

Université de Lille  
Ecole doctorale Biologie Santé

## **THESE de DOCTORAT**

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Adeline WYCHOWSKI**

---

Dynamique enzymatique et contrôle de la formation et  
de la distribution des branchements de l'amidon

---

Présentée le 30 Novembre 2017 devant la commission d'examen composée de :

Pr Simon HAWKINS	Université de Lille	<b>Président</b>
Dr Mirjam CZIZEK	Station Biologique Roscoff	<b>Rapporteur</b>
Dr Didier MARION	BIA INRA, Nantes	<b>Rapporteur</b>
Dr Gabrielle POTOCKI-VERONESE	INSA Toulouse	<b>Examineur</b>
Dr Arnaud GRUEZ	Université de Lorraine	<b>Examineur</b>
Dr Xavier ROUSSEL	Université de Lille	<b>Co-encadrant</b>
Dr Fabrice WATTEBLED	Université de Lille	<b>Directeur de thèse</b>

# REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Mirjam Czjzek et le Dr Didier Marion d'avoir accepté d'être membres de mon jury en qualité de rapporteur et pour le temps consacré à évaluer mes travaux de thèse.

Je souhaite également remercier le Dr Gabrielle Potocki-Veronese et le Dr Arnaud Gruez de m'avoir suivi tout au long de ma thèse, durant les CST et d'être présents au sein de cette commission en tant qu'examineur.

Je remercie de tout cœur le Pr Simon Hawkins pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements au Pr Christophe D'Hulst, pour m'avoir accueillie dans son Unité, depuis mes stages de Master jusqu'à ces trois années de thèse. Merci pour tes conseils, ton soutien et de m'avoir montré qu'au final on trouve toujours une solution.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse le Dr Fabrice Wattebled pour sa bienveillance, sa gentillesse et son aide précieuse au cours de ces années. Tu as toujours tout fait pour que je m'épanouisse dans le travail et dans l'équipe. J'ai énormément appris à tes côtés et je t'exprime ici ma plus profonde gratitude.

Un grand Merci au Dr Xavier Roussel pour m'avoir fait faire mes premiers pas dans un labo de Biochimie, qui est vite devenu ma deuxième maison. Je te suis reconnaissante de m'avoir encadrée durant ces cinq années, grâce à toi « je ne devrais plus faire de gâteaux ».

Je tiens également à remercier le Dr Coralie Bompard qui m'a fait découvrir les joies de la « purif de prot » ou de la production de masse ! Je n'y serai jamais parvenue sans tes astuces et ton vecteur magique.

Je remercie également le Dr David Dauvillée pour ses super recettes de « zymo » et pour toutes nos conversations scientifiques mais pas que... Tu as su exacerber mon côté (paraît-il) « atypique ». Merci à Adeline : notre maman du labo, pour ta gentillesse et tes encouragements ; à Monika qui est partie : tes conseils (et tes petits plats) me manquent. Je remercie également Corentin et Dave, pour leurs conseils avisés et leur bonnes blagues à la pause café ; mes comparses Camilou, Sylvain, Derifa et Gwen pour leur soutien, leur bonne humeur et aussi d'avoir supporté mon espace-temps à base de « t'inquiètes j'en ai que pour cinq minutes ! ».

Merci à nos collaborateurs toulousains et en particulier le Dr Florent Grimaud qui m'a permis de passer un agréable séjour au sein du laboratoire, ce fût intense mais trop bref. Je n'oublie pas non plus nos collègues de la team patate, le Dr Nicolas Szydowski pour ses précieux conseils, au Dr Demauu ma bikeuse préférée, merci d'être toi, d'avoir été là durant ces cinq ans et même après j'en suis sûre et à Stan le dernier arrivant. Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai travaillé pour la bonne ambiance et tout le personnel de l'UGSF qui a toujours tout fait pour que je ne manque de rien.

Je tiens également à remercier mes amis, rencontrés sur les bancs de l'école, ma Didine, Matthieu, Momo, Sam, Rémi, Alex et ma petite Jojo pour votre soutien inconditionnel tout au long de ces années. Un grand merci à Hélène, Fanfan, Stein, Flo et tous les copains lillois pour tous les bons moments musicaux ou pas, j'espère qu'il y en aura encore une longue série.

Enfin je remercie du fond du cœur ma famille, tout particulièrement mes parents et mon frère pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir soutenu dans tous les domaines. Vous êtes pour beaucoup dans l'aboutissement de ce travail. Et à ma mamie qui vivait son rêve par procuration à travers mon travail, je te dédie toutes mes réussites.

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>3-PGA</b> : 3-phosphoglycérate	<b>G1P</b> : Glucose-1-phosphate
<b>aa</b> : acide aminé	<b>GBSS</b> : Granule Bound Starch Synthase, Amidon-Synthase lié au grain
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>GT</b> : Glycosyle transférase
<b>ADPG</b> : Adénosine Diphospho-Glucose	<b>HCl</b> : acide chlorydrique
Diphospho-Glucose	<b>HPAEC-PAD</b> : High pH Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection, Chromatographie échangeuse d'anions à haut pH avec détection ampérométrique pulsée
<b>AGPase</b> : Adénosine Diphospho-Glucose Pyrophosphorylase	<b>IPTG</b> : IsoPropyl Thio $\beta$ D Galactoside
<b>AMP</b> : Adénosine monophosphate	<b>LB</b> : Luria-Bertani
<b>APTS</b> : Acide-8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonique	<b>M</b> : Molaire
<b>AS</b> : Activité spécifique	<b>Mt</b> : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>ASDg</b> : Amylosaccharase de <i>Deinococcus geothermalis</i>	<b>PAGE</b> : PolyAcrylamid Gel Electrophoresis, Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
<b>AS<sub>max</sub></b> : Activité spécifique maximale	<b>pb</b> : Paire de bases
<b>ASNp</b> : Amylosaccharase de <i>Neissaria polysaccharea</i>	<b>PDB</b> : Protein Data Bank
<b>At</b> : <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>Pi</b> : Orthophosphate
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>PTST</b> : Protein targeting to starch
<b>BAM</b> : $\beta$ -amylase	<b>R<sub>g</sub></b> : Rayon de gyration
<b>BE</b> : Enzyme de branchement	<b>SAXS</b> : Small Angle X-Ray Scattering, Diffusion des rayons X aux petits angles
<b>BSA</b> : Bovin Serum Albumin	<b>SBD</b> : Domaine de liaison à l'amidon
<b>CAZy</b> : Carbohydrate Active Enzyme	<b>SBE</b> : Enzyme de branchement de l'amidon
<b>CBM</b> : Module de liaison aux carbohydrates	<b>SDS</b> : Sodium dodécyl sulfate
<b>cce</b> : <i>Cyanothece</i>	<b>SS</b> : Amidon-synthase soluble
<b>Col-0</b> : Ecotype Columbia d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>Tris</b> : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
<b>CGTase</b> : Cyclodextrine glycosyltransférase	<b>USIPA</b> : Union des Syndicats des Industries des Produits Amylacés et de leurs dérivés
<b>Da</b> : Dalton	<b>UV</b> : Ultra-violet
<b>DTT</b> : Dithiotréitol	$\lambda_{max}$ : Longueur d'onde du maximum d'absorbance
<b>DBE</b> : Enzyme de débranchement	
<b>DLC</b> : Distribution de longueur de chaîne	
<b>D<sub>max</sub></b> : Diamètre maximal	
<b>DO</b> : Densité optique	
<b>DP</b> : Degré de polymérisation	
<b>EDTA</b> : Acide éthylène diamine tétracétique	

# RÉSUMÉ

Chez *Arabidopsis thaliana*, deux gènes codent des enzymes de branchement (BE) BE2.2 et BE2.1 responsables de la formation des liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amidon transitoire synthétisé dans la feuille de la plante. Ces enzymes, appartenant à la famille GH13\_8 de la classification CAZy, agissent en clivant une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un glucane puis en transférant la chaîne clivée en position  $\alpha$ -1,6 selon un mécanisme d'action qui peut être intra ou intermoléculaire. Dans ce travail, une caractérisation enzymatique et structurale des BEs d'*A. thaliana* (classées de type II d'après leur séquence en acides aminés) a été réalisée et les résultats comparés à ceux de la BE d'*E. coli* (GlgB, enzyme de type I).

L'état oligomérique, la forme en solution et l'organisation structurale des BEs ont été évalués par une approche SAXS. Par des analyses spectrophotométriques, le pH, la température, mais aussi le  $K_M$  pour l'amylose et l'amylopectine ont été déterminés. Une analyse sur gel de polyacrylamide, en conditions natives, a permis d'évaluer le comportement électrophorétique des BEs en présence ou en absence de ces substrats et d'en déterminer leur constante d'affinité ( $K_s$ ).

Notre étude révèle que les BEs d'*A. thaliana* ont plus d'affinité pour l'amylopectine que pour l'amylose contrairement à GlgB. En présence d'un substrat branché, des changements d'oligométrie et/ou de la conformation des BEs d'*A. thaliana* ont été observés. Finalement, des analyses en chromatographie échangeuse d'anions ont permis de déterminer la taille minimale du substrat nécessaire à l'activité des BEs et la taille des chaînes transférées. Les résultats obtenus pointent vers un mécanisme d'action intramoléculaire de BE2.2.

# ABSTRACT

BE2.2 and BE2.1 are the two genetically independent branching enzymes (BE) isoforms involved in transitory starch synthesis in *A. thaliana* and belong to family GH13\_8 (according to CAZy database). Both are classified as type II BE due to their amino acid sequence. In *Arabidopsis* leaves, they are the only enzymes that catalyze the formation of  $\alpha$ -1,6 branch points by cleaving  $\alpha$ -1,4 linkages and transferring the newly formed reducing end in  $\alpha$ -1,6 position through an intra or intermolecular mechanism. In this work, we report *in vitro* enzymatic characterization and structural analysis of *A. thaliana* BEs, these results were compared to *E. coli* BE enzymatic analysis (GlgB, type I enzyme).

Structural analysis using SAXS approach was used to evaluate *A. thaliana* BEs oligomeric state, shape in solution and to determine BE organization. *In vitro* enzymatic analyses were performed using spectrophotometry assays to establish their catalytic parameters such as pH, temperature and also  $K_M$  for amylose and amylopectin.

Native PAGE analyses were also used to assess BEs behaviour in the presence or absence of substrates and to determine their affinity constant ( $K_s$ ) for amylopectin and amylose. Enzymatic characterization reveals that both *A. thaliana* BEs have more affinity for amylopectin than for amylose, contrary to GlgB. Moreover, interaction of *A. thaliana* BEs with branched substrates induces protein oligomerization and/or conformational changes. Finally, determination of the minimal length of their substrate and characterization of reaction products were performed using anions exchange chromatography analyses.

Taken together, our data point to an intramolecular mechanism of action of BE2.2.

# SOMMAIRE

## GENERALITES

1. Structure de l'amidon .....	12
1.1 Structure de l'amylose .....	12
1.2 Structure de l'amylopectine.....	13
1.2.1 Structure moléculaire de l'amylopectine.....	13
1.2.2 L'organisation en grappe de l'amylopectine.....	16
1.3 Les différents niveaux d'organisation structurale du grain d'amidon .....	16
1.4 L'interaction entre l'iode et les $\alpha$ -1,4 glucanes .....	18
2. La synthèse de l'amidon.....	19
2.1 La synthèse du précurseur .....	20
2.2 L'initiation .....	22
2.2.1 Le cas du glycogène .....	22
2.2.2 L'initiation de la synthèse d'amidon .....	23
2.3 L'élongation des $\alpha$ -1,4 glucanes.....	23
2.3.1 L'amidon-synthase liée au grain : GBSS .....	25
2.3.2 Les amidon-synthases solubles.....	26
2.3.3 Redondance fonctionnelle entre les amidon-synthases.....	28
2.4 L'introduction des liaisons $\alpha$ -1,6 par les enzymes de branchement.....	29
2.4.1 Famille des $\alpha$ -amylases .....	29
2.4.2 Mécanisme d'action des enzymes de branchement de la famille GH13.....	31
2.4.3 Deux types d'enzymes de branchement impliqués dans la synthèse d'amidon. ....	32
2.4.3.1 Les enzymes de branchement de type I (BEI ou famille B) .....	34
2.4.3.2 Les enzymes de branchement de type II, SBEII.....	34
2.4.4 Cas particulier d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	36
2.4.5 Structure et fonctions .....	37
2.4.5.1 Le domaine catalytique central.....	38
2.4.5.2 Le domaine N-terminal, en amont du domaine catalytique.....	39
2.4.5.3 Le domaine C-terminal, situé en aval du domaine catalytique .....	42
2.5 Intervention des enzymes de débranchement au cours du processus de synthèse de l'amylopectine.....	45
2.5.1 Les isoamylases .....	46
2.5.2 La maturation de la structure de l'amylopectine .....	47
2.6 Modulation de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon .....	48

4. Objectifs du travail de thèse .....	51
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	
1. Souches bactériennes .....	54
2. Plasmides .....	54
3. Milieu de croissance bactérien (Luria-Bertani) .....	55
4. Production de protéines recombinantes dans <i>E. coli</i> .....	55
4.1 Production de BE2.2 et BE2.1 .....	55
4.2 Production de GlgB .....	55
5. Purification des protéines recombinantes.....	56
6. Analyse structurale après purification des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> .....	57
6.1 Analyse des séquences protéiques.....	57
6.2 Modélisation moléculaire .....	57
6.3 Analyse par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	57
6.3.1 Principes généraux.....	57
6.3.2 Acquisition des données SAXS .....	58
6.3.3 Traitement des données SAXS .....	59
6.3.3.1 Loi de Guinier .....	59
6.3.3.2 Représentation de Kratky .....	60
6.3.3.3 Fonction de distribution des distances .....	61
6.4.3 Modélisations <i>ab initio</i> .....	61
7. Synthèse de substrats linéaires.....	62
7.1 Synthèse du A600 .....	62
7.2 Synthèse et purification de glucanes linéaires moins polydisperses: DP 4-19; DP 14-28 .....	63
8. Analyse par électrophorèse sur gels de polyacrylamide .....	63
8.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	63
8.2 Les gels d'activité (ou zymogramme).....	63
8.2.1 Zymogramme amidon en conditions dénaturantes .....	64
8.2.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives .....	64
8.2.2.1 Détermination de la constante d'affinité ( $K_s$ ).....	64
8.2.2.2 Zymogramme révélant les activités hydrolytiques .....	65
8.2.2.3 Zymogramme révélant les activités de branchement .....	65
9. Analyse de l'activité de branchement par spectrophotométrie.....	65
9.1 Détermination du pH optimum des BEs .....	66
9.2 Détermination de la température optimale des BEs .....	66
9.3 Détermination du $K_{0.5}$ ou $K_M$ des enzymes. ....	66

10. Analyse des distributions de longueurs de chaîne des polysaccharides par chromatographie échangeuse d'anions à haut pH avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD)..... 67

## RESULTATS

1. Analyse structurale des enzymes de branchement d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	71
1.1 Etude bio-informatique des séquences protéiques des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> .....	71
1.2 Modélisation des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> .....	73
1.3 Expression et purification des enzymes recombinantes BE2.2, BE2.1 et de GlgB d' <i>E. coli</i> .....	76
1.4 Analyse structurale des enzymes de branchement d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) .....	78
1.3.1 Analyse structurale de BE2.2 par SAXS .....	79
1.3.2 Analyse structurale de BE2.1 par SAXS .....	81
3. Caractérisation enzymatique des BEs d' <i>A. thaliana</i> et de GlgB d' <i>E. coli</i> .....	84
3.1 Obtention de glucanes linéaires synthétisés par l'amylosaccharase.....	84
3.2 Mobilité électrophorétique des enzymes de branchement, affinité pour l'amylopectine, l'amylose ou les $\alpha$ -1,4 glucanes linéaires.....	84
3.2.1 Evaluation de l'activité de BE2.2 par zymogrammes.....	85
3.2.2 Détermination de l'affinité de BE2.2 pour différents substrats .....	86
3.3 Evaluation de l'activité de BE2.1 par zymogrammes .....	90
3.3.1 Détermination de l'affinité de BE2.1 pour différents substrats .....	92
3.4 Evaluation de l'activité de GlgB par zymogrammes.....	97
3.4.1 Détermination de l'affinité de GlgB pour différents substrats .....	98
4. Détermination des paramètres cinétiques des BEs d' <i>A. thaliana</i> et de la GlgB d' <i>E. coli</i> .....	102
5. Caractérisation des substrats donneurs et des chaînes transférées par les BEs .....	109
5.1 Caractérisation des substrats donneurs et des chaînes transférées par BE2.2.....	111
5.1.1 Action de BE2.2 sur l'amylopectine .....	111
5.1.2 Action de BE2.2 sur l'amylose .....	112
5.1.3 Action de BE2.2 sur des glucanes linéaires .....	114
5.2 Caractérisation des substrats donneurs et des chaînes transférées par BE2.1.....	120
5.2.1 Action de BE2.1 sur l'amylopectine .....	120
5.2.2 Action de BE2.1 sur l'amylose.....	121
5.2.3 Action de BE2.1 sur des glucanes linéaires .....	122
5.3 Caractérisation des substrats donneurs et des chaînes transférées par GlgB .....	129
5.3.1 Action de GlgB sur l'amylopectine .....	129
5.3.2 Action de GlgB sur l'amylose .....	131
5.3.3 Action de GlgB sur des glucanes linéaires.....	132



## DISCUSSION

Caractérisation biochimique de BE2.2 : .....	138
Caractérisation biochimique de BE2.1 .....	141
Caractérisation biochimique de GlgB.....	145
Etude des mutants dépourvus de BE2.2, BE2.1 ou exprimant GlgB chez <i>Arabidopsis</i> .....	148

## PERSPECTIVES

## BIBLIOGRAPHIE

## ANNEXES

Annexe 1 : Carte du vecteur pDONR™221 .....	168
Annexe 2 : Carte du vecteur pENTR™/D-TOPO® .....	168
Annexe 3 : Carte du vecteur pml375 .....	169
Annexe 4 : Carte du vecteur pDEST17 .....	169
Annexe 5 : Alignement de séquences des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> .....	170
Annexe 6: Alignement de séquences des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> avec BEI d' <i>Oriza sativa</i> .....	172
Annexe 7: Alignement de séquences des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> avec les BEII du maïs .....	174
Annexe 8: Alignement de séquences des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> avec cceBE1 de <i>Cyanothece</i> .....	176
Annexe 9: Alignement de séquences des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> avec MtBE1.....	177
Annexe 10 : Alignement de séquences des enzymes de branchement d' <i>A. thaliana</i> avec GlgB de <i>E.coli</i> .....	178
Annexe 11 : Prédiction de désordre et d'interaction protéine-protéine pour GlgB d' <i>E. coli</i> .....	179
Annexes 12 : Article .....	180

# GÉNÉRALITÉS

L'amidon est un polymère d'importance cruciale pour les végétaux puisqu'il constitue le principal polysaccharide de réserve utilisé comme source d'énergie et réserve de carbone. Il est synthétisé dans les plastes sous la forme de grains insolubles et semi-cristallins. Le nombre de ces grains et la quantité d'amidon varient selon les espèces et selon le tissu considérés. On différenciera ainsi les organes de réserve (graines, tubercules et racines) et les tissus photosynthétiques (feuilles) des plantes.

Du point de vue industriel, l'amidon est principalement extrait du maïs, du blé et de la pomme de terre et, dans une moindre mesure, du riz, du pois et de l'orge (selon l'USIPA). Moins de la moitié de la production mondiale d'amidon est dévolue à l'alimentation humaine et animale dont il constitue la première source de calorie (OECD/FAO). Outre leurs valeurs nutritives, l'amidon et ses dérivés sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés épaississantes, texturantes, etc., et sont directement reliés aux propriétés de l'amidon. On le retrouve par exemple dans les produits de boulangerie et viennoiserie où il est responsable du goût sucré et participe à la coloration lors de la cuisson. Il est également présent dans les laits pour enfants où les dérivés amidonnés confèrent au lait sa consistance et contribuent à diminuer les troubles intestinaux. Certaines propriétés de l'amidon sont également très étudiées pour leurs bénéfices directs et indirects dans le domaine de la santé. Ainsi, les nombreuses études menées sur l'intérêt de l'amidon résistant ont permis de mettre en évidence certaines propriétés « curatives » (Topping, Fukushima et al. 2003). Cet amidon résistant est digéré plus lentement par l'organisme et présente un index glycémique plus faible, il favorise également la sensibilité à l'insuline, ce qui est d'un intérêt médical dans le cas du diabète. De plus, il semblerait que cet amidon résistant favorise la prolifération de bactéries Gram positives au sein du microbiote intestinal, parmi lesquelles certaines sont connues pour produire du butyrate et des chaînes courtes d'acide gras ayant des propriétés anti-inflammatoires et antitumorales (Cockburn and Koropatkin 2016).

L'amidon est facilement modifiable que ce soit physiquement ou chimiquement ce qui le rend attractif pour une exploitation industrielle où il est très largement utilisé à des fins alimentaires ou non. Il est par exemple employé en papeterie où il contribue à la résistance du papier, c'est également grâce à l'amidon présent en surface des feuilles que l'on peut écrire sur ces dernières. Il est exploité dans de nombreux domaines, tels que dans les industries textiles et du bâtiment ou en cosmétique. Il est aussi présent dans la liste des excipients de nombreux médicaments. A l'heure où les considérations écologiques et environnementales sont au premier plan dans notre société, l'amidon prend une place toute particulière. En effet, il entre de plus en plus dans la composition des sacs

plastiques biodégradables et est utilisé pour la production de bioéthanol. Il a donc un impact favorable sur notre écosystème en étant une alternative à l'utilisation des énergies fossiles.

Bien que les différentes étapes nécessaires à la synthèse d'un grain d'amidon soient en grande partie connues, de nombreuses questions restent encore en suspens en ce qui concerne les mécanismes régissant son organisation structurale. En effet, si sa composition chimique est relativement simple, le grain d'amidon présente une architecture complexe et très organisée qui est conservée au sein du règne végétal. Cette complexité s'explique en partie par l'intervention de nombreuses enzymes au cours du processus de synthèse. Décrire les spécificités de fonctionnement de chacune d'entre elles constitue une première étape dans la compréhension des mécanismes régulant la synthèse du grain d'amidon.

Avant d'aborder les objectifs de cette thèse et les résultats obtenus, nous ferons un état des lieux des connaissances sur la structure et le métabolisme de l'amidon.

## 1. Structure de l'amidon

Selon l'origine végétale, l'amidon se présente sous la forme de grains dont la forme et la taille sont variables, ils atteignent 0,1  $\mu\text{m}$  chez certaines algues unicellulaires et présentent un diamètre pouvant s'élever à 100  $\mu\text{m}$  chez la pomme de terre. La composition moléculaire de l'amidon est relativement simple. Elle est constituée de résidus de D-glucose liés entre eux par deux types de liaisons : les liaisons  $\alpha$ -1,4 O-glycosidiques et les liaisons  $\alpha$ -1,6, appelées points de branchement, qui permettent la ramification du polysaccharide. L'amidon est un hétéropolymère composé de deux macromolécules, l'amylose et l'amylopectine.

### 1.1 Structure de l'amylose

L'amylose représente 20 à 30% du poids sec du grain d'amidon. D'un degré de polymérisation variable, 200 à 10 000 résidus de glucose en fonction des espèces ( $10^5$ - $10^6$  Da), ce polysaccharide est souvent considéré comme une molécule linéaire en raison de son faible taux de ramification inférieur à 1% (Takeda and Hizukuri 1987; Hanashiro and Takeda 1998). Des études ont démontré que la présence d'amylose n'est pas essentielle à la synthèse d'amidon car en son absence, les végétaux synthétisent un nombre normal de grains. L'amylose est donc généralement considéré comme dispensable à la synthèse du grain d'amidon, qui ne dépend que de la synthèse de l'amylopectine.

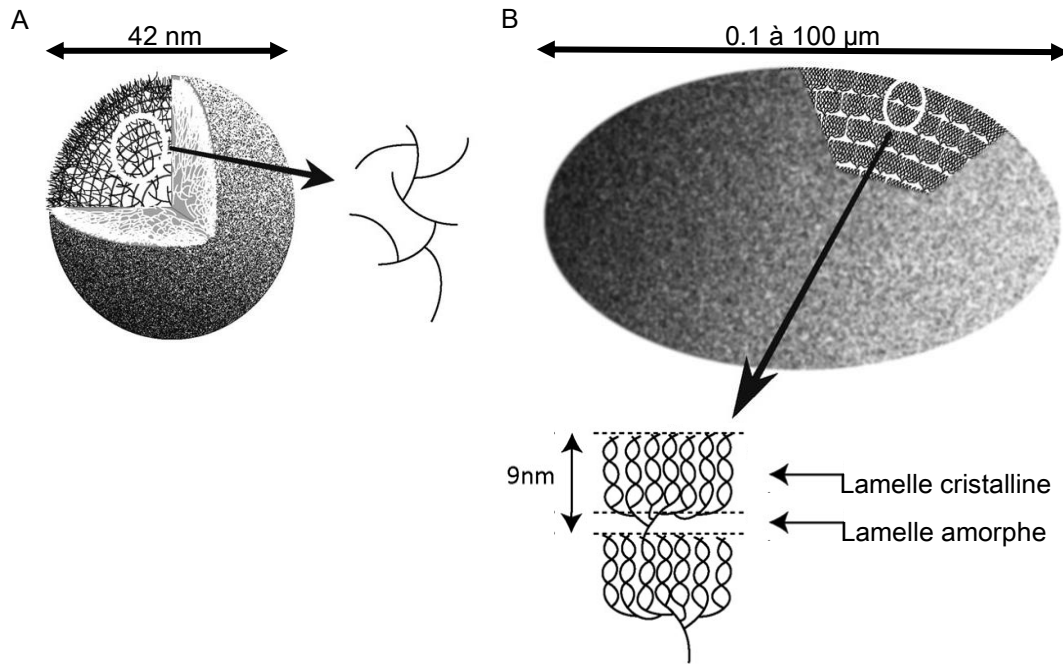
## 1.2 Structure de l'amylopectine

### 1.2.1 Structure moléculaire de l'amylopectine

L'amylopectine constitue la fraction majoritaire du grain d'amidon, et représente de 70 à 80% de son poids sec. De masse moléculaire élevée ( $10^7$ - $10^8$  Da) (Aberle T, Burchard W et al. 1994), elle présente un degré de polymérisation nettement plus important que l'amylose (entre 50 000 et 500 000 résidus de glucose) avec un taux de ramification de 5 à 6%. C'est la répartition inégale des points de branchement au sein du polymère qui confère à l'amylopectine une structure dite « en grappe ». Afin d'appréhender la structure si particulière de l'amylopectine et les propriétés qui en découlent, un parallèle peut être fait avec la structure du glycogène (Figure 1).

Le glycogène est le polysaccharide de réserve de carbone et d'énergie chez les animaux, bactéries et champignons. Sa composition de base s'apparente à celle de l'amidon : un enchaînement de résidus de D-glucose lié entre eux par des liaisons  $\alpha$ -1,4, et ramifié par des liaisons  $\alpha$ -1,6. Néanmoins, le glycogène possède un taux de ramification nettement plus élevé que l'amylopectine, de l'ordre de 8 à 10%. De plus, la répartition des points de branchements se fait de manière uniforme au sein du polymère, avec une liaison  $\alpha$ -1,6 tous les 10 à 13 résidus de glucose (Lerner and Krisman 1996). De ce fait, l'encombrement stérique limite la taille de la particule de glycogène à une quarantaine de micromètres (Melendez, Melendez-Hevia et al. 1998) et cette distribution ordonnée des points de branchement confère au polysaccharide son caractère amorphe et hydrosoluble (Ball, Guan et al. 1996) (Figure 1A).

Dans le cas de l'amylopectine, en revanche, sa structure organisée en grappe est la conséquence d'une répartition asymétrique des points de branchement au sein de la molécule. La position des liaisons  $\alpha$ -1,6 est concentrée dans des régions appelées lamelles amorphes, alors que les longues chaînes du polysaccharide, constitué par les liaisons  $\alpha$ -1,4 O-glycosidiques, s'organisent en doubles hélices parallèles au sein de lamelles dites cristallines (Figure 1B). Le caractère insoluble et partiellement cristallin du polysaccharide résulte de cette organisation particulière. Il apparaît également que la succession de ces lamelles amorphes/cristallines est extrêmement conservée au sein du règne végétal avec une périodicité de 9 nm ce qui suggère un mécanisme de synthèse très régulé et conservé chez les plantes (Paul J. Jenkins, Ruth E. Cameron et al. 1993) (Figure 1B).



**Figure 1 : Comparaison de la structure du glycogène (A) et du grain d'amidon (B)** (Ball, Colleoni et al. 2011). Un grossissement des régions encadrées est représenté à droite de la figure A et en bas de la figure B. Ces grossissements mettent en évidence la distribution des points de branchement au sein de chaque molécule. Les liaisons  $\alpha$ -1,6 sont représentées par les intersections entre les lignes (en A, à droite). Elles sont réparties de manière homogène dans le glycogène conduisant à une taille maximale de la particule de 42nm. Dans le cas de l'amylopectine, constituant principal du grain d'amidon, elles sont réparties de manière asymétriques dans les grappes de l'amylopectine où elles sont présentes et concentrées dans les lamelles amorphes. Les liaisons  $\alpha$ -1,4 sont quant à elles localisées dans les lamelles cristallines où les glucanes linéaires s'organisent en doubles hélices parallèles. L'ensemble constitué d'une lamelle cristalline et d'une lamelle amorphe se répète tous les 9 nm.

Il paraît maintenant évident que le pourcentage et la position des points de branchement au sein du polysaccharide constituent des éléments clés qui vont déterminer son niveau de cristallinité et également ses propriétés physico-chimiques.

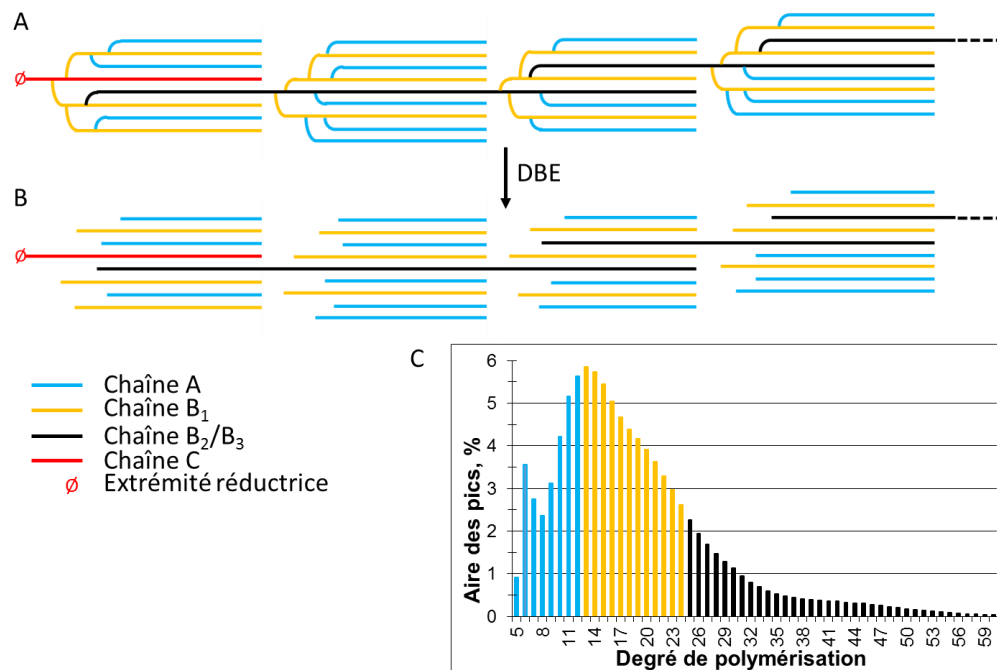
Il existe un niveau d'organisation supplémentaire au sein de l'amylopectine. Les chaînes glucaniques constituant la molécule peuvent être subdivisées en trois types (Stanley Peat, W. J. Whelan et al. 1952) :

- les chaînes A, externes, qui ne supportent aucune autre chaîne
- les chaînes B, internes, qui portent les chaînes A et d'autres chaînes B, et qui peuvent être contenues dans une ou plusieurs grappes.
- une chaîne C possédant une extrémité réductrice, dirigée vers le centre du grain.

Diverses techniques, telles que la chromatographie échangeuse d'anions ou l'électrophorèse capillaire, permettant la séparation et la détection des glucanes en fonction de leur degré de polymérisation (DP), ont permis de réaliser des études plus fines de la structure de l'amylopectine

(Hanashiro, Abe et al. 1996; Morell, Samuel et al. 1998). Pour cela, les liaisons  $\alpha$ -1,6 sont hydrolysées par des enzymes de débranchement (DBE) (Figure 2B) et les chaînes linéaires ainsi libérées peuvent ensuite être analysées par le biais de ces techniques et révéler la distribution de longueurs de chaîne (DLC) de l'amylopectine (Figure 2C).

