**). En réponse à une augmentation de l'activité photosynthétique ou à une carence, l'augmentation du ratio 3-PGA/P_i active l'AGPase. En cas de diminution de ce ratio, suite à une baisse d'activité photosynthétique ou à une augmentation de la consommation d'énergie par la cellule, l'activité de cette enzyme est inhibée.

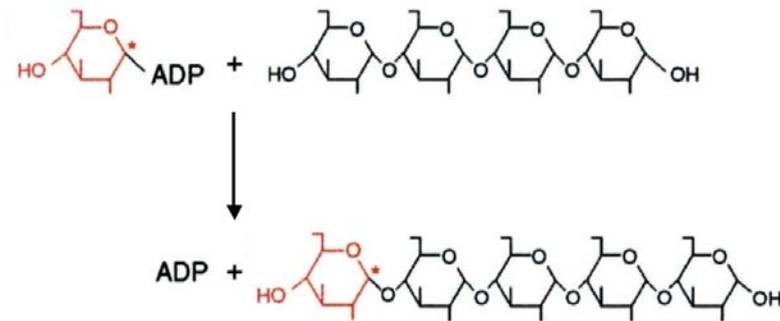


Figure 9 – Illustration de la réaction chimique catalysée par les amidon synthétases (SS) (Myers *et al.*, 2000).

Les amidon synthétases transfèrent le glucose du donneur de sucre à l'extrémité non réductrice d'une chaîne de glucanes en croissance, à l'aide d'une liaison α -1,4. L'unité de glucose transférée est représentée en rouge et les astérisques indiquent les carbones réduits.

	SSI	SSII	SSIII	SSIV	GBSS
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	1	2	1	2
<i>Volvox carteri</i>	1	2	1	2	1
<i>Ostreococcus tauri</i>	1	1	3	-	1
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	1	1	3	1	1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	1	1	1	1
<i>Solanum tuberosum</i>	1	1	1	-	1
<i>Zea mays</i>	1	2	1	1	1
<i>Oryza sativa</i>	1	3	2	2	2

Tableau 2 – Nombre de gènes par espèce codant chaque classe d'amidon synthétases chez les plantes (Schwarte *et al.*, 2013).

Les analyses des séquences protéiques permettent d'identifier cinq classes d'amidon synthétases chez les algues vertes et les plantes supérieures. Chez *A. thaliana*, chaque classe d'amidon synthétase est codée par un seul gène alors que chez les autres espèces, ces classes sont représentées par plusieurs isoformes.

L'AGPase se présente, chez les végétaux, sous la forme d'un hétérotétramère ($\alpha_2\beta_2$) constitué de deux grandes sous-unités (β) régulatrices et deux petites sous-unités (α) catalytiques (**Okita et al., 1990 ; Okita, 1992 ; Tetlow et al., 2004**) qui sont codées par des gènes distincts partageant probablement un seul ancêtre commun puisque les séquences de ces sous-unités sont 40 à 60 % identiques (**Nakata et al., 1991 ; Smith-white et Preiss, 1992**). Les sous-unités α sont capables de former un homotétramère catalytique (**Ballicora et al., 1995 ; Iglesias et al., 1993**). Par contre, celui-ci est moins sensible à l'inhibition par le P_i et nécessite une concentration élevée de 3-PGA pour son activation, suggérant l'importance essentielle de la sous-unité β pour le fonctionnement optimal de l'enzyme (**Ballicora et al., 1995 ; Kavakli et al., 2001**). Contrairement aux sous-unités α , les sous-unités β sont incapables de former un homotétramère mais une étude récente réalisée sur une isoforme de sous-unités β chez la tomate montre qu'elle peut avoir une activité catalytique sous forme de monomère (**Petreivkov et al., 2010**). De plus, il a été montré que chez la pomme de terre, l'ADP-glucose pyrophosphorylase est soumise à un mécanisme de régulation supplémentaire impliquant la réduction d'un pont disulfure reliant les deux petites sous-unités via des thiorédoxines (**Fu et al., 1998 ; Ballicora et al., 1999 ; Ballicora et al., 2000**). Cette réduction permettrait à l'enzyme de passer dans une conformation réduite active.

3.2.2. L'élongation des α -1,4 glucanes

Les amidon synthétases (ADP-glucose α -1,4 glucane α -1,4 glucosyltransférase, EC 2.4.1.21) utilisent l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ADP-glucose (le donneur de sucre) afin de transférer un glucose, à l'aide d'une liaison α -1,4, à l'extrémité non réductrice d'une chaîne de glucanes en croissance (l'accepteur) (**Figure 9**) (**Ball et Morell, 2003 ; Lairson et al., 2008**).

En se basant sur les analyses des séquences protéiques, on distingue cinq classes d'amidon synthétases chez les plantes (**Patron et Keeling, 2005**) : la GBSS (granule bound starch synthase), impliquée dans la synthèse de l'amylose (voir II.c.1.), et les quatre amidon synthétases solubles (SSI, SSII, SSIII et SSIV ; SS pour starch synthase) qui interviennent dans la synthèse de l'amylopectine. Ces cinq classes sont conservées chez les algues vertes et les plantes supérieures (**Tableau 2**). Les analyses phylogénétiques effectuées sur ces enzymes permettent de séparer la SSIII et la SSIV

des autres amidon synthétases (**Ball et Morell, 2003 ; Patron et Keeling, 2005**). Contrairement à la GBSS, la forme de synthétase liée au grain, les amidons synthétases solubles se trouvent souvent dans le stroma des plastes. Cependant, ces enzymes peuvent être, en partie, associées au grain d'amidon.

Les isoformes SSI, SSII et SSIII sont impliquées dans l'élongation des chaînes d'amylopectine d'une longueur spécifique. La SSI et SSII allongent de préférence les chaînes d'amylopectine les plus courtes contenant 4 à 10 unités de glucose et les chaînes de longueur moyennes contenant 12 à 24 unités de glucose, respectivement. La SSIII, quant à elle, allonge de préférence les chaînes d'amylopectine les plus longues et peut influencer le taux d'accumulation d'amidon dans les feuilles (**Morell et al., 2003; Zhang et al., 2005**). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'analyse des mutants affectés dans l'activité enzymatique SSI indique que cette enzyme joue le rôle de « remplissage » en allongeant les chaînes externes déjà existantes sur la molécule d'amylopectine (**Delvallé et al., 2005**). L'absence de l'activité SSII chez le riz (**Umemoto et al., 2002**) ou chez le pois (**Craig et al., 1998**) se caractérise par la diminution de la quantité d'amidon accumulée et de la cristallinité du polysaccharide. Cette absence d'activité perturbe également la répartition des chaînes d'amylopectine. Le mutant *sta3* de *Chlamydomonas*, dépourvu de l'activité SSIII, est fortement affecté dans la synthèse de l'amylopectine aboutissant à une modification structurale de la molécule et à une diminution de la quantité d'amidon accumulée (**Fontaine et al., 1993**).

La contribution de la SSIV dans l'élongation des chaînes d'amylopectine n'est pas évidente. L'abolition de l'activité SSIV chez *Arabidopsis thaliana* entraîne une diminution de la quantité d'amidon accumulée dans les feuilles sans affecter la structure de l'amylopectine produite (**Roldán et al., 2007**). Les plantes sauvages d'*Arabidopsis* contiennent à peu près cinq grains d'amidon dans chaque chloroplaste de la feuille alors que les mutants *ssIV* ne contiennent qu'un seul gros grain par chloroplaste. Cette augmentation de taille et la réduction du nombre de grains indiquent que la SSIV pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la formation du grain d'amidon et/ou dans la régulation du nombre de grains formés. Il faut noter que la perte de l'activité SSIV n'empêche pas complètement la biosynthèse d'amidon, suggérant l'existence d'une activité redondante dans le chloroplaste. En effet, en absence de l'activité SSIV, la SSIII intervient dans l'initiation de la formation d'un seul grain d'amidon par chloroplaste. De

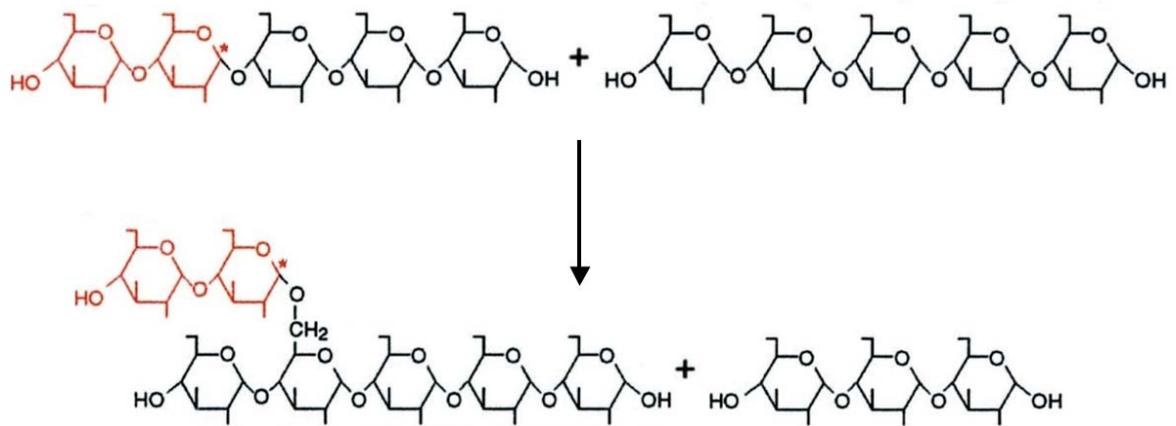


Figure 10 – Schéma représentatif du mode d'action des enzymes de branchement (BE) (Myers *et al.*, 2000).

Les enzymes de branchement clivent une chaîne linéaire de glucoses liés en α -1,4 afin de la transférer en α -1,6. Les unités de glucose transférées sont représentées en rouge et les astérisques indiquent les carbones réduits.

plus, les doubles mutants d'*Arabidopsis* déficients pour les activités SSIII et SSIV sont incapables de synthétiser de l'amidon bien que ces mutants contiennent encore 60% de l'activité amidon synthétase mesurée dans les plantes sauvages (**Szydlowski et al., 2009**). Ainsi, ces travaux de combinaisons de mutations proposent que la SSIII soit capable de synthétiser des glucanes à partir de l'ADP-glucose sans avoir besoin d'une amorce.

3.2.3. La formation des liaisons α -1,6

Les α -1,4-glucane-6-glycosyltransférases (EC 2.4.1.18) ou plus simplement les "enzymes de branchement" (BE pour Branching Enzymes) catalysent le clivage d'une chaîne linéaire de glucoses liés en α -1,4 afin de transférer le malto-oligosaccharide (MOS) libéré sur le même glucane ou un glucane proche par l'intermédiaire d'une liaison α -1,6 (**Borovsky et al., 1975**) (**Figure 10**).

Chez les plantes, ces enzymes sont réparties en deux classes : BEI (enzyme de branchement de type 1 ou classe B) et BEII (enzyme de branchement de type 2 ou classe A). Ces deux classes diffèrent par leur profil d'expression, leur affinité pour l'amylose et l'amylopectine, et leur activité. La BEII aboutit à la génération des chaînes courtes tandis que la BEI favorise plutôt le transfert des chaînes plus longues (**Guan et Preiss, 1993**). Ainsi, la BEII est moins affine pour l'amylose mais plus active envers l'amylopectine.

Les études réalisées sur les mutants déficients pour l'activité BEI émettent des avis partagés sur l'implication de cette enzyme dans la synthèse de l'amylopectine. Les mutants *sbe1* du maïs ne montrent aucune altération de la structure fine de l'amylopectine (**Blauth et al., 2002**) alors que l'absence de cette activité chez les mutants *sbe1* du riz engendre une diminution significative de la concentration des chaînes longues d'amylopectine et une augmentation de la concentration des chaînes courtes et intermédiaires (**Sato et al., 2003**).

Dans la classe BEII, on distingue deux isoformes. BEIIa et BEIIb. Chez les céréales, la BEIIa est présente dans la feuille et la BEIIb est spécifiquement exprimée dans les tissus de réserve comme l'albumen (**Yamanouchi et Nakamura, 1992** ; **Ohdan et al., 2005**). Les mutants déficients pour la BEIIa du maïs et du riz ne montrent

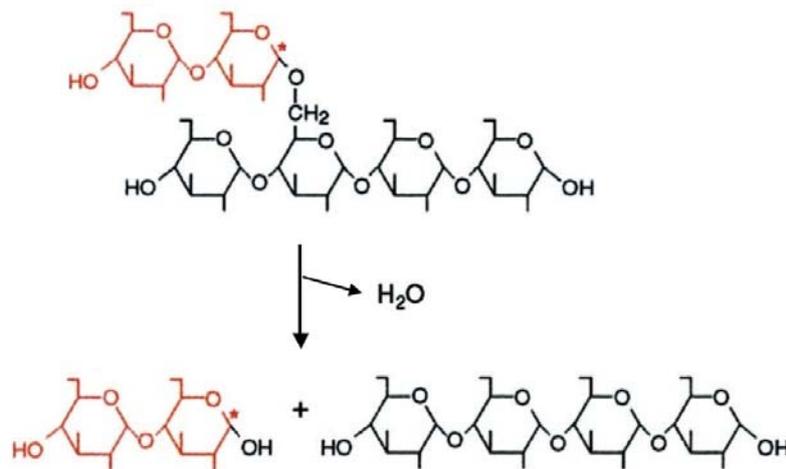


Figure 11 – Représentation schématique de l'activité des enzymes de débranchement directes (DBE) (Myers *et al.*, 2000).

Les enzymes de débranchement catalysent l'hydrolyse d'une liaison α -1,6. Les unités de glucose transférées sont représentées en rouge et les astérisques indiquent les carbones réduits.

aucun changement de la structure de l'amylopectine produite bien qu'une légère réduction du contenu en chaînes courtes de l'amylopectine de l'albumen du riz et des feuilles de maïs ait été observée (**Blauth et al., 2001 ; Nakamura, 2002**). Ces résultats laissent présager que la BEIIa joue un rôle de support pour les autres isoformes de BE. Le mutant *amylose extender* (*ae*) du maïs, dépourvu de l'activité BEIIb, produit de l'amidon contenant des quantités d'amylose élevées (**Yun et Matheson, 1993**). De plus, la suppression des deux activités BEIIa et BEIIb chez le blé entraîne également la production d'un amidon enrichi en amylose (**Regina et al., 2005**). Dans le double mutant *ae/wx* (déficient pour les activités BEIIb/GBSSI) du riz, l'amidon est dépourvu d'amylose et l'amylopectine contient moins de chaînes courtes (**Nishi et al., 2001**). L'ensemble de ces études suggère que la BEIIb est spécifiquement impliquée dans la formation des chaînes courtes d'amylopectine.

A ce stade, le polymère de glucoses produit se présentera sous forme d'un glycogène hyper ramifié et ne possèdera pas la structure semi-cristalline caractéristique de l'amylopectine. L'analyse de mutants chez les plantes comme chez les microalgues a permis de révéler l'existence de fonctions supplémentaires nécessaires à la production du polysaccharide semi-cristallin.

3.3. La production de la structure semi-cristalline :

L'implication d'autres enzymes

Des approches de génétique formelle ont permis de révéler l'importance de fonctions enzymatiques supplémentaires afin d'aboutir à la structure semi-cristalline de l'amylopectine. Il s'agit principalement d'activités de débranchement (DBE pour debranching enzyme, α -1,6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.10) et de l'activité disproportionnante (l'enzyme D, EC 2.4.1.25).

3.3.1. Les enzymes de débranchement

Les enzymes de débranchement (DBEs) catalysent l'hydrolyse d'une liaison O-glucosidique de type α -1,6 (**Figure 11**). La plupart des cellules végétales contiennent deux types de DBEs: les limite-dextrinases (LDA appelées aussi des pullulanases, EC 3.2.1.142) et les isoamylases (EC 3.2.1.68). Ces enzymes se distinguent par leurs

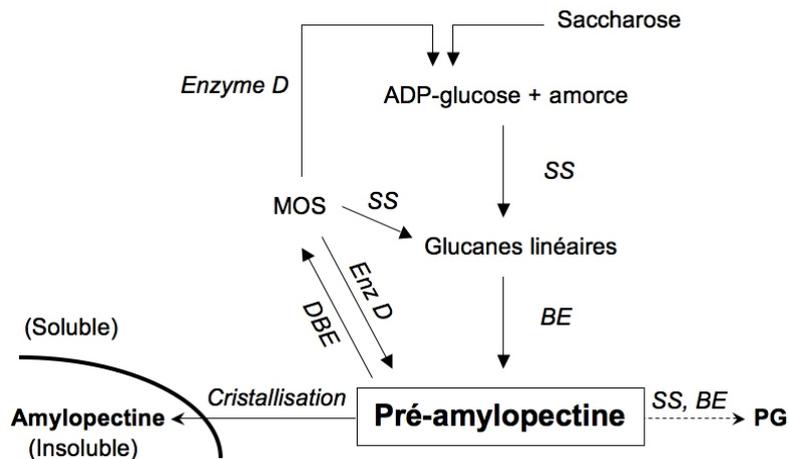


Figure 12 – Modèle de la biosynthèse discontinue de l'amylopectine (Myers et al., 2000).

Dans ce modèle, les chaînes de glucanes sont allongées par les amidon synthétases (SS). Lorsque celles-ci ont atteint une longueur suffisante, les enzymes de branchement (BE) viennent introduire des points de branchement donnant ainsi naissance à une molécule de type glycogène fortement ramifiée, appelée la pré-amylopectine. Les enzymes de débranchement (DBE) hydrolysent ensuite certains de ces points de branchement aboutissant à la libération de malto-oligosaccharides (MOS) et engendrent le caractère cristallin. Lors de ce mécanisme d'épissage, l'enzyme D (Enz D) recycle les MOS libérés par les DBEs afin de limiter la perte d'énergie. Ces MOS pourraient être transférés directement sur la pré-amylopectine ou utilisés dans la formation de l'ADP-glucose via l'action indirecte de l'enzyme D et d'une amidon phosphorylase. Les SSs peuvent également utiliser les MOS comme précurseur. La flèche en pointillés indique la production du phytoglycogène (PG) par l'action continue des SSs et BEs sur la pré-amylopectine, en absence de DBEs. Ceci rend la cristallisation impossible pour des raisons physiques. L'intérieur de l'arc représente l'intérieur d'un grain d'amidon (insoluble) et l'extérieur, la surface du grain (soluble).

séquences protéiques et leurs spécificités de substrat. Les pullulanases sont très actives sur l'amylopectine et le pullulane (un polysaccharide fongique composé de répétitions de maltotrioses branchés en α -1,6) alors que les isoamylases ne peuvent débrancher que l'amylopectine ou le glycogène (**Doehlert et Knutson, 1991**).

Les isoamylases sont séparées en 3 classes: ISA1, ISA2 et ISA3 (**Hussain et al., 2003**). Les études réalisées sur les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* et les tubercules de pomme de terre montrent l'implication des classes ISA1 et ISA2 (en formant un complexe hétéromultimérique) dans la synthèse de l'amylopectine. Chez le riz, ISA1 est capable de former un homomultimère ou est couplée avec ISA2 afin de former un hétéromultimère (**Utsumi et Nakamura, 2006**). ISA2 est catalytiquement inactive (**Hussain et al., 2003**) donc elle ne contribue pas directement au processus de débranchement mais elle agit probablement sur la stabilité et la régulation de ISA1 (**Delatte et al., 2005 ; Wattebled et al., 2005**). Les ISA3 et LDA semblent avoir un rôle principal plutôt dans la dégradation du polysaccharide (voir II.c.4 3.1). ISA1 est essentiellement active sur des glucanes contenant des longues chaînes externes comme l'amylopectine soluble alors que ISA3 et LDA agissent sur des glucanes possédant des petites chaînes externes comme la β -limite dextrine.

La diminution ou l'absence de l'activité isoamylase (ISA1 ou ISA2) résulte en un défaut de synthèse d'amidon accompagné de l'accumulation d'un polysaccharide soluble appelé phytoglycogène chez le maïs (**James et al., 1995**), le riz (**Nakamura et al., 1996**), l'orge (**Burton et al., 2002**), *Chlamydomonas* (**Mouille et al., 1996 ; Dauvillée et al., 2001**), *Arabidopsis*, (**Zeeman et al., 1998 ; Delatte et al., 2005 & Wattebled et al., 2005**) et la pomme de terre (**Bustos et al., 2004**). Le phytoglycogène dont la structure ressemble à celle du glycogène, est enrichi en chaînes courtes contenant moins de 10 unités de glucose et possède plus de points de branchement par rapport à l'amylopectine. En absence de l'activité isoamylase, cette structure hyper ramifiée produite empêche la formation de la structure semi-cristalline caractéristique des grains d'amidon.

Un modèle a été proposé pour expliquer le rôle des isoamylases (DBEs) dans la biosynthèse de l'amidon (**Figure 12**). Dans un premier temps, l'action concertée des amidon synthétases solubles (SSs) et des enzymes de branchement (BEs) permet la

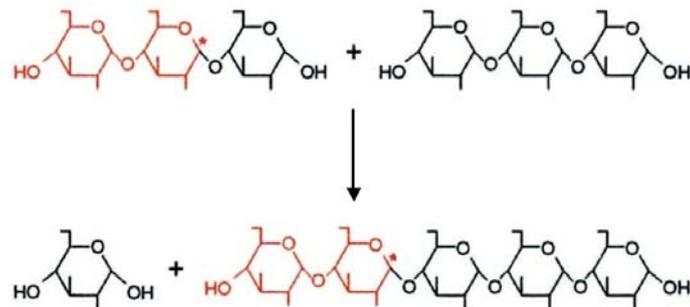


Figure 13 – Diagramme représentatif du fonctionnement de l’enzyme disproportionnante (D-enzyme) (Myers *et al.*, 2000).

L’enzyme disproportionnante catalyse le clivage d’une chaîne linéaire de glucoses liés en α -1,4 afin de la transférer sur un autre glucane par une liaison α -1,4. Les unités de glucose transférées sont représentées en rouge et les astérisques indiquent les carbones réduits.

production d'un polysaccharide hyper ramifié appelé « pré-amylopectine ». Les isoamylases (DBEs) vont ensuite concentrer ces points de ramification en hydrolysant uniquement les points de branchement les plus éloignés. Cet épissage produit des malto-oligosaccharides (MOS). L'enzyme D sera en charge de recycler ces MOS libérés par les DBEs afin de limiter la perte d'énergie (voir II.c.3.2). Ce processus provoque ainsi un phénomène de cristallisation encore peu compris à ce jour, qui rend le grain d'amidon inaccessible à une nouvelle modification enzymatique (**Ball et al., 1996 ; Myers et al., 2000**). En absence de DBEs, l'action continue des SSs et BEs sur la pré-amylopectine provoque la production du phytoglycogène puisque la cristallisation est physiquement impossible, expliquant ainsi la présence simultanée de l'amidon et du phytoglycogène chez les mutants *dbe1* d'*Arabidopsis thaliana* (**Zeeman et al., 1998**).

3.3.2. L'enzyme Disproportionnante

L'enzyme disproportionnante, ou enzyme D est une α -1,4 glucanotransférase (E.C. 2.4.1.25) qui catalyse le clivage d'une liaison α -1,4 d'un malto-oligosaccharide (MOS) « donneur » et transfère le glucane libéré sur l'extrémité non-réductrice d'un MOS « accepteur » par une liaison α -1,4 (**Figure 13**). Le plus petit MOS donneur est le maltotriose et le plus petit MOS accepteur est le D-glucose. Le maltose ne peut pas servir de substrat, en revanche il peut jouer le rôle d'accepteur. L'enzyme D est incapable d'hydrolyser la première liaison O-glucosidique (côté non-réducteur) et l'avant dernière (côté réducteur) (**Jones et Whelan, 1969**). Dans le maltotriose, ces liaisons sont les mêmes.

La disparition de cette activité chez les mutants *sta11* de *Chlamydomonas* entraîne une forte baisse de l'amidon (10 fois moins d'amidon accumulé chez le mutant par rapport à une souche sauvage) qui est très enrichi en amylose (**Wattebled et al., 2003**). De plus, une grande quantité de MOS est détectée chez ces mutants (**Colleoni et al., 1999a**). Ainsi, le rôle de cette enzyme serait de recycler les MOS libérés par les isoamylases lors de la synthèse de la pré-amylopectine afin d'éviter un cycle futile coûteux en énergie (**Colleoni et al., 1999 a et b**). L'enzyme D est capable de transférer les chaînes linéaires de MOS directement sur la pré-amylopectin et de participer de manière indirecte à la génération d'ADP-glucose à partir de ces MOS (**Figure 12**).

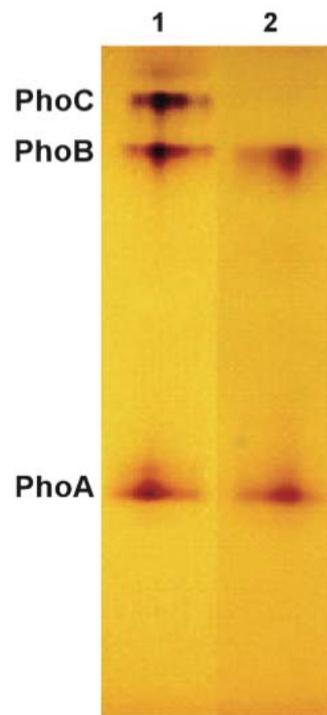


Figure 14 – Localisation des activités de type α -glucane phosphorylase chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Dauvillée *et al.*, 2006).

Cinq microgrammes de protéines d'extrait brut (1) et de chloroplastes purifiés (2) sont analysés sur un gel d'activité de type zymogramme contenant du glycogène. La phosphorylase C est absente des extraits plastidiaux alors que les deux autres activités phosphorylases semblent être localisées dans ce compartiment.

3.3.3. Les amidons phosphorylases

Trois activités de type amidon phosphorylase (α -glucanes phosphorylases EC 2.4.1.1) ont été détectées chez *Chlamydomonas* : PHOA, PHOB et PHOC. PHOA et PHOB sont localisées au niveau du chloroplaste (**Figure 14**). L'implication précise de ces enzymes dans le métabolisme de l'amidon reste à ce jour très mal comprise. Cependant, les analyses génétiques effectuées sur les mutants *phoB* de *Chlamydomonas reinhardtii* (**Dauvillee et al., 2006**) semblent montrer que cette enzyme interviendrait dans la synthèse du polysaccharide, sans pour autant exclure une participation dans la dégradation (voir aussi II.c.4.3.2). L'hypothèse proposée est que les amidon phosphorylases participent à la biosynthèse de l'amidon en formant des complexes multi-enzymatiques avec les enzymes de branchement. Leur rôle pourrait être d'optimiser la longueur des chaînes de glucanes pour que celles-ci soient prises en charge par les enzymes de branchement afin d'être intégrées à la molécule d'amylopectine en croissance. L'absence de l'activité PHOB entraîne une mauvaise ramification des glucanes, et conduit à une diminution de la quantité d'amidon accumulée. Chez le riz, la perte de l'amidon phosphorylase plastidiale appelée PHO1 résulte également en une accumulation moindre d'amidon (**Satoh et al., 2008**). L'implication de PHO1 dans l'initiation de la biosynthèse de l'amidon en allongeant les courtes chaînes de glucanes a été proposée comme hypothèse.

Les nombreux efforts concédés à l'élucidation des mécanismes de biosynthèse de l'amidon et à la compréhension du phénomène de cristallisation de la molécule d'amylopectine ont eu pour conséquence d'entraîner un certain délaissement de l'étude des phénomènes qui régissent la dégradation et la mobilisation du polysaccharide. Des avancées récentes viennent cependant combler peu à peu ce fossé.

3.4. La dégradation de l'amidon

La dégradation de l'amidon transitoire dans les organes sources comme la feuille est mieux comprise que celle de l'amidon de réserve. Dans les feuilles, l'amidon accumulé le jour sera dégradé la nuit afin de fournir l'énergie nécessaire à la plante en absence de photosynthèse. La dégradation de l'amidon de réserve quant à lui intervient quelques jours après la germination de graine afin de permettre le développement de la future plante.. Il est clair que les voies de dégradation intervenant dans ces deux

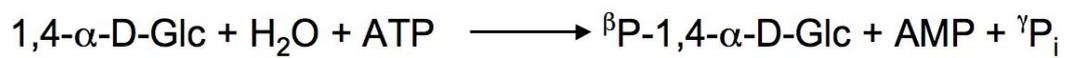


Figure 15 – Equation de la réaction catalysée par une dikinase.

Cette enzyme transfère dans un premier temps, le phosphate γ de l'ATP sur une molécule d'eau (H_2O). Ensuite, un résidu d'histidine très conservé de l'enzyme est phosphorylé par le phosphate β qui sera transféré par la suite sur le glucane. La réaction globale conduit donc à une libération stœchiométrique de P_i et d'AMP. Il faut noter que les enzymes de type PWD ne sont actives que sur des glucanes déjà phosphorylés en position C6 par une GWD.

phénomènes différents entre les organes d'une même plante mais qu'ils peuvent également partager certains composants. La dégradation de l'amidon n'est pas une voie linéaire mais c'est plutôt une voie composée de plusieurs réactions. Les plantes déficientes pour une activité enzymatique clé accumulent toutes des quantités d'amidon élevées, elles présentent un phénotype *sex*, pour « starch excess » du fait du déséquilibre des taux de synthèse et de dégradation du polysaccharide.

3.4.1. La phosphorylation des glucanes

Considérant l'état semi-cristallin et insoluble du grain d'amidon, celui-ci n'est pas sensible aux activités hydrolytiques. L'initiation de la dégradation dépend donc de fonctions supplémentaires indispensables pour rendre le grain d'amidon accessible. Les activités de type dikinase portées par les protéines GWD (Glucan, water dikinase ; α -1,4-glucan, water phosphotransferase ; EC 2.7.9.4) et PWD (Phosphoglucan, water dikinase ; phospho- α -1,4-glucan, water phosphotransferase ; EC 2.7.9.5) ont pour rôle la phosphorylation de certains résidus de glucose de l'amylopectine (**Figure 15**) afin de rendre le polymère plus hydrophile et donc accessible aux enzymes de dégradation (**Hejazi et al., 2008**).

Le mutant insertionnel d'*Arabidopsis thaliana* déficient pour la protéine R1 est totalement incapable de dégrader ses réserves d'amidon à l'obscurité (**Caspar et al., 1991**). L'inhibition de la protéine R1 retrouvée liée au grain d'amidon chez la pomme de terre provoque l'accumulation de quantités d'amidon élevées dans les feuilles et empêche la dégradation de l'amidon dans les tubercules (**Lorberth et al., 1998**). La caractérisation biochimique de cette protéine de pomme de terre a montré qu'il s'agissait de la GWD qui transfère le phosphate β de l'ATP en position 6 d'un résidu de glucose de la molécule d'amylopectine (**Ritte et al., 2002 ; Ritte et al., 2006**). De même, la perte de cette enzyme chez les mutants *sex1* d'*Arabidopsis* résulte en l'accumulation excessive d'amidon (**Yu et al., 2001**). L'expression de la protéine R1 de la pomme de terre chez *Escherichia coli* provoque l'accumulation d'un glycogène hyperphosphorylé chez la bactérie (**Vikso-Nielsen et al., 2002**) ce qui permet de confirmer le rôle de la GWD dans la phosphorylation des glucanes.

La présence d'une deuxième dikinase, appelée PWD, qui est quant à elle responsable de la phosphorylation des résidus de glucose de la molécule d'amylopectine en position 3, est aussi nécessaire pour une dégradation correcte de l'amidon (**Baunsgaard et al., 2005 ; Kötting et al., 2005**). Les mutants *pwd* d'*Arabidopsis* ont un phénotype moins sévère que ceux déficients pour l'activité GWD. La PWD diffère de la GWD par sa capacité de phosphoryler un résidu qui est déjà phosphorylé sur son carbone en position 6 (**Ritte et al., 2006**). Ainsi, la PWD nécessite l'intervention d'une GWD active pour fonctionner.

Les groupes de phosphate ajoutés par l'action concertée de ces deux enzymes pourraient modifier la structure de l'amidon, par exemple en écartant les chaînes de l'amylopectine suite à l'ajout de charges négatives. L'hypothèse retenue à ce jour est que ce relâchement de structure permettrait ensuite une meilleure accessibilité du polysaccharide pour les enzymes de dégradation. Le phénomène est d'ailleurs encore plus complexe puisque les chaînes de glucose, phosphorylées et rendues accessibles, doivent ensuite être déphosphorylées afin que les enzymes hydrolytiques puissent agir.

3.4.2. La déphosphorylation des glucanes

L'amidon sauvage contient des groupements phosphates attachés par des liaisons covalentes à la molécule d'amylopectine en position 6 (70 à 80 % du phosphate total attaché) et en position 3 (20 à 30 %) via l'action des dikinases GWD et PWD (**Blennow et al., 1998 ; Ritte et al., 2006**). Les études récentes montrent que le déplacement de ces phosphates est nécessaire pour une dégradation efficace de l'amidon. Chez *Arabidopsis thaliana*, la phosphoglucane phosphatase SEX4 (pour starch excess 4, EC 3.1.3.48) est responsable de l'hydrolyse des liaisons phosphates en positions 6 et 3 (**Kötting et al., 2009 ; Hejazi et al., 2010**).

La déphosphorylation de l'amidon pendant la dégradation est nécessaire à l'activité des β -amylases (**Kötting et al., 2009**), des enzymes hydrolytiques incapables d'agir sur les glucanes contenant un phosphate à leur extrémité non-réductrice (**Takeda et Hizukuri, 1981 ; Fulton et al., 2008**). Chez *Arabidopsis*, en absence de l'activité SEX4, la dégradation de l'amidon est perturbée engendrant une accumulation excessive d'amidon. Cependant les enzymes de débranchement (ISA3) et les α -amylases (AMY3) peuvent toujours attaquer le grain d'amidon hyperphosphorylé et on observe

l'accumulation de phospho-oligosaccharides solubles pendant la nuit. Il est important de noter que la dégradation complète de l'amidon en maltose et glucose est impossible malgré l'intervention réduite des β -amylases (**Kötting et al., 2009**).

Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe deux homologues de phosphoglucane phosphatase : LSF1 et LSF2 (LSF pour Like Sex Four). Comme SEX4, ces deux protéines sont des phosphatases plastidiales, nécessaires pour une dégradation d'amidon normale (**Comparot-Moss et al., 2010 ; Santelia et al., 2011**). Les mutants *lsf1* d'*Arabidopsis* produisent des quantités d'amidon élevées alors qu'ils ne montrent aucune réduction significative de l'activité phosphatase et n'accumulent pas de phospho-oligosaccharides. Ces résultats suggèrent que cette protéine puisse jouer un rôle de régulateur plutôt que de posséder une fonction catalytique (**Comparot-Moss et al., 2010**). Contrairement à SEX4, LSF2 hydrolyse uniquement les groupements phosphates en position 3. Les mutants *lsf2* accumulent de l'amidon contenant des niveaux de phosphate élevés. Néanmoins, comparé au simple mutant *sex4*, les doubles mutants *lsf2 sex4* possèdent un phénotype plus sévère et montrent des problèmes de croissance (**Santelia et al., 2011**).

3.4.3. La dégradation des glucanes

Chez la plupart des espèces végétales, la dégradation de l'amidon peut avoir lieu selon deux grandes voies cataboliques: la voie hydrolytique et la voie phosphorolytique (**Smith et al., 2005**). La voie hydrolytique est représentée par un large panel d'activités enzymatiques telles que les amylases : α -amylases (endo-amylases, EC 3.2.1.1) et β -amylases (exo-amylases, EC 3.2.1.2). La seconde voie possible de mobilisation des réserves d'amidon passe par les amidon-phosphorylases (EC 2.4.1.1), aussi appelées α -glucane phosphorylases.

3.4.3.1. La voie hydrolytique

Les activités de type endo-amylases (α -amylases) et exo-amylases (β -amylases) peuvent être responsables de la dégradation des liaisons α -1,4 du polysaccharide en synergie avec les enzymes de débranchement (DBEs) qui se chargent quant à elles de l'hydrolyse des liaisons α -1,6.

Les α -amylases (EC 3.2.1.1) hydrolysent les liaisons α -1,4 à l'intérieur même d'une chaîne de glucanes en libérant une molécule d'un degré de polymérisation minimal de deux, donc un maltose. Il existe trois α -amylases annotées dans le génome d'*Arabidopsis* (**Stanley et al., 2002**) : AMY1, AMY2 et AMY3. Une étude réalisée sur ces α -amylases montre qu'AMY3 est la seule α -amylase catalytique plastidiale possédant un peptide de transit (**Yu et al., 2005 ; Streb et al., 2008**). Les simples mutants *amy3* ou les triples mutants *amy1 amy2 amy3* d'*Arabidopsis* sont toujours capables de dégrader leurs réserves d'amidon avec la même efficacité que la plante sauvage (**Yu et al., 2005**). Ces résultats permettent de conclure que les α -amylases ne sont pas impliquées dans la dégradation de l'amidon ou que leur absence peut être compensé par d'autres activités enzymatiques comme les β -amylases, les amidon phosphorylases. Néanmoins, plusieurs études montrent que l'activité AMY3 a un effet significatif sur la mobilisation d'amidon chez les mutants qui sont dépourvus d'une ou plusieurs isoformes d'enzymes de débranchement (DBE). Par exemple, chez les doubles mutants *isa3 lda* d'*Arabidopsis*, la dégradation de l'amidon est réduite pendant la nuit, mais n'est pas complètement abolie (**Delatte et al., 2006**). L'augmentation de l'activité α -amylase et surtout de l'expression d'AMY3 observée chez ces mutants entraîne l'accumulation en grande quantité de petits glucanes branchés. Ces glucanes sont également présents chez les quadruples mutants dépourvus de toutes les activités de débranchement (mutants *isa1 isa2 isa3 lda*) chez qui la production d'amidon est quasiment remplacée par le phytoglycogène (**Streb et al., 2008**). De plus, la mutation d'AMY3 chez le quadruple mutant provoque le retour du polysaccharide cristallin. La disparition des glucanes branchés, chez le quintuple mutant, montre qu'AMY3 est responsable de la formation de ces oligosaccharides solubles en dégradant l'amidon. Les fonctions d'AMY1 et AMY2 sont très peu connues et leur implication dans la dégradation de l'amidon transitoire n'a pas été encore montrée. Chez les céréales, AMY1 est une enzyme catalytique non plastidiale, sécrétée dans l'albumen (**Yu et al., 2005 ; Doyle et al., 2007**).

De nombreuses études réalisées chez les végétaux supérieurs laissent présager que les α -amylases n'auraient aucune implication dans la dégradation de l'amidon transitoire des feuilles d'*Arabidopsis* alors que les β -amylases (EC 3.2.1.2) tiendraient un rôle prédominant dans ce catabolisme (**Niittylä et al., 2004 ; Yu et al., 2005**). Comme les α -amylases, les β -amylases catalysent l'hydrolyse d'une liaison α -1,4 mais

Exo-amylase (β-amylase)	Locus	Fonction	Phénotype du mutant
BAM1	At3g23920	catalytique, plastidiale	aucun phénotype*
BAM2	At4g00490	catalytique, plastidiale	aucun phénotype*
BAM3	At4g17090	catalytique, plastidiale	phénotype sex**
BAM4	At5g55700	non-catalytique, plastidiale, protéine régulatrice (?)	phénotype sex**
BAM5	At4g15210	catalytique, cytosolique	aucun phénotype*
BAM6	At2g32290	-	-
BAM7	At2g45880	non-catalytique, facteur de transcription nucléaire	aucun phénotype*
BAM8	At5g45300	non-catalytique, facteur de transcription nucléaire	aucun phénotype*
BAM9	At5g18670	-	-

Tableau 3 – Différentes isoformes de β -amylases (BAMs) chez *Arabidopsis thaliana*.

Quatre des neuf isoformes de β -amylase existants chez *Arabidopsis thaliana* semblent être adressées au plaste. Les simples mutants dépourvus de ces β -amylases possèdent des phénotypes différents. Aucune donnée n'est disponible pour BAM6 et BAM9.

* L'absence de l'enzyme ne provoque aucun effet sur le métabolisme de l'amidon.

** Le phénotype sex (starch excess) indique l'accumulation de quantités d'amidon élevées chez le mutant par rapport au sauvage.

elles agissent en libérant du β -maltose à partir de l'extrémité non-réductrice des glucanes (Weise *et al.*, 2005). L'absence d'activité β -amylasique résulte en une augmentation des niveaux de maltose dans les feuilles d'*Arabidopsis* pendant la nuit (Chia *et al.*, 2004 ; Niittylä *et al.*, 2004, Fulton *et al.*, 2008), qui s'accompagne d'une suraccumulation d'amidon chez *Arabidopsis* et la pomme de terre (Scheidig *et al.*, 2002 ; Kaplan et Guy, 2005 ; Fulton *et al.*, 2008).

Neuf isoformes de β -amylase (BAM1 à BAM9) sont retrouvées chez *Arabidopsis thaliana* (Tableau 3) dont quatre (BAM1, BAM2, BAM3, BAM4) semblent être adressées au plaste (Lao *et al.*, 1999 ; Sparla *et al.*, 2006 ; Fulton *et al.*, 2008). Une localisation plastidiale n'a été prouvée que pour l'une d'entre elles dénommée BAM3 (Lao *et al.*, 1999) et son implication dans la dégradation de l'amidon a été prouvée (Kaplan et Guy, 2005). BAM1, BAM2 et BAM3 sont des enzymes catalytiques alors que BAM4 semble être non-catalytique en raison de substitutions d'acides aminés sur un des deux résidus de glutamate essentiels au site actif de ces enzymes (Fulton *et al.*, 2008). Chez les simples mutants *bam1* et *bam3* d'*Arabidopsis*, l'activité totale β -amylase est réduite, en revanche aucune baisse d'activité n'est observée chez les mutants *bam2* et *bam4*. Les simples mutants dépourvus de ces β -amylases plastidiales ont des phénotypes différents : Les mutants *bam1* ne montrent aucune altération dans le métabolisme de l'amidon alors que les simples mutants *bam3* accumulent des quantités d'amidon plus élevées par rapport aux plantes sauvages. L'étude des doubles mutants *bam1 bam3* montre que la quantité d'amidon accumulée est plus importante chez ces mutants. Ces résultats prouvent ainsi qu'il existe une redondance partielle entre BAM1 et BAM3 : BAM3 peut compenser l'absence de BAM1, mais l'inverse n'est pas vrai. L'absence de BAM2 n'engendre aucun changement de phénotype que ce soit chez les simples mutants ou chez les mutants dépourvus d'autres activités β -amylases. Les simples mutants *bam4* produisent étonnamment des quantités d'amidon élevées par rapport à un sauvage. Ces résultats laissent présager que la BAM4 non-catalytique puisse jouer un rôle de régulateur plastidial, capable de détecter la concentration de maltose dans le plaste. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, il existe 3 isoformes de β -amylase et leur implication exacte dans la dégradation de l'amidon reste méconnue.

Très peu de données sont disponibles sur les fonctions du reste des protéines BAM. Il est important de noter que l'expression de BAM5 varie extrêmement (représente

20 à 90 % de l'activité totale des β -amylases) et dépend des conditions de croissance et de concentration en sucres (Mita *et al.*, 1997). Ainsi cette variation peut provoquer des erreurs dans les mesures d'activité totale des β -amylases (Fulton *et al.*, 2008). Les simples mutants *bam5* possèdent des quantités d'amidon normales (Laby *et al.*, 2001). Une étude récente montre que BAM7 et BAM8 sont localisées dans le noyau et possèdent un domaine supplémentaire qui permet la liaison à un motif d'ADN spécifique (Reinhold *et al.*, 2011). Ces protéines peuvent avoir un rôle dans la régulation transcriptionnelle liée à la croissance et au développement de la graine, mais elles n'ont aucun effet direct sur le métabolisme d'amidon.

Ni les α -amylases ni les β -amylases ne peuvent hydrolyser les liaisons α -1,6. Elles nécessitent donc l'action conjointe des enzymes de débranchement (DBE) afin de dégrader entièrement une molécule ramifiée. Parmi les 4 DBEs, ISA3 et LDA sont les deux qui interviennent dans la dégradation de l'amidon (Wattebled *et al.*, 2005 ; Delatte *et al.*, 2006). L'affinité de ces DBEs pour la β -limite dextrine, molécule produite par la digestion de l'amylpectine via l'action des β -amylases, montre que ces enzymes hydrolysent de préférence les branches courtes (Wu *et al.*, 2002 ; Hussain *et al.*, 2003 ; Takashima *et al.*, 2007). Les mutants *lda* d'Arabidopsis montrent un phénotype sauvage alors que les mutants *isa3* accumulent des quantités élevées d'amidon par rapport à un sauvage. Ce phénotype est encore plus marquant chez les doubles mutants *isa3 lda*, montrant que LDA est capable de dégrader l'amidon en absence d'ISA3 (Delatte *et al.*, 2006). Ainsi, ISA3 semble jouer un rôle plus important que LDA dans la dégradation de l'amidon transitoire chez Arabidopsis, mais ces deux activités présentent un certain niveau de redondance.

L'action concertée des β -amylases, des α -amylases et des DBEs résulte en l'accumulation de maltose et de malto-oligosaccharides (MOS) longs dans le stroma du chloroplaste. Ces MOS longs peuvent être pris en charge par les β -amylases afin de donner respectivement du maltose et du maltotriose ou par les amidons phosphorylases qui vont libérer du glucose-1-phosphate (G1P) et du maltotétraose. Le maltotriose et le maltotétraose sont trop courts pour que les β -amylases et les phosphorylases puissent les utiliser comme substrats. Ils seront donc convertis en glucose par l'enzyme D appelée DPE1. Les mutants *dpe1* d'Arabidopsis accumulent du maltotriose, le produit de l'hydrolyse des MOS par les β -amylases (Critchley *et al.*, 2001). Cette accumulation de

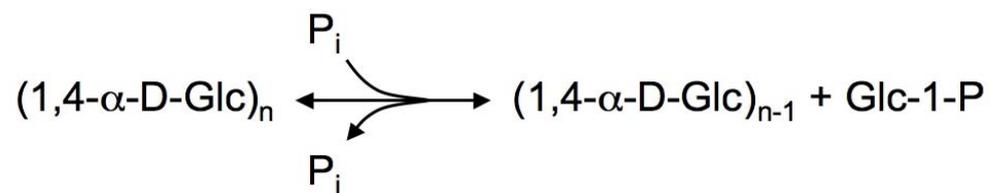


Figure 16 – Equation de la réaction catalysée par une amidon phosphorylase.

Cette enzyme, appelée aussi α -glucane phosphorylase, catalyse la réaction réversible de libération de Glucose-1-phosphate (Glc-1-P) à partir de l'extrémité non-réductrice d'une chaîne d' α -glucane linéaire en présence de P_i .

maltotriose peut inhiber la dégradation de l'amidon. L'absence de l'activité DPE1 chez les mutants d'*Arabidopsis* résulte en une dégradation ralentie engendrant une accumulation de quantités d'amidon élevées. Chez *Chlamydomonas*, les mutants *dpe1* montrent une sous-production d'amidon, suggérant la contribution de l'enzyme dans la biosynthèse de l'amidon (**Colleoni et al., 1999a ; Wattedled et al., 2003**). Ces résultats opposés laissent penser que cette enzyme puisse intervenir à la fois dans la synthèse et la dégradation de l'amidon.

Il est important de noter qu'une isoforme cytosolique de glucanotransférase, appelée DPE2, est observée chez *Arabidopsis* (**Chia et al., 2004 ; Lu et Sharkey, 2006**). Cette enzyme joue un rôle dans le métabolisme de l'hétéroglycane cytosolique (voir II.c.4.3.3).

3.4.3.2. La voie phosphorolytique

Les enzymes mises en jeu dans la dégradation phosphorolytique de l'amidon appelées α -glucanes phosphorylases (amidon-phosphorylases, EC 2.4.1.1) sont retrouvées chez les plantes et chez *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme d'homodimères d'environ 200 kDa (**Ball et Morell 2003**). Leur mode réactionnel (**Figure 16**) argue en faveur d'un rôle catabolique puisqu'elles sont capables de libérer du glucose-1-phosphate (G1P) à partir de l'extrémité non-réductrice d'une chaîne linéaire de glucanes. Bien que cette réaction soit réversible, les concentrations de G1P nécessaires au fonctionnement dans le sens de la synthèse sont bien supérieures à celles que l'on peut rencontrer dans la cellule (**Burr et Nelson 1975 ; Mu et al., 2001**). De plus, le phosphate inorganique, cofacteur indispensable au fonctionnement de ces enzymes dans le sens de la dégradation, est présent en grande quantité dans la cellule lors de consommations intensives d'énergie, via l'hydrolyse de l'ATP (**Wirtz et al., 1980 ; Kruger et ap Rees, 1983**). En outre, l'amidon phosphorylase plastidiale est inhibée par l'ADP-glucose, l'unique précurseur de la voie de biosynthèse (**Burr et Nelson, 1975**). Ces observations ont eu pour conséquence la classification des amidon-phosphorylases dans la classe des enzymes cataboliques.

Chez *Arabidopsis*, la seule enzyme phosphorolytique impliquée dans la mobilisation de l'amidon est l' α -glucane phosphorylase plastidiale PHS1 (**Zeeman et al.,**

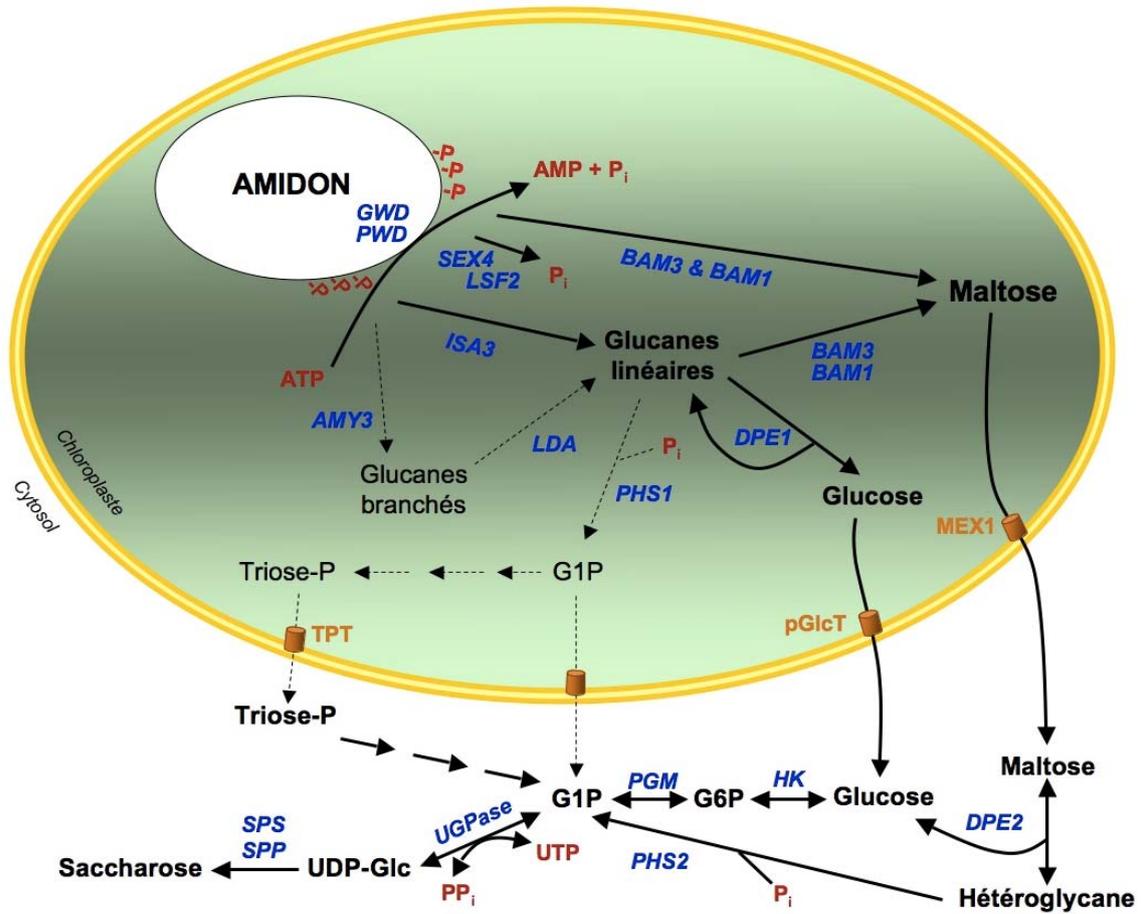


Figure 17 – Modèle de dégradation de l'amidon dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*.

Ce schéma résume les étapes essentielles à la mobilisation de l'amidon transitoire. Dans un premier temps, les chaînes externes du grain d'amidon sont phosphorylées par les dikinases (GWD et PWD), entraînant leur solubilisation puis déphosphorylées par les phosphatases (SEX4 et LSF2). Le polysaccharide rendu accessible est alors pris en charge par l'action concertée d' α -amylase (AMY3), d'enzymes de débranchement (ISA3 et LDA), de phosphorylase (PHS1), de β -amylases (BAM3 et BAM1) et de transglucosidase (DPE1) conduisant à la production de glucose-1-phosphate (G1P), de glucose et de maltose dans le chloroplaste. Le G1P peut être directement transporté dans le cytosol ou bien converti en triose-phosphate (triose-P), lui-même exporté hors du chloroplaste par un transporteur spécifique (TPT). Le glucose et le maltose sont exportés dans le cytosol via leurs transporteurs pGlcT et MEX1, respectivement. Le maltose est pris en charge par la transglucosidase cytosolique (DPE2) qui libère un résidu de glucose et transfère le second sur les chaînes externes d'une molécule d'hétéroglycane. Les résidus de glucose transférés sur cet accepteur sont relargués via l'action d'une isoforme cytosolique d'amidon phosphorylase (PHS2) aboutissant à la production de G1P. Le glucose et le G1P sont utilisés dans la voie métabolique aboutissant à la production du saccharose dans le cytosol. Les voies de dégradation mineures sont représentées par des flèches en pointillés.

2004). Les mutant *phs1* ne montrent aucun phénotype notable, que ce soit au niveau de l'accumulation, de la dégradation ou de la structure de l'amidon, s'opposant aux deux études réalisées sur les mutants *phoB* de *Chlamydomonas* et les mutants *pho1* du riz qui accumulent tous les deux des quantités amoindries d'amidon (**Dauvillée et al., 2006 ; Satoh et al., 2008**). Il est important de noter qu'*in vitro*, PHO1 est capable d'allonger les chaînes de glucanes en présence de concentrations élevées en P_i (**Hwang et al., 2010**). Ainsi, cette enzyme serait capable de produire des longues chaînes de glucanes même dans des conditions physiologiques favorisant la dégradation phosphorolytique, c'est-à-dire des concentrations élevées en P_i et basses en G1P. Ces résultats laissent présager que l'amidon phosphorylase plastidiale est une enzyme versatile et que sa fonction physiologique dépend des espèces, des tissus et des conditions de croissance.

Une autre isoforme d' α -glucane phosphorylase, appelée PHS2, est présente dans le cytosol des feuilles d'*Arabidopsis* et est impliquée dans le métabolisme de l'hétéroglucane cytosolique (**Fettke et al., 2004**) (voir II.c.4.3.3).

3.4.4. Le devenir des produits de dégradation

L'action concertée des phosphorylases, des β -amylases et des enzymes disproportionnantes résulte en la production de glucose-1-phosphate (G1P), de maltose et de glucose après dégradation de l'amidon dans le chloroplaste (**Figure 17**) (**Lin et Preiss, 1988 ; Takaha et al., 1993 ; 1996**). Le maltose, qui est le produit majeur de la dégradation de l'amidon transitoire, n'est pas un donneur ni un accepteur efficace pour DPE1. Le glucose et le maltose sont exportés vers le cytosol via leur propre transporteur. Le G1P, libéré par la voie phosphorolytique, peut être converti en triose-phosphate, lui-même exporté hors du chloroplaste par un transporteur spécifique (TPT pour triose-phosphate/phosphate translocator) (**Häusler et al., 1998**) afin d'être converti en saccharose. Une étude récente a également montré l'existence d'un transport spécifique du G1P à travers les membranes du chloroplaste (**Fettke et al., 2011**).

La membrane interne du chloroplaste possède plusieurs transporteurs (transporteurs de glucose et de maltose) afin de faciliter la diffusion des sucres entre le stroma et le cytosol (**Niittylä et al., 2004 ; Cho et al., 2011 ; Weber et al., 2010**). Les

mutants déficients pour le transporteur de maltose (MEX1 pour maltose excess) accumulent des quantités de maltose 40 fois plus élevées dans leurs chloroplastes par rapport à un sauvage et montrent des altérations dans la synthèse et la dégradation de l'amidon ayant pour conséquence la suraccumulation de ce polysaccharide (**Niittylä et al., 2004 ; Lu et Sharkey, 2006**). Il est important de noter qu'une diminution du contenu en chlorophylle est également observée chez ces mutants *mex1*. Au contraire, les mutants déficients pour le transporteur de glucose (pGlcT, GLT1) possèdent un phénotype sauvage (**Cho et al., 2011**). Ces résultats laissent présager que le glucose est un produit mineur de la dégradation de l'amidon, ou bien, qu'il peut être transporté sous une autre forme ou par un autre transporteur. Les doubles mutants *mex1 pglct* d'Arabidopsis possèdent un phénotype plus sévère par rapport aux simples mutants *mex1* avec un contenu en chlorophylle et en amidon réduit, des chloroplastes altérés et un taux de photosynthèse réduit. Ainsi, il a été suggéré que l'accumulation des produits de dégradation de l'amidon provoquait une forte perturbation des fonctions de cet organite.

Le phénotype du double mutant *mex1 pglct* est également observé chez le double mutant *mex1 dpe1* qui accumule du maltose et du maltotriose, et présente une diminution de la quantité d'amidon, du contenu en chlorophylle et du taux de photosynthèse (**Critchey et al., 2001, Stettler et al., 2009**). Ainsi la perte de l'activité DPE1 a le même effet que la perte du transporteur de glucose. Le maltotriose accumulé dans le chloroplaste, en absence de DPE1, ne peut pas traverser les membranes du plaste et engendre des altérations dans la morphologie du chloroplaste (**Stettler et al., 2009**). Les études génétiques montrent que ce phénotype sévère apparaît du fait de l'accumulation des produits de dégradation de l'amidon. Chez le double mutant *mex1 dpe1*, la mutation de PGM1 (phosphoglucomutase) bloquant la biosynthèse de l'amidon ou la mutation de GWD1 (glucan, water dikinase) ou de l'activité β -amylase empêchant la libération du maltose pendant la dégradation du polysaccharide réduisent la lyse du chloroplaste.