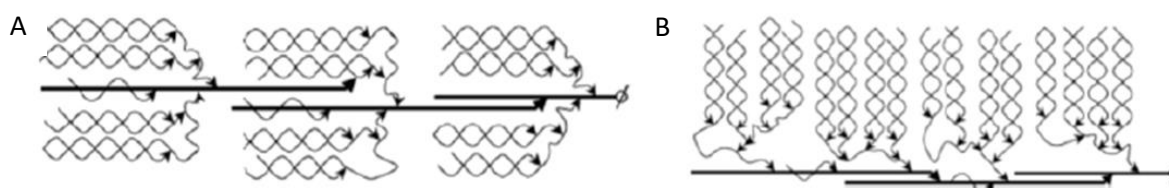
La DLC de l'amylopectine provenant de diverses sources botaniques a mis en évidence une périodicité de 12 résidus de glucoses. Cette découverte a permis de classifier les différentes chaînes de l'amylopectine en plusieurs catégories : les chaînes externes A, les plus courtes, constituées de 6 à 12 résidus de glucoses ; les chaînes B<sub>1</sub>, comprises entre 13 et 24 résidus, contenues dans une seule grappe ; les chaînes B<sub>2</sub>, de DP 25 à 36, et les chaînes B<sub>3</sub> de DP supérieur à 36 (Figure 2) (Hanashiro, Abe et al. 1996). Il apparaît néanmoins d'après les travaux de Bertoft (Bertoft, Piyachomkwan et al. 2008) que certaines chaînes A externes sont constituées de DP compris entre 10 et 16 résidus de glucose et donc recouvrent une partie des chaînes B<sub>1</sub>.



**Figure 2: Représentation schématique de grappes d'amylopectine (selon le modèle défini par Hizukuri), des différents types de chaînes qui la constituent et du résultat de l'analyse de la distribution de longueur de chaînes des glucanes composant la macromolécule. (A) Schéma des grappes de l'amylopectine, en bleu, on retrouve les chaînes A externes de la molécule. En orange, les chaînes B<sub>1</sub>, internes, qui portent les chaînes A et d'autres chaînes B, et qui sont présentes au sein d'une seule grappe. En noir, les chaînes B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> reliant plusieurs grappes. En rouge, on retrouve la chaîne C porteuse de l'extrémité réductrice du polysaccharide. (B) Représentation schématique d'une molécule d'amylopectine dont les liaisons  $\alpha$ -1,6 ont été soumises à une hydrolyse par des enzymes de débranchement (DBEs). (C) Distribution de longueur de chaîne de l'amylopectine (hydrolysée en B), déterminée par électrophorèse capillaire ou par chromatographie échangeuse d'anions. Les différentes populations de chaînes décrites précédemment y sont rappelées.**

### 1.2.2 L'organisation en grappe de l'amylopectine

Si la structure de l'amylopectine est organisée sous forme de grappes, l'agencement de ces dernières les unes par rapport aux autres n'est pas encore déterminé. Deux modèles d'organisation ont été proposés. Le premier (Figure 3A) où les chaînes B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> font parties des grappes et sont dans la même orientation que ces dernières et partiellement cristallines (Hizukuri 1986) et le second (Figure 3B), plus récent, où les chaînes B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> sont retrouvées dans les régions amorphes et sont orientées perpendiculairement aux grappes (Bertoft 2004).



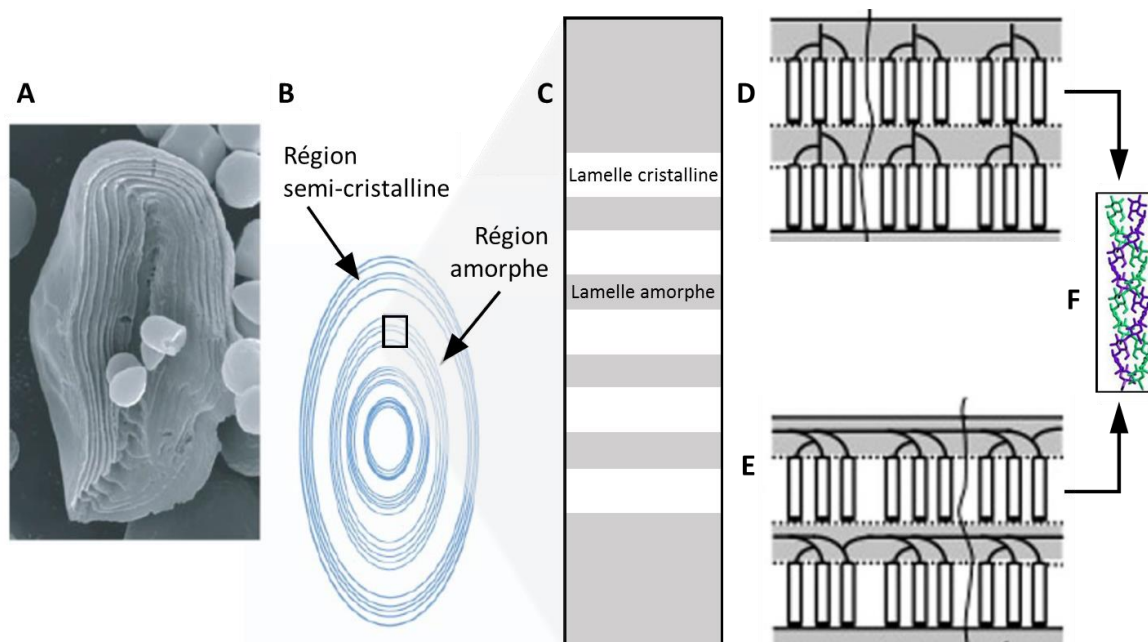
**Figure 3 : Modèle définissant l'agencement des grappes de l'amylopectine proposé par Hizukuri (A) et Bertoft (B) ; les  $\alpha$ -1,4 glucanes linéaires portant les grappes sont représentés par des lignes noires sur lesquelles reposent les glucanes externes qui interagissent entre eux pour former des doubles hélices ; les points de branchement constitués par les liaisons  $\alpha$ -1,6 sont représentés par des flèches et l'extrémité réductrice est symbolisée par le symbole  $\emptyset$  (Hizukuri 1986; Bertoft 2004).**

### 1.3 Les différents niveaux d'organisation structurale du grain d'amidon

Le grain d'amidon est une particule structurée au sein de laquelle différents niveaux d'organisation existent (Figure 4). Pour étudier la structure du grain, l'amidon peut être soumis à une hydrolyse ménagée (enzymatique ou acide). L'observation de ces grains par microscopie électronique (Figure 4A) révèle alors une alternance de zones concentriques plus ou moins denses aux électrons, du centre (hile) vers la périphérie du grain, appelée « anneaux de croissance » (Figure 4B). Ces anneaux résultent de l'alternance de régions semi-cristallines, plus résistantes à l'hydrolyse, et de régions amorphes.

C'est au sein de ces régions semi-cristallines (Figure 4C) que l'on retrouve une succession de lamelles amorphes (contenant les points de branchement) et de lamelles cristallines (Figure 4D et E) où les glucanes linéaires sont agencés en doubles hélices (Figure 4F).





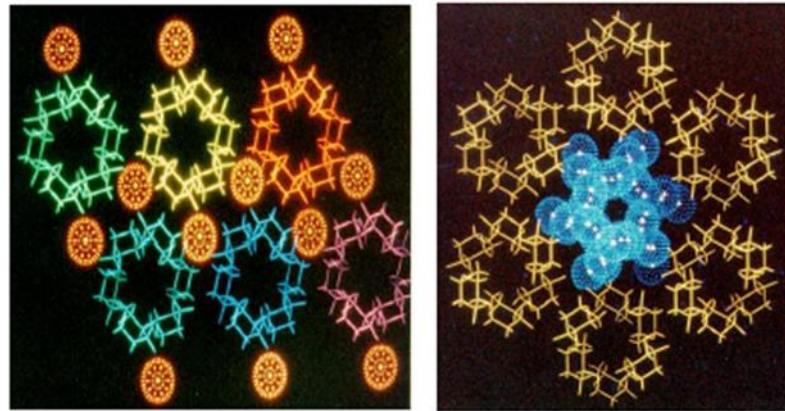
**Figure 4: Représentation des différents niveaux d'organisation du grain d'amidon** (adapté de (Vamadevan and Bertoft 2014))(A) Amidon de blé ayant subi une hydrolyse ménagée, observé par microscopie électronique à balayage, les anneaux de croissance y sont visibles. (B) Représentation schématique de l'alternance entre région semi-cristalline et région amorphe, une région semi-cristalline y est encadrée. (C) Représentation d'une région semi-cristalline où l'on retrouve une alternance entre lamelles cristallines (en blanc) et lamelles amorphes (en gris). (D et E) Représentations schématiques de l'agencement des glucanes au sein des lamelles amorphes (gris) et cristallines selon les modèles proposés par Hizukuri (D) et Bertoft (E). (F) Représentation de l'association des glucanes linéaires en hélices.

Suivant l'origine végétale, le taux de cristallinité du grain d'amidon oscille entre 15 et 45%. Cette variation s'explique par l'agencement des glucanes linéaires en doubles hélices parallèles au sein des lamelles cristallines et la quantité d'eau piégée entre ces doubles hélices (Imberty, Chanzy et al. 1988). On différencie les types cristallins A, B et C :

-Le type A (Figure 5, à droite), retrouvé dans l'albumen des céréales, présente une maille monoclinique au sein de laquelle 4 molécules d'eau sont piégées. Dans les organismes présentant ce type cristallin (comme le blé ou le riz), on retrouve plus de chaînes A et B<sub>1</sub>. De plus, le ratio  $(A+B_1)/(B_2+B_3)$  est compris entre 8,9 et 12,9 (Hanashiro, Tagawa et al. 2002).

-Le type B (Figure 5, à gauche), présent dans les tubercules, se caractérise par une maille hexagonale dans laquelle 36 molécules d'eau sont piégées. Les organismes présentant un type cristallin B (comme la pomme de terre) ont un ratio  $(A+B_1)/(B_2+B_3)$  qui oscille entre 2,5 et 6,5 (Hanashiro, Tagawa et al. 2002). Il semble également qu'un contenu élevé en amylose puisse favoriser la formation de cristaux de type B (Wattebled, Buleon et al. 2002; Zhou, Yang et al. 2015).

- et enfin le type C, décrit chez le pois, est une combinaison des types cristallins A et B, au sein du même grain ou de grains différents. (Buleon, Gallant et al. 1997).

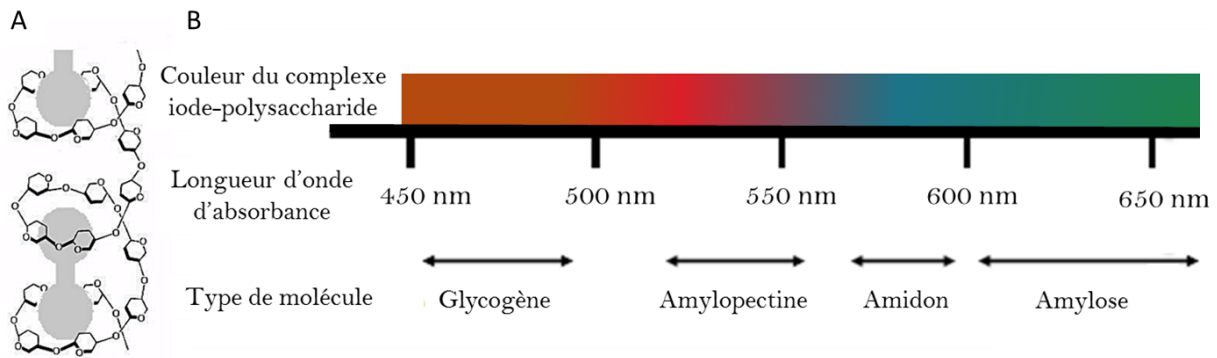


**Figure 5: Représentation en coupe transversale de la structure cristalline de l'amylopectine.** À gauche, représentation de la maille cristalline de type A, les molécules d'eau sont représentées en orange. À droite, représentation de la maille cristalline de type B, les molécules d'eau sont indiquées en bleu (Buleon, Gallant et al. 1997).

Au niveau du grain, un autre niveau d'organisation a été mis en évidence par Gallant lors d'observations en microscopie électronique (Gallant, Bouchet et al. 1997). Le grain d'amidon serait constitué de particules de tailles variables, appelées « blocklets », les petits blocklets sensibles à l'hydrolyse et des grands blocklets plus résistants. Néanmoins l'agencement de ces blocklets au sein du grain d'amidon reste encore sujet à débat (Bertoft 2017).

#### 1.4 L'interaction entre l'iode et les $\alpha$ -1,4 glucanes

Une des caractéristiques physico-chimiques de l'amidon couramment utilisée en laboratoire repose sur sa capacité à interagir avec l'iode. En effet, lorsque l'amidon est mis en présence de diiode ( $I_2$ ) il se colore en bleu, facilitant la détection du polysaccharide (Bailey and Whelan 1961). Cette propriété ne se limite pas à l'amidon. En effet, les  $\alpha$ -1,4 glucanes peuvent être colorés à l'iode dès que ces derniers atteignent un DP de 12 résidus de glucoses. C'est en effet à partir de cette taille que les chaînes glucaniques peuvent adopter une conformation en hélice (à raison de 6 glucoses par tour) à l'intérieur de laquelle les molécules de diiode ( $I_2$ ) peuvent s'imbriquer (Figure 6A). Lorsque la taille de la chaîne glucanique augmente, le nombre de molécules d'iode pouvant se fixer augmente également, engendrant une augmentation de la longueur d'onde maximale d'absorbance du complexe diiode/ $\alpha$ -1,4 glucanes (John, Schmidt et al. 1983).



**Figure 6 : Interaction entre l'iode et les  $\alpha$ -1,4 glucanes.** (A) Représentation schématique de l'interaction entre le diiode ( $I_2$ ) et une chaîne glucanique ; (B) Domaines d'absorbance des complexes formés entre l'iode et les polysaccharides.

L'introduction de points de branchement perturbe l'agencement des glucanes en doubles hélices et donc l'interaction avec le diiode. L'identification de la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe iode/polysaccharide nous donne donc des indications sur la structure du polymère. Le complexe prendra par exemple une teinte brune dans le cas du glycogène (qui contient 8 à 10% de liaison  $\alpha$ -1,6) alors que l'amylose (contenant moins de 1% de points de branchement) prendra une teinte verte en présence de diiode (Figure 6B).

Outre son utilité pour la localisation des polysaccharides dans les tissus, la coloration à l'iode est très utile pour la caractérisation ou le suivi de l'activité d'enzymes agissant sur les  $\alpha$ -1,4 glucanes. La réalisation de gels d'activités (zymogrammes) permet, par exemple, de visualiser des activités enzymatiques agissant sur un substrat inclus dans le gel de polyacrylamide. Il est également possible de réaliser un suivi de réactions enzymatiques au cours du temps. Ainsi en incubant, par exemple, une enzyme de branchement avec un substrat adéquat, la modification de celui-ci peut être visualisée en prélevant régulièrement des aliquotes qui seront mises en présence de diiode.

## 2. La synthèse de l'amidon

Chez les végétaux, l'amidon s'accumule dans les plastes qui sont des organites d'origine endosymbiotique. On distingue deux types d'amidon :

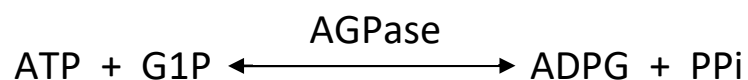
- ✚ L'amidon transitoire est synthétisé et stocké le jour dans les chloroplastes des feuilles et dégradé durant la nuit.

✚ L'amidon de réserve est quant à lui produit et stocké à long terme dans les amyloplastes des organes de réserve (graines, tubercules). Ce dernier sert essentiellement à subvenir à certains besoins spécifiques de la plante de la plante comme la germination par exemple.

L'amidon n'est constitué que de résidus de glucoses liés entre eux par deux types de liaisons. Malgré cette apparente simplicité, l'édification d'une structure aussi complexe que l'amylopectine nécessite l'intervention d'une multitude d'enzymes. Les mécanismes de synthèse du glycogène et de l'amidon, polymères possédant des caractéristiques communes, sont souvent mis en parallèle pour expliquer la fonction des enzymes de leur métabolisme. Néanmoins, l'analogie entre les deux processus reste limitée en raison de la présence de plusieurs isoformes enzymatiques intervenant à chaque étape du métabolisme de l'amidon. Ces isoformes assurent la même fonction catalytique, mais possèdent des spécificités différentes (Ball and Morell 2003).

## 2.1 La synthèse du précurseur

La synthèse du nucléotide sucre précurseur, l'ADP-glucose, constitue l'étape clé du métabolisme à la fois du glycogène chez les bactéries, mais également de l'amidon chez les plantes. L'ADP-glucose (ADPG) est synthétisé à partir de glucose-1-phosphate (G1P) et d'ATP par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) et libère du pyrophosphate (PPi).



Si la plupart des AGPases bactériennes sont codées par un seul gène et sont actives sous forme d'homotétramère ( $\alpha_4$  ou  $S_4$ ) (Ballicora, Iglesias et al. 2003), chez les plantes plusieurs gènes, codant les formes S et L, sont impliqués (S et L pour petite et grande sous unités respectivement). Il en résulte la formation d'un hétérotétramère ( $L_2S_2$ ). Chez *C. reinhardtii* et *A. thaliana*, il a été montré que l'absence de la sous unité S conduit à l'abolition de la synthèse de l'amidon (Lin, Caspar et al. 1988; Zabawinski, Van Den Koornhuysse et al. 2001). Chez *A. thaliana* lorsque la sous-unité S est présente mais inactive, il y a formation d'hétérotétramère actif suggérant que les sous unités L, outre leur fonction régulatrice, possèdent également une activité catalytique (Ventriglia, Kuhn et al. 2008). Les deux sous-unités participent donc toutes deux à la catalyse et à la régulation de l'enzyme ou l'agencement en hétérotétramère est primordiale pour son fonctionnement optimal (Tuncel, Kawaguchi et al. 2014).

L'activité de cette enzyme est soumise à plusieurs régulations :

- Régulation spatio-temporelle :

Plusieurs isoformes de chacune des sous-unités sont exprimées chez les végétaux supérieurs et leur expression diffère en fonction des tissus végétaux et au cours de la croissance de la plante. Chez *A. thaliana* par exemple, on dénombre une isoforme de la petite sous-unité pouvant interagir avec 4 isoformes de la grande sous-unité, différemment exprimées dans les tissus de la plante (Crevillen, Ballicora et al. 2003). Dans l'albumen du maïs, l'activité « AGPasique » la plus importante est cytosolique (Huang, Hennen-Bierwagen et al. 2014), ce qui implique un processus supplémentaire de régulation chez les céréales : le transport de l'ADP-glucose produit dans le cytosol vers les amyloplastés (Cakir, Shiraishi et al. 2016; Li, Wei et al. 2017). En plus d'une régulation spatiale, l'expression et l'activité des AGPases sont également régulées dans le temps. Dans l'albumen de blé, l'activité de l'AGPase est amyloplastique dans les premiers stades de développement tandis que 10 à 12 jours après pollinisation, l'activité AGPasique devient principalement cytosolique (Emes, Bowsher et al. 2003). Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, l'expression de la petite sous unité de l'AGPase est plus importante la journée que la nuit, expliquant la régulation circadienne de la synthèse d'amidon (Zabawinski, Van Den Koornhuysse et al. 2001; Ral, Colleoni et al. 2006).

- Régulation de type allostérique :

L'activité des AGPases est contrôlée de manière allostérique. Parmi les effecteurs influençant son activité, quel que soit l'organisme, les activateurs allostériques de l'enzyme semblent être étroitement corrélés à la voie métabolique du carbone. Chez les plantes, les cyanobactéries et les algues vertes, l'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA), premier métabolite issu du cycle de Calvin, joue le rôle d'activateur alors que l'orthophosphate (Pi), indicateur de la charge énergétique de la cellule, contrôle négativement son activité.

- Régulation de type rédox :

Chez la pomme de terre, *Arabidopsis* ou encore le pois, l'activité enzymatique des AGPases est soumise à un contrôle rédox. Elle se trouve ainsi activée sous sa forme réduite (Tiessen, Hendriks et al. 2002; Hendriks, Kolbe et al. 2003).

## 2.2 L'initiation

### 2.2.1 Le cas du glycogène

De manière extrêmement simpliste, la synthèse d'une molécule de glycogène peut être décrite en 3 étapes :

- la synthèse du nucléotide sucre précurseur
- l'élongation des  $\alpha$ -1,4 glucanes par une glycogène synthase
- la ramification de ces chaînes glucaniques (création de liaisons  $\alpha$ -1,6) par les enzymes de branchement.

Néanmoins, l'élongation des  $\alpha$ -1,4 glucanes nécessite la création au préalable d'une amorce qui va jouer le rôle de déclencheur et permettre d'initier la synthèse du polysaccharide.

Chez les animaux et les champignons, cette amorce est créée par les glycogénines. Ces enzymes ont la capacité de s'auto-glucosyler pour produire une amorce de 8 à 12 résidus de glucose qui pourra ensuite être utilisée par la glycogène synthase (Zeqiraj and Sicheri 2015). Cette dernière utilise l'UDP-glucose pour allonger les chaînes glucaniques existantes. Chez la plupart des mammifères, un seul gène code la glycogénine et sa forme active est dimérique, suggérant un transfert de glucose entre sous-unités (Cao, Steinrauf et al. 1995). Chez la levure, deux isoformes génétiquement indépendantes de la glycogénine ont été retrouvées (Cheng, Mu et al. 1995). Chez ce même organisme, il a été montré qu'en absence de glycogénines, l'initiation de la synthèse de glycogène pouvait être restaurée par une glycogène synthase hyperactive (Torija, Novo et al. 2005).

Chez les bactéries, qui ne possèdent pas de glycogénines, c'est la glycogène synthase qui assure le processus d'initiation de façon similaire aux glycogénines animales et fongiques. Elle possède donc une double fonction : celle de s'autoglucosyler pour permettre la création de l'amorce et celle d'élongation des  $\alpha$ -1,4 glucanes à partir de cette amorce en utilisant l'ADP glucose comme substrat (Ugalde, Parodi et al. 2003).

Ces deux processus d'initiation de la synthèse du glycogène sont relativement proches, mais qu'en est-il de l'initiation de la synthèse de l'amidon ? La synthèse des deux polysaccharides, possédant des caractéristiques communes, a amené les chercheurs à s'interroger sur un processus similaire qui régirait l'initiation de la synthèse de l'amidon.

### 2.2.2 L'initiation de la synthèse d'amidon

A ce jour, chez les végétaux, aucune protéine de type « glycogénine » n'a été identifiée comme intervenant dans la synthèse d'amidon. De plus, il n'a pas non plus été démontré qu'une des isoformes d'amidon-synthases, responsables de l'élongation des  $\alpha$ -1,4 glucanes, était capable de s'autoglycosyler comme cela a été mis en évidence pour les glycogène-synthases bactériennes.

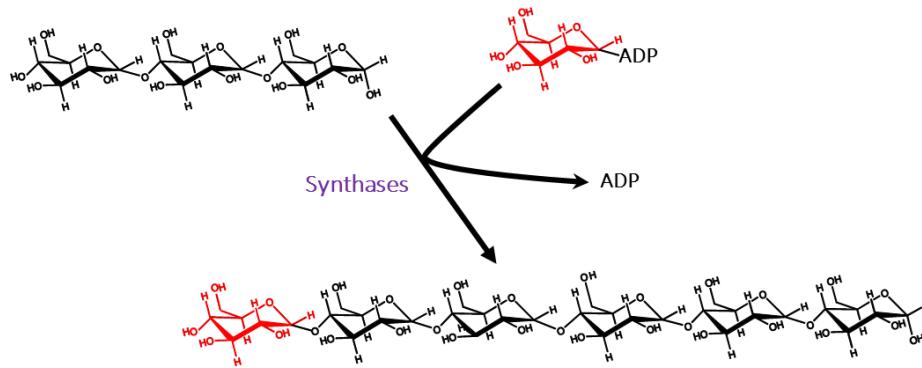
Néanmoins, des tests d'activités effectués *in vitro* sur des amidon-synthases purifiées de tubercules de pomme de terre ont montré que la seule présence d'ADP-glucose était suffisante pour observer une activité enzymatique avec production de chaînes linéaires et donc sans amorce requise (Mukerjea and Robyt 2012). L'initiation de la synthèse de l'amidon pourrait alors être supportée par une synthase comme c'est le cas pour le glycogène bactérien.

Chez *Arabidopsis thaliana*, des études menées sur des mutants, dépourvus de l'amidon-synthase soluble IV (SSIV), ont montré que cette dernière était impliquée dans le processus d'initiation de la synthèse de l'amidon (Roldan, Wattedled et al. 2007). En effet, chez un individu sauvage de cet organisme, on dénombre 5 à 7 grains d'amidon par chloroplaste. Lorsque SSIV est absente, on dénombre un (occasionnellement deux) grain(s) d'amidon par plaste, de taille plus importante, suggérant un (à deux) évènement d'initiation de la synthèse d'amidon par plaste chez ce mutant.

Cependant, la seule intervention d'une amidon-synthase dans le processus d'initiation de la synthèse d'amidon reste soumise à discussion. Des études récentes ont montré que le volume du plaste était étroitement lié au contenu en amidon. Une mutation engendrant une augmentation de ce volume combinée à la mutation SSIV a pour effet d'augmenter le nombre de grains d'amidon en comparaison avec le simple mutant SSIV (Crumpton-Taylor, Pike et al. 2013). Il semblerait donc que le processus d'initiation de la synthèse de l'amidon soit régulé à plusieurs niveaux, combinant l'action de SS4 au mécanisme de division du plaste.

### 2.3 L'élongation des $\alpha$ -1,4 glucanes

Que ce soit dans le cadre de la synthèse du glycogène bactérien ou celle de l'amidon, les glycogène-synthases et les amidon-synthases sont responsables de l'allongement des glucanes. Ces dernières catalysent le transfert du résidu de glucose de l'ADP-glucose sur l'extrémité non réductrice d'un  $\alpha$ -1,4 glucane permettant la création d'une nouvelle liaison  $\alpha$ -1,4 O-glycosidique (Figure 7).



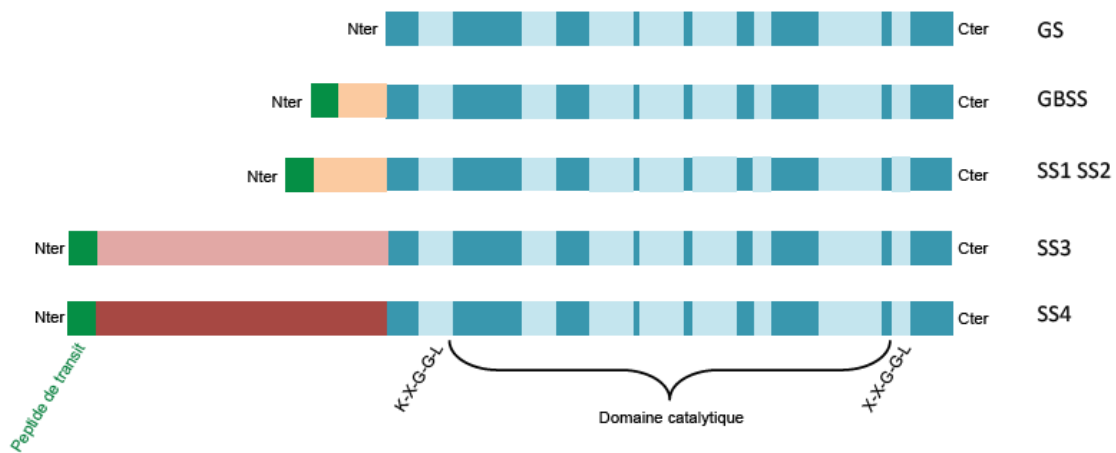
**Figure 7 : Représentation schématique de la réaction catalysée par les synthases**, transfert d'un glucose sur l'extrémité non réductrice d'un  $\alpha$ -1,4 glucane à partir d'ADP-glucose et libération de l'ADP. En rouge le résidu glucose transféré.

La synthèse du glycogène n'implique qu'une glycogène-synthase, en revanche plusieurs amidon-synthases sont nécessaires à l'édification de l'amidon.

Les synthases appartiennent à la famille des Glycosyles Transférases 5 (GT) de la classification CAZy (Coutinho, Deleury et al. 2003). Dans cette classification sont regroupées les enzymes présentant des homologies de séquences ainsi que des caractéristiques structurales et mécanistiques communes. Les synthases possèdent un domaine catalytique très conservé dans leur région C-terminale (Cao, Imparl-Radosevich et al. 1999) où l'on retrouve 8 motifs identifiés parmi les lesquelles les motifs KXGGL et XXGGL, localisés aux extrémités du domaine catalytique dans les régions I et VIII respectivement (Figure 8).

Malgré ces similitudes, les amidon-synthases se distinguent de la glycogène-synthase et les unes des autres en raison de la variabilité de taille et de séquence de leur domaine N-terminal. Les amidon-synthases I et II possèdent une région N-terminale plus courte que SSIII et SSIV ; conférant à chacune des enzymes ses propres spécificités (Figure 8).





**Figure 8 : Schéma représentatif de l'organisation des domaines catalytique et C-terminal d'une glycogène synthase (GS) procaryote comparé aux différentes classes d'amidon-synthases (GBSS, SS1, SS2, SS3 et SS4).** En bleu, est représenté le domaine catalytique des synthases localisé dans la partie C-terminale, en bleu clair les 8 régions conservées du domaine catalytique. En marron, on retrouve l'extension N-terminale plus courte pour SSI et SSII et plus longue chez SSIII et SSIV . Enfin, en vert, est indiqué le peptide de transit qui permet l'adressage des protéines vers le plaste.

Dans le règne végétal, on retrouve jusqu'à 6 amidon-synthases : les amidon-synthases solubles (SSI à SSV) et l'amidon-synthase liée au grain (GBSS pour Granule Bound Starch Synthase). De plus chez certains végétaux, et en particulier les céréales, plusieurs isoformes d'une même classe d'amidon-synthase peuvent être retrouvées. Dans ce cas, l'expression est spécifique du tissu et chaque organe n'exprime généralement qu'une enzyme de chaque classe (Schwarte, Brust et al. 2013).

### 2.3.1 L'amidon-synthase liée au grain : GBSS

La GBSS est connue pour être la seule enzyme impliquée dans la synthèse de l'amylose. Au cours de la synthèse de l'amidon, elle se retrouve dans le grain et représente 95% des protéines qui y sont présentes. En son absence, les mutants se retrouvent dans l'impossibilité de synthétiser de l'amylose et les grains accumulés dans les plastes ne sont donc constitués que d'amylopectine. S'il est souvent admis que la GBSS n'a aucun impact majeur sur la structure de l'amylopectine (Inouchi, Glover et al. 1987), cette remarque doit être nuancée. En effet, en l'absence de GBSS, la distribution de longueur de chaîne de l'amylopectine des mutants montre une diminution des très longues chaînes de l'amylopectine (Takeda and Hizukuri 1987; Buleon, Gallant et al. 1997). Cette diminution a par la suite été attribuée au fait que la GBSS synthétise l'amylose à partir de ces très longues chaînes de

l'amylopectine (van de Wal, D'Hulst et al. 1998; Hanashiro, Itoh et al. 2008). Il a été récemment montré que la synthèse de l'amylose chez *Arabidopsis* nécessitait l'intervention d'une seconde protéine : PTST (pour protein targeting to starch). Cette protéine n'est pas directement impliquée dans la synthèse d'amylose mais permet l'adressage correct de la GBSS vers le grain d'amidon. En l'absence de PTST, la GBSS n'est plus dirigée au grain d'amidon, on observe alors une forte réduction de la quantité d'amylose dans les granules (Seung, Soyk et al. 2015).

### 2.3.2 Les amidon-synthases solubles

#### SSI :

L'étude *in vitro* de la SSI du maïs a démontré que cette dernière synthétise des chaînes courtes, comptant jusque 15 résidus de glucose. Lorsque le DP des chaînes augmente, l'activité enzymatique diminue mais son affinité augmente. Commuri et collaborateurs ont ainsi proposé que la SSI synthétise les chaînes courtes A et B<sub>1</sub> de l'amylopectine et qu'une fois cette synthèse effectuée, l'enzyme « inactive » se retrouverait piégée dans le grain (Commuri and Keeling 2001). L'étude, *in vitro*, de protéines tronquées a révélé que le domaine N-terminal est impliqué dans la spécificité de liaison au substrat. En son absence, l'affinité à l'amylopectine décroît, indiquant que ce domaine n'est pas directement impliqué dans la catalyse mais régulerait la liaison de l'enzyme envers son substrat et pourrait être également impliqué dans des interactions avec les autres enzymes du métabolisme (Imparl-Radosevich, Li et al. 1998).

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'analyse de la distribution de longueur de chaîne de l'amylopectine de lignées mutantes déficientes pour la SSI montre une diminution des chaînes de DP 8-12, ce qui confirme l'implication de cette enzyme dans la synthèse de chaînes courtes de l'amylopectine. (Delvalle, Dumez et al. 2005). Plus récemment, il a été démontré que l'activité de la SSI chez ce même organisme est soumise à une régulation de type redox et qu'elle est active sous forme réduite au cours de la journée (Skryhan, Cuesta-Seijo et al. 2015).

#### SSII :

Dans certains organismes (en particulier les céréales), plusieurs isoformes de SSII sont exprimées mais de manière tissu spécifique. Ainsi le maïs exprime 2 isoformes de SSII et 3 sont présentes chez le riz (Harn, Knight et al. 1998). L'étude de mutants dépourvus de l'activité de SSII dans divers organismes a montré son impact important dans la synthèse du grain d'amidon.