Dans le cytosol, le maltose exporté via Mex est pris en charge par la transglucosidase cytosolique DPE2 (**Chia et al., 2004 ; Lu et Sharkey, 2004**). Les mutants *dpe2* d'Arabidopsis sont des surproducteurs d'amidon et accumulent 200 fois plus de maltose par rapport au sauvage. La DPE2 est spécifique pour le β -maltose

(Dumez *et al.*, 2006 ; Steichen *et al.*, 2008) et son mode d'action est réversible : elle libère un résidu de glucose et transfère le second sur les chaînes externes d'une molécule d'hétéroglycane (Fettke *et al.*, 2006). L'hétéroglycane est composé majoritairement d'arabinose et de galactose mais contient également du mannose, du fucose, du xylose, du rhamnose et bien entendu du glucose (Fettke *et al.*, 2005). Néanmoins, la structure du polymère et sa biosynthèse ne sont pas encore connues. Les résidus de glucose transférés sur cet accepteur seraient relargués via l'action d'une isoforme cytosolique d'amidon phosphorylase (PHS2) aboutissant à la production de G1P (Fettke *et al.*, 2004). Les mutants *phs2* d'Arabidopsis ont un phénotype moins sévère que celui des mutants *dpe2* (Lu et Sharkey, 2006). Pourtant ces mutants accumulent 4 fois plus de maltose dans leurs chloroplastes, mais dégradent leurs amidons normalement. L'augmentation légère du contenu en glucose dans la molécule d'hétéroglycane suggère qu'une autre voie de libération de glucose puisse exister.

Il faut noter que le modèle établi à ce jour et basé sur grand nombre d'observations réalisées chez Arabidopsis représente une situation physiologique bien particulière, c'est-à-dire celle d'un organe source dont l'unique fonction est de fournir de l'énergie à la plante. De plus, la majorité des travaux effectués sur Arabidopsis repose sur des études de génétique inverse qui ne permettent d'accéder que très difficilement aux fonctions de régulation de la voie métabolique. Afin d'appréhender cette problématique, nous avons décidé d'étudier la dégradation de l'amidon chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* via une approche complémentaire de génétique formelle. Dans ce modèle bien plus versatile, une simple modification du milieu de culture permet de mimer aussi bien le métabolisme de l'amidon transitoire (comme celui de la feuille d'Arabidopsis) que celui de l'amidon de réserve (prenant place par exemple dans le tubercule de pomme de terre). Ainsi, *C. reinhardtii* représente un modèle "tout en un", chez qui une souche mutante pourra être testée dans les deux conditions physiologiques et permettra donc d'étudier l'impact de la fonction touchée aussi bien dans un système de type feuille que dans celui d'un organe de réserve.

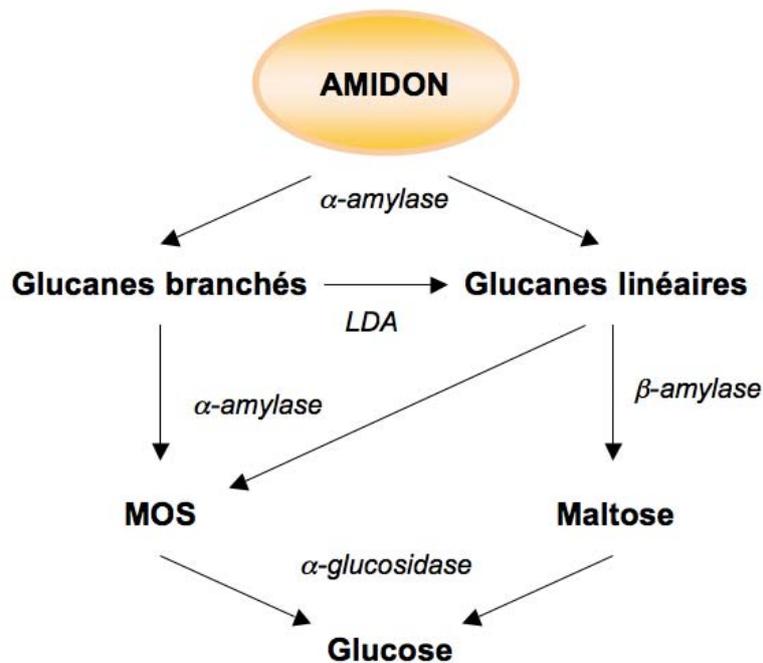


Figure 18 – Dégradation de l'amidon dans l'albumen des céréales.

Dans l'albumen d'une graine germée, les α -amylases peuvent directement s'attaquer aux grains d'amidon afin de libérer un mélange de glucanes linéaires et branchés. Ces glucanes peuvent être ensuite dégradés par les α -amylases, les limite-dextrinases (LDA) et les β -amylases en maltose et malto-oligosaccharides (MOS). Les limite-dextrinases hydrolysent les liaisons α -1,6 des glucanes branchés, afin de les convertir en glucanes linéaires. Ces derniers sont pris en charge par les α -amylases aboutissant à la formation des MOS et par les β -amylases qui libèrent les unités de maltose à partir de leurs extrémités non-réductrices. Enfin, le maltose et les MOS sont convertis en glucose par l'action des α -glucosidases.

3.4.5. La différence entre la dégradation de l'amidon dans les feuilles d'*Arabidopsis* et l'albumen des céréales

Chez la plupart des végétaux, la reproduction sexuée aboutit à la formation d'une graine à l'origine d'un nouvel individu. Elle constitue un organe de dissémination et de résistance. La résistance exceptionnelle de ces organes est due à l'existence d'une vie ralentie : Les graines sont entourées de couches protéiques solides et imperméables empêchant tout échange avec le milieu extérieur. Aucune activité vivante n'est détectable. Cette vie latente est rendue possible par une déshydratation poussée de l'organe puisque toute activité métabolique est suspendue en absence d'eau.

La germination est l'aboutissement naturel de l'activité vitale de la graine, en présence d'oxygène (O₂) et dans des conditions optimales d'humidité et de température. Au moment de la germination, l'albumen est mort : L'intégrité cellulaire est perdue pendant la phase de déshydratation du développement de la graine. Le tissu ne contient qu'une paroi cellulaire, des grains d'amidon et des protéines de réserve (**Zeeman et al., 2010**). Quelques jours après la germination, ces grains d'amidon doivent être dégradés afin de fournir l'énergie nécessaire au redémarrage du métabolisme et au développement de l'embryon.

La dégradation de l'amidon dans l'albumen d'une graine germée, nécessite l'action concertée de 4 enzymes (**Figure 18**): les α -amylases, les β -amylases, les LDAs (limite-dextrinases) et les α -glucosidases (appelés aussi maltases ; EC 3.2.1.3) (**Fincher, 1989 ; Kristensen et al., 1999 ; Mikami et al., 1999 ; Frandsen et al., 2000 ; Bozonnet et al., 2007**). Chez les céréales, les α -amylases ont un rôle majeur dans la mobilisation de l'amidon de l'albumen. La dégradation commence par l'attaque directe des α -amylases sur les grains d'amidon, afin de libérer un mélange de glucanes linéaires et branchés. Ces enzymes sont sécrétées dans l'albumen après leur synthèse massive dans le scutellum (une couche de cellules de l'embryon adjacentes) et l'aleurone (une couche de cellules qui entoure l'albumen) (**Fincher, 1989**).

Chez l'orge, il existe deux classes d' α -amylases, *HvAMY1* et *HvAMY2*, qui sont synthétisées pendant la germination. Ces protéines sont plus proches d'AMY1

d'Arabidopsis (une forme extraplastidiale d' α -amylase) que d'AMY3 (**Stanley et al., 2002 ; Yu et al., 2005**) et jouent des rôles distincts dans la dégradation de l'amidon. HvAMY1 présente une préférence pour les malto-oligosaccharides linéaires alors que HvAMY2 est plus affine pour l'amidon (**Sogaard et Svensson, 1990**). Chez le riz, l'étude de la répression d'un homologue d'AMY1 d'Arabidopsis résulte en un retard dans l'établissement de la jeune plantule et confirme l'importance des α -amylases dans la mobilisation de l'amidon (**Asatsuma et al., 2005**).

Dans les feuilles d'Arabidopsis, l'amidon transitoire subit une étape de phosphorylation/déphosphorylation par les dikinases, GWD & PWD et les phosphatases, SEX4 & LSF2. L'amidon de l'albumen des graines contient très peu de groupements phosphates par rapport à l'amidon transitoire des feuilles (**Blennow et al., 2000**). De plus, il est probable qu'il n'y ait pas assez de molécules d'ATP disponibles aux cycles de phosphorylation répétés dans cet organe. A l'heure actuelle il n'existe aucune évidence suggérant que la phosphorylation réversible se produise dans l'albumen des graines en germination. Néanmoins, une étude récente réalisée chez le blé montre que la réduction de l'expression de GWD par RNAi entraîne une diminution dans le contenu de phosphate de l'amidon et une augmentation de la taille de la graine (**Ral et al., 2012**). Une amélioration inattendue de la production de biomasse et du rendement des graines a été également observée dans les générations suivantes. En dehors de ces effets, la diminution de l'activité GWD provoque une augmentation de l'activité α -amylase dans l'aleurone pendant la maturation de graine. Ainsi l'initiation de la dégradation de l'amidon de réserve dans l'albumen des céréales est encore très peu connue, mais diffère manifestement de celle dans les chloroplastes des feuilles.

Les glucanes linéaires et branchés, produits par les α -amylases, peuvent être dégradés par les α -amylases, les limite-dextrinases et les β -amylases en maltose et malto-oligosaccharides de courtes tailles (**Figure 18**). Chez l'orge, les β -amylases sont synthétisées pendant le développement de la graine et elles représentent 1 à 2% de la protéine totale présente dans l'albumen de la graine. Elles sont présentes sous forme d'enzymes inactives et deviennent actives lors de la germination via l'action de protéases relarguées par l'aleurone (**Zeeman et al., 2010**). L'importance de ces enzymes dans la dégradation de l'amidon n'est pas très bien comprise puisque les mutants du seigle et de l'orge possédant des activités β -amylases réduites (**Kreis et al.,**

1987) et les mutants d'orge de Tibet déficients pour presque toutes les activités β -amylases (**Kaneko et al., 2000**) sont capables de germer normalement. Ces résultats laissent présager qu'il existe une redondance entre les activités β -amylases et α -amylases dans l'albumen contrairement à la situation dans les chloroplastes.

Enfin, le maltose et les malto-oligosaccharides produits par les enzymes hydrolytiques sont convertis en glucose via l'action des α -glucosidases. Aucune étude n'a montré une telle implication des α -glucosidases dans le métabolisme de l'amidon des feuilles. Il est important de noter que les α -glucosidases sont capables d'attaquer directement les grains d'amidon et que ces enzymes travaillent en synergie avec les α -amylases afin d'initier la dégradation de l'amidon en conditions *in vitro* (**Sun et Henson, 1990 ; Sun et Henson, 1991**).

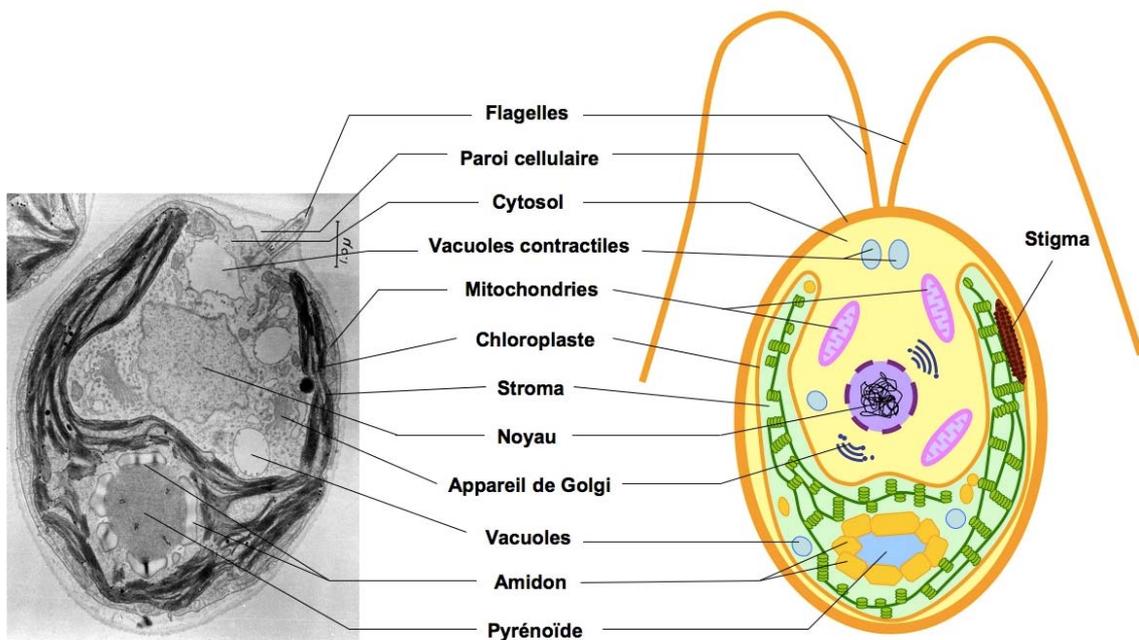


Figure 19 – Vue d'une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Une micrographie électronique d'une section longitudinale de l'algue verte est montrée à gauche de la figure et la cellule est schématisée à droite.

III. L'ORGANISME MODELE ETUDIE : *Chlamydomonas reinhardtii*

L'algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, trouvée communément dans les sols et dans l'eau douce (**Goodenough, 1995**) appartient à la famille des volvocales. Il s'agit d'un organisme eucaryote biflagellé de 5 à 10µm de diamètre. Contrairement aux plantes supérieures, cette microalgue ne possède qu'un chloroplaste unique (**Figure 19**) qui représente plus de 40% du volume cellulaire (**Harris, 2008**) dans lequel prend place la biosynthèse de l'amidon. Son génome nucléaire, d'une taille approximative de 120 Mpb (62% de G/C en moyenne) et réparti sur 17 chromosomes, est entièrement séquencé (**Merchant et al., 2007**).

Cette algue est capable de croître en utilisant un substrat carboné, l'acétate, qui lui sert de source d'énergie et de carbone en absence de photosynthèse. Ainsi, elle est utilisée comme organisme modèle pour l'étude de la photosynthèse (**Rochaix, 1995**) mais aussi pour l'étude de la fonction et l'assemblage des flagelles (**Silflow et Lefebvre, 2001**), de la phototaxie (**Hegemann, 1997**), des métabolismes de l'azote, du soufre et du phosphate (**Grossman, 2000**) et des rythmes circadiens (**Werner, 2002**). Sa culture aisée aussi bien en milieu solide que liquide et son temps de génération de 6-8 heures en font également un modèle de choix pour nos études puisqu'il est possible en quelques jours d'obtenir la quantité suffisante d'amidon nécessaire à une caractérisation complète.

1. Le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii*

Le chloroplaste, un organe d'origine endosymbiotique commun à tous les organismes eucaryotes photosynthétiques (**Rodriguez-Ezpeleta et al., 2005**), est le siège de la photosynthèse et de la biosynthèse d'amidon chez *Chlamydomonas*. D'un point de vue génétique, il s'agit d'un organe semi autonome possédant un ADN circulaire de 203 kpb composé de 99 gènes (**Maul et al., 2002**).

Chez *Chlamydomonas* comme chez les plantes supérieures, le chloroplaste est entouré par une double membrane : la membrane externe, qui sépare l'espace inter-membranaire du cytoplasme de la cellule et la membrane interne qui délimite le stroma (appelé aussi la matrice intrachloroplastique). La membrane externe perméable aux

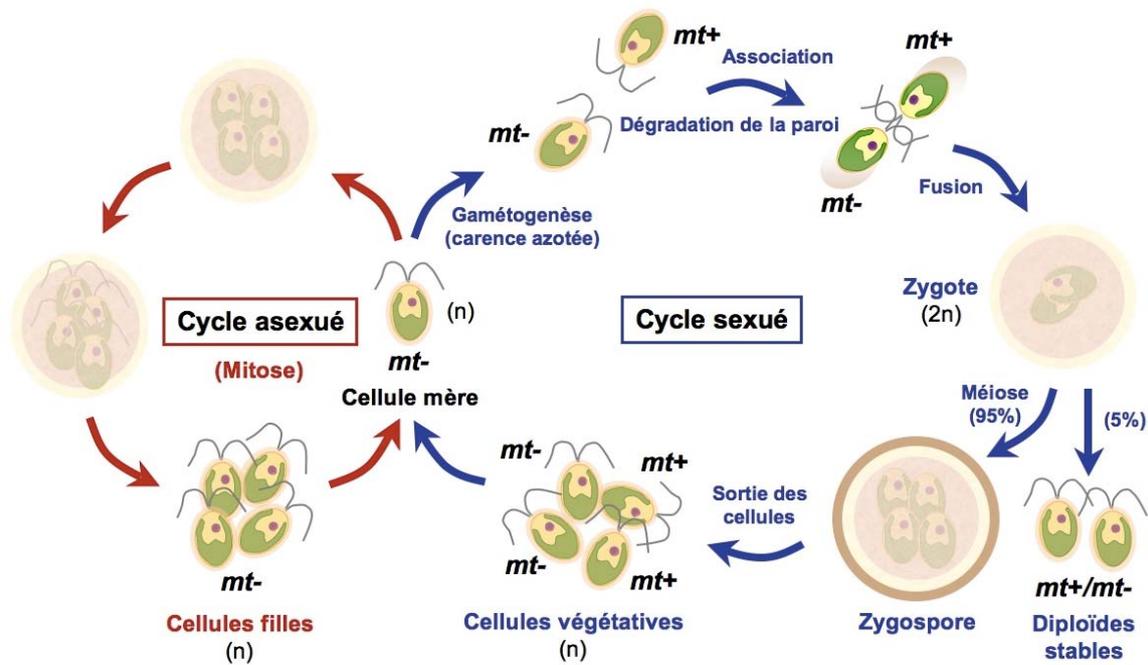


Figure 20 – Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Les cellules végétatives, haploïdes, se transforment en gamètes suite à une condition de stress (comme une carence azotée). Si des gamètes de polarités sexuelles opposées se rencontrent (*mt+* et *mt-*) ; ils vont fusionner, après la dégradation de la paroi qui les entoure, afin de former un zygote (2n). Ce dernier va donner naissance soit à une forme diploïde stable (5% des cas) soit à une forme de résistance appelée « zygospore » (95% des cas) qui possède une paroi plus épaisse par rapport au zygote. Lorsque les conditions sont de nouveau favorables, la zygospore entre en méiose, ce qui va aboutir à la formation de cellules végétatives haploïdes (cycle sexué). Ces dernières peuvent se diviser par mitose pour donner naissance à des cellules filles de même polarité sexuelle (cycle asexué). Les diploïdes stables peuvent également se diviser par mitose.

métabolites de faible poids moléculaire permet les échanges de nutriments, d'énergie et d'informations avec le reste de la cellule. Les extensions de la membrane interne forment les thylacoïdes, qui permettent de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ces structures se composent des thylacoïdes granaires, qui sont formés par un empilement de vésicules, et des thylacoïdes lamellaires qui les interconnectent **(Staehein et al., 1976)**.

Parmi les autres structures du chloroplaste, le stigma ou 'eyespot' **(Figure 19)** composée de plaques de granules denses étroitement associées permet à la cellule de percevoir la lumière grâce à un pigment appelé la rhodopsine. Cette structure est donc essentielle pour les phénomènes de phototaxie puisqu'il permet à la cellule de s'orienter en fonction de l'intensité lumineuse **(Foster et Smyth, 1980)**. Une autre structure présente dans le chloroplaste est le pyrénoloïde **(Figure 19)**, corps sphérique de 1,5 à 2 μm de diamètre localisé dans le stroma et entouré d'amidon **(Sager et Palade, 1957; Libessart et al., 1995)** qui contient un réservoir de Rubisco **(Griffiths, 1970)** permettant la fixation de CO_2 **(Borkhsenius et al., 1998)**.

2. La génétique formelle chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Cette algue surnommée la "levure verte" présente de nombreux avantages pour les études de génétique formelle. Tout d'abord, les cellules de *Chlamydomonas* sont la plupart du temps haploïdes et présentent une reproduction asexuée. Bien que son cycle de vie **(Figure 20)** se passe majoritairement sous une forme haploïde, l'algue peut adopter en cas de stress un cycle sexué dans lequel deux cellules de polarités sexuelles opposées ($mt+/mt-$) pourront fusionner et engendrer des diploïdes stables (dans 5% des cas) permettant les analyses de dominance/récessivité ou des zygotes (dans 95% des cas) qui, une fois enkystés, constitueront la forme de résistance et permettront les analyses de coségrégation après méiose. Alors que son cycle de vie simple parfaitement contrôlé au laboratoire rend possible les études génétiques telles que les tests de complémentation ou de coségrégation, sa nature haploïde permet d'observer immédiatement le phénotype mutant et de limiter des phénomènes de masquage phénotypique.

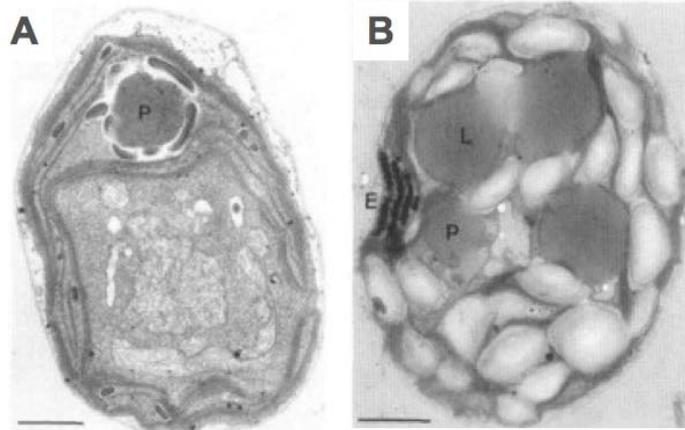


Figure 21 – Images d’une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii* en microscopie électronique à transmission.

(A) Lors d’une culture exponentielle, *Chlamydomonas* produit de l’amidon transitoire qui est accumulé autour du pyrénioïde. (B) En conditions de stress mimées en laboratoire par une carence azotée, l’algue produit de l’amidon de réserve accumulé dans le chloroplaste qui occupe quasiment tout le volume de l’espace cellulaire. P : pyrénioïde, L : corps lipidiques, E : eyespot (stigma).

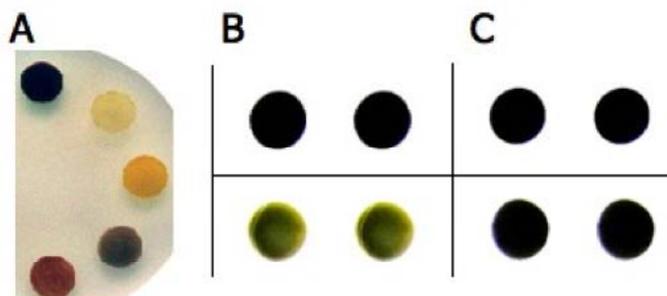


Figure 22 – Coloration à l’iode.

(A) Teintes observées après vaporisation à l’iode d’une souche sauvage (noire), des souches mutantes dépourvues d’amidon (jaune), ou de souches produisant un amidon modifié (verdâtre ou rouge). (B-C) Illustration du crible en 2 étapes. Les panneaux B et C représentent les teintes obtenues par coloration à l’iode de la souche sauvage (B) et d’un mutant de dégradation (C) après 5 jours de carence azotée (panneaux du haut) et 5 jours de carence suivis d’une journée à l’obscurité après levée de carence (panneaux du bas).

C. reinhardtii présente bien d'autres avantages afin de mener nos études. En effet, le métabolisme de l'amidon chez cette algue est en tout point comparable à celui des plantes supérieures. Lors d'une culture exponentielle, l'algue produit un amidon transitoire fruit de la photosynthèse, alors qu'en conditions de stress (mimées en laboratoire par une carence en azote), elle produit de l'amidon de réserve (**Figure 21**). La versatilité du modèle nous permet d'étudier deux situations physiologiques différentes en changeant simplement de milieu de culture. Par le passé, il a été prouvé que l'inactivation d'enzymes impliquées dans le métabolisme du polysaccharide engendrait les mêmes phénotypes que ceux des mutants homologues des plantes supérieures. Pour exemple, une étude récente menée au laboratoire a conclu qu'une amidon phosphorylase plastidiale dénommée PhoB chez *Chlamydomonas* était impliquée dans la biosynthèse du polysaccharide (**Dauvillée et al., 2006**). Ce résultat inattendu pour une enzyme suspectée jouer un rôle dans la dégradation a été confirmé deux ans plus tard chez un mutant du riz déficient pour la même activité (**Satoh et al., 2008**).

Il faut également noter que le génome de l'algue est entièrement séquencé permettant ainsi une identification aisée de nos mutations. En raison de l'absence de recombinaison homologue sur le génome nucléaire de l'algue, la mutagenèse dirigée directe est impossible chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Cependant, grâce à des méthodes efficaces de transformation nucléaire et à l'existence de cassettes de résistance à différents antibiotiques (paromomycine, hygromycine et bléomycine entre autres), la construction de banques de mutants est aisée. Ainsi, *Chlamydomonas* possède tous les avantages nécessaires aux études de génétique formelle que nous envisageons de mener. Il ne reste donc plus qu'à disposer d'un crible phénotypique suffisamment performant afin de détecter des mutants de dégradation de l'amidon.

Par le passé, notre laboratoire a bénéficié de l'interaction naturelle de l'iode et de l'amidon pour identifier des mutants de synthèse du polysaccharide (**Figure 22A**) (**Hicks et al., 2001**). Dans le cas des mutants de dégradation, ce crible doit être modifié. En effet, une souche sauvage apparaît noire au crible à l'iode. Un mutant de dégradation contiendra potentiellement plus d'amidon et donc se colorera également en noir. Afin de contourner cette difficulté, nous utilisons un crible en deux étapes mis en place dans le laboratoire et déjà testé avec succès (**Chochois et al., 2010**). Dans un premier temps,

on laisse aux cellules le temps d'accumuler de l'amidon à la lumière, pendant 5 jours sur un milieu carencé en azote. La carence est ensuite levée et les cellules sont transférées à l'obscurité pendant 24 heures. Au bout de cette période, une souche sauvage (**Figure 22B**) aura le temps de dégrader quasiment tout son amidon et sera donc grise lors de la coloration à l'iode. Un mutant de dégradation ou une souche suraccumulant le polysaccharide (**Figure 22C**) n'en sera pas capable et restera donc noire.

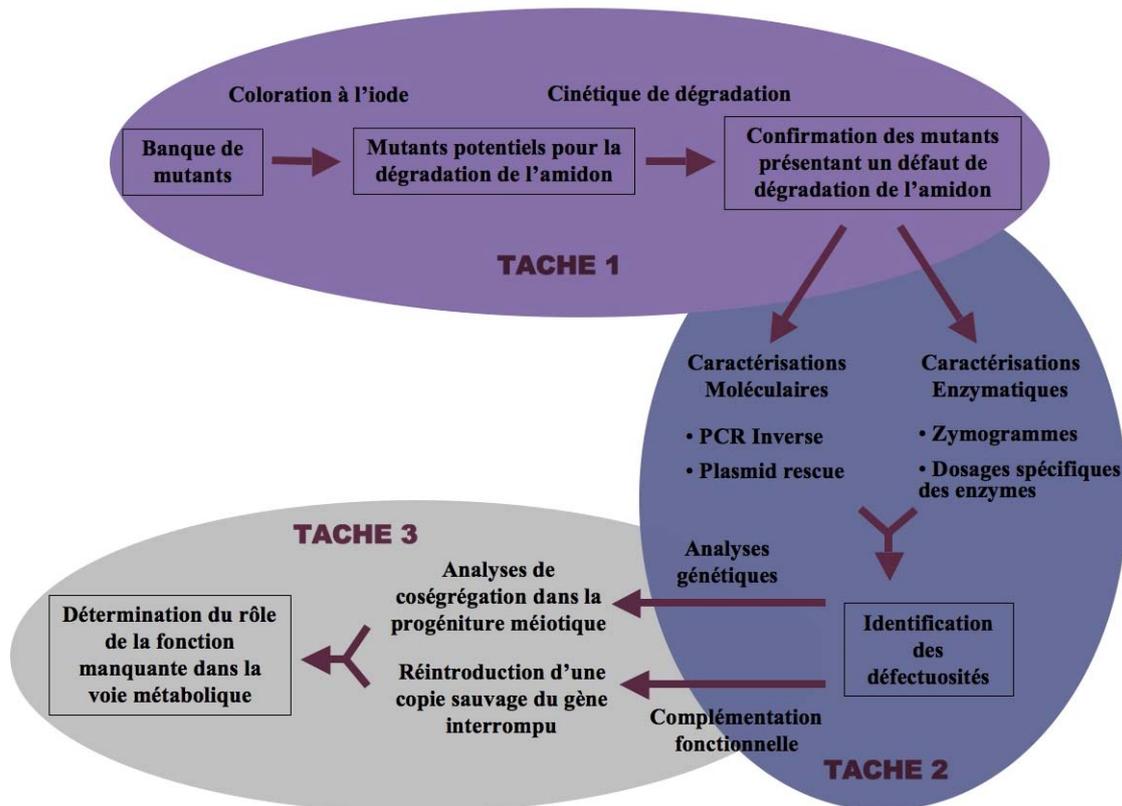


Figure 23 – Schématisation des 3 étapes du projet de thèse.

Cette illustration résume la procédure expérimentale qui a été utilisée afin de caractériser de nouvelles fonctions impliquées dans le catabolisme de l'amidon chez *Chlamydomonas*. Tâche 1: Obtention des mutants déficients dans le catabolisme de l'amidon par insertion d'un plasmide mutagène chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Tâche 2: Identification des fonctions clés du processus par les caractérisations moléculaires et enzymatiques. Tâche 3: Détermination du rôle de la fonction manquante dans la voie catabolique par la complémentation fonctionnelle et des analyses de coségrégation.

IV. OBJECTIF DE LA THESE

Les voies impliquées dans la biosynthèse de l'amidon sont assez bien décrites alors que de nombreuses incertitudes demeurent concernant les voies de dégradation et leurs régulations. Nous avons pour objectif de découvrir et caractériser les fonctions impliquées dans la dégradation et la mobilisation des réserves d'amidon par une approche de génétique formelle chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

Le projet de thèse se déroule en 3 étapes (**Figure 23**). Dans un premier temps, nous avons généré une banque de 16 000 mutants d'insertion qui a été criblée à l'iode afin d'identifier les mutants de dégradation de l'amidon. Une quarantaine de mutants, plus ou moins affectés dans le catabolisme de l'amidon, ont ainsi fait l'objet des études de cinétiques de dégradation afin de différencier les simples surproducteurs, des souches possédant un véritable défaut de dégradation. Une fois que le défaut de dégradation est confirmé, deux grandes voies de caractérisations sont entreprises : la caractérisation moléculaire par la PCR inverse et par le "plasmid rescue", et la caractérisation enzymatique grâce aux gels d'activité de type zymogramme et aux dosages spécifiques des enzymes, permettant l'identification des déficiences. Après détermination de la mutation, les candidats les plus prometteurs comme CAT3 déficient pour le transporteur de maltose, CAT4 altéré pour une β -amylase et CAT16 dépourvu de l'enzyme de branchement de type 1 ont fait l'objet d'une caractérisation poussée aux niveaux génétique, moléculaire et physiologique. Ces candidats sont analysés par des études de complémentation fonctionnelle, qui permettent de vérifier le retour à un phénotype normal en réintroduisant une copie sauvage du gène déficient dans le mutant correspondant, en parallèle des études de coségrégation chez la progéniture provenant du croisement du mutant avec un sauvage de polarité sexuelle opposée. L'ensemble de ces données est utilisé afin de tenter de déterminer la nature de la fonction altérée dans la mobilisation du polysaccharide semi-cristalin.

Ce projet nous apporte non seulement des renseignements sur les fonctions enzymatiques nécessaires à la dégradation *in planta* de l'amidon, mais permet également de façon très probable d'aboutir à l'identification de fonctions de régulation de cette voie métabolique qui ne sont pas accessibles à l'heure actuelle aux démarches de génétique inverse. Néanmoins, il est important de savoir que le phénotype de certains

de nos mutants affectés dans la capacité à mobiliser l'amidon pourrait être expliqué aussi par des conséquences indirectes de l'absence d'une fonction intervenant dans d'autres processus cellulaires comme la division cellulaire, la motilité ou bien la perception de la lumière. Pour exemple, un de nos mutants, dénommé CAT22, montre un défaut dans le gène codant pour une protéine de flagelle, ce qui pourrait expliquer son phénotype *sex* (*starch excess*) puisque la motilité représente une voie d'utilisation très importante de l'énergie (**Hamilton et al., 1992**). Nous pourrions également mettre à jour dans nos banques de mutants des souches déficientes pour des fonctions enzymatiques non suspectées et requises pour la dégradation de l'amidon. Comme c'est déjà le cas pour l'anabolisme de l'amidon, nous espérons que les observations effectuées chez notre microalgue seront transposées aux modèles végétaux supérieurs et permettront de mieux appréhender les mécanismes de mobilisation d'un des polysaccharides les plus répandus dans le règne vivant.

MATERIELS & METHODES

I. SOUCHES

La souche sauvage de référence 137C a été utilisée pour la mutagenèse insertionnelle afin de créer la banque de mutants. Ainsi toutes les souches mutantes étudiées dans ce mémoire possèdent les mêmes caractères génétiques tels que la polarité sexuelle (*mt-*) ou les auxotrophies (*nit1 nit2*, mutations affectant le métabolisme du nitrate et du nitrite).

La souche CC125, souche sauvage de polarité sexuelle opposée (*mt+*) est utilisée pour la préparation de l'autolysine (une glycoprotéine dégradant la paroi cellulaire et produite lors de la mise en contact des gamètes).

La souche sauvage 37 de polarité sexuelle opposée à 137C (*mt+*) a servi de souche parentale pour les croisements lors des analyses de coségrégation dans les tétrades. Elle possède des mutations différentes de celles de la souche sauvage de référence 137C (*ac14 pab2*, mutations entraînant respectivement une incapacité à pousser en photo-autotrophie et une auxotrophie pour l'acide para-aminobenzoïque) qui permettront d'examiner la redistribution des caractères génétiques au cours de la méiose.

Milieux de culture Solutions mères	Milieu non carencé (TAP)	Milieu dépourvu d'acétate (TMP)	Milieu dépourvu d'azote (TAP-N)
Cr Salts 20X	50 ml/L	50 ml/L	-
Cr Salts 20X-N	-	-	50 ml/L
Tris 100X	10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L
Cr KPO ₄	5 ml/L	5 ml/L	5 ml/L
Cr MgSO ₄	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L
pH 7.0*	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L
P.A.B. (1mg/ml)	1 ml/L	1 ml/L	-

Tableau 4 – Milieux de cultures liquides utilisés pour les souches de *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Le pH du milieu TMP se fait à l'acide chlorhydrique (HCl) alors que l'acide acétique est utilisé pour ajuster le pH des autres milieux à 7.

P.A.B. : Acide para-aminobenzoïque.

II. MILIEUX DE CULTURE

1. Les précultures

Une étape préliminaire de préculture est nécessaire pour le passage de la culture du milieu gélosé au milieu liquide. Elle permet l'adaptation au milieu, la croissance et le contrôle de la densité cellulaire. Dans cette optique, les cellules sont transférées, à l'aide d'un bâtonnet stérile, dans un erlenmeyer de 100 mL, préalablement stérilisé par autoclave, contenant 50 mL de milieu TAP liquide en conditions stériles. Ces précultures sont conservées sous lumière vive et agitation continues pendant 3 à 5 jours à 21°C. Elles sont ensuite utilisées afin d'ensemencer les cultures du volume désiré.

2. Les cultures de *Chlamydomonas reinhardtii*

La composition des milieux liquides ou gélosés utilisés pour les cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* décrits par **Harris (1989)** est indiquée en **tableaux 4 et 5**, respectivement. Le milieu liquide qui permet la multiplication rapide des cellules et ainsi l'accumulation de biomasse est le milieu TAP (Tris/Acétate/Phosphate). Dans ce milieu, les cellules sont en mixotrophie puisqu'elles utilisent l'acétate comme source de carbone et effectuent en même temps la photosynthèse.

Afin d'obtenir une accumulation massive d'amidon par les cellules ou bien d'induire la gamétogenèse, celles-ci sont transférées en milieu TAP carencé en azote (TAP -N). Elles peuvent ensuite être transférées dans un milieu TMP (l'équivalent du milieu TAP dépourvu d'acétate) à l'obscurité et sans source de carbone afin de favoriser la dégradation du polysaccharide.

Les souches de *Chlamydomonas* sont conservées sur un milieu gélosé HSA (High Salt Acetate) riche contenant 1,2 % d'agarose en lumière continue et elles sont repiquées sur un milieu frais toutes les 3 à 4 semaines. Il est possible de rendre ce milieu sélectif en y ajoutant des antibiotiques tels que la paromomycine (10µg/mL) ou l'hygromycine (20µg/mL). D'autres milieux gélosés utilisés par exemple pour la sélection des mutants par le crible à l'iode (le milieu HS-N, le milieu minimum dépourvu d'azote)

S.M.	M.C.	HSA Riche	HS-N	HS	HSA	HS+PAB	HSA+PAB	HSA+PAB -N	HSA+PAB +ARG	NIT	NIT Complet
Cr Salts 20X		50 ml/L	-	50 ml/L	50 ml/L	50 ml/L	50 ml/L	-	50 ml/L	-	-
Cr Salts 20X-N		-	50 ml/L	-	-	-	-	50 ml/L	-	50 ml/L	50 ml/L
Cr KPO ₄ (mini)		10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L	10 ml/L
Cr Oligo		1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L
Cr MgSO ₄		1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L	1 ml/L
P.A.B. (1mg/ml)		1 ml/L	-	-	-	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L	-	1 g/L
Acétate de Sodium		1 g/L	-	-	1 g/L	-	1 g/L	1 g/L	1 g/L	-	1 g/L
Extrait de levure		4 g/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar		12 g/L	12 g/L	12 g/L	12 g/L	12 g/L	12 g/L	12 g/L	12 g/L	12 g/L	12 g/L
KNO ₃		-	-	-	-	-	-	-	-	0.4 g/L	0.4 g/L
Arginine (100mg/ml)		-	-	-	-	-	-	-	1 ml/L	-	-
NaNO ₂		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4 g/L

Tableau 5 – Milieux de culture solides pour les souches de *Chlamydomonas reinhardtii*.

P.A.B. : Acide para-aminobenzoïque. KNO₃: Nitrate de potassium. NaNO₂: Nitrite de sodium.

ou pour les tests d'auxotrophies (HS, HSA, HSA+PAB etc.) sur les tétrades sont indiqués en **tableau 5**.

La composition des solutions mères utilisées pour préparer tous ces milieux (liquides ou gélosés) est détaillée dans le **tableau 6**.

		20X	20X -N
Cr Salts	NH ₄ Cl	8 g/L	-
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g/L	2 g/L
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 g/L	1 g/L
	NaCl	-	8.7 g/L
Cr MgSO₄ (0.5M)		123,25 g/L	
Cr Tris 100X (2M)		242 g/L	

Cr KPO ₄		Milieu Liquide (1M)	Milieu Gélosé (0.67M)
	K ₂ HPO ₄	93,5 g/L	72 g/L
	KH ₂ PO ₄	63 g/L	36 g/L

Cr Oligo	H ₂ BO ₃	11,4 g	550 ml H ₂ O (à 100°C)
	ZnCl ₂ (ou ZnSO ₄)	10,4 g (ou 22 g)	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,1 g	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,99 g	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,61 g	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57 g	
	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O (ou MoO ₃)	1,1 g (ou 0,8g)	
	EDTA	50 g	350 ml H ₂ O (à 100°C)
	KOH	20 g	100 ml H ₂ O
	Ajouter le KOH pour obtenir un pH 6.5 à 6.8 (à 80°C)		

Tableau 6 – Compositions des solutions mères pour les milieux liquides et solides.

III. PRODUCTION DE LA BANQUE DE MUTANTS

1. Préparation de l'autolysine

L'autolysine est une enzyme de lyse de la paroi, synthétisée par les cellules de *Chlamydomonas* lors de la fusion des gamètes. Cette autolysine peut être utilisée pour se débarrasser de la paroi des souches que l'on veut transformer.

Des suspensions cellulaires des deux références sauvages de polarités sexuelles opposées 137C (*mt-*) et CC125 (*mt+*) sont incubées pendant 1 nuit sous lumière vive et en milieu carencé en azote (20 mL par souche) afin d'induire la gamétogenèse. Les deux suspensions sont ensuite mises en contact pendant 2 à 3h à l'obscurité. Le surnageant contenant l'autolysine est récupéré par centrifugation (4000 g 10 min à 4°C) puis stérilisé par filtration (filtre 0,2 µm) à 4°C et stocké à -80°C pour un usage ultérieur.

2. Vérification de la qualité de l'autolysine

Afin de tester l'efficacité de la préparation d'autolysine, 500 µL de la solution sont ajoutés à 500 µL d'une culture de cellules de la référence sauvage 137C. Après 1 h d'incubation à température ambiante et à la lumière, les cellules sont centrifugées à 13 000 g pendant 1 minute. Les culots de cellules sont resuspendus dans 200 µL de Triton® X100 0,1% et sont centrifugés de nouveau à 13 000 g pendant 10 secondes. On effectue en général ce test en parallèle sur la souche initiale non-traitée à l'autolysine (témoin négatif) en remplaçant l'autolysine par de l'eau stérile.

Le Triton® X100 provoque la lyse des cellules si celles-ci sont dépourvues de paroi. Les cellules lysées (signes d'une autolysine efficace) donnent lieu à un culot blanc et un surnageant vert. Les cellules intactes (signe d'une autolysine peu ou non efficace) donnent lieu à un culot vert et un surnageant incolore.

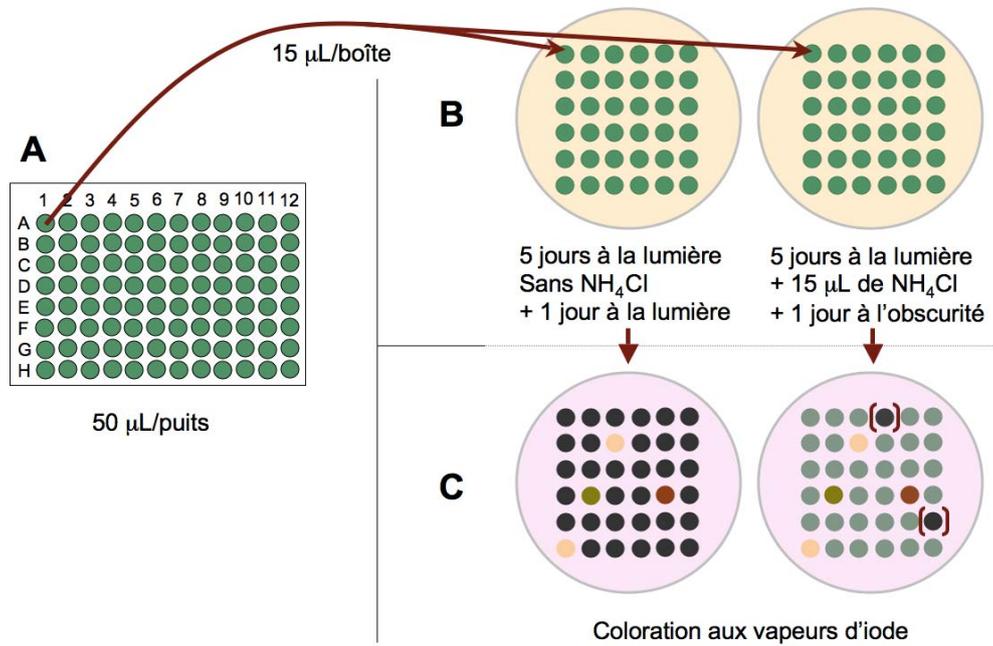


Figure 24 – Schéma représentatif du crible en deux étapes.

(A) Suspension cellulaire. Les cellules de la référence sauvage et des mutants potentiels sont mises en suspension dans 50 µL de TAP-N liquide. (B) Crible en deux étapes. La boîte de gauche correspond à une incubation des patches cellulaires pendant 5 jours en lumière sur milieu carencé en azote. La boîte de droite correspond aux mêmes souches, après levée de la carence par l'addition de 15µL de NH₄Cl, et incubation supplémentaire à l'obscurité pendant 24h. (C) Détection des mutants. La référence sauvage 137C est souvent placée en haut à gauche de chaque boîte. Cette souche est capable de dégrader quasiment tout l'amidon qu'elle a accumulé lors de la période de carence et apparaît vert pâle pendant la coloration aux vapeurs d'iode du fait de la perte d'interaction. Les souches montrant un phénotype intéressant sont entourées en rouge (sur la boîte de droite). Ce crible permet également de détecter les mutants de synthèse du polysaccharide (colorations jaune, rouge ou verte sur la boîte de gauche).

3. Transformation nucléaire

La transformation nucléaire chez *Chlamydomonas reinhardtii* est réalisée grâce à la méthode aux billes de verre décrite par **Kindle (1990)**. Les cellules de la référence sauvage 137C sont mises préalablement en culture dans 1L de TAP jusqu'à l'obtention d'une concentration d'environ 5.10^6 cellules/mL. La culture est alors centrifugée (3000 g 10 min 4°C) afin de se débarrasser du milieu. Le culot de cellules est repris dans 20 mL d'autolysine et incubé au moins 1h à la lumière vive. Les cellules sont de nouveau centrifugées (3000 g 10 min 4°C) et concentrées 100 fois dans du milieu TAP. 300 μ L de la suspension cellulaire concentrée sont vortexés pendant 10 secondes en présence de 0.5 μ g de plasmide pSL18 préalablement linéarisé par *EcoRI* et de 250 mg de billes de verre (d'un diamètre de 400 μ m). Elle est ensuite étalée sur un milieu HSA riche contenant de la paromomycine (10 μ g/mL). Seules les cellules transformées par le plasmide seront résistantes à l'antibiotique et formeront une colonie. Les premiers clones apparaissent entre 7 et 10 jours après la transformation et sont repiqués de manière ordonnée sur des boîtes de milieu sélectif. Ces transformants feront l'objet du crible en deux étapes afin de pouvoir détecter les clones d'intérêts. Le même protocole est suivi afin de générer des mutants à l'aide du produit de PCR correspondant à la cassette paromomycine du plasmide pSL18.

4. Crible à l'iode en deux étapes

Après 5 à 7 jours de croissance sur un milieu riche (HSA), les cellules de la souche référence 137C et des transformants sont resuspendues, à l'aide d'un bâtonnet stérile, dans 50 μ L de milieu TAP-N contenus dans chaque puits d'une plaque de microtitration stérile (Nunc, Roskilde, Danemark) (**Figure 24A**). Quinze μ L des suspensions cellulaires sont déposées en deux exemplaires sur le milieu solide carencé en azote (TAP-N). Les boîtes sont ensuite placées en salle de culture sous lumière vive pendant 5 jours, pour permettre aux cellules d'accumuler massivement de l'amidon.

À la fin de cette période de 5 jours, la carence est levée sur la moitié des boîtes (sur un des deux exemplaires) en ajoutant simplement 15 μ L d'une solution de chlorure de sodium (NH_4Cl 150 mM) (**Figure 24B**). Ces boîtes sont ensuite placées à l'obscurité totale pendant 24 heures en les emballant dans du papier aluminium, afin d'induire la

dégradation du polysaccharide de réserve. Les boîtes non traitées sont conservées en salle de culture sous lumière vive. Après 24h, toutes les boîtes sont colorées aux vapeurs d'iode (I_2) (**Figure 24C**) en les plaçant simplement sur une boîte de Petri qui contient environ 2 g de paillettes d'iode. Après coloration, les boîtes sont immédiatement prises en photo. Il est important de noter qu'une période de décoloration de 8 à 16 h sous sorbonne suivie d'une recoloration aux vapeurs d'iode est souvent nécessaire afin de discerner correctement les clones d'intérêt. Ceux-ci se caractérisent par une coloration noire ou bleu-nuit, signe de la présence d'amidon malgré la période de dégradation à l'obscurité. À l'opposé, les clones ayant dégradé leur amidon comme la référence sauvage apparaissent de couleur verdâtre. Grâce à ce crible, il est également possible de détecter des mutants de synthèse du polysaccharide qui peuvent présenter des teintes verte, jaune, orange ou rouge à la fin de la période de carence du fait de la modification ou de l'absence du polysaccharide de réserve.

IV. CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES

1. Extraction et dosage de l'amidon

Une culture cellulaire de $0,5-1,5 \cdot 10^6$ cellules/mL est centrifugée à 3000 g pendant 10 min à 4°C. Les cellules sont alors cassées par sonication pendant 1 min sur la glace et centrifugées de nouveau (4000 g 10 min 4°C). Le culot contenant l'amidon est repris dans 750 μ L de Percoll 90% afin de séparer le polysaccharide des débris cellulaires. Une centrifugation à 13 000 g pendant 10 min à 4°C permet de sédimenter l'amidon qui est le seul à avoir une densité suffisante pour traverser le Percoll. Le culot est ensuite lavé une fois avec 750 μ L d'eau.

Pour le dosage, la suspension d'amidon obtenue permet la préparation de trois dilutions (1/5, 1/10 et 1/20) qui sont bouillies pendant 5 minutes afin de déstructurer les grains d'amidon. Cet empois d'amidon est alors dosé à l'aide du kit « Starch assay » commercialisé par Enzytec™ Scil (R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne). Il est tout d'abord digéré par une amyloglucosidase afin de le transformer en glucose. Ce dernier est alors phosphorylé par une hexokinase et oxydé par une glucose-6-phosphate déshydrogénase, ce qui permet la réduction du NADP en NADPH₂. La production du NADPH₂ est suivie au spectrophotomètre à 365 nm.

2. Dosage des polysaccharides solubles

En parallèle du dosage de l'amidon, le surnageant obtenu après sonication est bouilli 15 min afin d'inactiver les activités enzymatiques puis centrifugé 10 min à 13000 g. 60 μ L du surnageant sont digérés par le même volume d'amyloglucosidase et 60 μ L sont dilués dans l'eau au 1/2. Le premier échantillon permet le dosage de l'ensemble des polysaccharides solubles tandis que le second permet d'estimer la quantité de glucose libre. Le dosage suit le même principe que celui de l'amidon (Chapitre IV.1).

3. Mesure de la λ_{max}

La lambda max (λ_{max}) représente la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe iode-polysaccharide. L'amidon (100 μ g) est dissous dans 20 μ L de DMSO

100% (diméthylsulfoxyde) en le bouillant 5 min puis la suspension est ramenée à 10 % DMSO en ajoutant 180 μ L d'eau. Pour une analyse spectrophotométrique, 20 μ L de solution d'iode (KI 1 % ; I₂ 0,1 %) sont ajoutés à 80 μ L d'échantillon. La λ_{\max} est mesurée entre 500 et 700 nm afin de déterminer précisément la longueur d'onde donnant l'absorption maximale. Cette valeur est spécifique de la structure du polysaccharide complexé à l'iode (**Thorn et Mohazzeb, 1990**).

4. Chromatographie de tamisage moléculaire (CL-2B)

Deux mg d'amidon sont dissous dans 200 μ L de DMSO 100% pendant 10 minutes à 100°C puis précipités par 800 μ L d'éthanol 100% à -20°C (pendant minimum 30 min). Le culot obtenu par centrifugation (13000 g 10 min 4°C) est resuspendu dans 300 μ L de soude (NaOH) 10 mM puis déposé sur une colonne de sépharose CL-2B de 0,8 cm de diamètre et de 70 cm de hauteur. L'élution se fait par la soude 10 mM à un débit de 12 mL/h. Des fractions de 300 μ L sont récoltées et la λ_{\max} de chaque fraction est mesurée au spectrophotomètre (80 μ L de fraction mélangés avec 20 μ L de solution d'iode). Ce type d'analyse permet de séparer l'amylopectine de l'amylose afin d'obtenir une caractérisation plus précise de la structure du polysaccharide. La proportion d'amylose dans l'amidon peut être également dosée à l'aide du kit d'amidon décrit au chapitre IV.1.

5. Analyse de la distribution en longueurs de chaînes (CLD) de l'amylopectine

L'amylopectine récupérée après séparation sur colonne de sépharose CL-2B est dialysée durant la nuit puis lyophilisée. Le lyophilisat est ensuite resuspendu dans 500 μ L d'eau auquel on ajoute 500 μ L de tampon 110 mM acétate de sodium à pH3.5 et 6 unités d'isoamylase et 3 unités de pullulanase. L'ensemble est incubé une nuit à 42°C pour l'hydrolyse des points de branchement par les deux enzymes.

Les chaînes de glucose de différentes longueurs sont purifiées sur une colonne Carbohydrate (Discovery Science, Deerfield, USA), lyophilisées une seconde fois puis resuspendues dans 450 μ L d'eau avant d'être analysées sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions à haute performance avec détection

ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD). L'élution des polysaccharides se fait par une solution de soude (150 mM NaOH) et d'acétate de sodium (1 M NaAc).

V. CARACTERISATIONS ENZYMATIQUES

1. Préparation des extraits bruts

Les extraits bruts sont en général préparés à partir d'une préculture en milieu TAP. Les cellules sont culotées par centrifugation pendant 5 min à 3000 g et reprises dans 1 mL d'eau afin d'être cassées par sonication (30 secondes, 4°C). Des aliquots de 500 µL sont conservés à – 80°C pour un usage ultérieur.

2. Dosage des protéines

La concentration des protéines contenues dans l'extrait brut est estimée par la méthode de **Bradford (1976)** à l'aide du kit de dosage Biorad Protein Assay. Après une centrifugation de l'extrait brut décongelé (13000 g 10 min 4°C), la concentration en protéines du surnageant obtenu est mesurée à l'aide de trois dilutions (1/500, 1/1000 et 1/2000) réalisées dans un volume de 800 µL. 200 µL de réactif Biorad sont ajoutés à ces dilutions afin de mesurer la concentration en protéines à 595 nm. Cette dernière est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec la sérum albumine bovine (0 à 20 mg/mL).

3. Les gels d'activité de type zymogramme

3.1. Préparation de l'échantillon et du gel

Pour les gels effectués en conditions dénaturantes, un aliquot de surnageant correspondant à la quantité de protéines désirée est bouilli pendant 5 min en présence de 5% β-mercaptoéthanol / 2% SDS afin de dénaturer les protéines. L'échantillon est prêt à être déposé sur le gel après l'ajout du tampon de chargement (Glycérol 20%, Tris glycine 40 mM pH 8.3, bleu de bromophénol 0,001%). En conditions natives, le tampon de chargement est immédiatement ajouté au surnageant.

L'électrophorèse est réalisée à l'aide du système MiniProtean II de BioRAD (Richmond, CA, USA). Les gels de concentration et de séparation ont une concentration finale en monomère de 4 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). En conditions dénaturantes, les gels contiennent en plus du SDS (0,2 % final). La migration s'effectue dans le tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,2 %, DTT 1 mM à 150 V pendant 1h30 pour un gel dénaturant. Le tampon ne contient pas de SDS lorsque le gel est réalisé en condition native et dans ce cas la migration est réalisée à 4°C.

3.2. Le zymogramme révélant les activités hydrolytiques

Pour révéler ce type d'activité, le gel de polyacrylamide contient 0,3 % d'amidon de pomme de terre soluble (Sigma, St Louis, USA). Après l'électrophorèse, afin d'éliminer toutes traces de SDS et de β -mercaptoéthanol, le gel est lavé quatre fois 30 min dans un tampon Tris 40 mM. Il est ensuite incubé toute la nuit à température ambiante dans du Tris/Glycine 25 mM pH 8.3, DTT 20 mM. Les activités ayant modifié la structure de l'amidon contenu dans le gel sont révélées par coloration du gel avec la solution d'iode (KI 1% ; I₂ 0,1%).

3.3. Les zymogrammes révélant les activités amidon-synthétases solubles et les amidon phosphorylases

Le gel contient cette fois-ci comme substrat du glycogène de foie de lapin (0,3 % final, Sigma, St Louis, USA). Afin de révéler les amidon synthétases, après les quatre rinçages successifs dans le Tris 40 mM, le gel est incubé une nuit à température ambiante dans le tampon suivant: Glycylglycine 50mM pH9, (NH₄)₂SO₄ 100mM, β -mercaptoéthanol 5mM, MgCl₂ 5mM, sérum albumine bovine 0,5 mg/mL, ADP-glucose 1mM. La réaction est arrêtée lors de la coloration du gel par l'iode. Dans le cas du zymogramme amidon phosphorylase, le premier lavage après migration est réalisé à l'aide du Tris 40mM contenant 20mM de phosphate de pyridoxal, un cofacteur essentiel à la remise en conformation de ces enzymes. Il est ensuite lavé trois fois dans le Tris 40mM. Le gel est ensuite équilibré dans le tampon Citrate 100 mM pH7 et incubé durant la nuit dans le même tampon contenant 20 mM de Glucose-1-phosphate.

Les deux types d'activités sont révélés par l'apparition de bandes noires sur le gel après coloration dues à l'allongement des chaînes du glycogène contenu dans le gel.

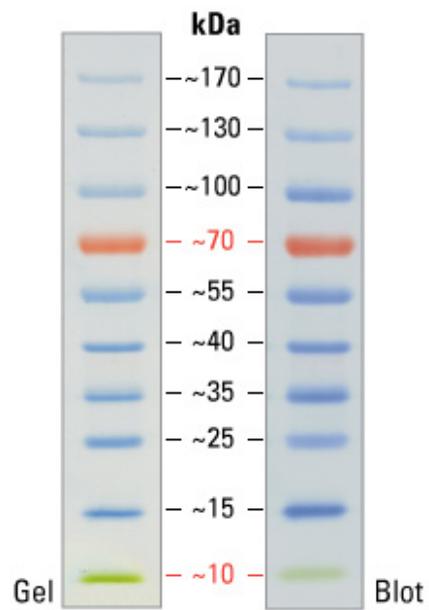


Figure 25 – Profil des bandes du marqueur de protéine coloré.

Les images proviennent de la migration du marqueur sur un gel dénaturant (SDS-PAGE) (à gauche) et du transfert sur la membrane (à droite).

3.4. Le zymogramme révélant les enzymes de branchement

Cette fois, l'électrophorèse s'effectue en conditions natives et le gel ne contient pas de substrat. La migration s'effectue à 4°C à 150 V pendant 4h. Après la migration, le gel est lavé deux fois 10 min dans 30 mL de tampon Hepes 50 mM pH7 / Glycérol 10%. Il est ensuite incubé une nuit dans 30 mL du tampon auquel sont ajoutés 40mM de Glucose-1-phosphate, 2,5 mM d'AMP, et 10mg de phosphorylase a de muscle de lapin (Sigma, St Louis, USA). L'activité des enzymes de branchement est révélée par la coloration du gel à l'iode.

4. Western Blotting

Après purification, 50 µL de protéines d'intérêt sont bouillis pendant 5 min en présence de 5µL du mélange β-mercaptoéthanol / SDS 10% (v/v). 25 µL de protéines déstructurées sont séparés sur un gel dénaturant (SDS-PAGE). La migration est vérifiée à l'aide de 10 µL de marqueur de taille coloré (Thermo Fischer Scientific, USA) (**Figure 25**) et dure environ 1h30 à température ambiante à 150 Volts dans le tampon de migration (25 mM Tris/Glycine pH 8.3, 20% SDS, 20 mM DTT).