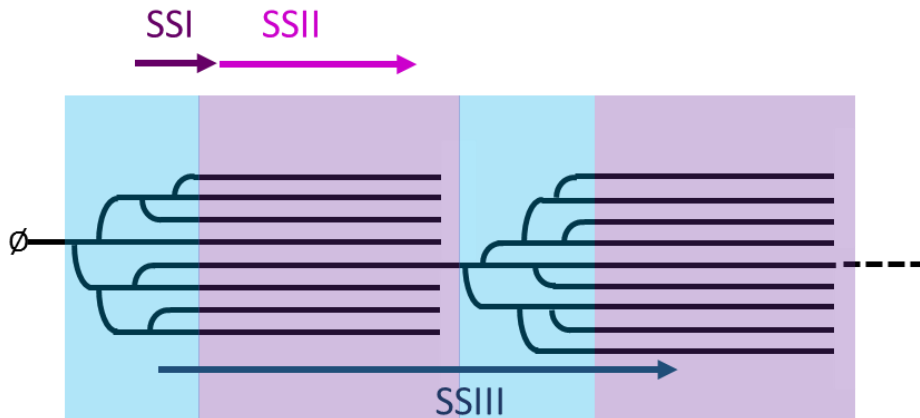
En effet, la mutation de SSII engendre une altération de la morphologie du grain (Szydlowski, Ragel et al. 2011), une modification de la cristallinité et de la distribution de longueur de chaîne de l'amylopectine. A l'exception du pois, où la mutation SSII semble affecter les longues chaînes B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> de l'amylopectine (Craig, Lloyd et al. 1998), la mutation SSII impacte essentiellement les chaînes intermédiaires de l'amylopectine chez *Chlamydomonas* (Fontaine, D'Hulst et al. 1993), le riz (Nakamura, Francisco et al. 2005) ou encore *Arabidopsis* (Zhang, Szydlowski et al. 2008). L'enrichissement en chaînes courtes au détriment des chaînes de tailles intermédiaires serait donc cohérent avec une implication de SSII dans l'élongation des chaînes courtes et de tailles moyennes de l'amylopectine (A et B<sub>1</sub>). Cette observation a par ailleurs été vérifiée *in vitro* sur la SSII du riz (Nakamura, Aihara et al. 2014).

### SSIII :

Comme dans le cas de SSII, plusieurs isoformes de SSIII sont retrouvées suivant les organismes et leur expression diffère en fonction de leur localisation dans les différents tissus et au cours de la croissance. Dans de nombreux organismes comme *Chlamydomonas* ou encore le maïs, l'absence de SSIII engendre une augmentation des courtes et très longues chaînes au détriment des chaînes B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> de l'amylopectine (Wang, White et al. 1993; Ral, Colleoni et al. 2006). Il semblerait donc que cette enzyme soit impliquée dans la synthèse des chaînes longues qui assurent la liaison entre les grappes (Figure 9).

Chez *Arabidopsis thaliana*, le phénotype du mutant est différent, l'amidon est présent en plus grande quantité dans les feuilles et l'activité des autres synthases est plus importante en comparaison avec le sauvage. Une hypothèse quant à la possible implication de SSIII sur la régulation de la synthèse de l'amidon dans les feuilles a été émise (Zhang, Myers et al. 2005). De plus, il a été mis en évidence chez le maïs, que SSIII et plus particulièrement son domaine N-terminal est impliqué dans des interactions physiques avec d'autres enzymes du métabolisme, comme SSI et SBEIIa (Hennen-Bierwagen, Liu et al. 2008). Par ailleurs, dans son extension N-terminale SSIII présente trois domaines dans lesquels certains résidus sont impliqués dans la liaison avec l'amidon, et permettent de réguler la catalyse enzymatique (Valdez, Busi et al. 2008; Wayllace, Valdez et al. 2010).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le domaine N-terminal de SSIII contribuerait par l'interaction avec d'autres enzymes du métabolisme de l'amidon (comme SSI et SBEIIa chez le maïs par exemple) et par la liaison à l'amidon, à réguler sa propre activité et celle des enzymes avec lesquelles elle interagit.



**Figure 9 : Schéma représentant les différents rôles des amidon-synthases au cours de la synthèse de l'amylopectine.** En bleu on retrouve les lamelles amorphes où se situent les points de branchement, en violet les lamelles cristallines où se retrouvent les glucanes linéaires.

#### SSIV :

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la mutation de SSIV n'engendre pas de modification de la structure de l'amylopectine. L'accumulation d'un (voire 2) gros grain(s) par plaste suggère une implication dans le processus d'initiation de la synthèse et dans la régulation du nombre de grains par chloroplaste.

#### SSV :

Cette isoforme d'amidon-synthase a été trouvée chez plusieurs organismes, comme la pomme de terre ou encore *A. thaliana*. Néanmoins, cette protéine semble dépourvue de certains acides aminés nécessaires à l'activité catalytique et son importance dans la biosynthèse de l'amidon n'est pas déterminée ni comprise à ce jour (Deschamps, Moreau et al. 2008).

### 2.3.3 Redondance fonctionnelle entre les amidon-synthases

La présence de nombreuses isoformes d'amidon-synthases, conservées au sein du règne végétal, indique qu'elles possèdent toutes une fonction spécifique au cours de la synthèse. Néanmoins, l'analyse des mutants dépourvus de SSII ou SSIII montrent des caractéristiques communes, comme l'augmentation des chaînes courtes par exemple (Zhang, Szydlowski et al. 2008). La combinaison de mutations, chez divers organismes, a permis de mettre en évidence les redondances fonctionnelles existant entre les différentes isoformes. L'exemple le plus flagrant

concerne les fonctions de SSIII et SSIV. Chez *Arabidopsis thaliana*, la double mutation engendre la perte totale de synthèse d'amidon alors que les triples mutants SSI/SSII/SSIII et SSI/SSII/SSIV accumulent toujours de l'amidon. L'ensemble de ces observations suggère que la synthèse d'amidon chez cet organisme nécessite la présence de SSIII ou SSIV pour initier le processus (Szydowski, Ragel et al. 2011). Chez le riz, la double mutation SSIIIa/SSIVb ne provoque pas l'abolition de la synthèse de l'amidon (probablement dû à la présence d'autres isoformes de SSIII et SSIV) mais induit une variation de la morphologie du grain dans les amyloplastés.

Cette morphologie n'est observée chez aucun des simples mutants, une fois encore la présence d'au moins une de ces 2 formes de synthase semble requise pour la synthèse d'un grain d'amidon de « morphologie sauvage » (Toyosawa, Kawagoe et al. 2016).

## 2.4 L'introduction des liaisons $\alpha$ -1,6 par les enzymes de branchement

Les enzymes de branchements (BEs) (EC 2.4.1.18), objets de ce travail de thèse, sont les seules responsables de la ramification de l'amylopectine. La création d'un point de branchement ou ramification résulte du clivage préalable d'une liaison d'un  $\alpha$ -1,4 glucane (produit par les synthases) puis du transfert de la portion de chaîne clivée en position  $\alpha$ -1,6.

### 2.4.1 Famille des $\alpha$ -amylases

Bien que certaines enzymes de branchement (bactériennes) aient été classées dans la famille des glycosides hydrolases 57 (GH57) selon la classification CAZy (Murakami, Kanai et al. 2006; Palomo, Pijning et al. 2011), la plupart des enzymes de branchement (BE) appartiennent à la famille des GH13. Dans cette classification sont regroupées les enzymes présentant des homologies de séquences et des caractéristiques structurales et mécanistiques communes. (Henrissat 1991; Henrissat and Bairoch 1993; Henrissat, Callebaut et al. 1996; Henrissat and Davies 1997; Cantarel, Coutinho et al. 2009).

Cette famille GH13, communément appelée famille des  $\alpha$ -amylases, regroupe des enzymes possédant une grande diversité dans leurs spécificités de substrat et de produits formés. En effet, les enzymes de cette famille, catalysent une vingtaine de réactions : au moins 26 types d'enzymes sont répertoriés selon la nomenclature E.C.

Cette nomenclature associe à chaque activité enzymatique une classification, à 4 niveaux :

- ✚ Le premier, défini par six classes d'activités enzymatiques : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et enfin les ligases.
- ✚ Le second, correspondant à une sous-classe renseignant sur le composé ou groupement chimique impliqué dans la réaction
- ✚ Le troisième niveau est relatif au type de réaction
- ✚ Le dernier niveau est un identifiant d'accèsion qui correspond à une activité enzymatique individuelle à chaque membre

Selon cette même nomenclature, on y retrouve des hydrolases (E.C. 3), les plus représentées au sein de la famille GH13), des transférases (E.C 2) et également des isomérases (E.C. 5). Dans cette famille, des transporteurs d'acides aminés y sont également répertoriés.

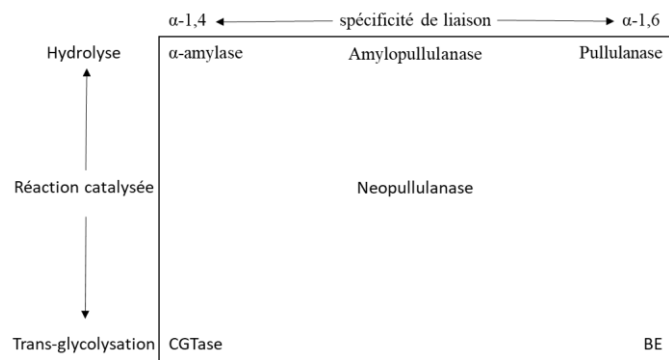
Malgré cette apparente diversité, les enzymes de cette famille ont été regroupées sur la base de 4 critères :

1. Elles doivent agir sur des liaisons  $\alpha$ -glucosidiques
2. Elles hydrolysent et/ou transfèrent des liaisons  $\alpha$ -glucosidiques selon un mécanisme qui permet le maintien de leur configuration anomérique.
3. Elles contiennent 4 régions très conservées (Figures 12 et 13) qui seront expliquées plus en détail dans la suite du manuscrit.
4. Elles possèdent une triade catalytique constituée de deux aspartates et un glutamate (Kuriki and Imanaka 1999).

Au sein de cette famille sont retrouvées de nombreuses enzymes participant au métabolisme de l'amidon mais également du glycogène.

L'analyse des séquences des membres de la famille GH13 a permis de les subdiviser en (au moins) 35 sous familles. On y retrouve ainsi les enzymes de branchement au sein des sous-familles 8 (majoritairement issus d'organismes eucaryotes) et 9 (principalement des BEs bactériennes) (Stam, Danchin et al. 2006).

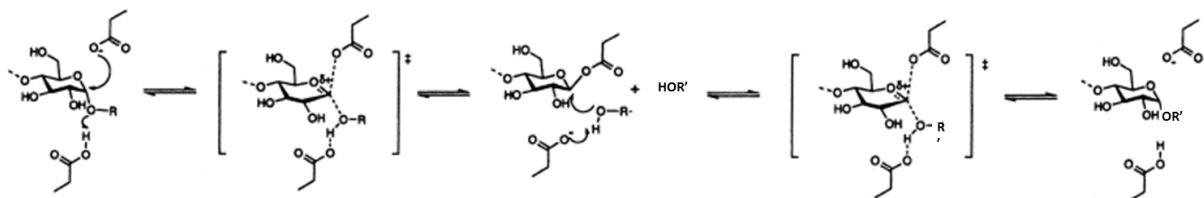
Les enzymes appartenant à la famille des  $\alpha$ -amylases GH13 possèdent toutes un mécanisme catalytique similaire qui se différencie, selon la spécificité de l'enzyme, par la nature du substrat et de la molécule qui sera acceptrice du glucane transféré : l'eau dans le cas des hydrolases et un groupement hydroxyle du substrat accepteur dans le cas des transférases (Figure 10).



**Figure 10 : Représentation schématique des relations entre les enzymes appartenant à la famille des  $\alpha$ -amylases et le type de réaction qu'elles catalysent (adapté de Kuriki, 1999).** Les enzymes de cette famille catalysent l'hydrolyse et/ou le transfert des  $\alpha$ -glucanes et agissent spécifiquement sur les liaisons  $\alpha$ -1,4 et/ou  $\alpha$ -1,6. Quelques exemples d'enzymes appartenant à cette famille sont indiqués, leur position relative dans le cadre correspond à leur spécificité catalytique : les  $\alpha$ -amylases hydrolysent spécifiquement les liaisons  $\alpha$ -1,4, les pullulanases les liaisons  $\alpha$ -1,6, tandis que les amylopullulanases hydrolysent les 2 types de liaisons. Les CGTases, quant à elles, catalysent l'élongation des  $\alpha$ -1,4 glucanes. Les BEs transfèrent des  $\alpha$ -glucanes en créant des liaisons  $\alpha$ -1,6. Enfin les néopullulanases peuvent réaliser l'ensemble des réactions décrites ci-dessus.

#### 2.4.2 Mécanisme d'action des enzymes de branchement de la famille GH13

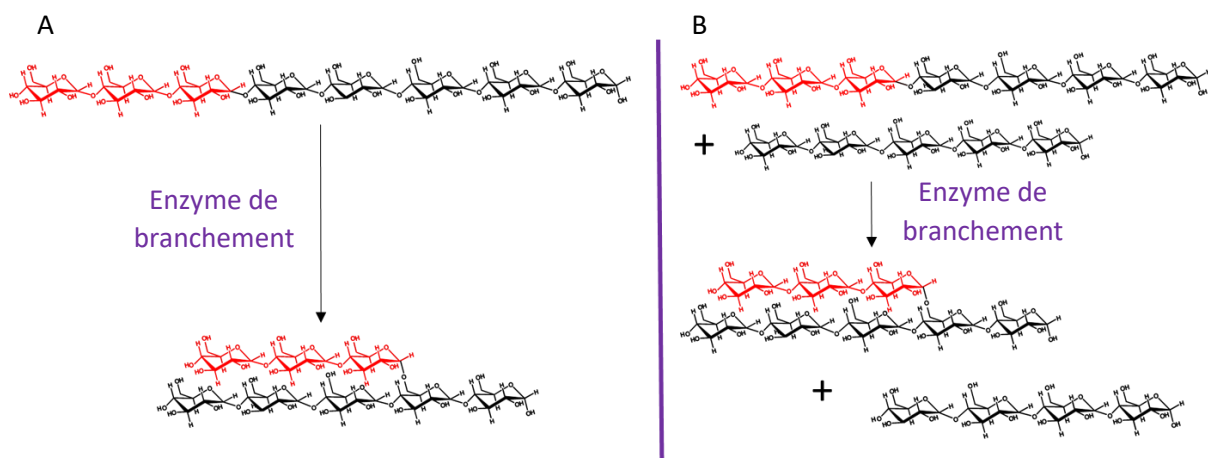
Les deux étapes du mécanisme catalytique sont des réactions de type substitution nucléophile d'ordre 2 (SN2) (Figure 11).



**Figure 11 : Représentation du mécanisme en 2 étapes des enzymes de branchement de la famille GH13 permettant le maintien de l'anométrie.** (MacGregor, Janecek et al. 2001). La première conduisant à la formation d'un intermédiaire enzyme-sucre et la seconde permettant la création de la liaison  $\alpha$ -1,6 et le recyclage de l'enzyme

Lors de la première étape, le groupement carboxylate d'un aspartate (nucléophile) attaque le carbone anomérique (C1) d'un glucane impliqué dans une liaison  $\alpha$ -1,4 O-glycosidique. Une liaison covalente se forme alors entre le résidu de glucose et le nucléophile formant un intermédiaire catalytique enzyme-sucre et libérant une partie du glucane substrat. Le mécanisme de type SN2 implique une inversion de configuration appelée inversion de Walden.

L'intermédiaire enzyme-sucre créé au cours de la première réaction subit alors l'attaque d'un hydroxyle activé par le groupement carboxylate d'un autre aspartate ou glutamate porté par l'enzyme. Ce groupement hydroxyle est porté par le C6 d'un résidu glucose, il y a donc formation d'une liaison  $\alpha$ -1,6 O-glycosidique. (Kuriki and Imanaka 1999; MacGregor, Janecek et al. 2001). Ce résidu de glucose peut être localisé sur la partie clivée du glucane donneur, il s'agit alors d'un mécanisme intramoléculaire ou sur un glucane adjacent dans le cas d'un mécanisme intermoléculaire (Figure 12). Ce type de mécanisme permet de conserver l'anométrie initiale du glucane par la succession de 2 réactions inversant l'anométrie.



**Figure 12 : Représentation schématique du mode d'action des enzymes de branchement durant un mécanisme intramoléculaire (A) et intermoléculaire (B), les résidus de glucose transférés sont représentés en rouge.**

### 2.4.3 Deux types d'enzymes de branchement impliqués dans la synthèse d'amidon.

Plusieurs isoformes d'enzymes de branchement impliquées dans la synthèse de l'amidon ont été découvertes. Contrairement à la synthèse du glycogène qui ne nécessite qu'une seule BE, deux catégories d'enzymes de branchement interviennent dans la synthèse de l'amidon. L'analyse de leur séquence primaire a permis de les classer en deux familles, A (ou type II) et B (ou type I). Chez les BE de type II (SBEII), on note la présence d'un domaine en N-terminal plus long qui est absent chez les BE de type I (SBEI) (Burton, Bewley et al. 1995).

Suivant le type d'organisme végétal étudié, plusieurs nomenclatures ont été utilisées pour les nommer. Au regard des nombreuses études réalisées sur le maïs, c'est sa nomenclature qui fait désormais office de référence.

Une seule SBEI est présente chez les végétaux, en revanche suivant l'organisme étudié on retrouve la présence d'une ou deux SBEII. (Burton, Bewley et al. 1995; Fisher, Gao et al. 1996). Lorsque



deux gènes distincts codent des enzymes de branchement de type II, celles-ci sont différenciées par la dénomination « a » et « b » qui leur est généralement ajoutée (Table 1).

**Table 1 : Classification des enzymes de branchement et leurs dénominations respectives. Entre parenthèses leurs dénominations historiquement utilisées.**

organisme	Famille A		Famille B
	Monocotylédones	Dicotylédones	Mono et dicotylédones
Maïs	SBE2a	SBE2b	SBE1
Blé	SBE2a	SBE2b	SBE1
Orge	SBE2a	SBE2b	SBE1
Riz	SBE2a (RBE4 ou QE2a)	SBE2b (RBE3 ou QE2b)	SBE1 (RBE1)
Pois			SBEB (SBE1)
Pomme de terre			SBE2 (SBEB)
Haricot			PvSBE2
Arabidopsis thaliana			SBE2.2 (AtBE2)      SBE2.1 (AtBE3)

De plus, chaque BE présente des spécificités quant à la longueur des chaînes qui sont transférées, ainsi qu'une activité variable envers des substrats de structures différentes. Des études ont également démontré qu'elles ne sont pas exprimées d'une manière équivalente au cours du développement ou dans les différents organes des plantes.

Afin de disséquer le fonctionnement et le rôle des BEs, différentes stratégies ont été employées, comme la création de mutations induisant la suppression ou la variation du niveau d'expression de ces enzymes pour en observer l'impact phénotypique au niveau de la synthèse d'amidon. Des études *in vitro* ont également été réalisées sur ces enzymes pour identifier leur substrat préférentiel, la taille minimale du substrat qui leur est nécessaire ainsi que la taille des chaînes qu'elles sont capables de transférer.

#### 2.4.3.1 Les enzymes de branchement de type I (BEI ou famille B)

SBEI est principalement exprimée dans les organes de réserves. Il semble qu'elle intervienne plus tard que les SBEII au cours du développement de la plante (Morell, Blennow et al. 1997; Kim and Guiltinan 1999; Mutisya, Sathish et al. 2003).

Le rôle de SBEI dans la synthèse de l'amidon est difficile à appréhender. En effet, l'analyse chez le maïs de mutants déficients pour SBEI n'a montré aucune altération de la structure de l'amidon que ce soit au niveau des feuilles ou de l'albumen (Blauth, Kim et al. 2002). En revanche, le mutant SBEI du riz présente de petites modifications dans la distribution de longueur de chaîne de l'amylopectine par comparaison avec la lignée sauvage. Une diminution des chaînes de DP 12 à 21 et de DP supérieur à 37 fut observée chez les lignées mutantes, ainsi qu'une augmentation des chaînes de DP  $\leq 10$  et des DP 24 à 34. Les auteurs ont suggéré une implication de SBEI dans la synthèse des chaînes B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> de l'amylopectine (Nakamura 2002; Satoh, Nishi et al. 2003).

La caractérisation biochimique de plusieurs SBEI a mis en lumière leur fonction de manière plus précise. Il s'avère que les SBEI ont plus d'affinité pour le substrat amylose. Cette enzyme est capable de transférer de longues chaînes de DP 30 mais privilégie le transfert de chaînes de DP compris entre 10 et 13 résidus à partir d'un substrat constitué d'au moins 15 résidus de glucose. (Takeda, Guan et al. 1993; Guan, Li et al. 1997; Rydberg, Andersson et al. 2001; Ito, Hamada et al. 2004). L'expression hétérologue des différentes SBE de maïs chez la levure a montré que SBEI n'était pas capable d'agir en absence de SBEII (SBEIIa et b) (Seo, Kim et al. 2002). Il serait donc possible que, chez le maïs, les SBEII agissent en amont de SBEI sur la synthèse du polymère. Chez cet organisme, il a été avancé l'hypothèse d'un rôle régulateur de SBEI sur les autres enzymes. En effet, l'absence de SBEI seule ne montre pas d'impact sur le phénotype amidon alors que la suppression de SBEI chez le maïs dans le mutant amylose extender, dépourvu de SBEIIb (donc seule SBEIIa reste présente) a montré une augmentation du branchement, traduisant un potentiel rôle régulateur de SBEI sur l'activité des autres BEs (Yao, Thompson et al. 2004).

#### 2.4.3.2 Les enzymes de branchement de type II, SBEII

Chez les monocotylédones, on retrouve 2 SBEII nommées SBEIIa et SBEIIb (Fisher, Gao et al. 1996; Rahman, Regina et al. 2001) alors que chez les dicotylédones une seule SBEII est présente (à l'exception d'*Arabidopsis thaliana*). De plus, on note une variabilité de l'expression de ces isoformes dans les différents organes. Généralement, SBEIIa est présente dans tous les organes de la plante alors

que l'isoforme SBEIIb est exprimée de manière spécifique au niveau de l'albumen (Dang and Boyer 1988; Dang and Boyer 1989; Gao, Fisher et al. 1996). Il a également été démontré que les niveaux d'expression de ces isoformes ne sont pas identiques selon l'organisme étudié. Ainsi, dans l'albumen du blé, SBEIIb a un niveau d'expression plus faible que la SBEIIa (Regina, Kosar-Hashemi et al. 2005) contrairement au maïs où l'inverse est observé (Gao, Fisher et al. 1997; Kim, Fisher et al. 1998).

Si l'absence de SBEI ne montre qu'un faible impact sur le phénotype amidon, en revanche, la suppression de BE de type II chez divers organismes se traduit par un phénotype beaucoup plus marqué.

#### Phénotype amidon dans les organes photosynthétiques

Chez le maïs, l'absence de SBEIIa (majoritairement active dans les feuilles) se traduit par une altération de la structure de l'amylopectine dans les organes photosynthétiques. Cette modification est caractérisée par une augmentation des longues chaînes. L'amidon des feuilles présente également un contenu en amylose plus élevé (Blauth, Yao et al. 2001). Les mutants SBEIIa du maïs présentent également un défaut du catabolisme de l'amidon : la dégradation de l'amidon transitoire durant la nuit n'est pas complète et entraîne une sénescence prématurée des feuilles. Ces résultats suggèrent l'implication de SBEIIa dans l'édification d'une structure de l'amylopectine compatible avec l'action des enzymes de dégradation de l'amidon transitoire (Yandeau-Nelson, Laurens et al. 2011).

#### Phénotype amidon dans les organes de réserve

Toujours chez le maïs, aucune modification notable de l'amidon dans les organes de réserve n'a été remarquée lorsque SBEIIa est absente. L'absence de phénotype dans ces derniers étant probablement due à la présence de l'isoforme SBEIIb (la plus exprimée dans ces organes). En revanche, lorsque l'isoforme SBEIIb est affectée, la synthèse du polysaccharide s'en trouve fortement impactée. L'étude de mutant SBEIIb (*amylose extender* du maïs et du riz) a montré une diminution de la synthèse de l'amidon associée à une augmentation du contenu en amylose, l'amylopectine présente des longues chaînes internes et des chaînes externes moins fréquemment branchées (Boyer and Preiss 1978; Mizuno, Kawasaki et al. 1993; Nishi, Nakamura et al. 2001).

Chez le blé, la diminution de la SBEIIb (forme la moins exprimée chez le sauvage) n'est pas suffisante pour voir un effet sur le contenu en amylose. En revanche lorsqu'il y a diminution de l'activité des 2 isoformes SBEIIa et SBEIIb, l'amidon résultant possède un contenu en amylose supérieur à 70% (Regina, Bird et al. 2006).

La surexpression de SBEII chez la pomme de terre, plante monocotylédone, ne possédant qu'une SBEII, a montré une forte augmentation des DP<sub>≤12</sub> et plus particulièrement du DP 6 (Brummell, Watson et al. 2015), suggérant que BEII agit principalement sur les chaînes courtes. Ce résultat confirme les analyses effectuées *in vitro* où SBEII transfère majoritairement des DP 6 (Rydberg, Andersson et al. 2001).

D'autres SBEII, issues de divers organismes, ont été analysées et caractérisées pour déterminer leurs spécificités catalytiques. Des études menées chez le blé (Morell, Blennow et al. 1997) et le riz (Nakamura, Utsumi et al. 2010) révèlent que contrairement aux SBEI, les SBEII sont plus actives sur l'amylopectine comme substrat (Guan and Preiss 1993) et transfèrent des chaînes plus courtes que les SBEI (de 6 à 14 résidus de glucose). De plus, il apparaît que l'isoforme SBEIIb transfère des chaînes plus courtes que SBEIIa, préférentiellement des DP 6 et 7 (Takeda, Guan et al. 1993; Nakamura, Utsumi et al. 2010), à partir d'un glucane composé de 12 résidus. Il est possible que ces spécificités de transfert soient responsables des variations de structure de l'amylopectine observées chez différents organismes. Que ce soit SBEI ou SBEII, la taille du substrat de préférence semble indiquer que la formation d'une hélice, qui nécessite un minimum de 12 résidus de glucose, soit un prérequis pour l'activité de branchement.

#### 2.4.4 Cas particulier d'*Arabidopsis thaliana*

Chez la plante dicotylédone *Arabidopsis thaliana*, il existe 2 isoformes de BE de type II, génétiquement indépendantes, impliquées dans la synthèse d'amidon au niveau des feuilles (Fisher, Gao et al. 1996). L'analyse du génome de cette plante révèle la présence d'un autre gène, apparentée aux SBEI, mais qui possède un faible taux de similarité avec les autres BE de type I et dont la fonction n'a pas pu être déterminée. Il a cependant été clairement établi que cette enzyme n'intervient pas dans le métabolisme de l'amidon des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Des études précédemment menées sur des plantes mutantes d'*Arabidopsis thaliana* déficientes pour SBE2.2 (AtBE2) ou SBE2.1 (AtBE3) ont montré des phénotypes semblables et proches d'une lignée sauvage. Néanmoins, des analyses plus fines de la structure des amylopectines produites ont révélé de légères modifications de la distribution de longueur de chaîne de ces molécules en comparaison avec ceux produits dans les plantes sauvages. Chez le mutant dépourvu de SBE2.2, on observe une diminution des chaînes de DP 6-7 alors que chez le mutant SBE2.1 ce sont les chaînes de DP5-9 qui diminuent. En parallèle, une petite augmentation des DP10-16 a été observée chez ces mutants. En revanche, des plantes possédant la double mutation *be2be3* ne sont plus capables de synthétiser de l'amidon mais

accumulent du maltose. Ces observations montrent que chez cet organisme, seuls SBE2.2 et SBE2.1 interviennent dans la synthèse d'amidon dans les feuilles et attestent du caractère fortement redondant de leurs fonctions (Dumez, Wattebled et al. 2006).

Les lignées mutantes *be2be3* d'*Arabidopsis thaliana* ont été d'un grand intérêt pour déterminer les particularités des BEs de divers organismes. Afin de déterminer si l'origine des BEs jouait un rôle dans la synthèse du polysaccharide synthétisé, différentes enzymes de branchement ont été exprimées dans ces lignées dépourvues des BEs endogènes.

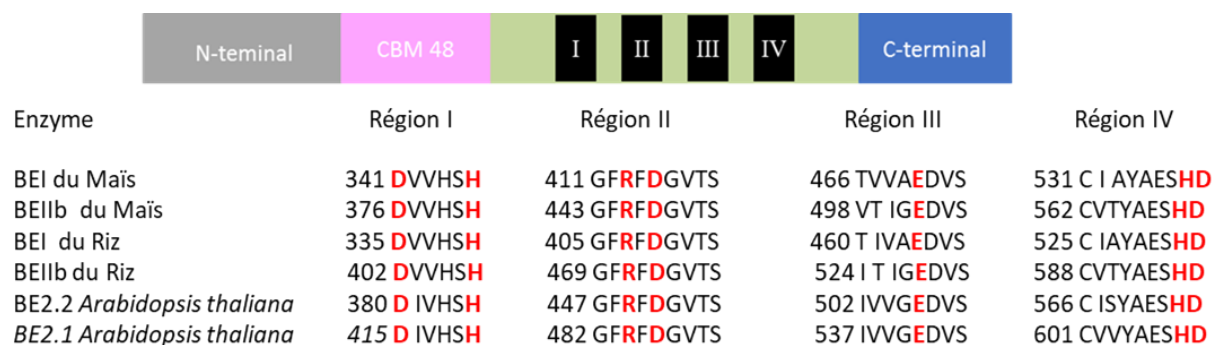
L'introduction dans ces lignées de différentes BEs de plantes a ainsi été effectuée. L'expression d'une SBEIIa du maïs (similaire aux 2 SBEII d'*Arabidopsis*) a permis une complémentation totale du phénotype amidon. En revanche l'introduction d'une SBEI (de pomme de terre ou de maïs) conduit à la synthèse d'amylopectine de structure modifiée associée à une augmentation du contenu en amylose (Lu, Streb et al. 2015; Liu, Zhao et al. 2016).

L'enzyme de branchement bactérienne d'*E. coli* (GlgB) a également été exprimée dans ces lignées mutantes (dépourvues de BEs endogènes) et a permis une restauration de la synthèse d'un polysaccharide de type amidon (de nature insoluble, partiellement cristallin et composé d'amylose et d'amylopectine). Néanmoins, le polysaccharide accumulé dans ces plantes diffère légèrement de l'amidon produit par une lignée sauvage. Des différences de distribution de longueur de chaînes de l'amylopectine ont ainsi été observées dans les plantes mutantes exprimant GlgB comme seule enzyme de branchement (Lu, Streb et al. 2015; Boyer, Roussel et al. 2016). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Il est possible que l'activité de GlgB ne puisse pas être régulée de la même façon que les BEs endogènes et/ou que cette dernière affecte la formation de complexes protéiques avec les autres enzymes du métabolisme de l'amidon ou encore que ces modifications résultent des propriétés spécifiques de l'enzyme bactérienne (comme la taille des chaînes que l'enzyme est capable de cliver et de transférer). Lors de ces expériences, il a également été démontré que le niveau d'expression de l'enzyme de branchement affecte la structure finale de l'amylopectine. Ainsi un contrôle du niveau d'expression de l'enzyme semble essentiel à la formation du polymère semi-cristallin.

#### 2.4.5 Structure et fonctions

Les enzymes de branchement de la famille GH13 sont des protéines composées de 3 domaines : un domaine catalytique, un domaine N-terminal incluant un domaine de liaison aux carbohydrates (CBM) et un domaine C-terminal (Figure 13). Ces enzymes présentant des homologies de séquences

et de structures ont été étudiées chez de nombreux organismes pour déterminer les spécificités de fonctions des différents domaines.



**Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation des différents domaines des enzymes de branchements.** En gris et rose, le domaine N-terminal incluant le module de liaison aux carbohydrates (CBM48), en vert le domaine catalytique contenant 4 motifs peptidiques (brins  $\beta$ ) très conservés (notées I à IV, en noir), en bleu le domaine C-terminal. En bas, présentation des régions conservées du domaine catalytique avec les acides aminés correspondant chez les BEs de type I du maïs et du riz et les BE de type II du maïs, du riz et d'*Arabidopsis thaliana*. La position des acides aminés est indiquée devant chaque séquence, en rouge on retrouve les 7 résidus très conservés et jouant un rôle dans la catalyse (Tetlow and Emes 2014).