Avant le transfert, la membrane PVDF (BioRAD) est activée dans du méthanol et ensuite lavée dans 40 mL de tampon de transfert (25 mM Tris/Glycine pH 8.3, 0,2% SDS, 20% méthanol). Le transfert sur membrane se fait à température ambiante pendant 1h30 à 15 Volts, 200 mA. La membrane est ensuite bloquée pendant 1h dans 50 mL de TBS 1X contenant 1% de TWEEN®20 (TBST) en présence de 5% de lait demi-écrémé (Auchan, France). Après le blocage, la membrane est incubée à 4°C pendant la nuit dans le même tampon contenant cette fois-ci 1/1000^{ème} d'anticorps primaire penta-His de souris (Qiagen, USA) (1 µg/ml), sous agitation modérée. Cet anticorps va se lier à la séquence peptidique (6Xhistidine) ajoutée aux protéines que l'on veut détecter.

Après rinçage de la membrane 3 fois pendant 5 min dans 50 mL de TBST afin d'enlever les anticorps primaires non liés, celle-ci est exposée à l'anticorps secondaire « anti-souris » (Qiagen, USA) (0.1 µg/ml) lié à la phosphatase alcaline qui permet l'identification de la protéine portant le tag histidine. La détection colorimétrique se fait

dans 20 mL de tampon de coloration (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH final à HCl 9.5) contenant 400 µL de NBT/BCIP (Roche, USA) (NBT, nitrobleu tetrazolium ; BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) pendant 5-15 min. Afin d'arrêter la coloration, la membrane est rincée à l'H₂O pendant 5 min, puis séchée entre deux papiers Whatman et prise en photo.

5. Semi-purification et caractérisation de l'enzyme de branchement de type 1

La semi-purification de cette activité responsable de la production d'une bande de teinte rose/rouge sur les zymogrammes contenant de l'amidon comme substrat a été réalisée à partir de 1 litre de culture (TAP) des cellules de la référence sauvage 137C en phase exponentielle de croissance. Les algues ont été cassées par sonication dans le tampon de purification (10 mM Tris/HCl pH 7.5; 10 mM EDTA; 8 mM DTT). 25 mg de protéines totales ont été incubés à 4°C dans une colonne contenant une résine d'affinité à l'amylose (New England Biolabs, Ipswich, MA) pendant 10 minutes. La colonne a été ensuite lavée 3 fois dans 5 mL de tampon de purification et les protéines attachées ont été éluées 3 fois par 1 mL de tampon contenant différentes concentrations de malto-oligosaccharides (0.5, 1, 2, 5 et 10 mg/ml MOS dans le tampon de purification).

50 µL de chaque fraction d'éluion ont été analysés par zymogrammes afin de détecter les fractions d'éluion ne contenant que l'activité responsable de l'apparition de la bande rose. 300 µL de ces fractions ont été incubés pendant 2 heures à 30°C en présence de 1 mg d'amylose de pomme de terre (Sigma, St. Louis, MO). Les polysaccharides obtenus ont été alors précipités par l'éthanol (1.2 mL d'éthanol 100 %) à 13 000 g pendant 10 min à 4°C. Les culots séchés ont été resuspendus dans 100 µL de NaOH (10 mM) et l'interaction avec l'iode a été observée en ajoutant 200 µL de Lugol (0.01 % I₂; 0.1 % KI) et 700 µL d'eau déminéralisée. L'absorbance a été mesurée entre 400 et 700 nm afin de déterminer la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe iode-polysaccharide (λ_{max}) qui reflète la structure du polysaccharide.

VI. CARACTERISATIONS MOLECULAIRES

1. Extraction et dosage de l'ADN génomique

Une préculture de *Chlamydomonas* contenant des cellules en phase exponentielle de croissance est centrifugée pendant 5 min à 3000 rpm et le culot est resuspendu dans 500 µL d'eau stérile. Le même volume (500 µL) de tampon de lyse 2X (Tris/HCl 200 mM pH 8.0, EDTA 3,5 mM, SDS 6 % (p/v)) est ajouté ainsi que 6 µL de protéinase K à une concentration de 20 mg/mL. Après incubation pendant 15 min à température ambiante, 160 µL de NaCl 5 M sont ajoutés à l'échantillon qui est vortexé pendant 10 secondes. 140 µL de CTAB/NaCl (10% CTAB dans 0,7 M NaCl) préalablement chauffés à 65°C sont ajoutés et le tout est incubé pendant 10 min à la même température.

L'ADN est ensuite purifié par plusieurs extractions à l'aide d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). L'ADN présent dans le surnageant est précipité en ajoutant un volume d'isopropanol. Le culot d'ADN obtenu après centrifugation est lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % avant d'être séché pour être repris dans 100 µL d'eau stérile.

La concentration en ADN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm au NanoDrop (Labtech International Ltd., East Sussex, UK). Afin d'évaluer la contamination d'une préparation d'acides nucléiques par des protéines, l'absorbance à 280 nm peut être mesurée. La pureté de l'ADN est déterminée par le rapport : $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, celui-ci devant être compris entre 1,8 et 2.

2. Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait d'une culture bactérienne selon le protocole classique de la lyse alcaline décrit par **(Sambrook et Russell, 2001)** et modifié pour l'utilisation des colonnes distribuées par Promega (PureYield™ Plasmid Miniprep System, Promega, Madison, USA). La lyse alcaline est basée sur le comportement différent des ADN génomiques et plasmidiques lorsqu'ils sont soumis à une dénaturation alcaline suivie d'une renaturation rapide. Le principe de ce kit repose sur trois étapes

Nom	Séquence	Température	Taille
Kin5For	5'-CAGCGCGCAGTCCATGCAGC-3'	70°C	550 pb
Kin5Rev	5'-ATCGGACACGGGCGCCAACG-3'		
Kin3For	5'-CAGCTGGTCACAAGCGAAGTG-3'	60°C	400 pb
Kin3Rev	5'-CGCCAGCTGTTGCTGCTGTAG-3'		
BE1FOR5	5'-ATGGCTGCGAGGCCGCTTCAG-3'	60°C	650 pb
BE1REV5	5'-ACGACCGCCTACACGCCCTG-3'		
BE2aFor5	5'-CAATGGCACACCTCCTCCAC-3'	60°C	516 pb
BE2aRev5	5'-GTTGAACTGGATCTCGTTCCAG-3'		
BE2bFor5	5'-CTTACTCGCACCAGCAAGCTG-3'	60°C	615 pb
BE2bRev5	5'-CTTGAAGGTGTAAGTCTGCTGTC-3'		

Conditions de PCR			
Réactions	Étapes	Température & Temps	Cycles
Dénaturation	1	94°C, 1 min	1
Dénaturation	2	94°C, 30 sec	Répéter 30 fois
Hybridation	3	60°C ou 70°C, 30 sec	
Elongation	4	72°C, 1 min	
Elongation finale	5	72°C, 10 min	1
	6	4°C (maintenir)	1

Tableau 7 – Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées afin d'amplifier le fragment d'ADNg de la kinase du mutant CAT15 et des enzymes de branchement de Chlamydomonas.

Les amplifications sont réalisées en présence de 5% DMSO.

principales : lyse alcaline, adsorption de l'ADN sur une membrane de silice, lavage et élution de l'ADN plasmidique.

3. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les amplifications réalisées lors de ce travail ont été obtenues à partir d'1µg d'ADN génomique (ADNg) à l'aide de l'enzyme EXT DNA Polymérase (Finnzymes, Espoo, Finlande), optimisée pour les fragments longs et riches en GC, ou de la Taq polymérase DreamTaq (Fermentas, Burlington, CAN) en suivant les recommandations du fournisseur.

Les séquences des amorces utilisées et les conditions de PCR sont indiquées dans le **tableau 7**.

4. Extraction et dosage des ARNs

Une préculture de *Chlamydomonas reinhardtii* en phase exponentielle est centrifugée 5 min à 3000 rpm puis le culot est congelé à – 80°C pendant minimum 30 min. Il est ensuite resuspendu dans 1 mL de Trizol (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) et le tout est transféré et incubé 5 min à température ambiante dans un tube PLG (Phase Lock Gel ; 5Prime, Gaithersburg, USA). 500 µL de chloroforme sont ajoutés et le tube est agité vigoureusement avant d'être centrifugé 10 min à 13000 g et à 4°C. Si la phase aqueuse est translucide et claire, elle est prélevée pour la suite de l'extraction. Sinon, l'opération est répétée avec 200 µL supplémentaires de chloroforme jusqu'à obtenir l'état désiré. La phase aqueuse est reprise en tube Eppendorf avec 500 µL d'isopropanol puis l'échantillon est incubé 10 min à température ambiante après avoir été vortexé 10 secondes. Le culot d'ARN est obtenu par centrifugation 10 min à 13000 g puis lavé par 1 mL d'éthanol 70%. L'éthanol est éliminé puis l'ARN est resuspendu dans 40 µL d'eau traitée au DEPC.

La concentration d'ARN est définie par mesure de l'absorbance à 260 nm au NanoDrop (Labtech International Ltd., East Sussex, UK). Afin d'évaluer la contamination d'une préparation d'ARN par des protéines, l'absorbance à 280 nm peut être mesurée. La pureté des ARN est déterminée par le rapport : A_{260nm}/A_{280nm} , celui-ci devant être

Nom	Séquence	Température	Taille
RTKin5F	5'-GTCAGCCTGTCGCCGTCTAGCAAG-3'	60°C	560 pb
RTKin5R	5'-CGGCCTCCACGCCTGCCTCTG-3'		
RTKin3F	5'-CACAAGGCGTCAGACGTGTAC-3'	60°C	280 pb
RTKin3R	5'-CTGCCGCCAGGGCCTTCCTG-3'		
BE1RT5	5'- GAGAGTCACGACCAGGCTCTG-3'	60°C	650 pb
BE1RT3	5'- GAAGCCGTAGTGGTTGTGCGAG-3'		
RTMexA	5'-TCTCTGCCATGTTCCGGCAACAC-3'	60°C	375 pb
RTMexE	5'- CAGCCCAAGCGTGCAAATGAAG -3'		
RTMexC	5'-TTCCGCAAGTCGTCCAGAATGC-3'	60°C	455 pb
PhoBFor	5'-CAGCCCAAGCGTGCAAATGAAG-3'	60°C	736 pb
PhoBRev	5'-TGCAGGAAGCGCCAGTTGA-3'		

Conditions de PCR			
Réactions	Étapes	Température & Temps	Cycles
Reverse transcription	1	50°C, 30min	1
Activation	2	95°C, 15 min	1
Dénaturation	3	94°C, 30 sec	
Hybridation	4	60°C, 30 sec	X 30
Elongation	5	72°C, 1 min	
Elongation finale	6	72°C, 10 min	1
	7	4°C (maintenir)	1

Tableau 8 – Séquences des amorces et conditions de RT-PCR utilisées afin d'amplifier le fragment d'ADNc de la kinase CAT15, de BE1 et de MEX1 de Chlamydomonas.

Les amplifications sont réalisées en présence de 5% de solution Q.

supérieur à 1,8. La qualité des ARN extraits peut être vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

5. RT-PCR « one step »

La réaction de RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) consiste en la synthèse d'un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir de son ARN messager (ARNm), à l'aide d'amorces aléatoires. L'amplification a été réalisée à partir du kit commercial « one step » RT-PCR (Qiagen, Hilden, ALL) permettant d'effectuer la réaction de « transcription reverse » et de PCR dans la foulée. La réaction de transcription reverse est effectuée sur 1 µg d'ARNs totaux alors que la réaction de PCR se fait directement sur l'ADNc simple brin obtenu lors de la RT-PCR. Le mélange enzymatique utilisé lors de la réaction contient à la fois une transcriptase reverse et une polymérase, et les amorces nécessaires à la synthèse du brin d'ADNc par la transcriptase reverse sont les mêmes que les amorces utilisées lors de la PCR. Ce protocole présente l'avantage d'être nettement plus rapide et de limiter le nombre d'étapes intermédiaires, mais est restreint aux fragments de taille relativement petite (inférieure à 2 kb en général).

Les séquences des amorces utilisées et les conditions de « one step » RT-PCR sont indiquées dans le **tableau 8**.

6. Identification du lieu d'insertion du plasmide

6.1. « Plasmid Rescue »

Deux microgrammes d'ADN génomique de la souche d'intérêt est digéré, pendant une nuit à 37°C, par 10 unités d'une enzyme de restriction qui ne coupe pas dans le plasmide pSL18 mais qui coupe fréquemment dans le génome de *Chlamydomonas*. Après l'inactivation de l'enzyme à la chaleur, les fragments d'ADN obtenus sont recircularisés à l'aide de la T4 DNA ligase (Promega, Madison, USA). Le mélange de ligation est alors utilisé afin de transformer des bactéries compétentes (*Top10*) d'*E. coli* par choc thermique. Seules les bactéries qui ont reçu le plasmide intégré dans le génome de l'algue seront capables de pousser sur le milieu contenant de l'ampicilline (100 µg/mL). La purification de l'ADN plasmidique des clones obtenus se fait à l'aide du

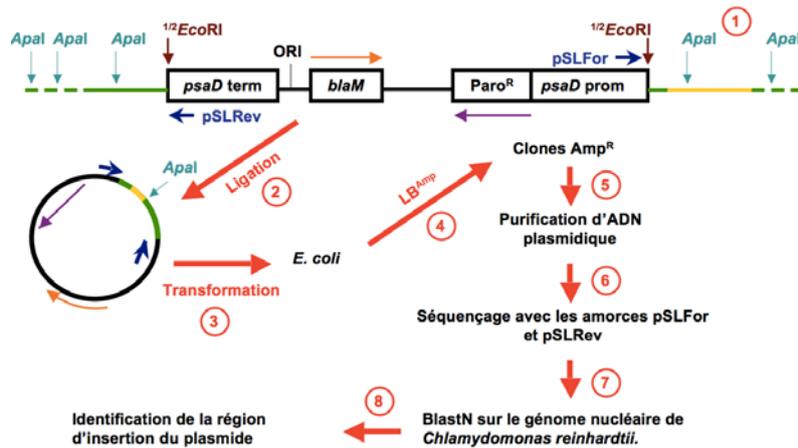


Figure 26 – Représentation schématique de la technique de plasmid rescue.

Les différentes étapes sont indiquées par un chiffre cerclé en rouge.

1 Digestion de l'ADNg de l'algue par une enzyme de restriction qui ne coupe pas dans le plasmide mutagène.

2 Ligation des fragments obtenus à l'aide d'une T4 DNA ligase.

3 Transformation des bactéries *Top10* d'*E. coli*.

4 Sélection des transformants sur milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml).

5 Purification de l'ADN plasmidique des transformants.

6 Séquençage.

7 Annotation de la séquence nucléique dans phytozome (<http://www.phytozome.net>).

8 Identification du lieu d'insertion.

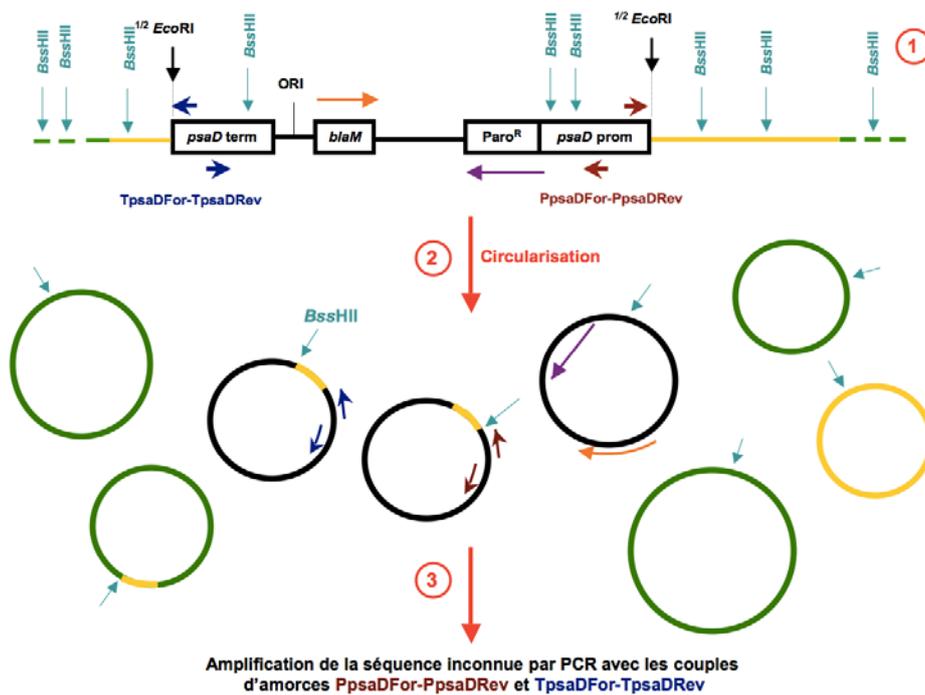


Figure 27 – Schématisation des étapes de la PCR inverse.

1 Digestion de l'ADNg de l'algue par une enzyme de restriction coupant fréquemment dans le génome de l'algue.

2 Circularisation des fragments par la T4 DNA ligase.

3 Amplification de la séquence par PCR

kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, USA) selon les indications du fournisseur (voir chapitre VI.2.). La présence de fragments spécifiques de pSL18 est vérifiée par restriction et les plasmides contenant un fragment d'ADN génomique sont séquencés afin de déterminer le lieu d'insertion du vecteur.

Les différentes étapes de plasmid rescue sont schématisées dans la **figure 26**. La séquence des amorces utilisées pour séquencer le fragment d'ADN génomique est indiquée dans le **tableau 9**. Elles s'hybrident de part et d'autre du site unique *EcoRI* qui a été utilisé afin de linéariser le plasmide pour la mutagenèse.

6.2. PCR inverse

Pour localiser l'insertion du plasmide pSL18 dans le génome, 1 µg d'ADN génomique sont digérés pendant 2 heures à 37°C par 10 unités d'enzyme de restriction coupant fréquemment dans le génome de *Chlamydomonas reinhardtii* (*BssHII*, *BsrBI* et *EaeI*). Après inactivation à la chaleur de l'enzyme de restriction, les fragments générés sont circularisés à l'aide de la T4 DNA ligase (Promega, Madison, USA) pendant 2 heures à température ambiante dans son tampon 2X Rapid Ligation. Une fois la ligase inactivée, le mélange de ligation est utilisé pour réaliser la réaction de polymérisation en chaînes. Les amorces utilisées sont PpsaDFor et PpsaDRev pour amplifier à partir de la partie promotrice du gène *psaD* contenu dans le vecteur mutagène ; TpsaDFor et TpsaDRev pour la partie terminatrice. La **figure 27** schématise ces différentes étapes. L'hybridation se fait à 60°C et l'élongation dure 3 min à 72°C. Les produits de PCR inverse sont purifiés à l'aide du kit PCR Clean Up System (Promega, Madison, USA) selon les indications du fournisseur. Les séquences des amorces utilisées pour la PCR sont indiquées dans le **tableau 10**.

6.3. TAIL-PCR

La technique de TAIL-PCR consiste à amplifier par PCR la région flanquant l'insertion, en utilisant d'une part une amorce spécifique de la cassette de résistance, et d'autre part, une amorce dégénérée. Le principe réside sur le fait que l'amorce dégénérée va se fixer aléatoirement sur des séquences d'ADN génomique. Si l'amorce dégénérée se fixe suffisamment près de l'insertion et dans le bon sens, la réaction de

Nom	Séquence
pSLFor	5'-GGTTTCCTCGCCGAGCAAGCCAG-3'
pSLRev	5'-GATTACCCTGTCCTTGCAAATGC-3'

Tableau 9 – Séquences des amorces qui bordent l'unique site *EcoRI* du plasmide pSL18.

Nom	Séquence
PpsaDFor	5'-CATGTTTGCCCCGAACTCGGAG-3'
PpsaDRev	5'-CATTTGCCTGCCTTCACGCATC-3'
TpsaDFor	5'-TGCATGTAATGGCCAGGCCATG-3'
TpsaDRev	5'-ACTGGCTCACGCACACGCTAAC-3'

Conditions de PCR			
Réactions	Étapes	Température & Temps	Cycles
Dénaturation	1	95°C, 1 min	1
Dénaturation	2	95°C, 1 min	X 30
Hybridation	3	55°C, 1 min	
Élongation	4	72°C, 1 min	
Élongation finale	5	72°C, 10 min	1
	6	4°C (maintenir)	1

Tableau 10 – Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour la PCR inverse.

Les amplifications sont effectuées en présence de 5% DMSO.

Nom	Séquence
AD2	5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'
TAIL1	5'-GTGCTCGTTTGTGCGTGAAAGT-3'
TAIL2	5'-CAAATCAGTCCTGTAGCTTCA-3'
TAIL3	5'-ACATACGCACCAATCATGTCA-3'

Tableau 11 – Séquences des amorces utilisées lors de la TAIL-PCR.

AD2 représente l'amorce dégénérée ; TAIL1, TAIL2, TAIL3 sont les amorces s'hybridant sur la cassette paromomycine présent dans le plasmide mutagène pSL18.

PCR va permettre d'amplifier la région flanquant l'insertion. Après purification, l'amplifiât est séquencé et l'insertion du plasmide mutagène peut être situé en localisant, par BLAST (Basic local alignment search tool), ce fragment de PCR. Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le **tableau 11**.

7. Hybridation de type Southern

La technique du Southern blot permet de quantifier le nombre d'insertions du plasmide de mutagenèse dans le génome des souches mutantes isolées lors du crible décrit au chapitre III. Dans le cadre du laboratoire, cette technique est utilisée « à froid », c'est-à-dire en utilisant une sonde marquée à la digoxygénine, qui est un antigène reconnu par un anticorps spécifique fourni dans le kit « DIG Luminescent détection kit » (Roche). Cet anticorps est finalement détecté par luminescence sur film photographique, révélant une bande sombre à l'endroit où la sonde s'est hybridée. Afin de déterminer le nombre d'insertions dans le génome des mutants, la sonde marquée a été choisie de manière à ce qu'elle s'hybride sur la zone correspondant à la séquence codante du gène *APHVIII*, qui confère la résistance à la paromomycine, utilisée lors de la mutagenèse.

7.1. Synthèse de la sonde marquée par PCR

La sonde est préalablement synthétisée par PCR avec les amorces Aph_ORF_FW et Aph_tail_3 dont les séquences sont indiquées dans le **tableau 12**. Les tampons utilisés sont fournis par le kit « PCR DIG probe synthesis » (Roche) (**Tableau 12**) qui est un kit de PCR classique supplémenté avec du dUTP marqué à la digoxygénine. Ce nucléotide va s'insérer à la place du dTTP pendant la synthèse de la sonde en y ajoutant de nombreux sites de marquage. L'efficacité de marquage peut être vérifiée en comparant la vitesse de migration de la sonde marquée avec la même PCR effectuée sans le nucléotide marqué. Le produit de PCR est ensuite dilué 10 fois et dénaturé en l'incubant pendant 10 min à 100°C puis en le refroidissant immédiatement dans la glace.

Réactif	Quantité
Tampon de PCR (n°3)	5µL
Enzyme (n°1)	1µL
dNTP (n°2) (dATP, dCTP, dTTP, dGTP et dUTP-DIG)	5µL
Aph_ORF_FW (100mM) 5'-CGAGACTGCGATCGAACGGACA-3'	0.5µL
Aph_tail_3 (100mM) 5'-CGAAGCATGGACGATGCGTT-3'	0.5µL
ADN (pSL18 ou cassette purifiée)	1µL

Contenu du kit de synthèse de la sonde marquée à la digoxygénine (Roche)	
n°1 Mélange d'enzymes	150 U, 3.5 U/ µL
n°2 Mélange de synthèse pour la sonde	2 mM dATP, dCTP et dGTP; 1.3 mM dTTP; 0.7 mM dUTP-DIG
n°3 Tampon de PCR (10X) avec MgCl ₂	15 mM MgCl ₂
n°4 Mélange de dNTP	2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP et dUTP
n°5 Matrice de contrôle	1 ng d'ADN plasmidique (20 pg/µL) dans le tampon Tris/EDTA (pH 8.0)
n°6 Mélange d'amorces pour PCR de contrôle	2 µM de chaque amorce

Tableau 12 – Mélange de PCR utilisé pour la synthèse de la sonde marquée.

Le volume final de la réaction de PCR est de 50 µL. L'hybridation des amorces se fait à 62°C pendant 30 sec.

Nom	Composition
Tampon de migration	TAE 1X Gel d'agarose 0.8%
Tampon de Dépurination	HCl 0.25 M
Tampon de Dénaturation	NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M
Tampon de neutralisation	Tris HCl 0.5 M pH 7.5, NaCl 1.5 M
Tampon de transfert	SSC 20X
Tampon de détection	Tris HCl pH 9.5, NaCl 0.1 M MgCl ₂ 50 mM
Tampon de blocage	Acide maléique (1X): 90% (v/v) Blocking reagent (10X) : 10% (v/v)
Tampon de lavage	Acide maléique 1X : 500 mL Tween® 20 : 0.3% (v/v)
Acide Maléique 10x	Acide maléique (M-0375, Sigma) 0.1 M, Chlorure de Sodium 0.15 M pour 1L, pH ajusté à 7.5 avec NaOH 10N, Autoclaver
SSC 20x	Chlorure de Sodium 3 M, Citrate de Sodium 300 mM pour 1L pH ajuster à 7.0

Tableau 13 – Liste des tampons utilisés lors de l'hybridation Southern.

7.2. Digestion et séparation des fragments d'ADN

Dans un premier temps, 8 µg d'ADN génomique de la souche à analyser ont été digérés en parallèle à l'aide de deux enzymes de restriction : *NotI* et *XmaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). La digestion est effectuée pendant 16 heures à 37°C. Le choix de ces enzymes dépend de plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, ces enzymes ne doivent pas couper dans la cassette ou le plasmide utilisé pour la mutagenèse. De plus, il faut s'assurer *in silico* que ces enzymes coupent relativement souvent dans le génome de *Chlamydomonas reinhardtii* (afin de donner une majorité de fragments d'une taille comprise entre 0,5 et 5 kpb). Les produits de la réaction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% dans du tampon TAE 1X (TAE 50X : Tris 2 M ; EDTA 0,05 M ; Acide acétique 1 M ; pH=8,0).

Les compositions des tampons nécessaires aux étapes suivantes sont détaillées dans le **tableau 13**. Les fragments d'ADN séparés selon leur taille sont ensuite dépurinés (par incubation du gel d'agarose dans un bain de tampon de dépurination pendant 30 min, ou jusqu'à ce que le bleu de chargement devient jaune), dénaturés (par incubation dans un bain de tampon de dénaturation pendant 30 min) et finalement, le gel est neutralisé (par incubation dans le tampon de neutralisation pendant 30 min).

Après ces trois étapes préliminaires, les fragments d'ADN peuvent être transférés pendant 16 h sur une membrane de Nylon (reference:VWR732-3030, Biotyne® Plus Membrane, Pall Corporation), par capillarité dans du tampon SSC 20X (**Tableau 13**). Une fois transférés sur la membrane, les fragments d'ADN sont fixés de manière covalente à celle-ci par exposition aux UV (Crosslinker, 1200 J).

7.3. Hybridation de la sonde et lavages de la membrane

Le tampon d'hybridation fourni dans le kit (DIG easy hyb) est supplémenté de 1mg/mL d'ADN de saumon préalablement dénaturé (30 min à 100°C puis refroidissement brutal dans la glace). La membrane est pré-hybridée pendant 1h dans ce tampon, sous agitation dans le four à hybridation à 65°C, puis hybridé avec la sonde dénaturée pendant la nuit à 65°C, également sous agitation. Après hybridation, la membrane est lavée deux fois 5 minutes dans du SSC 0,5X ; SDS 0,1% à température

ambiante, puis deux fois 20 minutes dans un tampon SSC 1X, SDS 0,1% préchauffé à 65°C (four à hybridation, 65°C).

7.4. Détection des signaux

Après hybridation, la membrane est lavée sous agitation pendant 5 min dans du tampon de lavage 1X puis bloquée 30 min dans le tampon de blocage avant d'être incubée 1 h en présence de l'anticorps anti-digoxigénine fourni dans le kit (1 µL d'anticorps pour 10 mL de tampon de blocage). Après cette incubation, la membrane est à nouveau lavée deux fois dans le tampon de lavage, et préincubée quelques minutes dans le tampon de détection. Elle est ensuite transférée dans une solution de CSPD (7,5 µL de CSPD pour 750 µL de tampon de blocage, les deux solutions sont fournies dans le kit de détection) dans laquelle elle est incubée pendant 5 min à l'obscurité avant d'être transférée dans une pochette plastique en prenant soin d'ôter l'excès de solution de CSPD.

Une fois dans la pochette plastique, la membrane est à nouveau incubée 15 min à l'obscurité à 37°C. La détection se fait via la Gbox (Syngene). La membrane est installée sous une caméra (système fermé) et la chimioluminescence est détectée via cette caméra en continu. Ce système permet l'accumulation de signal quelque soit le temps d'exposition en empêchant sa perte.

8. Technique de clonage

8.1. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

La digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction est réalisée dans les conditions conseillées par le fournisseur (New England BioLabs). Les plasmides et les fragments d'ADN à cloner sont digérés par les enzymes de restriction appropriées. Les choix du tampon, de la température d'action de l'enzyme, du temps d'action de l'enzyme, de l'ajout ou non de BSA sont conditionnés par les enzymes de restriction utilisées.

Nom	Composition
PSI broth	Extrait de levure bacto 5 g.L ⁻¹ Bactotryptone 20 g.L ⁻¹ Sulfate de magnésium 5 g.L ⁻¹ pH 7.6 avec KOH
Tampon TFbI	Acétate de potassium 30 mM Chlorure de rubidium 100 mM Chlorure de calcium 10 mM Chlorure de manganèse 50 mM Glycérol 15% v/v pH 5.8 avec acide acétique
Tampon TFbII	MOPS 10 mM Chlorure de calcium 75 mM Chlorure de rubidium 10 mM Glycérol 15% v/v pH 6.5 à la soude

Tableau 14 – Liste des tampons et milieu utilisés pour les bactéries chimiocompétentes.

L'ADN plasmidique est digéré par la ou les mêmes enzymes de restriction que le fragment d'ADN à cloner afin de générer des extrémités compatibles. Si l'insert (l'ADN complémentaire d'intérêt) et le plasmide possèdent les mêmes sites de restriction, le plasmide subi une étape supplémentaire de déphosphorylation pendant 1 heure à 37°C en présence de 0,5 unité de phosphatase alcaline de veau (CIP, New England BioLabs) par microgramme d'ADN, afin d'éviter une re-circularisation du vecteur sur lui-même lors de l'étape de ligation. Plasmide et ADNc d'intérêt sont alors analysés séparément sur un gel d'agarose et purifiés à l'aide du kit « Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega, Madison, USA).

8.2. Ligation

La ligation de l'ADN est réalisée dans un volume final de 20 µL, en présence de l'ADN plasmidique (50 ng) et de l'ADNc d'intérêt (quantité variable) préalablement digérés, du tampon de ligation T4 DNA ligase (10X) et de 40 unités de T4 DNA ligase (New England BioLabs). La ligation s'effectue à 4°C sur la nuit ou est réalisée pendant 2 h à la température ambiante à l'aide du kit « LigaFast™ Rapid DNA Ligation System Product Information » (Promega, Madison, USA) selon les indications du fournisseur.

8.3. Préparation des bactéries compétentes

100 µL de bactéries d'*E. coli Top10* sont incubés à 30°C dans 5 mL de milieu LB, sous agitation (140 rpm) pendant une nuit. Le lendemain, 2 mL de la suspension bactérienne sont transférées dans 200 mL de PSI broth (**Tableau 14**) pendant 2-3h à 30°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 3000 g, pendant 10 min, à 4°C et conservées dans la glace. Les bactéries sont resuspendues dans 20 mL de TFbI (**Tableau 14**) et centrifugées de nouveau à 4°C, pendant 10 min, à 4000 g. Le culot bactérien est lavé dans 10 mL de TFbII (**Tableau 14**) (centrifugation à 4000 g pendant 10 min à 4°C). Les bactéries sont finalement mises en suspension dans 5 mL de TFbII. La suspension bactérienne, répartie dans des tubes Eppendorf® (100 µL/tube), est immédiatement congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

8.4. Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries compétentes *Top10* (100 μ L), après une lente décongélation dans la glace (4°C), sont mises en présence de l'ADN, vecteur ou produit de ligation vecteur-insert (1 à 25 ng d'ADN) dans la glace pendant 15 min et soumises à un choc thermique pendant 45 sec à 42°C. Après 1 min d'attente dans la glace, 900 μ L de milieu LB sont ajoutés et les bactéries sont incubées 1 heure à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu LB et l'antibiotique approprié (ampicilline 100 μ g/ml ou kanamycine 40 μ g/ml). Après une incubation à 37°C pendant 16 heures, les colonies obtenues sont purifiées et l'ADN plasmidique de celles-ci est analysé par digestion enzymatique sur un gel d'agarose.

Nom	Séquence	Taille	T°C
Cat15FOR	5'-GTCTAGAATGGCCACAAGGAAAGGGGCGGCCAG-3'	4,5 kb	70
Cat15R	5'-GTCTAGACTACACCGCGCTGTACTTGCGGAC-3'		
RVMexFor	5'-GATATCATGTTGCAACCGGCACCGGCAAG-3'	2,8 kb	60
RVMexRev	5'-GATATCTTATGCGGGCCGCGGGCTTGCTG-3'		

Tableau 15 – Séquences des amorces utilisées afin d’amplifier la phase ouverte de lecture de la kinase et du gène *MEX1*.

La taille des fragments d’ADN génomique et la température d’hybridation des amorces sont également indiquées.

VII. COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE

Afin de confirmer le lien entre le gène défectueux et le phénotype observé, une copie sauvage d'un gène est réintroduite dans le génome nucléaire de l'algue mutante. La phase ouverte de lecture du gène est amplifiée par PCR sur l'ADN génomique (ADNg) de la souche sauvage 137C, à l'aide des amorces appropriées (**Tableau 15**) permettant l'introduction des sites de restriction pour l'endonucléase *EcoRV*. Le vecteur de clonage a été construit par le Dr. David DAUVILLEE en échangeant la cassette paromomycine du vecteur pSL18 par la cassette hygromycine B. Ce nouveau vecteur a été appelé pSLHyg. Le clonage dans le vecteur pSLHyg s'est effectué d'après la technique précédemment décrite au chapitre VI.8. La transformation du mutant est réalisée par la méthode aux billes de verre décrite par **Kindle (1990)** (voir chapitre III.3). En parallèle, le mutant a également été transformé avec le même vecteur cette fois sans insert. Les transformants ont été sélectionnés sur le milieu HSA riche contenant deux antibiotiques : la paromomycine (10 µg/mL) et l'hygromycine B (20 µg/mL). Le vecteur de mutagenèse confère aux transformants la résistance à la paromomycine alors que le vecteur de complémententation permet la résistance à l'hygromycine B.

Les complémentants (C) et les souches non complémentées (NC) ont tous subi les mêmes caractérisations biochimique, enzymatique et moléculaire effectuées sur le mutant d'origine, afin de prouver que le retour à un phénotype sauvage dépend de la réintroduction de la copie sauvage du gène défectueux chez le mutant.

VIII. ANALYSE DE COSEGREGATION

Le mutant étudié (*mt-*) et la référence sauvage 37 de polarité sexuelle opposée (*mt+*) sont cultivés dans 50 mL du milieu TAP, sous lumière vive ($40 \text{ mE m}^{-2}\text{s}^{-1}$) et agitation à 25°C , pendant 2 à 3 jours. Les cellules de chaque souche parentale sont lavées une fois en milieu TAP carencé en azote puis la gamétogénèse est induite pendant 16 heures dans 20 mL de milieu carencé en azote, sous lumière vive et agitation à 25°C . Après gamétogénèse, les deux souches parentales sont mises en contact en mélangeant les cellules et placées en salle de culture, sans agitation. 50 μL de la suspension cellulaire (en quatre exemplaires) sont ensuite déposés sur une boîte de Petri contenant du milieu HSA riche (4% d'agar). Ces boîtes sont exposées à une lumière faible ($15 \text{ mE m}^{-2}\text{s}^{-1}$) pendant une nuit puis placées à l'obscurité totale pendant 5 à 10 jours.

Les cellules parentales sont raclées à l'aide d'une lame de rasoir stérilisée à la flamme. On peut alors observer à la loupe binoculaire que les zygotes restent fixés à l'agar. Afin de se débarrasser des cellules parentales résiduelles, les boîtes sont exposées aux vapeurs de chloroforme pendant 30 secondes. Les zygotes sont ensuite transférés au centre d'une nouvelle boîte de Petri contenant du milieu HSA riche afin de les séparer les uns des autres et placés en salle de culture à 25°C sous lumière atténuée ($15 \text{ mE m}^{-2}\text{s}^{-1}$) pendant 24-48 heures. Après germination des zygotes, les quatre cellules de chaque tétrade obtenue sont séparées à l'aide d'une pipette pasteur stérile effilée en les espaçant d'au moins 5 mm afin d'empêcher le mélange de clones. Toutes les tétrades font l'objet d'analyses de la polarité sexuelle par PCR, de la croissance sur différents milieux sélectifs pour les auxotrophies et de la résistance à la paromomycine afin de vérifier qu'elles sont bien constituées de ségrégeants méiotiques.

IX. COMPLEMENTATION HETEROLOGUE DU TRANSPORTEUR DE MALTOSE (MEX1)

Le génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii* possède un fort pourcentage de GC (62%) (Sueoka, 1960), ce qui peut empêcher la synthèse correcte de la protéine MEX1. Afin d'obtenir l'expression de *MEX1* de *Chlamydomonas* dans ces systèmes hétérologues, nous avons utilisé un gène synthétique avec des codons optimisés pour la levure.

1. Chez *Escherichia coli*

1.1. Construction des vecteurs

Afin d'étudier l'expression hétérologue du transporteur de maltose (MEX1) chez les bactéries TST6 d'*E. coli*, les fragments correspondant à l'ADNc des gènes *MEX1* d'*Arabidopsis thaliana*, de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Synechococcus sp.* (PCC7002) sont amplifiés par PCR à l'aide des amorces appropriées (Tableau 16) permettant l'introduction des sites de restriction pour les endonucléases *Bam*HI et *Kpn*l. Le fragment correspondant à l'ADNc de *MEX1* de *Synechococcus sp.* n'a malheureusement pas pu être amplifié. Les séquences obtenues sont clonées dans le vecteur pQE30 (Figure 28) sous le contrôle de l'opérateur *lacO* afin de disposer d'un système inductible par l'IPTG (l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (voir chapitre VI.8.). Le clonage du gène synthétique de *MEX1* de *Chlamydomonas* a été également réalisé en parallèle.

1.2. Transformation de la souche TST6 d'*E. coli*

Les inserts ont été clonés dans le vecteur pQE30 qui porte un gène de résistance à l'ampicilline. La sélection des souches TST6 transformées par les différents vecteurs a été faite sur le milieu LB contenant cet antibiotique (100 μ g/mL). Les vecteurs ont été purifiés à partir de ces transformants afin de vérifier leurs séquences. Après vérification des séquences, les souches ont été utilisées afin d'étudier la croissance bactérienne.

Nom	Séquence
MexChlaSBam5	GATATCGGATCCATGGTTTCTTCTAGAAAGAAG
MexChlaSNot3	GATATCGCGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGAGCTGGTCTTG GAGAAGC
MexARABam5	GATATCGGATCCATGTGTTCCGGCGTCAATGGC
MexARANot3	GATATCGCGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGCGGTCCAAAA CAAGTTCTTTCAAAG
MexSynBam5	GATATCGGATCCATGTTTTTCTTTTTGAAGCAAC
MexSynNot3	GATATCGCGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGACTTTCAATGGG TTGCCAC

Tableau 17 – Séquences des amorces utilisées afin d’amplifier l’ADNc correspondant aux *MEX1* d’Arabidopsis, de Chlamydomonas et de Synechococcus.

La température d’hybridation des amorces est de 60°C. Les tailles attendues sont 1085 bp, 1154 pb et 1157 pb pour *MEX1* de Chlamydomonas, d’Arabidopsis et de Synechococcus, respectivement.

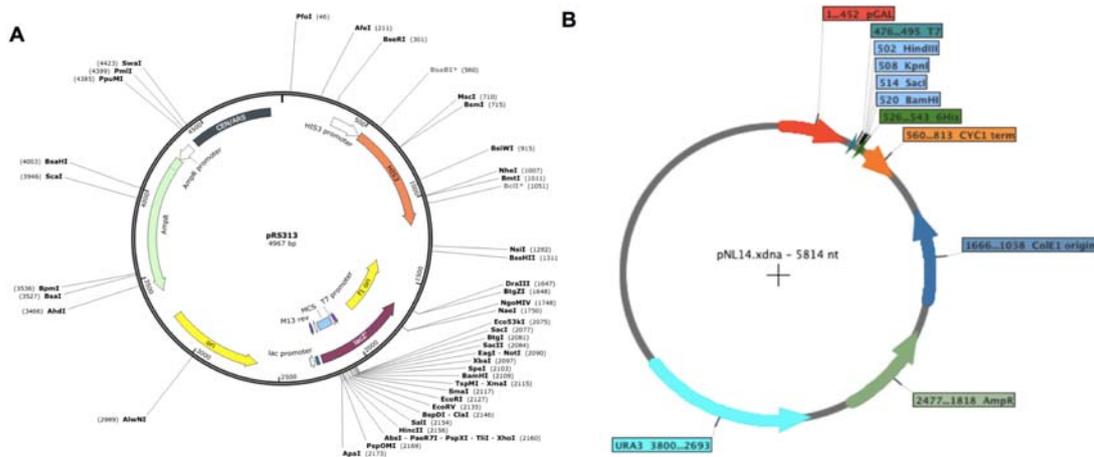


Figure 29 – Cartes des vecteurs pRS313 (A) et pNL14 (B) utilisés pour l’expression hétérologue du transporteur de maltose chez *S. cerevisiae*.

Les deux vecteurs utilisés pour la transformation de levure contiennent les gènes *HIS3* et *URA3* permettant la sélection des levures transformées.

1.3. Etude de la croissance des bactéries TST6 d'*E. coli*

Les souches TST6 d'*E. coli* transformées et non transformées ont été incubées à 37°C pendant 24h dans le milieu LB (en présence d'ampicilline) et utilisées afin d'ensemencer un milieu minimum M9 liquide contenant de l'ampicilline (100 µg/mL), de l'IPTG (1 mM) et, comme source de carbone, uniquement du maltose (0.4 % ou 0.8 % m/v) ou du glucose (0.4% ou 0.8 % m/v) afin d'obtenir une DO₆₀₀ de 0.01. La croissance des souches a été suivie au spectrophotomètre à 600nm toutes les heures pendant 8h et à 24h.

2. Chez *Saccharomyces cerevisiae*

2.1. Construction des vecteurs

Afin d'étudier l'expression hétérologue du transporteur de maltose (MEX1) chez les souches W303RKO et INVSc1 de *S. cerevisiae*, la phase ouverte de lecture des gènes *MEX1* d'*Arabidopsis thaliana*, de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Synechococcus sp.* (PCC7002) a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces appropriées (**Tableau 17**) permettant l'introduction des sites de restriction pour les endonucléases *Bam*HI et *Not*I. Durant l'amplification, une séquence consensus (AAAAUGUGU) a été ajoutée afin d'obtenir une expression correcte chez *Saccharomyces*. Ces inserts ont été clonés dans les vecteurs pRS313(pTI) (pour la souche W303RKO de levure) (**Figure 29A**) et pNL14 (pour la souche INVSc1) (**Figure 29B**). Un gène synthétique de *MEX1* de *Chlamydomonas* a été également utilisé pendant le clonage.

Les vecteurs pRS313(pTI) et pNL14 possèdent un gène de résistance à l'ampicilline. La sélection des souches d'*E. coli* Top10 transformées par ces vecteurs a été faite sur le milieu LB contenant cet antibiotique (100 µg/mL). Les vecteurs ont été purifiés à partir de ces transformants afin de vérifier leurs séquences.

Nom	Composition
Solution I	10 mM Tris, 1 mM EDTA (TE)
Solution II	1 mM LiAc, 0.5 mM TE
Solution III	1mM LiAc, 40% PEG-3350, 1 mM TE

Tableau 18 – Composition des tampons fournis dans le kit « S.c. EasyComp™ Transformation ».

2.2. Préparation des levures compétentes

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* (W303RKO ou INVSc1) a été épuisée et incubée pendant 2 jours à 30°C sur le milieu solide YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) contenant 20 % de glucose afin d'obtenir une colonie isolée. Après culture de cette colonie jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} entre 3.0-5.0, les cellules ont été diluées afin d'obtenir une DO_{600} entre 0.2-0.4. La suspension cellulaire a été mise en culture à 30°C pendant 3 à 6h pour que la DO_{600} atteigne 0.6-1.0. Les cellules ont ensuite été centrifugées à température ambiante à 1500 g pendant 5 min. Le culot a été lavé dans 1 mL de Solution I du kit « *S. c.* EasyComp™ Transformation » (Invitrogen) et centrifugé de nouveau à température ambiante à 1500 g pendant 5 min. Le culot est mis en suspension dans 1 mL de Solution II et des aliquots de 100 μ L ont été conservés à -80°C. La composition du kit « *S. c.* EasyComp™ Transformation » (Invitrogen) est indiquée dans le **tableau 18**.

2.3. Transformation des levures

Après une décongélation lente à 4°C, les levures compétentes (50 μ L) ont été incubées à 30°C pendant 1h dans 500 μ L de Solution III (*S. c.* EasyComp™ Transformation Kit, Invitrogen) (**Tableau 18**), en présence de 1 à 5 μ g de vecteur de clonage, sous agitation toutes les 15 minutes. Après une incubation supplémentaire d'une heure à 30°C en ajoutant 1 mL de milieu liquide YPED contenant 20 % de glucose, les cellules ont été centrifugées pendant 5 min à 9000 g à température ambiante.

Les souches W303RKO et INVSc1 sont auxotrophes pour l'histidine et l'uracile, respectivement. Les vecteurs pRS313(pTI) et pNL14 possèdent, respectivement, un gène *HIS3* et *URA3* permettant aux levures transformées de pousser sur un milieu sans histidine ou sans uracile. Ainsi, la sélection des levures transformées de la souche W303RKO (100 μ L) a été effectuée sur le milieu SC-His alors que le milieu SC-Ura a été utilisé pour les levures INVSc1. Les transformants apparaissent après incubation à 30°C pendant 2 à 4 jours. Une transformation de contrôle a été faite avec le vecteur sans insert dans les deux cas.

YPED	
Extrait de levure	1 %
Peptone (Tryptone)	2 %
Dextrose (D-Glucose)	2 %
Agar	2 %

SC (Synthétique Complet)	
Yeast Nitrogen Base (YNB)	0.67 %
Source de carbone 20 %	2 %
Drop Out Mix 10X	1X
Agar	2 %

Drop Out Mix	
Adénine, Arginine, Cystéine, Leucine, Lysine, Thréonine, Tryptophane, (Uracile)	0.1 %
Acide aspartique, (Histidine), Sérine, Isoleucine, Phénylalanine, Méthionine, Proline, Tyrosine, Valine	0.05 %

Tableau 19 – Composition des milieux de culture utilisés pour Saccharomyces.

Pendant la préparation du Drop Out mix (10X), l'uracile ou l'histidine n'est pas ajoutée afin de faciliter la préparation du milieu minimum SC pour la sélection des levures transformées par les différents vecteurs de clonage qui portent soit le gène *URA3* soit *HIS3*.

La composition des milieux utilisés pour *Saccharomyces* est indiquée dans le **tableau 19**.

2.4. Isolement des membranes de levure

Après culture à 30°C pendant 2 à 3 jours, les cellules sont transférées et cassées par sonication à 4°C dans un tampon contenant 50 mM phosphate de sodium (pH 7.4), 1 mM EDTA et 5 % de glycérol et culottées à 2200 g pendant 1 min à 4°C. Le culot obtenu est resuspendu dans le même tampon (13 mL). Après centrifugation à 100 000 g à 4°C pendant 45 min, les membranes sont récupérées dans 100 µL de TE (Tris 1 M pH 8.0, EDTA 0.5 M pH 8.0). Les membranes sont soit conservées à -80°C pour un usage ultérieur soit utilisées directement afin de vérifier la présence des protéines MEX1 par western blot (voir chapitre V.4.).

2.5. Etude de la croissance chez les levures W303RKO

Les levures W303RKO transformées, transformées avec le vecteur pRS313(pTI) vide et non transformée ont été incubées à 30°C pendant 48h dans le milieu riche YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) contenant 20 % de glucose afin d'obtenir une DO₆₀₀ entre 3.0-5.0. Les cellules ont été diluées en milieu SC-His contenant du glucose (20 %) ou du maltose (20 %) comme seule source de carbone pour atteindre une DO₆₀₀ de 0.05. La croissance des souches a été suivie au spectrophotomètre à 600nm après 2, 4, 6, 8 et 24h de culture.

2.6. Étude du transporteur de maltose

2.6.1. Purification des phospholipides

Les liposomes ont été préparés à partir de L- α -phosphatidylcholine (Sigma, type IV-S du soja) lavés à l'acétone. La procédure de lavage à l'acétone est utilisée pour purifier les lipides polaires, comme la phosphatidylcholine, d'acides gras libres solubles dans l'acétone. Trente grammes de phosphatidylcholine sont alors dissous dans 3 volume de chloroforme (90 ml) et 540 ml d'acétone ont été ajoutés à cette suspension sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. La suspension est ensuite

incubée à 4°C durant une nuit afin de permettre la précipitation des phospholipides. Le culot contenant les phospholipides est séché sous l'azote et stocké à -20°C pour un usage ultérieur.

2.6.2. Préparation des liposomes

Les phospholipides lavés à l'acétone sont dissous dans le milieu interne (50 mM K-gluconate, 100 mM Tris/Glycine pH 7.6 à KOH) par sonication (Branson sonifier-type B-15) à 4°C toutes les 30 secondes pour 10 cycles.

2.6.3. Reconstitution des protéoliposomes

Pour la reconstitution, 950 µL de liposomes sont ajoutés aux 100 µL de membranes purifiées à partir de 50 mL de culture de levure induite au galactose. La suspension est immédiatement congelée dans l'azote liquide puis décongelée à température ambiante. La congélation rapide dans l'azote liquide permet l'ouverture des vésicules tandis que la décongélation lente mène à l'insertion de la protéine dans la membrane. Les vésicules sont alors scellées par sonication toutes les 30 secondes pour 10 cycles (reconstitution des protéoliposomes).

Après reconstitution, le milieu interne à l'extérieur des protéoliposomes est enlevé par chromatographie sur une colonne Sephadex G-25M (colonnes PD10, GE Healthcare) pré-équilibrée dans le tampon PD10 (100 mM Na-gluconate, 40 mM K-gluconate, 10 mM Tris/Glycine pH 7.6). Les protéoliposomes (1.1 mL) sont élués avec le tampon PD10. Le liquide trouble contenant les protéoliposomes (~1-1.5 mL) est collecté dans un tube eppendorf.

2.6.4. Étude du flux de maltose radioactif

50 µL de milieu de transport (22 mM de maltose froid et 160 µM de maltose radioactif dans le tampon PD10) sont distribués dans des eppendorf de 1.5 mL. Le transport est initié dès l'addition de 1050 µL de protéoliposomes. Au bout de 1, 2, 4, 8 et 16 min, le transport est arrêté en chargeant les protéoliposomes (200 µL / point de cinétique) sur la colonne Sephadex G-25M afin d'enlever le substrat externe, qui n'est

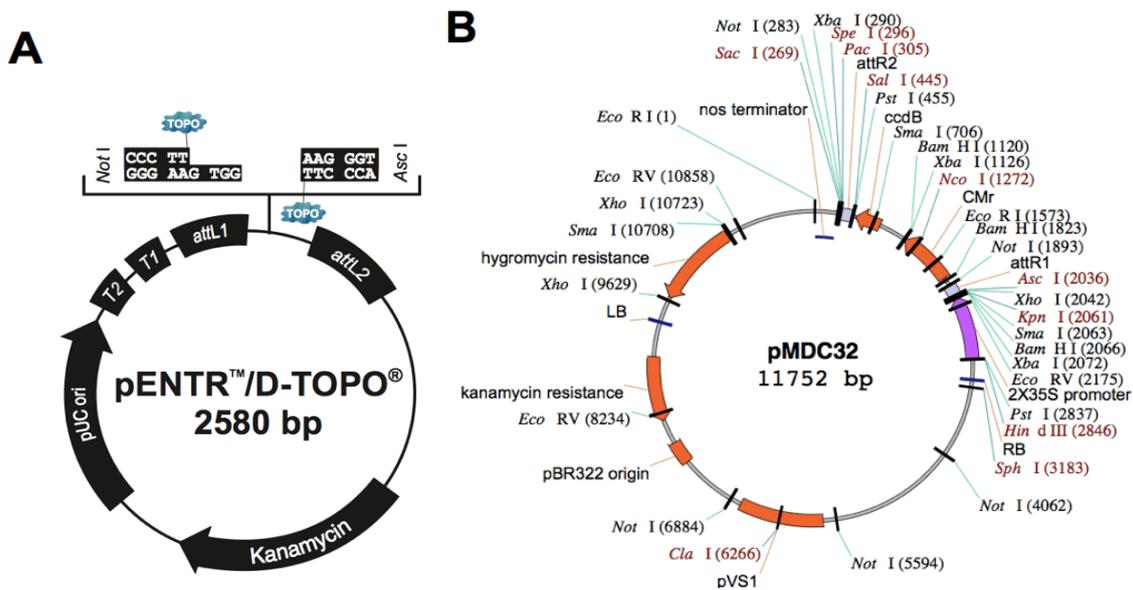


Figure 30 – Carte du vecteur d’entrée pENTR D-TOPO (A) et pMDC32 (B).

Le vecteur pENTR est digéré par *MluI* afin de se débarrasser de la cassette kanamycine facilitant ainsi son élimination lors de la sélection des agrobactéries transformées avec le vecteur pMDC32.

Nom	Séquence	Taille	T°C
2tagFor	CACCATGGATGCAATCAAATGCAGTTCCAGTTTC	164 pb	60
TPMexRev	ATGGTGGAAGTGGCTTCTTTCTAGAAGAAACGGAAATC GAAATCGGACGGAAGAG		
MexF	GTTTCTTCTAGAAAGAAGCC	1038 pb	55
MexR	TTAAGCTGGTCTTGGAGAAGCAGC		

Tableau 20 – Séquences des amorces utilisées pour la construction du vecteur de complémententation lors de l’agroinfection des plantes *mex1*.

Les amorces 2tagFor et TPMexRev sont utilisées afin d’amplifier le peptide de transit d’*ISA1*, les amorces MexF et MexR permettent l’amplification du gène synthétique de *MEX1*.

pas incorporé dans les protéoliposomes. Les expériences sont réalisées à température ambiante (25°C).

Les protéoliposomes élués (~500 µL) sont collectés dans des fioles de scintillation. La radioactivité est mesurée en CPM par un détecteur à scintillation liquide. Une expérience contrôle est effectuée avec des protéoliposomes formés à partir des membranes de levures transformés avec le vecteur vide.

3. Chez *Arabidopsis thaliana*

3.1. Construction du vecteur

La construction de l'ADNc chimérique contenant la séquence codant pour le peptide de transit de *ISA1* d'*Arabidopsis* associée à la séquence de *MEX1* synthétique de *Chlamydomonas* s'est faite en plusieurs étapes. Dans un premier temps, la séquence nucléotidique qui code le peptide de transit d'*ISA1* d'*Arabidopsis* a été amplifiée afin de l'ajouter à la séquence ADNc codant le *MEX1* synthétique de *Chlamydomonas* dépourvu de son propre peptide de transit. L'association des deux fragments a été réalisée lors d'une PCR en absence d'amorces (5 min à 94°C, 45 sec à 94°C, 45 sec à 59°C, 3 min 20 sec à 72°C, 36 cycles). Une dernière PCR a été réalisée de manière à amplifier la séquence d'intérêt à l'aide de la polymérase haute fidélité Kapa HiFi (Kappa Biosystems). La séquence des amorces utilisées lors des PCRs est indiquée dans le **tableau 20**.

La séquence d'intérêt est intégrée dans un vecteur donneur appelé pENTR D-TOPO (**Figure 30A**) à l'aide du kit « TOPO cloning » (Invitrogen). 40 ng de produit PCR et 20 ng de pENTR D-TOPO sont incubés 5 minutes à température ambiante dans le tampon fourni (Invitrogen). Avant l'incubation, le vecteur pENTR est digéré par l'enzyme de restriction *MluI* afin de se débarrasser de la cassette kanamycine présente sur celui-ci. La présence d'une séquence « CACC » (insérée lors de la PCR) permet l'intégration de l'insert de manière orientée au sein du vecteur grâce à la topoisomérase présente sur celui-ci. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB 1,2% agar contenant de la kanamycine (40 µg/mL).

Nom	Séquence	Température	Taille
Mex1For2	5'-TCTCTGCCATGTTTCGGCAACAC-3'	53°C	550 pb
MexRevaf	5'-CGGTCCAAAAACAAGTTCTTTCAAAG-3'		
LB1	5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'	53°C	385 pb

Tableau 21 – Séquences des amorces utilisées afin de vérifier le génotype des plantes *mex1*.
 Une PCR à 3 amorces est effectuée sur l'ADNg des plantes afin de vérifier la présence du gène sauvage *MEX1* ou de l'ADN-T.

Après vérification de la séquence d'intérêt, celle-ci est transférée dans un vecteur de destination appelé pMDC32 (**Figure 30B**) grâce à la technique « Gateway ». La recombinaison homologue est effectuée par la *LR clonase II* (Invitrogen) (2 µL) dans le tampon Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA) en présence de 150 ng de vecteur d'entrée (pENTR contenant la séquence d'intérêt) et 150 ng de vecteur de destination dans un volume final de 8 µL, pendant 2h à 25°C. La réaction est arrêtée par incubation à 37°C pendant 10 min en présence de 1 µL d'une solution de protéinase K fournie par le fournisseur. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB contenant 40 µg/mL de kanamycine. Le vecteur de destination contenant la séquence d'intérêt est linéarisé par restriction puis, après migration sur gel d'agarose à 1 %, celui-ci est purifié grâce au kit « Wizard SV Gel and PCR Clean Up System » (Promega) afin de transformer *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2. Extraction d'ADN génomique d'*Arabidopsis*

Avant la transformation, quelques feuilles des plantes sont prélevées afin d'en purifier l'ADNg et vérifier le génotype des plantes par PCR.

Les feuilles sont congelées dans l'azote liquide puis broyées à l'aide d'un pilon. La poudre ainsi obtenue est incubée à 60°C pendant 30 min dans 400 µL de tampon d'extraction (Tris-HCL 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2 %, β-mercaptoethanol 0.064 %). Un volume (400 µL) du mélange chloroforme / alcool isoamylique (24:1 v/v) est ensuite ajouté. Après une agitation au vortex, une centrifugation à 10 000 g pendant 15 min à 4°C permet de récupérer la phase aqueuse qui contient les acides nucléiques. L'ajout de 250 µL d'isopropanol provoque la précipitation de l'ADN et celui-ci est obtenu après une centrifugation à 10 000g pendant 30 min à 4°C. Après un lavage dans 300 µL d'éthanol 70 %, l'ADN est resuspendu dans 50 µL d'eau stérile. Une PCR avec des amorces spécifiques (**Tableau 21**) permettant de détecter le gène sauvage ou la présence de l'ADN-T dans les mutants d'insertion est ensuite réalisée.

3.3. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La souche GV3101 d'*A. tumefaciens* possède un plasmide naturel dépourvu d'ADN de transfert (ADN-T) mais contenant les gènes de virulence nécessaires au transfert d'un ADN-T et un gène permettant la résistance à la gentamycine.

La transformation d'*A. tumefaciens* GV3101 se fait par une méthode de Congélation/Décongélation des bactéries qui ne nécessite pas de préparation particulière (cellules non-compétentes). Après une inoculation au 1/100^{ème}, une culture de 100 mL est lancée sous agitation à 30°C jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ entre 0.5 et 1.0 (phase exponentielle de croissance). La suspension bactérienne est mise au contact du plasmide pMDC32 contenant *MEX1* synthétique de *Chlamydomonas* (1 µg). Après congélation dans l'azote liquide, les tubes sont décongelés pendant 5 min à 37°C. Les cellules sont incubées à 30°C pendant 2h dans 1 mL de LB, sous agitation. 100 µL de cette suspension sont étalés sur un milieu gélosé LB contenant 50 µg/mL de kanamycine et de gentamycine.

3.4. Transformation des plantes *mex1*

Une préculture d'agrobactéries dans 10 mL de LB contenant de la kanamycine (50 µg/mL) et de la gentamycine (50 µg/mL) est incubée pendant une nuit à 30°C, sous agitation. La culture est réalisée dans 100 mL du même milieu contenant les mêmes antibiotiques. Après 4 à 5h de croissance, lorsque la DO₆₀₀ dépasse 2.0 (phase stationnaire), la culture est centrifugée à 4000 g pendant 30 min à 4°C puis le culot est resuspendu dans 40 mL de milieu d'infiltration (MS 0.5X, 5% saccharose, 0.05 % Silwett L77). Le Silwett L77 est un agent mouillant de faible tension superficielle. Tous les boutons floraux de la plante âgée d'une quarantaine de jours (la hampe florale mesure environ 5 cm) sont imbibés par la suspension d'agrobactéries. Les plantes transformées sont ensuite recouvertes de manière à maintenir une forte humidité pendant 2 jours, facilitant l'agroinfection.

3.5. Sélection des transformants

Les siliques sèches sont récoltées environ un mois après la transformation puis les graines sont récupérées par tamisage (0.5 mm). Après une étape d'aseptisation (2 minutes dans l'éthanol 70 %, 10 minutes dans de l'hypochlorite de sodium 10 % suivi par 4 rinçages à l'eau stérile), les graines issues de la transformation seront semées sur un milieu Murashigue et Skoog (MS) 1 % agar contenant 20 µg/mL d'hygromycine B (Sigma-Aldrich®). Après une vernalisation à 4°C pendant 2 jours à l'obscurité, la croissance des graines sera suivie en phytotron à une température constante de 22°C et un taux d'humidité relatif de 80 %. Dès la formation des premières feuilles, les plantes sont transférées sur du terreau et les conditions de croissance optimale d'*Arabidopsis thaliana* sont maintenues en serre.

RESULTATS

CHAPITRE I :

PRODUCTION D'UNE BANQUE DE MUTANTS DEFICIENTS DANS LE
CATABOLISME DE L'AMIDON CHEZ LA MICROALGUE VERTE
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII VIA UNE APPROCHE DE GENETIQUE
FORMELLE.

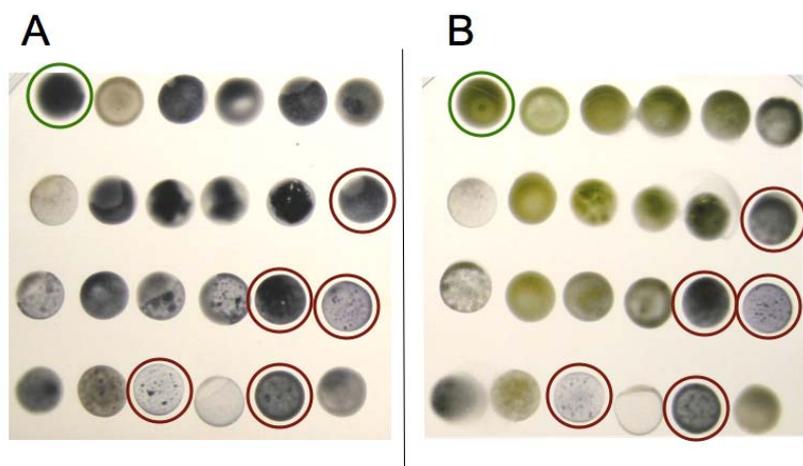


Figure 31 – Crible à l'iode des transformants obtenus après mutagenèse de la souche 137C par le plasmide pSL18.

La boîte de gauche (A) correspond à une incubation des patches cellulaires pendant 5 jours en lumière sur milieu carencé en azote. La boîte de droite (B) correspond aux mêmes souches ayant été incubées une journée supplémentaire à l'obscurité et après levée de la carence. La référence sauvage 137C, encadrée en vert, est placée en haut à gauche de chaque boîte, sa couleur verdâtre sur les boîtes de droite révèle sa capacité à dégrader l'amidon accumulé pendant les 5 jours de carence azotée. Les souches retenues lors de ce second crible de confirmation sont indiquées par un cercle rouge.

Deux campagnes de mutagenèse indépendantes ont été effectuées en transformant la souche sauvage de référence, 137C, par insertion soit du plasmide pSL18 linéarisé par *EcoRI* soit du produit de PCR de 1,9 kb correspondant à la cassette de résistance à la paromomycine afin de découvrir et caractériser les fonctions requises pour la dégradation de l'amidon chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Le plasmide pSL18 se caractérise par la présence d'un gène de résistance à la paromomycine, *APHVIII*, codant une aminoglycoside-3'-phosphotransférase (**Sizova et al., 2001**). Après transformation, nous avons isolé 16 000 souches résistantes à cet antibiotique dont 3 000 par insertion de la cassette seule. L'ensemble des souches résistantes ont fait l'objet du crible à l'iode en deux étapes décrit précédemment (**Figure 31**). Parmi les 16 000 transformants testés, nous avons réussi à identifier 38 souches (31 obtenues par insertion du plasmide et 7 par insertion de la cassette paromomycine) qui possédaient une interaction forte à l'iode après la période d'obscurité et donc potentiellement une capacité amoindrie de dégradation du polysaccharide de réserve. Ces souches ont été appelées « CAT » pour catabolisme de l'amidon. Il est important à noter que, quel que soit le type de mutagenèse, nous avons obtenu le même ratio de mutants : 2 souches mutantes pour 1000 clones résistants à la paromomycine.

Le crible utilisé ne nous permet pas de distinguer les souches mutantes déficientes pour le catabolisme de l'amidon de celles qui surproduisent le polysaccharide de réserve. En effet, un mutant possédant une cinétique altérée de mobilisation reste noir après 24h d'obscurité puisque cette souche n'a pas réussi à dégrader une quantité suffisante du polysaccharide pour que l'interaction avec l'iode s'en trouve amoindrie. Une souche dégradant correctement son amidon, mais qui surproduit le polysaccharide possédera le même phénotype sur boîte puisque la quantité d'amidon présente après 24h de dégradation sera suffisamment importante pour donner une coloration noire à l'iode. Nous avons donc cherché à détecter d'éventuels surproducteurs parmi nos mutants en purifiant et dosant l'amidon produit par ces souches en milieu carencé en azote. La détermination des quantités d'amidon produites par nos souches candidates révèlent l'existence de trois classes phénotypiques dans la banque de mutants. Les différentes classes phénotypiques et les mutants obtenus sont décrits dans l'article ci-dessous intitulé « A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism », publié récemment dans la revue PLOS ONE (**Tunçay et al., 2013**). Cet

article dont le but était de valider notre démarche scientifique et démontrer que le crible phénotypique en deux étapes permettait bien l'isolement de mutants pour des fonctions directement impliquées dans la dégradation de l'amidon. L'identification de mutations pour une β -amylase ou encore pour le transporteur de maltose Mex dans notre banque de mutants prouve que la démarche est valide et représente un outil de choix complémentaire aux démarches de génétique inverse afin d'étudier la voie catabolique du polysaccharide de réserve.

A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism

Hande Tunçay^{1,9}, Justin Findinier^{1,9}, Thierry Duchêne¹, Virginie Cogez¹, Charlotte Cousin^{1,2}, Gilles Peltier³, Steven G. Ball¹, David Dauvillee^{1*}

1 Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR 8576, CNRS- Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France, **2** Institute Micalis UMR1319, INRA, Thiverval-Grignon, France, **3** UMR Biologie Végétale et Microbiologie Environnementale, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues, CEA-CNRS- Aix Marseille Université, Saint-Paul-lez-Durance, France

Abstract

A screen was recently developed to study the mobilization of starch in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. This screen relies on starch synthesis accumulation during nitrogen starvation followed by the supply of nitrogen and the switch to darkness. Hence multiple regulatory networks including those of nutrient starvation, cell cycle control and light to dark transitions are likely to impact the recovery of mutant candidates. In this paper we monitor the specificity of this mutant screen by characterizing the nature of the genes disrupted in the selected mutants. We show that one third of the mutants consisted of strains mutated in genes previously reported to be of paramount importance in starch catabolism such as those encoding β -amylases, the maltose export protein, and branching enzyme I. The other mutants were defective for previously uncharacterized functions some of which are likely to define novel proteins affecting starch mobilization in green algae.

Citation: Tunçay H, Findinier J, Duchêne T, Cogez V, Cousin C, et al. (2013) A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism. PLoS ONE 8(9): e74763. doi:10.1371/journal.pone.0074763

Editor: Miguel A Blazquez, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Spain

Received: June 22, 2013; **Accepted:** August 5, 2013; **Published:** September 3, 2013

Copyright: © 2013 Tunçay et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL) and the Institut Français des Matériaux Agro-Sourcés (IFMAS). PhD grants from the Ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur (HT) and the Région Nord Pas de Calais and the Université des Sciences et technologies de Lille (JF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: David.Dauvillee@univ-lille1.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Starch represents the most widespread storage polysaccharide found in plants and algae. This insoluble polymer of glucose not only defines an essential source of calories for human and animal nutrition but is also used in many non-food applications including but not restricted to biofuel and hydrogen production. Starch is made of two distinct subfractions: the minor amylose fraction is synthesized by a starch granule bound isoform of starch synthase called GBSS (Granule Bound Starch Synthase). Amylopectin, the major fraction, confers to starch most of its physical properties and in particular its insoluble semi-crystalline nature. Even if amylopectin and glycogen share the same primary structure (they are both composed of linear glucose chains linked together through α -1,4 O-glycosidic bonds and branched in α -1,6), the synthesis of these two storage polysaccharides requires a completely different set of enzymes. While bacterial glycogen is synthesized and degraded through the use in most cases of no more than 5–6 activities [1] starch metabolism in green algae and land plants involves more than 30 different enzymes [2]. The high complexity of this metabolic pathway in the green lineage is conserved from the tiniest free-living green alga known to date to maize [2]. Starch is found in the plastids of both photosynthetic and nonphotosynthetic cells. In source organs as leaves it is accumulated during the light period and degraded in the dark to provide substrates for leaf respiration and to supply the plant with

sucrose. Transient starch turnover is crucial for normal plant growth as revealed by the reduced growth rates of mutant plants unable to synthesize or breakdown the polysaccharide [3]. Storage starch found in amyloplasts of stems, roots, seeds and tubers is remobilized to support plant development as seedling establishment after germination [4] or in response to high demand for carbon as for nectar secretion [5].

The starch biosynthetic process has been extensively studied thanks to both reverse and forward genetics approaches. The high number of enzymatic activities involved and the interaction found between them in the same protein complexes [6,7] reveal the high complexity of the anabolic pathway needed to achieve amylopectin biogenesis. It is therefore expected that mobilization of such a molecule would also require a complex catabolic pathway.

Significant progress in our understanding of starch mobilisation has been made mostly in the last decade. It now defines a very active domain of research that essentially concerns diurnal Arabidopsis leaf starch mobilisation (for review, see [8]). One of the most remarkable discoveries consists of the involvement of dikinases as essential actors of starch degradation. These enzymes, glucan water dikinase (GWD; [9]) and phosphoglucan water dikinase (PWD; [10]) were first found as minor proteins bound to starch granules and were subsequently demonstrated to phosphorylate glucose residues of amylopectin crystalline sections during starch breakdown. However, the exact link between this

phosphorylation process and the ability displayed by degradation enzymes to initiate polysaccharide mobilization is not yet fully understood. It has been recently proposed that this phosphorylation opens up the crystalline structure thereby facilitating subsequent hydrolysis [11]. The process is even more complex as specific phosphatases called Sex4 [12], and LSF2 [13] are necessary to achieve efficient starch degradation. Another homologous protein called LSF1 [14] is also necessary for efficient starch breakdown but this protein was not yet proved to contain a phosphatase activity and may act as a regulator. In addition to the initial discovery of GWD, the analyses performed on different T-DNA insertion mutants of *Arabidopsis thaliana* have yielded a working model for the recurring starch degradation occurring in leaves of this model organism [15]. Taken together, the data revealed the importance of exo-amylases (β -amylases; [16]) and a specific type of isoamylase (ISA3; [17]) as major actors of the starch degradation process in *Arabidopsis* leaves at night. Briefly, the starch granule is subjected to phosphorylation/dephosphorylation thereby allowing the action of hydrolytic activities. The maltose produced by β -amylases is then exported to the cytosol via a plastidial maltose transporter MEX1 [18]. In this compartment, a transglucosylation reaction occurs allowing the release of glucose (catalysed by DPE2, [19]). Nevertheless, the catabolic model established in *Arabidopsis* may not represent a consensus of starch mobilization in photosynthetic tissues. It may predominantly reveal a pathway that is active in only a very specific subset of physiological conditions. These may be limited to massive and immediate export of carbon in the leaf cytosol to feed the nonphotosynthetic parts of the plant at night. Moreover, even if reverse genetics was extensively used to raise this model, the most surprising steps were revealed through distinct approaches such as biochemistry for the initial dikinase discovery or forward genetics for the Mex maltose transporter. While α -amylase activities were thought not to participate to starch degradation [20] in *Arabidopsis* leaves, a recent study revealed that the degradation initiated by the glucan phosphorylation process would require the action of three hydrolytic activities including one particular isoform of α -amylase called AMY3 [21]. Hence there is room to better our knowledge of starch catabolism and to expand these studies to organisms which are not only amenable to very productive forward genetic approaches but which in addition would afford for a greater variety of physiological conditions not restricted to the massive carbon export displayed by *Arabidopsis* leaf cells. We therefore believe that the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* which has been by the past intensively used to study starch synthesis [22,23,24,25,26,27] offers a very useful model to deepen our knowledge of starch mobilization. In addition to offering an excellent forward genetics system with straightforward mutant screening procedure, *Chlamydomonas* was also shown to offer a very diverse spectrum of relevant physiological growth conditions [28] thereby mimicking source sink and storage tissues of higher plants to study the impact of diverse mutations.

In this work, we report the production and the preliminary characterization of an insertional mutant bank of the green alga model *Chlamydomonas reinhardtii*. Our goal was to assess the suitability of the phenotypic screening procedure we set up in the green alga model [29] and that was recently used to study the link between starch degradation and hydrogen production [30]. The molecular analyses performed on our mutants allowed us to identify mutations either in enzymes involved in starch degradation *per se* or in putative regulatory functions revealing the importance to combine both reverse and forward genetic approaches to obtain a clear view on starch catabolism in plants

and algae. Our data obtained so far offer valuable information for the community involved in the study of carbon metabolism in plants and reveal potential functions which may define suitable targets to control the catabolic process for bioenergy production purposes. They also not only validate the two step iodine screening procedure as a tool in identifying starch catabolic functions but also reveal the complexity of the physiological processes taking place in the cells as non directly relevant functions may have been identified too. The complete characterization of the most promising mutants including functional complementation and genetic cosegregation analyses will be described elsewhere.

Results

Generation of the insertional mutant libraries and phenotypic screening

Two independent insertional libraries were generated by transforming our *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type reference strain 137C with either the *EcoRI* linearized pSL18 plasmid [31] or with a 1,9 kb PCR product corresponding to the paromomycin cassette (see Methods). Prior to transformation the cell pellets were treated with home-made autolysin to allow the transformation with glass beads. The efficiency of transformation was clearly different as we obtained around 2000 paromomycin resistant clones with 1 μ g of linearized plasmid while less than 100 were observed with the same quantity of PCR products. This difference could be attributed to the limited size of the non-essential region of the foreign DNA which can be used during the integration process and that most of the insertions with PCR products did not confer paromomycin resistance to the algae. With this approach, we generated 3,000 and 13,000 mutants with respectively the PCR cassette and the linearized plasmid which were thereafter screened with iodine to detect the strains defective for starch catabolism.

The natural interaction between iodine and α -1,4-linked-glucans has been used extensively to study starch anabolism in *Chlamydomonas* [26]. However, as a *Chlamydomonas* strain contains enough starch to appear black while subjected to iodine vapors, the screening procedure has to be modified in order to detect strains which are potentially containing more polysaccharide than a wild-type. Two successive steps were then used to detect the strains in which the insertion has modified either the amount of polysaccharide or produce a defect in the rate of starch mobilization. In a first step, cells were spotted in duplicate on nitrogen free TAP plates and incubated for 5 days under continuous light to trigger massive starch deposition. For one of the plates, the starvation was removed after this incubation by applying 10 μ L of 0,15 M ammonium chloride and incubated in total darkness for one more day. Both plates were then subjected to iodine vapors and immediately photographed. During the incubation in the dark, a strain competent for starch mobilization will be able to degrade nearly all its storage polysaccharide and will then lose its black stain with iodine (Figure 1). A strain which is defective for starch degradation or which contained much more polysaccharide than a wild-type before the transition to darkness will remain black revealing the presence of residual starch. The figure 1 is illustrating the phenotype of the wild-type strain 137C and of 9 mutants that have been selected as putative starch catabolic mutants after a confirmation round of screening. In total, we selected 31 strains displaying a clear black phenotype after 24 h of degradation (that we named CAT1 to CAT31) from our plasmid insertional mutagenesis procedures and 7 generated with the PCR product (called CAT32 to CAT38). The same ratio of starch catabolic mutant was then observed for both foreign DNA used in this study (1 mutant for 428 resistant clones with the PCR

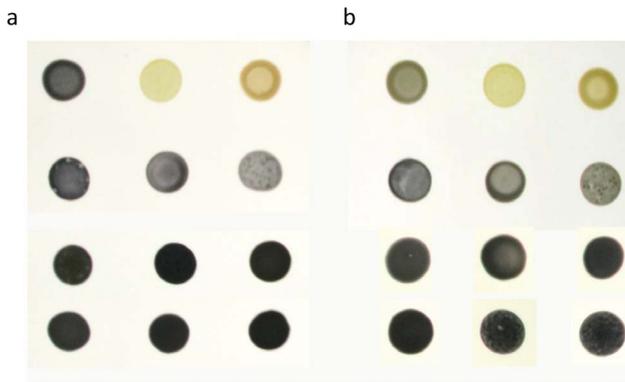


Figure 1. Two step iodine screen of putative starch catabolic mutants. Cell patches of the wild-type strain 137C, two mutant strains defective for starch biosynthesis and of the three mutant classes are displayed after staining with iodine vapors. The cells were incubated 5 days under nitrogen starvation in the light (a) or one more day in the dark after the removal of the starvation (b). The wild-type reference 137C, the BafJ4 mutant strain lacking starch and the BafR1 mutant producing only amylopectin are shown at the top while the CAT1, 6, and 9 (second lane); the CAT17, 21, and 23 (third lane); the CAT 3, 19, and 22 (fourth lane) represent respectively mutants of the three classes. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g001

product and 1 for 483 with the linearized plasmid). All these mutants were then subjected to biochemical characterizations in order to determine which of the candidates identify *bona fide* starch catabolism mutants

Biochemical characterizations of the CAT mutants

Starches accumulated by each of the CAT mutants were assayed after 5 days in liquid TAP-N medium under constant light. The amounts of storage polysaccharide accumulated in all these strains are displayed in figures 2a, 3a and 4a as percentages of the amount assayed in the wild-type. We were expecting that most of our selected mutants would have displayed a starch excess phenotype. This is clearly not the case as 16 of them contain between 64 to 119% of the wild-type value (the wild-type strain 137C contains 21 ± 4 μg of starch per million cells in our standard nitrogen starvation conditions). Fifteen CAT mutants contain a significant higher amount of starch under nitrogen starvation (ranging from 124% to 205%) and only 7 display a clear starch excess phenotype containing more than twice the amount of polysaccharide accumulated by the parental strain (from 233% to 468%). In parallel, we examined the kinetics of starch degradation in each of our strains in liquid cultures. Each strain was used to inoculate one liter of TAP-N liquid medium and grown for 5 days under continuous light. The cells were then transferred to TMP medium (without acetate) and aliquots of the culture were incubated in the dark for 4, 8 and 24 hours. For each time, starch was extracted and assayed in order to determine the amount of polysaccharide broken down. The amounts of residual starch after 24 hours of degradation are displayed in figures 2b, 3b and 4b while the complete kinetics can be found in figure S1. These kinetics experiments allowed us to identify three phenotypic classes in our mutant bank. The first group consisted in strains as efficient as the wild-type with respect to starch mobilization. In fact, after 24 hours darkness, the wild-type 137C strain still contained $28 \pm 7\%$ of its initial starch amount as did 12 of our mutants (figure 2b). Those strains which initially displayed a clear and confirmed phenotype during the 2 step screening procedure should be then either considered as false positives or as mutants

with conditional defects due to different behavior on solid and liquid medium. However, one of them called CAT37 did display a slow rate of starch mobilization during the first 8 hours of the kinetics and may represent a mutant in the signalization process (figure S1a). The second class of mutants displayed a confirmed unconditional defect in starch mobilization. These 13 strains (figure 3b) contain more residual starch than the wild-type after 24 h of degradation (from 35 to 49% of the initial amount while 137C contains 28%). Finally, the most defective strains (figure 4b) define the third class of mutants in which 13 strains harbor a strong starch degradation defect as they still contained between 56 to 97% of their initial amount of starch after 1 day in darkness. It is of prime importance to notice that for each class of mutants we observed strains containing completely different amounts of starch. Even for the most affected strains, some did contain less starch than the wild-type at the end of the starvation phase. This is clearly the case for example for strains CAT13, CAT34 and CAT35 which accumulate respectively 67, 86 and 73% of the wild-type starch amount but are still unable to degrade their polysaccharides as they still contain 81, 56, and 89% of this starch after 24 h in TMP in the dark while 137C was able to catabolize two thirds of its initial amount in the same time. This result and the fact that strains that seem to degrade efficiently while overaccumulating starch (CAT30 for example, figure 2a) reveal that there is not an obligate link between a starch excess phenotype and a defect in starch catabolism. However, the highest starch excess phenotypes are still found in the class 3 mutants corresponding to those strains which are the most impaired in starch mobilization (figure 4).

Despite that we did not expect mutants impaired in starch degradation to yield a structurally modified polysaccharide, we nevertheless analyzed on CL-2B gel permeation chromatography the amylopectin/amylose ratio and the amylopectin λ_{max} which reflects the structure of this storage polysaccharide component in our CAT mutants (figure 5). The wild-type strain 137C produces a starch composed of 20% of amylose and 80% of amylopectin with a λ_{max} of 550 nm for the latter (Figure 5a). Two of our mutants did harbor significant differences concerning either the amylopectin/amylose ratio or the amylopectin structure. CAT17 produced a starch containing a high λ_{max} amylopectin at 567 nm (Figure 5b) compared to the 552 nm recorded for the wild-type. This increase in λ_{max} is surprisingly not correlated with an amylose enrichment as is usually recorded when amylopectin synthesis is impaired (29% compared to 23% in 137C). On the other hand, the CAT31 starch displayed a high amount of amylose as this component represents 41% of the polysaccharide produced by this strain (figure 5c). In this mutant, the amylopectin structure appears unchanged (λ_{max} 553 nm). At this stage, it seems difficult to explain these modifications and further investigations on these two strains are required to explain the observed phenotypes.

In parallel, we tested the presence of the complete set of hydrolytic activities which are easily visualized thanks to our zymogram techniques in such mutants. In fact, some of our mutants may be defective for an enzymatic activity which is required for starch catabolism and zymograms may allow us to quickly ascertain the absence of one of them. In one of our mutants (CAT16), an activity producing a pink band on denaturing starch containing zymograms is lacking (figure 6a, left panel). This phenotype was confirmed on starch containing zymograms performed under native (non denaturing) conditions (figure 6a, right panel). This pink/red staining of the missing activity in CAT16 is characteristic of an increase in the amount of branches in the starch contained as substrate in the gel. Two kinds of activities can be responsible of such a modification. Branching enzyme will catalyze the introduction of new α -1,6 linked chains in

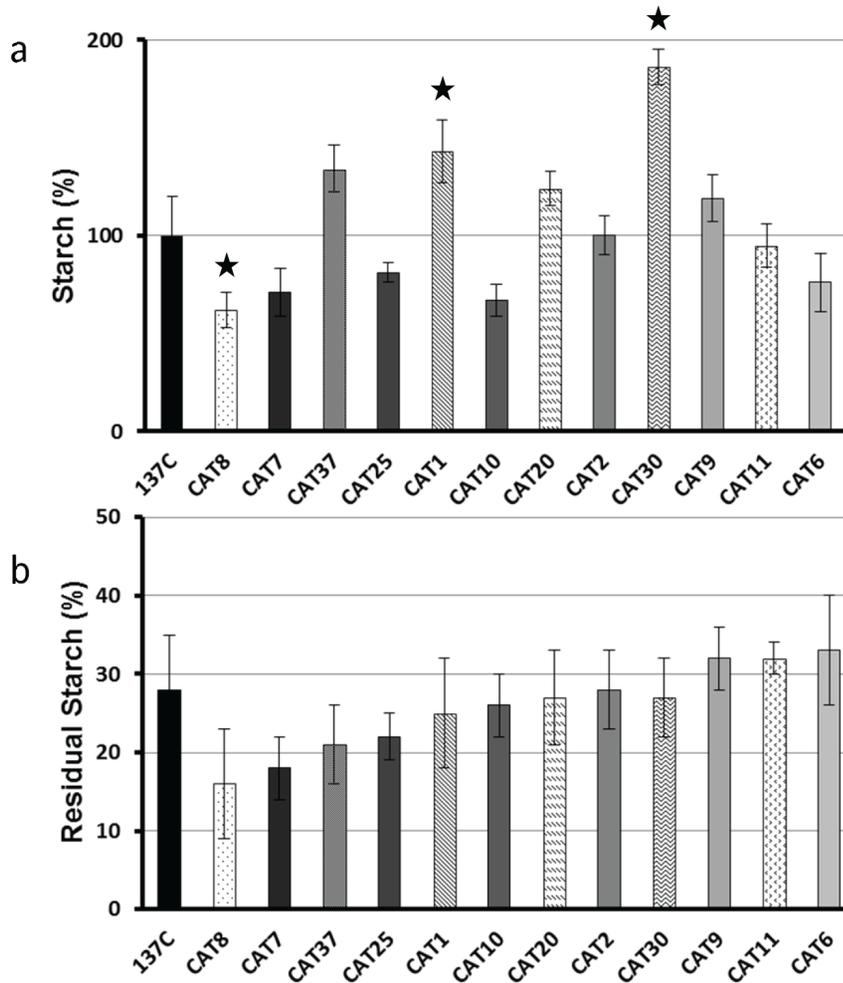


Figure 2. Starch deposition and kinetics of starch mobilization in class 1 mutants. The amount of starch assayed in the strains after 5 days under nitrogen starvation (a) is displayed as a percentage of the value assayed in the wild-type reference strain 137C ($21 \pm 4 \mu\text{g}$ per million cells) cultivated under the same conditions. The amount of starch remaining after 1 day of degradation of the same strains (b) is represented as the percentage of the initial amount measured in the corresponding strain. All data correspond to mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g002

the polysaccharide matrix and β -amylases by shortening the outer chains of starch will produce a so-called beta-limit dextrin which is enriched in branching points compared to the initial substrate found in the gel. To determine the nature of the missing activity in our mutant, we semi purified this activity and determined its precise nature as described below.

Molecular characterizations of the CAT mutants

In order to confirm the validity of our screening procedure, the mutants displaying a possible defect in starch mobilization (i.e. chiefly the class 2 and 3 mutants) were analyzed through molecular techniques in order to identify the genomic sequences of those regions flanking the insertions. Different strategies including plasmid rescue, inverse PCR and TAIL-PCR were attempted. Even if our efforts resulted in limited success, we were still able to determine in a few of our mutants the identity of the genes disrupted by the exogenous DNA. A summary of the genes identified and of the techniques used for the identification is listed in table 1. We were able to find in our mutant bank several insertions in genes which encoded enzymes previously reported as involved in starch catabolism. This is the case for the CAT3

mutant which is disrupted in a gene encoding the MEX transporter previously characterized in Arabidopsis [18]. We were also able to identify a disruption in a catalytic isoform of β -amylase (CAT4) which had been described as a major component of the transient starch degradation machinery in Arabidopsis [16]. Two additional mutants can be suspected to be defective for components of the catabolic machinery even if these functions had not yet been reported as such. This is the case for the CAT33 mutant which carries a disruption for a protein of unknown function but which contains a CBM20 starch binding module. A disruption in an oligosaccharyl transferase was also detected in CAT37 and may also represent a yet undescribed enzymatic function required for efficient starch degradation. In 4 of our mutants, we were able to identify the integration sites in different kinase activities (table 1). If the link between the starch defect and the absence of these kinase activities should be confirmed, it may unravel precious information concerning the regulation of starch catabolism. However, the phenotype on starch catabolism could also reflect indirect consequences of the absence of a kinase activity since such mutants are known to yield numerous pleiotropic effects. Finally, we detected a defect in a gene described as encoding a flagellar/

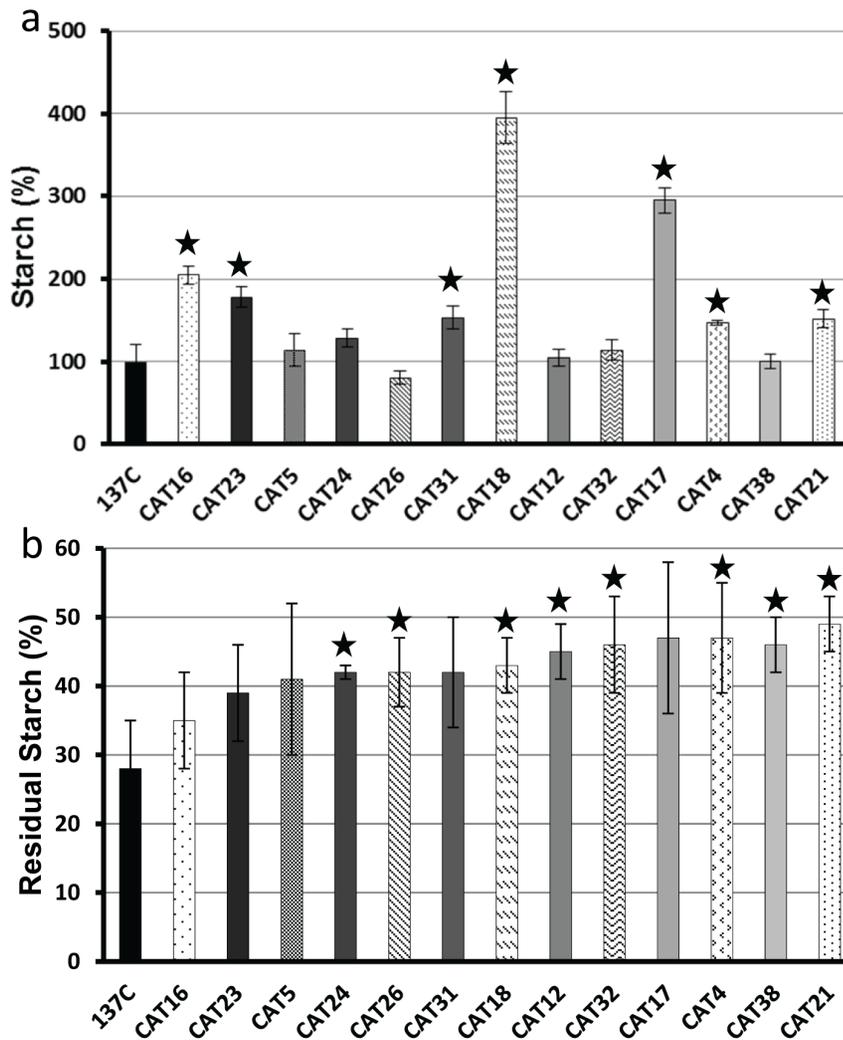


Figure 3. Starch deposition and kinetics of starch mobilization in class 2 mutants. The amount of starch assayed in the strains after 5 days under nitrogen starvation (a) is displayed as a percentage of the value assayed in the wild-type reference strain 137C ($21 \pm 4 \mu\text{g}$ per million cells) cultivated under the same conditions. The amount of starch remaining after 1 day of degradation of the same strains (b) is represented as the percentage of the initial amount measured in the corresponding strain. All data correspond to mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g003

basal body protein which could explain the starch excess phenotype found in the CAT22 mutant as motility has been previously reported to impact starch accumulation [32]. Moreover, we started backcrosses and genetic analyses of our mutants in order to check the co-segregation between the disruption and the observed phenotype. The complete genetic and biochemical characterization of some of them will be described elsewhere.

In this work, we decided to focus on the CAT16 mutant which is the only one in our bank for which we detected a clear enzymatic defect through zymograms.

The CAT16 mutant is defective for starch branching enzyme 1 and displays a starch catabolism defect

A crude extract from the wild-type strain 137C was used to semi-purify the activity missing in the CAT16 mutant (figure 6a). The wild-type extract was subjected to affinity chromatography on an amylose resin and the bounded proteins were eluted with purification buffer containing increasing amount of malto-oligosaccharides (MOS). Each elution fraction was tested on starch

containing zymograms in order to detect fractions containing the pink band forming activity free of any other hydrolytic activity. In 3 elution fractions (E1 to E3 in figure 6b which corresponds to the 3 consecutive elution with the buffer containing 0,5 mg/mL MOS) only the pink band which is missing in CAT16 could be detected on the gel while the next elutions are all contaminated with hydrolytic activities giving a white band on the gel that we already characterized as α -amylase [27]. These fractions were then used to determine the nature of the enzyme activity. To do so, 300 μL of the three fractions were incubated 2 hours in the presence of potato amylose at 30°C. The modified amylose was then stained with iodine (see methods). If the missing activity detected in the CAT16 mutant is of the beta-amylase type, then during the incubation the amylose should be entirely degraded and no interaction with iodine should be recorded. In the case of a branching enzyme activity the greenish color due to the interaction of the long amylose chains with iodine should disappear and a pink to red staining should appear due to the appearance of new branching points. In this case, the λ_{max} of the

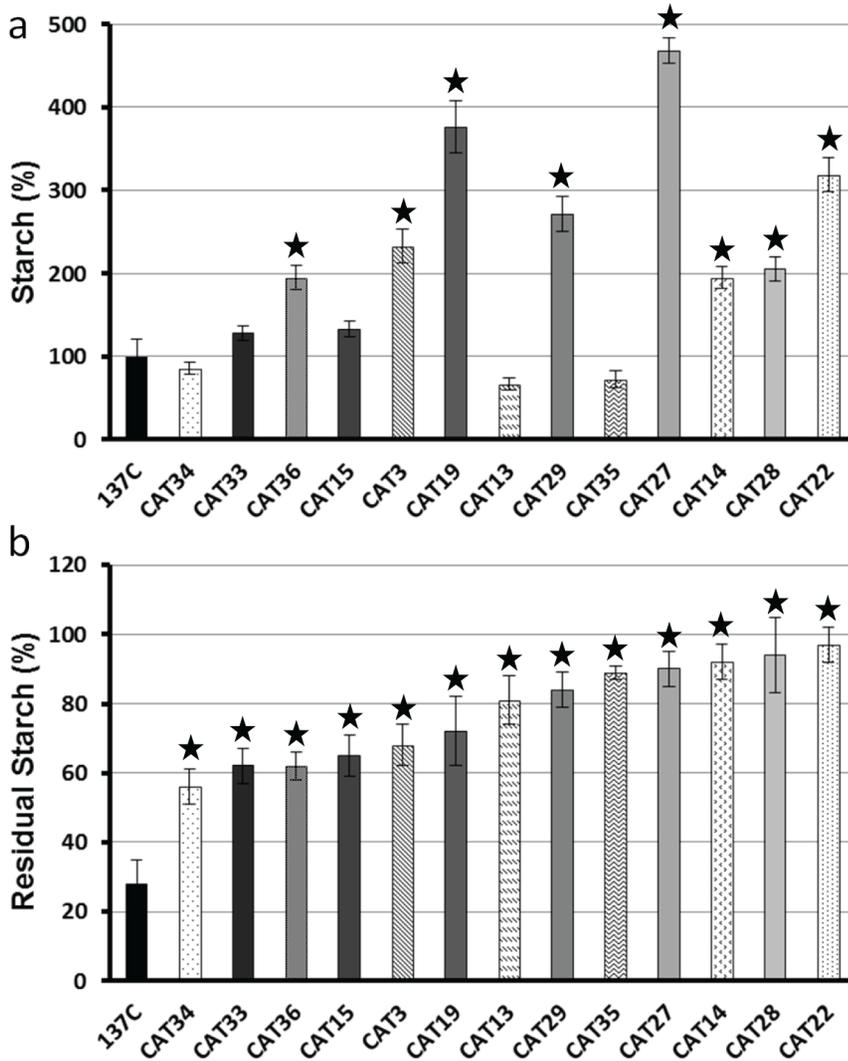


Figure 4. Starch deposition and kinetics of starch mobilization in class 3 mutants. The amount of starch assayed in the strains after 5 days under nitrogen starvation (a) is displayed as a percentage of the value assayed in the wild-type reference strain 137C ($21 \pm 4 \mu\text{g}$ per million cells) cultivated under the same conditions. The amount of starch remaining after 1 day of degradation of the same strains (b) is represented as the percentage of the initial amount measured in the corresponding strain. All data correspond to mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g004

iodine/polysaccharide complex should decrease due to the reduction in length of the glucose chains [33]. No interaction can be recorded between iodine and the purification buffer used alone (figure 6C, lane 1). A clear interaction of amylose and iodine prior to incubation is observed as revealed by a greenish color with a typical λ_{max} of 643 nm due to the long chains composing the polysaccharide (figure 6C, lane 2). In the presence of 0,5 mg/mL MOS, the λ_{max} of the amylose/iodine complex decreases but remains high at 602 nm showing a light interaction with the glucans that were used to elute the enzymatic activity (figure 6C, lane 3). After incubation with the “pink band” producing activity, the iodine interaction was completely changed as the color switched from green to red and the λ_{max} drastically decreased with values around 480 nm (figure 6C, lanes 4, 5 and 6). This modification reveals that the semi purified activity which is lacking in CAT16 is a branching enzyme activity. To ensure this modification was really due to the “pink band” detected on zymograms, the same purification procedure was used on a crude

extract of the CAT16 mutant strain which is lacking this activity (figure S2). As expected, no activity was detected in the elution fractions (figure S2B) and after incubation of these fractions with amylose, no modification of the polysaccharide was detected (figure S2C) revealing the link between the “pink/red” producing enzyme and the branching enzyme activity. As the *Chlamydomonas* genome contains three kind of branching enzymes, we tried to determine which one was missing in our mutant and if this absence was due to the insertion of the mutagenesis plasmid in the structural gene encoding the enzyme. We then designed three primers couples to amplify a part of the three branching enzyme structural genes from the CAT16 genomic DNA. We were able to amplify a fragment of *BE2a* and *BE2b* structural genes in both 137C and CAT16 while no amplification was obtained with the mutant with the primers designed to amplify a part of the *BE1* gene (figure 7a). As insertional mutagenesis in *Chlamydomonas* is known to cause deletions, the lack of amplification is a strong argument in favor of an insertion of pSL18 into the *BE1* structural

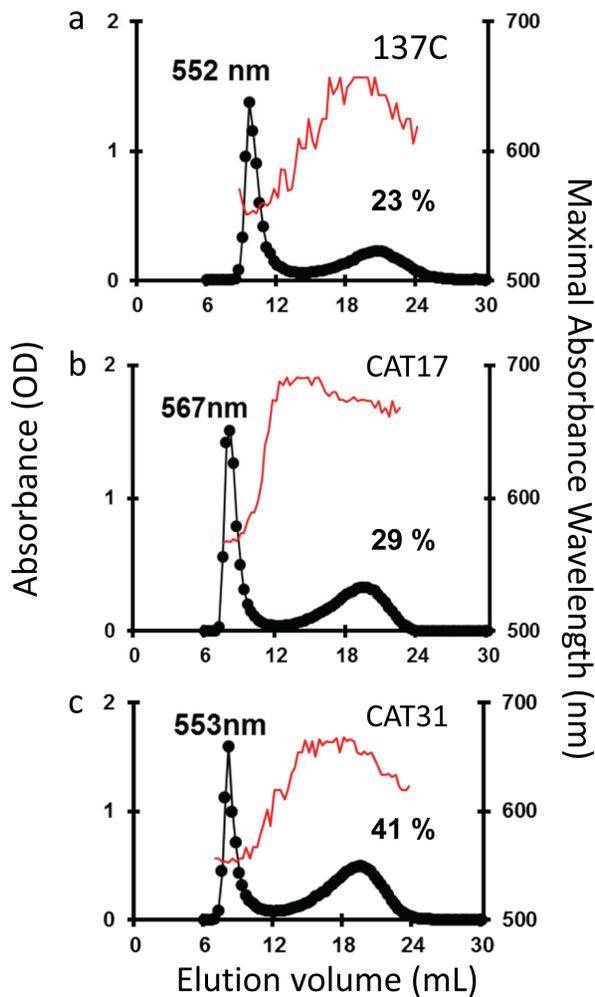


Figure 5. Separation of amylopectin and amylose by CL2B Sepharose chromatography. The optical density (●) was measured for each 0.3-mL fraction at λ_{max} (unbroken thin line). All samples were loaded on the same column setup described by [25]. The wild-type haploid 137C strain starch extracted from nitrogen starved cultures (a) displays both amylopectin and low-molecular weight amylose. Starches from the mutant strains CAT17 and CAT31 are represented in b and c respectively. The amount of amylose (%) and the amylopectin λ_{max} in nanometers are displayed on the corresponding graphs. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g005

gene. We then tested through RT-PCR the expression of the *BE1* gene. As expected, we were not able to amplify a part of the *BE1* cDNA when using the RNAs extracted from the mutant (figure 7b). These preliminary results may argue in favor of an unsuspected role of branching enzyme 1 in starch catabolism in *Chlamydomonas*.

Discussion

While the iodine vapors staining of cell patches has been proved to be an efficient way to selectively detect algal mutants affected in starch biosynthesis and (or) starch structure [26]; the use of this natural interaction had to be tested with respect to starch catabolism. A two-step procedure consisting of the staining of *Chlamydomonas* cell patches with iodine after massive starch accumulation under the light and a duplicate which is incubated one more day in darkness to trigger degradation was recently used

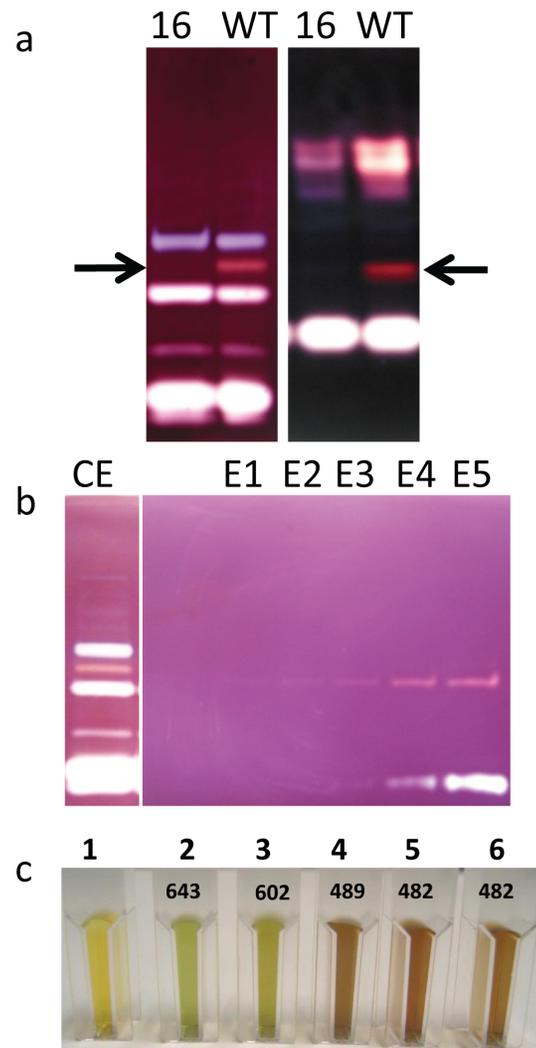


Figure 6. Partial purification of branching enzyme 1 activity. The enzymatic defect in the CAT 16 mutant can be observed through the lack of a pink or a red band (enlightened by arrows) on native (a; left panel) and denaturing (a; right panel) starch zymograms respectively. The lack of contaminating activities in the first elution fractions (E1 to E3) of the amylose column chromatography was assessed on starch denaturing zymogram (b). (c) Interaction of polysaccharides with iodine. Samples 1 to 6 correspond respectively to the iodine alone (1), the interaction of the latter with the unmodified amylose in the absence (2) or in the presence of the MOS in elution buffer (3). The iodine interaction of the polysaccharide modified by the enzyme contained in the 3 elution fractions are displayed in 4, 5 and 6. The values of the λ_{max} of each complex is indicated on the figure in nanometers. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g006

to produce mutants and study the link between polysaccharide degradation and photosystem II-independent hydrogen bioproduction [30]. However, in this study, the mutations were not characterized and it appeared important to ascertain that true starch catabolic mutants could be obtained through this screening procedure. Several physiological processes suspected to be highly regulated impact the amount of polysaccharide remaining after incubation in darkness during the phenotypic screening procedure. First, the cells are incubated 5 days on solid medium without nitrogen which triggers starch deposition. Depending of the strain genotype, the amount of storage polysaccharide accumulated can be different from strain to strain and thereby affect the intensity of

Table 1. List of mutants whose molecular nature was identified through molecular or biochemical techniques.

Strain	Origin	Identification Technique	Insertion (Phytozome v9.0)
CAT3	Plasmid	Inverse (T1&T2) <i>BssHII</i>	Cre12.g486600, Maltose exporter-like protein
CAT4	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>BssHII</i>	Cre06.g307150, Beta-amylase
CAT16	Plasmid	Zymograms	Cre06.g289850, Branching enzyme 1
CAT33	PCR	TAIL	Cre02.g091750, CBM20 Starch Binding Domain containing protein
CAT37	PCR	TAIL	Cre07.g330100, Oligosaccharyl transferase STT3 subunit
CAT15	Plasmid	Plasmid rescue <i>Apal</i>	Cre16.g689550, Putative tyrosine kinase
CAT24	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>EaeI</i>	Cre06.g307100, ABC1/COQ8 Ser/Thr kinase
CAT26	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>BsrBI</i>	Cre02.g107000, Putative protein Kinase
CAT14	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>BssHII</i>	Cre06.g266150, Putative kinase
CAT22	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>BssHII</i>	Cre07.g338300, Putative flagellar/basal body protein

doi:10.1371/journal.pone.0074763.t001

the stains. New signals have to be integrated by the cells when

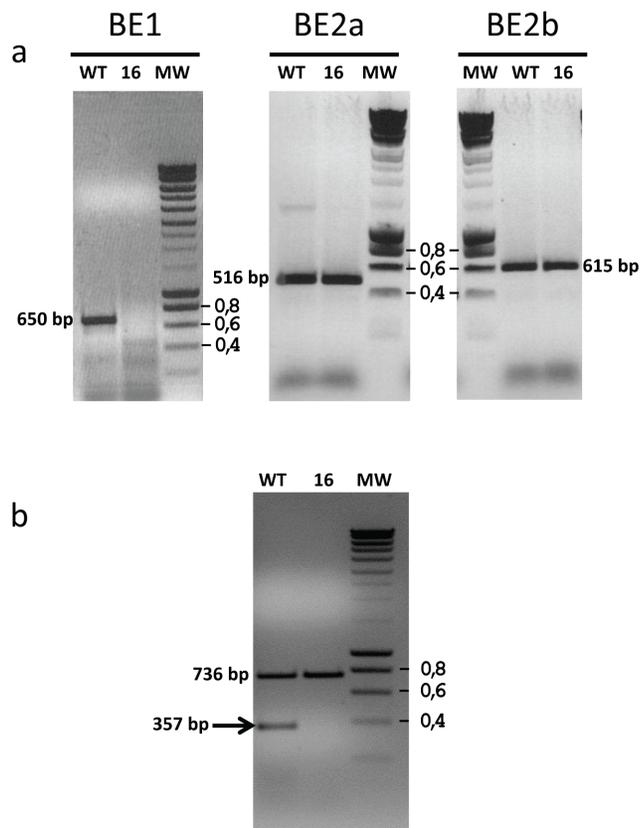


Figure 7. Molecular characterization of the CAT 16 mutant. (a) Amplification of a part of each of the three branching enzyme structural genes was performed on genomic DNA extracted from the wild-type reference 137C (WT) and from the mutant (16). The amplification products sizes for the *BE1*, *BE2a* and *BE2b* structural genes were 650, 516 and 615 bp respectively. (b) RT-PCR analysis performed on total RNAs extracted from the wild-type and the CAT16 mutant allowing the amplification of a 736 bp fragment of the *PHOB* structural gene and a 357 bp fragment of the *BE1* structural gene (indicated by an arrow). Smart ladder (Eurogentec) was used as molecular weight marker (MW), the standard fragments corresponding to 0.4, 0.6 and 0.8 kbp are indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0074763.g007

starvation is removed and cell patches transferred to darkness. At this stage again, a high amount of residual starch which will impact the stain intensity can reflect not only the presence of a defect for a starch catabolic function but also any mutation influencing the complex machinery responsible for the detection of either the switch to darkness or the starvation status and the equally complex signaling cascades. We then decided to conduct an insertional mutagenesis assay in *Chlamydomonas* in order to ensure that true starch catabolic mutants could indeed be recovered. Our major goal in this work was then to ascertain that we could recover mutations in genes previously reported or suspected to be selectively involved in starch mobilization. In this case, the effectiveness and at least partial selectivity of the screening procedure would be confirmed thereby allowing a certain level of confidence for the discovery of unsuspected functions.

From 16,000 paromomycin resistant colonies obtained after insertional mutagenesis (13,000 with the linearized pSL18 plasmid and 3,000 with a PCR product corresponding to the resistance cassette) we were able to isolate 38 independent strains which harbor a clear defect for starch mobilization with the two-step iodine screening procedure. Through kinetics of starch mobilization, we were able to show that 12 of these 38 mutants do degrade starch with the same efficiency as the wild-type. Those strains may be either false positive or strains in which the efficiency of starch degradation is not the same on solid and liquid medium. The 26 other mutants were all less effective than the wild-type with respect to starch mobilization and define two different phenotypic classes. The so-called class 2 mutants display a mild phenotype but with a significant starch degradation impairment as these 13 mutants still contain between 35 to 49% of their initial polysaccharide amounts after 1 day of degradation compared to the 28% recorded for the isogenic wild-type. The most defective strains were found in the class 3 for which 13 mutants still contain from 56 to 97% of the initial polysaccharide amounts assayed before degradation. It is worth noting that starch over accumulation and impairment in starch degradation were not linearly linked as overproducers are found in the mutants of class 1 (the one degrading starch with good efficiency) while even in class 3 mutants containing the mutants the most dramatically impaired for starch degradation, some of the strains accumulated nearly wild-type amounts of polysaccharide. These results may reflect the high complexity of the process involved in the regulation of starch deposition and catabolism in *Chlamydomonas*.

For the 26 strains for which a real defect for starch degradation was confirmed thanks to the kinetics of polysaccharide mobilization in liquid cultures, we used several strategies including the starch structure determination, visualization of the starch hydrolytic activities through the use of zymograms and molecular techniques in order to identify the missing function responsible for the catabolic phenotype.

Even if a defect in starch catabolism is not expected to lead to a modification of starch structure, two of our mutants displayed modification either in the amylopectin/amylose ratio or in the amylopectin structure. The CAT31 mutant contains a high amount of amylose as this starch subfraction represents 41% of the total polysaccharide for only 23% in the wild-type. This increase in amylose is not accompanied by a strong modification of amylopectin which displays the classical λ_{\max} value around 550 nm. At the opposite, the CAT17 mutant produces a modified amylopectin with a high λ_{\max} at 567 nm but no amylose increase in this polysaccharide can be recorded. As for now, it is difficult to explain these modifications and the link between the modified structure and the defect in starch degradation cannot be easily explained. The identification of the disrupted functions in these strains will possibly yield some understanding on the reasons for these observations.

The molecular experiments including plasmid rescue, inverse PCR and TAIL PCR allowed us to identify several candidates which still need to be validated as responsible of the starch degradation defects. Nevertheless, the detection of a copy of the mutagenesis plasmid in the structural genes encoding the maltose transporter Mex (CAT3) or an isoform of β -amylase (CAT4), both functions already demonstrated to impact efficient starch mobilization, are encouraging with respect to the specificity of our mutant screen. Several disrupted functions which may be related to polysaccharide metabolism were also identified as a starch binding domain containing protein in CAT 33 or an oligosaccharyl transferase in CAT 37. Such oligosaccharyl transferase are known to be involved in protein N-glycosylation in the ER lumen [34]. The effect on starch catabolism if really linked to this insertion may reflect a consequence of the malfunction of important proteins involved in starch catabolism or also be related to the building in a direct or indirect manner of the heteroglycan which plays a central role in maltose breakdown in the cytosol [35]. Four independent insertions in structural genes encoding kinase activities were also recorded in the CAT14, 15, 24 and 26 mutants. However, at this stage we are not sure these mutations are directly responsible for the slower starch degradation observed in these strains.

One single mutation was identified through the use of zymogram techniques allowing visualization of hydrolytic activities. The missing activity in the CAT 16 mutant was identified as a branching enzyme activity. The molecular characterizations allowed us to prove that this strain was defective for branching enzyme 1, an enzyme for which no function in starch metabolism has been reported so far. A recent study performed in maize revealed a slight modification of starch structure in this homologous mutant [36]. The endosperm starch produced by the *shel1a* mutant was more resistant to α -amylase digestion. During kernel germination, shorter coleoptile lengths and higher residual starch were recorded leading to the hypothesis that less efficient starch utilization was taking place in this mutant. However, at this stage a role of branching enzyme 1 in starch catabolism in *Chlamydomonas* can only be suggested as this and the other mutants reported in this work have to go through a more detailed and comprehensive characterization. Nevertheless, the recovery of such a “mild” defect in starch catabolism suggests that the iodine

screening procedure in *Chlamydomonas* is quite sensitive and effective in this respect.

The discovery of mutants for Mex or β -amylase which are already known as important starch degradation enzymes reveals the two step iodine phenotypic screen as an efficient tool to isolate novel starch catabolic mutants. We believe that the sensitivity of this mutant screening procedure and the physiological plasticity of the *Chlamydomonas* model will enable this system to bring further light into the complex machinery responsible for starch mobilization in green plants and algae.

Methods

Chlamydomonas reinhardtii Strains, Growth Conditions, and Media

The wild-type reference *C. reinhardtii* strains used in this study were 137C (*mt- nit1 nit2*) and 37 (*mt+ ac14 pab2*). All experiments were carried out in continuous light (40 mE m⁻² s⁻¹) in the presence of acetate at 24°C in liquid cultures that were shaken without air or CO₂ bubbling. Late-log phase cultures were inoculated at 10⁵ cells mL⁻¹ and harvested at 2–3.10⁶ cells mL⁻¹. Nitrogen-starved cultures were inoculated at 5.10⁵ cells mL⁻¹ and were harvested after 5 days at a final density of 1 to 2.10⁶ cells mL⁻¹. Recipes for media can be found in [37]. For starch degradation kinetics experiments, the cells harvested after 5 days under nitrogen starvation were collected in sterile conditions and transferred in TMP (TAP medium without acetate; [37]) liquid medium and incubated in the dark for 4, 8 and 24 hours. Starch was purified from these samples and the amount of remaining polysaccharide was assayed and compared to the initial starch amount assayed before the switch to darkness.

Determination of Starch Levels, Starch Purification, and Spectral Properties of the Iodine-Starch Complex

A full account of amyloglucosidase assays, starch purification on Percoll gradient, separation of amylose and amylopectin on CL-2B gel permeation chromatography and λ_{\max} (maximal absorbance wavelength of the iodine polysaccharide complex) measures can be found in [25].

Generation of the Mutant Library

The wild-type *Chlamydomonas* reference strain 137C was transformed with either *EcoRI* linearized pSL18 vector [31] which carries the *AphVIII* gene (aminoglycoside 3'-phosphotransferase from *Streptomyces rimosus*) conferring resistance to paromomycin, or with a 1,9 kb PCR product of this plasmid corresponding to the resistance cassette in order to produce transformants according to the protocol described in [38]. The paromomycin cassette was amplified from the pSL18 plasmid with the primers ParoF (5'-ACCATGATTACGCCAAGCGCGCAA-3') and ParoR (5'-CTCGACATGCGTTCACCTCCTGTC-3') using Dynazyme Ext (Finnzymes, Espoo, FI) following the manufacturer recommendation with an annealing temperature at 55°C and an extension time of 2 minutes for 30 cycles.

After transformation, cells were plated on paromomycin supplemented TAP (10 mg/l) plates for the selection of transformant lines.

Iodine screening of putative starch catabolism mutants

The putative catabolic mutants were screened on the basis of their iodine/starch interaction which reflects the amount of polysaccharide in the cells. Cellular patches (20 μ L) of the wild-type reference strain 137C, the already characterized mutants

Table 2. TAIL-PCR and inverse PCR cycling parameters used to isolate flanking DNA from insertional mutants.