#### 2.4.5.1 Le domaine catalytique central

La structure du domaine catalytique central, aussi appelé domaine A (Figure 13 en vert), de différents membres de la famille GH13 (Klein and Schulz 1991; Katsuya, Mezaki et al. 1998; Abad, Binderup et al. 2002; Pal, Kumar et al. 2010; Noguchi, Chaen et al. 2011; Froese, Michaeli et al. 2015; Hayashi, Suzuki et al. 2017) a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Ce domaine A est formé d'un tonneau  $(\beta/\alpha)_8$  typique de la famille GH13. Une autre caractéristique commune aux membres de cette famille est la présence de 4 motifs peptidiques très conservés dans ce domaine A. Des expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur les séquences codant des enzymes de la famille GH13 ont permis d'identifier 7 résidus, présents au sein de ces motifs, jouant un rôle clé dans la catalyse. Ces résidus sont : Asp<sup>376</sup>, His<sup>381</sup>, Arg<sup>445</sup>, Asp<sup>447</sup>, Glu<sup>502</sup>, His<sup>569</sup> et Asp<sup>570</sup> d'après la numérotation de la SBEIIb du maïs. Parmi ces résidus, on retrouve la triade catalytique (Asp<sup>447</sup>, Glu<sup>502</sup> et Asp<sup>570</sup>), dont les acides aminés sont situés dans les régions II, III et IV (Figure 13, en noir).

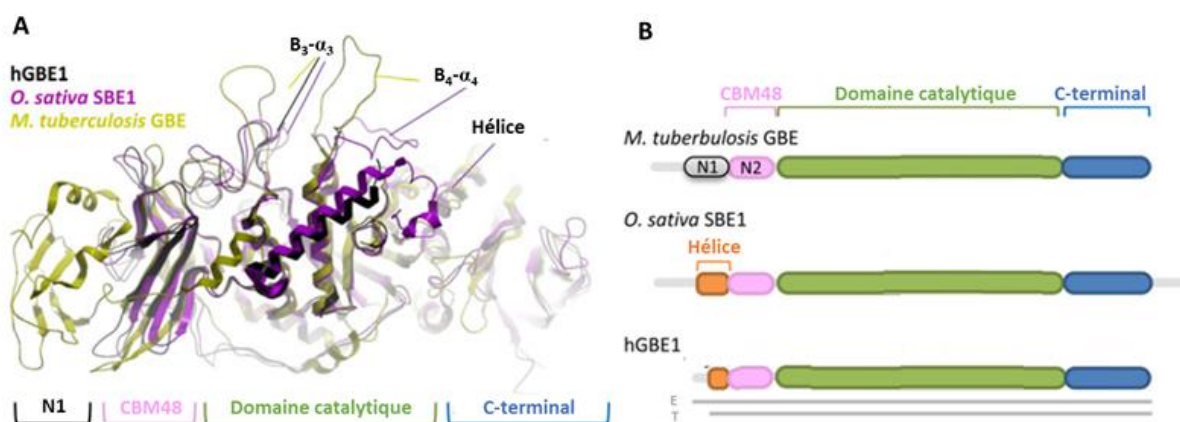
Chez les cyclodextrines glycosyltransférases (CGTases) ou encore les isoamylases, on retrouve un domaine B additionnel entre le brin  $\beta_3$  et l'hélice  $\alpha_3$ , constitué de boucles supplémentaires de tailles variables. Chez les BEs, la boucle qui relie le brin  $\beta_3$  avec l'hélice  $\alpha_3$  est plus courte. La présence, ou non, de ce domaine B semble reliée aux différentes spécificités des enzymes de la famille GH13. Ainsi

la présence de boucles plus courtes chez les BEs induirait la formation d'une cavité plus grande permettant d'accueillir des substrats branchés (Janecek 1997; Abad, Binderup et al. 2002).

La comparaison des séquences de BEs de divers organismes montre que ce domaine catalytique est très conservé et donc que les spécificités des BEs seraient en grandes parties dues à la variabilité du domaine N- et C-terminal.

#### 2.4.5.2 Le domaine N-terminal, en amont du domaine catalytique

La longueur du domaine N-terminal (en gris et rose Figure 14) des BEs diffère selon la famille de l'enzyme (Type I ou type II). On note la présence d'un domaine appelé N2 constitué d'un module de liaison aux carbohydrates (CBM48) (Figure 13 et 14 en rose). Le CBM48 est une région d'une centaine de résidus organisé en  $\beta$ -sandwich. Il est présent chez d'autres enzymes de la famille GH13 telles que les pullulanases et les isoamylases (enzymes capables de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,6) (Janecek, Svensson et al. 2011); mais aussi sur des protéines non catalytiques n'intervenant pas directement dans la synthèse de l'amidon comme PTST (pour protein targeting to starch) (Seung, Soyk et al. 2015).

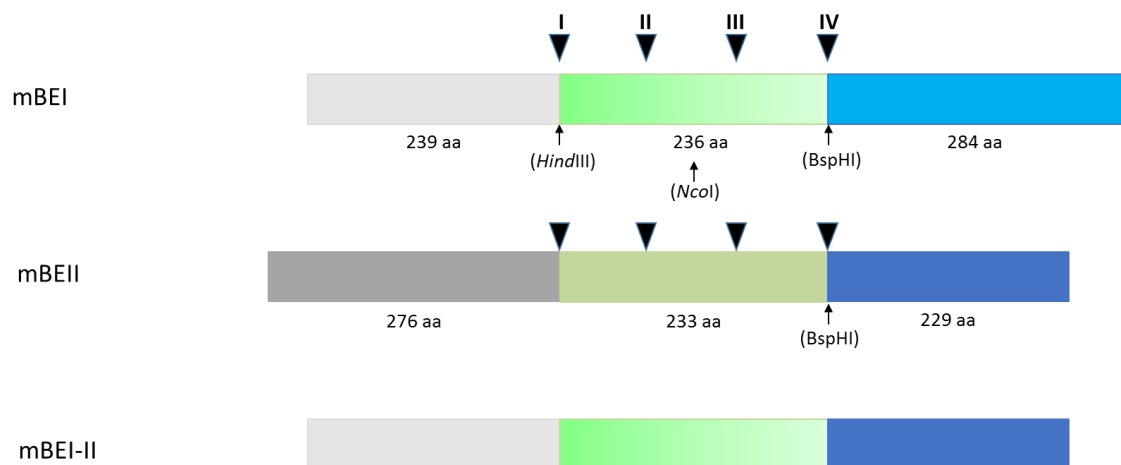


**Figure 14 : Structures des BEs humaine, du riz et de *Mycobacterium tuberculosis* et représentation schématique de l'organisation des différents domaines.** (A) Structure de la BE humaine (en gris), de SBE1 du riz (en violet) et de la BE de *mycobacterium tuberculosis*, la position des domaines N1, CBM48, du domaine catalytique des 3 enzymes est indiquée respectivement en gris, rose, vert et bleu et en (B), (B) Organisation des domaines des 3 BEs, on retrouve des différences au niveau du N-terminal des BEs procaryotes, possédant les domaines N1 et N2 (CBM48) et eucaryote où l'hélice  $\alpha$  remplace le domaine N1 (Froese, Michaeli et al. 2015).

La résolution des structures de BEs eucaryotes, humaine (Froese, Michaeli et al. 2015) et de celle de la SBEI du riz (Noguchi, Chaen et al. 2011; Chaen, Noguchi et al. 2012), a montré la présence d'une hélice alpha en amont du domaine N2. Néanmoins ces structures ont été obtenues à partir de BEs tronquées à l'extrémité N-terminale, il n'est donc pas exclu que l'agencement du domaine en amont du CBM48 soit dû à une stabilisation des protéines tronquées.

Afin de déterminer la fonction et l'importance du domaine N-terminal chez les BEs, des analyses biochimiques ont été menées sur des BEs tronquées de divers organismes ainsi que sur des enzymes chimériques.

1) Une première étude menée *in vitro* sur une enzyme chimérique du maïs (mBE I-II, Figure 15), où les acides aminés de la région N-terminale de SBEIIb ont été remplacés par ceux de la région N-terminale de SBEI, révèle que l'enzyme est capable de transférer des chaînes de façon similaire à l'action de SBEI (Kuriki, Stewart et al. 1997).



**Figure 15 : Représentation schématique de l'organisation des différents domaines des BEs de type I et II du maïs et d'une enzyme chimère.** Les domaines N-terminal, catalytique et le C-terminal des BEs de type I et II de maïs (mBEI, mBEII) et de l'enzyme chimère mBEI-II sont indiqués en gris, vert et bleu respectivement. Les 4 régions conservées sont représentés par des triangles noirs.

2) Un autre exemple concerne l'étude de l'enzyme de branchement d'*E. coli*. L'absence de 112 acides aminés du domaine N1 terminal conduit à une réduction de 40 à 60 % de l'activité en comparaison avec l'enzyme sauvage. Cette délétion n'a cependant aucun impact sur la capacité de liaison au substrat, sur la préférence de substrat, ni sur le  $K_M$  de l'enzyme (Binderup, Mikkelsen et al. 2000). Néanmoins, cette BE tronquée ne conserve pas le même mode de transfert que l'enzyme



sauvage. Elle transfère plus de chaînes de  $DP \geq 12$  et moins de chaînes courtes ( $DP \leq 11$ ) (Binderup, Mikkelsen et al. 2002).

Bien que des différences soient observées, au niveau du N-terminal, entre les BEs eucaryotes et procaryotes, ces résultats suggèrent une implication du domaine N-terminal des BEs dans la détermination de la taille des chaînes transférées durant la réaction de branchement.

#### Rôle du module de liaison aux carbohydrates (CBM) :

Le rôle d'un CBM est de se lier au ligand pour diriger la machinerie catalytique. Il ne possède pas d'activité catalytique propre mais permet d'en augmenter l'efficacité. Récemment, la caractérisation d'une nouvelle BE chez *Ostreococcus tauri* (OsttaBE) a montré l'importance des modules de liaison aux carbohydrates dans la catalyse. OsttaBE possède un second CBM (CBM41) situé en amont du CBM48 dans le domaine N-terminal. Il a été montré dans cette étude qu'en absence d'un ou des 2 CBM, le repliement de l'enzyme n'est pas impacté mais cette dernière perd son activité. La présence de domaine de liaison aux carbohydrates est donc un facteur clé pour l'activité enzymatique, elle influence la capacité de l'enzyme à agir et/ou à se lier à différents substrats. Les auteurs ont ainsi déterminé que le CBM41 est responsable de la forte affinité de l'enzyme pour l'amidon bien que cette dernière n'agisse pas sur ce substrat. Ils en ont conclu qu'une trop forte affinité pour ce substrat était un facteur limitant son activité sur ce dernier (Hedin, Barchiesi et al. 2017).

L'étude de BEs chimériques impliquées dans la synthèse du glycogène chez *Deinococcus* a également révélé l'implication du domaine N2 dans la détermination de la spécificité de substrat mais également dans la détermination de la taille des chaînes transférée. Les auteurs ont ainsi postulé que la distance entre le CBM48 et les sites de liaisons aux sucres présents dans le domaine catalytique, est un facteur déterminant qui régirait la taille des chaînes transférées par l'enzyme (Palomo, Kralj et al. 2009). Cette hypothèse corrèle avec l'analyse de la structure de la BEI du riz en complexe avec du maltopentaose où les auteurs ont mis en évidence 3 sites d'interaction (Figure 16). Ils ont décrit la présence d'une poche hydrophobe putative formée par l'hélice  $\alpha$  du N-terminal, le CBM48 et des résidus du domaine catalytique. Les acides aminés impliqués dans l'interaction sont très conservés chez les BEs de plantes, suggérant un mécanisme de liaison au substrat commun à ces enzymes de branchement. Les auteurs ont émis l'hypothèse d'un possible changement conformationnel de l'enzyme au niveau de ces sites de liaison putatifs lorsqu'elle est en présence de son substrat naturel (Chaen, Noguchi et al. 2012).

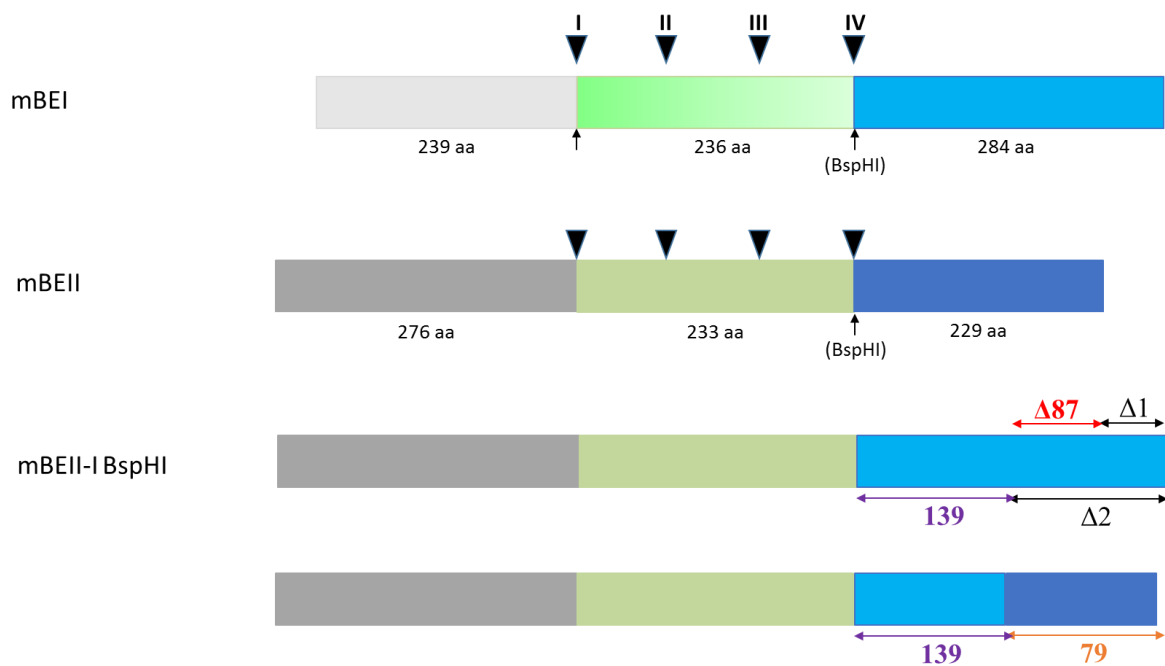
	Site 1						Site 2			Site 3					
	44	72	99	294	319	323	88	123	135	26	29	352	369	374	
BEI: Rice	HE	WAP	KF	HE	WEVLR	W	KFRFRHGGGAWVD	HFN	HHGINKGFTGNYKEYFSLD	TDV					
Wheat	YE	WAP	NF	QE	WEVLR	W	KFRFRHGDGLWVD	HFSY	NHHGINMSFAGNYKEYFGLD	TDV					
Barley	HE	WAP	NF	QE	WEVLR	W	KFRFRHGDGVWVD	HFSY	NHHGINMSFSGDYKEYFGLD	TDV					
Corn	NE	WAP	KF	QE	WEVLR	W	KFRFLHGG-VWVD	HFRY	HHGINVGF	TGNYQYFSLD	TAV				
Sweet potato	FE	WAP	QF	QD	WEVLR	W	KFRFKHNSGVWID	HFRY	HHGINLTFTGDYNEYFSEK	TDV					
Mung bean	YE	WAP	QF	QD	WEVLR	W	KFRFRHGDGVWVD	HFKY	HHGINIAFTGDYNEYFSEAT	TDV					
Pea	YE	WAP	AF	DG	WEVLR	W	KIHMDTPSGI-KD	HLD	THHGLQVSFTGNYSEYFGLA	TDV					
Rice BEIIa	HE	WAP	EY	DT	WEVLR	W	KIRMDTPSGV-KD	HLDY	THHGLQVAFTGNYGEYFGFAT	TDV					
Rice BEIIb	YE	WAP	EF	DT	WEVLR	W	KVRMETPSGI-KD	HLEY	THHGLQVAFTGNYSEYFGFAT	DA					
	**	*	*	**	**	*	*	*	*	*	*	*	**	**	*

**Figure 16 : Comparaison des séquences de la BEI du riz avec d'autres BEs de plantes.** Les acides aminés impliqués dans l'interaction de la BEI du riz avec le maltopentaose sont indiqués par un astérisque, les acides aminés conservés parmi les BEs sont surlignés en gris. La numérotation correspond à celle de la BEI du riz (Chaen, Noguchi et al. 2012).

#### 2.4.5.3 Le domaine C-terminal, situé en aval du domaine catalytique

Le domaine C-terminal, est défini comme le domaine situé en aval du domaine catalytique. Comme pour le domaine N-terminal, une variabilité de la taille de la séquence est observée dans cette région, où les BEs de type I sont plus longues que celle de type II. Des études ont été entreprises afin de déterminer la fonction de ce domaine.

L'analyse *in vitro* d'une chimère de SBEIIb du maïs (mBE II-I BspHI, Figure 15)), où les 229 acides aminés de la région C-terminale sont remplacés par les 284 acides aminés de la région C-terminale de SBEI, a conduit à une augmentation de l'activité de l'enzyme en comparaison avec les deux enzymes sauvages. L'enzyme chimérique possède la même spécificité de substrat que SBEI, à savoir plus d'affinité pour le substrat amylose mais transfère des chaînes courtes ( $\approx$ DP 6) de la même manière que SBEIIb. Cette étude suggère que le domaine C-terminal des BEs est impliqué dans la détermination du substrat de préférence et influe sur l'activité catalytique de l'enzyme (Kuriki, Stewart et al. 1997).



**Figure 17 : Représentation schématique de l'organisation des différents domaines des BEs de type I et II du maïs et d'une enzyme chimère.** Les domaines N-terminal, catalytique et C-terminal des BEs de type I et II de maïs (mBEI, mBEII) sont représentés en gris, vert et bleu respectivement. Deux enzymes chimériques (mBEII-I BspHI) ont été construites à partir du domaine catalytique et N-terminal de mBEII et du domaine C-terminal de mBEI et mBEII. En rouge et violet sont indiquées les régions déterminantes dans l'activité de l'enzyme et dans la détermination du substrat de préférence

La suppression de 58 acides aminés du C-terminal chez l'enzyme chimérique mBE II-I BspHI (mBE II-I BspHI $\Delta$ 1 Figure 15) ne modifie pas l'activité de l'enzyme ni la spécificité de substrat (amylose). En revanche, lorsque les 145 acides aminés du C-terminal du mutant mBE II-I BspHI sont délétés (mBE II-I BspHI $\Delta$ 2 Figure 15), il en résulte une perte d'activité de l'enzyme. Ces résultats indiquent que cette région (de 87 acides aminés, en rouge Figure 15) est déterminante pour l'activité de l'enzyme.

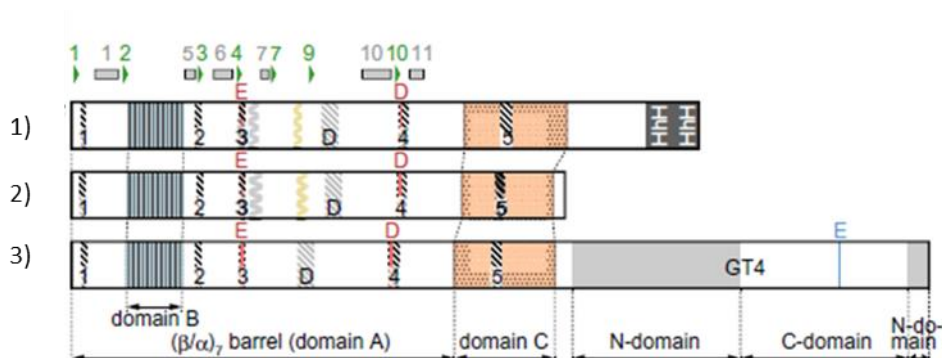
De plus, l'addition des 79 acides aminés (en orange figure 17) correspondants du C-terminal de SBEIIb permet de restaurer 25 % de l'activité sans changer le substrat de préférence (amylose). Cela implique que la séquence de 139 acides aminés en aval du domaine catalytique (en violet Figure 17) serait impliquée dans la détermination du substrat de préférence (Hong and Preiss 2000).

Le même type d'expérimentation, mené sur les BEs intervenant dans la synthèse d'amidon dans les graines de haricot, confirme l'implication du domaine C-terminal de ces dernières dans la catalyse et la spécificité de substrat (Ito, Hamada et al. 2004).

### Cas particulier des enzymes de branchement de la famille GH57 :

Certaines BEs d'organismes procaryotes ne sont pas classées parmi les GH13 mais appartiennent à la famille GH57. Bien qu'elles partagent des similitudes de mécanisme catalytique avec celles de la famille GH13 (mécanisme en 2 étapes et maintien de l'anomérie), elles se distinguent l'une de l'autre par leur divergence en termes de séquence protéique ainsi que par leur structure tertiaire. Elles sont composées de plusieurs domaines, caractéristiques des membres de la famille GH57 (Figure 18):

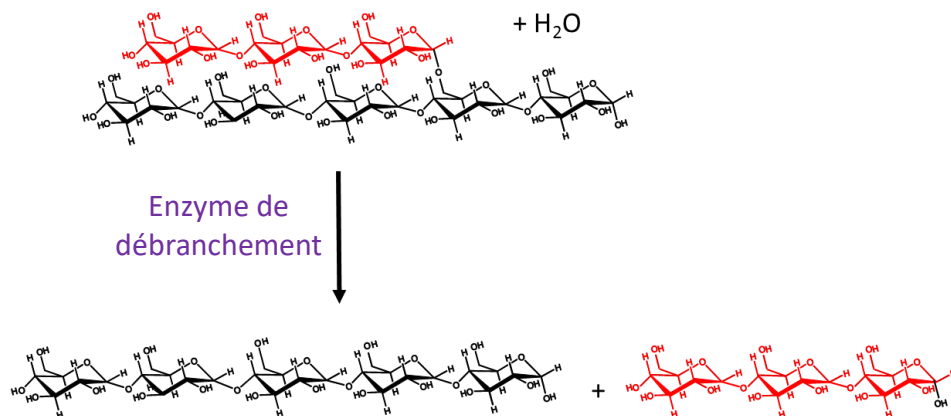
- un domaine A constitué d'un tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>7</sub>,
- un domaine B constitué d'hélices  $\alpha$ , localisé entre le brin  $\beta_2$  et l'hélice  $\alpha_5$  du domaine A,
- un domaine C situé en aval du domaine A.
- Dans ces différents domaines, 5 régions très conservées sont retrouvées. Les régions 3 et 4 contiennent respectivement le résidu catalytique nucléophile (glutamate) et le résidu acide/base (aspartate)
- (Une région conservée supplémentaire est présente dans le domaine A mais uniquement constitutives des BEs de la famille)



**Figure 18 : Organisation des domaines et des motifs conservés chez les enzymes de branchement procaryotes de la famille GH57, (Suzuki and Suzuki 2016).** 1) BEs de *thermococcus kodakarensis* KOD1 (BAD85625), 2) de *thermus thermophilus* HB8 (BAD71725), 3) *Bacillus halodurans* C-125 (BAB05134). Les BEs de cette famille sont composées d'un tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>7</sub> (domaine A), d'un domaine hélice  $\alpha$  (domaine B, représenté par des rayures) situé entre les brins  $\beta_2$  et  $\alpha_5$  du domaine A, d'un domaine C-terminal constitué d'hélices  $\alpha$  (domaine C). Six motifs, numérotés 1 à 5 et le motif D, sont très conservés et indiqués par des hachures. La position des résidus catalytiques Glutamate (E) et aspartate (D) sont indiqués en rouge. Chez certaines BEs de la famille, des régions constitués de boucles sont présentes (indiquées par des traits ondulés en (1) et (2)) ; des séquences additionnelles peuvent également être retrouvées (un motif hélice-boucle en épingle à cheveux-hélice en (1), un domaine glycosyltransférase de la famille 4 composé d'un domaine N et d'un domain C contenant le résidu glutamate (E) catalytique putatif en bleu). Les hélices  $\alpha$  et les brins  $\beta$  du domaine A sont représentés par des rectangle gris et des triangles vert respectivement.

## 2.5 Intervention des enzymes de débranchement au cours du processus de synthèse de l'amylopectine

Les enzymes de débranchement (DBEs) appartiennent à la famille GH13 de la classification CAZy et catalysent le clivage des liaisons  $\alpha$ -1,6 ou points de branchement (Figure 19). Historiquement, cette fonction d'hydrolyse de liaisons O-glucosidiques laissait envisager une implication dans le métabolisme de l'amidon au niveau de la dégradation du polysaccharide.



**Figure 19 : Représentation schématique du mode d'action des enzymes de débranchement.** Le clivage de la liaison  $\alpha$ -1,6 conduit au relargage du glucane indiqué en rouge

De manière surprenante, l'analyse de lignées mutantes a permis de démontrer que les DBEs sont également impliquées dans le processus de biosynthèse du polysaccharide. En effet, chez divers organismes, la perte d'une activité de débranchement est couplée à une diminution de la synthèse d'amidon au profit de l'accumulation d'un polysaccharide soluble hyperbranché, nommé « phytoglycogène », de structure comparable à celle du glycogène (Ball, Guan et al. 1996; Mouille, Maddelein et al. 1996; Wattedled, Dong et al. 2005).

Il est maintenant admis qu'une ou plusieurs enzymes (du catabolisme du glycogène), les DBEs, ont été recrutées au cours de l'évolution pour contribuer au mécanisme de synthèse de l'amylopectine (Ball and Morell 2003).

Il existe 2 types d'enzymes de débranchement, les pullulanases et les isoamylases chacune hydrolysant les liaisons  $\alpha$ -1,6 mais possédant leur propre spécificité de substrat. Les pullulanases hydrolysent préférentiellement le pullulane, polymère constitué de maltotriose lié par des liaisons  $\alpha$ -1,6. Elles sont également capables de digérer l'amylopectine mais ont peu d'activité sur le glycogène. Les isoamylases ne sont pas capables d'hydrolyser le pullulane mais dégradent le glycogène et l'amylopectine.

### 2.5.1 Les isoamylases

#### ISA1 et ISA2 participent à la synthèse de l'amidon:

Chez *A. thaliana*, le mutant *isa1*, présente une réduction de 80% de la quantité d'amidon dans les feuilles. De plus, les grains d'amidon résiduel sont plus petits que ceux d'une lignée sauvage et la distribution en longueur de chaîne de l'amylopectine est fortement modifiée et présente un enrichissement en chaînes courtes. Cette baisse de la quantité d'amidon est compensée par l'accumulation d'un polymère hydrosoluble de structure similaire au glycogène : le phytoglycogène (Wattebled, Dong et al. 2005). Chez *Chlamydomonas*, cette même mutation entraîne la perte totale d'amidon (Mouille, Maddelein et al. 1996).

L'effet de la mutation *isa2* est plus variable. Chez *Arabidopsis thaliana*, le phénotype est équivalent à celui observé pour *isa1* (Delatte, Trevisan et al. 2005). Chez le maïs, en revanche, la mutation *isa2* seule ne semble pas perturber la synthèse de l'amidon puisqu'il accumule un amidon de structure semblable au sauvage et que la présence de phytoglycogène n'a pas été détectée (Kubo, Colleoni et al. 2010). Ces différences s'expliquent par la présence de complexes ISA différents suivant les organismes.

Chez *Arabidopsis*, *Isa1* et *Isa2* s'associent uniquement sous la forme d'hétérocomplexes où seule *Isa1* est catalytiquement active (Zeeman, Umemoto et al. 1998; Delatte, Trevisan et al. 2005; Wattebled, Dong et al. 2005). Chez le maïs ou le riz, on note la présence de deux types de complexes actifs : homomultimériques *Isa1* ou hétéromultimériques *Isa1/Isa2*.

Ainsi en absence d'*Isa1* ou *Isa2*, il n'y a plus de complexe actif chez *Arabidopsis* alors que chez les céréales l'homomultimère *Isa1* suffit à produire de l'amidon de structure proche d'une lignée sauvage. Lorsque *Isa1* de maïs est exprimée dans le mutant d'*A. thaliana* dépourvu des enzymes *Isa1* et *Isa2* endogènes, elle est capable de restaurer la synthèse d'un amidon de type sauvage (Utsumi and Nakamura 2006; Kubo, Colleoni et al. 2010; Facon, Lin et al. 2013; Lin, Facon et al. 2013).

#### ISA3 :

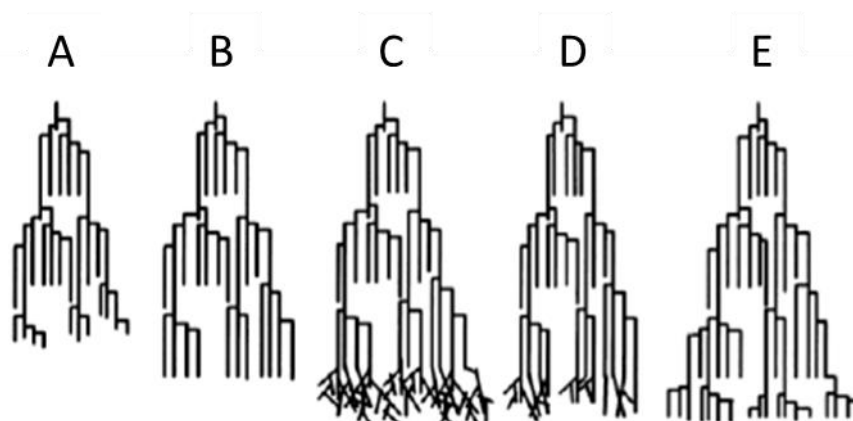
L'étude de lignées d'*Arabidopsis* dépourvues d'*isa3* a révélé une implication presque exclusive de l'enzyme dans le processus de dégradation de l'amidon. En absence de cette protéine, l'amidon s'accumule en excès dans les chloroplastes. Néanmoins, l'analyse de lignées déficientes pour plusieurs isoamylases révèle une implication marginale d'ISA3 dans le processus de synthèse (Wattebled, Planchot et al. 2008).

## LA PULLULANASE

La pullulanase est une enzyme de débranchement également très conservée chez les algues et les plantes. Néanmoins son implication précise dans le métabolisme de l'amidon n'est pas encore déterminée. En effet, l'analyse de lignées mutantes déficientes pour plusieurs enzymes de débranchement tend à montrer qu'elle peut intervenir, avec une faible efficacité, à la fois dans le processus de synthèse et de dégradation de l'amidon (Wattebled, Dong et al. 2005; Wattebled, Planchot et al. 2008).

### 2.5.2 La maturation de la structure de l'amylopectine

Les isoamylases sont donc des acteurs clés de la synthèse de l'amidon. Elles sont directement impliquées dans le processus de maturation de l'amylopectine et leur intervention au cours de la synthèse permet la cristallisation de cette dernière. Le processus de synthèse de l'amylopectine proposé par Ball et collaborateur en 1996 sur la base des résultats obtenus chez *chlamydomonas*, reposait sur la création d'une structure intermédiaire au cours de la synthèse, fruit de l'élongation et de la ramification des glucanes, appelée pré-amylopectine. C'est cette pré-amylopectine qui constituerait le substrat des DBEs (Figure 20).



**Figure 20 : Modèle de la synthèse de l'amylopectine proposée par Ball et coll., en 1996.** (A) Représentation de deux grappes successives, une lamelle amorphe contenant les points de branchement en bas est soumise à l'action des amidon-synthases (B), lorsque les glucanes linéaires ont atteint une longueur de chaîne suffisante, les BEs peuvent alors créer les ramifications jusqu'à obtenir la pré-amylopectine en (C). Cette pré-amylopectine est alors soumise à l'action des DBEs qui hydrolysent sélectivement certaines liaisons  $\alpha$ -1,6 (D). Ce clivage sélectif permet la formation d'une structure compatible avec sa cristallisation (E). Un nouveau cycle de synthèse peut alors avoir lieu.

Néanmoins, cette structure (pré-amylopectine) n'a jamais été isolée et ce schéma de synthèse n'explique pas la présence de grains d'amidon chez les végétaux supérieurs dépourvus d'Isa1. Un second modèle a donc été proposé dans lequel les DBEs jouent un rôle de support à la cristallisation de l'amylopectine. Une partie des glucanes serait capable de cristalliser de manière spontanée sans l'intervention des DBEs, l'autre partie serait alors régulée par les DBEs qui favoriseraient l'agencement des glucanes pour permettre leur cristallisation (Streb, Delatte et al. 2008; Hennen-Bierwagen, James et al. 2012).

## 2.6 Modulation de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon

### Intervention au sein de complexes protéiques

Si la synthèse du glycogène ne nécessite qu'une seule forme de glycogène synthase et d'enzyme de branchement, l'édification d'une structure aussi complexe et ordonnée que l'amidon (qui implique plusieurs isoformes de synthase, d'enzymes de branchement et de débranchement) exige de ce fait une action coordonnée entre les enzymes impliquées dans son métabolisme.

En effet, la synthèse de l'amidon n'est pas le résultat d'une action séquentielle des enzymes de son métabolisme mais découle d'une synergie entre elles. Cela a été confirmé par l'analyse de mutant de plantes où l'absence d'une ou plusieurs enzymes du métabolisme de l'amidon impacte le fonctionnement des autres enzymes de ce métabolisme. Par exemple, dans le mutant *amylose extender* du riz, qui correspond à une mutation du gène codant l'isoforme SBEIIb, la mutation de cette dernière se répercute par une diminution de l'activité de SSI dans l'albumen (Nishi, Nakamura et al. 2001). Chez le maïs, la mutation de SBEIIb cause une réduction de l'activité de SBEI dans l'albumen (Colleoni, Myers et al. 2003; Liu, Makhmoudova et al. 2009) et l'absence de SSIII engendre quant à elle une diminution de l'activité de SBEIIa et de SSII, (Boyer and Preiss 1981; Cao, James et al. 2000).

De la même manière, la mutation de SSIIa a montré un impact (réduction) sur l'activité dans l'albumen de SSI, SBEIIa et SBEIIb chez le blé, l'orge et le riz (Yamamori, Fujita et al. 2000; Morell, Kosar-Hashemi et al. 2003; Umemoto, Aoki et al. 2004; Umemoto and Aoki 2005).

Toutes ces observations indiquent l'existence de complexes enzymatiques hétéromultimériques au sein desquels les enzymes fonctionneraient de manière coordonnée et se réguleraient entre elles.

La mise en évidence de la présence de complexes constitués de différentes isoformes de synthases et de BEs a été effectuée chez divers organismes. Dans les amyloplastides de blé, SBEI, SBEIIb



et une phosphorylase interagissent entre elles pour former un complexe dont la formation et le maintien sont rendus possibles par la phosphorylation de ces 3 enzymes (Tetlow, Wait et al. 2004). Il apparaît également que SSI, SSIIa et SBEIIa forment un complexe hétéromultimérique (Tetlow, Beisel et al. 2008). (Figure 21A).

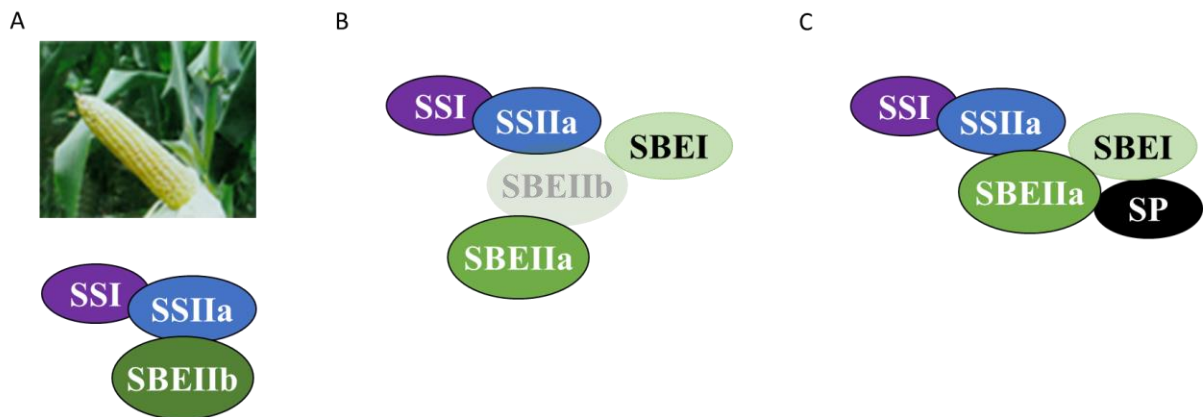


**Figure 21 : Représentation schématique des complexes retrouvés chez le blé et le maïs.** Complexes mis en évidence dans l’albumen de blé (Tetlow, 2004 et 2008) (A) et de maïs (B) (Hennen-Bierwagen 2008 et 2009). Les amidon-synthases I, IIa et III sont représentés en violet, bleu et rouge respectivement. La BE de type I et les deux isoformes de BEs de type II (a et b) sont indiquées en dégradé de vert, la phosphorylase (SP) est représentée en noir.

Le même type de complexe (SS/BE) a pu être mis en évidence dans les amyloplastés de maïs. Chez cette céréale, c’est la forme la plus exprimée d’enzyme de branchement, SBEIIb, qui s’associe avec les amidon-synthases SSI et SSIIa. (Liu, Makhmoudova et al. 2009). De plus, l’existence d’autres complexes de plus haut poids moléculaire impliquant l’interaction des isoformes de synthase I, II et III avec les deux BEs de type II a également été observée. Il apparaît cette fois encore que la phosphorylation intervient dans le processus de formation et de maintien du complexe (Hennen-Bierwagen, Liu et al. 2008; Hennen-Bierwagen, Lin et al. 2009). D’autres études menées chez le riz (Crofts, Abe et al. 2015) et l’orge (Ahmed, Tetlow et al. 2015) ont confirmé l’existence de complexes similaires dans ces organismes, suggérant une organisation conservée dans le règne végétal.

Ainsi l’existence de ces complexes soulève la question de leur contribution respective dans l’édification de la structure de l’amylopectine. A titre d’exemple, chez le maïs, la présence de SBEIIb inactive (Figure 22B) mène à la formation d’un complexe différent de celui observé dans le mutant SBEIIb, (Figure 22C) lui-même différent du sauvage (Figure 22A). Chaque mutant présentant un phénotype amidon altéré et spécifique (Liu, Makhmoudova et al. 2009; Liu, Ahmed et al. 2012). Chez l’orge, lorsque SSIIa est sous exprimée, aucune isoforme de SS (à l’exception de la GBSS) ni de BEs ne

sont retrouvées dans le grain et aucun complexe n'a pu être mis en évidence. Les auteurs ont ainsi suggéré un rôle de SSIIa dans l'adressage des protéines au grain par le biais de la formation de complexe (Ahmed, Tetlow et al. 2015).



**Figure 22 : Complexes mis en évidence dans le grain de maïs d'une lignée sauvage et de lignées mutantes exprimant ou non SBEIIb inactive.** Complexes retrouvés piégés dans le grain chez le maïs d'une lignée sauvage (A), présentant l'enzyme SBEIIb inactive (B) ou en absence de SBEIIb (*amylose extender*) (C). Les amidon-synthases I, IIa sont représentés en violet, bleu respectivement. La BE de type I et les deux isoformes de BEs de type II (a et b) sont indiquées en dégradé de vert, la phosphorylase (SP) est représentée en noir. Lorsque la SBEIIb est présente et inactive (B), cette dernière est grisée.

L'étude des phénotypes amidons de lignées mutantes pour une ou plusieurs enzymes du métabolisme est une base pour la compréhension du rôle des enzymes. Il est maintenant admis que les complexes jouent un rôle prépondérant dans la structuration du polysaccharide. Les phénotypes observés pour les lignées mutantes reflètent donc de la contribution à la fois des enzymes individuelles mais également des complexes impliqués dans l'édification de la structure.

#### Impact de la phosphorylation des enzymes du métabolisme

Comme mentionné précédemment, il a été démontré que les enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon sont phosphorylées. Cette phosphorylation favorise la formation de complexes hétéroenzymatiques mais impacte également, de manière variable, l'activité de ces enzymes. En effet, il a été montré chez le blé que les BEs de type II voient leur activité augmentée lorsqu'elles sont phosphorylées. En revanche, l'activité de SBEI chez cet organisme ne se trouve pas impactée par la phosphorylation (Tetlow, Wait et al. 2004). Une étude de la SBEIIb du maïs a permis de mettre en évidence plusieurs sérines pouvant être phosphorylées *in vitro* par 2 kinases amyloplastiques calcium dépendantes. Parmi ces résidus, la Ser<sup>297</sup> (selon la numérotation de la SBEIIb du maïs) est très conservée chez les autres BEs de plantes alors que la Ser<sup>286</sup> semble être spécifique des BEs de type II.

La mutation de ces 2 résidus en alanine a montré une diminution importante de l'activité de l'enzyme, ce qui renforce l'idée selon laquelle ces résidus Ser auraient un rôle primordial dans la catalyse. Une troisième sérine (Ser<sup>649</sup>) a également été mise en évidence, et la mutation de celle-ci en alanine n'a pas conduit à une perte d'activité. L'analyse des séquences des BEs suggère que la Ser<sup>649</sup> pourrait avoir une fonction plus spécifique, car elle n'est retrouvée que chez certaines SBEIIb de céréales et est absente des BEs de type I. De manière intéressante, chez les SBEII de plantes cette serine est parfois substituée par un aspartate qui est un mime de phosphorylation comme c'est le cas chez SBE2.2 d'*Arabidopsis* (Makhmoudova, Williams et al. 2014).

Les différentes isoformes de synthase ont également été retrouvées phosphorylées chez diverses espèces végétales (Tetlow, Wait et al. 2004; Grimaud, Rogniaux et al. 2008; Hennen-Bierwagen, Liu et al. 2008; Tetlow, Beisel et al. 2008; Liu, Makhmoudova et al. 2009; Liu, Ahmed et al. 2012). A l'heure actuelle, il est connu que leur phosphorylation est impliquée dans le processus de formation des complexes mais rien n'est connu d'un éventuel impact de cette phosphorylation sur leur activité.

#### 4. Objectifs du travail de thèse.

Au cours de ce travail de thèse, je me suis intéressée à la caractérisation biochimique et enzymatique des enzymes de branchement d'*Arabidopsis thaliana*. Cette plante est une exception dans le monde végétal. Elle ne possède pas de BE de type I impliquée dans la synthèse de l'amidon, et, pour une dicotylédone, elle possède deux BEs de type II génétiquement indépendantes impliquées dans la synthèse d'amidon transitoire : BE2.2 (AtBE2) et BE2.1 (AtBE3). Ces enzymes possèdent plus de 80% d'acides aminés identiques. L'analyse des simples mutants a révélé des phénotypes semblables et proches d'une lignée sauvage suggérant une forte redondance de leur fonction. La différence d'activité entre les deux enzymes se limite à une modification de l'amylopectine un peu plus conséquente chez le mutant dépourvu de SBE2.1.

Par une étude comparative, j'ai donc tenté de déterminer si des différences de fonctionnement existent entre ces deux enzymes. Pour cela, les séquences de SBE2.2 et SBE2.1 ont été optimisées en vue d'une production chez *E. coli*. La purification de ces enzymes a permis la détermination *in vitro* des paramètres biochimiques et enzymatiques de chaque BE, tels que le pH et la température optimum nécessaire à leur activité.

Le fonctionnement de SBE2.2 sur différents types de substrats linéaires ou branchés ainsi que les produits formés par l'enzyme ont été étudiés. Cette analyse de SBE2.2 combinée à une approche

structurale a permis de déterminer l'état d'oligomérisation de l'enzyme en solution ainsi que la forme de la protéine et de montrer l'existence de changement conformationnel et/ou d'oligomérisation en présence de substrat branchés. L'ensemble des travaux réalisés sur SBE2.2 a donné lieu à une publication dans la revue Biochimie.

Ces résultats seront comparés aux données obtenues sur la seconde isoforme chez *Arabidopsis*, SBE2.1 et à celles connues des autres BEs de type II de plante, exprimant une BE de type I. Une analyse comparative sera aussi faite avec les enzymes de branchement bactériennes impliquées dans la synthèse de glycogène.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 1. Souches bactériennes

### Liste des souches utilisées pour l'amplification des vecteurs :

-top 10 : F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697  
*gal/U gal/K rspL* (StrR) *endA1 nupG*

-DB3.1 : F- *gyrA462 endA1*  $\Delta$ (*sr1-recA*) *mcrB mrr hsdS20*(rB-, mB-) *supE44 ara-14 galK2 lacY1*  
*proA2 rpsL20*(SmR) *xyl-5*  $\lambda$ - *leu mtl1*

Cette souche est dédiée spécifiquement à l'amplification des vecteurs porteurs d'un gène suicide (ccdb).

### Liste des souches utilisées pour l'expression de protéines recombinantes :

-BL21-AI<sup>TM</sup> : F- *ompT hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm araB::T7RNAP-tetA*

-BL21 (DE3) : F- *ompT hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm* (DE3)

La première nécessite le L-Arabinose (2g/L en concentration finale) pour induire l'expression des protéines et la seconde l'*Isopropyl  $\beta$ -D thiogalactopyranoside* (IPTG, à 1mM en concentration finale).

## 2. Plasmides

Les cartes des différents plasmides utilisés dans ce travail sont présentées en annexes

### Liste des vecteurs de clonage :

-pENTR-BE2.2 et pENTR-BE2.1 :

Les gènes synthétiques de BE2.2 (AtBE2) et BE2.1 (AtBE3), dépourvus de leur peptide de transit (61 acides aminés pour BE2.2 et 36 pour BE2.1, déterminé par le serveur ChloroP), optimisés pour l'expression chez *E. coli* ont été insérés par BP recombinaison dans le vecteur pDONR<sup>TM</sup>221 (GeneOptimizer®, Geneart, life technology), vecteur donneur (d'entrée) du système Gateway®.

-pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO®-GlgB:

Ce vecteur correspond au clonage de l'enzyme de branchement d'*E. coli* dans un vecteur d'entrée du système Gateway®. Cette construction est décrite dans la publication de Laura Boyer (Boyer, Roussel et al. 2016).

### Liste des vecteurs d'expression:

- pDEST<sup>TM</sup>17-GlgB :

Ce plasmide est un vecteur de destination du système Gateway® permettant la fusion d'une étiquette 6×histidines au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine.

-pML375 (Fioravanti, Fumeaux et al. 2013), (pML375-BE2.2, pML375-BE2.1) :

Ce vecteur de destination du système Gateway® permet la fusion d'une étiquette 6×histidines suivie d'un site de clivage par la thrombine au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine.

Ces plasmides sont obtenus après une réaction de LR recombinaison entre un vecteur d'entrée et un vecteur de destination selon les recommandations du fournisseur (Gateway® technology Invitrogen).

### 3. Milieu de croissance bactérien (Luria-Bertani)

Ce milieu se compose de : Tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L et NaCl 10 g/L. Le pH est ajusté à 7,2 par ajout de NaOH.

Le milieu gélosé possède la même composition, mais est solidifié par l'ajout de 12 g/L d'agar. Les milieux sont ensuite autoclavés pour stérilisation (20 min, 121 °C, 2 bars).

Selon l'utilisation, une pression de sélection est effectuée par ajout de 50 mg/L de kanamycine ou 100 mg/L d'ampicilline, respectivement pour la sélection des vecteurs d'entrée ou de destination.

## 4. Production de protéines recombinantes dans *E. coli*

### 4.1 Production de BE2.2 et BE2.1

Les protéines sont produites dans la souche BL21 transformée par le vecteur pML375-BE2.2 ou BE2.1 dans du milieu LB supplémenté en ampicilline 100 mg/L. Les bactéries sont cultivées à 37 °C jusqu'à une densité optique de 0,5 DO<sub>600 nm</sub>. La production de la protéine d'intérêt est induite par ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM dans le milieu. La culture est ensuite placée à 18 °C durant 20 heures puis les bactéries sont culotées par centrifugation (4 000 g durant 30 min à 4 °C). Le culot est ensuite lavé deux fois dans du tampon Tris 50 mM, saccharose 250 mM, EDTA 5 mM, pH 8, puis centrifugé (4 000 g durant 10 min à 4 °C) avant d'être congelé dans l'azote liquide et stocké à -80 C jusqu'à l'étape de purification des protéines.

### 4.2 Production de GlgB

GlgB est produite dans la souche BL21-AI™ transformée par le vecteur pDEST™17-GlgB dans du milieu LB supplémenté en ampicilline 100 mg/L. Les bactéries sont cultivées à 37 °C jusqu'à une

densité optique de 0,5 DO<sub>600 nm</sub>. La production de la protéine d'intérêt est induite par ajout de L-arabinose à 2 g/L en concentration finale dans le milieu. La culture est ensuite placée à 20 °C pendant 4 heures puis les bactéries sont culotées par centrifugation (4 000 g durant 30 min à 4 °C). Le culot est ensuite lavé deux fois dans du tampon Tris 50 mM, saccharose 250 mM, EDTA 5 mM, pH 8 puis centrifugé (4 000 g durant 10 min à 4 °C) avant d'être congelé dans l'azote liquide et stocké à -80 °C jusqu'à l'étape de purification des protéines.

## 5. Purification des protéines recombinantes

Le culot de bactéries est repris dans du tampon de lyse Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 40 mM, pH 7,4 contenant des inhibiteurs de protéases (complete ULTRA, Roche, 1 pastille pour 1 L de culture) et 0,1 % de Triton X-100. La suspension est lysée sous presse de French à 4 °C, 1500 psi puis centrifugée à 14 000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant est ensuite injecté sur une colonne d'affinité Ni<sup>2+</sup> HiTrap IMAC FF (5 mL, GE Healthcare), connecté au système Aktastart, préalablement équilibrée avec 25 mL de tampon de lyse. La colonne est lavée par 100 mL de tampon NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, imidazole 40 mM, pH 7.4 puis la protéine d'intérêt est éluée avec le tampon NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, imidazole 300 mM, pH 7,4, à 5 ml.min<sup>-1</sup>. La protéine purifiée est ensuite dialysée à 4 °C sur la nuit dans un tampon décrit ci-dessous.

Suivant l'enzyme différents tampons de dialyse ont été utilisés :

- pour BE2.2 : un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM, glycérol 5 %, pH 7
- pour GlgB : un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM, glycérol 5 %, pH 7,5
- pour BE2.1 : HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, glycérol 10%, pH 7 Ce tampon a été sélectionné après criblage des conditions optimales (tampon, pH, concentration en sel...) de stabilité de l'enzyme BE2.2 par Thermal Shift assay.

Le tampon de conditionnement de BE2.2 après purification (phosphate 50 mM, NaCl 50 mM, glycérol 5 %, pH 7) n'est pas un tampon de référence pour des essais de cristallisation de l'enzyme, la présence de phosphate pouvant engendrer la formation de cristaux de sels de cations bivalents. Les paramètres pour un conditionnement optimal, compatibles avec des essais de cristallisation et permettant la stabilité de BE2.2, ont été déterminés par Thermal Shift Assay. L'obtention de ces paramètres nous a également permis de purifier la seconde enzyme de branchement d'*A. thaliana* BE2.1.



## 6. Analyse structurale après purification des enzymes de branchement d'*A. thaliana*

### 6.1 Analyse des séquences protéiques

Pour l'analyse des séquences primaires des enzymes de branchement d'*A. thaliana*, nous avons utilisé l'outil d'alignement de séquences ClustalΩ pour visualiser les régions conservées communes aux deux enzymes et les divergences entre elles.

Le logiciel DISOPRED3 (Jones and Cozzetto 2015) a été utilisé pour déterminer la présence ou non de régions prédites désordonnées. Il permet également de prédire si ces régions peuvent être impliquées dans des interactions protéine-protéine.

### 6.2 Modélisation moléculaire

Une modélisation moléculaire a été effectuée pour BE2.2 et BE2.1 par le logiciel SWISS-MODEL. Ce logiciel analyse les séquences en acides aminés de protéines dont les structures ont déjà été résolues et qui sont répertoriées dans la banque de données PDB (protein data bank). Il identifie ainsi les séquences et motifs conservés et sélectionne la protéine qui présente le plus d'homologie de séquence avec BE2.2 et BE2.1. Cette protéine servira de patron pour construire le modèle moléculaire. Ce logiciel évalue également la qualité du modèle obtenu (Arnold, Bordoli et al. 2006; Bordoli, Kiefer et al. 2008; Biasini, Bienert et al. 2014).

### 6.3 Analyse par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

#### 6.3.1 Principes généraux

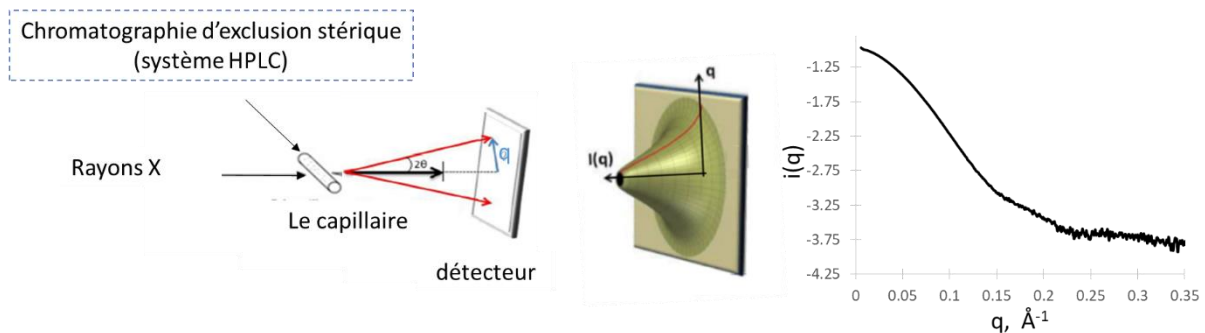
La technique de diffusion de rayons X aux petits angles permet d'étudier, à basse résolution, en solution, la forme globale d'une protéine, d'accéder à des paramètres tels que ses dimensions et son poids moléculaire, mais elle peut également permettre de détecter des changements conformationnels souvent difficilement observable par diffraction des rayons X. De plus, elle ne nécessite pas la formation de cristaux. Le principe de cette méthode repose sur la diffusion des rayons X par les électrons. L'échantillon protéique en solution est exposé à un faisceau monochromatique de rayons X. Une partie des rayons est alors diffusée par les protéines ainsi que par le tampon. L'intensité des rayons diffusés  $I$  est mesurée par le détecteur pour différents angles de diffusion ( $2\theta$ ). L'intensité des rayons diffusés relatifs au solvant est ensuite soustraite afin d'obtenir une courbe de diffusion

uniquement caractéristique des protéines. Les données expérimentales sont représentées par une courbe où l'intensité ( $I$ ) des rayons diffusés est fonction du vecteur de diffusion  $q$  ( $\text{\AA}^{-1}$ ). La relation liant  $q$  à l'angle de diffusion est définie par :

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}, \text{ où } \lambda \text{ (\AA) représente la longueur d'onde de la source monochromatique de rayon X}$$

### 6.3.2 Acquisition des données SAXS

Chaque échantillon protéique est centrifugé (10 min,  $10\,000 \times g$ ) avant l'analyse pour éliminer les agrégats. La concentration en protéines est déterminée par absorption UV à 280nm en utilisant un spectrophotomètre (Thermo Scientific NanoDrop 1000). Des solutions à  $10,73 \text{ mg.ml}^{-1}$  de BE2.2 et à  $7 \text{ mg.ml}^{-1}$  de BE2.1 sont maintenues à  $4^\circ\text{C}$  avant d'être utilisées pour l'analyse. Les données SAXS ont été collectées sur la ligne de lumière SWING du synchrotron SOLEIL ( $\lambda = 1,033197 \text{ \AA}$ ). Cette ligne de lumière a l'avantage d'avoir un système de séparation HPLC installé en amont du faisceau de rayons-X permettant la séparation des différentes formes protéiques [correspondant au monomère (et/ou multimères) de BEs] et l'élimination d'éventuels agrégats résiduels (le principe de la technique est schématisé Figure 23).



**Figure 23 : Représentation schématique d'une expérience de SAXS.** L'échantillon protéique est séparé par HPLC en amont du capillaire, une fois élué dans le capillaire il est soumis au faisceau de rayons X. Le détecteur mesure alors l'intensité des rayons diffusés ( $I$ ). La courbe de diffusion obtenue est représentée par l'intensité des rayons diffusés en fonction de  $q$

L'échantillon protéique monodisperse de BE2.2 a été injecté sur une colonne d'exclusion stérique (Bio SEC-3,  $300 \text{ \AA}$ , Agilent, à  $0,2 \text{ ml.min}^{-1}$ ), situé dans une enceinte thermostatée à  $15^\circ\text{C}$ , grâce au système HPLC d'Agilent. La colonne est préalablement équilibrée par le tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM, glycérol 5%, pH 7. BE2.2 est ensuite directement éluée dans le capillaire SAXS. Deux

injections ont été effectuées pour les mesures, une première avec 25 µl d'échantillon protéique et une seconde avec 70 µl.

De la même façon, 60 µl de la protéine BE2.1 ont été injectés sur une colonne d'exclusion stérique (Bio SEC-3, 300 Å, Agilent, à 0,3 ml.min<sup>-1</sup>, à 15°C) préalablement équilibré par le tampon HEPES 50 mM, NaCl 150mM, glycérol 10%, pH 7. BE2.1 est ensuite directement élué dans le capillaire SAXS.

Les données SAXS ont été collectées de manière continue, durant une seconde et un temps mort de 0,5 seconde entre chaque mesure ( $0,008 < q < 0,4232 \text{ \AA}^{-1}$  pour BE2.2 et  $0,006 < q < 0,60 \text{ \AA}^{-1}$  pour BE2.1). Durant les premières minutes de chaque élution, des données SAXS sont collectées pour prendre en compte la diffusion du tampon. Ces dernières sont ensuite moyennées grâce au logiciel FOXTROT développé au synchrotron SOLEIL (David and Pérez 2009). La contribution du tampon peut ainsi être déduite du signal mesuré durant l'élution de la protéine.

Les données SAXS collectées correspondant au pic d'élution de BE2.2 et BE2.1 indiquées en rouge, Figure 31A et 31B page 78, sont ensuite moyennées grâce au logiciel FOXTROT, disponible sur la ligne de lumière.

### 6.3.3 Traitement des données SAXS

Les données SAXS sont ensuite traitées à l'aide de la série de programmes ATSAS (Konarev, Petoukhov et al. 2006).

#### 6.3.3.1 Loi de Guinier

La portion de la courbe de diffusion  $I(q)$  aux très petits angles, appelée domaine de Guinier, peut être rapprochée de l'équation  $I(q) = I(0) \exp(-\frac{q^2 R_g^2}{3})$  pour des valeurs de  $q \cdot R_g < 1.3$  pour des protéines globulaires ou  $q \cdot R_g < 1$  pour des protéines non structurées.  $R_g$  correspond au rayon de giration de la particule, qui dépend de la taille et de la forme de la protéine.

La représentation de Guinier,  $\ln I(q)$  en fonction de  $q^2$ , permet d'accéder au rayon de giration de la protéine étudiée.

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{q^2 R_g^2}{3}$$

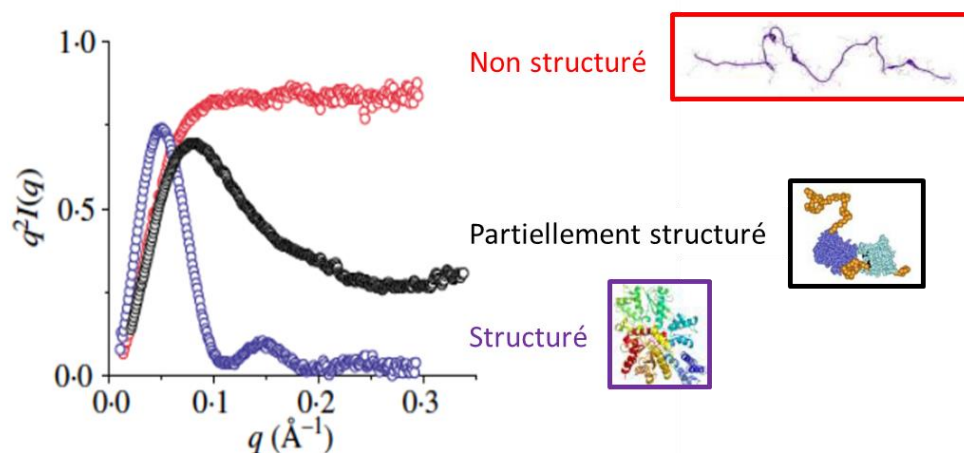
La validité du domaine de Guinier dépend du rayon de giration de la particule, la linéarité dans ce domaine est donc un indicateur de la qualité des données collectées et de l'état d'agrégation de la protéine.

Les données SAXS expérimentales obtenues pour BE2.2 sont linéaires dans le domaine de Guinier, indiquant que la protéine n'est pas agrégée. La détermination du rayon de giration par l'approximation de Guinier a été réalisée à partir du programme PRIMUS (Konarev, Volkov et al. 2003), pour des valeurs de  $q \cdot R_g < 1.16$ .

De la même manière, les données collectées pour BE2.1 indiquent que la protéine n'est pas agrégée, la représentation de Guinier est linéaire pour des valeurs de  $q \cdot R_g < 1$ .

### 6.3.3.2 Représentation de Kratky

L'analyse par SAXS est une technique qui permet d'obtenir des informations sur le niveau de structuration de la protéine. Un moyen d'évaluer ce niveau de structuration est la représentation de Kratky ( $q^2 \cdot I(q)$  en fonction de  $q$ ). Pour une protéine globulaire, la représentation de Kratky a la forme d'une courbe en cloche. En revanche, pour une protéine présentant des régions désordonnées, les valeurs de  $q^2 \cdot I(q)$  augmentent pour des grandes valeurs de  $q$  et peuvent atteindre un plateau dans le cas de protéine non structurée (Figure 24).



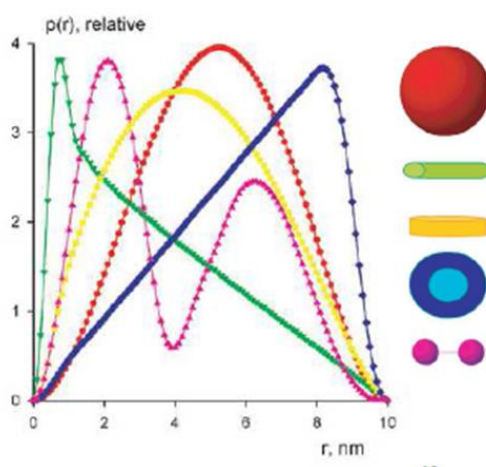
**Figure 24 : Représentation de Kratky de protéines de niveau de structuration différent.** Représentation de Kratky d'une protéine globulaire en violet, présentant des régions désordonnées en noir, une protéine désordonnée en rouge

### 6.3.3.3 Fonction de distribution des distances

Les données SAXS permettent également d'accéder aux dimensions de la protéine, plus particulièrement à son diamètre maximal ( $D_{\max}$ ). La fonction de distribution des distances  $P(r)$  est la transformée de Fourier de  $I(q)$ . Elle correspond à un histogramme où toutes les distances interatomiques ( $r$ ) au sein de la protéine sont représentées. Néanmoins, son calcul direct à partir de la courbe de diffusion  $I(q)$  est limité par les coupures en résolution  $q_{\min}$ ,  $q_{\max}$  et par le bruit de la courbe de diffusion.

Le programme GNOM (Svergun, Petoukhov et al. 2001) est donc utilisé pour calculer la transformée de Fourier indirecte de  $I(q)$ . Le diamètre maximal  $D_{\max}$  de la protéine est alors défini par l'utilisateur grâce au graphique  $P(r)=f(r)$  calculé par GNOM.

L'allure de la courbe de distribution des distances obtenue permet d'en déduire des informations sur la forme de la protéine (Figure 25).



**Figure 25 : Allure des fonctions de distribution des distances interatomiques pour des particules ayant le même  $D_{\max}$  mais des formes différentes ; une sphère (en rouge), un cylindre (en vert), un disque (en jaune), une sphère creuse (en bleu) et une particule possédant deux domaines sphériques (en rose)**

### 6.4.3 Modélisations *ab initio*

Grâce à la fonction de distribution des distances obtenues, l'enveloppe de la protéine peut être modélisée. Pour cela, le programme GASBOR (Svergun, Petoukhov et al. 2001) a été utilisé.

### Principe de fonctionnement du programme :

Le programme GASBOR utilise l'ensemble de la courbe de diffusion pour les calculs de forme. Les acides aminés de la protéine sont représentés par N billes de 0,38 nm de diamètre (afin de respecter les contraintes de distances interatomiques). Ces N pseudo résidus, correspondent aux nombres d'acides aminés de la protéine, GASBOR procède ensuite par itération : la position d'un pseudo résidu est changée de manière aléatoire, puis la courbe de diffusion du modèle obtenu est calculée et comparée à la courbe expérimentale, où la divergence entre les deux est définie par  $\chi^2$ . A chaque cycle, le programme affine la position des pseudo résidus permettant ainsi de minimiser cette divergence.

Afin de réaliser un modèle fiable, 10 enveloppes ont été générées par GASBOR et nous avons sélectionné le modèle le plus représentatif.

Le programme SUPCOMB (Kozin and Svergun 2001) aligne et superpose ensuite les enveloppes générées par GASBOR, qui sont ensuite moyennées par le programme DAMAVER (Volkov and Svergun 2003). L'enveloppe obtenue traduit donc une moyenne des conformations correspondant aux données SAXS expérimentales.

## 7. Synthèse de substrats linéaires

Les  $\alpha$ -1,4 glucanes linéaires utilisés comme substrat pour la caractérisation des enzymes de branchement ont été synthétisés *in vitro* par l'amylosaccharase recombinante de *Neissaria polysaccharea* (ASNp) et de *Deinococcus geothermalis* (ASDg) (Potocki de Montalk, Remaud-Simeon et al. 2000; Emond, Mondeil et al. 2008).

### 7.1 Synthèse du A600

1 U.ml<sup>-1</sup> d'ASNp est incubée à 30°C sur la nuit avec du saccharose 600 mM dans un tampon PBS pH 7,3. (1U d'ASNp correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de 1  $\mu$ mol de saccharose par min). Le mélange réactionnel est ensuite centrifugé à 10 000 g durant 10 min. Le culot est ensuite lavé trois fois avec de l'eau ultrapure et une fois avec de l'isopropanol puis séché à l'étuve. Les glucanes linéaires ainsi obtenus ont un degré de polymérisation (DP) est majoritairement compris entre 5 et 50 résidus de glucose.