TAIL PCR			
Reaction	Step	Thermal settings	N° of cycles
Primary	1	93°C, 2 min; 95°C, 1 min	1
	2	94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min	7
	3	94°C, 1 min; 25°C, 1 min; ramping to 72°C over 3 min; 72°C, 2.5 min	1
	4	94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min; 94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min; 94°C, 30 s; 48°C, 1 min; 72°C, 3 min	15
	5	72°C, 5 min	1
Secondary	1	94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min; 94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min; 94°C, 30 s; 44°C, 1 min; 72°C, 3 min	15
	2	72°C, 5 min	1
Tertiary	1	94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 3 min	30
	2	72°C, 5 min	
INVERSE PCR			
	Step	Thermal Settings	N° of cycles
	1	95°C, 1 min	1
	2	95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 3 min	30
	3	72°C, 10 min	1

doi:10.1371/journal.pone.0074763.t002

BafJ4 [27] and BafR1 [25] which are respectively defective for isoamylase and granule-bound starch synthase and of putative mutants were incubated on nitrogen free solid medium (TAP-N) for 5 days under continuous light in duplicate. Ten microliters of 0.15 M ammonium chloride were added to each spot of one of the two plates and these Petri dishes were incubated 24 hours in complete darkness in order to trigger starch degradation. Both control and test dishes were exposed to iodine vapor and photographed.

Zymograms, Partial Purification and characterization of branching enzyme activity

Zymograms in starch containing gels allowing the detection of most starch hydrolases and branching enzymes have been described for both undenatured samples [39] and for denatured enzymes [27]. The semi-purification of the activity generating the pink/red staining band on starch-containing zymograms was performed from 1 liter of exponential phase TAP culture of the reference strain 137C. Algae were disrupted by sonication in purification buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5; 10 mM EDTA; 8 mM DTT). Twenty five mg of total proteins were incubated with an amylose affinity resin (New England Biolabs, Ipswich, MA) for 10 minutes at 4°C. The affinity resin was then washed 3 times with 5 mL of purification buffer and bound proteins were eluted with 3 times one mL of buffer containing increasing concentrations of malto-oligosaccharides (0.5, 1, 2, 5 and 10 mg/mL MOS in purification buffer). Fifty microliters of each elution fraction were subjected to zymogram analysis to detect the elution fractions free of interfering activities (i.e. containing only the pink band). These fractions (300 µL) were incubated for 2 hours at 30°C in the presence of 1 mg of potato amylose (Sigma, St. Louis, MO). The polysaccharides were then collected by ethanol precipitation (1.2 mL 100% ethanol; 13000 g 10 min., 4°C). The dried pellets were then resuspended in 100 µL of 10 mM NaOH and the interaction with iodine was assessed by adding 200 µL of Lugol

reagent (0.01% I₂; 0.1% KI) and 700 µL of distilled water. The absorbance was measured every nanometer between 400 and 700 nm to determine the wavelength of the maximal absorbance of the iodine-polysaccharide complex (λ_{max}) which reflects the polysaccharide structure.

Nucleic acid Techniques

Total RNA was extracted from *Chlamydomonas* according to Merendino et al., 2003[40]. RT-PCR analysis was performed on 1 µg of total RNA using the One Step RT-PCR Kit (Qiagen) following the manufacturer recommendation. Amplification was achieved with an annealing temperature of 60°C in the presence of Q-solution with the 4 following primers. The BE1RT5 (5'-GAGAGTCACGACCAGGCTCTG-3') and BE1RT3 (5'-GAAGCCGTAGTGGTTGTCGAG-3') allow the amplification of a 357 bp fragment of *BE1* mRNA while PhoBRT5 (5'-GCATGTTCCGCCAGACCA-3') and PhoBRT3 (5'-TGCAG-GAAGCGCCAGTTGA-3') primers are used to amplify a 736 bp fragment of the *PhoB* mRNA used as an internal control. PCR products [23] were resolved in 2% (w/v) agarose gels.

Total DNA from wild-type and mutant strains was extracted as previously described [41].

The integrity of branching enzymes genes was checked by amplifying parts of the corresponding DNA with Dynazyme Ext (Finnzymes, Espoo, FI) following the manufacturer recommendation with an annealing temperature of 60°C and an extension time of 1 minute for 30 cycles. A 650 bp genomic DNA fragment corresponding to *BE1* (XM_001695339) was amplified in the reference wild-type using the BE1 FOR5 (5'-ATGGCTGC-GAGGCCGCTTCAG-3') and BE1 REV3 (5'-ACGACCGCC-TACACGCCCTG-3') primers, while BE2aFor5 (5'-CAATGG-CACACCTCCTCCAC-3') and BE2aRev3 (5'-GTTGAACGTGATCTCGTTCAG-3') primers were used to amplify a 516 bp DNA fragment and BE2bFor5 (5'-CTTACTCGCACACAGCAAGCTG-3') and BE2bRev3 (5'-CTTGAAGGTGTACTGCTT

GTC-3') a 615 bp fragment corresponding respectively to the *BE2a* (XM_001696177) and *BE2b* (XM_001690270) genes.

Thermal asymmetric interlaced PCR and inverse-PCR were used to obtain the DNA flanking the paramycins cassette or pSL18 insertion sites [42, 43, 44]. Homology searches were performed using the BLAST server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; [45]), and at Phytozome site (http://www.phytozome.net/search.php?show=blast&method=Org_Creinhardtii). For TAIL-PCR the primers used were the degenerated primer AD2 (5'-NGT CGASWGANAWGAA-3') and 3 specific primers, TAIL1 (5'-GTGCTCGTTTTGTCTCGCTGAAAGT-3'), TAIL2 (5'-CAAAT-CAGTCTCTGTAGCTTCA-3'), and TAIL3 (5'-ACATACGCA CCAATCATGTCA-3') used respectively for the primary, secondary and tertiary reactions. For inverse PCR, the P1 (5'-CATGTTTGCCCGAACTCGGAG-3') and P2 (5'-CATTTG CCTGCCTTCACGCATC-3') or the T1 (5'-TGCATGTA ATGGCCAGGCCATG-3') and T2 (5'-ACTGGCTCACGCA CACGCTAAC-3') primers allowed the amplification of the genomic DNA flanking each side of the unique *EcoRI* site used to linearize the pSL18 plasmid. The cycling parameters for all reactions of TAIL-PCR and inverse PCR are described in Table 2.

Supporting Information

Figure S1 Kinetics of starch mobilization in the insertional mutants. The amount of starch measured in the CAT mutant strains is displayed as percentages of the initial content after 4, 8 and 24 h of degradation. The class 1 mutants are

presented in a while the class 2 and 3 are shown in b and c respectively. Each bar is mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star. (TIF)

Figure S2 Partial purification of branching enzyme 1 activity from the CAT16 mutant crude extract. The enzymatic defect in the CAT 16 mutant can be observed through the lack of a pink or a red band (enlighted by arrows) on native (a; left panel) and denaturing (a; right panel) starch zymograms respectively. This activity cannot be detected in the first elution fractions (E1 to E3) of the amylose column chromatography as it was the case with the wild-type crude extract as revealed by analysis on starch denaturing zymogram (b). (c) Interaction of polysaccharides with iodine. Samples 1 to 6 correspond respectively to the iodine alone (1), the interaction of the latter with the unmodified amylose in the absence (2) or in the presence of the MOS in elution buffer (3). The iodine interaction of the polysaccharide incubated with the 3 elution fractions (E1 to E3) are displayed in 4, 5 and 6. The values of the λ_{max} of each complex is indicated on the figure in nanometers. (TIF)

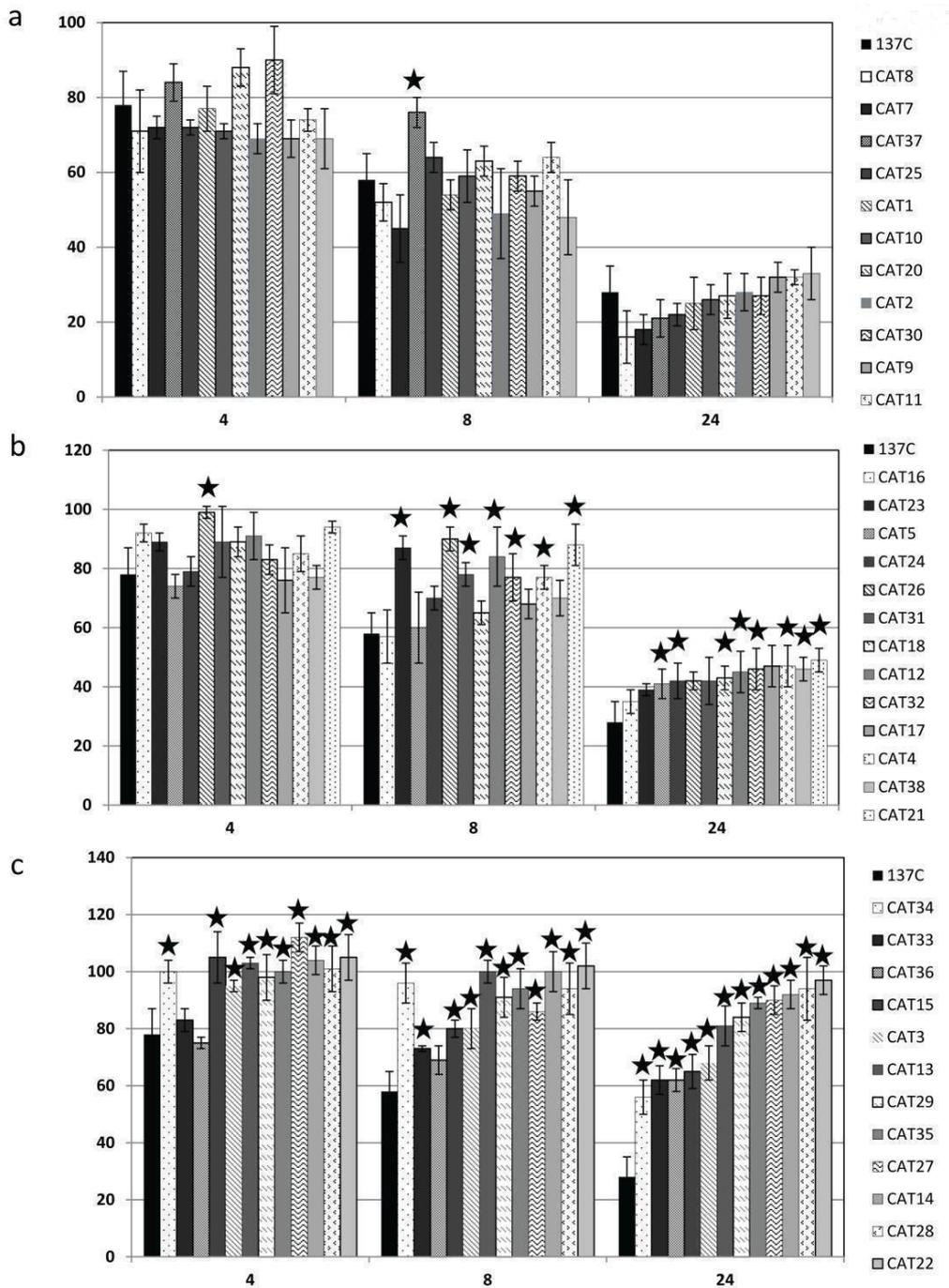
Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GP SGB DD. Performed the experiments: HT JF TD VC CC. Analyzed the data: GP SGB DD. Wrote the paper: SGB DD.

References

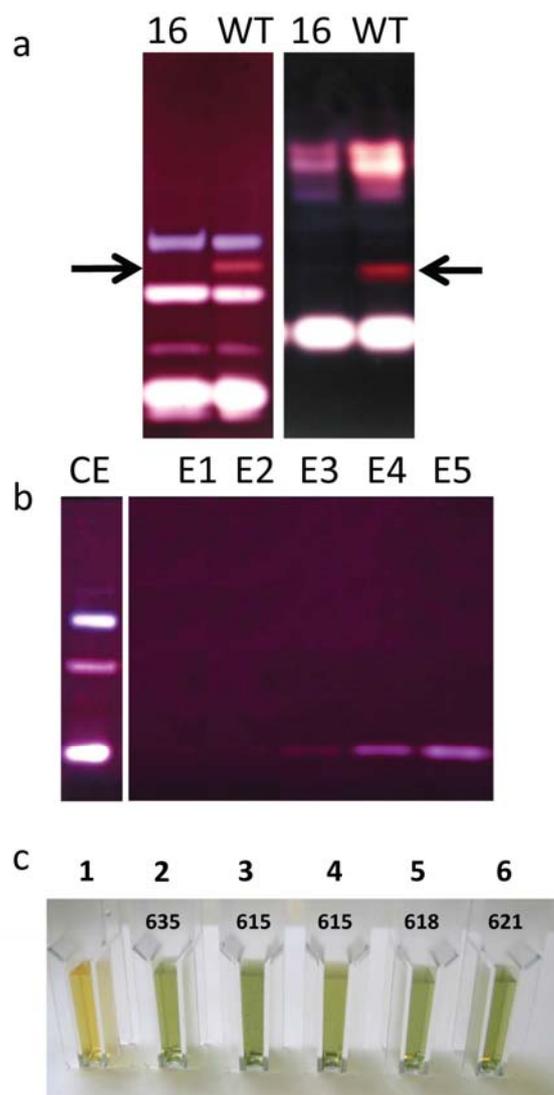
- Wilson WA, Roach PJ, Montero M, Baroja-Fernández E, Muñoz EJ, et al. (2010) Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria FEMS Microbiol Rev 34(6): 952–985.
- Deschamps P, Moreau H, Worden AZ, Dauvillée D, Ball SG (2008) Early gene duplication within Chloroplastida and its correspondence with relocation of starch metabolism to chloroplasts. Genetics 178: 2373–2387.
- Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. Plant Cell Environ 30: 1126–1149.
- Fincher GB (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating grain cereal grains. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40: 305–346.
- Razem FA, Davis AR (1999) Anatomical and ultrastructural changes of the floral nectary of *Pisum sativum* L during flower development. Protoplasma 206: 57–72.
- Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, Kim S, Gan Q, et al. (2008) Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multi-subunit complexes. Plant Physiol 146(4): 1892–1908.
- Tedlow IJ, Beisel KG, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, et al. (2008) Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. Plant Physiol 146(4): 1878–1891.
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM (2005) Starch degradation. Annu Rev Plant Biol 56: 73–98.
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, et al. (2002) The starch-related R1 protein is an alpha-glucan water dikinase. Proc Natl Acad Sci USA 99(10): 7166–7171.
- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, et al. (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves: The phosphoglucan water dikinase. Plant Physiol 137(1): 242–252.
- Hejazi M, Fetteke J, Haebel S, Edner C, Paris O, et al. (2008) Glucan water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. Plant J 55(2): 323–334.
- Hejazi M, Fetteke J, Kötting O, Zeeman SC, Steup M (2010) The Laforin-like dual-specificity phosphatase SEX4 from Arabidopsis hydrolyzes both C6- and C3-phosphate esters introduced by starch-related dikinases and thereby affects phase transition of alpha-glucans. Plant Physiol 152(2): 711–722.
- Santelia D, Kötting O, Seung D, Schubert M, Thalmann M, et al. (2011) The phosphoglucan phosphatase like sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in Arabidopsis. Plant Cell 23(11): 4096–4111.
- Comparot-Moss S, Kötting O, Stettler M, Edner C, Graf A, et al. (2010) A putative phosphatase LSF1 is required for normal starch turnover in Arabidopsis leaves. Plant Physiol 152(2): 685–697.
- Weise SE, Schrader SM, Kleinbeck KR, Sharkey TD (2006) Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phospholytic breakdown of transitory starch. Plant Physiol 141(3): 879–886.
- Fulton DC, Stettler M, Mettler T, Vaughan CK, Li J, et al. (2008) Beta-AMYLASE4 a noncatalytic protein required for starch breakdown acts upstream of three active beta-amylases in Arabidopsis chloroplasts. Plant Cell 20(4): 1040–1058.
- Wattebled F, Dong Y, Dumez S, Delvallé D, Planchot V, et al. (2005) Mutants of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyloglycogen and an abnormal form of amylopectin. Plant Physiol 138(1): 184–195.
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, et al. (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. Science 303(5654): 87–89.
- Chia T, Thornecroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, et al. (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. Plant J 37(6): 853–863.
- Yu TS, Zeeman SC, Thornecroft D, Fulton DC, Dunstan H, et al. (2005) Alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. J Biol Chem 280(11): 9773–9779.
- Streb S, Eicke S, Zeeman SC (2012) The simultaneous abolition of three starch hydrolases blocks transient starch breakdown in Arabidopsis. J Biol Chem 287(50): 41745–41756.
- Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, Buléon A, Gallant D, et al. (1999) Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -14 glucanotransferase in amylopectin synthesis. Plant Physiol 120: 993–1004.
- Dauvillée D, Chochois V, Steup M, Haebel S, Eckermann N, et al. (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J 48: 274–285.
- Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, Morell M, D'Hulst C, et al. (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.
- Delrue B, Fontaine T, Routier F, Decq A, Wieruszski JM, et al. (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(11): 3612–3620.
- Hicks GR, Hironaka CM, Dauvillée D, Funke RP, D'Hulst C, et al. (2001) When simpler is better: Unicellular green algae for discovering new genes and functions in carbohydrate metabolism. Plant Physiol 127(4): 1334–1338.
- Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, et al. (1996) Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. Plant Cell 8(8): 1353–1366.

28. Libessart N, Maddelein ML, Koornhuysen N, Decq A, Delrue B, et al. (1995) Storage Photosynthesis and Growth: The Conditional Nature of Mutations Affecting Starch Synthesis and Structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 7(8): 1117–1127.
29. Bellanger F (1994) «La mutagenèse par insertion d'ADN chez *Chlamydomonas reinhardtii*: une nouvelle voie pour l'élucidation de la biosynthèse de l'amidon» PhD thesis Université de Technologie de Compiègne France.
30. Chochois V, Constans L, Dauvillée D, Beyly A, Soliveres M, et al. (2010) Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Hydrogen Energy* 35: 10731–10740.
31. Fischer N, Rochaix JD (2001) The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genom* 265: 888–894.
32. Hamilton BS, Nakamura K, Roncari DA (1992) Accumulation of starch in *Chlamydomonas reinhardtii* flagellar mutants. *Biochem Cell Biol* 70(3–4): 255–258.
33. Banks W, Greenwood C, Khan K (1971) The interaction of linear amylose oligomers with iodine. *Carbohydr Res* 17: 25–33.
34. Kelleher DJ, Gilmore R (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16: 47R–62R.
35. Fettke J, Eckermann N, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M (2005) Identification subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. *Plant J* 43(4): 568–585.
36. Xia H, Yandea-Nelson M, Thompson DB, Gultinan MJ (2011) Deficiency of maize starch-branching enzyme I results in altered starch fine structure decreased digestibility and reduced coleoptile growth during germination. *BMC Plant Biol* 11: 95.
37. Harris EH (1989) *The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use*. Academic Press, San Diego.
38. Kindle KL (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1228–1232.
39. Kakefuda G, Duke SH (1984) Electrophoretic transfer as a technique for the detection and identification of the plant amylolytic enzymes in polyacrylamide gels. *Plant Physiol* 75: 278–280.
40. Merendino L, Falcatore A, Rochaix JD (2003) Expression and RNA binding properties of the chloroplast ribosomal protein S1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 53(3): 371–382.
41. Rochaix JD, Mayfield S, Goldschmidt-Clermont M, Erickson J (1991) Molecular biology of *Chlamydomonas*. In C. Shaw ed *Plant Molecular Biology: A Practical Approach* IRL Press Oxford pp 253–275.
42. Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8: 457–463.
43. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120(3): 621–623.
44. Colombo SL, Pollock SV, Eger KA, Godfrey AC, Adams JE, et al. (2002) Use of the bleomycin resistance gene to generate tagged insertional mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* that require elevated CO₂ for optimal growth. *Funct Plant Biol* 29: 231–241.
45. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.



Supplemental Figure 1. Kinetics of starch mobilization in the insertional mutants.

The amount of starch measured in the CAT mutant strains is displayed as percentages of the initial content after 4, 8 and 24h of degradation. The class 1 mutants are presented in a while the class 2 and 3 are shown in b and c respectively. Each bar is mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star.



Supplemental Figure 2. Partial purification of branching enzyme 1 activity from the CAT16 mutant crude extract.

The enzymatic defect in the CAT 16 mutant can be observed through the lack of a pink or a red band (enlighted by arrows) on native (a; left panel) and denaturing (a; right panel) starch zymograms respectively. This activity can not be detected in the first elution fractions (E1 to E3) of the amylose column chromatography as it was the case with the wild-type crude extract as revealed by analysis on starch denaturing zymogram (b). (c) Interaction of polysaccharides with iodine. Samples 1 to 6 correspond respectively to the iodine alone (1), the interaction of the latter with the unmodified amylose in the absence (2) or in the presence of the MOS in elution buffer (3). The iodine interaction of the polysaccharide incubated with the 3 elution fractions (E1 to E3) are displayed in 4, 5 and 6. The values of the I_{max} of each complex is indicated on the figure in nanometers.

CHAPITRE II :

ETUDE DU MUTANT CAT15 DEFICIENT POUR UNE SERINE / THREONINE
KINASE.

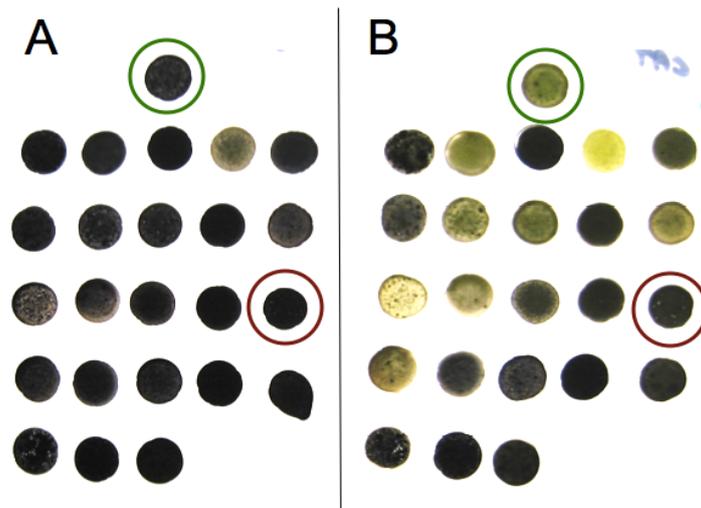


Figure 32 – Crible à l'iode du mutant CAT15.

La boîte de gauche (A) correspond à une incubation des patches cellulaires pendant 5 jours en lumière sur milieu carencé en azote. La boîte de droite (B) correspond aux mêmes souches ayant été incubées une journée supplémentaire à l'obscurité et après levée de la carence. La référence sauvage 137C, encerclée en vert, est placée en haut au milieu de chaque boîte, sa couleur verdâtre sur les boîtes de droite révèle sa capacité à dégrader l'amidon accumulé pendant les 5 jours de carence azotée. La souche CAT15 est cerclée en rouge.

SOUCHES	Quantité d'amidon en TAP-N ($\mu\text{g}/10^6$ de cellules)	λ_{max} (nm)	% amylose
137C	21 ± 4	552 ± 3	26 ± 2
CAT15	28 ± 4	549 ± 3	29 ± 3

Tableau 22 – Quantités d'amidon accumulées par la souche sauvage 137C et le mutant CAT15 avec l'analyse de la structure de leurs polysaccharides.

Les quantités d'amidon accumulées sont présentées en μg de polysaccharide produit par million de cellules. La longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) des amylopectines des souches et le pourcentage d'amylose dans l'amidon ont été obtenus après séparation des deux sous fractions du polysaccharide en CL-2B réalisée sur 2 mg d'amidon purifiés de cultures en milieu carencé en azote. Les résultats correspondent à la moyenne et aux écart-types calculés à partir de trois cultures indépendantes de chaque souche.

I. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DU MUTANT CAT15

Le mutant CAT15, qui a été isolé à l'aide du crible décrit au chapitre I, présente une forte interaction lors de la coloration aux vapeurs d'iode, après la période de 24 heures à l'obscurité durant laquelle la quasi-totalité de l'amidon a été dégradée chez le sauvage (**Figure 32**). Ce phénotype peut résulter du fait que le mutant soit affecté dans sa capacité à mobiliser ses réserves d'amidon à l'obscurité, mais on peut également envisager qu'il résulte simplement d'une suraccumulation d'amidon pendant la phase initiale. Afin de répondre à cette interrogation, nous avons dosé l'amidon contenu chez le mutant CAT15 et la souche sauvage 137C après 5 jours sous lumière vive dans un milieu liquide carencé en azote (TAP-N) (**Tableau 22**). On remarque que les quantités d'amidon accumulées par les deux souches ne sont pas significativement différentes. De plus, nous avons analysé la structure du polysaccharide produit par ces souches sur colonne de tamisage moléculaire de type Sépharose CL-2B. Ce type d'analyse permet non seulement de séparer les deux composants du grain d'amidon, l'amylopectine et l'amylose, mais aussi de déterminer la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) de l'amylopectine et de doser la quantité d'amylose. Aucun défaut structural ou de composition de l'amidon produit par la souche CAT15 n'a pu être détecté en analysant le polysaccharide puisque le mutant produit 133 % de la quantité sauvage, que son amylopectine présente un λ_{max} de 549 nm similaire aux 552 nm du sauvage (**Figure 33**) et un taux d'amylose semblable (**Tableau 22**).

Afin de confirmer que cette souche présentait bien un défaut de dégradation de l'amidon, nous avons étudié la cinétique de mobilisation du polysaccharide à l'obscurité. Après culture à la lumière pendant 5 jours en milieu liquide carencé en azote permettant une synthèse massive d'amidon, la référence sauvage 137C et la souche CAT15 ont été transférées dans un milieu non carencé sans source de carbone (TMP) et placées à l'obscurité. Les quantités d'amidons résiduels dans ces deux souches après 4h, 6h, 8h, 24h et 48h d'obscurité ont été dosées (**Figure 34**). Les mesures de cinétique de dégradation de l'amidon à l'obscurité révèlent un fort défaut de dégradation de l'amidon chez la souche CAT15. Durant les 6 premières heures d'obscurité, celle-ci ne dégrade pas son polysaccharide. Il semblerait même qu'il y ait toujours une synthèse d'amidon malgré le passage à l'obscurité pendant les 4 premières heures. Après 24 heures à l'obscurité, le mutant a dégradé en moyenne 35% de l'amidon initialement présent alors

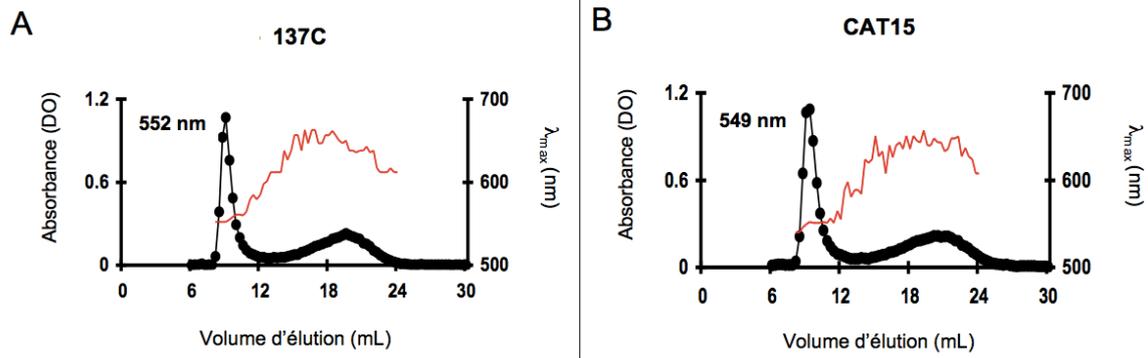


Figure 33 – Profils de chromatographie de tamisage moléculaire des amidons produits par la souche sauvage 137C (A) et le mutant CAT15 (B) lors d'une période de carence.

L'axe des ordonnées de droite correspond à la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) représentée par une courbe rouge et celui de gauche à l'absorbance représentée par des points noirs. L'axe des abscisses correspond au volume d'élution (mL). La λ_{max} de chaque amylopectine mesurée est indiquée sur les graphes (en haut à gauche à côté du pic d'amylopectine).

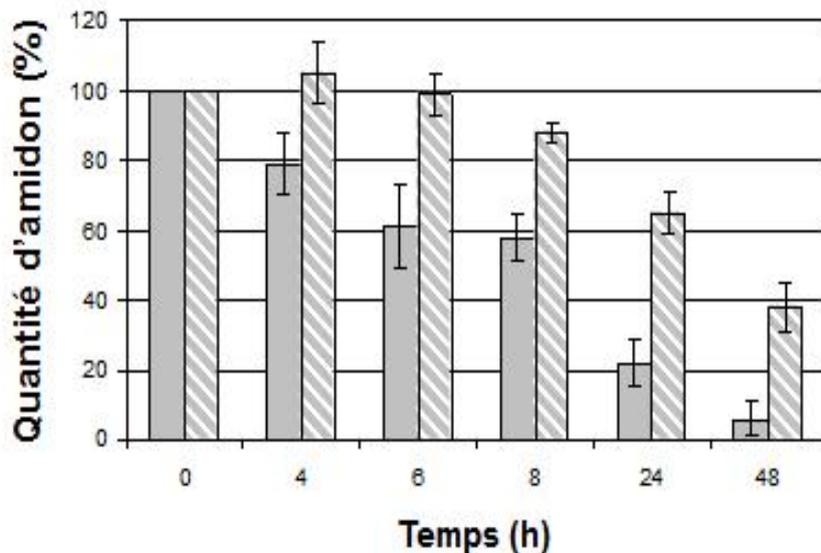


Figure 34 – Cinétique de dégradation de l'amidon du sauvage 137C et du mutant CAT15.

La quantité d'amidon est présentée en pourcentage du T0 (correspondant à la levée de carence et au passage à l'obscurité des cultures) pour chaque souche. Les barres grises correspondent au sauvage 137C et celles rayées au mutant CAT15. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur sont indiquées pour chaque point de la cinétique.

que la souche sauvage ne contient plus que 20 % de son polysaccharide de réserve initial. Ce retard n'est pas comblé après 48h de dégradation, puisqu'il reste encore 40 % d'amidon chez la souche CAT15 alors que 137C n'en contient plus que 10 %.

L'absence de surproduction d'amidon en milieu carencé en azote et la cinétique de dégradation fortement altérée dans cette souche laissent présager que le mutant CAT15 est bien déficient pour la mobilisation de l'amidon à l'obscurité. Afin de déterminer la lésion responsable de ce phénotype, une tentative de caractérisation enzymatique a été réalisée sur ce mutant à l'aide de gels d'activité de type zymogrammes.

|

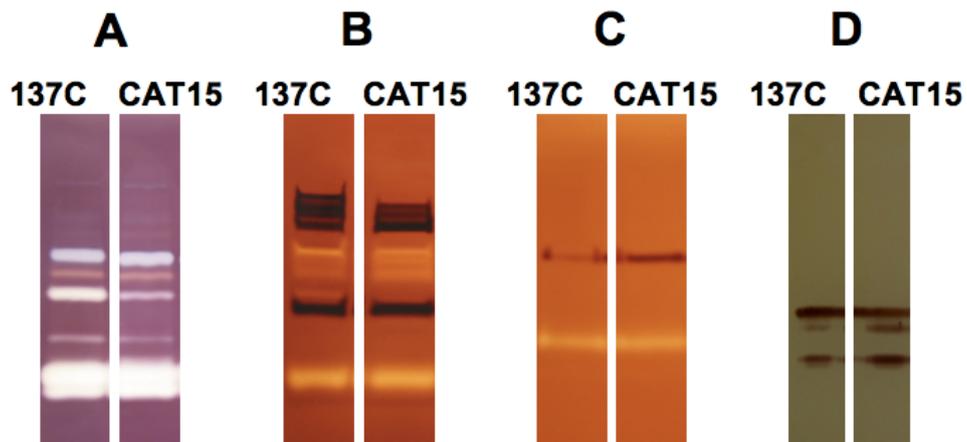


Figure 35 – Profils enzymatiques des souches 137C et CAT15.

(A) Zymogramme contenant de l'amidon et révélant les activités hydrolytiques (Bande bleue: isoamylase, bande rose: enzyme de branchement, bande rouge: D enzyme, bande blanche: α - ou β -amylases). (B) Zymogramme révélant les amidon synthétases solubles. Les bandes brunes correspondent respectivement à l'amidon synthétase soluble 3 (les plus hautes dans le gel) et l'amidon synthétase soluble 1 (au milieu du gel). (C) Zymogramme révélant une activité amidon-phosphorylase (en conditions dénaturantes). (D) Zymogramme révélant les enzymes de branchement (en conditions natives). Pour chaque zymogramme, 50 μ g de protéines de l'extrait brut ont été déposés sur le gel.

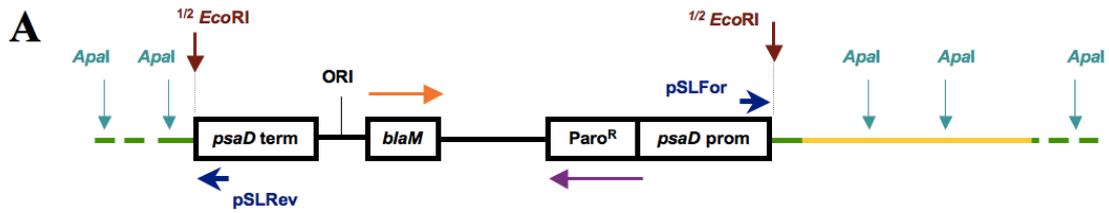
II. IDENTIFICATION DE LA DEFECTUOSITE CHEZ LE MUTANT CAT15

Nous avons cherché dans un premier temps à visualiser une modification du profil des enzymes du métabolisme de l'amidon à l'aide de gels d'activité de type zymogrammes. En parallèle, nous avons tenté d'identifier le lieu d'insertion du plasmide mutagène par la technique de « plasmid rescue » chez notre mutant.

1. Zymogrammes

La défectuosité présente chez le mutant CAT15 provoque une dégradation très altérée de l'amidon de réserve durant les six premières heures. Afin de déterminer l'activité enzymatique responsable de ce phénotype, nous avons cherché à visualiser une modification du profil des enzymes du métabolisme de l'amidon. Pour cela, nous avons réalisé des zymogrammes révélant quatre types d'activités enzymatiques (les activités hydrolytiques, les amidon synthétases, les amidon phosphorylases et les enzymes de branchement) que nous pouvons visualiser sur gels à partir d'extraits bruts de la souche sauvage 137C et du mutant CAT15.

Chaque gel d'activités, sauf le zymogramme révélant les enzymes de branchement, contient un substrat qui sera modifié par les enzymes présentes dans l'extrait brut. Ces modifications seront visualisées par une modification de l'interaction avec l'iode du polysaccharide et donc l'apparition de bandes de couleurs différentes (**Figure 35**). Après coloration, plusieurs bandes de couleurs différentes sont visualisées pour le zymogramme révélant les activités hydrolytiques (**Figure 35A**). Les amidon synthétases et les amidon phosphorylases sont révélées par l'apparition de bandes noires sur le gel, dues à l'allongement des chaînes du glycogène contenu dans le gel (**Figure 35B et C**). Le zymogramme révélant les activités de branchement (**Figure 35D**) est réalisé en conditions natives sans substrat. Le substrat nécessaire est produit pendant l'incubation du gel par la phosphorylase a de muscle de lapin (Sigma, St Louis, USA) qui est capable de synthétiser des chaînes de glucose linéaires à partir du G1P



B

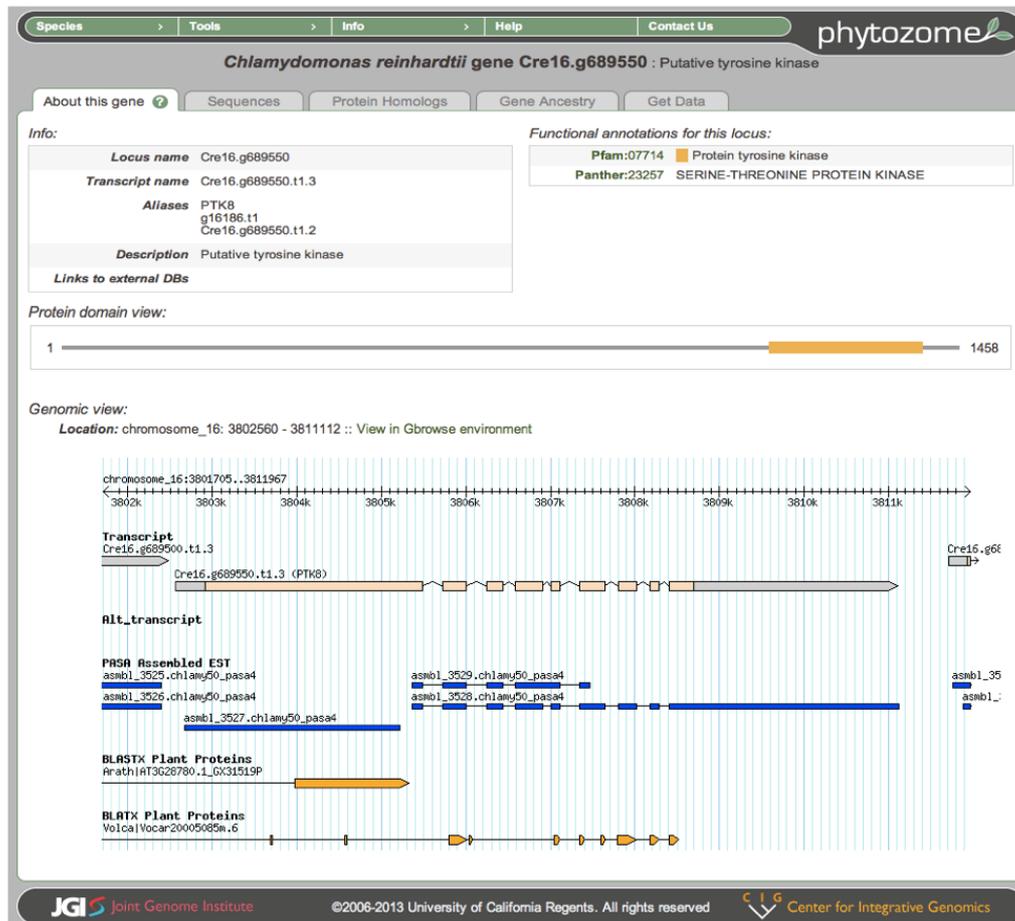


Figure 36 – Lieu d’insertion du plasmide mutagène dans le génome du mutant CAT15.

(A) Schématisation de l’insertion du plasmide pSL18 dans le génome de l’algue. La phase ouverte de lecture de la sérine / thréonine kinase est représentée en jaune, le génome de l’algue en vert et le plasmide mutagène en noir. (B) Recherche d’homologie à partir de la séquence nucléotidique de la kinase à l’aide de phytozome (<http://www.phytozome.net>). Des protéines homologues de cette kinase sont présentes chez *Arabidopsis thaliana* et *Volvox carteri*.

présent dans le tampon d'incubation. Les activités de branchement apparaissent sous forme de bandes rouges sur le gel après la coloration à l'iode.

Les zymogrammes réalisés sur l'extrait brut du mutant CAT15 n'ont pas permis d'identifier une modification quelconque pour les enzymes du métabolisme de l'amidon (**Figure 35**). Le mutant CAT15 ne semble pas être déficient pour les activités enzymatiques que nous sommes capables de visualiser par les techniques de zymogrammes.

2. Plasmid Rescue

Afin de déterminer le lieu d'insertion du plasmide mutagène, pSL18, par la technique de « plasmid rescue », nous avons purifié l'ADN génomique du mutant CAT15. Des aliquots de 2 µg d'ADN génomique ont été digérés par les enzymes de restriction *Apal*, *MluI* et *ZraI* qui ne coupent pas dans le vecteur de mutagenèse mais coupent fréquemment dans le génome de *Chlamydomonas*. Après inactivation des enzymes de restriction par la chaleur, les fragments ont été recircularisés et utilisés pour transformer *Escherichia coli*. Nous avons obtenu un seul clone d'*E. coli* résistant à l'ampicilline après transformation avec les fragments provenant de la digestion par *Apal*. Le plasmide purifié de ce clone a été séquencé à l'aide des amorces pSLFor et pSLRev (voir Matériels & Méthodes, chapitre VI.6.1.) qui bordent l'unique site *EcoRI* du plasmide ayant été utilisé afin de linéariser le vecteur pour la mutagenèse. Une séquence de 547 nucléotides a été obtenue à partir de l'amorce pSLFor alors que le séquençage à partir de l'amorce pSLRev n'a donné aucun résultat. Des 547 nucléotides obtenus, 65 correspondaient à la séquence du plasmide mutagène pSL18 et ont été retirés. Le reste de séquence a été utilisé afin de rechercher le site d'insertion du vecteur mutagène dans le génome nucléaire de la microalgue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (http://www.phytozome.net/search.php?show=blast&method=Org_Creinhardtii). Les 482 nucléotides présentent une homologie parfaite avec une séquence présente sur le chromosome 16 de l'algue. Cette zone correspond à la région juste en amont du codon d'initiation d'un gène annoté comme codant une sérine / thréonine protéine kinase (Cre16.g689550) (**Figure 36**). L'inactivation de cette kinase pourrait donc potentiellement être responsable du phénotype observé et donc cette enzyme pourrait jouer un rôle dans le catabolisme de l'amidon chez la microalgue verte.

Nom	Séquence	Amplification sur	T°C	Taille
Kin5For	5'-CAGCGCGCAGTCCATGCAGC-3'	ADNg	70°C	550 pb
Kin5Rev	5'-ATCGGACACGGGCGCCAACG-3'			
Kin3For	5'-CAGCTGGTCACAAGCGAAGTG-3'	ADNg	60°C	400 pb
Kin3Rev	5'-CGCCAGCTGTTGCTGCTGTAG-3'			
RTKin5F	5'-GTCAGCCTGTGCGCGTCTAGCAAG-3'	ADNc	60°C	560 pb
RTKin5R	5'-CGGCCTCCACGCCTGCCTCTG-3'			
RTKin3F	5'-CACAAGGCGTCAGACGTGTAC-3'	ADNc	60°C	280 pb
RTKin3R	5'-CTGCCGCCAGGGCCTTCTG-3'			

Tableau 23 – Séquences des amorces utilisées afin d'amplifier des fragments de l'ADN génomique ou de l'ARN messager du gène de la kinase.

Les températures d'hybridation pour chaque couple d'amorce et la taille des produits de PCR sont également indiquées. Toutes les PCR sont réalisées en présence de 5% DMSO ou Solution Q.

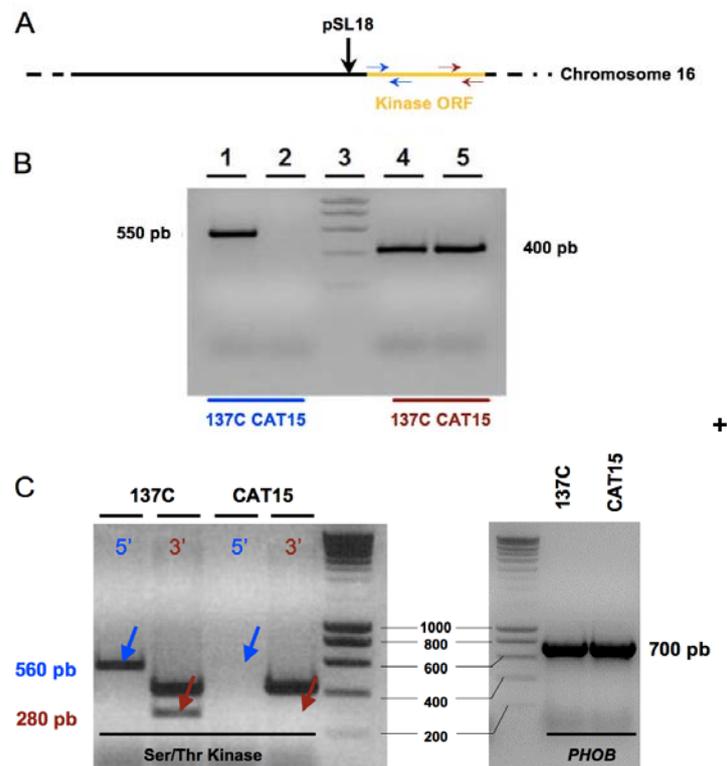


Figure 37 – Expression du gène de la kinase chez le sauvage 137C et le mutant CAT15.

(A) Schématisation de site d'insertion du plasmide mutagène. La position des amorces utilisées pour amplifier les fragments correspondant aux extrémités 5' et 3' d'ADN génomique (ou d'ARN messager) est indiquée par des flèches bleues et rouges, respectivement. (B) Amplification des fragments du gène de la kinase par PCR. Les bandes à 550 pb et 400 pb proviennent des amplifications effectuées avec les amorces Kin5For/Kin5Rev et Kin3For/Kin3Rev respectivement. L'ensemble des PCR ont été réalisées en présence de 5% DMSO. (C) Amplification des fragments de l'ARNm par RT-PCR. Les bandes à 560 pb et 280 pb proviennent des amplifications effectuées avec les amorces RTKin5F/RTKin5R et RTKin3F/RTKin3R respectivement. Une bande parasite de ~400 pb est amplifiée lors de la RT-PCR du fragment 3' d'ARNm. Des RT-PCR de contrôle ont été réalisées sur le gène de la phosphorylase (*PHOB*).

III. CARACTERISATION MOLECULAIRE DU MUTANT CAT15

Afin de savoir si l'insertion du plasmide mutagène dans le mutant CAT15 pouvait avoir provoqué une mutation dans le gène de la kinase, nous avons cherché à vérifier l'intégrité de sa séquence dans le mutant en amplifiant des fragments d'ADN correspondant aux extrémités 5' et 3' de la phase ouverte de lecture en présence des amorces Kin5For/Kin5Rev et Kin3For/Kin3Rev (**Tableau 23**), respectivement. Des conditions optimales d'amplification ont été définies à partir d'ADN génomique de la souche sauvage 137C (voir Matériels & Méthodes, chapitre VI.3.). Il est possible d'amplifier aisément les fragments 5' et 3' du gène de la kinase chez la souche sauvage (**Figure 37B**). Chez le mutant CAT15, le fragment 3' est amplifié alors que la séquence correspondant à l'extrémité 5' du gène ne peut pas être obtenue. L'ADN de la souche CAT15 ne permet pas d'obtenir d'amplification de la partie 5' du gène de la kinase. L'insertion du plasmide mutagène semble avoir perturbé cette région du chromosome 16 de l'algue. La partie 3' du gène ne semble pas avoir été affectée par l'insertion du plasmide pSL18.

Afin de confirmer la perturbation produite lors de la mutagenèse, l'expression de la kinase a été vérifiée par RT-PCR (voir Matériels & Méthodes, chapitre VI.5.) en utilisant un couple d'amorces à chaque extrémité de la phase ouverte de lecture (RTKin5F/RTKin5R et RTKin3F/RTKin3R) du gène de la kinase (**Tableau 23**). Des conditions optimales de PCR ont été définies à partir des ARNs totaux de la souche sauvage 137C (voir Matériels & Méthodes, chapitre VI.5.). Le gène de la kinase est exprimé chez le sauvage puisqu'on est capable de détecter les fragments correspondant aux extrémités 5' et 3' de son ARN messager alors que ces fragments ne sont pas détectés chez le mutant CAT15 (**Figure 37C**). En parallèle, nous avons réalisé des RT-PCR sur un gène de phosphorylase appelé *PHOB* afin de vérifier la qualité des ARNs. La bande correspondant à cette phosphorylase est aisément amplifiée chez les deux souches. La bande parasite (~400 pb) obtenue lors des RT-PCR réalisées sur l'extrémité 3' du gène nous sert également de témoin pour cette étude. L'insertion du plasmide mutagène en amont du gène de la kinase entraîne la perte attendue de l'ARN

Nom	Séquence	Taille	T°C
Cat15FOR	5'-GTCTAGAATGGCCACAAGGAAAGGGGCGGCCAG-3'	4,5 kb	70
Cat15R	5'-GTCTAGACTACACCGCGCTGTACTIONTGGCGGAC-3'		

Tableau 24 – Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN génomique du gène de la kinase par PCR.

Les températures d'hybridation des amorces et la taille du produit de PCR sont indiquées. La PCR est réalisée en présence de 5% DMSO.

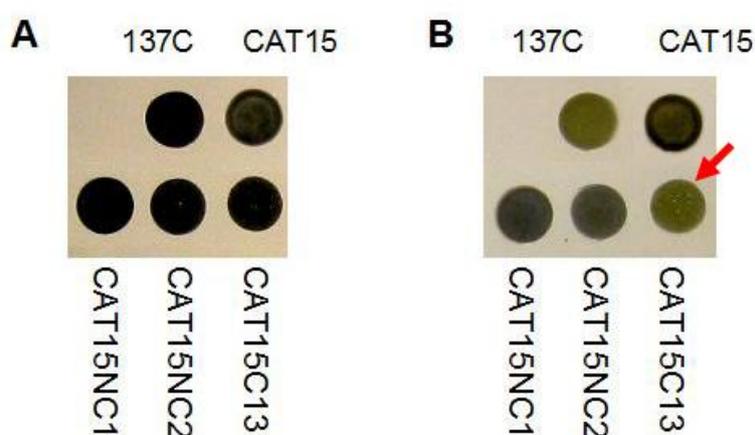


Figure 38 – Crible des complémentants du mutant CAT15.

(A) Coloration à l'iode de patches cellulaires incubés 5 jours à la lumière sur un milieu carencé en azote. (B) Coloration à l'iode des mêmes souches après levée de carence et incubation une journée à l'obscurité. La souche CAT15C13, indiquée par une flèche rouge, montre le même phénotype que la souche sauvage 137C. Les souches CAT15NC1 et CAT15NC2 illustrent le résultat observé pour les transformants avec le vecteur vide.

messenger correspondant. La souche CAT15 est donc bien déficiente pour la sérine / thréonine kinase.

IV. COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE

1. Obtention des complémentants

Afin de confirmer que le phénotype observé sur la dégradation de l'amidon chez le mutant CAT15 était bien lié à l'absence de la kinase, nous avons cherché à réintroduire une copie sauvage de ce gène dans notre mutant. La phase ouverte de lecture de la kinase a été amplifiée par PCR, à l'aide des amorces Cat15FOR et Cat15R (**Tableau 24**) et clonée dans un vecteur d'expression sous le contrôle du promoteur du gène *PSAD*. Le mutant CAT15 étant déjà résistant à la paromomycine, nous avons choisi pour réaliser la complémentation le vecteur d'expression pSLHyg portant une cassette de résistance à l'hygromycine B (**Berthold et al., 2002**).

Après transformation de la souche mutante avec le vecteur pSLHygKinase portant une copie sauvage du gène, les clones résistants à l'hygromycine B ont été purifiés sur milieu sélectif puis criblés selon le même protocole en deux étapes qui avait permis d'isoler le mutant. Après sélection, nous n'avons obtenu que 6 clones qui sont capables de pousser sur un milieu TAP supplémenté de 10 µg/mL de paromomycine et 20 µg/mL d'hygromycine B. En parallèle, le mutant CAT15 a également été transformé avec le même vecteur dépourvu d'insert. Les 2 clones obtenus par cette transformation ont servi de contrôle. Ces clones sont également résistants aux deux antibiotiques. Parmi les 6 clones provenant de la transformation avec le vecteur de complémentation, le clone appelé CAT15C13 présente un phénotype comparable à celui du sauvage (**Figure 38**). L'ensemble des transformants obtenus avec le vecteur vide ont gardé le phénotype mutant sur boîte.

2. Analyses du complémentant CAT15C13

Afin de vérifier la capacité de la souche CAT15C13 à dégrader de nouveau correctement son amidon, nous avons étudié la cinétique de mobilisation du polysaccharide à l'obscurité en milieu liquide. Le comportement du mutant d'origine

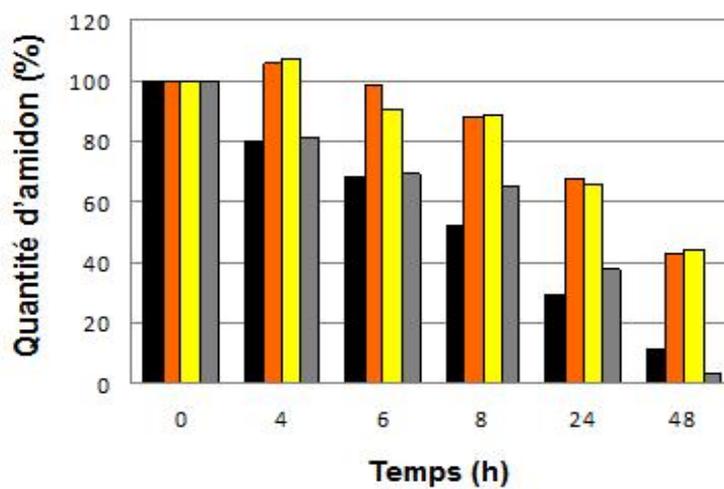


Figure 39 – Cinétique de dégradation des transformants du mutant CAT15.

Les pourcentages d'amidon résiduel dosés après incubation des cultures à l'obscurité pendant 4h, 6h, 8h, 24h et 48h sont présentés pour la référence sauvage 137C (noir), le mutant CAT15 (orange), les transformants CAT15C13 (gris) et CAT15NC1 (jaune). Les résultats sont calculés à partir de la quantité d'amidon dosée après la levée de carence sans passage à l'obscurité (T_0).

CAT15, de la référence sauvage 137C et d'un transformant obtenu avec le vecteur vide (CAT15NC1) a également été analysé.

Après une carence en azote de 5 jours à la lumière vive, les cellules ont été centrifugées et transférées dans un milieu sans acétate (TMP) et à l'obscurité. Des dosages d'amidon ont été effectués à intervalles réguliers afin de calculer les pourcentages de la quantité d'amidon résiduel chez les différentes souches après 0, 4, 6, 8, 24 et 48 heures d'obscurité (**Figure 39**). La souche CAT15C13 présente une cinétique de dégradation en tout point similaire à la souche sauvage 137C puisqu'il reste moins de 10% d'amidon chez ces deux souches au bout de 48h à l'obscurité, alors que le mutant CAT15 contient encore 40% de ses réserves accumulées lors de la carence. Par contre, la souche CAT15NC1 obtenue par la transformation du vecteur sans insert, n'a pas restauré sa capacité à dégrader ses réserves. Cette souche montre un défaut de dégradation de son amidon pendant les premières heures de la cinétique tout comme le mutant d'origine CAT15, elle n'a pu dégrader que 60% de son amidon initial au bout de 48 heures.

Bien que le faible nombre de transformants obtenus ne nous permette pas d'affirmer que la complémentation fonctionnelle ait fonctionné, le retour au phénotype normal observé dans la souche CAT15C13 laisse présager que la kinase pourrait représenter un intervenant du processus catabolique de l'amidon. Faut de temps, nous n'avons pas pu réaliser une nouvelle expérience de complémentation fonctionnelle. Néanmoins, ces travaux sont en cours au laboratoire afin de confirmer le lien entre l'absence de cette kinase et le défaut de dégradation. En parallèle, des croisements entre le mutant CAT15 et une référence sauvage sont en cours afin d'étudier la coségrégation du défaut de dégradation et la défectuosité que nous avons identifiée par la technique de plasmid rescue.

V. RÔLE PROBABLE POUR LA SERINE / THREONINE KINASE DANS LE CATABOLISME DE L'AMIDON

Le mutant CAT15 produit des quantités normales d'amidon mais montre une cinétique de dégradation altérée par rapport au sauvage. Une défectuosité pouvant être responsable de ce retard a été identifiée par la technique de « plasmid rescue ». Cette technique a permis d'identifier le lieu d'insertion du plasmide mutagène en amont d'un gène codant une sérine/thréonine kinase situé sur le chromosome 16 (Cre16.g689550). L'analyse de la séquence de cette kinase nous a permis d'identifier une enzyme homologue chez l'algue verte *Volvox carteri* (Vocar20005065m.6) mais également chez *Arabidopsis thaliana* (At3g28780.1). Cependant, pour ces deux homologues, la fonction reste inconnue. L'absence de l'ARN messager lors des RT-PCR réalisées sur les extrémités 5' et 3' de la phase ouverte de lecture du gène de la kinase montre que la souche CAT15 est bien déficiente pour cette fonction.

Afin de confirmer le lien entre la défectuosité et le phénotype observé, une copie sauvage du gène a été introduite dans le mutant CAT15. Nous n'avons hélas obtenu qu'un très faible nombre de transformants ne nous permettant pas d'affirmer que la complémentation fonctionnelle ait fonctionné. Néanmoins, la souche CAT15C13 dégrade de nouveau son polysaccharide comme le sauvage et nous conforte dans l'idée que le phénotype du mutant est bien lié à l'absence d'expression de la kinase. Une nouvelle tentative de complémentation fonctionnelle est actuellement en cours dans le laboratoire afin d'augmenter le nombre de complémentants analysés et confirmer ce lien. Si le défaut de dégradation observé est bien lié à l'absence de cette kinase, plusieurs hypothèses quant au rôle de cette kinase peuvent être émises. Celle-ci pourrait jouer un rôle dans la régulation de la dégradation. Notre approche sans a priori de génétique formelle nous permet en effet d'espérer pouvoir identifier ce type de fonctions qui sont peu accessibles aux démarches de génétique inverse. La kinase pourrait jouer un rôle direct via la phosphorylation de certaines protéines impliquées dans la dégradation. On peut aisément à ce niveau imaginer un parallèle avec le système de synthèse/dégradation d'un autre polysaccharide de réserve : le glycogène de levure. En effet, il est démontré que la synthèse et la dégradation du glycogène chez

Souches	Technique d'identification	Insertion (Phytozome v9.0)	Fonction
CAT15	Plasmid rescue <i>Apal</i>	Cre16.g689550	Ser/Thr kinase
CAT14	PCR Inverse <i>EaeI</i>	Cre06.g266150	Kinase putative
CAT24	PCR Inverse <i>BsrBI</i>	Cre06.g307100	ABC1/COQ8 Ser/Thr kinase
CAT26	PCR Inverse <i>BssHII</i>	Cre02.g107000	Protéine kinase putative

Tableau 25 – Liste des mutants déficients pour des activités kinases.