## 7.2 Synthèse et purification de glucanes linéaires moins polydisperses: DP 4-19; DP 14-28

1 U.ml<sup>-1</sup> d'ASNg est incubée à 50°C sur la nuit avec du saccharose 600 mM, maltose 60 mM, dans un tampon PBS pH 7,3. Le mélange réactionnel est ensuite centrifugé à 10 000 g durant 10 min. Le surnageant est ensuite filtré avant d'être injecté sur une colonne d'exclusion stérique (Bio-Gel® P-6 Gel, Fine, Biorad ; 10 ml.min<sup>-1</sup>) et élués avec de l'eau ultrapure. Le fractionnement permet alors d'obtenir des glucanes linéaires dont le degré de polymérisation varie faiblement. Les fractions appelées DP 4-19 et DP 14-28 ont été utilisées au cours de cette étude. La fraction DP 4-19 est constituée de glucanes linéaires dont le degré de polymérisation est compris entre 4 et 19 résidus de glucose et la fraction DP 14-28 contient quant à elle des glucanes dont le DP est majoritairement compris entre 14 et 28 résidus de glucose.

## 8. Analyse par électrophorèse sur gels de polyacrylamide

### 8.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines purifiées sont soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, pour évaluer le niveau de pureté des enzymes. A chaque échantillon est ajouté 1/4 du volume d'un mélange SDS 10% (p/v), β-mercaptoéthanol 50% (v/v) puis les protéines sont dénaturées par chauffage pendant 5 min à 100°C avant d'être chargées sur le gel. Après concentration de ces dernières par migration dans un gel à 4 % en polyacrylamide d'une épaisseur de 0,75 mm, tamponné par du Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 %, les protéines sont séparées suivant leur taille dans un gel à 10 % en polyacrylamide, tamponné par du Tris-HCl 375 mM pH 8,8 et contenant 0,1 % de SDS. Après 1h de migration à température ambiante à 15 V.cm<sup>-1</sup> dans le tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 % (dans les chambres Mini-PROTEAN® Tetra system, BioRAD), le gel est rincé à l'eau durant 5 min puis les protéines sont révélées par coloration avec l'InstantBlue™ (expedon).

### 8.2 Les gels d'activité (ou zymogramme)

En conditions dénaturantes, les protéines purifiées sont dénaturées durant 5 min à 100°C avec 1/10 du volume d'un mélange SDS 20 %/ β-mercaptoéthanol (v/v).

En conditions natives, le tampon de chargement (Tris 62,5 mM, glycine 480 mM, glycérol 25 %, bleu de bromophénol 0,001 %) est directement ajouté à l'échantillon protéique.

Après ajout du tampon de chargement, l'échantillon est déposé sur un gel de polyacrylamide (de 1,5 mm d'épaisseur).

L'électrophorèse se déroule dans les chambres Mini-PROTEAN® Tetra system, BioRAD. Les gels de concentration et de séparation sont préparés à 4 et 7,5 % en polyacrylamide et sont tamponnés par du Tris-HCl 125mM pH 6,8 et du Tris-HCl 375 mM pH 8,8 respectivement. En conditions dénaturantes, les gels contiennent en supplément du SDS à 0,2 % final. La migration s'effectue dans un tampon Tris 25 mM, Glycine 192 mM, DTT 1 mM, (SDS 0,2 % en conditions dénaturantes) à 15 V.cm<sup>-1</sup> durant 1h à température ambiante en conditions dénaturantes ou 2h à 4°C en conditions natives.

### 8.2.1 Zymogramme amidon en conditions dénaturantes

Au gel de séparation est ajouté 0,3 % d'amidon de pomme de terre soluble en concentration finale (Sigma). A l'issue de la migration, le gel est rincé 4 × 30 min dans du Tris 40 mM pour renaturer les protéines du gel puis incubé sur la nuit dans le Tris 25 mM, Glycine 192 mM, DTT 20 mM (pH 8,3). Le gel est ensuite lavé à l'eau puis l'activité des protéines ayant modifié l'amidon est révélée par coloration à l'aide d'une solution d'iode (I<sub>2</sub> 0,1 % (w/v) et KI 1 % (w/v)).

### 8.2.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives

Un substrat peut être inclus dans le gel de séparation, à différentes concentrations (entre 0 et 0,3 % final): l'amidon de pomme de terre (Sigma), l'amylopectine de pomme de terre (Sigma), l'amylose de type III (Sigma) ou le A600.

#### 8.2.2.1 Détermination de la constante d'affinité (K<sub>s</sub>)

Afin d'évaluer le retard de migration des enzymes de branchement en présence ou en absence de substrat, 2 µg de BSA, seule et additionnée à l'échantillon protéique, serviront de standard de migration. A l'issue de la migration, le gel est rincé à l'eau durant 5 min puis les protéines sont révélées par coloration avec l'InstantBlue™ (expedeon).

La migration de la BSA n'étant pas affectée par la présence ou l'absence d'amylopectine, d'amylose ou de A600, cette dernière permet de mesurer le rapport de migration (M<sub>r</sub>) entre l'enzyme de branchement et la BSA pour chaque concentration en substrat.



Les valeurs des rapports de migration ( $M_r$ ) en fonction de la concentration en substrat (%) sont ensuite soumises à une régression linéaire. L'intersection entre la droite de régression et l'axe des abscisses permet alors de déterminer la constante d'affinité ( $K_s$ ) pour chacune des formes (si plusieurs coexistent) de BE et ce pour les différents substrats.

Si l'on veut observer l'activité enzymatique, après la migration, le tampon d'électrophorèse est éliminé par deux rinçages de 10 minutes à l'eau puis le gel est incubé pendant une nuit dans un tampon permettant l'action des enzymes hydrolytiques ou de branchement (voir ci-dessous).

#### *8.2.2.2 Zymogramme révélant les activités hydrolytiques*

Afin de révéler l'activité des protéines modifiant le substrat, le gel est incubé sur la nuit dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM et DTT 2 mM, NaCl 100 mM (à l'exception du substrat amylose où le NaCl n'est pas additionné au tampon d'incubation). Les protéines piégées dans le gel modifient alors le substrat contenu dans ce dernier. Le gel est ensuite lavé à l'eau puis l'activité des protéines modifiant le substrat est révélée par coloration à l'iode.

#### *8.2.2.3 Zymogramme révélant les activités de branchement*

A l'issue de la migration, le gel est rincé  $2 \times 10$  min dans 30 ml de tampon de lavage HEPES 50 mM, Glycérol 10 % (v/v) pH 7 et incubé sur la nuit dans ce même tampon auquel sont ajoutés du G1P 50 mM, AMP 2,5 mM et 28 U de phosphorylase « a » de muscle de lapin (Sigma). Les glucanes linéaires synthétisés par la phosphorylase « a » peuvent être utilisés comme substrat par les enzymes de branchement. Ces dernières ramifient les glucanes linéaires et créent de nouvelles extrémités non réductrices qui peuvent de nouveau être utilisées par la phosphorylase « a ». Le gel est ensuite rincé à l'eau puis l'activité de branchement est révélée par coloration à l'iode des polysaccharides branchés produits lors de la réaction (Dumez, Wattebled et al. 2006).

## 9. Analyse de l'activité de branchement par spectrophotométrie

La caractérisation enzymatique est réalisée grâce à un test d'activité spectrophotométrique qui permet de suivre de manière indirecte la réaction de branchement au cours du temps (Roussel, Lancelon-Pin et al. 2013). Ce test est basé sur la diminution d'absorbance du complexe iode-polysaccharide (à 660 nm ou 540 nm) au cours de la réaction. Sous l'action d'une enzyme de branchement, des liaisons O-glucosidiques  $\alpha$ -1,4 du substrat sont clivées puis les glucanes libérés sont branchés par création d'une liaison  $\alpha$ -1,6. Cette réaction se traduit par la réduction de la longueur

moyenne des glucanes et donc par une diminution de l'absorbance mesurée. Lorsque l'amylose de pomme de terre de type III (Sigma) est utilisé comme substrat, le complexe iode-polysaccharide possède une absorbance maximale à 660 nm. Si c'est de l'amylopectine (Sigma) qui est utilisée comme substrat, cette absorbance maximale est de 540 nm. Pour chaque suivi spectrophotométrique, 2 µg de BE2.2, 3 µg de BE2.1 ou 15 µg de GlgB sont utilisés. Les valeurs d'absorbances obtenues en fonction du temps sont soumises à une régression linéaire, la pente obtenue permet alors de déterminer l'activité spécifique (AS, en U/mg de protéine) de l'enzyme.

### 9.1 Détermination du pH optimum des BEs

Afin de déterminer le pH optimum des BEs, 280 µl d'un mélange contenant 3 mg.ml<sup>-1</sup> d'amylose dans le tampon Tris 120 mM, Acide acétique 30 mM et Imidazole 30 mM (le pH est ajusté afin d'obtenir une gamme allant de 4 à 8,5) et l'enzyme de branchement sont incubés à 30 °C. 14 µl du mélange réactionnel sont régulièrement prélevés et dilués dans 626 µl du même tampon et 160 µl d'une solution d'iode (I<sub>2</sub> 0,1 % (w/v) et KI 1 % (w/v)). L'échantillon est homogénéisé durant une minute avant lecture de l'absorbance à 660 nm. Les activités spécifiques de l'enzyme en fonction du pH sont ensuite ajustées à l'équation d'une courbe en cloche.

Ces suivis spectrophotométriques ont été reproduits à la température optimale de chaque enzyme après leur détermination.

### 9.2 Détermination de la température optimale des BEs

L'enzyme de branchement est incubée à différentes températures (de 10°C à 35°C) dans 280 µl d'un mélange contenant 3 mg.ml<sup>-1</sup> d'amylose dans le tampon Tris-HCl 50 mM ou dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM à pH 7. 14 µl du mélange réactionnel sont régulièrement prélevés et dilués dans 626 µl de tampon et 160 µl d'une solution d'iode. L'échantillon est homogénéisé durant une minute avant lecture de l'absorbance à 660 nm. Comme décrit précédemment, une régression linéaire permet d'obtenir la pente de la droite et d'en déduire l'activité spécifique de l'enzyme. Les activités spécifiques en fonction de la température sont ensuite ajustées à l'équation d'une courbe en cloche.

### 9.3 Détermination du K<sub>0.5</sub> ou K<sub>M</sub> des enzymes.

L'enzyme de branchement est incubée dans 280 µL de tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM contenant différentes concentrations en amylose ou en amylopectine (de 0 à 4 mg.ml<sup>-1</sup>). La réaction

est effectuée dans les conditions optimales de température et pH de chaque enzyme (indiquées dans le tableau ci-dessous).

**Table 2 : Conditions d'incubation des enzymes de branchement**

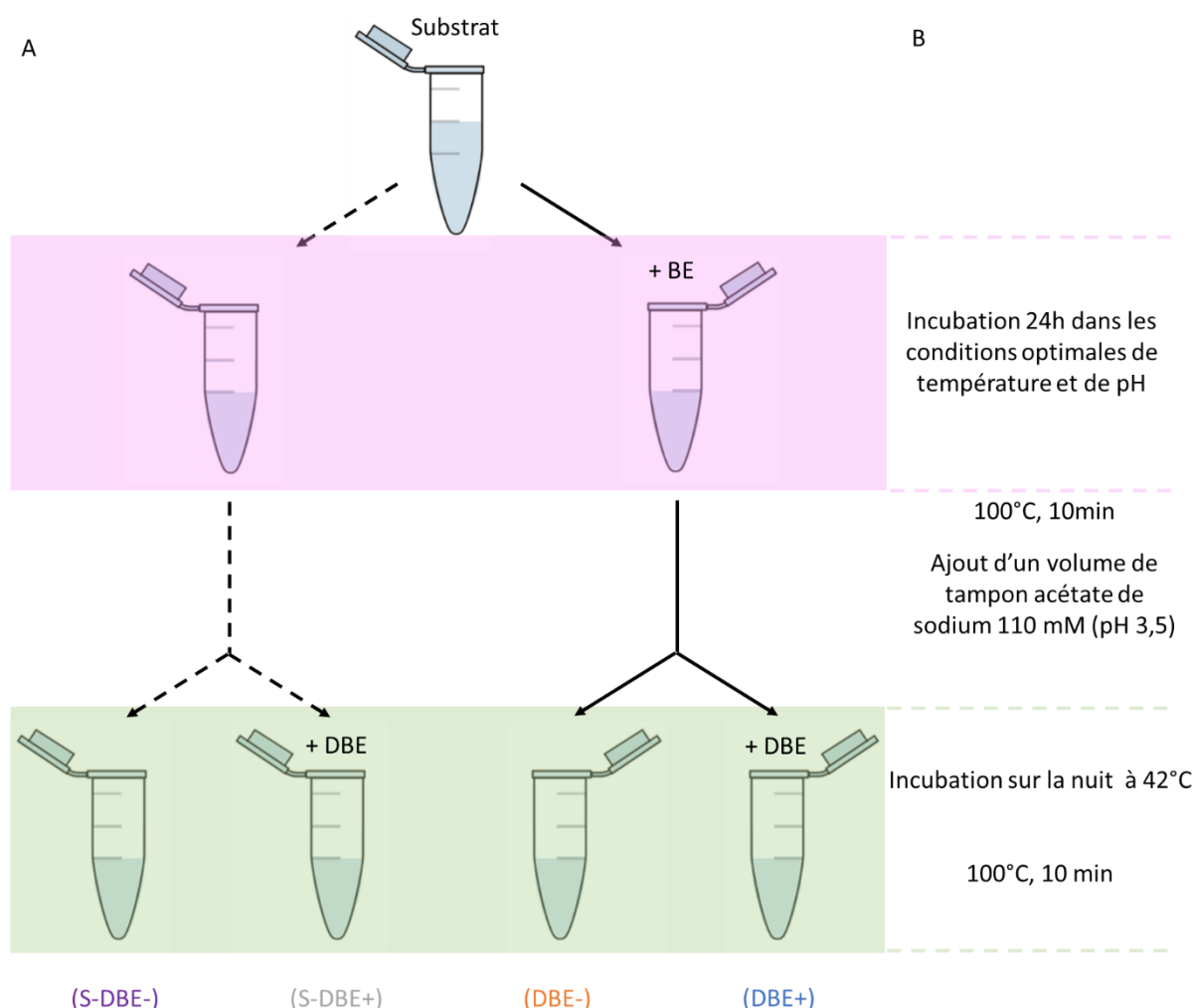
Enzyme de branchement (BE)	Conditions d'incubation des enzymes	
	pH	T (°C)
BE2.2	7	25
BE2.1	6,5	20
GlgB	7,5	37

A intervalle régulier, des aliquots sont prélevés et dilués dans 640  $\mu\text{l}$  (final) de tampon. 160  $\mu\text{l}$  d'une solution d'iode ( $\text{I}_2$  0,1 % (w/v) et KI 1 % (w/v)) sont ajoutés et l'échantillon est homogénéisé durant une minute avant lecture de l'absorbance à 660 nm lorsque l'enzyme est incubée avec l'amylose ou 540 nm si c'est l'amylopectine qui est utilisée comme substrat. L'activité spécifique est déterminée pour chaque concentration en substrat et les valeurs obtenues s'ajustent à une sigmoïde ou une hyperbole (dans le cas de GlgB).

## 10. Analyse des distributions de longueurs de chaîne des polysaccharides par chromatographie échangeuse d'anions à haut pH avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD)

Différents glucanes linéaires (A600, DP 4-19, DP 14-28) ou branchés (amylose et amylopectine de pomme de terre, Sigma) à 2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  sont incubés avec 1  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'enzyme de branchement (Une unité enzymatique est définie comme la diminution d'une unité d'absorbance par minute) dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM, dans les conditions optimales de pH et de température de l'enzyme (détaillées dans le tableau, section 9.3 de ce chapitre). Après 24h d'incubation, le mélange réactionnel est chauffé à 100°C durant 10 min afin de stopper la réaction. Un volume d'acétate de sodium 110 mM (pH 3,5) est ajouté à la solution. Celle-ci est ensuite divisée en deux échantillons de 0,5 ml, le premier n'est pas soumis à l'action des enzymes de débranchement (DBE-), tandis qu'est ajouté au second échantillon (DBE+) est additionné un cocktail d'enzymes de débranchement (DBEs) composé d'isoamylase (4U) de *Pseudomonas sp.* (Megazyme) et de pullulanase (2U) de *K. Pneumonia* (Megazyme). Après une nuit à 42°C, les échantillons sont chauffés à 100°C durant 10 min ce qui permet d'arrêter la réaction de débranchement. (Figure 26, indiqués par des flèches pleines).

Qu'il soit linéaire ou branché, le substrat seul (non soumis à une enzyme de branchement) est traité dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus (Figure 26, indiqués par des flèches brisées).



**Figure 26 : Représentation schématique du protocole expérimental permettant l'obtention des polysaccharides modifiés ou non sous l'action d'une BE.** (A) Traitement du substrat non soumis à une BE (indiqué par des flèches brisées) ou soumis à l'action d'une enzyme de branchement (indiqué par des flèches pleines). En couleur, au bas de la figure, sont spécifiés les différents échantillons obtenus. Ils seront ensuite analysés par HPAEC-PAD. (B) Les conditions expérimentales communes à chaque étape.

Les échantillons (S-DBE-, S-DBE+, DBE- et DBE+, comme indiqués au bas de la Figure 25) sont dessalés sur colonne carbographe (Extract Clean Carbo, Grace®) et élués à l'acétonitrile 25 %. Ils sont ensuite lyophilisés puis repris dans 300 µl d'eau avant d'être analysés par chromatographie échangeuse d'anions haute performance avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD, Dionex ICS-300, colonne CarboPac PA-200 : 250 × 3mm) permettant d'obtenir la distribution de longueur de chaîne (DLC) de chaque échantillon. Les analyses sont réalisées à 25 °C avec un débit de 0,4 ml.min<sup>-1</sup>.

Après injection de l'échantillon et 4 min de rinçage dans 150 mM de NaOH, les glucanes retenus sur la colonne sont élués par un gradient linéaire d'acétate de sodium (de 0 à 400 mM en 50 min) (Roussel, Lancelon-Pin et al. 2013). La colonne est ensuite lavée avec 800 mM d'acétate de sodium (durant 8 min) puis régénérée par 150 mM de NaOH durant 7 min.

Lorsque des glucanes linéaires sont utilisés comme substrat, alors la DLC de l'échantillon n'ayant subi aucune réaction enzymatique (S-DBE-) est utilisée comme témoin. Le profil de distribution de longueur de chaîne de l'échantillon (S-DBE+) sert de contrôle pour vérifier que le substrat n'est pas contaminé par une enzyme de branchement, ce profil est identique au témoin.

Lorsque des substrats branchés sont incubés avec une BE, ce sont les profils de DLC des substrats soumis à une étape de débranchement (S-DBE+) qui sont utilisés comme témoin.

# RÉSULTATS

Ce travail de thèse intervient dans la continuité des travaux réalisés par Sylvain Dumez en 2006 et Laura Boyez en 2015. L'étude réalisée par Sylvain Dumez avait pour but de caractériser des lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana* dépourvues d'une ou plusieurs enzymes de branchement. Cette étude a démontré que seules deux enzymes de branchement BE2.2 (AtBE2) et BE2.1(AtBE3) interviennent dans la synthèse de l'amidon dans les feuilles d'*Arabidopsis*. L'analyse des simples mutants a révélé que les fonctions de ces deux enzymes sont fortement redondantes, néanmoins de légères modifications dans la distribution de longueur des chaînes de l'amylopectine ont été retrouvées.

En 2015, les travaux de Laura Boyer ont démontré que l'introduction d'une enzyme de branchement bactérienne (GlgB d'*E. coli*) dans des lignées doubles mutantes dépourvues des enzymes de branchement endogènes *be2be3* permettait la restauration d'un polysaccharide de type amidon dans les feuilles de la plante. Néanmoins, le polysaccharide accumulé diffère légèrement de celui produit par une lignée sauvage (*section 2.4.4 de l'introduction bibliographique*).

Afin de mieux comprendre les phénotypes observés dans ces lignées mutantes, et de manière plus générale estimer la contribution des différentes BEs d'*Arabidopsis* à l'édification du grain d'amidon, une caractérisation biochimique a été réalisée sur les deux enzymes de branchement d'*Arabidopsis* ainsi que sur celle de d'*E. coli*.

## 1. Analyse structurale des enzymes de branchement d'*Arabidopsis thaliana*

### 1.1 Etude bio-informatique des séquences protéiques des enzymes de branchement d'*A. thaliana*

L'analyse des séquences protéiques des enzymes de branchement d'*A. thaliana* BE2.2 et BE2.1 matures (dépourvues de leur peptide de transit) a révélé que ces dernières partagent 83% d'identité de séquence. Néanmoins, la séquence en acides aminés de BE2.1 est plus longue (822 acides aminés) que celles que de BE2.2 (745 acides aminés). Il apparaît que les régions des enzymes correspondant au domaine catalytique et au CBM48 sont très conservées entre les deux enzymes, cependant l'alignement de leur séquence (présenté en Annexe 5) révèle deux différences majeures entre les deux protéines : les extrémités N-terminales (en gris, en amont du CBM48) et C-terminales (en bleu) sont plus courtes chez BE2.2 (de 55 résidus et 20 résidus respectivement), domaines qui ont été décrits comme intervenant dans la spécificité de transfert au cours de la réaction de branchement et dans la spécificité de substrat.

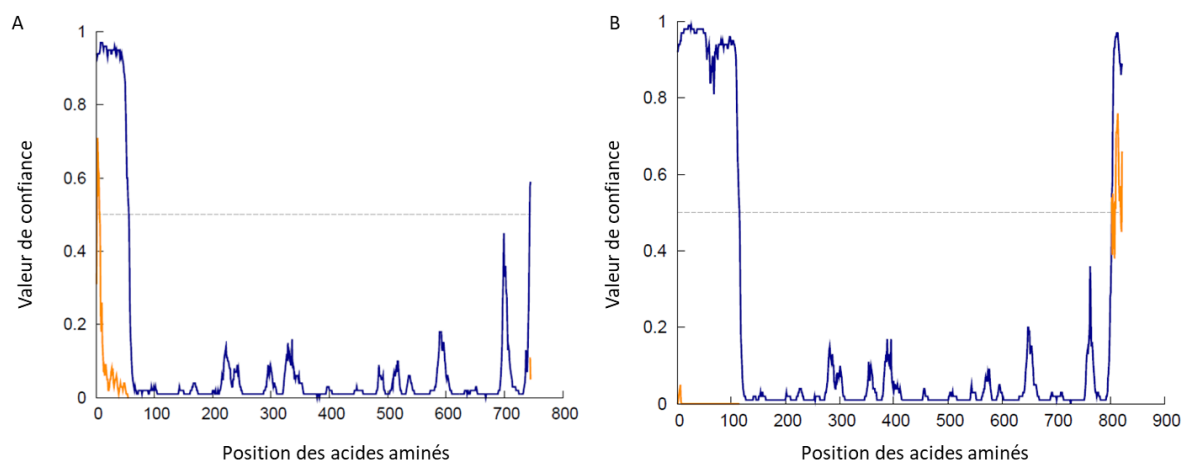
## Prédiction de désordre

Une prédiction de désordre des protéines est réalisée grâce au logiciel DISOPRED3 (Jones and Cozzetto 2015) pour déterminer la présence ou non de régions désordonnées. Il apparaît que BE2.2 est globalement structurée à l'exception d'une région de 56 acides aminés en position N-terminale (Figure 27A).

La même analyse a été effectuée pour BE2.1. Cette enzyme, qui possède un domaine N-terminal et C-terminal plus long, est prédite désordonnée dans ces régions. En effet, les 115 premiers résidus en position N-terminale et les 20 résidus du côté C-terminal sont prédits désordonnés (Figure 27B). L'alignement de séquence des enzymes (présenté Annexe 5) montre que ces régions désordonnées (encadrées en rouge) sont localisées dans les mêmes régions de chaque BE.

Pour BE2.2 et BE2.1, la prédiction d'interaction protéine-protéine, également réalisée par le logiciel DISOPRED3 (indiqué en orange figure 27A et B respectivement), n'a pas donné de résultats significatifs.

Si l'analyse structurale par SAXS confirme ces prédictions de désordres, ces régions seront alors clivées afin de pouvoir cristalliser les protéines.



**Figure 27 : Prédiction de désordre pour la protéine BE2.2 (A) et de BE2.1 (B).** Le graphique représente les valeurs de confiance en fonction de la position des acides aminés (en bleu), le seuil au-delà duquel les résidus sont considérés comme désordonnés est indiquées par des tirets gris. En orange sont indiqués les résidus pouvant être impliqués dans des interactions protéine-protéine avec le niveau de confiance correspondant.



## 1.2 Modélisation des enzymes de branchement d'*A. thaliana*

Afin de déterminer si les enzymes de branchement BE2.2 et BE2.1 présentent des spécificités dans leur organisation structurale, nous avons calculé des modèles moléculaires pour ces enzymes sur la base de leur séquence primaire par le logiciel SWISS-MODEL. Ce programme génère un modèle sur la base d'homologie de séquence à partir d'informations de structures connues et répertoriées dans la base de données PDB (Protein Data Bank).

Pour BE2.2 comme BE2.1, c'est l'enzyme de branchement de type I d'*Oriza sativa* (riz) qui présente le plus d'identité de séquence (60% avec BE2.2 contre 59% pour BE2.1).

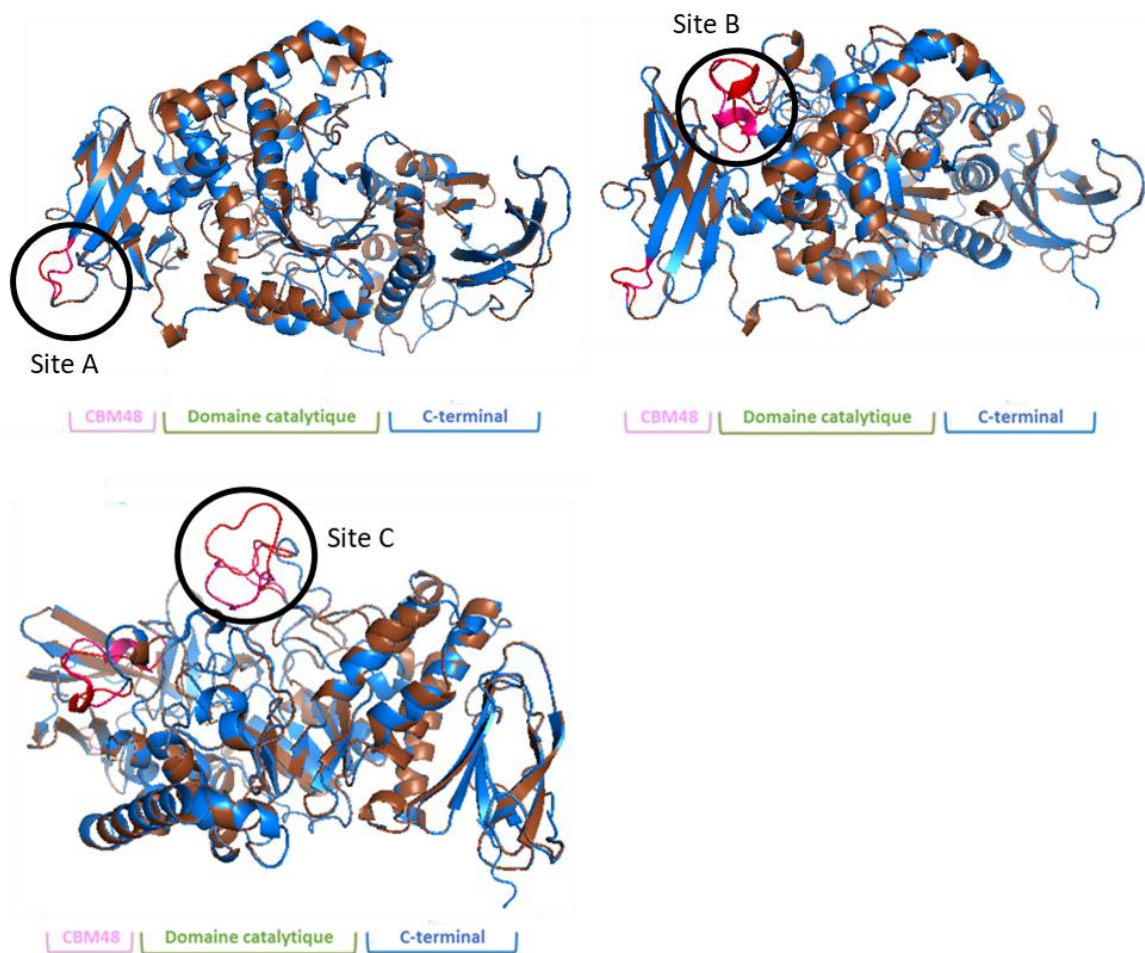
La BEI mature (dépourvue de son peptide de transit), d'une taille de 755 acides aminés, possède un domaine N-terminal plus court que BE2.2 et BE2.1 ; en revanche, son domaine C-terminal est plus long (Annexe 6).

En conséquence, le programme SWISS-MODEL a modélisé BE2.2 du résidu 125 à 805 et BE2.1 a été modélisée du résidu 160 à 830 (selon la numérotation des protéines non matures).

Outre la taille des extrémités N- et C-terminales, la comparaison des séquences protéiques de BE2.2 et BE2.1 met en lumière trois différences entre les deux enzymes qui sont également retrouvées dans les modèles générés par SWISS-MODEL.

Ces différences (nommées site A, B et C) ont été reportées en Figure 28 et en Annexe 5 :

- Site A : Une boucle, reliant deux brins  $\beta$  du CBM48, est plus courte pour BE2.2 que pour BE2.1 (Figure 28A)
- Site B : inclus dans la boucle ( $\beta_3 \rightarrow \alpha_3$ ) et localisé entre les régions conservées I et II du domaine catalytique ne s'oriente pas de la même façon pour les deux enzymes (Figure 28B)
- Site C : Une boucle localisée en aval de la région IV du domaine catalytique s'oriente vers la molécule pour BE2.1 et vers l'extérieur pour BE2.2 (Figure 28C)



**Figure 28 : Comparaison des modèles moléculaires de BE2.2 et BE2.1.** Modèle moléculaire de BE2.2 en cian et BE2.1 en marron. Les différences entre les modèles sites A, B et C sont repérées par un cercle noir. En rose, vert et bleu sont indiquées les positions du CBM48, du domaine catalytique et du domaine C-terminal respectivement.

Au sein des membres de la famille GH13\_8 et 9, le domaine catalytique et le CBM48 sont très conservés. Si ces différences de structure mises en lumière par les modèles sont avérées, il est donc fort probable qu'elles soient reliées à une fonction précise dans la catalyse ou à des interactions avec les partenaires protéiques. Afin de déterminer si les modèles obtenus pour BE2.2 et BE2.1 reflètent la structure des protéines en solution, nous avons donc cherché à déterminer si ces sites avaient déjà été décrits dans la littérature.

-Le site B inclut des résidus qui ont été décrits par Chaen et collaborateurs comme intervenant dans des interactions (décrit section 2.4.5.2 de l'introduction bibliographique). Les résidus <sup>294</sup>HE de la BEI du riz, impliqués dans l'interaction avec le maltoheptaose, sont localisés dans la région définie comme le site B chez les BEs d'*A. thaliana* (Annexe 6). Dans cet article, les auteurs émettent

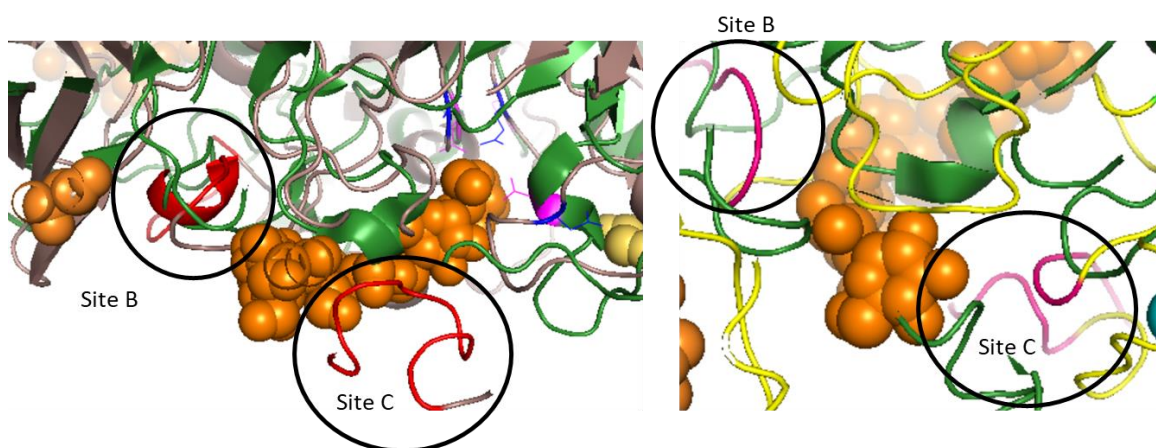
l'hypothèse que 3 sites d'interactions puissent être responsables d'un changement conformationnel de l'enzyme en présence de substrat (Chaen, Noguchi et al. 2012).

-Le site C est inclus dans un domaine de 139 acides aminés chez la BE1b du maïs, (domaine décrit comme faisant partie intégrante du domaine C-terminal présenté dans la section 2.4.5.3 de l'introduction bibliographique) et localisé en aval de la région IV (en violet, Annexe 7). Ces 139 acides aminés ont été attribués à un domaine déterminant la sélectivité de substrat (Kuriki, Stewart et al. 1997). De manière intéressante, chez la BEI du riz, ce site C se caractérise par une boucle plus courte que ce qui est observé chez les BEs de type II d'*Arabidopsis*. En revanche, ce site C chez les BEs d'*Arabidopsis* est très similaire à celui retrouvé chez la BE1a et b du maïs .