La technique d'identification de la mutation, le lieu d'insertion du plasmide mutagène pSL18 dans le génome de l'algue et la fonction décrite pour les gènes interrompus sont indiqués pour chaque mutant. Les enzymes de restriction et les différentes techniques d'identification de la défectuosité chez les mutants sont également précisées.

les eucaryotes dépend de l'état de phosphorylation de deux enzymes clés : la glycogène synthétase pour la synthèse et la glycogène phosphorylase pour le catabolisme. Ainsi les balances de phosphorylation entre glycogène synthétase et glycogène phosphorylase permettent une régulation fine de la mise en réserve ou de la dégradation du polysaccharide. Les mammifères régulent la production de leur glycogène à l'aide d'un système similaire (**Guinovart et al., 1997**). C'est par ailleurs historiquement dans le contexte de l'analyse de ce métabolisme qu'ont été découverts l'AMPc et la régulation post-traductionnelle des enzymes par phosphorylation / déphosphorylation. L'absence de cette activité entraînant un défaut de phosphorylation de ces protéines aurait pour conséquence le ralentissement de la dégradation que nous avons observé. Le mutant CAT15 déficient pour cette activité kinase ne semble pas percevoir avec efficacité le passage de la lumière à l'obscurité puisque cette souche continue à synthétiser son polysaccharide pendant les six premières heures de dégradation. Cette observation est en faveur d'un rôle de cette fonction dans la régulation de l'initiation de la dégradation. Néanmoins, ce rôle n'est pas essentiel puisque nous n'observons qu'un délai dans le démarrage du processus. Il reste néanmoins important puisque la souche mutante montre également un ralentissement du processus. Bien entendu, la cible de la kinase pourrait ne pas être une des enzymes intervenant dans le processus catabolique. Le phénotype observé peut également être tout à fait expliqué si la kinase absente dans CAT15 participe à une cascade de signalisation aboutissant à l'expression de facteurs limitants pour le catabolisme de l'amidon.

Notre approche de génétique formelle nous a également permis d'identifier des mutants déficients pour d'autres activités kinases (**Tableau 25**). La combinaison de ces différentes mutations pourraient nous aider à élucider les phénomènes de régulation de cette voie catabolique. Ainsi l'approche de génétique formelle nous permet d'identifier des fonctions enzymatiques responsables de la dégradation de l'amidon mais également d'obtenir des informations concernant sa régulation alors que les études de génétique inverse ne permettent d'accéder que très difficilement aux fonctions de régulation. Ces résultats illustrent la validité de la démarche expérimentale initiée récemment dans notre groupe et nous encourage à continuer ces travaux de génétique formelle afin de disséquer les mécanismes enzymatiques et les phénomènes de régulation de cette voie catabolique.

CHAPITRE III :

ETUDE DU MUTANT CAT3 DEFICIENT POUR LE TRANSPORTEUR DE
MALTOSE (MEX1).

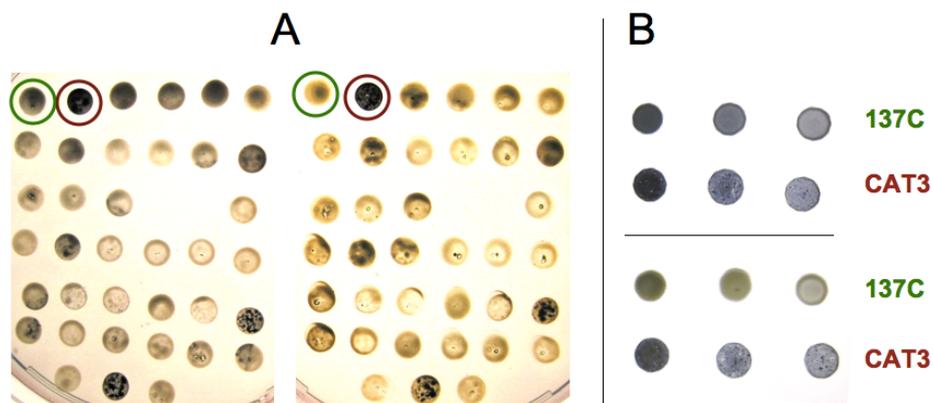


Figure 40 – Le phénotype du mutant CAT3 lors du crible en deux étapes.

(A) Premier crible à l'iode après mutagenèse insertionnelle de la souche 137C. Les patchs cellulaires de gauche (ou du haut en B) ont été incubés 5 jours à la lumière en milieu carencé en azote. Les patchs de droite (ou du bas en B) ont été incubés 24h supplémentaires à l'obscurité après levée de la carence. (B) Crible de confirmation du phénotype du mutant CAT3. Les patchs cellulaires correspondent à 3 dilutions différentes de chaque suspension cellulaire. La couleur verdâtre de la souche sauvage après levée de carence révèle sa capacité à dégrader l'amidon accumulé lors de la période de carence. La couleur noire maintenue chez le mutant CAT3 indique la présence d'une quantité suffisante d'amidon pour interagir avec l'iode au bout de 24h de dégradation.

I. ISOLEMENT ET CARACTERISATIONS PRELIMINAIRES DU MUTANT CAT3

Ce mutant est issu d'une campagne de mutagenèse par insertion du plasmide pSL18 linéarisé par *EcoRI*, réalisée en 2009 au sein de notre laboratoire. La **Figure 40** montre le phénotype affiché par ce mutant lors du crible en deux étapes. Le mutant CAT3 présente une coloration noire à l'iode après la période de 24 heures à l'obscurité pendant laquelle la souche de référence sauvage 137C dégrade la quasi-totalité de son amidon et perd cette interaction. Ce phénotype peut résulter du fait que la souche CAT3 dégrade de façon incorrecte son amidon puisqu'il reste suffisamment d'amidon dans cette souche après 24h de dégradation pour que l'interaction avec l'iode persiste, mais on peut également envisager que le même phénotype soit dû à un simple phénomène de surproduction.

Le mutant CAT3, comme les autres mutants, a donc fait l'objet d'études préliminaires afin de déterminer les caractéristiques quantitatives et structurales de son amidon. Pour cela, les quantités d'amidon accumulées ont été dosées en mixotrophie comme en milieu carencé en azote. De même la capacité du mutant à dégrader le polysaccharide a été étudiée par des cinétiques. L'analyse structurale de l'amidon s'est faite en séparant les deux fractions qui le composent (l'amylose et l'amylopectine) sur une colonne de tamisage moléculaire de type Sépharose CL-2B qui permet également de mesurer la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) du complexe amylopectine/iode afin de révéler d'éventuelles modifications structurales du polysaccharide et de purifier l'amylopectine dans le but de déterminer sa distribution en longueurs de chaînes.

1. Dosage de l'amidon

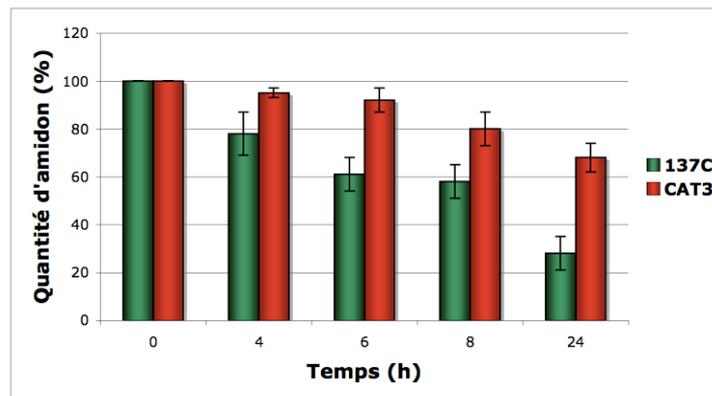
Le crible en deux étapes utilisé afin d'identifier les mutants déficients dans le catabolisme de l'amidon n'est pas quantitatif et ne permet donc pas de distinguer une souche surproductrice d'amidon d'une souche qui possède un défaut de dégradation du polysaccharide. Nous nous attendons à ce que la plupart des candidats obtenus par ce

SOUCHES	Quantité d'amidon ($\mu\text{g}/10^6$ de cellules)	
	TAP+N	TAP-N
137C	1.3 ± 0.4	21 ± 4
CAT3	4.9 ± 1.1	50 ± 5

Tableau 26 – Quantités d'amidon accumulées par le sauvage 137C et le mutant CAT3.

Les quantités d'amidon accumulées en mixotrophie (TAP+N) et milieu carencé en azote (TAP-N) sont présentées en μg de polysaccharide produit par million de cellules. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes et écart types provenant de 3 expériences indépendantes.

A



B

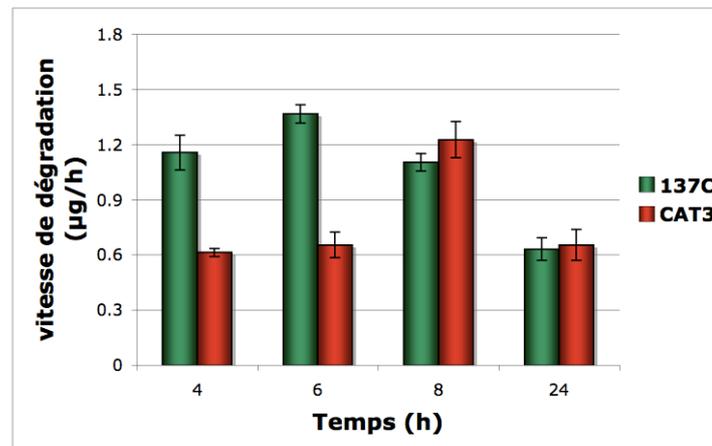


Figure 41 – Cinétique (A) et vitesse (B) de dégradation de l'amidon par 137C et CAT3.

La quantité d'amidon est présentée en pourcentage par rapport au T_0 (levée de carence et début d'incubation à l'obscurité). La vitesse de dégradation représente la dégradation de l'amidon par heure pour chaque point de la cinétique. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes et les barres d'erreurs sont indiquées pour chaque point de la cinétique.

crible montrent un phénotype *sex* (excès d'amidon) puisqu'ils seront incapables de dégrader l'amidon qu'ils ont produit pendant les 5 jours de carence. Afin de savoir si le mutant CAT3 présente un caractère surproducteur, nous avons purifié et dosé l'amidon produit chez cette souche et chez le sauvage isogénique autant en mixotrophie qu'en milieu carencé en azote (**Tableau 26**). Les dosages effectués nous ont permis de mettre en évidence que la souche CAT3 produit 2 à 3 fois plus d'amidon par rapport à la référence sauvage 137C quelles que soient les conditions de culture. En parallèle, nous avons également tenté d'identifier la présence de polysaccharides solubles dans cette souche. Les dosages réalisés aussi bien en mixotrophie qu'après carence azotée n'ont pas permis de mettre en évidence de polysaccharides solubles dans le mutant CAT3.

2. Cinétique de dégradation

Afin de savoir si la souche CAT3 présentait un véritable défaut de dégradation de l'amidon en sus de son caractère surproducteur, une cinétique de mobilisation de son polysaccharide a été réalisée dans les conditions décrites au chapitre II. Après 5 jours d'accumulation d'amidon en milieu carencé en azote (TAP-N) et à la lumière, la souche sauvage 137C et le mutant CAT3 ont été transférés en milieu non carencé sans source de carbone (TMP) et à l'obscurité. L'amidon présent dans des aliquots de la culture a été dosé avant le transfert et après 4h, 8h et 24h d'incubation à l'obscurité (**Figure 41A**). Ces cinétiques ont permis de révéler un défaut de dégradation relativement marqué. En effet, la souche CAT3 ne parvient à dégrader que 5% de son amidon pendant les 4 premières heures tandis que la souche sauvage en est déjà à 30%. Durant les 4 heures suivantes, la mobilisation du polysaccharide de réserve reste ralentie avant de s'accélérer pour les 16 dernières heures (**Figure 41B**). Après 24h à l'obscurité, le mutant CAT3 présente, malgré tout, plus de 65% d'amidon résiduel alors que la souche sauvage a dégradé plus de 70% de son polysaccharide de réserve dans le même laps de temps.

Le phénotype *sex* et la cinétique de dégradation altérée observés chez le mutant CAT3 laissent donc présager que cette souche porte bien une mutation entraînant un ralentissement de la dégradation de son polysaccharide de réserve.

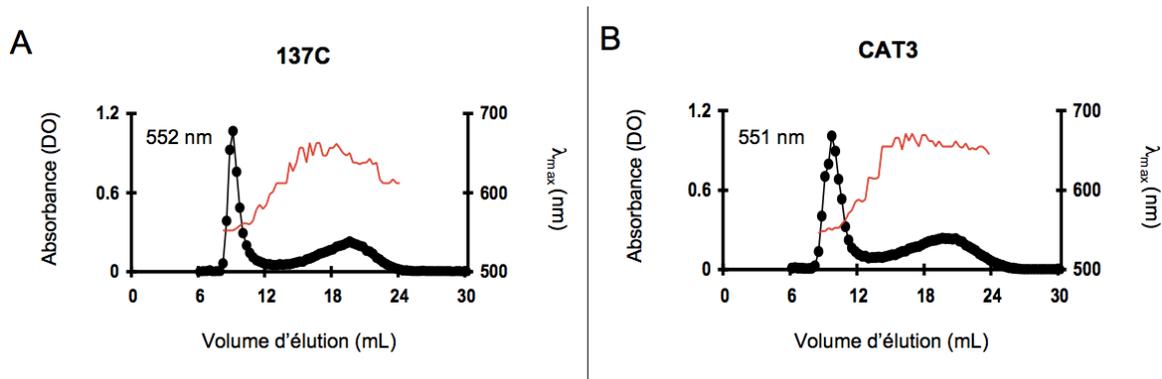


Figure 42 – Profils de chromatographie de tamisage moléculaire des amidons produits par la souche sauvage 137C (A) et par le mutant CAT3 (B) lors d'une période de carence.

L'axe des ordonnées de droite correspond à la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) représentée par une courbe rouge et celui de gauche à l'absorbance représentée par des points noirs. L'axe des abscisses correspond au volume d'élution (mL). La λ_{max} de chaque amylopectine est indiquée sur les graphes (en haut à gauche à côté du pic d'amylopectine).

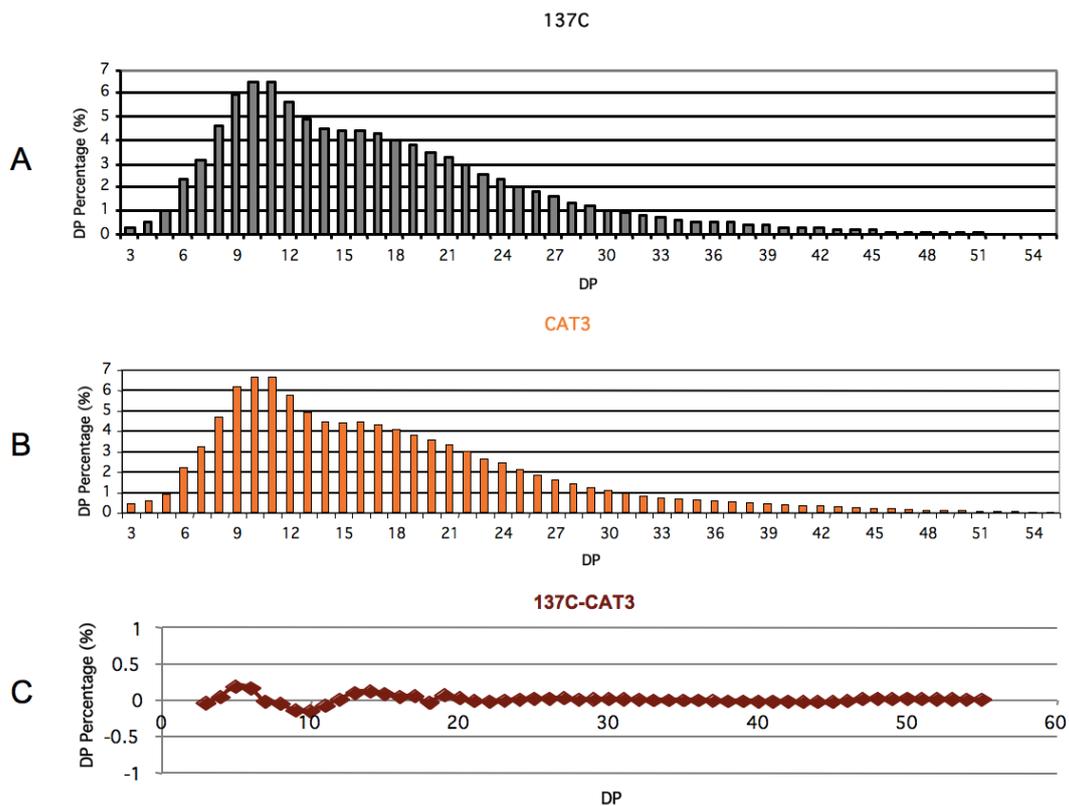


Figure 43 – Distribution en longueurs de chaînes des amylopectines du sauvage 137C et du mutant CAT3.

(A) Profil de distribution en longueur de chaînes (CLD) de l'amylopectine de 137C. (B) CLD du mutant CAT3. Les résultats sont présentés en pourcentages relatifs de chaque longueur de chaînes (DP pour degré de polymérisation) (C) Profil différentiel de la CLD des deux souches obtenu en soustrayant les pourcentages de chaque DP constituant l'amylopectine de la souche mutante de ceux du sauvage. DP : nombre d'unités de glucoses composant la chaîne.

3. Analyse de la structure de l'amidon

Afin de vérifier les aspects structuraux du polysaccharide produit par le mutant CAT3, l'amidon purifié à partir de cultures en milieu carencé a été analysé sur une colonne de tamisage moléculaire de type Sépharose CL-2B. Ce type d'analyse permet non seulement de mesurer la λ_{\max} de l'amylopectine qui est spécifique de la structure du polysaccharide, mais également de séparer les deux fractions du grain d'amidon et d'étudier plus précisément la structure de l'amylopectine. La souche mutante CAT3 présente un profil sur gel filtration très similaire à celui de la référence sauvage 137C (**Figure 42**). De même, la λ_{\max} de son amylopectine (551 nm) est très proche de la valeur référence mesurée chez la souche sauvage (552 nm). Aucune modification structurale importante de la composition du grain d'amidon n'a donc pu être mise en évidence par la chromatographie de tamisage moléculaire.

Après purification des amylopectines de ces deux souches sur colonne de tamisage moléculaire, celles-ci ont été débranchées avec un mélange d'enzymes de débranchement contenant une isoamylase et une pullulanase (voir Matériels & Méthodes, chapitre IV.5.), et les profils de distribution en longueur de chaînes de ces amylopectines ont été étudiés sur HPAEC-PAD afin de détecter une modification fine de la structure du polysaccharide de réserve. Les pourcentages des chaînes linéaires contenant de 3 à 54 résidus de glucose qui constituent les amylopectines sauvage (**Figure 43A**) et mutante (**Figure 43B**) indiquent que la composition du mélange de chaînes obtenus après le débranchement de l'amylopectine du mutant CAT3 est quasiment identique à celle de la souche sauvage 137C. Cela est particulièrement flagrant si on s'intéresse à la courbe différentielle représentée dans la **Figure 43C** qui montre des variations de maximum 0,2% entre les deux polysaccharides.

Les études structurales réalisées n'ont donc pas permis de mettre en évidence une quelconque altération de la structure du grain d'amidon dans notre mutant. L'amidon produit par le mutant CAT3, présente une structure parfaitement sauvage. Par la suite, nous avons cherché à identifier la fonction manquante chez cette souche à l'aide de différentes techniques enzymatique et moléculaire.

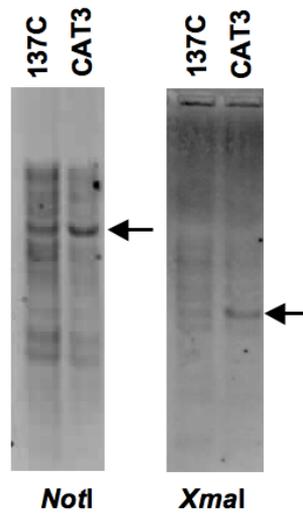


Figure 44 – Hybridation de type Southern montrant le nombre d'insertions de la cassette *AphVIII* dans le génome du mutant CAT3.

Les résultats proviennent de la digestion de l'ADN génomique (8 μ g) par deux enzymes de restriction différentes: *NotI* et *XmaI*. Une sonde marquée à la digoxigénine correspondant à une partie de la cassette *AphVIII*, qui confère la résistance à la paromomycine au mutant CAT3, est utilisée pour l'hybridation. Les bandes indiquées par une flèche noire montrent une copie du plasmide mutagène pSL18 dans le génome du mutant CAT3.

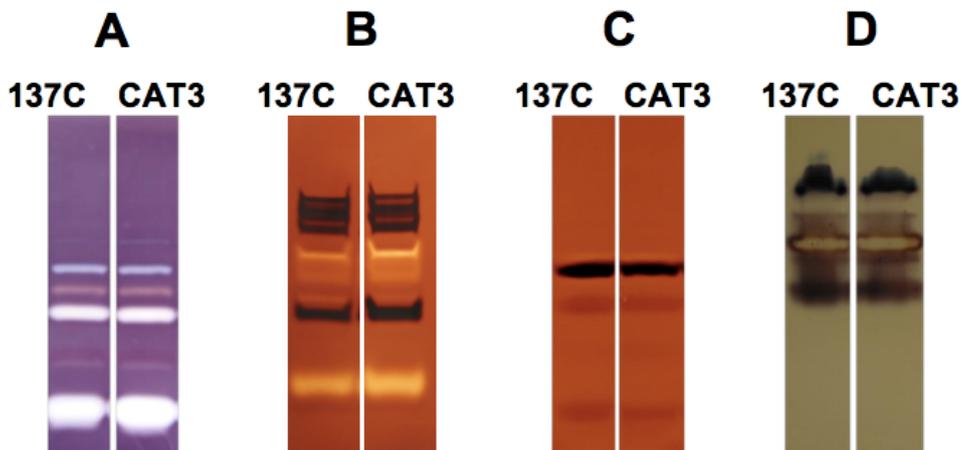


Figure 45 – Profils enzymatiques des souches 137C et CAT3.

(A) Zymogramme contenant de l'amidon et révélant les activités hydrolytiques (Bande bleue: isoamylase, bande rose: enzyme de branchement, bande rouge: D enzyme, bande blanche: α - ou β -amylases). (B) Zymogramme révélant les amidon synthétases solubles. Les bandes brunes correspondent respectivement à l'amidon synthétase soluble 3 (les plus hautes dans le gel) et l'amidon synthétase soluble 1 (au milieu du gel). (C) Zymogramme révélant une activité amidon-phosphorylase (en conditions dénaturantes). (D) Zymogramme révélant les enzymes de branchement (en conditions natives). Pour chaque zymogramme, 50 μ g de protéines ont été déposés sur le gel.

II. CARACTERISATIONS ENZYMATIQUE ET MOLECULAIRE DU MUTANT CAT3

Différentes démarches ont été entreprises afin d'identifier la défectuosité responsable du phénotype observé chez le mutant CAT3. À l'aide de gels d'activité de type zymogrammes, la modification du profil des enzymes du métabolisme de l'amidon chez le mutant a été étudiée. En parallèle, nous avons tenté à plusieurs reprises des Southern blot à l'aide d'une sonde froide marquée afin d'identifier le nombre de copies du plasmide mutagène dans la souche CAT3. Enfin, nous avons essayé de localiser le lieu d'insertion du plasmide pSL18 dans le génome nucléaire du mutant par les techniques de « plasmid rescue » et de PCR inverse.

1. Identification du nombre d'insertions chez le mutant CAT3

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer le nombre d'insertions du plasmide dans le génome du mutant CAT3 par hybridation de type Southern (voir Matériels & Méthodes, chapitre VI.7.). La sonde utilisée correspond à un fragment amplifié par PCR, en présence des amorces *aph_ORF_fw* et *aph_tail_3* (voir Matériels & Méthodes chapitre VI.7.1.), à partir d'une séquence de la phase codante du gène *APHVIII*, responsable de la résistance à la paromomycine de la souche CAT3. Malgré le fort bruit de fond sur les membranes d'hybridation, nous avons été capables d'observer une bande unique d'hybridation obtenue pour deux digestions différentes de l'ADN génomique du mutant CAT3 par *NotI* et *XmaI* (**Figure 44**). Ces résultats nous laissent présager que ce mutant présente une insertion unique du gène *APHVIII* et donc certainement du plasmide mutagène dans son génome.

2. Zymogrammes

Les différents gels d'activité de type zymogrammes ont été utilisés afin de tenter de visualiser une modification ou la disparition d'une activité enzymatique liée au métabolisme de l'amidon chez le mutant CAT3. L'ensemble de ces analyses n'a pas permis de révéler une quelconque défectuosité enzymatique pour le métabolisme de

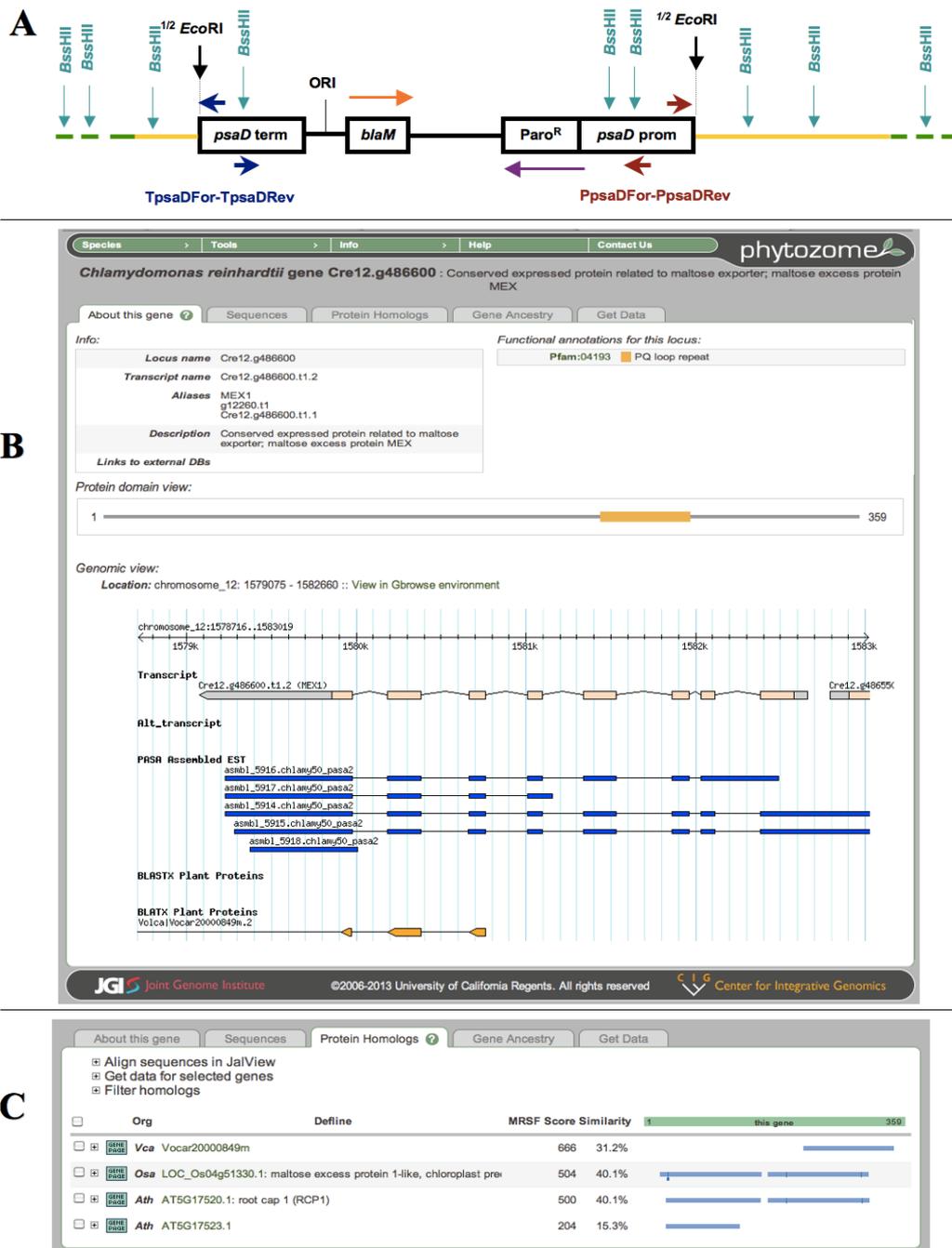


Figure 46 – Lieu d’insertion du plasmide mutagène dans le génome du mutant CAT3.

(A) Schématisation du lieu d’insertion du plasmide mutagène pSL18 dans le génome de l’algue. La phase ouverte de lecture du locus *MEX1* est représentée en jaune, le génome de l’algue en vert et le plasmide mutagène en noir. (B) Annotation de la séquence nucléique du transporteur de maltose *MEX1* dans phytozome (<http://www.phytozome.net>). (C) Protéines homologues chez les plantes. Cette protéine de *Chlamydomonas* possède 33 % d’identité et 40 % de similitude avec ses homologues décrits chez *Arabidopsis thaliana* et chez *Oryza sativa*.

l'amidon dans notre mutant (**Figure 45**). Le mutant CAT3 ne semble pas être déficient pour les activités enzymatiques que nous sommes capables de visualiser par les techniques de zymogrammes.

3. PCR inverse

Afin d'identifier le lieu d'insertion du plasmide mutagène dans le génome nucléaire du mutant CAT3, nous avons tenté à plusieurs reprises la technique de « plasmid rescue ». Malgré les différentes digestions réalisées par les enzymes de restriction qui coupent fréquemment dans le génome de l'algue sans autant digérer le plasmide mutagène, nous n'avons pas réussi à obtenir de clones d'*Escherichia coli* résistants à l'ampicilline. Cela nous a poussé à essayer la technique de PCR inverse chez *Chlamydomonas* afin d'identifier la mutation responsable de la dégradation ralentie observée chez le mutant CAT3.

L'ADN génomique de la souche mutante CAT3 a été purifié puis digéré par les enzymes de restriction *BsrBI*, *BssHII* et *EaeI* qui coupent fréquemment dans le génome de *Chlamydomonas reinhardtii*. Après inactivation de ces enzymes par la chaleur, les fragments obtenus ont été circularisés puis utilisés pour réaliser une réaction de polymérisation en chaîne utilisant deux couples d'amorces divergentes (voir Matériels & Méthodes, chapitre VI.6.2.) qui s'hybrident sur le plasmide pSL18 (**Figure 46A**). La PCR réalisée en présence des amorces localisées sur le terminateur du gène *PSAD* contenu dans le plasmide mutagène a permis d'amplifier une bande d'environ 1,9 kb obtenue à partir de la digestion par *BssHII*. Cette bande a été ensuite extraite du gel d'ADN à l'aide du kit PCR Clean Up System, puis insérée dans un vecteur de clonage de type Topo II (Life Technologies Ltd, Paisley, UK) et amplifiée chez la bactérie. Après vérification de la présence de l'insert par une digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI*, le vecteur a été séquencé à l'aide d'une amorce universelle M13 (TGTAACGACGGCCAGT). Parmi les 1164 pb obtenues, 624 correspondent au vecteur de clonage et au plasmide de mutagenèse pSL18. Les 540 pb restantes ont été utilisées afin de localiser le lieu d'insertion du vecteur mutagène dans le génome nucléaire de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (<http://www.phytozome.net/search.php>). 281 de ces nucléotides présentent une homologie parfaite avec le début d'un gène codant pour un transporteur de maltose, appelé MEX1, situé sur le chromosome 12 de l'algue (Cre12.g486600) (**Figure 46B**).

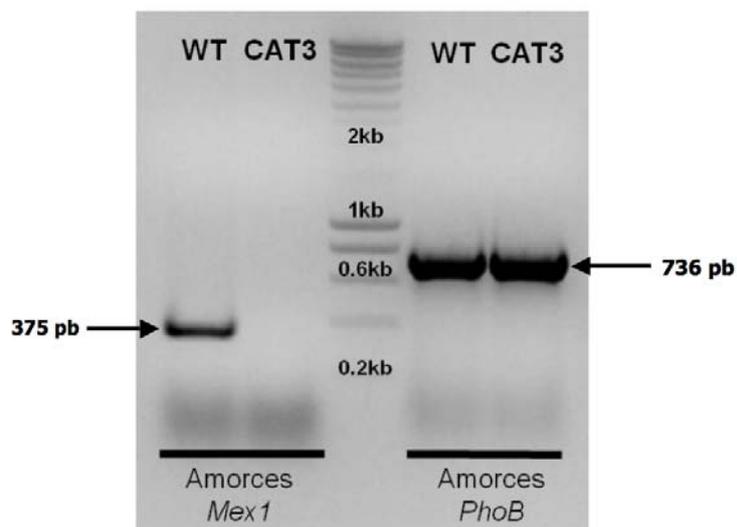


Figure 47 – Analyse de l’expression de *MEX1* par RT-PCR sur les ARNs totaux de la souche sauvage 137C et du mutant CAT3.

Le produit de PCR obtenu à l’aide du couple d’amorces RTMexA-RTMexE chez le sauvage 137C (WT) est présenté à gauche du marqueur de taille déposé au milieu du gel d’agarose (1,5 %). Cette bande à 375 pb n’est pas amplifiée chez le mutant CAT3. Les bandes présentes à droite correspondent au témoin d’amplification d’un fragment de l’ARN messager du gène de la phosphorylase PhoB.

L'analyse de la séquence de ce transporteur nous a permis d'identifier une enzyme homologue chez l'algue verte *Volvox carteri* (Vocar20000849m.2) dont la fonction reste méconnue mais également chez *Arabidopsis thaliana* (At5g17520.1) et *Oryza sativa* (Os04g51330.1) dont la fonction est décrite comme transporteur de maltose (**Figure 46C**).

Cette technique nous a également permis de localiser précisément le lieu d'insertion du plasmide pSL18 dans le génome du mutant CAT3. L'insertion dans le gène *MEX1* débute exactement au niveau du nucléotide 285 (par rapport au codon d'initiation) mais la borne opposée n'a pas pu être déterminée précisément du fait de la délétion engendrée par le plasmide. Cette information nous a poussés à analyser l'expression de *MEX1* par RT-PCR (voir Matériels & Méthodes, chapitre, VI.5.) afin de confirmer la perturbation produite lors de la mutagenèse. Des conditions optimales de PCR ont été définies à partir des ARNs totaux de la souche sauvage 137C. Le gène *MEX1* est exprimé chez le sauvage puisqu'on est capable de détecter un fragment de son ARN messenger alors que cette bande de 375 pb n'est pas détectée chez le mutant CAT3 (**Figure 47**). En parallèle, nous avons réalisé des RT-PCR sur un gène de phosphorylase appelé *PHOB* afin de vérifier la qualité des ARNs. Le fragment de l'ARN messenger de cette phosphorylase est aisément amplifié chez les deux souches. L'insertion du plasmide mutagène dans le locus *MEX1* entraîne la perte attendue de l'ARN messenger correspondant. La souche CAT3 est donc bien déficiente pour cette fonction.

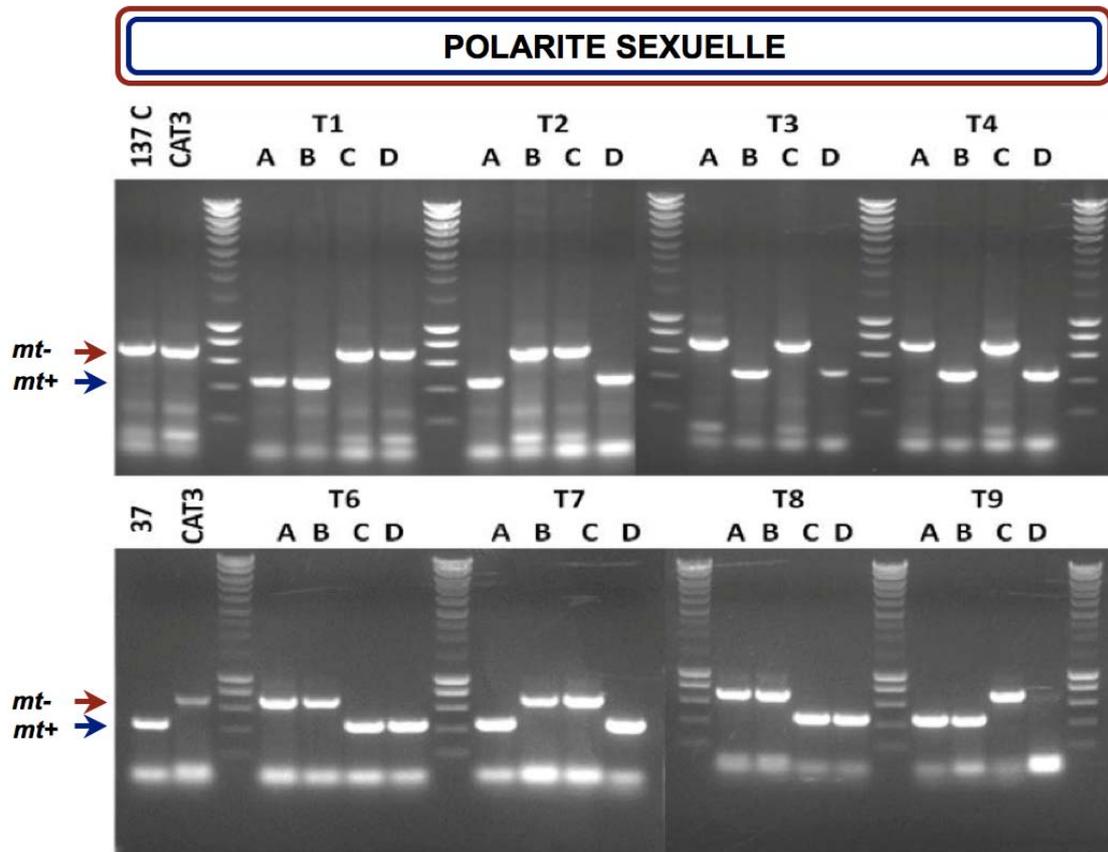


Figure 48 – Analyse par PCR des loci *MT* (mating type).

L'ADN génomique des ségrégeants a été utilisé comme matrice pour amplifier soit un fragment de 423 bp du locus *Fus1* spécifique des souches *mt+* soit de 689 bp du locus *Mid1* porté par les souches *mt-*. Les souches sauvages 137C (*mt-*), 37 (*mt+*) et mutante CAT3 (*mt-*) sont utilisées comme témoins lors de ces PCR.

III. IMPLICATION DE L'INSERTION DANS *MEX1*

Afin de démontrer le lien entre l'insertion du plasmide mutagène dans le locus *MEX1* et le phénotype de défaut de dégradation de l'amidon, nous avons entrepris deux démarches en parallèle. D'une part, nous avons étudié la coségrégation de la mutation avec le défaut de dégradation par l'étude des ségrégeants issus du croisement entre le mutant CAT3 et une souche sauvage de polarité sexuelle opposée et d'autre part, nous avons engagé la complémentation fonctionnelle du mutant CAT3 pour étudier la réversibilité du phénotype observé.

1. Analyse de la coségrégation

Le mutant CAT3 de polarité sexuelle *mt-* a été croisé avec une souche sauvage, appelée 37, qui est de polarité sexuelle opposée *mt+*. De ce croisement, 8 tétrades ont été obtenues. Afin de confirmer que ces souches étaient toutes originaires d'une ségrégation méiotique, nous avons étudié la distribution des différents caractères provenant des souches parentales 37 (*mt+* ; *ac14* ; *pab2*) et CAT3 (*mt-* ; *nit1* ; *nit2* ; *paroR*). Toutes les tétrades ont fait l'objet d'analyses de la polarité sexuelle par PCR (**Figure 48**), de la croissance sur différents milieux sélectifs pour les auxotrophies et de la résistance à la paromomycine. L'examen de l'ensemble des caractères a permis de s'assurer que les 8 tétrades étaient bien constituées de ségrégeants méiotiques. Par exemple, l'analyse couplée des caractères *ac14* et *nit1* permet d'identifier 6 ditypes non parentaux et 2 tétratypés parmi les tétrades. Au cours de ces tests une ségrégation 2/2 de la résistance à la paromomycine a été observée, laissant supposer qu'une seule copie du plasmide mutagène s'est intégrée dans le génome du mutant d'origine CAT3. Cette information renforce les résultats obtenus lors de l'hybridation de type Southern réalisée sur l'ADN génomique du mutant.

Afin de déterminer les souches portant la mutation au locus *MEX1* dans les ségrégeants, des analyses de PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de ces souches en présence de 3 amorces (KpnMexDeltaTP, TpsaDRev et Mex1Rev1500). Ces amorces permettent l'amplification d'un fragment de 1316 pb si le gène n'est pas

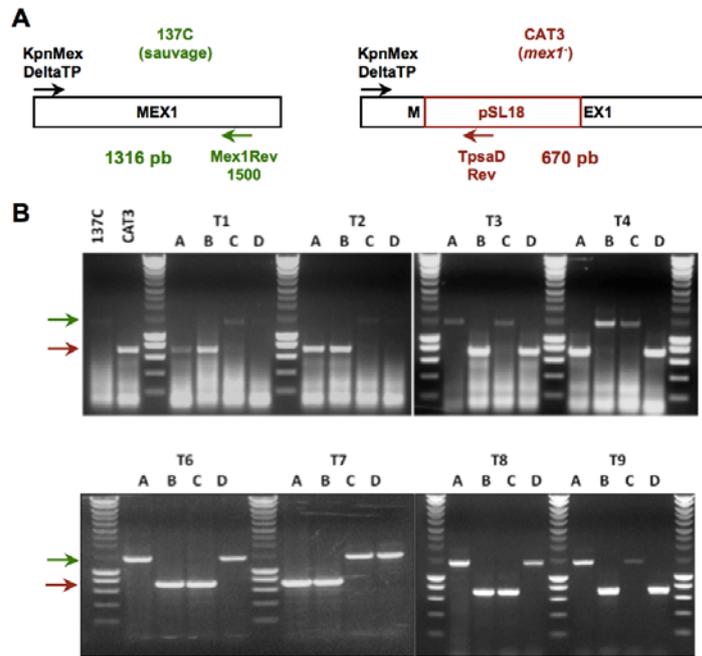


Figure 49 – Analyse par PCR du locus *MEX1*.

(A) Positionnement des amorces utilisées sur le locus sauvage (137C) et le locus muté (CAT3). Une amplification d'un fragment de 1316 pb correspond à l'allèle sauvage alors qu'un fragment de 670 pb est obtenu si le gène est interrompu par le plasmide mutagène pSL18. (B) Résultat de la PCR sur les 8 tétrades issues du croisement 37xCAT3. La flèche verte indique la présence du produit de PCR correspondant à l'allèle sauvage *MEX1* sur le gel d'agarose (0.8 %) alors que la flèche rouge montre la position de l'amplification de l'allèle mutant due à l'insertion de pSL18.

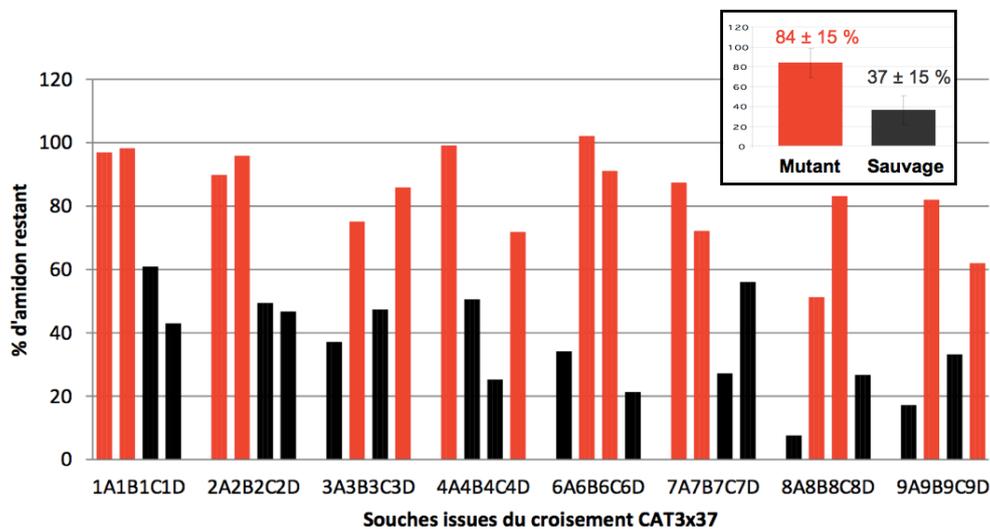


Figure 50 – Quantités d'amidon résiduel après 24h de dégradation à l'obscurité.

Les barres rouges représentent la quantité d'amidon résiduel exprimée en pourcentage (%) des ségrégeants mutants *mex1* identifiés par PCR et les barres noires les valeurs observées pour les souches possédant une copie sauvage du gène *MEX1*. Chaque tétrade est composée de quatre souches dénommées par un chiffre et des lettres. Le graphe récapitulatif encadré en noir (en haut à droite de la figure) représente le pourcentage moyen d'amidon résiduel des souches mutantes et sauvages avec les écarts types.

perturbé ou d'un fragment de 670 pb si le vecteur mutagène est inséré (**Figure 49A**). Cette analyse a permis de montrer une ségrégation parfaite 2 sauvages : 2 mutants dans les 8 tétrades obtenues lors du croisement (**Figure 49B**).

Après vérification des tétrades, nous avons cherché à vérifier la coségrégation du défaut de dégradation de l'amidon et de la présence de la mutation *mex1* dans ces souches. Dans cette optique, chaque ségrégeant a été analysé afin de déterminer la capacité à dégrader son polysaccharide de réserve après 24h d'obscurité. Toutes les tétrades ont donc fait l'objet d'une cinétique de dégradation afin de déterminer la quantité résiduelle d'amidon observée après 24h de dégradation par rapport à la quantité initiale présente dans la souche. (**Figure 50**). Au sein de chacune de ces tétrades, on observe clairement que les deux ségrégeants mutants, représentés par des barres rouges dans la **Figure 50**, dégradent moins bien leur amidon que les deux ségrégeants sauvages en noirs. Lorsque l'on s'intéresse à la population testée dans son ensemble, les mutants contiennent encore $84 \pm 15\%$ de leur amidon alors que les sauvages n'en contiennent plus que $37 \pm 15\%$ au bout de 24h de dégradation. L'analyse de la coségrégation entre l'insertion du plasmide mutagène dans le locus *MEX1* et le défaut de dégradation prouve que l'insertion dans *MEX1* est bien responsable du défaut de dégradation de l'amidon de réserve observé chez le mutant CAT3.

2. Complémentation Fonctionnelle

Afin de démontrer définitivement que l'absence du transporteur MEX1 est bien responsable du phénotype observé chez le mutant de dégradation CAT3, nous avons tenté de réintroduire une copie sauvage de ce gène dans le génome du mutant. Le gène *MEX1* a été amplifié par PCR à l'aide des amorces RVMexRev et RVMexFor, et cloné dans le vecteur pSLHyg préalablement digéré par l'enzyme de restriction *EcoRV* et déphosphorylé. La souche CAT3 a été transformée par ce plasmide qui porte un gène de résistance à l'hygromycine B ($20\mu\text{g}/\text{mL}$) préalablement linéarisé par l'enzyme de restriction *XmnI*. Après transformation, 50 % des transformants résistants aux deux antibiotiques montraient un phénotype identique au sauvage lors du crible en deux étapes (**Figure 51**). La **figure 52** montre les résultats de la cinétique de dégradation obtenus avec certains de ces clones. Tous les transformants montrant un phénotype sauvage sur boîte sont capables de dégrader leurs amidons correctement. Les deux

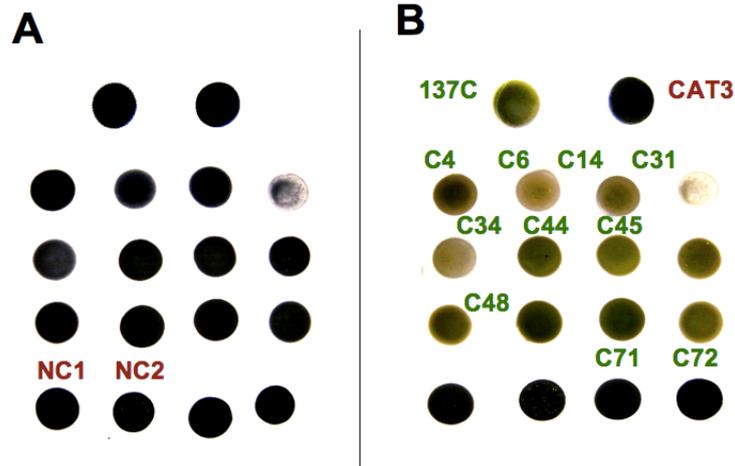


Figure 51 – Crible à l'iode des complémentants du mutant CAT3.

- (A) Coloration à l'iode de patches cellulaires incubés 5 jours à la lumière sur milieu carencé en azote. (B) Coloration à l'iode des mêmes souches après levée de la carence et incubation 24h supplémentaires à l'obscurité. Les souches C4, C6, C14, C31, C34, C44, C45, C48, C71 et C72 proviennent de la transformation du mutant CAT3 par le vecteur de complémentation (pSLHygMex1) et les souches NC1 et NC2, par le vecteur pSLHyg sans insert.
- (B)

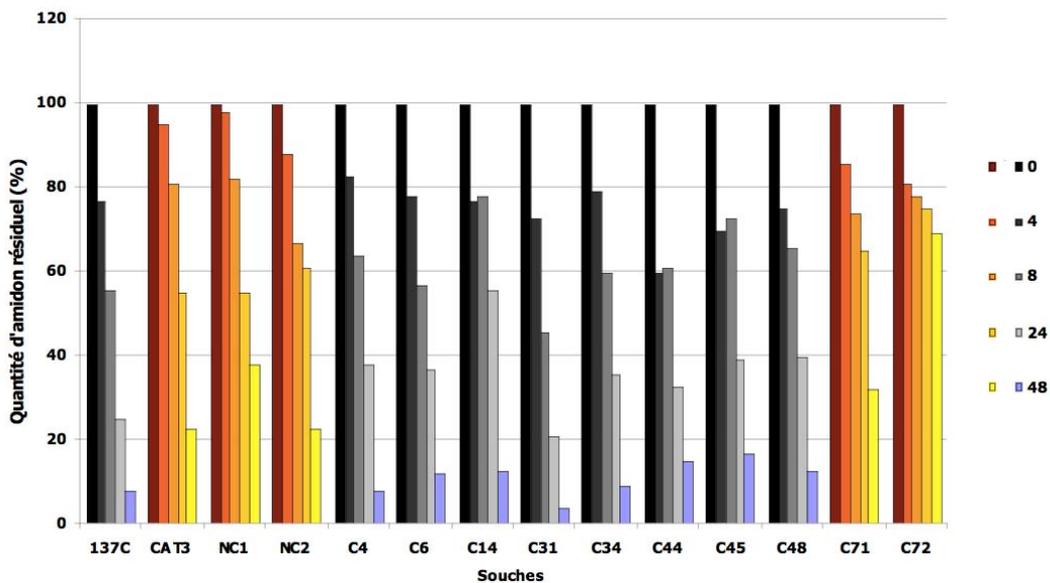


Figure 52 – Cinétique de dégradation des complémentants du mutant CAT3.

La quantité d'amidon résiduel après incubation à différents temps à l'obscurité est présentée en pourcentage par rapport à la quantité d'amidon présente lors de la levée de carence (T_0). Les souches qui dégradent leurs amidons comme le sauvage 137 sont représentées en gris. Les souches qui ont gardé le phénotype mutant sont représentées en orange.

clones CAT3C71 et CAT3C72 complémentés avec le vecteur contenant l'insert restent noires lors du crible et montrent une cinétique de dégradation altérée comme le mutant. L'étude de l'expression de *MEX1* par RT-PCR a mis en évidence la présence d'un profil étrange (**Figure 53**) chez tous les complémentants sélectionnés pour ces expériences. Une transition d'une adénine en guanine (**Figure 54**) apparue lors de la construction du vecteur de clonage pourrait être responsable de ce phénomène. Après vérification par séquençage, nous avons identifié la présence d'une substitution dans un intron. Cette modification pourrait perturber l'épissage correct de cet intron et représenter la cause de ce profil étrange après RT-PCR.

De ce fait, le clonage a été refait et 70 clones résistants aux deux antibiotiques ont été obtenus. Un témoin consistant en la transformation du mutant CAT3 avec le vecteur de clonage sans insert a également été réalisé. L'ensemble des transformants obtenu a ensuite été soumis au crible phénotypique en deux étapes afin de détecter d'éventuels complémentants. Parmi les 70 clones résistants à la paromomycine et à l'hygromycine B, 47 présentent un phénotype proche de celui de la souche sauvage sur boîte. Les 20 transformants obtenus avec le vecteur vide ont tous sans exception gardé le phénotype mutant. La **Figure 55** représente les résultats du crible en deux étapes réalisé sur certaines souches choisies pour les analyses des complémentants avec en témoin le sauvage 137C et le mutant CAT3.

Afin de confirmer le phénotype sauvage affiché sur boîte par les complémentants, la capacité à dégrader l'amidon a ensuite été mesurée en culture liquide sur l'un des complémentants appelé CAT3C9₁, le clone issu de la transformation par le vecteur de clonage sans insert appelé CAT3NC4, le mutant d'origine CAT3 et la souche de référence sauvage 137C (**Figure 56**). Le transformant CAT3C9₁ a totalement restauré sa capacité à mobiliser sa réserve d'amidon à l'obscurité. Après 24 h d'obscurité, il reste moins de 40% de l'amidon accumulé chez le transformant et le sauvage, alors que le mutant contient encore 70% des réserves accumulées lors de la carence. Quant au témoin de transformation, CAT3NC4, le défaut de dégradation de l'amidon persiste tout comme chez le mutant CAT3. Après 48 heures, ces souches possèdent toujours 30% de leur amidon initial alors que le sauvage et le complémentant n'en contiennent plus que 10%.

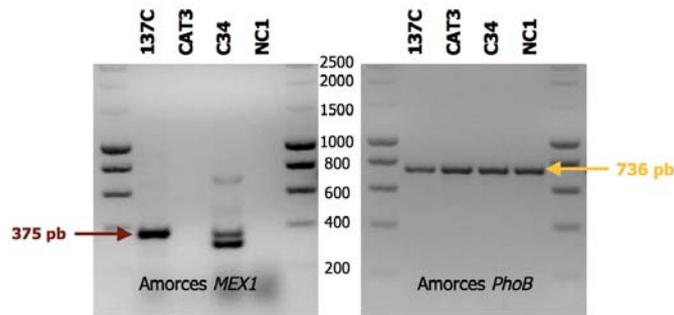


Figure 53 – Analyse du locus *MEX1* par RT-PCR sur la souche sauvage 137C, le mutant CAT3, le complémentant CAT3C34 et le non complémentant CAT3NC1.

Les résultats d'amplification obtenus à partir du couple d'amorces spécifiques du locus *MEX1* sont présentés à gauche de la figure. Les bandes (700 pb) présentes sur le gel d'agarose (1 %) de droite correspondent au témoin d'amplification d'un fragment de l'ARN messager du gène de la phosphorylase. La bande à 375 pb correspondant à un fragment de l'ARNm du gène *MEX1* est présente chez la souche sauvage 137C. Un profil étrange est observé lors de l'amplification du fragment de l'ARNm de *MEX1* chez le complémentant CAT3C34. Cette bande est absente chez le mutant CAT3 ainsi que chez la souche CAT3NC1.

```

ATGTTGCAACC GGCAACCGGCAAGGAGTTTTTCGGGGATGGAAGGGCGACGGACAACAGGCACCGCAACGCT
GGTGACTGTCAAGTAGCCGGAAAAAGCCCGTGCCTCCGTTGCATGCGGGAGCAACAGCGGTCCTCGGCAAGC
ACAGCCAGCGATGGAATGCGCTCACGGACAAGCTGGTGGCTGCATCCAGCATTCCTATTTTGGTG
CTTCCGCAAGTCTGTCAGGTAGGCTGGGCCGCCAGGCAAGGTTCCCGCGCAACCCGCGGCGTGCCGTGACC
GGCCCTGCCAGGACGTGCACGGGGTGTGTGTGCGAGGCTTAGCACCCGCAATGCTGGCCGCAAGTTCCTCTGC
GTGCAAAACGGAACTCAACAGCTAGCGGCCCTGAGGAGTAGAGGGGGTATTGCCAAGACCCGTAGCAATGG
CACCCCTTATACCAACAGGCCAGCACCATCCGGTCCCTTGACCCAAAACGAAAAACCAACGTTTCATCCA
ACAGAAATGCCATCAACATGGCTGGCGGCCACCCACGGCCCTGTCCATTATCAGCTGGGAGGGCTACCTCT
CTGCCATGTTCCGTAAGTGTGTGTCAAAGCAGGAGGAGGACGGTATTGTTATCTCATGTGTGCATGCCCG
GTTCCATCCGAGGCAACACATAAATGTGCAGCCATTTCCGGCGCTCAGGGGAGCGCAGCCCGCTAAACGTC
CAGCTTGTGGGAATCCTCAACAACCTTCTCATTTCTCACACAGGTCCGCGAGGGCGGGGAGAGTGGAGGGC
TCCGCAGAGGAAGGGGTGCAGAGGAAGGGGCAAGGGTGAAGGGAGGGTCCAGGGCGGGCGGTGGCGTGGGG
GTCTTGGCGTCCGTGCTCAGCCCTAAGTGCAGTGCCTTAATGTGGCGGACAAGGACTGGGACCCCGGG
GAGGCATGCACCTGTGTAGCCCGTAAAGTACTCACCTGATGCATGCATACGTTCAACCCACAGCAACAGCA
CATCATCAACGGTCTCTTCCACCCCTTAACACCGCTCAAGATGTCGCGAGTTCTGACCGGATTTCCGTTT
TTGCCATGTGTGCCTCAGGTGGCTCTTGGCGGCTTCATGCCGCTCGCGGTGTTTTTGGCGGGGGGGCCCTT
CACGGCCCTTTGCCACTTTTATGAACCTGGCACCGCTGGCGGGCTGGCGGGCGCAGCCAGCCGGCGGAGC
AGAAGTGGCGCAGCTGGCAGATGTGCAGCTGGCAGCCGGCTGGTGGGCTGGCGGTGGTCCCGCACGTG
GGTGGAGGGGAGGGAAGGC GAATGATAGGGGCCCTGAAGACAGCGCTGAAACCATAGCCAACCTCCGAGGG
AAGGAAACCGAAGGGATGTGCAACAGGGCAATAGGGCGGTGGGGTGCCTGGGGGTGGAC CAGCACCTG
GTGTAGTGGCTGTGGTGTGTGTAGTGTGTGGCGAACACAGGTGGAGGAGCTACCCAAATTGACGTGCCG
GCCCTATATCCCTTTGCTCCATTATCATCTCCTGCTGACTGCCTGCCTATCTGACTGACTGACTGACTGACTA
CAGCTGTCCTTCAAGGGCGGTAGCGACCGCCAAACGCTGGTGCAGCAGCTGCCGGCTGGCGGGCCACGCT
GCTGTTTGGCTGTGCGCCCTACCGCAGCTGTGGGTGCGGATTCGGAAAGGGCGGGGCGAGCGCGCCAG
GGGTACCGCGTCTTGAATTTGGCGGCGCAGCCGCTGGAGCAATGCACAACGTGGATGGTGTCACTG
CCGCGGTTCGCAAGGGCGCCAGCCCTGAGCCCTACCCATGCCCTCGGCGCTGTGACCTATGCACCCCTCTT
CCACCCAACCGCACGCACACACACACACACACTCACACACTCACTCATGCACGCACACACTCACT
CATGCACGCACGCACGCACCGCCCTGCAGCTCCGCAACCTGCTTGAGCCACAGAGCCTGGAGGGCCTGAGC
GTGGCCACCATGCTGCTGGCGCTGCTGGGCAACCGCTCATGTTGCCCGGGCGCTGTTCTGTGCGCGAGCT
GGTGTGGCTCAGCGGCACCTGCTGGGCGTGCAGCGGGCTGGGGTCAAGTGTTCAGCATGTTCCGACGGC
CGTCCGCGGCCACACCTGAGCGGGCGGGAGGGCAGGGCGGGAAGCGGTGGGAGTGGAGAGGTGGAGG
CGGGGTGTCCGGTAGGGCAAGGGTATGGAGCGGAGGATGGCGTCAACCGGCCCGGAGGCAGGTGTGCA
GGCAGCTGCGTGTTCGCAACCGCGGCTTGTGACCTCCCGGGGCACAGGTGCCCTGCATAATGCTCGCG
CTCGTGACGCGCGCTCTCTGAGCCCTGGGTGTTCTTCTCATCACCGGGCGCTGCTGTGTAACACTG
GCTACGTGGTGGTGCAGCACCGGAGAGCCACAGCGGGCGAGCAAGCCCGCGGCCGCATAA

```

Figure 54 – Analyse de la séquence du gène *MEX1* utilisée dans le vecteur de complémentation pSLHyg*MEX1*.

La séquence de l'ADN complémentaire est surlignée en vert, les séquences des amorces utilisées lors de la RT-PCR en bleu. Les mutations formées pendant d'amplification de ce gène par PCR sont représentées en rouge. Une des mutations ponctuelles est présente dans un intron situé entre les deux amorces utilisées en RT-PCR.

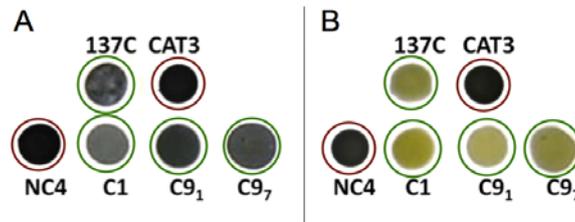


Figure 55 – Crible à l'iode des complémentants du mutant CAT3 (2^{ème} complémentation).

(A) Coloration à l'iode de patches cellulaires incubés 5 jours à la lumière sur milieu carencé en azote. (B) Coloration à l'iode des mêmes souches après levée de carence et incubation à l'obscurité pendant 24h. Les souches C1, C91 et C97 provenant de la transformation du mutant CAT3 par le vecteur de complémentation (pSLHygMex) présentent un phénotype sauvage. La souche NC4 obtenue en transformant le mutant CAT3 avec le vecteur pSLHyg sans insert garde son phénotype mutant.

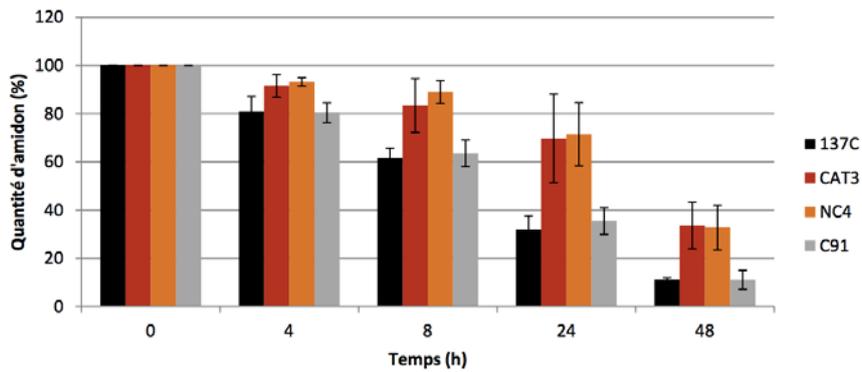


Figure 56 – Cinétique de dégradation des clones obtenus lors de la transformation du mutant CAT3.

La quantité d'amidon, après passage à l'obscurité pour différents temps, est présentée en pourcentage par rapport au T₀ (levée de carence et début d'incubation à l'obscurité). Les résultats et les écart-types proviennent de 3 expériences indépendantes.

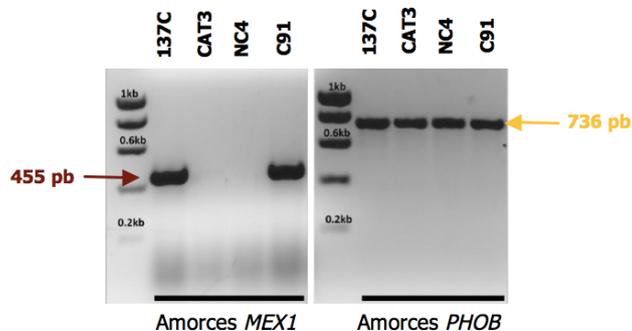


Figure 57 – Analyse de l'expression du locus *MEX1* par RT-PCR sur les ARNs totaux de 137C, CAT3, CAT3NC4 et CAT3C91.

Les résultats de l'amplification d'un fragment de l'ARN messager de *MEX1* par RT-PCR sont présentés sur le gel d'agarose de gauche (2 %). La bande de 455 pb correspondant à un fragment du locus *MEX1* amplifié par les amorces RTMexC et RTMexE est présente chez le sauvage 137C et le complémentant CAT3C91. Cette bande est absente chez le mutant CAT3 ainsi que chez la souche CAT3NC4 provenant de la transformation du mutant avec le vecteur sans insert. Le gel d'agarose de droite (1 %) représente le produit de PCR à 736 pb obtenu par RT-PCR de contrôle permettant l'amplification d'un fragment de l'ARN messager de la phosphorylase. Un témoin de masse moléculaire a été déposé dans le premier puits de chaque gel. Quelques tailles de référence de ce dernier sont indiquées.

L'expression du locus *MEX1* a été étudiée par RT-PCR chez la souche sauvage, le mutant CAT3 ainsi que la souche CAT3NC4 et le complémentant CAT3C91 (**Figure 57**). On observe clairement un retour de l'ARNm chez le complémentant que l'on peut logiquement relier à un mécanisme de dégradation normal chez cette souche. Puisque l'expression d'une copie sauvage du gène *MEX1* permet de rétablir une capacité normale de mobilisation de l'amidon chez le complémentant CAT3C91, nous concluons que l'absence de cette fonction est responsable du défaut de dégradation de l'amidon observé chez la souche mutante CAT3.

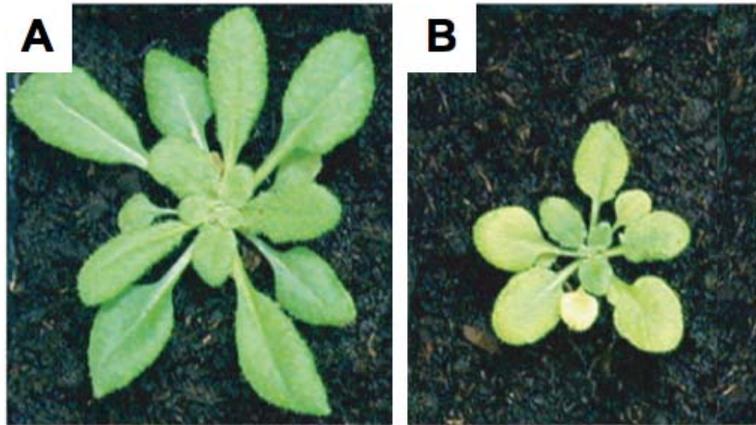


Figure 58 – Croissance des plantes sauvage Col-0 (A) et mutante *mex1-* (B) (Niittylä *et al.*, 2004).

La croissance des plantes est observée en cycles de 12h de lumière suivies de 12h d'obscurité. Un défaut de croissance et une décoloration des feuilles sont observés chez la plante mutante (*mex1-*) signe d'un contenu en chlorophylle amoindri par rapport à la plante sauvage (Col-0).

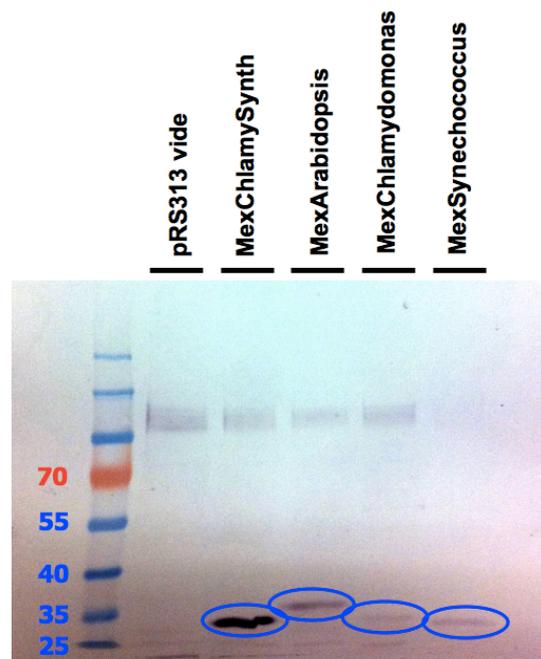


Figure 59 – Analyse de l'expression hétérologue des différentes protéines MEX1 chez *Saccharomyces*.

Les différentes constructions sont testées afin de vérifier l'expression des MEX1 d'Arabidopsis, de *Synechococcus*, de *Chlamydomonas* et du gène synthétique MEX1 de *Chlamydomonas* (construction contenant des codons optimisés pour la levure). L'ensemble des constructions testées permet l'expression des protéines. La levure transformée par le plasmide pRS313pT1 sans insert a servi de témoin lors de cette expérience.

IV. IMPLICATION DU TRANPORTEUR *MEX1* DANS LE CATABOLISME DE L'AMIDON

1. Le mutant homologue chez *Arabidopsis thaliana*

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, il existe une protéine de la membrane interne du plaste décrite comme étant un transporteur de maltose qui est essentielle pour la conversion d'amidon en saccharose pendant la nuit dans les feuilles. Le transporteur a été identifié en isolant deux mutants alléliques qui possèdent des quantités d'amidon et de maltose très élevées, accompagné d'un défaut de dégradation d'amidon (Niitylä *et al.*, 2004). Ces mutations affectent un gène appelé *MEX1* qui a été défini comme codant pour un transporteur de maltose. Le phénotype sévère des mutants *mex1* démontre que ce transporteur représente la voie prédominante d'export de glucides du chloroplaste vers le cytosol durant la nuit chez cette plante.

Les plantes mutantes présentent un défaut de croissance et contiennent moins de chlorophylle par rapport aux plantes sauvages, Col-0 (Figure 58). Elles possèdent un caractère surproducteur d'amidon et les taux de synthèse et de dégradation du polysaccharide insoluble sont également réduits chez ces plantes. Un phénotype intéressant du mutant *mex1* d'*Arabidopsis* repose sur la présence de 40 fois plus de maltoses accumulés dans le chloroplaste lors de la phase de dégradation. Chez le mutant CAT3 de *Chlamydomonas* déficient pour la fonction homologue, une telle suraccumulation de maltose n'a pas pu être détectée. Cette contradiction nous a poussés à savoir si le *MEX1* de *Chlamydomonas* jouait le même rôle que celui d'*Arabidopsis*. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'expression de cette protéine chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez *Escherichia coli*.

2. Etude de l'expression de *MEX1* chez la levure

Afin d'étudier la fonction et la spécificité de la protéine *MEX1*, nous avons exprimé les différents transporteurs de maltose d'*Arabidopsis thaliana*, de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Synechococcus sp.* (PCC7002) chez *Saccharomyces*

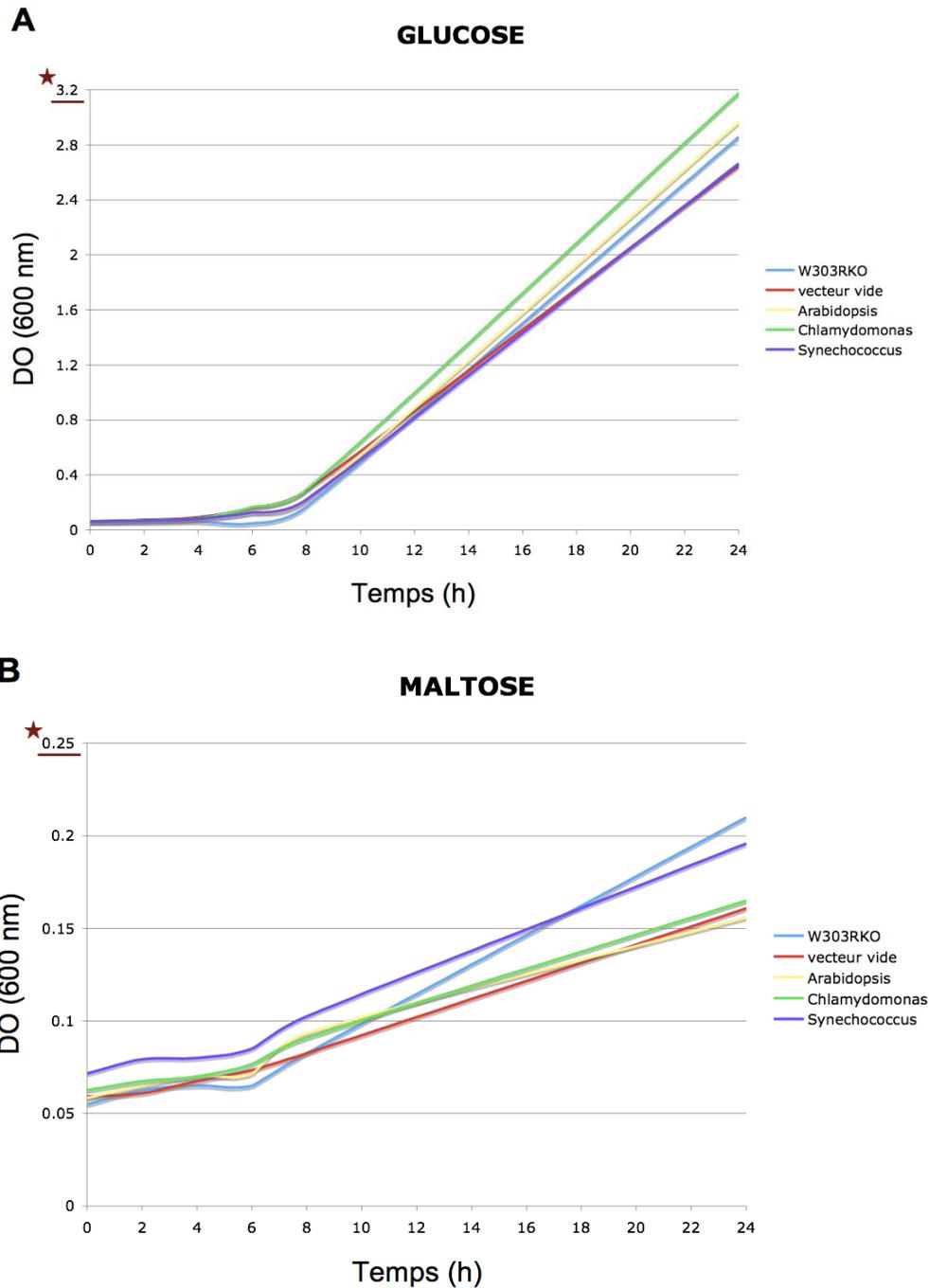


Figure 60 – Croissance des levures W303RKO portant les différents MEX1 sur SC-His contenant du glucose (A) ou du maltose (B).

(A) La souche W303RKO (auxotrophe pour l'histidine et déficiente pour toutes les perméases de maltose) et les levures transformées par le vecteur pRS313pTI contenant les différentes protéines MEX1 et par le vecteur sans insert montrent toutes une croissance normale (DO ~ 3) sur le milieu minimum SC-His contenant du glucose (20 % m/v). (B) Aucune levure n'arrive à croître sur le milieu minimum contenant 20 % (m/v) de maltose (DO < 0.2).

cerevisiae (W303RKO). Cette souche est déficiente pour toutes les perméases de maltose présentes chez la levure et est auxotrophe pour l'histidine.

Le génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii* possède un fort pourcentage de GC (62%) (**Sueoka, 1960**), ce qui peut empêcher la synthèse correcte de la protéine. Afin d'obtenir l'expression de *MEX1* de *Chlamydomonas* dans ces systèmes hétérologues, nous avons utilisé un gène synthétique avec des codons optimisés pour la levure. Après l'ajout d'une séquence consensus (AAAAUGUGU) pour une expression correcte chez *Saccharomyces*, nous avons amplifié les gènes de *Chlamydomonas*, d'*Arabidopsis* et de *Synechococcus* par PCR et les avons clonés dans le vecteur pRS313pTI (voir Matériels & Méthodes). Après vérification par séquençage, les vecteurs obtenus ont été utilisés afin de transformer la souche W303RKO de levure. La présence des protéines *MEX1* a été testée par western blot (voir Matériels & Méthodes) à partir des membranes de levure purifiées (**Figure 59**). L'ensemble des constructions testées permet l'expression des protéines comme le montre le western blot à l'exception du plasmide sans insert utilisé comme témoin pour la transformation.

Le vecteur pRS313pTI possède également un gène *HIS3* qui permettra aux transformants de levure de pousser sur un milieu sans histidine. La croissance de ces transformants a été étudiée sur le milieu SC solide et liquide contenant comme seule source de carbone soit du maltose (20%) soit du glucose (20%). Les souches W303RKO non transformées et transformées avec le vecteur vide ont servi de témoins lors de cette expérience. Après une croissance de 48h sur milieu riche YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), toutes les souches ont été transférées en milieu SC-His contenant du glucose ou du maltose et leur croissance a été suivie au spectrophotomètre à 600nm. Aucune levure exprimant la protéine n'a montré une croissance significative sur le milieu contenant uniquement du maltose comme source de carbone alors qu'une croissance normale est observée sur le milieu contenant du glucose (**Figure 60**).

3. Etude de l'expression de *MEX1* chez *Escherichia coli*

En parallèle, l'expression hétérologue de *MEX1* d'*Arabidopsis* et de *Chlamydomonas* a également été étudiée chez la souche TST6 d'*Escherichia coli*. Cette souche est déficiente pour le transporteur de maltose de la bactérie appelé, MalF. Le

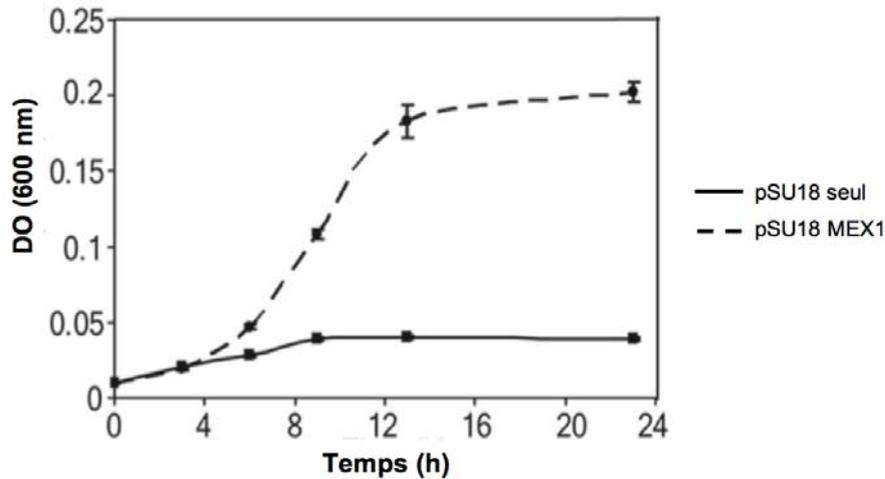


Figure 61 – Complémentation hétérologue chez la souche KU98 d'*E. coli* déficient pour le transporteur de maltose MalF (Niittylä *et al.*, 2004).

La croissance des bactéries KU98 d'*E. coli* transformées par le vecteur vide et le vecteur PSU18MEX1 est suivie au spectrophotomètre à 600 nm dans le milieu minimum (M9) contenant 0.5 % (m/v) de maltose comme unique source de carbone. Les résultats de cette étude proviennent de cinq expériences indépendantes (Niittylä *et al.*, 2004).

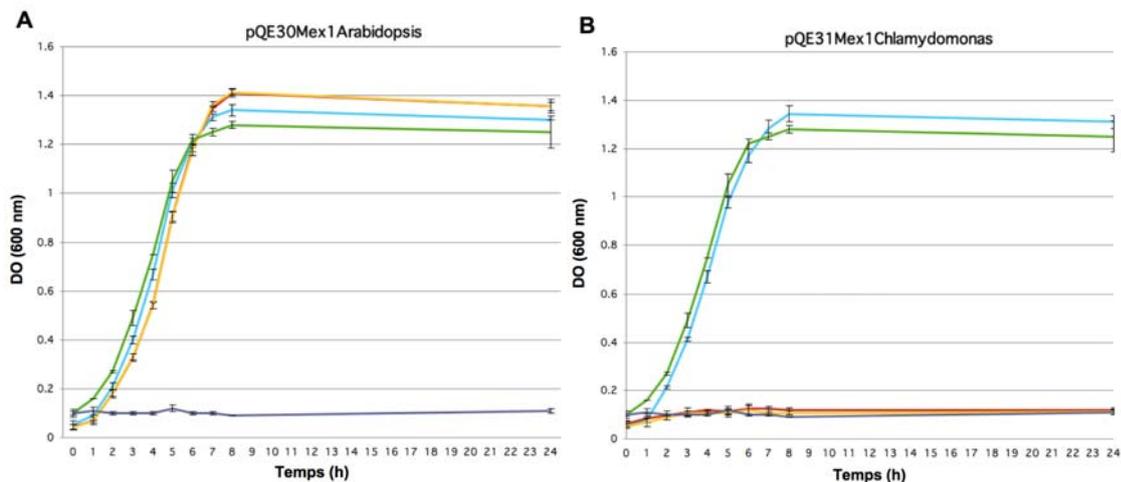


Figure 62 – Croissance des bactéries TST6 exprimant les différents MEX1 sur M9 contenant du glucose ou du maltose.

(A) Croissance des bactéries TST6 exprimant le MEX1 d'Arabidopsis. (B) Croissance des bactéries TST6 exprimant le MEX1 de Chlamydomonas. L'expression des protéines MEX1 est induite à l'IPTG. La souche TST6 d'*E. coli* est déficiente pour le transporteur de maltose MalF et est incapable de croître sur un milieu contenant uniquement du maltose comme seule source de carbone. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes. Les courbes en bleu, rouge et jaune représentent respectivement la croissance des transformants en glucose, maltose et maltose après induction par l'IPTG. Les courbes de croissance des souches non transformées sur glucose et maltose sont indiquées en vert et violet respectivement.

mutant *malF* est incapable de croître sur un milieu contenant uniquement du maltose comme seule source de carbone. Ce type d'expérience avait été utilisé afin de prouver le rôle de MEX1 d'*Arabidopsis* dans le transport de ce sucre (Niitylä *et al.*, 2004). Cette étude a montré que les bactéries KU98 d'*E. coli* transformées avec le gène *MEX1* d'*Arabidopsis* sont capables de se développer sur le milieu minimum M9 ne contenant que du maltose (0.5 % m/v) comme seule source de carbone (Figure 61). Cependant, la croissance limitée ($DO_{600} < 0,2$) et l'apparition d'une phase stationnaire précoce des bactéries obtenues lors de cette expérience nous ont encouragées à reproduire cette expérience et à comparer l'efficacité de transport des différentes protéines MEX1.

Après amplification des différents *MEX1* par PCR (voir Matériels & Méthodes), nous les avons clonés dans le vecteur pQE30 sous le contrôle de l'opérateur *lacO* afin de disposer d'un système inductible par l'IPTG (l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Ce vecteur confère également la résistance à l'ampicilline. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB solide contenant 100 μ g/mL d'antibiotique. Après purification et vérification des différents vecteurs, ceux-ci ont été utilisés afin d'étudier la croissance bactérienne sur le milieu minimum M9 solide et liquide contenant de l'ampicilline (100 μ g/mL), de l'IPTG (1 mM) et, comme source de carbone, uniquement du maltose (0.4 % ou 0.8 % m/v) ou du glucose (0.4% ou 0.8 % m/v). La souche d'*E. coli* TST6 non transformée a été utilisée comme témoin lors de cette expérience. La croissance des différents transformants et des témoins a été mesurée au spectrophotomètre à 600 nm. Une croissance normale est observée pour la souche TST6 sur le milieu contenant du glucose. Les bactéries transformées avec le gène *MEX1* d'*Arabidopsis* ont été les seules à croître sur le milieu minimum ne contenant que du maltose (0.8 % m/v) comme source de carbone (Figure 62). La croissance de ces bactéries a été observée même sans induction à l'IPTG. Par contre, aucune croissance n'a pu être observée pour les bactéries contenant le gène de *Chlamydomonas* laissant présager que la protéine de l'algue n'est pas capable de médier ce transport ou alors avec une efficacité moins grande que celle de son homologue d'*Arabidopsis*.

4. Etude du transport de maltose par radioactivité

L'étude de la croissance des bactéries et des levures exprimant les protéines MEX1 de différents organismes dans un milieu contenant uniquement du maltose

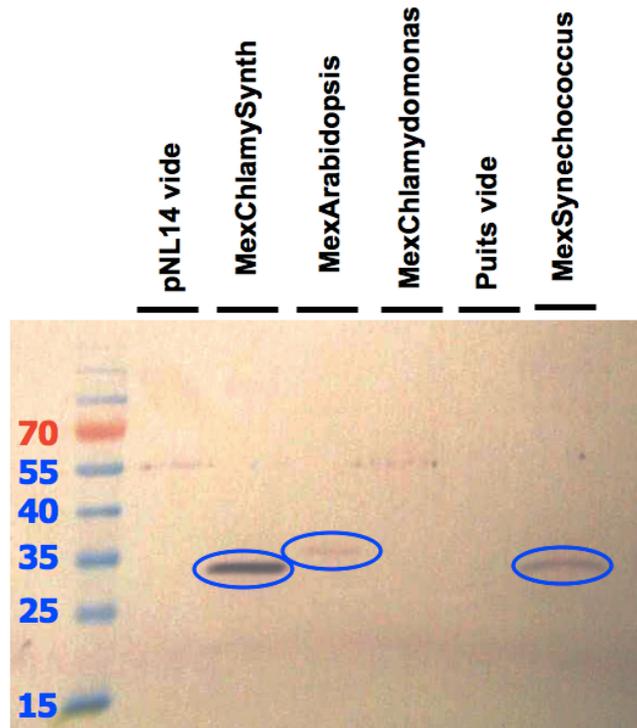


Figure 63 – Analyse de l’expression hétérologue des différentes protéines MEX1 chez la souche INVSc1 de Saccharomyces.

Les différentes constructions sont testées chez la levure afin de vérifier l’expression des MEX1 d’Arabidopsis, de Synechococcus, de Chlamydomonas et du gène synthétique *MEX1* de Chlamydomonas. L’ensemble des constructions permet l’expression des protéines à l’exception du gène endogène de Chlamydomonas. La levure transformée par le plasmide pNL14 sans insert a servi de témoin lors de cette expérience.

comme seule source de carbone ne nous a pas permis de confirmer que le transporteur MEX1 de *Chlamydomonas reinhardtii* possède les mêmes caractéristiques que son homologue d'*Arabidopsis thaliana*. Afin de vérifier si le maltose est le substrat spécifique de la protéine MEX1, nous avons, en parallèle, tenté d'étudier les aspects cinétiques de ce transporteur via son expression dans des liposomes chez la levure en collaboration avec l'équipe du Prof. Andreas WEBER de l'Université de Düsseldorf (Allemagne). Afin d'étudier la fonction et la spécificité de la protéine MEX1, nous avons exprimé les différents transporteurs de maltose d'*Arabidopsis thaliana*, de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Synechococcus* sp. (PCC7002) chez *Saccharomyces cerevisiae* (INVScI). Cette souche possède une auxotrophie pour l'uracile.

Après l'ajout d'une séquence consensus (AAAAUGUGU) pour une expression correcte chez la levure, nous avons amplifié les gènes de *Chlamydomonas*, d'*Arabidopsis* et de *Synechococcus* par PCR et les avons clonés cette fois-ci dans le vecteur pNL14 (voir Matériels & Méthodes) qui confère la résistance à l'ampicilline. La sélection des souches *E. coli Top10* transformées par ce vecteur a été faite sur le milieu LB contenant cet antibiotique. Les vecteurs ont été purifiés à partir de ces transformants afin de vérifier leurs séquences et ensuite utilisés pour transformer la souche INVScI de la levure. Ce vecteur possède également un gène *URA3* qui permettra aux transformants de levure de pousser sur un milieu sans uracile. L'induction et l'expression de ces protéines ont été obtenues par l'ajout du galactose (20 %) dans le milieu. La présence des protéines MEX1 a été testée par western blot (voir Matériels & Méthodes, chapitre V.4.) à partir des membranes de levure purifiées (**Figure 63**). L'ensemble des constructions testées permet l'expression des protéines, à l'exception du plasmide contenant la séquence du *MEX1* endogène de *Chlamydomonas*.

Les membranes de levures exprimant correctement les transporteurs MEX1 ont été purifiées et insérées dans des liposomes afin d'étudier le flux de maltose marqué au ¹⁴C (voir Matériels & Méthodes). Les protéoliposomes ont été transférés dans le milieu de transport contenant 22 mM de maltose (dont 160 μM de maltose radioactif) afin d'avoir une concentration finale de maltose de 1 mM ou 5 mM dans un volume final de 1.1 mL. La radioactivité à l'intérieur des vésicules a été mesurée à l'aide d'un détecteur à scintillation au bout de 1 min, 2 min, 4 min, 8 min et 16 min. Le standard pour les mesures est constitué de 5 μL de solution de maltose radiomarqué (160 μM dans 22

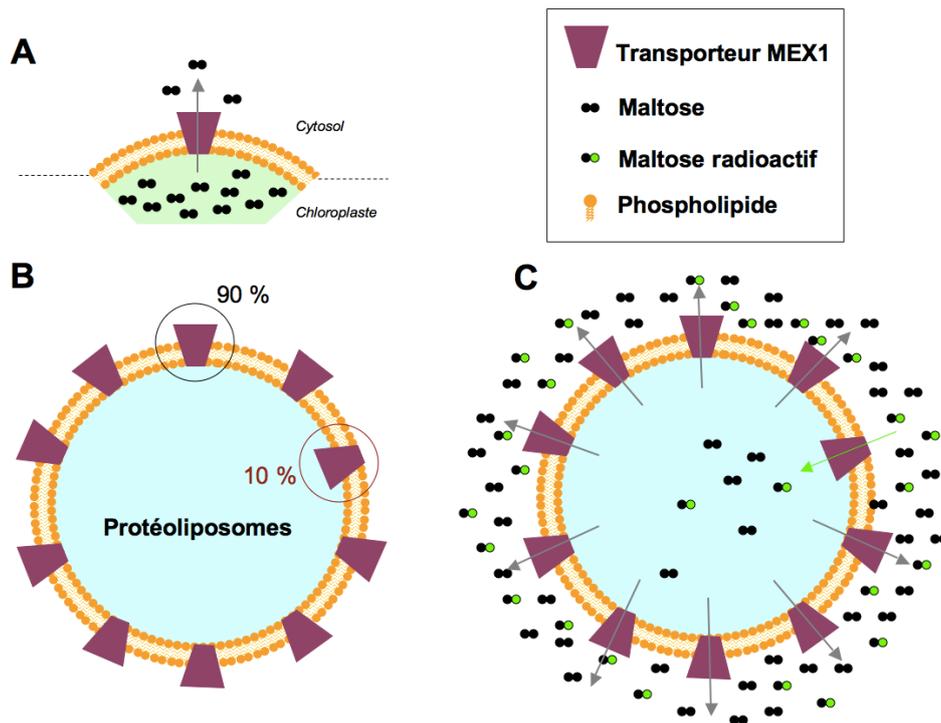


Figure 64 – Orientation de la protéine MEX1 dans les protéoliposomes.

(A) Schéma représentatif de l'export de maltose du chloroplaste vers le cytosol, pendant la nuit dans les feuilles d'Arabidopsis. (B) Reconstitution des protéoliposomes. L'intégration de la protéine MEX1 dans les liposomes se réalise, dans 90 % des cas, dans le sens favorisant l'export du maltose. La possibilité d'intégration de cette protéine dans le sens inverse est de 10 % (encerclé en rouge). (C) Transport du maltose radioactif à l'intérieur des vésicules. Seulement 10 % des protéines MEX1 seront capables de transporter le maltose radioactif à l'intérieur des vésicules mais celui-ci risque d'être exporté aussi rapidement par les autres protéines MEX1 présentes sur la membrane des protéoliposomes.

mM de maltose froid). Les protéoliposomes construits à partir des membranes de levures contenant le vecteur sans insert ont été utilisés comme témoin négatif lors de ces expériences. Nous avons également utilisé deux autres contrôles en inactivant les protéines par la chaleur (pendant 10 min à 95°C) avant la formation des protéoliposomes ou en ajoutant un mélange d'inhibiteurs (60 mM PLP, protéines de liaison aux pénicillines ;16 mM Mersalyl et 10 mM NEM, N-éthylmaléimide) avant le transfert dans le milieu de transport. Malgré toutes nos tentatives, nous n'avons hélas pas pu observer la présence de maltose radioactif à l'intérieur des protéoliposomes contenant les différents transporteurs MEX1. Cela pourrait être expliqué par l'orientation du transporteur lors de l'intégration dans les liposomes. A ce jour, la nature de ce transporteur de maltose est inconnue. On ne sait pas si ce transporteur MEX1 est de type uniport, symport ou antiport. De plus, ce type d'expérience dépend également de l'orientation de la protéine dans les liposomes. Ces inconnues ne nous permettent pas de conclure sur l'inefficacité de ces protéines à transporter le maltose. *In vivo*, il est suggéré que le transporteur MEX1 est responsable de l'export du maltose du chloroplaste vers le cytosol. Nous pouvons donc imaginer que la topologie de ce transporteur lui permet de s'intégrer dans les liposomes dans le sens à exporter le maltose préexistant à l'intérieur des vésicules alors que le maltose radioactif se trouve à l'extérieur des vésicules lors de nos expériences (**Figure 64**). Afin d'éviter la contamination par la radioactivité des matériels du laboratoire, la reconstitution de protéoliposomes contenant du maltose radioactif à l'intérieur des vésicules n'a pas pu être effectuée. Ce travail ne nous a donc hélas pas donné plus d'information quant à la capacité de MEX1 à transporter du maltose.

5. Etude de l'expression de MEX1 de Chlamydomonas chez le mutant mex1 d'Arabidopsis

Les doutes posés par nos résultats quant à l'expression de la protéine de Chlamydomonas dans la levure et la bactérie nous ont poussés à tenter de vérifier si le MEX1 de l'algue jouait le même rôle que celui d'Arabidopsis dans la dégradation de l'amidon. Afin d'aborder cette problématique, nous avons décidé de tester la capacité de la protéine de Chlamydomonas à se substituer à celle d'Arabidopsis. Pour cela, nous avons voulu déterminer si l'expression hétérologue du gène synthétique de MEX1 de Chlamydomonas pouvait compléter la mutation du transporteur orthologue

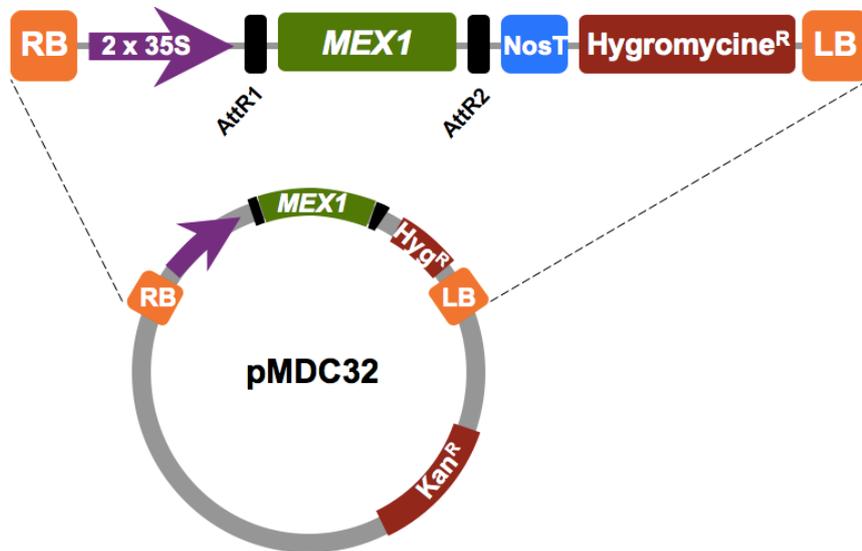


Figure 65 – Carte du vecteur pMDC32 contenant le gène *MEX1* de *Chlamydomonas*.

Le vecteur pMDC32 contient un gène qui confère la résistance à la kanamycine à *E. coli* ou *A. tumefaciens*. L'ADN-T qui sera transféré dans le génome des plantes *mex1-* d'*Arabidopsis* est composé des bords droit et gauche (RB et LB), et possède un promoteur fort 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (2x35S). La séquence d'ADN codant *MEX1* de *Chlamydomonas* est encadrée par les sites Att (AttR1 et AttR2) qui ont permis son insertion par recombinaison homologue (système Gateway). Le NosT est le terminateur de la nopaline synthétase. L'ADN-T contient également un autre gène qui confère la résistance à l'hygromycine B permettant la sélection des plantes transformées.

d'Arabidopsis.

5.1. Construction du vecteur d'expression

Nous avons choisi d'intégrer la séquence codant le peptide de transit de MEX1 d'Arabidopsis en amont de la séquence de Chlamydomonas (délétée du peptide de transit endogène) pour assurer un adressage correct de la protéine dans la cellule (voir Matériels & Méthodes). La séquence de cette protéine a été intégrée dans un vecteur d'entrée appelé pENTR D-TOPO par la méthode de TOPO-Cloning (Invitrogen®). Cette construction a été utilisée pour transformer des bactéries thermocompétentes d'*E. coli* (*Top10*). La sélection des bactéries transformées a été effectuée sur le milieu LB contenant de la kanamycine (40 µg/mL). Après purification, la construction du vecteur d'entrée a été vérifiée par une analyse de restriction suivie d'un contrôle par séquençage. Une fois les séquences vérifiées, elles ont été transférées dans le vecteur de destination appelé pMDC32 (**Figure 65**) grâce à la technique « Gateway » (voir Matériels & Méthodes). Ce vecteur navette peut être maintenu dans les souches d'*E. coli* ou d'*Agrobacterium tumefaciens* en conférant la résistance à la kanamycine des cellules transformées. Par ailleurs, en contenant une forme modifiée de l'ADN-T, ce vecteur permet de transformer les cellules végétales par agroinfection (infection par *A. tumefaciens*) conférant aux cellules transformées la résistance à l'hygromycine B.

5.2. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* qui servira à la transformation des lignées d'*A. thaliana* possède un plasmide pTi inactif (pMP90) qui confère la résistance à la gentamycine. Ce vecteur contient les gènes de virulence permettant le transfert de l'ADN-T mais pas l'ADN-T lui-même. La souche GV3101 d'*A. tumefaciens* (sensible à la kanamycine) a été transformée avec le vecteur pMDC32 contenant l'ADN-T dans lequel la séquence de *MEX1* de Chlamydomonas est insérée (voir Matériels & Méthodes) afin de transformer les plantes mutantes *mex1* d'Arabidopsis. La double sélection a été réalisée sur le milieu LB contenant de la gentamycine (50 µg/mL) et de la kanamycine (50 µg/mL). Après transformation, nous avons obtenu 18 clones d'*A. tumefaciens* résistants aux deux antibiotiques.

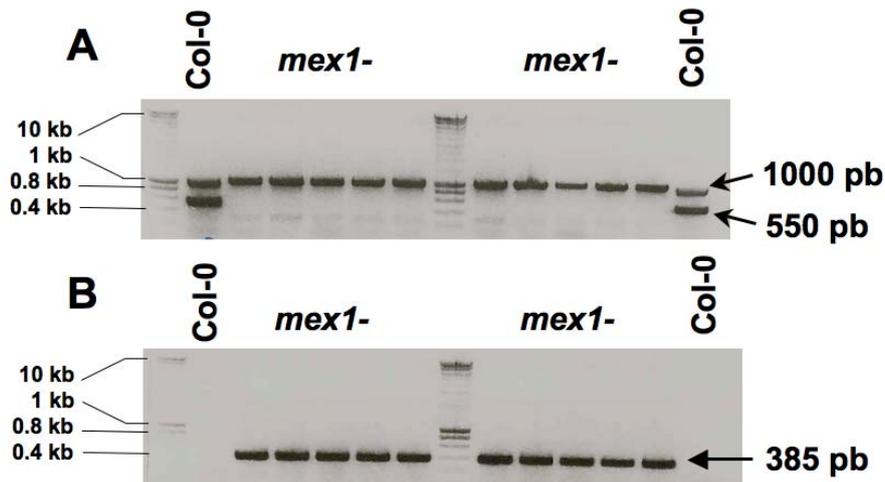


Figure 66 – Vérification du génotype des plantes mutantes *mex1-* par PCR.

(A) Amplification de l'allèle sauvage par les amorces Mex1For2-MexRevaf. Le produit de PCR à 550 pb correspond au fragment d'ADN du gène *MEX1* d'Arabidopsis. Ce fragment n'est présent que chez la plante sauvage Col-0. L'absence de l'allèle sauvage de *MEX1* chez les plantes mutantes montre bien qu'elles sont homozygotes pour cette mutation. La bande à 1 kb amplifiée lors des PCRs sert de témoin pour cette expérience. (B) Amplification de l'allèle muté par les amorces LB1-MexRevaf. Le fragment correspondant à l'allèle muté (385 pb) est présent chez toutes les plantes *mex1-*. L'amorce LB1 permet l'amplification de cet allèle muté en s'hybridant sur l'ADN-T du plasmide pDAP101 qui a provoqué la mutation sur le locus *MEX1*. Cette bande à 385 pb n'est pas observée chez la plante sauvage Col-0.

5.3. Génotypage des lignées d'Arabidopsis

Avant la transformation par agroinfection, le génotype des plantes *mex1* d'Arabidopsis et du sauvage Col-0 a été contrôlé par PCR afin de vérifier la présence de l'allèle sauvage ou de l'allèle mutant. Les amorces Mex1For2 et MexRevaf permettent l'amplification d'une bande à 550 pb en s'hybridant sur le gène *MEX1* d'Arabidopsis alors que les amorces LB1 et MexRevaf permettent l'amplification d'une bande à 385 pb en s'hybridant sur le vecteur pDAP101 et le gène *MEX1* d'Arabidopsis (**Figure 66**). L'existence d'une bande parasite à 1 kb lors de l'amplification par PCR de l'allèle sauvage sert de contrôle pour les plantes mutantes.

5.4. Agroinfection des plantes *mex1* et sélection des transformants

Les plantes *mex1* dont le génotype est correct ont été transformées avec l'agrobactérie possédant la séquence synthétique de la protéine de Chlamydomonas. La transformation a été réalisée par la méthode appelée « Drop by Drop » qui consiste à déposer une goutte de suspension dense d'agrobactéries à la surface des boutons floraux. Un total de 100 plantes a été transformé en utilisant cette méthode. La totalité des graines ont été récoltées et aseptisées avant d'être semées sur un milieu MS gélosé contenant de l'hygromycine B (20 µg/mL). Le taux de germination observé se situe entre 90 et 100%. En effet, même si l'hygromycine B n'empêche pas la germination des plantes, sa présence va très rapidement conduire à la mort des plantules non résistantes. Les plantules résistantes à l'hygromycine B pourront elles poursuivre leur croissance.

Ainsi, les transformants se distinguent des non-transformants environ 15 jours après semis par la longueur de leur hypocotyle. En effet, celui-ci va atteindre 1 cm alors que la longueur de l'hypocotyle d'une plante non transformée ne dépassera pas 2 mm (**Figure 67**). Les plantes sélectionnées sur milieu MS contenant de l'hygromycine B sont, dès la formation de leurs premières feuilles, transférées sur du terreau. Les plantes témoins (les plantes sauvage et mutante *mex1*) ont été traitées de la même manière que les plantes transformées hormis la présence d'hygromycine B dans le milieu de culture.

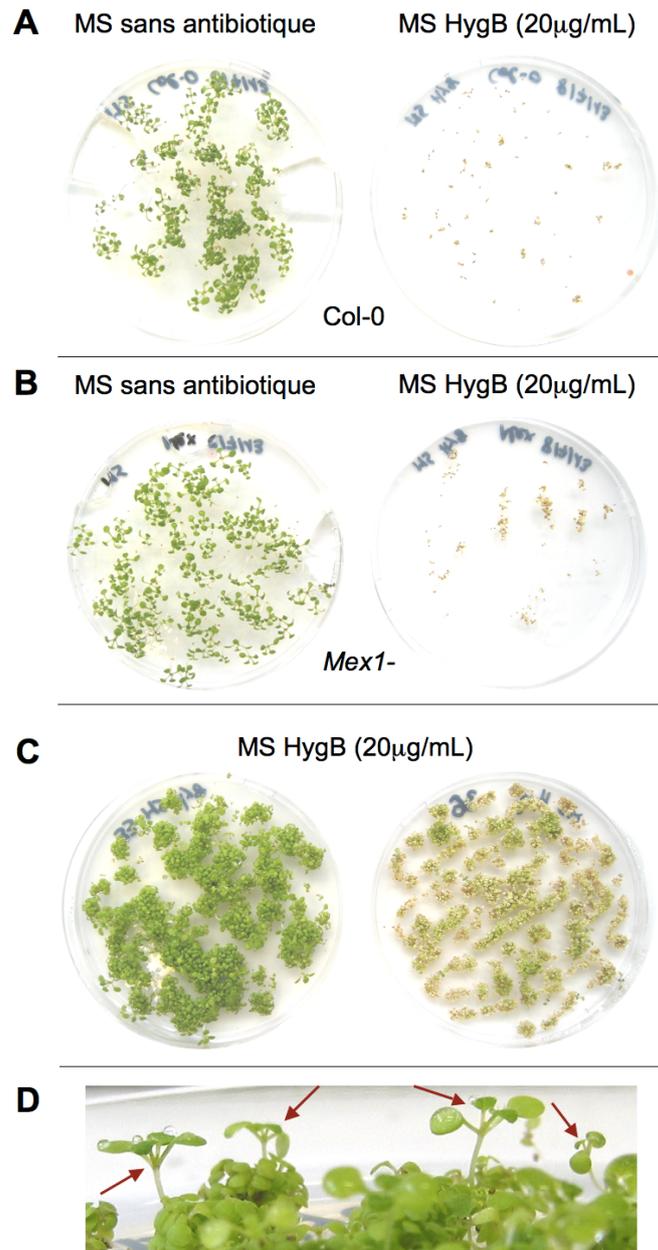


Figure 67 – Sélection des plantes transformées sur le milieu minimum MS contenant de l'hygromycine B (20 µg/mL).

(A-B) Croissance des plantes sauvages (Col-0) (A) et mutantes (*mex1-*) (B) sur milieu minimum MS avec (à droite) ou sans (à gauche) antibiotique. Les photos sont prises 12 jours après germination. Ces plantes sont incapables de se développer sur le milieu contenant de l'hygromycine B. (C) Croissance des plantes transformées par le gène synthétique *MEX1* de *Chlamydomonas*. La photo de gauche représente une transformation réussie alors que la photo de droite montre l'exemple d'une transformation ayant échoué. (D) Détection des plantes transformées. Les plantes sélectionnées sont indiquées par une flèche rouge.

Après sélection, nous avons obtenu 500 plantes transformées.

5.5. Etude des transformants

Afin de vérifier la présence de l'ADN-T dans le génome des plantes sélectionnées, le gène de résistance à l'hygromycine B qui est déjà présent sur l'ADN-T sera amplifié par PCR à l'aide de 2 amorces spécifiques HygrRFor (5'-GATGTAGGAGGG-CGTGGATA-3') et HygrRRev (5'-GATGTTGGCGACCTCGTATT-3'). Il est important à savoir qu'à ce stade de la sélection, les plantes transformées seront probablement toutes hétérozygotes pour l'insertion de l'ADN-T puisque la probabilité d'insertion de 2 copies de l'ADN-T dans le même gène est quasiment nulle.

Une fois la présence de l'ADN-T confirmée, les plantes sélectionnées feront l'objet de l'étude de complémentation et l'expression de *MEX1* chez ces plantes sera vérifiée par PCR en présence des amorces BamSynthF (5'-GGATCCGTTTCTTCTAGA-AAGAAGC-3') et KpnSynthR (5'-GGTACCTTAAGCTGGTCTTGGAGAAGC-3'). En effet, l'intégration de l'ADN-T s'effectue au hasard dans le génome de la plante et le site d'insertion pourrait influencer l'expression du gène d'intérêt (*MEX1*). La quantité de feuilles disponibles par plante étant limitée, nous ne disposons pas de suffisamment de matériel pour extraire l'ADN génomique et en parallèle, étudier la quantité d'amidon et de maltose produite par ces plantes. Ainsi, les graines des transformants sélectionnés pour cette étude seront récoltées et la quantité d'amidon et de maltose produite sera déterminée à partir des feuilles de la génération suivante prélevées en fin de jour (en fin de synthèse) ou en fin de nuit (en fin de dégradation). Ces travaux sont actuellement en cours au laboratoire. Les plantes transformées ont été sélectionnées et les analyses biochimiques seront prochainement réalisées afin de voir si l'expression de la protéine de *Chlamydomonas* peut restaurer au moins partiellement un phénotype normal chez les plantes.

V. DISCUSSION DU ROLE DU TRANSPORTEUR MEX1

Le mutant CAT3 présente le phénotype attendu lors du crible en deux étapes puisqu'il lui reste suffisamment d'amidon après 24h de dégradation pour que l'interaction avec l'iode persiste. Cette souche possède un caractère surproducteur d'amidon et un ralentissement de la dégradation de son polysaccharide de réserve. La technique de PCR inverse nous a permis de localiser le lieu d'insertion du plasmide mutagène pSL18 dans le mutant CAT3, au niveau du gène annoté comme codant pour un transporteur de maltose de l'enveloppe plastidiale appelé MEX1 du fait de son homologie de séquence avec la protéine décrite chez *Arabidopsis*. L'insertion du plasmide mutagène dans le locus *MEX1* entraîne la perte attendue de l'ARN messager correspondant. La souche CAT3 est donc bien déficiente pour cette fonction. L'analyse de la coségrégation entre l'insertion du plasmide mutagène et le défaut de dégradation et la complémentation fonctionnelle du gène *MEX1* permettent de démontrer définitivement la responsabilité de l'absence de cette fonction dans le défaut de dégradation de l'amidon observé chez ce mutant.

Malgré toutes nos tentatives, nous ne sommes pas parvenus à confirmer le rôle de la protéine MEX1 dans la dégradation de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce type de mutant a déjà été caractérisé chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Niittylä *et al.*, 2004), présentant comme le mutant CAT3 une suraccumulation d'amidon. Chez *Arabidopsis thaliana*, la fonction décrite pour MEX1 est l'export du maltose permettant les dernières étapes de la dégradation de l'amidon dans le cytosol. En absence de cette protéine, les plantes mutantes suraccumulent jusqu'à 40 fois plus de maltose dans leurs chloroplastes par rapport aux plantes sauvages alors que ce phénotype n'est pas observé chez les mutants de *Chlamydomonas*. Cette contradiction peut être expliquée par le fait que les deux mutants sont étudiés dans deux situations physiologiques différentes. Chez *Arabidopsis*, il s'agit de la dégradation de l'amidon transitoire, alors que chez *Chlamydomonas* nous avons étudié la mobilisation de l'amidon produit lors d'une période de carence, un système plus proche de la mobilisation de l'amidon de réserve. Néanmoins, l'accumulation de maltose n'a pas non

plus été détectée dans notre mutant en conditions de mixotrophie, ce qui laisse présager la possibilité d'une fonction différente de la protéine chez l'algue. Nous pouvons néanmoins également envisager que la protéine MEX1 puisse jouer deux rôles différents dans la dégradation de l'amidon : une fonction d'export du maltose dans la feuille et une autre fonction à définir lors de la mobilisation de l'amidon de réserve. Une autre possibilité expliquant notre incapacité à détecter du maltose dans le mutant de *Chlamydomonas* pourrait provenir de la présence d'une fonction capable de convertir le maltose au sein même du plaste. Dans ce cas, l'accumulation de maltose ne peut être détectée, cela pourrait également être le cas si ce maltose n'est pas métabolisé dans le plaste mais est modifié le rendant non accessible aux dosages utilisés afin de le détecter. Dans tous les cas, les expériences en cours afin de compléter le mutant de plante avec la protéine de *Chlamydomonas* devrait nous apporter prochainement des informations précieuses quant à la redondance fonctionnelle de ces protéines.

Plusieurs expériences restent à mener afin de tenter de découvrir le rôle de MEX1 dans la dégradation de l'amidon chez *Chlamydomonas*. Nous envisageons donc par exemple d'étudier l'accumulation et la dégradation de l'amidon dans des conditions non carencées au cours de cultures en cycles de 12h de lumière suivies de 12h d'obscurité afin de se rapprocher des conditions utilisées lors du mutant homologue d'*Arabidopsis thaliana*. Afin de comprendre l'absence de maltose dans le mutant CAT3, plusieurs expériences pourraient également être menées. L'absence d'accumulation de polysaccharides solubles chez ce mutant pourrait révéler un processus visant à réduire l'accumulation de maltose chez la microalgue. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette différence. Premièrement, la suraccumulation de maltose pourrait induire un stress dans un organisme aquatique tel que *Chlamydomonas reinhardtii* et engendrer un rétrocontrôle négatif sur les activités de type β -amylases qui sont responsables de la production de maltose. Ce rétrocontrôle négatif pourrait être éprouvé via l'étude en RT-PCR quantitative de l'expression des gènes de β -amylases chez la souche sauvage et le mutant. En parallèle, ces activités pourraient être également dosées grâce à l'utilisation de kits spécifiques (Betamyl-3 Kit, Megazyme, Bray, IRL). Deuxièmement, *Chlamydomonas reinhardtii* pourrait également posséder un système intraplastidial de dégradation du maltose. Le candidat le plus probable pour cette fonction serait une forme plastidiale de la transglucosidase DPE2. Cette enzyme permettrait ainsi la production de glucose, au sein du chloroplaste, qui serait ensuite

exporté vers le cytosol par son propre transporteur pGlcT. Afin de tester cette hypothèse, l'activité de la transglucosidase DPE2 pourrait être dosée dans les différents compartiments cellulaires après purification de chloroplastes de l'algue (**Mason et al., 2006**). Enfin, nous pourrions imaginer que le produit final de la dégradation de l'amidon au sein du plaste de la microalgue ne soit pas le maltose et que la protéine MEX1 puisse jouer un autre rôle que celui d'export du maltose chez la microalgue modèle. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions tenter de purifier les polysaccharides solubles du sauvage et du mutant au bout de 12h, 18h et 24h de dégradation et analyser ceux-ci par RMN après leur séparation par chromatographie sur couche mince (TLC : thin layer chromatography).

*CONCLUSION &
DISCUSSION*

L'amidon est un polysaccharide composé uniquement de glucoses liés en α -1,4 et branchés en α -1,6. Bien que possédant cette structure primaire très simple il a été montré que la nature semi cristalline de ce polysaccharide nécessitait l'action de nombreuses activités enzymatiques différentes. On peut noter que plus de 20 ans d'étude ont été nécessaires afin d'appréhender la biosynthèse de ce polysaccharide de réserve qui même si désormais est bien connue possède encore quelques subtilités non établies. Alors qu'à l'heure actuelle, les mécanismes de synthèse commencent à être bien connus, ce n'est pas le cas des phénomènes nécessaires à la dégradation de ce polymère de glucoses. Les données disponibles à ce jour proviennent des études effectuées sur la feuille d'*Arabidopsis thaliana* mais il faut noter que le modèle établi à ce jour ne représente qu'une situation physiologique bien particulière, celle d'un organe source comme la feuille dont l'unique fonction est de fournir de l'énergie à la plante durant la nuit. De plus la majorité de ces résultats proviennent d'approches de génétique inverse et ne permettent pas de déchiffrer la voie catabolique dans son ensemble puisque ce type d'étude se prête difficilement au déchiffrement des phénomènes de régulation par exemple. Puisque par le passé notre laboratoire d'accueil avait démontré l'intérêt de la génétique formelle afin d'élucider les mécanismes de synthèse du polysaccharide de réserve, il semblait naturel de transposer notre savoir afin de disséquer le catabolisme de l'amidon.

Dans ce contexte, l'objet de ces travaux de thèse était de valider la possibilité d'obtenir des mutants de la voie de dégradation de l'amidon chez la microalgue modèle *Chlamydomonas reinhardtii* par une approche complémentaire de génétique formelle. La première étape consistait en l'adaptation du crible à l'iode afin de mettre en évidence des mutants de dégradation. Alors qu'un défaut de synthèse est révélé directement par une perte ou une modification de l'interaction avec l'iode, un défaut de dégradation nécessite un crible plus subtil. Celui est basé sur une coloration différentielle des mêmes souches après synthèse massive (5 jours en carence azotée) et synthèse suivie d'une période de 24 heures de dégradation (5 jours en carence azotée puis levée de carence et incubation 24h à l'obscurité). Un de nos objectifs était de vérifier que ce crible phénotypique en deux étapes était adéquat et permettait d'identifier des fonctions impliquées dans la voie catabolique que ce soit des fonctions enzymatiques responsables de la dégradation du polysaccharide mais aussi des fonctions de régulation qui ne sont que très difficilement accessibles aux approches de génétique

inverse menées chez *Arabidopsis*. Le crible de notre banque de mutants d'insertion de *Chlamydomonas* (à l'heure actuelle 20 000 clones criblés) nous a permis d'isoler 45 souches indépendantes qui présentent un phénotype d'intérêt sur boîte. Pour 38 d'entre eux ayant fait l'objet de caractérisations préliminaires (**Tunçay et al., 2013**), un tiers montrent une cinétique de dégradation altérée par rapport au sauvage isogénique (137C). Les caractérisations moléculaires effectuées sur cette banque de mutants nous ont permis d'identifier le lieu d'insertion du plasmide mutagène dans 16 souches de notre banque de mutants alors que l'absence d'une activité enzymatique via l'utilisation des zymogrammes n'a été détectée que pour un seul de nos mutants dénommé CAT16.