-A ce jour, aucune corrélation du site A avec un rôle connu n'a été déterminée

A l'heure actuelle, seule la structure de la BE bactérienne de *Cyanotheca* (Hayashi, Suzuki et al. 2017) a été résolue en complexe avec un sucre dans son site actif. Cette enzyme est classée parmi les BEs de type I et bien qu'elle possède moins de 30% d'identité de séquence avec les enzymes de branchement d'*A. thaliana*, cette enzyme est, avec celle de *Mycobacterium Tuberculosis*, une des seules dont la structure a été résolue dans son intégralité par cristallographie aux rayons X.

Les modèles obtenus pour les BEs d'*A. thaliana* ont été comparés avec la structure de l'enzyme bactérienne de *Cyanotheca* (Figure 29) pour mettre en évidence d'éventuelles modifications conformationnelles pouvant être à l'origine de différences de leur paramètres enzymatiques respectifs.



**Figure 29 : Comparaison de la structure de *Cyanotheca* avec les modèles moléculaires de BE2.2 et BE2.1.** Superposition de la structure de l'enzyme de branchement de *Cyanotheca* sp.(ATCC 51142, LF-WtBE1 : PDB code 5GQUX en vert) en complexe avec du maltoheptaose dans son site catalytique (la triade catalytique est indiquée en rose) avec le modèle moléculaire de BE2.2 à gauche (marron, sa triade catalytique est indiquée en bleu) et avec le modèle moléculaire de BE2.1 à droite (jaune), les sites B et C sont encadrés en noir et représentés en couleurs (rouge et rose pour BE2.2 et BE2.1 respectivement).

Pour BE2.2 comme BE2.1, les modèles obtenus corrèlent avec le mécanisme décrit chez l'enzyme bactérienne, à savoir la possibilité d'insérer 6 glucoses au niveau du site actif. Dans le cas de BE2.2, la boucle incluant le site C est en contact avec le substrat dans le sillon catalytique avec à l'opposé de ce sillon la boucle  $\beta 3 \rightarrow \alpha 3$ . (incluant le site B) (à gauche Figure 29). L'orientation de la boucle incluant le site C chez BE2.1, vers l'extérieur de la protéine, suggère un sillon catalytique plus grand (à droite Figure 29).

Les résultats obtenus grâce aux analyses bio-informatiques sont cohérents avec ce qui est connu dans la littérature et mettent en lumière des différences entre les BEs de type I et II. A ce jour, aucune donnée structurale n'est disponible sur les BEs de type II. Afin d'évaluer l'organisation structurale des BEs d'*A. thaliana* et notamment au niveau du domaine N-terminal, nous avons entrepris une étude structurale par SAXS. Les données structurales acquises sur les enzymes de branchement d'*Arabidopsis* seront ensuite mises en parallèle avec la caractérisation enzymatique de BE2.2, BE2.1 et de GlgB d'*E. coli*.

### 1.3 Expression et purification des enzymes recombinantes BE2.2, BE2.1 et de GlgB d'*E. coli*

Afin de pouvoir caractériser les enzymes de branchement, ces protéines ont été exprimées de manière hétérologue chez *E. coli* et purifiées. Après expression, les protéines sont majoritairement contenues dans la fraction soluble du lysat cellulaire. Ces dernières, qui possèdent une étiquette six histidines en position N-terminale, sont ensuite purifiées par affinité sur colonne de Nickel puis dialysées pour éliminer l'imidazole des solutions protéiques, composé incompatible pour une étude des activités enzymatiques. BE2.2 et GlgB sont dialysés dans un tampon phosphate qui maintient leur stabilité et permet l'analyse de leur activité de branchement. En revanche, BE2.1 est conservée dans un tampon HEPES conférant une meilleure stabilité de l'enzyme.

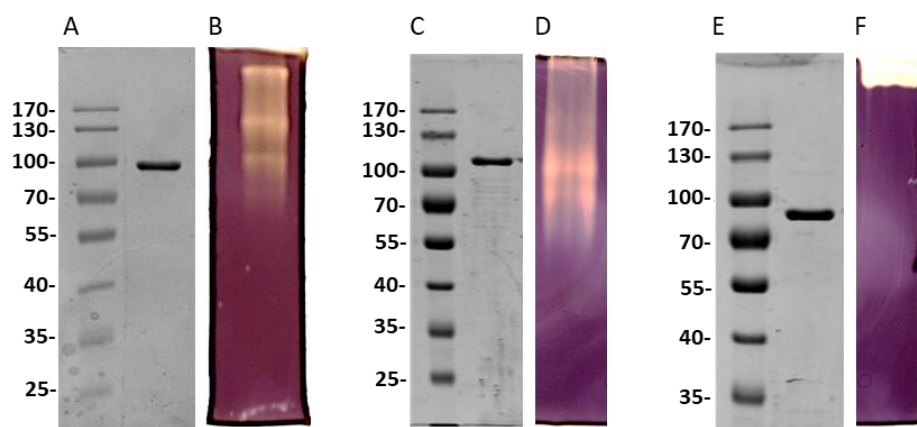
La pureté des enzymes à l'issue de la purification est vérifiée par SDS-PAGE. Une bande correspondant à la taille attendue des protéines étiquetées est observée pour BE2.2 (Figure 30A) et GlgB (Figure 30E) : 89 486 et 87 528 Da respectivement. En revanche, le profil de migration de BE2.1 sur gel SDS-PAGE présente une bande (Figure 30C) mais de poids moléculaire apparent un peu plus élevé (>100 kDa) que la taille attendue (96 994 Da, incluant l'étiquette). Il a cependant déjà été montré que des protéines intrinsèquement désordonnées empêchent le SDS de se fixer correctement aux protéines engendrant une migration plus lente et un poids moléculaire apparent plus élevé (Iakoucheva, Kimzey et al. 2001; Tompa 2002), BE2.1 possédant des régions prédites désordonnées à

ses extrémités N- et C-terminales, il est possible qu'elles soient responsables des propriétés de migration en SDS-PAGE.

Le maintien de l'activité des enzymes après purification est vérifié par zymogramme des activités hydrolytiques contenant de l'amylopectine comme substrat (Figure 30B, 30D et 30F). Il apparaît que BE2.2, BE2.1 et GlgB sont toujours actives après purification. Les trois enzymes étant toujours actives, le choix a été fait de ne pas cliver l'étiquette composée de six histidines pour la suite de l'étude.

L'analyse par zymogramme révèle néanmoins des différences dans les profils de migration des trois enzymes: si plusieurs formes sont détectées pour les enzymes de branchement d'*A. thaliana*, (Figure 30B et 30D) une seule forme est présente pour l'enzyme bactérienne (Figure 30F).

La migration sur gel s'effectuant en conditions natives, la présence de plusieurs bandes d'activité sur zymogramme en présence d'amylopectine suggère la présence de différentes formes de l'enzyme BE2.2 et BE2.1 ; par exemple la formation d'oligomères, actifs, ayant des affinités différentes pour le substrat (cette partie sera développée plus en détail, *section 3.1* de ce chapitre).



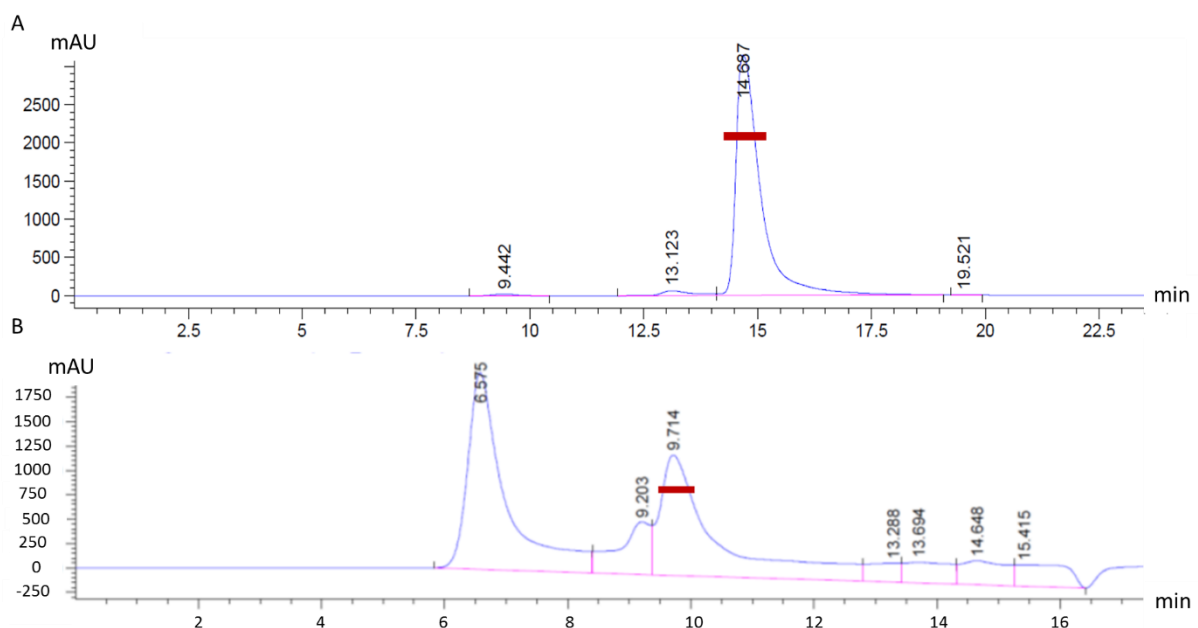
**Figure 30 : SDS-Page et zymogrammes des activités hydrolytiques des BEs purifiées.** 0,5 µg de BE2.2 (A), de BE2.1 (C) et de GlgB (E) ont été chargés sur gel SDS-PAGE. Le marqueur de poids moléculaire est indiqué et exprimé en kDa. Zymogramme des activités hydrolytiques : 1,5 µg de BE2.2 (B) de BE2.1 (D) et de GlgB (F) sont chargés sur un gel de polyacrylamide, contenant 0,3 % d'amylopectine (en concentration finale) et séparés en conditions natives. A l'issue de la migration, chaque gel est lavé à l'eau puis incubé sur la nuit dans du Tris 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et DTT 2 mM. Les activités modifiant l'amylopectine sont ensuite révélées par coloration à l'iode

## 1.4 Analyse structurale des enzymes de branchement d'*Arabidopsis thaliana* par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Une étude structurale par une approche SAXS a été effectuée afin d'évaluer l'organisation structurale des BEs d'*A. thaliana*. Cette technique permet d'obtenir des informations sur la forme ainsi que la taille des protéines en solution. Les échantillons protéiques de BE2.2 et BE2.1 purifiés sont soumis à une chromatographie d'exclusion stérique en amont des mesures SAXS.

Les profils d'élution obtenus pour les deux enzymes sont représentés en figure 31. L'analyse de ces profils révèle la présence d'une forme monomérique stable dans le cas de BE2.2, cette forme est prépondérante (indiqué en rouge Figure 31A). Les données SAXS ont donc été mesurées sur ce pic.

Pour BE2.1 en revanche, la présence de plusieurs pics est observée : un pic élué dans le volume mort de la colonne utilisée et deux autres pics élués plus tardivement. Les données SAXS collectées ont été mesurées pour le troisième pic, correspondant à une forme monomérique de BE2.1 (indiquée en rouge Figure 31B).



**Figure 31 : Profil d'élution obtenu après chromatographie d'exclusion stérique de BE2.2 et BE2.1.** (A) Profil d'élution de BE2.2 obtenu sur une colonne Bio-SEC, 300 Å, dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM, glycérol 5 %, pH 7. (B) Profil d'élution de BE2.1 obtenu sur une colonne Bio-SEC, 300 Å dans un tampon HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, glycérol 10 %, pH 7

### 1.3.1 Analyse structurale de BE2.2 par SAXS

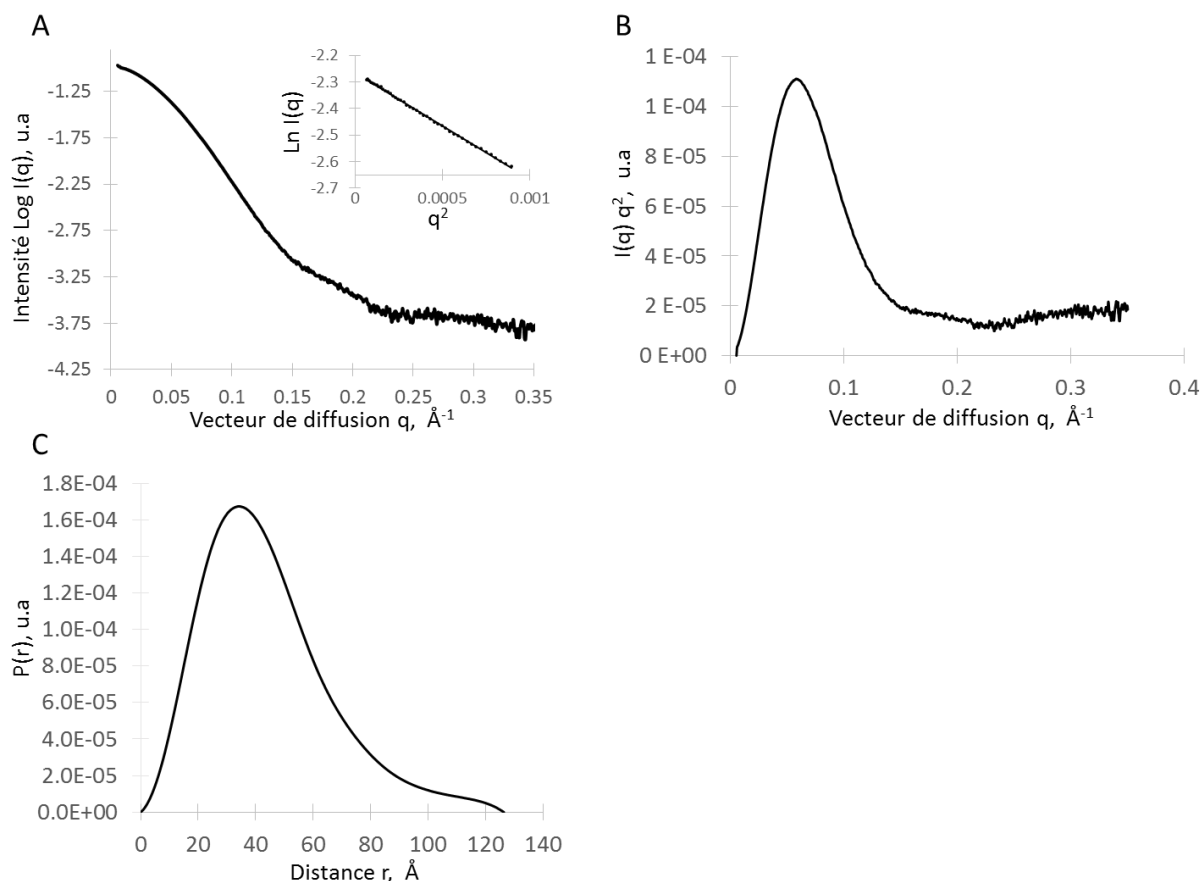
La courbe SAXS obtenue pour BE2.2 est présentée en figure 32A. La représentation de Guinier (Figure 32A, en médaillon) de la courbe de diffusion, réalisée dans la zone de  $q \cdot R_g < 1,16$  (où  $q$  est le vecteur de diffusion en  $\text{\AA}^{-1}$  et  $R_g$  le rayon de giration de la particule), est linéaire dans cette zone et atteste de la qualité des données collectées. La pente de cette droite, définie par  $-\frac{R_g^2}{3}$  a donc permis de calculer le rayon de giration de BE2.2 d'une valeur de 34,5  $\text{\AA}$ .

L'analyse de la courbe de diffusion par le logiciel SAXSMoW2 (Fischer, Oliveira Neto et al. 2010) a confirmé que les données collectées pour BE2.2 correspondent à une forme monomérique de l'enzyme (d'une taille calculée à 90 kDa) ce qui corrèle avec la taille attendue de la protéine étiquetée (89,486 kDa).

La représentation de Kratky de la courbe de diffusion présentée en figure 32B présente la forme d'une courbe en cloche ce qui suggère l'absence de grandes régions désordonnées au sein de la particule.

La fonction de distribution des distances, présentée en figure 32C, renseigne sur la forme de BE2.2. Cette dernière montre une courbe qui n'est pas centrée sur le  $R_g$  mais présente un profil biphasique, ce profil est caractéristique d'une protéine allongée présentant plusieurs domaines et dont le diamètre maximal  $D_{\max}$  est de 126  $\text{\AA}$  ( $\approx 4 R_g$ ).





**Figure 32 : Données SAXS obtenues pour BE2.2.** (A) Courbe expérimentale (logarithme de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion), en médaillon la zone de Guinier. (B) Représentation de Kratky des données expérimentales. (C) La fonction de distribution de distance correspondante [P(r)] calculée par GNOM, renseigne sur la forme de BE2.2.

L'enveloppe moyenne à basse résolution de BE2.2 (générée à partir de 10 modèles) ainsi que le meilleur modèle calculé pour BE2.2 sont présentés en figure 33A. L'enveloppe de BE2.2 présente une protubérance émergeant d'une forme globulaire. Ces résultats sont cohérents avec les structures connues des enzymes appartenant à la famille CAZy GH13\_8 et 9. En effet, les enzymes de cette famille possèdent plusieurs domaines dont un domaine globulaire constitué du CBM48, du domaine catalytique formé du tonneau ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> et de la région C-terminale (Figure 33B), et d'un domaine N-terminal dont l'organisation au sein de la protéine diffère selon l'origine des enzymes de branchement.

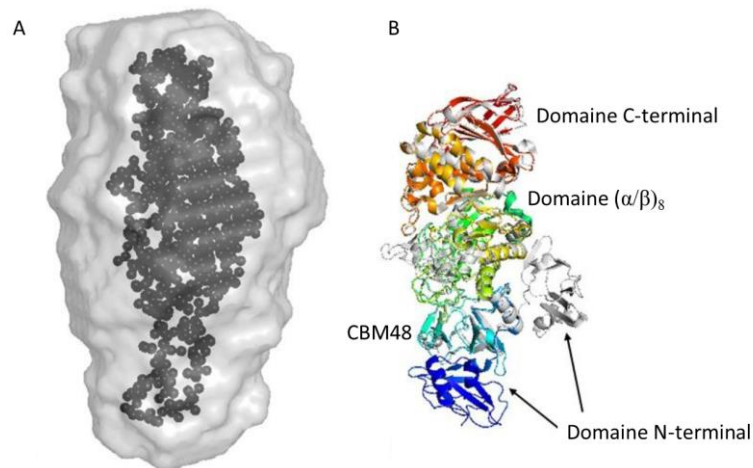
Seules les structures de *Mycobacterium tuberculosis* (MtBE1) (Pal, Kumar et al. 2010) et de *Cyanotheca* (ATCC 51142, cceBE1) (Hayashi, Suzuki et al. 2017), appartenant aux BE de type I, ont été résolues en intégralité, par cristallographie aux rayons X. Bien que partageant moins de 30 % d'identité de séquence avec les enzymes de branchement d'*Arabidopsis*, ces enzymes bactériennes, possédant un domaine N-terminal plus long, recouvrent une plus large séquence du domaine N-terminal de



BE2.2 (Annexe 8 et 9) que les enzymes de branchement eucaryotes, de l'homme (Froese, Michaeli et al. 2015) et du riz (Noguchi, Chaen et al. 2011). Chez ces deux enzymes bactériennes, la structure de chacun des domaines est semblable. Seul l'agencement du domaine N-terminal au sein de la protéine diffère.

MtBE1 présente un domaine N-terminal localisé dans le prolongement de la protéine et confère à cette dernière une forme allongée, contrairement à celui de cceBE1 localisé à la jonction entre le CBM48 et le tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> conférant à la protéine une structure plus compacte (plus globulaire) que celle de *M. tuberculosis* (Figure 33B).

Dans le but d'identifier la position du domaine N-terminal de BE2.2, les structures de MtBE1 et cceBE1 ont été comparées à l'enveloppe obtenue pour BE2.2. Il apparaît que l'organisation des domaines de BE2.2 semble proche de celle décrite pour MtBE1 (Figure 33B).



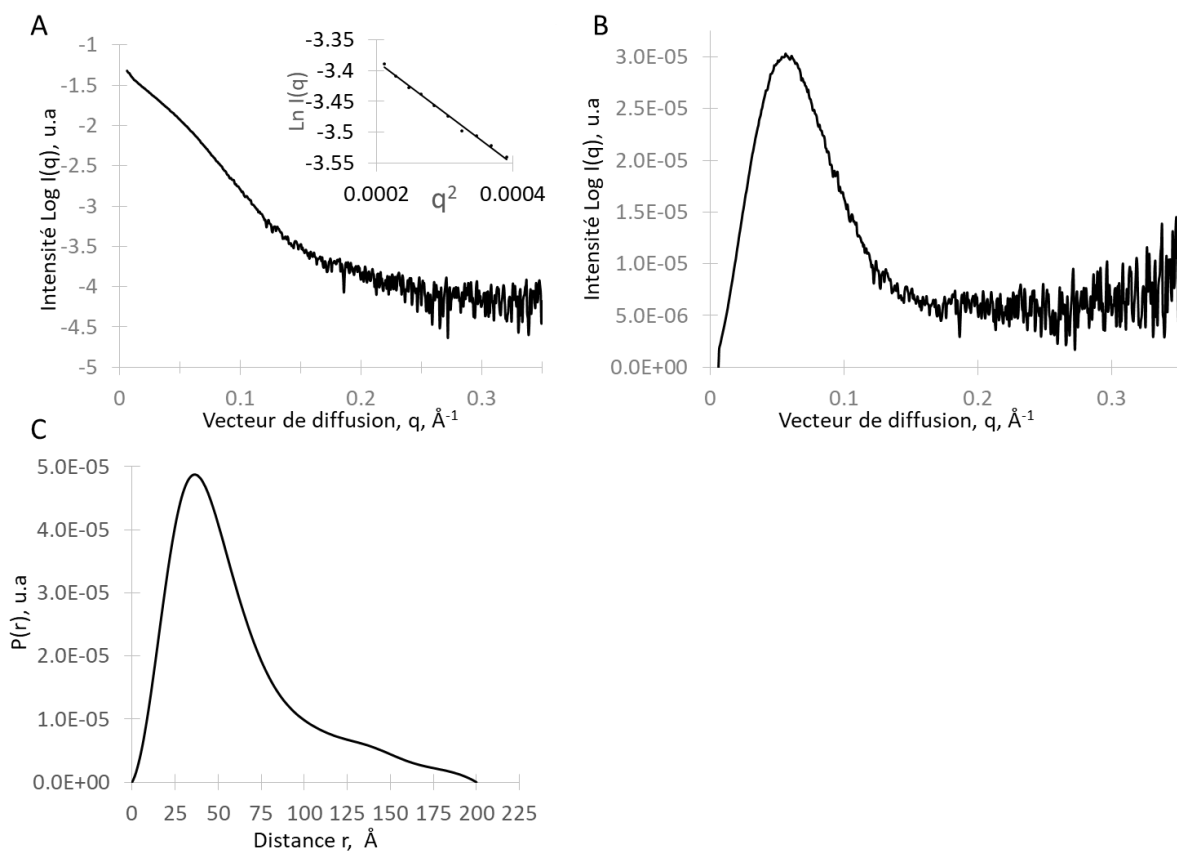
**Figure 33: Comparaison de l'enveloppe de BE2.2 avec les structures des enzymes de branchement de *Cyanothecce* et *Mycobacterium*.** (A) Représentation de l'enveloppe *ab initio* moyenne de BE2.2 générée par DAMAVER à laquelle est superposé le meilleur modèle généré par GASBOR (représenté par des billes). (B) Superposition des structures d'une enzyme de branchement cyanobactérienne en gris (*Cyanothecce* sp. ATCC 51142, LF-WtBE1 : PDB code 5GQU) et celle de *M. tuberculosis* H37RV en couleur (MtBE ; PDB code 3K1D), les domaines N-terminaux, le CBM48, le domaine ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> et le domaine C-terminal sont indiqués en bleu foncé, cyan, vert et rouge respectivement.

### 1.3.2 Analyse structurale de BE2.1 par SAXS

La courbe SAXS obtenue pour BE2.1 est présentée en figure 34A. La représentation de Guinier (Figure 34A, en médaillon) de la courbe de diffusion, réalisée dans la zone de  $q.R_g < 1$ , est linéaire dans cette zone attestant de la qualité des données collectées et nous a permis de calculer le rayon de giration de BE2.1 d'une valeur de 49,7 Å.

La représentation de Kratky de la courbe de diffusion (Figure 34B) présente la forme d'une courbe en cloche aux faibles valeurs de  $q$ , néanmoins aux grandes valeurs de  $q$ , la courbe augmente ce qui suggère la présence d'une ou plusieurs régions désordonnées au sein de la particule, ce qui corrèle avec les prédictions de désordre obtenues par analyse bio-informatique.

La fonction de distribution des distances obtenue pour BE2.1 présente également un profil biphasique comme dans le cas de BE2.2 (Figure 34B). Ce profil ainsi que le diamètre maximal déterminé, de 200 Å, suggère une protéine de forme beaucoup plus allongée que BE2.2 et présentant également plusieurs domaines.

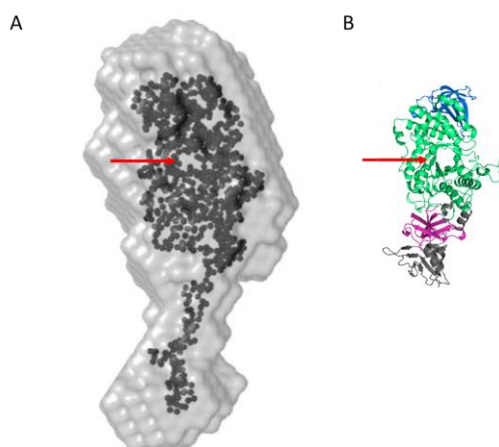


**Figure 34: Données SAXS obtenues pour BE2.1.** (A) Courbe expérimentale (logarithme de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion), en médaillon la zone de Guinier. (B) Représentation de Kratky des données expérimentales. (C) La fonction de distribution de distance correspondante [P(r)] calculée par GNOM, renseigne sur la forme de BE2.1.

L'analyse de l'enveloppe moyenne de BE2.1 ainsi que le meilleur modèle obtenu, présentés en figure 35A, révèlent une région allongée très dynamique émergeant d'un domaine globulaire stable. La comparaison du modèle obtenu avec la structure de l'enzyme de branchement de *Mycobacterium tuberculosis* (MtBE1) (Pal, Kumar et al. 2010) présentée en figure 35B, montre que l'agencement des différents domaines de MtBE1 corrèle avec la région globulaire de l'enveloppe de BE2.1. Pour le

meilleur modèle obtenu (représenté par des billes ou pseudo résidus Figure 35A), il est possible de visualiser les résidus correspondant aux acides aminés appartenant aux brins  $\beta$  du tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> du domaine catalytique (indiquée par une flèche rouge).

L'analyse de séquence de BE2.1 présente une extension de 55 résidus en N-terminale en comparaison avec BE2.2. Cette région prédite désordonnée corrèle donc parfaitement avec le domaine allongé et dynamique mis en évidence par le modèle de BE2.1 (Figure 35A).



**Figure 35: Comparaison de l'enveloppe de BE2.1 avec la structure de l'enzyme de branchement de *Mycobacterium*.** (A) Représentation de l'enveloppe moyenne *ab initio* de BE2.1 générée par DAMAVER à laquelle est superposé le meilleur modèle généré par GASBOR (représenté par des billes). (B) Structures de l'enzyme de branchement cyanobactérienne de *M. tuberculosis* H37RV (MtBE ; PDB code 3K1D), le domaine N-terminal, le CBM48, le domaine ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> et le domaine C-terminal sont indiqués en gris, rose, vert et bleu respectivement. La flèche rouge indique le tonneau formé par les brins  $\beta$  du domaine catalytique.

**Table 3 : Récapitulatif des données sur les enzymes de branchement d'*Arabidopsis thaliana* :**

	BE2.2	BE2.1
Nombre d'acides aminés (incluant l'étiquette)	776	853
Masse moléculaire en Da (incluant l'étiquette)	89 486	96 994
R <sub>g</sub> en Å	34,5	49,7
D <sub>max</sub> en Å	126	200

### 3. Caractérisation enzymatique des BEs d'*A. thaliana* et de GlgB d'*E. coli*

#### 3.1 Obtention de glucanes linéaires synthétisés par l'amylosaccharase

L'amylosaccharase est une  $\alpha$ -transglucosylase (E.C. 2.4.1.4). Cette enzyme, membre de la famille GH13, selon la classification CAZy, catalyse l'élongation d' $\alpha$ -1,4 glucanes linéaires à partir du saccharose comme sucre donneur. La polymérisation des unités glucosyles s'accompagne d'une libération d'unités fructose comme produit annexe de la réaction. Elle est ainsi capable de synthétiser des chaînes de degré de polymérisation allant de 3 à une centaine de résidus de glucose suivant la quantité de saccharose incorporée dans le milieu réactionnel. Il a ainsi été montré que l'amylosaccharase favorise la formation de chaînes plus courtes à forte concentration en saccharose (Potocki de Montalk, Remaud-Simeon et al. 2000).

Après fractionnement des produits de réaction de l'amylosaccharase, l'obtention de glucanes linéaires peu polydisperses, de DP 4-19 (Figure 58A) et de DP 14-28 (Figure 59A), permet de caractériser plus finement la taille des glucanes pouvant être utilisés comme substrat par les enzymes de branchement ainsi que les produits qui seront formés au cours de la réaction.

Le A600, de degré de polymérisation compris entre 5 et 50 résidus de glucose (Figure 57A), offre une gamme de glucanes linéaires plus larges pouvant être utilisés par les BEs. Une grande partie des glucanes constituant ce substrat étant de DP > 12, ils peuvent être colorés à l'iode. Ce substrat peut donc également être utilisé pour analyser la mobilité électrophorétique des BEs, en présence de glucanes strictement linéaires, en l'additionnant à des gels de polyacrylamide.

#### 3.2 Mobilité électrophorétique des enzymes de branchement, affinité pour l'amylopectine, l'amylose ou les $\alpha$ -1,4 glucanes linéaires.

Nous avons pu constater, à partir de zymogrammes contenant de l'amylopectine comme substrat, que les enzymes de branchement d'*Arabidopsis* migrent sous plusieurs formes électrophorétiques et sont responsables de plusieurs bandes d'activités mises en évidence par coloration à l'iode des glucanes du gel (Figures 30B et 30D). La même expérimentation faite avec l'enzyme de branchement d'*E. coli* (GlgB) ne présente qu'une bande d'activité (Figure 30F). De manière surprenante, l'analyse par SAXS a révélé que BE2.2 est présente uniquement sous forme

monomérique en solution. Nous avons donc cherché à savoir ce qui est responsable de la formation des différentes formes actives visualisées sur le zymogramme.

### 3.2.1 Evaluation de l'activité de BE2.2 par zymogrammes

Afin de s'assurer que les trois activités observées sur zymogramme (Figure 30B) sont bien caractéristiques de BE2.2, un zymogramme amidon en conditions dénaturantes est réalisé (Figure 36A). Sur ce dernier, seule une forme active est détectée suggérant que seule BE2.2 est présente et active dans l'échantillon protéique et correspond à la protéine visualisée par SDS-PAGE (Figure 30A).

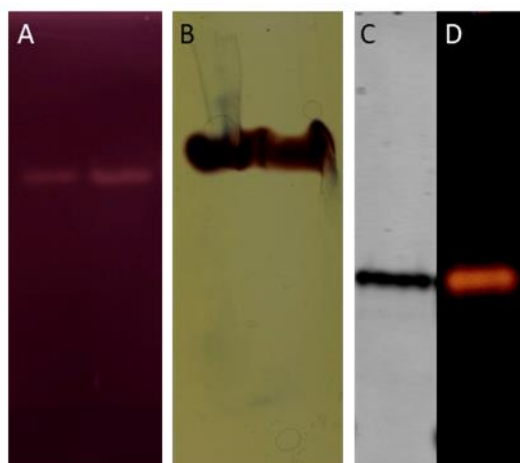
Il apparaît donc que ces différentes formes sont retrouvées uniquement lorsque la migration des protéines s'effectue en conditions natives. Nous avons donc voulu déterminer si la présence de substrat dans le gel était bien responsable de la formation de ces différentes formes de BE2.2 en conditions natives. Si cette hypothèse est avérée, en absence de substrat dans le gel au cours de la migration, ces différentes formes devraient être absentes.

Pour cela, l'activité de branchement a été évaluée par zymogramme après migration dans un gel ne contenant pas de substrat. Dans ce cas, l'activité peut être révélée de deux manières distinctes :

- les protéines piégées dans le gel sont mises en présence du substrat dans le tampon d'incubation contenant du G1P et la phosphorylase « a ». Les glucanes linéaires synthétisés par la phosphorylase « a » à partir du G1P, peuvent être utilisés comme substrat par l'enzyme de branchement. Les polysaccharides branchés produits se retrouvent alors piégés dans le gel et sont ensuite révélés par coloration à l'iode (Figure 36B).