La majorité des insertions dans nos mutants ont été identifiées par la technique de PCR inverse. Néanmoins, nous avons été capables d'identifier l'absence d'une activité de type sérine / thréonine kinase dans le mutant CAT15 (Cre16.g689550) par la technique de "plasmid rescue". La PCR inverse a mis en évidence l'existence d'autres mutants déficients pour ce type d'activité puisque 3 gènes de kinases distincts sont mutés dans nos souches mutantes (mutants CAT14, Cre06.g266150 ; CAT24, Cre06.g307100 et CAT26, Cre02.g107000). L'étude de ces kinases pourrait nous renseigner plus sur les phénomènes de régulation de la voie catabolique, ils pourraient également refléter des effets pléiotropes de ce type de mutations. Dans tous les cas, les travaux actuellement menés au laboratoire devraient nous permettre d'éclaircir le taux d'implication de ces kinases dans le catabolisme de l'amidon. Parmi nos mutants, nous avons également été capables de détecter des fonctions qui avaient d'ores et déjà été décrites comme importantes pour une dégradation correcte de l'amidon. La découverte dans notre banque de mutants d'une souche déficiente pour le transporteur de maltose MEX1 (mutant CAT3, Cre12.g486600) ou encore une β -amylase (mutant CAT4, Cre06.g307150) nous conforte dans la validité de notre démarche. En effet, notre crible en deux étapes ne reflète pas directement la dégradation de l'amidon puisque de nombreux processus physiologiques sont à l'œuvre lors de celui-ci. Les souches sont d'abord incubées 5 jours en carence azotée afin d'accumuler massivement de l'amidon. Puis la carence est levée par ajout d'une source d'azote et les mutants potentiels sont passés à l'obscurité. L'ensemble de ces étapes représente des perturbations importantes pour la cellule et l'absence de dégradation que nous visualisons peut provenir de défaut de signalisation de ces changements. La détection dans notre banque de mutants pour des fonctions connues comme impliquées dans le catabolisme

nous conforte sur la validité du crible et nous permet d'espérer que les autres mutants soient également impliqués dans ce processus catabolique. Nous avons également été capables d'identifier des mutations pour des fonctions de motilité (mutants CAT22, Cre07.g338300 & CAT25, Cre41.g786650). Ces derniers étaient également attendus puisqu'il est connu que les souches de *Chlamydomonas* incapables de nager présentent un caractère surproducteur d'amidon (**Hamilton et al., 1992**). En effet, la motilité représente un processus consommant beaucoup d'énergie et son absence conduit naturellement à l'accumulation de ces réserves non utilisées. Enfin, nos travaux d'identification des mutations nous ont permis de mettre à jour des mutations pour des loci codant des protéines de fonctions inconnues et pour lesquelles il nous est impossible à l'heure actuelle de juger de leur implication dans la dégradation de l'amidon.

La seule mutation identifiée à l'aide des gels d'activité de type zymogrammes correspond à une défectuosité pour une enzyme de branchement, enzyme reconnue comme intervenant dans le processus synthétique. Le mutant CAT16 qui se caractérise par l'absence d'une bande rose sur un gel amidon après coloration à l'iode, possède un défaut de dégradation qu'il semble difficile d'expliquer en première approche. Ce type de coloration montre que l'amidon contenu dans ce gel a été modifié. La teinte rose / rouge qu'il est impossible de détecter dans le mutant correspond à un enrichissement en points de branchement de l'amidon contenu dans les gels. Il existe deux types d'activité responsables d'une telle modification: les enzymes de branchement ou les β -amylases. Puisque nous avons affaire à un mutant de dégradation, nous pensions que ce mutant était déficient pour une des β -amylase. Les enzymes de branchement introduisent des points de branchement en clivant une chaîne de glucoses reliés par des liaisons α -1,4 et en transférant le fragment généré en position α -1,6 (**Borovsky et al., 1975**), ces enzymes participent donc à l'édification du polysaccharide. Ainsi, ces enzymes vont modifier l'amidon présent dans le gel qui deviendra plus branché et donnera une interaction de couleur rose lors de la coloration à l'iode. Les β -amylases sont des exoamylases qui digèrent les chaînes externes de la molécule d'amylopectine (**Ball et Morell, 2003**). Ces enzymes sont incapables d'hydrolyser les liaisons α -1,6. L'action d'une β -amylase sur l'amidon contenu dans le gel donnera naissance à une molécule plus branchée appelée « β -limit dextrine » qui elle aussi donne une coloration rose en

interagissant avec l'iode. Notre mutant CAT16 pouvait donc être déficient pour l'une de ces activités.

Les β -amylases (BAM) jouent un rôle clé dans la dégradation de l'amidon. Neuf isoformes de β -amylase (BAM1 à BAM9) sont observées chez *Arabidopsis thaliana* dont quatre (BAM1, BAM2, BAM3, BAM4) semblent être adressées au plaste (**Fulton et al., 2008**). Une localisation plastidiale n'a été prouvée que pour l'une d'entre elles dénommée BAM3 (**Lao et al., 1999**) et son implication dans la dégradation de l'amidon a été prouvée (**Kaplan et Guy, 2005**). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, il existe 3 isoformes de β -amylase et l'isoforme homologue à BAM3 représentait donc le meilleur candidat pour notre mutant CAT16.

Chez les plantes, les enzymes de branchement sont classées en deux groupes: BEI et BEII. Il existe deux isoformes pour les enzymes de branchement de type II: BEIIa et BEIIb (**Rahman et al., 2001**). Chez *Arabidopsis thaliana*, la mutation d'une des deux isoformes de BEII engendre des modifications de la structure de l'amylopectine et le double mutant ne contient plus du tout d'amidon révélant le rôle majeur des BEII dans la synthèse de l'amidon (**Dumez et al., 2006**). À l'heure actuelle, aucun rôle dans l'anabolisme de l'amidon n'a pu être établi pour les enzymes de branchement de type I. Si la souche CAT16 devait se révéler être déficiente pour une activité de branchement, il semble fort probable que la mutation touche le gène de la BEI de *Chlamydomonas* plutôt que l'un des deux gènes codant les isoformes IIa et IIb puisqu'aucun phénotype structural n'est observé sur l'amidon de ce mutant. D'ailleurs, la semi-purification de cette enzyme à partir d'un extrait sauvage, a permis de montrer que l'activité absente était bien une enzyme de branchement. Les PCR réalisées sur l'ADN génomique du mutant ont permis de préciser que c'était l'enzyme de branchement de type 1 qui était mutée dans cette souche (Cre06.g289850). A ce stade, nous pouvons envisager plusieurs raisons pouvant expliquer le défaut de dégradation de l'amidon dans notre mutant pour l'enzyme de branchement de type 1. Cette enzyme pourrait par exemple être nécessaire à une dégradation efficace en remodelant les chaînes en cours de dégradation afin d'offrir un substrat adéquat aux activités hydrolytiques. Une autre explication repose sur un phénomène moins direct sur la dégradation. En effet, il a été montré récemment dans un mutant de maïs déficient pour la BE1 que l'amidon de cette plante était plus résistant à la dégradation *in vitro* (**Xia et al., 2011**) et que ce

phénomène serait dû à une modification de sa structure. Une explication possible pour le ralentissement de la dégradation de l'amidon observé dans le mutant CAT16 serait que cette souche produise un amidon de structure moins adaptée à la machinerie de dégradation.

Nos travaux de thèse nous ont permis de valider la démarche expérimentale initiée récemment dans notre laboratoire. Les résultats obtenus nous encouragent à continuer cette approche complémentaire de génétique formelle puisque nous avons été capables de mettre en évidence aussi bien des fonctions déjà connues, telles que le transporteur de maltose (MEX1) ou une isoforme de β -amylase, mais également de mettre à jour la possible implication d'une ou plusieurs kinases dans la régulation de la voie catabolique. Nous avons également identifié des activités inattendues et que l'on peut difficilement relier au processus: comme par exemple une ARF-like GTPase. Nous ne pouvons pas affirmer pour le moment que toutes ces fonctions identifiées sont bien celles qui sont responsables du défaut de dégradation observé puisque les études génétiques n'ont pas encore été effectuées pour l'ensemble de ces mutants. Néanmoins, nos premiers résultats sont encourageants et nous laissent espérer que nous devrions être dans la capacité de décrire des fonctions originales impliquées dans le processus et pour lesquelles les approches de génétique inverse menées par d'autres groupes sont peu adaptées. L'ensemble de ces résultats illustre la validité de la démarche expérimentale initiée récemment dans notre groupe et les prochaines recherches s'axent désormais vers la découverte de ces fonctions non accessibles à la génétique inverse et en particulier les fonctions de régulation du catabolisme de l'amidon.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., et al. (2005). "The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists." Journal of Eukaryotic Microbiology **52**: 399–451.
2. Alonso-Casajus, N., D. Dauvillee, A. M. Viale, F. J. Munoz, E. Baroja-Fernandez, M. T. Moran-Zorzano, G. Eydallin, S. Ball and J. Pozueta-Romero (2006). "Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* Gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(14): 5266-5272.
3. Asatsuma, S., C. Sawada, K. Itoh, M. Okito, A. Kitajima and T. Mitsui (2005). "Involvement of alpha-amylase I-1 in starch degradation in rice chloroplasts." Plant Cell Physiol **46**(6): 858-869.

B

4. Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B. et Decq, A. (1991). "A *Chlamydomonas reinhardtii* low- starch mutant is defective for 3- phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase." Planta **185**: 17-26.
5. Ball, S., H. P. Guan, M. James, A. Myers, P. Keeling, G. Mouille, A. Buleon, P. Colonna and J. Preiss (1996). "From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule." Cell **86**(3): 349-352.
6. Ball, S., van de Wal, M. et Visser, R. (1998). "Progress in understanding the biosynthesis of amylose." Trends Plant Sci **3**(12): 462- 467.
7. Ball, S. G. (2002). "The intricate pathway of starch biosynthesis and degradation in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Aust J Chem **55**: 49-59
8. 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.
9. Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J. N., Tirtiaux, C. (2011). "The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis." Journal of Experimental Botany **62**(6): 1775–1801.
10. Ballicora, M. A., M. J. Laughlin, Y. Fu, T. W. Okita, G. F. Barry and J. Preiss (1995). "Adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. Significance of the N terminus of the small subunit for catalytic properties and heat stability." Plant Physiol **109**(1): 245-251.
11. Ballicora, M. A., Y. Fu, J. B. Frueauf and J. Preiss (1999). "Heat stability of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase: role of Cys residue 12 in the small subunit." Biochem Biophys Res Commun **257**(3): 782-786.

12. Ballicora, M. A., J. B. Frueauf, Y. Fu, P. Schurmann and J. Preiss (2000). "Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin." J Biol Chem **275**(2): 1315-1320.
13. Ballicora, M. A., A. A. Iglesias and J. Preiss (2003). "ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 213-225, table of contents.
14. Ballicora, M. A., A. A. Iglesias and J. Preiss (2004). "ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis." Photosynth Res **79**(1): 1-24.
15. Ballicora, M. A., J. R. Dubay, C. H. Devillers and J. Preiss (2005). "Resurrecting the ancestral enzymatic role of a modulatory subunit." J Biol Chem **280**(11): 10189-10195.
16. Banks, W., Greenwood, C. T. et Khan, K. M. (1971). "The interaction of linear, amylose oligomers with iodine." Carbohydrate research **17**: 25- 33.
17. Baunsgaard, L., H. Lutken, R. Mikkelsen, M. A. Glaring, T. T. Pham and A. Blennow (2005). "A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in Arabidopsis." Plant J **41**(4): 595-605.
18. Berthold, P., Schmitt, R. et Mages, W. (2002). "An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*." Protist **153**: 401-412.
19. Blauth, S. L., Y. Yao, J. D. Klucinec, J. C. Shannon, D. B. Thompson and M. J. Guiltinan (2001). "Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn." Plant Physiol **125**(3): 1396-1405.
20. Blauth, S. L., K. N. Kim, J. Klucinec, J. C. Shannon, D. Thompson and M. Guiltinan (2002). "Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in *Zea mays* L." Plant Mol Biol **48**(3): 287-297.
21. Blennow, A., A. Vikso-Nielsen and M. K. Morell (1998). "Alpha-glucan binding of potato-tuber starch-branching enzyme I as determined by tryptophan fluorescence quenching, affinity electrophoresis and steady-state kinetics." Eur J Biochem **252**(2): 331-338.
22. Blennow, A., A. M. Bay-Smidt, C. E. Olsen and B. L. Moller (2000). "The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity." Int J Biol Macromol **27**(3): 211-218.
23. Boos, W., Shuman, H. (1998). "Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 204–29.
24. Boren, M., Larsson, H., Falk, A. et Jansson, C. (2004). "The barley starch granule proteome - internalized granule polypeptides of the mature endosperm." Plant sci **166**: 617-626.
25. Borkhsenius, O. N., C. B. Mason and J. V. Moroney (1998). "The intracellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in *chlamydomonas reinhardtii*." Plant Physiol **116**(4): 1585-1591.

26. Borovsky, D., E. E. Smith and W. J. Whelan (1975). "The mechanism of branching enzyme action and its influence on the structure of amylopectin." Biochem Soc Trans **3**(1): 48-49.
27. Boyer, C. D. et Preiss J. (1978). "Multiple forms of starch branching enzyme of maize: evidence for independent genetic control." Biochem Biophys Res Commun. **80**(1): 169-75.
28. Bozonnet, S., M. T. Jensen, M. M. Nielsen, N. Aghajari, M. H. Jensen, B. Kramhoft, M. Willemoes, S. Tranier, R. Haser and B. Svensson (2007). "The 'pair of sugar tongs' site on the non-catalytic domain C of barley alpha-amylase participates in substrate binding and activity." FEBS J **274**(19): 5055-5067.
29. Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem. **72**: 248-54.
30. Buleon, A., Colonna, P., Doublier, J. L., Gallant, D. Colloque 'Qualité et Débouchés du Maïs', Bordeaux, France, September 1994.
31. Buleon, A., D. J. Gallant, B. Bouchet, G. Mouille, C. D'Hulst, J. Kossmann and S. Ball (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**(3): 949-957.
32. Buleon, A., P. Colonna, V. Planchot and S. Ball (1998a). "Starch granules: structure and biosynthesis." Int J Biol Macromol **23**(2): 85-112.
33. Buleon, A., Gerard, C., Riekkel, C., Vuong, R. et Chanzy, H. (1998b). "Details of the crystalline ultrastructure of C-starch granules revealed by Synchrotron microfocus." Macromolecules **31**: 6605-6610.
34. Burr, B. et Nelson, O. E. (1975). "Maize alpha-glucan phosphorylase." Eur J Biochem **56**(2): 539-46.
35. Burton, R. A., H. Jenner, L. Carrangis, B. Fahy, G. B. Fincher, C. Hylton, D. A. Laurie, M. Parker, D. Waite, S. van Wegen, T. Verhoeven and K. Denyer (2002). "Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity." Plant J **31**(1): 97-112.
36. Bustos, R., B. Fahy, C. M. Hylton, R. Seale, N. M. Nebane, A. Edwards, C. Martin and A. M. Smith (2004). "Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2215-2220.

C

37. Carciofi, M., Blennow, A., Jensen, S. L., Shaik, S. S., Henriksen, A., Buléon, A., Holm, P. B., Hebelstrup, K.H. (2012). "Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules." BMC Plant Biol. **12**: 223.
38. Caspar, T., Huber, S. C., Somerville, C. (1985). "Alterations in Growth, Photosynthesis,

- and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity." Plant Physiol. **79**(1):11-7.
39. Caspar, T., T. P. Lin, G. Kakefuda, L. Benbow, J. Preiss and C. Somerville (1991). "Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation." Plant Physiol **95**(4): 1181-1188.
 40. Cavalier-Smith, T. (2006). "Cell evolution and Earth history: stasis and revolution." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1470): 969-1006.
 41. Chia, T., D. Thorneycroft, A. Chapple, G. Messerli, J. Chen, S. C. Zeeman, S. M. Smith and A. M. Smith (2004). "A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night." Plant J **37**(6): 853-863.
 42. Chisti, Y. (2008a). "Biodiesel from microalgae beats bioethanol." Trends Biotechnol **26**(3): 126-131.
 43. Chisti, Y. (2008b). "Response to Reijnders : Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants ?" Trends Biotechnol **26**(7): 351-352.
 44. Cho, M. H., H. Lim, D. H. Shin, J. S. Jeon, S. H. Bhoo, Y. I. Park and T. R. Hahn (2011). "Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*." New Phytol **190**(1): 101-112.
 45. Chochois, V., D. Dauvillee, A. Beyly, D. Tolleter, S. Cuine, H. Timpano, S. Ball, L. Cournac and G. Peltier (2009). "Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism." Plant Physiol **151**(2): 631-640.
 46. Chochois V., Constans L., Dauvillee D., Beyly A., Soliveres M., et al. (2010). "Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Int J Hydrogen Energy **35**: 10731–10740.
 47. Colleoni, C., D. Dauvillee, G. Mouille, M. Morell, M. Samuel, M. C. Slomiany, L. Li nard, F. Wattebled, C. D'Hulst and S. Ball (1999a). "Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis." Plant Physiol **120**(4): 1005-1014.
 48. Colleoni, C., D. Dauvillee, G. Mouille, A. Bul on, D. Gallant, B. Bouchet, M. Morell, M. Samuel, B. Delrue, C. D'Hulst, C. Bliard, J. M. Nuzillard and S. Ball (1999b). "Genetic and biochemical evidence for the involvement of alpha-1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis." Plant Physiol **120**(4): 993-1004.
 49. Comparot-Moss, S., O. Kotting, M. Stettler, C. Edner, A. Graf, S. E. Weise, S. Streb, W. L. Lue, D. MacLean, S. Mahlow, G. Ritte, M. Steup, J. Chen, S. C. Zeeman and A. M. Smith (2010). "A putative phosphatase, LSF1, is required for normal starch turnover in *Arabidopsis* leaves." Plant Physiol **152**(2): 685-697.
 50. Coppin, A., J. S. Varre, L. Lienard, D. Dauvillee, Y. Guerardel, M. O. Soyer-Gobillard, A. Buleon, 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**(2): 257-267.

51. Craig, J., Lloyd, J. R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T. L., Martin, C., Hedley, C. L. et Smith, A. M. (1998). "Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos." Plant Cell **10**(3): 413-26.
52. Critchley, J. H., S. C. Zeeman, T. Takaha, A. M. Smith and S. M. Smith (2001). "A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis." Plant J **26**(1): 89-100.

D

53. Dauvillee, D., C. Colleoni, G. Mouille, M. K. Morell, C. D'Hulst, F. Wattebled, L. Lienard, D. Delvalle, J. P. Ral, A. M. Myers and S. G. 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**(4): 1723-1731.
54. Dauvillee, D., I. S. Kinderf, Z. Li, B. Kosar-Hashemi, M. S. Samuel, L. Rampling, S. Ball and M. K. Morell (2005). "Role of the *Escherichia coli* glgX gene in glycogen metabolism." J Bacteriol **187**(4): 1465-1473.
55. Dauvillee, 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. Lienard, L. Cournac, J. L. Putaux, D. Dupeyre and S. G. Ball (2006). "Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant J **48**(2): 274-285.
56. Delatte, T., M. Trevisan, M. L. Parker and S. C. Zeeman (2005). "Arabidopsis mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis." Plant J **41**(6): 815-830.
57. Delatte, T., M. Umhang, M. Trevisan, S. Eicke, D. Thorneycroft, S. M. Smith and S. C. Zeeman (2006). "Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants." J Biol Chem **281**(17): 12050-12059.
58. Delcour, J. A., C. Bruneel, L. J. Derde, S. V. Gomand, B. Pareyt, J. A. Putseys, E. Wilderjans and L. Lamberts (2010). "Fate of starch in food processing: from raw materials to final food products." Annu Rev Food Sci Technol **1**: 87-111.
59. Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszkeski, J. M., Van Den Koornhuyse, N., Maddelein, M. L., Fournet, B. et 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**(11): 3612- 20.
60. Delvalle, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldan, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Merida, A. et D'Hulst, C. (2005). "Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves." Plant J **43**(3): 398-412.
61. Denyer P. et Cortés J. (2001). "Tectonic survey of the Central Pacific coast of Costa Rica." Rev Biol Trop. **49**(Suppl2): 179-83.
62. Derelle E., Ferraz C., Rombauts S., Rouzé P., Worden A. Z., Robbens S., Partensky F., Degroeve S., Echeynié S., Cooke R., Saeys Y., Wuyts J., Jabbari K., Bowler C.,

- Panaud O., Piégu B., Ball S. G., Ral J. P., Bouget F. Y., Piganeau G., De Baets B., Picard A., Delseny M., Demaille J., Van de Peer Y., Moreau H. (2006). "Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features." Proc Natl Acad Sci USA 103(31): 11647-52.
63. Deschamps, P., Haferkamp, I., Dauvillee, D., Haebel, S., Steup, M., Buleon, A., Putaux, J. L., Colleoni, C., d'Hulst, C., Plancke, C., Gould, S., Maier, U., Neuhaus, H. E. et Ball, S. (2006). "Nature of the periplastidial pathway of starch synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*." Eukaryot Cell 5(6): 954-63.
64. Deschamps, P., D. Guillebeault, J. Devassine, D. Dauvillee, S. Haebel, M. Steup, A. Buleon, J. L. Putaux, M. C. Slomianny, C. Colleoni, A. Devin, C. Plancke, S. Tomavo, E. Derelle, H. Moreau and S. Ball (2008 a). "The heterotrophic dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* defines a model genetic system to investigate cytoplasmic starch synthesis." Eukaryot Cell 7(5): 872-880.
65. Deschamps, P., Moreau, H., Worden, A. Z., Dauvillee, D. et Ball, S. G. (2008b). "Early gene duplication within chloroplastida and its correspondence with relocation of starch metabolism to chloroplasts." Genetics 178(4): 2373-87.
66. Deschamps, P., Colleoni, C., Nakamura, Y., et al. (2008c). "Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom." Molecular Biology and Evolution 25: 536–548.
67. Deschamps, P., Haferkamp, I., D'Hulst, C., Neuhaus, E., Ball S. (2008 d). "The relocation of starch metabolism to chloroplasts: when, why and how." Trends in Plant Science 13:1802–1816.
68. Deschamps, P., Haferkamp, I., D'Hulst, C., Neuhaus, E., Ball S. (2008d). "The relocation of starch metabolism to chloroplasts: when, why and how." Trends in Plant Science 13:1802–1816.
69. Deutscher, J., C. Francke and P. W. Postma (2006). "How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev 70(4): 939-1031.
70. Doehlert DC, Knutson CA. (1991). "Two classes of starch debranching enzymes from developing maize kernels." J. Plant Physiol. 138:566–72
71. Doyle, E. A., A. M. Lane, J. M. Sides, M. B. Mudgett and J. D. Monroe (2007). "An alpha-amylase (At4g25000) in *Arabidopsis* leaves is secreted and induced by biotic and abiotic stress." Plant Cell Environ 30(4): 388-398.
72. Dumez, S., F. Wattedled, D. Dauvillee, D. Delvalle, V. Planchot, S. G. Ball and C. D'Hulst (2006). "Mutants of *Arabidopsis* lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation." Plant Cell 18(10): 2694-2709.

E

73. Edwards A., Vincken J. P., Suurs L. C., Visser R. G., Zeeman S., Smith A., Martin C. (2002). "Discrete forms of amylose are synthesized by isoforms of GBSSI in pea." Plant Cell. 14(8): 1767-85.

F

74. Fettke, J., N. Eckermann, S. Poeste, M. Pauly and M. Steup (2004). "The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization." Plant J **39**(6): 933-946.
75. Fettke, J., S. Poeste, N. Eckermann, A. Tiessen, M. Pauly, P. Geigenberger and M. Steup (2005). "Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme." Plant Cell Physiol **46**(12): 1987-2004.
76. Fettke, J., T. Chia, N. Eckermann, A. Smith and M. Steup (2006). "A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG)." Plant J **46**(4): 668-684.
77. Fettke, J., I. Malinova, T. Albrecht, M. Hejazi and M. Steup (2011). "Glucose-1-phosphate transport into protoplasts and chloroplasts from leaves of *Arabidopsis*." Plant Physiol **155**(4): 1723-1734.
78. Fincher, G. B. (1989). "Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains." Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **40**: 305-46.
79. Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M. L., Routier, F., Pepin, T. M., Decq, A., Wieruszkeski, J. M., Delrue, B., Van den Koornhuysse, N. et Bossu, J. P. (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**(22): 16223-30.
80. Foster, K. W. and R. D. Smyth (1980). "Light Antennas in phototactic algae." Microbiol Rev **44**(4): 572-630.
81. Frandsen TP, Lok F, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Svensson B. (2000). "Purification, enzymatic characterization, and nucleotide sequence of a high-isoelectric-point α -glucosidase from barley malt." Plant Physiol. **123**:275-86.
82. Fu, Y., Ballicora, M. A., Leykam, J. F. et Preiss, J. (1998). "Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase." J Biol Chem **273**(39): 25045-52.
83. Fujita N. et Taira T. (1998). "A 56-kDa protein is a novel granule-bound starch synthase existing in the pericarps, aleurone layers, and embryos of immature seed in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.)." Planta **207**(1): 125-32.
84. Fulton, D. C., M. Stettler, T. Mettler, C. K. Vaughan, J. Li, P. Francisco, M. Gil, H. Reinhold, S. Eicke, G. Messerli, G. Dorken, K. Halliday, A. M. Smith, S. M. Smith and S. C. Zeeman (2008). "Beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts." Plant Cell **20**(4): 1040-1058.

G

85. Gaffron, H. and J. Rubin (1942). "Fermentative and Photochemical Production of Hydrogen in Algae." J Gen Physiol **26**(2): 219-240.
86. Goodenough, U.W. (1995). "Molecular genetics of sexuality in Chlamydomonas" Annu. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **46**: 21-44.
87. Ghosh, H. P. et Preiss, J. (1966). "Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts." J Biol Chem **241**(19): 4491-504.
88. Govons, S., N. Gentner, E. Greenberg and J. Preiss (1973). "Biosynthesis of bacterial glycogen. XI. Kinetic characterization of an altered adenosine diphosphate-glucose synthase from a "glycogen-excess" mutant of Escherichia coli B." J Biol Chem **248**(5): 1731-1740.
89. Griffiths, D. J. (1970). "The pyrenoid." Botanical review **36**(1): 29-58.
90. Grossman, A. (2000). "Acclimation of Chlamydomonas reinhardtii to its nutrient environment." Protist **151**(3): 201-224.
91. Guan, H. P. and J. Preiss (1993). "Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (Zea mays)." Plant Physiol **102**(4): 1269-1273.
92. Guinovart, J., J., Gomez-Foix, A., M., Seoane, J., Fernandez-Novell, J., M., Bellido, D. et Vilaro, S. (1997). "Bridging the gap between glucose phosphorylation and glycogen synthesis in the liver." Biochem. Soc. Trans. **25**(1): 157-60.

H

93. Hamilton, B. S., K. Nakamura and D. A. Roncari (1992). "Accumulation of starch in Chlamydomonas reinhardtii flagellar mutants." Biochem Cell Biol **70**(3-4): 255-258.
94. Hanson, K. R. et McHale, N. A. (1988). "A Starchless Mutant of Nicotiana sylvestris Containing a Modified Plastid Phosphoglucomutase." Plant Physiol. **88**(3): 838-44.
95. Hausler, R. E., N. H. Schlieben, B. Schulz and U. I. Flugge (1998). "Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco." Planta **204**(3): 366-376.
96. Harris, E., H. (1989). The Chlamydomonas Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use, Academic Press, San Diego, CA
97. Harris, E., H. (2008). The Chlamydomonas Sourcebook
98. Harrison, C. J., Hedley, C. L. et Wang, T. L. (1998). "Evidence that the rug3 locus of pea (Pisum sativum) encodes plastidial phosphoglucomutase." The Plant Journal **13**(6): 753- 762.
99. Hegemann, P. (1997). "Vision in microalgae." Planta **203**(3): 265-274.

100. Hejazi, M., J. Fettke, S. Haebel, C. Edner, O. Paris, C. Froberg, M. Steup and G. Ritte (2008). "Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization." *Plant J* **55**(2): 323-334.
101. Hejazi, M., J. Fettke, O. Kotting, S. C. Zeeman and M. Steup (2010). "The Laforin-like dual-specificity phosphatase SEX4 from Arabidopsis hydrolyzes both C6- and C3-phosphate esters introduced by starch-related dikinases and thereby affects phase transition of alpha-glucans." *Plant Physiol* **152**(2): 711-722.
102. Hicks, G. R., C. M. Hironaka, D. Dauvillee, R. P. Funke, C. D'Hulst, S. Waffenschmidt and S. G. Ball (2001). "When simpler is better. Unicellular green algae for discovering new genes and functions in carbohydrate metabolism." *Plant Physiol* **127**(4): 1334-1338.
103. Hizukuri, S., Takeda, Y., Abe, J., Hanashiro, I., Matsunobu, G., Kiyota, H. In: Frazier, P.J., Richmond, P., Donald, A. M., editors. (1997). "Starch: Structure and Functionality." *London: Royal Society of Chemistry* **121**.
104. Hovenkamp-Hermelink, J., Jacobsen, E., Ponstin, A., Visser, R., Vos-Scheperkeuter, G., Bijmolt, E., J., d. V., Witholt, B. et Feenstra, W. (1987). "Isolation of an amylase-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.)." *Theoretical and Applied Genetics* **75**: 217-221.
105. Hussain, H., A. Mant, R. Seale, S. Zeeman, E. Hinchliffe, A. Edwards, C. Hylton, S. Bornemann, A. M. Smith, C. Martin and R. Bustos (2003). "Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans." *Plant Cell* **15**(1): 133-149.
106. Hwang, S. K., A. Nishi, H. Satoh and T. W. Okita (2010). "Rice endosperm-specific plastidial alpha-glucan phosphorylase is important for synthesis of short-chain malto-oligosaccharides." *Arch Biochem Biophys* **495**(1): 82-92.

J

107. Iglesias, A. A., Barry, G. F., Meyer, C., Bloksberg, L., Nakata, P.A., Greene, T., Laughlin, M. J., Okita, T. W., Kishore, G. M., Preiss, J. (1993). "Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in *Escherichia coli*." *J Biol Chem.* **268**(2): 1081-6.
108. Imberty, A., H. Chanzy, S. Perez, A. Buleon and V. Tran (1988). "The double-helical nature of the crystalline part of A-starch." *J Mol Biol* **201**(2): 365-378.

J

109. 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**(4): 417-429.
110. Jenkins, P. J., Cameron, R. E., Donald, A. M. (1993). "A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources." *Starch/Stärke* **45**: 417-420.

111. Jones, A. W. and G. Karreman (1969). "Ion exchange properties of the canine carotid artery." Biophys J **9**(7): 884-909.

K

112. Kaneko, T., S. Takahashi and K. Saito (2000). "Characterization of acid-stable glucose isomerase from *Streptomyces* sp., and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener (HFCS) production." Biosci Biotechnol Biochem **64**(5): 940-947.
113. Kaplan, F. and C. L. Guy (2005). "RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress." Plant J **44**(5): 730-743.
114. Kavakli IH, Greene TW, Salamone PR, Choi SB, Okita TW. (2001). "Investigation of subunit function in ADP-glucose pyrophosphorylase." Biochem Biophys Res Commun. **281**(3):783-7.
115. Keeling, P. J. (2009). "Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis." Journal of Eukaryotic Microbiology **56**: 1–8.
116. Kindle, K., L. (1990). "High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*" Proc.Natl.Acad.Sci. USA. **87**:1228-32.
117. Kosourov, S., E. Patrusheva, M. L. Ghirardi, M. Seibert and A. Tsygankov (2007). "A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions." J Biotechnol **128**(4): 776-787.
118. Kotting, O., K. Pusch, A. Tiessen, P. Geigenberger, M. Steup and G. Ritte (2005). "Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase." Plant Physiol **137**(1): 242-252.
119. Kotting, O., D. Santelia, C. Edner, S. Eicke, T. Marthaler, M. S. Gentry, S. Comparot-Moss, J. Chen, A. M. Smith, M. Steup, G. Ritte and S. C. Zeeman (2009). "STARCH-EXCESS4 is a laforin-like Phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell **21**(1): 334-346.
120. Kreis, M., M. Williamson, B. Buxton, J. Pywell, J. Hejgaard and I. Svendsen (1987). "Primary structure and differential expression of beta-amylase in normal and mutant barleys." Eur J Biochem **169**(3): 517-525.
121. Kristensen, M., F. Lok, V. Planchot, I. Svendsen, R. Leah and B. Svensson (1999). "Isolation and characterization of the gene encoding the starch debranching enzyme limit dextrinase from germinating barley." Biochim Biophys Acta **1431**(2): 538-546.
122. Kruger, N.J., and ap Rees, T. (1983). "Properties of α -glucan phosphorylase from pea chloroplasts." Phytochem. **22**, 1891-1898.

L

123. Laby, R. J., D. Kim and S. I. Gibson (2001). "The ram1 mutant of *Arabidopsis* exhibits severely decreased beta-amylase activity." Plant Physiol **127**(4): 1798-1807.

124. Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., Withers, S. G. (2008). "Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms." Annu Rev Biochem **77**: 521-55.
125. Lao, N. T., O. Schoneveld, R. M. Mould, J. M. Hibberd, J. C. Gray and T. A. Kavanagh (1999). "An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase." Plant J **20**(5): 519-527.
126. Leloir L. F., De Fekete M. A., Cardini C. E. (1961). "Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose." J Biol Chem. **236**: 636-41.
127. Libessart, N., M. L. Maddelein, N. Koornhuyse, A. Decq, B. Delrue, G. Mouille, C. D'Hulst and S. Ball (1995). "Storage, Photosynthesis, and Growth: The Conditional Nature of Mutations Affecting Starch Synthesis and Structure in Chlamydomonas." Plant Cell **7**(8): 1117-1127.
128. Li, Y., M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan and N. Dubois-Calero (2008). "Biofuels from microalgae." Biotechnol Prog **24**(4): 815-820.
129. Lin, T.P., and Preiss, J. (1988)." Characterization of D-enzyme (4- α -glucanotransferase) in Arabidopsis leaf." Plant Physiol. **86**:260- 265.
130. Lorberth, R., G. Ritte, L. Willmitzer and J. Kossmann (1998). "Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening." Nat Biotechnol **16**(5): 473-477.
131. Lou, J., K. A. Dawson and H. J. Strobel (1997). "Glycogen biosynthesis via UDP-glucose in the ruminal bacterium *Prevotella bryantii* B1(4)." Appl Environ Microbiol **63**(11): 4355-4359.
132. Lu, Y. and T. D. Sharkey (2004). "The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells." Planta **218**(3): 466-473.
133. Lu, Y. and T. D. Sharkey (2006). "The importance of maltose in transitory starch breakdown." Plant Cell Environ **29**(3): 353-366.

M

134. Makinoshima, H., Aizawa, S. I., Hayashi, H., Miki, T., Nishimura, A., Ishihama, A. (2003). "Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of *Escherichia coli*." J Bacteriol **185**: 1338–1345.
135. Manners, D. (1991). "Recent developments in our understanding of glycogen structure." Carbohydr. Polymers **16**: 37–82.
136. Martin, C. and A. M. Smith (1995). "Starch biosynthesis." Plant Cell **7**(7): 971-985.
137. Mason, C., B., Bricker, T., M. et Moronec, J., V. (2006). "A rapid method for chloroplast isolation from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Nat. Protoc. **1**(5) : 2227-30.
138. Maul, J. E., J. W. Lilly, L. Cui, C. W. dePamphilis, W. Miller, E. H. Harris and D. B. Stern (2002). "The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats." Plant Cell **14**(11): 2659-2679.

139. Melis, A., M. Seibert and M. L. Ghirardi (2007). "Hydrogen fuel production by transgenic microalgae." Adv Exp Med Biol **616**: 110-121.
140. Merchant, S. S., S. E. Prochnik, O. Vallon, E. H. Harris, S. J. Karpowicz, G. B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L. K. Fritz-Laylin, L. Marechal-Drouard, W. F. Marshall, L. H. Qu, D. R. Nelson, A. A. Sanderfoot, M. H. Spalding, V. V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S. M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C. L. Chen, V. Cognat, M. T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernandez, H. Fukuzawa, D. Gonzalez-Ballester, D. Gonzalez-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P. A. Lefebvre, S. D. Lemaire, A. V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J. V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A. M. Nedelcu, K. Niyogi, S. V. Novoselov, I. T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J. P. Ral, D. M. Riano-Pachon, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroda, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S. L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C. J. Chen, M. Elias, K. Gendler, C. Hauser, M. R. Lamb, H. Ledford, J. C. Long, J. Minagawa, M. D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A. M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C. L. Dieckmann, V. N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R. T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y. W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martinez, W. C. Ngau, B. Otilar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I. V. Grigoriev, D. S. Rokhsar and A. R. Grossman (2007). "The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions." Science **318**(5848): 245-250.
141. Mikami, B., M. Adachi, T. Kage, E. Sarikaya, T. Nanmori, R. Shinke and S. Utsumi (1999). "Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* beta-amylase complexed with maltose." Biochemistry **38**(22): 7050-7061.
142. Mita, S., H. Hirano and K. Nakamura (1997). "Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. A recessive mutation causing enhanced expression of a gene for beta-amylase." Plant Physiol **114**(2): 575-582.
143. Montero, M., G. Eydallin, A. M. Viale, G. Almagro, F. J. Munoz, M. Rahimpour, M. T. Sesma, E. Baroja-Fernandez and J. Pozueta-Romero (2009). "Escherichia coli glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental Mg²⁺ concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes." Biochem J **424**(1): 129-141.
144. Morán-Zorzano, M. T., Montero, M., Muñoz, F. J., Alonso-Casajús, N., Viale, A. M., Eydallin, G., Sesma, M. T., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2008). "Cytoplasmic Escherichia coli ADP sugar pyrophosphatase binds to cell membranes in response to extracellular signals as the cell population density increases." FEMS Microbiol Lett **288**: 25–32.
145. Morán-Zorzano, M. T., Viale, A. M., Muñoz, F. J., Alonso-Casajús, N., Eydallin, G., Zugasti, B., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2007). "Escherichia coli AspP activity is enhanced by molecular crowding and by both glucose-1,6-bisphosphate and nucleotide-sugars." FEBS Lett **581**: 1035–1040.
146. Morel, M., K., Kosar-Hashemi, B., Cmiel, B., Samuel, M., S., Chandler, P., Rahman, S., Buleon, A, Batey, I., L. et Li, Z. (2003) "Barley sex6 mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties." Plant J. **34**(2):173-85.

147. Moreno-Bruna, B., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Bastarrica-Berasategui, A., Zanduetta-Criado, A., Rodriguez-Lopez, M., Lasa, I., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2001). "Adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase prevents glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*." *P Natl Acad Sci USA* **98**: 8128–8132.
148. 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**(8): 1353-1366.
149. Mu, H. H., Y. Yu, B. P. Wasserman and G. M. Carman (2001). "Purification and characterization of the maize amyloplast stromal 112-kDa starch phosphorylase." *Arch Biochem Biophys* **388**(1): 155-164.
150. Myers, A. M., M. K. Morell, M. G. James and S. G. Ball (2000). "Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal." *Plant Physiol* **122**(4): 989-997.

N

151. Nakamura, Y., T. Umemoto, N. Ogata, Y. Kuboki, M. Yano and T. Sasaki (1996). "Starch debranching enzyme (R-enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene." *Planta* **199**(2): 209-218.
152. Nakamura, Y. and H. Yamanouchi (1992). "Nucleotide sequence of a cDNA encoding starch-branching enzyme, or q-enzyme I, from rice endosperm." *Plant Physiol* **99**(3): 1265-1266.
153. Nakamura, Y. (2002). "Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue." *Plant Cell Physiol* **43**(7): 718-725.
154. Nakata, P. A., Greene, T. W., Anderson, J. M., Smith-White, B. J., Okita, T. W., Preiss, J. (1991). "Comparison of the primary sequences of two potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase subunits." *Plant Mol Biol.* **17**(5): 1089-93.
155. Nelson, O. E. et Rines, H. W. (1962). "The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize." *Biochem Biophys Res Commun* **9**: 297- 300.
156. Niittyta, T., G. Messerli, M. Trevisan, J. Chen, A. M. Smith and S. C. Zeeman (2004). "A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves." *Science* **303**(5654): 87-89.
157. Nishi, A., Y. Nakamura, N. Tanaka and H. Satoh (2001). "Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm." *Plant Physiol* **127**(2): 459-472.

O

158. Oda, S. et Schofield, J. D. (1997). "Characterisation of Friabilin Polypeptides." *Journal of Cereal Science* **26**: 29-36.

159. Ohdan, T., P. B. Francisco, Jr., T. Sawada, T. Hirose, T. Terao, H. Satoh and Y. Nakamura (2005). "Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice." J Exp Bot **56**(422): 3229-3244.
160. Okita, T. W. (1992). "Is there an alternative pathway for starch synthesis?" Plant Physiol. **100**(2): 560-4.
161. Okita, T. W., Nakata, P. A., Anderson, J. M., Sowokinos, J., Morell, M., Preiss, J. (1990). "The Subunit Structure of Potato Tuber ADPglucose Pyrophosphorylase." Plant Physiol. **93**(2): 785-90.

P

162. Patron, N. J. et Keeling, P. K. (2005). "Common evolutionary origin of starch biosynthetic enzymes in green and red algae." Journal of Phycology **41**: 1131–1141.
163. Petreikov, M., Eisenstein, M., Yeselson, Y., Preiss, J., Schaffer, A. A. (2010). "Characterization of the AGPase large subunit isoforms from tomato indicates that the recombinant L3 subunit is active as a monomer." Biochem J. **428**(2): 201-12.
164. Plancke, C., C. Colleoni, P. Deschamps, D. Dauvillee, Y. Nakamura, S. Haebel, G. Ritte, M. Steup, A. Buleon, J. L. Putaux, D. Dupeyre, C. d'Hulst, J. P. Ral, W. Loffelhardt and S. G. Ball (2008). "Pathway of cytosolic starch synthesis in the model glaucophyte *Cyanophora paradoxa*." Eukaryot Cell **7**(2): 247-257.
165. Preiss, J. and T. Romeo (1989). "Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis." Adv Microb Physiol **30**: 183-238.
166. Preiss, J. and T. Romeo (1994). "Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **47**: 299-329.
167. Preiss, J. (2009). "Glycogen: biosynthesis and regulation." *EcoSal – Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Böck A, Curtiss R III, Kaper J, Karp P, Neidhardt F, Nyström T, Slauch J, Squires C & Ussery D, eds), ASM Press, Washington, DC. Available at <http://www.ecosal.org>.

R

168. Radakovits, R., R. E. Jinkerson, A. Darzins and M. C. Posewitz (2010). "Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production." Eukaryot Cell **9**(4): 486-501.
169. Rahman, S., Regina, A., Li, Z.Y., Mukai, Y., Yamamoto, M., Kosar-Hashemi, B., Abrahams, S., & Morell, M.K. (2001). "Comparison of Starch-Branching Enzyme Genes Reveals Evolutionary Relationships Among Isoforms. Characterization of a Gene for Starch-Branching Enzyme IIa from the Wheat D Genome Donor *Aegilops tauschii*." Plant Physiol. **125**: 1314-24.
170. Ral, J. P., A. F. Bowerman, Z. Li, X. Sirault, R. Furbank, J. R. Pritchard, M. Bloemsmas, C. R. Cavanagh, C. A. Howitt and M. K. Morell (2012). "Down-regulation of Glucan, Water-Dikinase activity in wheat endosperm increases vegetative biomass and yield." Plant Biotechnol J **10**(7): 871-882.

171. Ramesh, H. P., Tharanathan, R. N. (2003). "Carbohydrates – the renewable raw materials of high biotechnological value." Critical Reviews in Biotechnology **23**: 149-173.
172. Raven, J. A., Beardall, J., Flynn, K. J., Maberly, S. C. (2009). "Phagotrophy in the origins of photosynthesis in eukaryotes and as a complementary mode of nutrition in phototrophs: relation to Darwin's insectivorous plants." Journal of Experimental Botany **60**: 3975–3987.
173. Recondo, E. and L. F. Leloir (1961). "Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis." Biochem Biophys Res Commun **6**: 85-88.
174. Regina, A., B. Kosar-Hashemi, Z. Li, A. Pedler, Y. Mukai, M. Yamamoto, K. Gale, P. J. Sharp, M. K. Morell and S. Rahman (2005). "Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-syntenic locus." Planta **222**(5): 899-909.
175. Reijnders, L. (2008). "Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?" Trends Biotechnol **26**(7): 349-350; author reply 351-342.
176. Reijnders, L. (2009). "Microalgal and terrestrial transport biofuels to displace fossil fuels." Energies **2**: 48- 56.
177. Reinhold, H., S. Soyk, K. Simkova, C. Hostettler, J. Marafino, S. Mainiero, C. K. Vaughan, J. D. Monroe and S. C. Zeeman (2011). "beta-amylase-like proteins function as transcription factors in Arabidopsis, controlling shoot growth and development." Plant Cell **23**(4): 1391-1403.
178. Ritte, G., J. R. Lloyd, N. Eckermann, A. Rottmann, J. Kossmann and M. Steup (2002). "The starch-related R1 protein is an alpha -glucan, water dikinase." Proc Natl Acad Sci USA **99**(10): 7166-7171.
179. Ritte, G., M. Heydenreich, S. Mahlow, S. Haebel, O. Kotting and M. Steup (2006). "Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases." FEBS Lett **580**(20): 4872-4876.
180. Roach, P. J., C. Cheng, D. Huang, A. Lin, J. Mu, A. V. Skurat, W. Wilson and L. Zhai (1998). "Novel aspects of the regulation of glycogen storage." J Basic Clin Physiol Pharmacol **9**(2-4): 139-151.
181. Rochaix, J. D. (1995). "Chlamydomonas reinhardtii as the photosynthetic yeast." Annu Rev Genet **29**: 209-230.
182. Rodriguez-Ezpeleta, 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**(14): 1325-1330.
183. 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." Current Biology **15**: 1325–1330.
184. Roldan, I., Wattedled, F., Mercedes Lucas, M., Delvalle, D., Planchot, V., Jimenez, S.,

- Perez, R., Ball, S., D'Hulst, C. et Merida, A. (2007). "The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel." Plant J **49**(3): 492-504.
185. Röper, H. (2002). "Renewable raw materials in Europe - industrial utilization of starch and sugar." Starch-Stärke **54**: 89-99.
- S
186. Sager, R. and G. E. Palade (1957). "Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell." J Biophys Biochem Cytol **3**(3): 463-488.
187. Sambrook, J. et Russell D., W. (2001). "Molecular Cloning" third edition volume 1.
188. Santelia, D., O. Kotting, D. Seung, M. Schubert, M. Thalmann, S. Bischof, D. A. Meekins, A. Lutz, N. Patron, M. S. Gentry, F. H. Allain and S. C. Zeeman (2011). "The phosphoglucan phosphatase like sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in *Arabidopsis*." Plant Cell **23**(11): 4096-4111.
189. Satoh, H., A. Nishi, K. Yamashita, Y. Takemoto, Y. Tanaka, Y. Hosaka, A. Sakurai, N. Fujita and Y. Nakamura (2003). "Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm." Plant Physiol **133**(3): 1111-1121.
190. Satoh, H., K. Shibahara, T. Tokunaga, A. Nishi, M. Tasaki, S. K. Hwang, T. W. Okita, N. Kaneko, N. Fujita, M. Yoshida, Y. Hosaka, A. Sato, Y. Utsumi, T. Ohdan and Y. Nakamura (2008). "Mutation of the plastidial alpha-glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm." Plant Cell **20**(7): 1833-1849.
191. Scheidig, A., A. Frohlich, S. Schulze, J. R. Lloyd and J. Kossmann (2002). "Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves." Plant J **30**(5): 581-591.
192. Seok, Y. J., B. M. Koo, M. Sondej and A. Peterkofsky (2001). "Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr." J Mol Microbiol Biotechnol **3**(3): 385-393.
193. Shearer, J. and T. E. Graham (2002). "New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen." Can J Appl Physiol **27**(2): 179-203.
194. Silflow, C. D. and P. A. Lefebvre (2001). "Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Physiol **127**(4): 1500-1507.
195. Sizova, I., Fuhrmann, M. et Hegemann, P. (2001). "A *Streptomyces rimosus* aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*." Gene. **277**(1-2): 221-9.
196. Slattery, C. J., Kavakli, I. H., Okita, T. W. (2000). "Engineering starch for increased quantity and quality." Trends Plant Sci. **5**(7): 291-8.
197. Smith, A. M., S. C. Zeeman and S. M. Smith (2005). "Starch degradation." Annu Rev Plant Biol **56**: 73-98.
198. Smith-White, B. J. et Preiss, J. (1992). "Comparison of proteins of ADP-glucose

- pyrophosphorylase from diverse sources." J Mol Evol. **34**(5): 449-64.
199. Sogaard, M. et Svensson, B. (1990). "Expression of cDNAs encoding barley alpha-amylase 1 and 2 in yeast and characterization of the secreted proteins." Gene. **94**(2): 173-9.
 200. Sowokinos, J. R. et Preiss, J. (1982). "Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*: III. PURIFICATION, PHYSICAL, AND CATALYTIC PROPERTIES OF ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE IN POTATOES." Plant Physiol. **69**(6): 1459-66.
 201. Sparla, F., A. Costa, F. Lo Schiavo, P. Pupillo and P. Trost (2006). "Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of *Arabidopsis*." Plant Physiol **141**(3): 840-850.
 202. Staehelin, L. A., P. A. Armond and K. R. Miller (1976). "Chloroplast membrane organization at the supramolecular level and its functional implications." Brookhaven Symp Biol **28**: 278-315.
 203. Stanley, D., Fitzgerald, A.M., Farnden, K.J.F., and MacRae, E.A. (2002). Characterisation of putative α -amylases from apple (*Malus domestica*) and *Arabidopsis thaliana*. *Biologia* **57**, 137-148.
 204. Stark, D. M., Timmerman, K. P., Barry, G. F., Preiss, J. et Kishore, G. M. (1992). "Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-Glucose Pyrophosphorylase." Science **258**(5080): 287- 292.
 205. Stettler, M., S. Eicke, T. Mettler, G. Messerli, S. Hortensteiner and S. C. Zeeman (2009). "Blocking the metabolism of starch breakdown products in *Arabidopsis* leaves triggers chloroplast degradation." Mol Plant **2**(6): 1233-1246.
 206. Streb, S., T. Delatte, M. Umhang, S. Eicke, M. Schorderet, D. Reinhardt and S. C. Zeeman (2008). "Starch granule biosynthesis in *Arabidopsis* is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase." Plant Cell **20**(12): 3448-3466.
 207. Steichen, J. M., R. V. Petty and T. D. Sharkey (2008). "Domain characterization of a 4-alpha-glucanotransferase essential for maltose metabolism in photosynthetic leaves." J Biol Chem **283**(30): 20797-20804.
 208. Sueoka, N. (1960). "Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*" Proc Natl Acad Sci USA. **46**(1): 83-91.
 209. Sun, Z. and C. A. Henson (1990). "Degradation of Native Starch Granules by Barley alpha-Glucosidases." Plant Physiol **94**(1): 320-327.
 210. Sun, Z. T. and C. A. Henson (1991). "A quantitative assessment of the importance of barley seed alpha-amylase, beta-amylase, debranching enzyme, and alpha-glucosidase in starch degradation." Arch Biochem Biophys **284**(2): 298-305.
 211. Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M. M., Roldán, I., Montero, M., Muñoz, F. J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'Hulst, C., Mérida, A. (2009) "Starch granule initiation in *Arabidopsis* requires the presence of either class IV or class III starch synthases." Plant Cell. **21**(8):2443-57.

T

212. Takeda, Y., and Hizukuri, S. (1981). "Studies on starch phosphate. 5. Re-examination of the action of sweet-potato β -amylase on phosphorylated (1-4)- α -D-glucan." Carbohydr. Res. **89**: 174-178.
213. Takaha, T., M. Yanase, S. Okada and S. M. Smith (1993). "Disproportionating enzyme (4- α -glucanotransferase; EC 2.4.1.25) of potato. Purification, molecular cloning, and potential role in starch metabolism." J Biol Chem **268**(2): 1391-1396.
214. Takaha, T., M. Yanase, H. Takata, S. Okada and S. M. Smith (1996). "Potato D-enzyme catalyzes the cyclization of amylose to produce cycloamylose, a novel cyclic glucan." J Biol Chem **271**(6): 2902-2908.
215. Takashima, Y., T. Senoura, T. Yoshizaki, S. Hamada, H. Ito and H. Matsui (2007). "Differential chain-length specificities of two isoamylase-type starch-debranching enzymes from developing seeds of kidney bean." Biosci Biotechnol Biochem **71**(9): 2308-2312.
216. 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**(406): 2131-45.
217. Thorn, W., et Mohazzeb, S. (1990). α -D-glucane-iodine complexes, Starch **42**: 455-59
218. Tsai, C. Y. (1974). "The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm." Biochem Genet **11**(2): 83- 96.
219. Tuncay, H., J. Findinier, T. Duchene, V. Cogez, C. Cousin, G. Peltier, S. G. Ball and D. Dauvillee (2013). "A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism." PLoS One **8**(9): e74763.

U

220. Ugalde, J. E., A. J. Parodi and R. A. Ugalde (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**(19): 10659-10663.
221. Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H., Shomura, A. et Nakamura, Y. (2002). "Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties." Theor Appl Genet **104**(1): 1-8.
222. Utsumi, Y. and Y. Nakamura (2006). "Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1-isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm." Planta **225**(1): 75-87.

V

223. Van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J. P., Buleon, A., Visser, R. et Ball, S. (1998). "Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin." J Biol Chem **273**(35): 22232-40.
224. Van den Koornhuyse, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Carton, A., Preiss, J. et Ball, S. (1996). "Control of starch composition and structure

- through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*." J Biol Chem **271**(27): 16281-7.
225. Vikso-Nielsen, A., P. Hao-Jie Chen, H. Larsson, A. Blennow and B. L. Moller (2002). "Production of highly phosphorylated glycopolymers by expression of R1 in *Escherichia coli*." Carbohydr Res **337**(4): 327-333.
226. Viola, R., P. Nyvall and M. Pedersen (2001). "The unique features of starch metabolism in red algae." Proc Biol Sci **268**(1474): 1417-1422.
227. Vrinten, P. L. et Nakamura, T. (2000). "Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues." Plant Physiol. **122**(1): 255-64.
- W
228. Wattebled, F., A. Buleon, B. Bouchet, J. P. Ral, L. Lienard, D. Delvalle, K. Binderup, D. Dauvillee, S. Ball and C. D'Hulst (2002). "Granule-bound starch synthase I. A major enzyme involved in the biogenesis of B-crystallites in starch granules." Eur J Biochem **269**(15): 3810-3820.
229. Wattebled, F., J. P. Ral, D. Dauvillee, A. M. Myers, M. G. James, R. Schlichting, C. Giersch, S. G. Ball and C. D'Hulst (2003). "STA11, 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**(1): 137-145.
230. Wattebled, F., Y. Dong, S. Dumez, D. Delvalle, V. Planchot, P. Berbezy, D. Vyas, P. Colonna, M. Chatterjee, S. Ball and C. D'Hulst (2005). "Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyloglycogen and an abnormal form of amylopectin." Plant Physiol **138**(1): 184-195.
231. Weber, C. J., Haugaard, V., Festersen, R., Bertelsen, G. (2002). "Production and applications of biobased packaging materials for the food industry." Food Addit Contam **19**(Suppl): 172-177.
232. Weber, T. K., C. Freitas Kde, O. M. Amancio and M. B. de Morais (2010). "Effect of dietary fibre mixture on growth and intestinal iron absorption in rats recovering from iron-deficiency anaemia." Br J Nutr **104**(10): 1471-1476.
233. Weise, S. E., K. S. Kim, R. P. Stewart and T. D. Sharkey (2005). "beta-Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation." Plant Physiol **137**(2): 756-761.
234. Werner, R. (2002). "*Chlamydomonas reinhardtii* as a unicellular model for circadian rhythm analysis." Chronobiol Int **19**(2): 325-343.
235. Whittam, M. A., T. R. Noel and S. G. Ring (1990). "Melting behaviour of A- and B-type crystalline starch." Int J Biol Macromol **12**(6): 359-362.
236. Wilson, W. A., P. J. Roach, M. Montero, E. Baroja-Fernandez, F. J. Munoz, G. Eydallin, A. M. Viale and J. Pozueta-Romero (2010). "Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria." FEMS Microbiol Rev **34**(6): 952-985.

237. Wirtz, W., Stitt, M., and Heldt, H.W. (1980). "Enzymic determination of metabolites in the subcellular compartments of spinach protoplasts." Plant Physiol. 66: 187-193.
238. Wu, C., C. Colleoni, A. M. Myers and M. G. James (2002). "Enzymatic properties and regulation of ZPU1, the maize pullulanase-type starch debranching enzyme." Arch Biochem Biophys **406**(1): 21-32.

X

239. Xia, H., Yandeu-Nelson, M., Thompson, D., B. et Guiltinan, M., J. (2011). "Deficiency of maize starch-branching enzyme I results in altered starch fine structure, decreased digestibility and reduced coleoptile growth during germination." BMC Plant Biol. **11**:95

Y

240. Yoon, H. S., J. D. Hackett, C. Ciniglia, G. Pinto and D. Bhattacharya (2004). "A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes." Mol Biol Evol **21**(5): 809-818.
241. Yu, T. S., H. Kofler, R. E. Hausler, D. Hille, U. I. Flugge, S. C. Zeeman, A. M. Smith, J. Kossmann, J. Lloyd, G. Ritte, M. Steup, W. L. Lue, J. Chen and A. Weber (2001). "The Arabidopsis *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter." Plant Cell **13**(8): 1907-1918.
242. Yu, T. S., S. C. Zeeman, D. Thorneycroft, D. C. Fulton, H. Dunstan, W. L. Lue, B. Hegemann, S. Y. Tung, T. Umemoto, A. Chapple, D. L. Tsai, S. M. Wang, A. M. Smith, J. Chen and S. M. Smith (2005). "alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves." J Biol Chem **280**(11): 9773-9779.
243. Yun, S. H. and N. K. Matheson (1993). "Structures of the amylopectins of waxy, normal, amylose-extender, and wx:ae genotypes and of the phytyglycogen of maize." Carbohydr Res **243**(2): 307-321.

Z

244. Zabawinski, C., Van Den Koornhuysse, N., D'Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue, B., Lacroix, J. M., Preiss, J. et Ball, S. (2001). "Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase." J Bacteriol **183**(3): 1069- 77.
245. Zeeman, S. C., T. Umemoto, W. L. Lue, P. Au-Yeung, C. Martin, A. M. Smith and J. Chen (1998). "A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen." Plant Cell **10**(10): 1699-1712.
246. Zeeman, S. C., A. Tiessen, E. Pilling, K. L. Kato, A. M. Donald and A. M. Smith (2002). "Starch synthesis in Arabidopsis. Granule synthesis, composition, and structure." Plant Physiol **129**(2): 516-529.
247. Zeeman, S. C., D. Thorneycroft, N. Schupp, A. Chapple, M. Weck, H. Dunstan, P. Haldimann, N. Bechtold, A. M. Smith and S. M. Smith (2004). "Plastidial alpha-glucan phosphorylase is not required for starch degradation in Arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress." Plant Physiol **135**(2): 849-858.

248. Zeeman, S. C., J. Kossmann and A. M. Smith (2010). "Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants." Annu Rev Plant Biol **61**: 209-234.
249. Zhang X, Myers AM, James MG. (2005) "Mutations affecting starch synthase III in Arabidopsis alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis." Plant Physiol. **138**(2):663-74. Epub 2005 May 20.