- les protéines du gel dépourvu de substrat sont transférées en conditions natives, sur un gel contenant de l'amylopectine. Les enzymes modifient le substrat au cours du transfert. Ces modifications sont ensuite révélées par coloration à l'iode (Figure 36D).

Quel que soit le type de zymogramme utilisé, une seule bande d'activité correspondant à l'activité de BE2.2 est détectée après coloration à l'iode ce qui démontre que l'enzyme purifiée, active, n'est présente que sous une forme en absence de substrat dans le gel. Ces résultats corréleront donc avec l'analyse de BE2.2 par SAXS où seule la forme monomérique de l'enzyme est détectée en absence de substrat.



**Figure 36 : Zymogrammes de BE2.2 purifiée.** (A) Zymogramme amidon en conditions dénaturantes. 0,5 µg (à gauche) et 1 µg (à droite) de BE2.2 purifié ont été chargés sur un gel de polyacrylamide contenant de l'amidon de pomme de terre comme substrat (à une concentration finale de 0,3 % p/v) et séparés en conditions dénaturantes. Après la migration le gel est rincé trois fois pendant 30 min dans un tampon Tris puis incubé une nuit à température ambiante dans un tampon Tris-Glycine DTT permettant l'activité des BEs. L'activité des enzymes modifiant l'amidon est ensuite révélée par coloration à l'iode. (B) Zymogramme révélant l'activité de branchement. 0,5 µg (à gauche) et 1 µg (à droite) de BE2.2 purifié sont chargés sur un gel de polyacrylamide (ne contenant pas de substrat) et séparés en conditions natives. A l'issue de la migration, le gel est rincé deux fois 10 min dans un tampon de lavage HEPES-glycérol puis incubé une nuit à température ambiante dans ce tampon auquel est ajouté du G1P, de l'AMP nécessaire à l'action de la phosphorylase « a ». Les glucanes linéaires ainsi produits par la phosphorylase « a » servent de substrat à BE2.2 et les polysaccharides branchés ainsi générés sont alors piégés dans le gel. Ces polymères sont révélés par coloration à l'iode. (C) 1 µg de BE2.2 est chargé sur un gel de polyacrylamide et séparé en conditions natives (à gauche). A l'issue de la migration, les protéines sont révélées au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). (D) Transfert de 1 µg de BE2.2 ayant migré comme décrit en (C) sur un gel de polyacrylamide contenant 0,3 % d'amylopectine de pomme de terre. L'activité des protéines modifiant l'amylopectine est révélée par coloration à l'iode.

### 3.2.2 Détermination de l'affinité de BE2.2 pour différents substrats

Nous avons pu constater la présence de plusieurs formes actives de BE2.2, après migration en présence d'amylopectine dans des conditions natives. L'amylopectine présente un taux de branchement de 6 %. Nous avons donc cherché à savoir si l'enzyme adopte plusieurs formes enzymatiquement actives en présence d'autres substrats plus ou moins branchés comme l'amylose (1 % de points de branchement) et des  $\alpha$ -1,4 glucanes strictement linéaires (A600). En parallèle, de cette évaluation, l'affinité de BE2.2 purifiée pour ces différents substrats (amylopectine, amylose et glucanes linéaires) a été évaluée par une méthode de retard sur gel. Pour cela, l'enzyme purifiée est déposée sur différents gels de polyacrylamide contenant des concentrations variables en substrat. Après migration en conditions natives, les gels sont colorés au bleu de Coomassie pour révéler les différents profils de migration de l'enzyme (Figures 37A) ou incubés dans un tampon contenant la

phosphorylase « a », permettant l'action des enzymes de branchement (Figures 37B). Dans chaque cas l'activité est détectée par coloration à l'iode, comme décrit dans le paragraphe précédent (*section 3.2.1 de ce chapitre*). En absence de polysaccharide dans le gel, une seule bande correspondant à BE2.2 est observée que ce soit par coloration au bleu de Coomassie (Figure 37A) ou par détection des activités de branchement grâce à la phosphorylase « a » (Figure 37B).

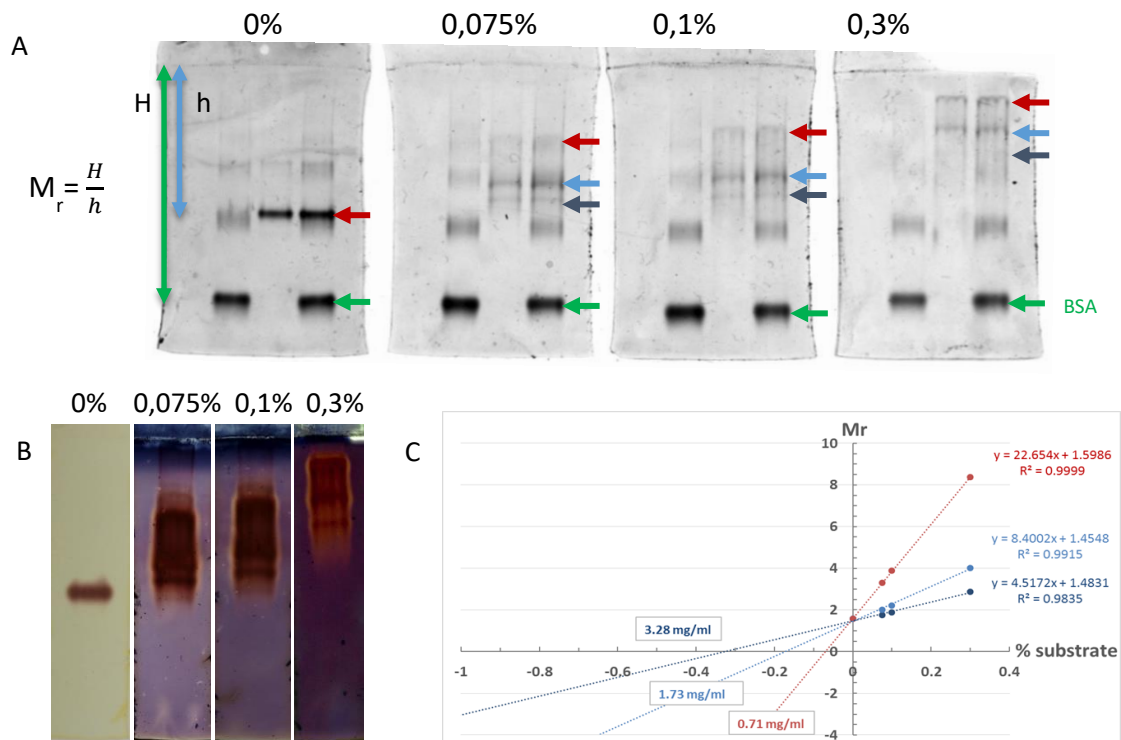
En présence d'amylopectine, plus la concentration en polysaccharide est élevée dans le gel, plus la migration de BE2.2 est retardée. De plus, dans ces conditions BE2.2 migre sous la forme de trois espèces actives (Figure 37B). Ces différentes formes de BE2.2 sont plus ou moins retardées par l'amylopectine présente dans le gel. Afin de s'assurer que le retard sur gel observé pour BE2.2 n'est pas causé par un encombrement stérique dû à la présence d'une concentration croissante en amylopectine dans le gel, la sérum albumine bovine (BSA) est utilisée comme témoin de migration.

Le profil de migration de la BSA reste identique quelle que soit la concentration en substrat dans le gel. Le retard de migration observée pour BE2.2 est donc lié à l'affinité de la protéine pour le polysaccharide présent dans le gel. Le rapport entre les distances de migration de BE2.2 et de la BSA ( $M_r$ ) est calculé pour chaque concentration en amylopectine et pour chaque forme de BE2.2 (Figure 37C). La constante d'affinité de chaque forme de BE2.2 pour l'amylopectine ( $K_s$ ) a donc pu être déterminée. Elle est de  $0,71 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme la plus retenue dans le gel, de  $1,73 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme intermédiaire et  $3,28 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme la moins retardée (indiquées respectivement en rouge, en bleu clair et bleu foncée Figure 37C).

La même démarche analytique a été effectuée en utilisant de l'amylose comme substrat (Figure 38). Cette fois encore, 3 bandes, enzymatiquement actives, correspondant à BE2.2 sont observées lorsque l'amylose est présent dans le gel (Figure 38A et 38B). Néanmoins, le retard sur gel observé pour BE2.2 est moins prononcé avec l'amylose qu'avec l'amylopectine, indiquant que BE2.2 possède moins d'affinité pour l'amylose. En effet, les valeurs de  $K_s$  obtenues pour chaque forme de BE2.2, pour le substrat amylose, sont plus élevées que celles obtenues pour l'amylopectine :  $1,81 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme la plus retenue dans le gel,  $5,82 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme intermédiaire et  $9,65 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme la moins retardée (indiquées respectivement en rouge, en bleu clair et bleu foncé Figure 38C).

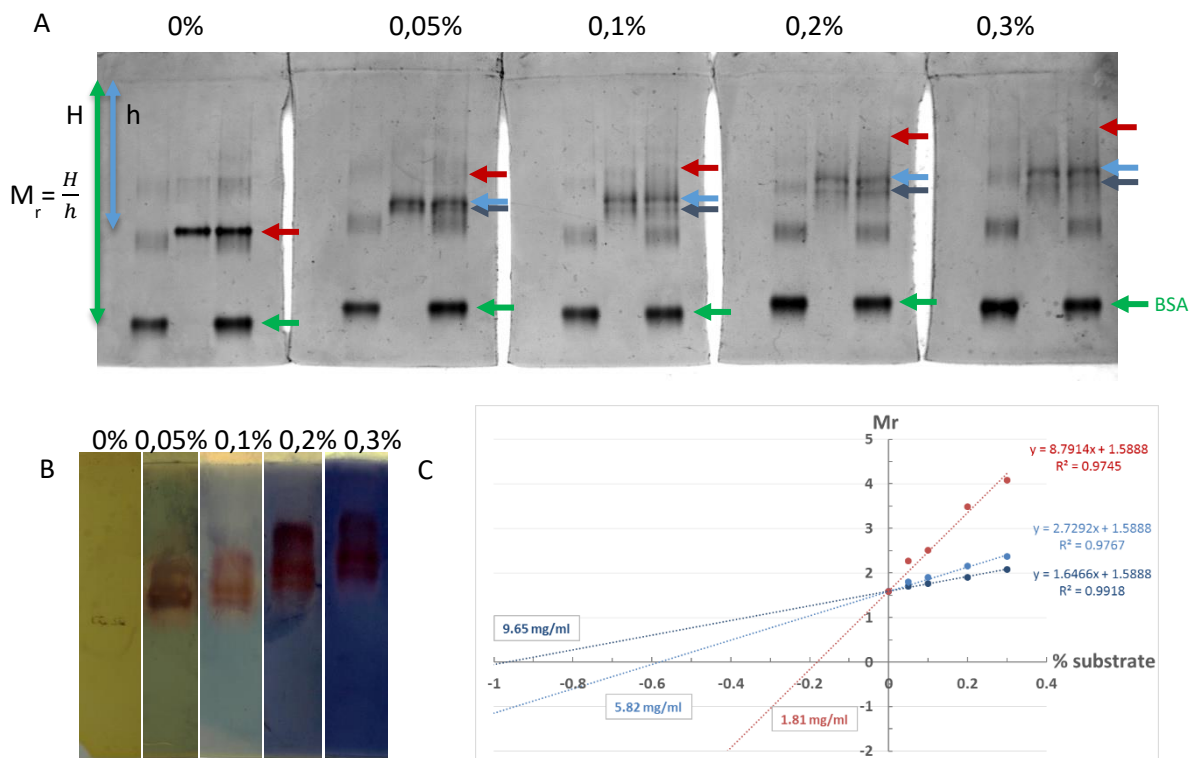
Le comportement électrophorétique de BE2.2 en présence de glucanes linéaires composant le A600 a également été évalué (le profil de distribution de longueur de chaîne du A600 est présenté Figure 56A de ce manuscrit). Lorsque le A600 est additionné au gel, une seule espèce enzymatiquement active est observée. De plus le retard de migration de BE2.2 est très peu marqué, même à forte concentration en substrat (0,3 % final) ce qui ne permet pas le calcul d'une constante d'affinité (Figure 39A et 39B). Bien que BE2.2 soit active sur des substrats linéaires (également

démontré Figure 36B), ces résultats suggèrent que BE2.2 se comporte différemment en présence de substrats branchés et non branchés et que la présence de différentes formes de BE2.2 est donc induite par la présence de substrats branchés.

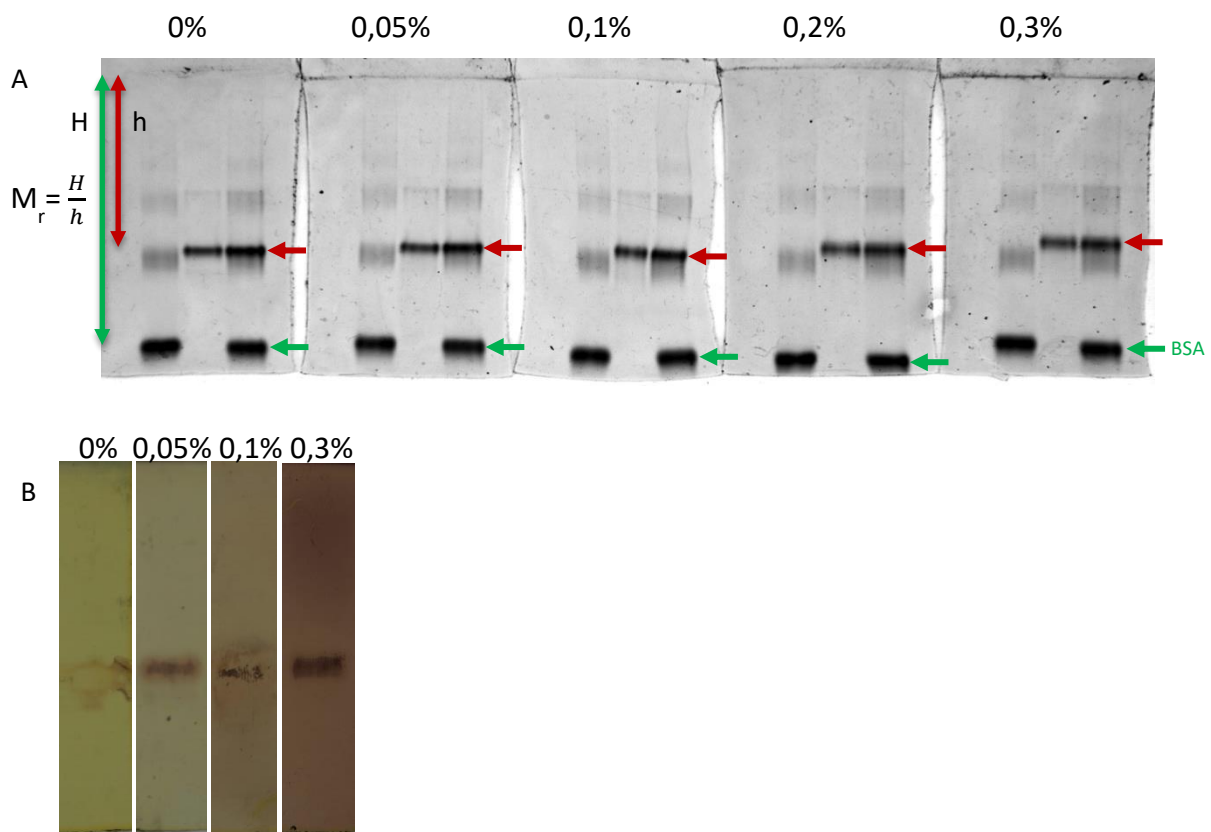


**Figure 37 : Détermination de l'affinité de BE2.2 purifiée pour l'amylopectine.** (A) 2  $\mu\text{g}$  de BSA (à gauche), 1  $\mu\text{g}$  de BE2.2 purifiée (au centre) et un mélange de 2 $\mu\text{g}$  de BSA et 1 $\mu\text{g}$  de BE2.2 (à droite) sont chargés sur différents gel de polyacrylamide, contenant de 0 à 0,3 % d'amylopectine de pomme de terre (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence d'amylopectine dans le gel, elle est utilisée comme standard de migration. Le rapport entre les distances de migration de la BSA et de BE2.2 ( $M_r$ ) est calculé pour chaque forme de BE2.2 observée (indiquée par une flèche rouge, bleu clair et bleu foncée). (B) Zymogramme de l'activité de branchement de 1  $\mu\text{g}$  de BE2.2. A l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé 2 $\times$ 10 min dans le tampon HEPES-glycérol puis incubé sur la nuit dans ce même tampon auquel est ajouté du G1P, de l'AMP nécessaire à la phosphorylase « a ». Les polysaccharides linéaires produits par la phosphorylase « a » sont ramifiés par action de l'enzyme de branchement et piégés dans le gel. Ces polysaccharides apparaissent rouge-brun après coloration à l'iode. (C) Représentation du rapport de migration entre la BSA et BE2.2 ( $M_r$ ) en fonction de la concentration en substrat (%), les valeurs obtenues sont soumises à une régression linéaire. Chaque droite correspond aux valeurs obtenues pour chacune des formes de BE2.2, plus ou moins retenues dans le gel (en rouge, bleu clair et bleu foncé respectivement). L'intersection entre la droite de régression et l'axe des abscisses permet d'obtenir la constante d'affinité de BE2.2 pour l'amylopectine ( $K_s$ ). Les valeurs encadrées représentent le ( $K_s$ ) de chaque forme de BE2.2 observée qui sont de 0,71  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la forme la plus retenue dans le gel (en rouge), 1,73  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la forme intermédiaire (en bleu clair) et de 3,28  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la forme la moins retardée (en bleu foncé).





**Figure 38 : Détermination de l'affinité de BE2.2 purifiée pour l'amylose.** (A) 2  $\mu$ g de BSA (à gauche), 1  $\mu$ g de BE2.2 (au centre) et un mélange de 2  $\mu$ g de BSA et 1  $\mu$ g de BE2.2 (à droite) sont chargés sur un gel de polyacrylamide, contenant 0 à 0,3 % d'amylose de pomme de terre (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence d'amylose dans le gel, cette dernière est utilisée comme standard de migration. Le rapport entre les distances de migration de la BSA et de BE2.2 ( $M_r$ ) est calculé pour chaque forme de BE2.2 observée (indiquée par une flèche rouge, bleu clair et bleu foncée). (B) Zymogramme de l'activité de branchement de 1  $\mu$ g de BE2.2. A l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé 2 $\times$ 10 min dans le tampon HEPES - glycérol puis incubé sur la nuit dans ce même tampon auquel est ajouté du G1P, de l'AMP nécessaire à la phosphorylase « a ». Les polysaccharides branchés produit par BE2.2 et piégés dans le gel apparaissent rouge-brun après coloration à l'iode. (C) Représentation du rapport de migration entre la BSA et BE2.2 ( $M_r$ ) en fonction de la concentration en substrat (%), les valeurs obtenues sont soumises à une régression linéaire. Chaque droite correspond aux valeurs obtenues pour les différentes formes de BE2.2, plus ou moins retenues dans le gel (en rouge, bleu clair et bleu foncé respectivement). L'intersection entre la droite de régression et l'axe des abscisses permet d'obtenir la constante d'affinité de BE2.2 pour l'amylose ( $K_s$ ). Les valeurs encadrées représentent le  $K_s$  de chaque forme de BE2.2 observée qui sont de 1,81 mg.ml<sup>-1</sup> pour la forme la plus retenue dans le gel (en rouge), 5,82 mg.ml<sup>-1</sup> pour la forme intermédiaire (en bleu clair) et 9,65 mg.ml<sup>-1</sup> pour la forme la moins retardée (en bleu foncé).

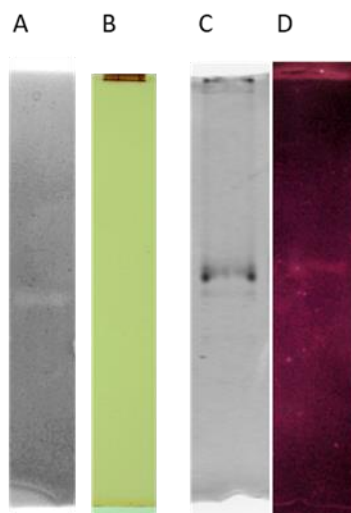


**Figure 39 : Détermination de l'affinité de BE2.2 purifiée pour le A600.** (A) 2  $\mu$ g de BSA (à gauche), 1  $\mu$ g de BE2.2 (au centre) et un mélange de 2  $\mu$ g de BSA et 1  $\mu$ g de BE2.2 (à droite) sont chargés sur un gel de polyacrylamide contenant 0 à 0,3 % de A600 (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées grâce au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence de substrat dans le gel, cette dernière est utilisée comme standard de migration. (B) zymogramme de l'activité de branchement de 1  $\mu$ g de BE2.2. à l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé 2x10 min dans le tampon HEPES - glycérol puis incubé sur la nuit dans ce même tampon auquel est ajouté du G1P, de l'AMP nécessaire à la phosphorylase « a ». Les polysaccharides branchés produits par BE2.2 et piégés dans le gel apparaissent rouge-brun après coloration à l'iode.

### 3.3 Evaluation de l'activité de BE2.1 par zymogrammes

Les mêmes analyses ont été initiées pour caractériser la seconde enzyme de branchement d'*A. thaliana*, BE2.1. Sur zymogramme amidon, en conditions dénaturantes, une seule bande d'activité est détectée, suggérant que BE2.1 n'est pas contaminée par d'autres enzymes ayant une activité sur l'amidon (Figure 40A). Elle est donc la seule enzyme présente et active dans l'échantillon protéique et correspond à la protéine visualisée par SDS-PAGE (Figure 30C). Cette bande d'activité est néanmoins de plus faible intensité en comparaison avec BE2.2, elle est donc beaucoup moins active après renaturation.

En conditions natives, plusieurs bandes d'activité sont observées sur zymogramme contenant de l'amylopectine comme substrat (Figure 30D). Nous avons cherché à déterminer si différentes formes de BE2.1 existent en absence de substrat dans le gel comme cela est suggéré par la présence de plusieurs pics sur le profil de migration de BE2.1 par HPLC (Figure 31B). En effet, plusieurs formes sont détectées par coloration au bleu de Coomassie après migration en conditions natives dans un gel ne contenant pas de substrat (Figure 40C). Le caractère diffus des formes détectées (Figure 40C et également Figure 41A et 42A), après coloration au bleu ne permet pas de définir le nombre exact de formes présentes, même si au moins trois d'entre elles sont visibles. Une première forme qui ne pénètre que très peu dans le gel et au moins deux autres formes qui migrent de manière plus importante. Nous avons donc entrepris une étude de l'activité de branchement de ces différentes formes par zymogramme en absence de substrat. L'activité de branchement a été détectée de deux manières : sur zymogramme après incubation dans un tampon contenant la phosphorylase « a » (Figure 40B) et après transfert sur un gel contenant 0,3 % d'amylopectine (Figure 40D). Dans le premier cas, seule une forme de la protéine, correspondant à celle qui ne pénètre que très peu dans le gel est détectée (Figure 40B). Dans le second, seule la forme ayant une migration intermédiaire est active mais de manière très faible (Figure 40D). Il est possible que ces différentes formes protéiques n'aient pas le même niveau d'activité pour le substrat à disposition (linéaire dans le cas du zymogramme avec la phosphorylase « a » ou branché dans le cas du transfert sur un gel contenant de l'amylopectine). Dans ce cas, cela expliquerait que les trois formes ne soient pas visualisées dans les deux cas (Figure 40B et 40D). Il est également possible qu'il y ait eu une perte d'activité lors du transfert (Figure 40D) et/ou que la forme protéique la plus retenue dans le gel ne puisse pas être transférée dans un autre gel ayant la même réticulation et donc ne puisse pas être visualisée.



**Figure 40 : Zymogrammes de BE2.1 purifiée.** (A) Zymogramme amidon en conditions dénaturantes. 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1 purifiée ont été chargés sur un gel de polyacrylamide contenant de l'amidon de pomme de terre comme substrat (à une concentration finale de 0,3 % p/v) et séparés en conditions dénaturantes. Après la migration le gel est rincé trois fois pendant 30 min dans un tampon Tris puis incubé une nuit à température ambiante dans un tampon Tris-Glycine DTT permettant l'activité des BEs. L'activité des enzymes modifiant l'amidon est ensuite révélée par coloration à l'iode. (B) Zymogramme révélant l'activité de branchement. 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1 purifiée sont chargés sur un gel de polyacrylamide (ne contenant pas de substrat) et séparés en conditions natives. A l'issue de la migration, le gel est rincé deux fois 10 min dans un tampon de lavage HEPES-glycérol puis incubé une nuit à température ambiante dans ce tampon auquel est ajouté du G1P, de l'AMP nécessaire à l'action de la phosphorylase « a ». Les glucanes linéaires ainsi produits par la phosphorylase « a » servent de substrat à BE2.1 et les polysaccharides branchés ainsi générés sont alors piégés dans le gel. Ces polymères sont révélés par coloration à l'iode. (C) 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1 sont chargés sur un gel de polyacrylamide et séparés en conditions natives (à gauche). A l'issue de la migration, les protéines sont révélées au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). (D) Transfert de 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1 ayant migré comme décrit en (C) sur un gel de polyacrylamide contenant 0,3 % d'amylopectine de pomme de terre. L'activité des protéines modifiant l'amylopectine est révélée par coloration à l'iode.

### 3.3.1 Détermination de l'affinité de BE2.1 pour différents substrats

L'affinité de BE2.1 purifiée pour différents substrats (amylopectine, amylose et glucanes linéaires A600) a été évaluée par retard sur gel. L'activité de l'enzyme a été visualisée par zymogramme des activités hydrolytiques dans chaque cas présenté ici. Contrairement au zymogramme utilisant la phosphorylase « a », ces derniers sont beaucoup moins résolutifs plus particulièrement lorsque le substrat A600 est additionné au gel.

Lorsque l'amylopectine est utilisée comme substrat, plus la concentration est élevée dans le gel, plus la migration de BE2.1 est retardée (Figure 41A). Néanmoins, si une seule forme est observée en absence de substrat pour BE2.2, BE2.1 en présente plusieurs, indiquées en rouge, bleu clair et bleu

foncé (Figure 41A). Parmi ces trois formes, celles indiquées par une flèche rouge et bleu foncé semblent corrélées avec les formes actives observées Figure 40B et 40D respectivement. L'activité de la troisième forme indiquée en bleu clair (Figure 41A et B) n'est détectée que lorsque l'amylopectine est présente dans le gel. La forme la plus haute dans le gel, très retardée, présente au niveau du gel de concentration, indiquée en rouge (Figure 41A) ne pénètre pas ou très peu dans le gel quel que soit la concentration en amylopectine. Bien qu'elle soit active, il est impossible de mesurer les rapports de migration pour cette forme et donc de déterminer son  $K_s$  pour l'amylopectine. Les deux autres formes indiquées en bleu clair et bleu foncé ont, quant à elles, fait l'objet d'une étude complète ayant permis de déterminer leur  $K_s$  pour l'amylopectine. Le rapport entre les distances de migration de BE2.1 et de la BSA ( $M_r$ ) est mesuré, pour chaque concentration en amylopectine, pour chacune des deux formes de BE2.1 (Figure 41C). Les valeurs de  $K_s$  obtenues sont de  $5,2 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme intermédiaire et  $7,83 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme la moins retardée (indiquées respectivement en bleu clair et bleu foncé (Figure 41C).

La même démarche analytique a été effectuée en utilisant de l'amylose comme substrat (Figure 42). Cette fois encore, au moins trois formes sont observées avec ou sans substrat dans le gel. Ces formes sont plus ou moins retenues dans le gel, et sont indiquées respectivement par des flèches rouge, bleu clair et bleu foncé (Figure 42A). Tout comme dans le cas de l'amylopectine, le retard sur gel de la forme la plus haute dans le gel n'a pu être évalué (en rouge Figure 42A). Les rapports entre les distances de migration de BE2.1 et de la BSA ( $M_r$ ) ont permis de déterminer un  $K_s$  de  $8,17 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme intermédiaire (en bleu clair) et de  $8,73 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour la forme la moins retardée (en bleu foncé). Le retard sur gel observé pour BE2.1 est donc moins prononcé avec l'amylose qu'avec l'amylopectine, indiquant que BE2.1 possède moins d'affinité pour l'amylose.

Le comportement électrophorétique de BE2.1 en présence de glucanes linéaires (A600) a également été évalué. Lorsque le A600 est présent dans le gel, le retard de migration de BE2.1 est très faiblement marqué, même à forte concentration en substrat (0,3 % final). Trois espèces, enzymatiquement actives, sont observées (Figure 43B) : une forme fortement retenue dans le gel indiquée en rouge, une forme qui est la moins retardée et très faiblement active indiquée en bleu foncé et une forme intermédiaire indiquée en orange très retenue dans le gel. La présence d'une quatrième forme, indiquée en bleu clair a pu être visualisée par coloration au bleu de Coomassie mais son activité pour les glucanes linéaires, si elle existe, est trop faible pour être détectée (Figure 43A).

Contrairement à BE2.2, BE2.1 est donc détectée sous plusieurs formes en absence ou en présence de substrats linéaires ou branchés. Ces différentes formes sont présentes en quantité inégale et ont des niveaux d'activités variables voire inexistantes suivant le substrat employé. La forme,

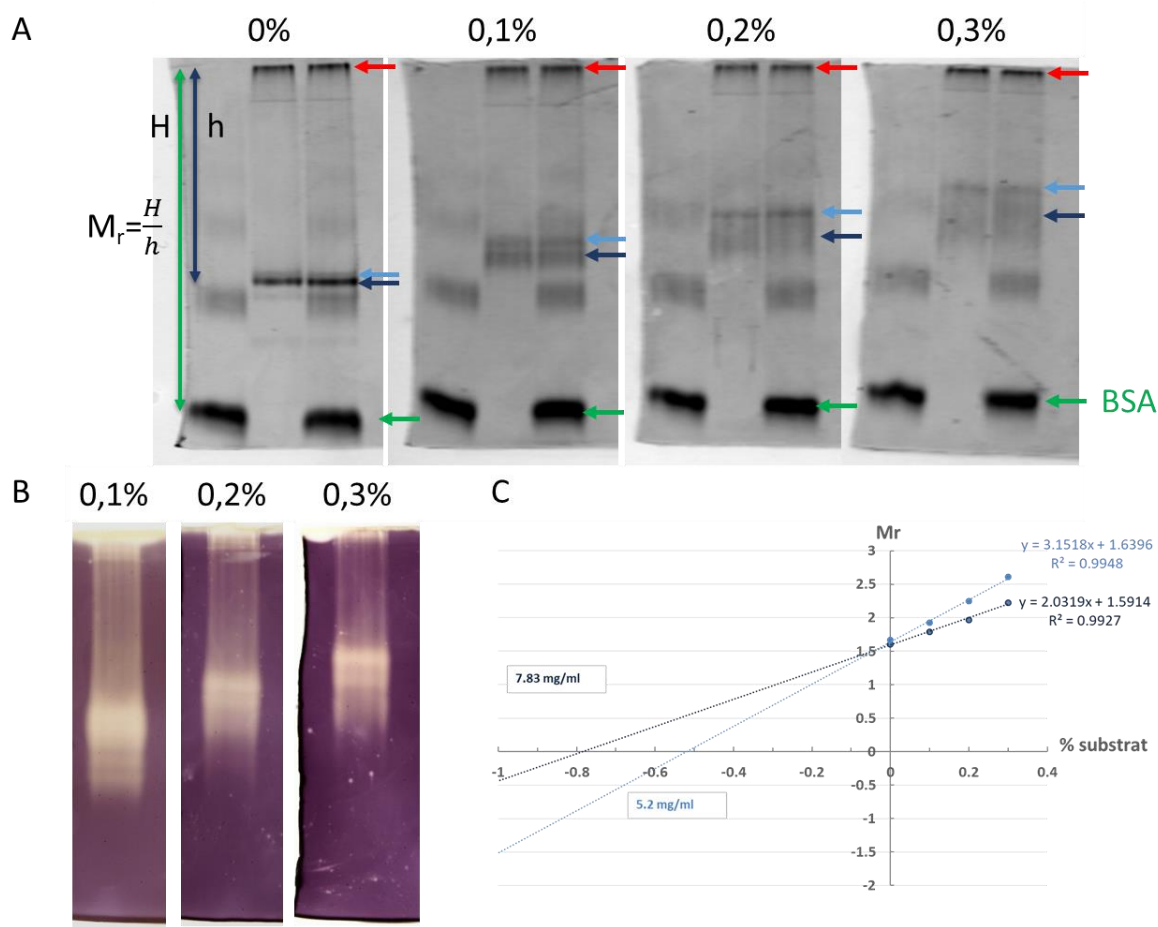
la plus retenue dans le gel n'a pas pu être caractérisée à cause de sa faible mobilité électrophorétique. Cette forme semble corrélée au pic de haut poids moléculaire retrouvé de manière prépondérante dans le profil de migration de BE2.1 (Figure 31B).

Afin de poursuivre l'analyse de cette enzyme de branchement, chaque fraction protéique de BE2.1 pourra être isolée spécifiquement par chromatographie d'exclusion stérique. Leurs activités spécifiques envers divers substrats seront alors analysées par test d'activité spectrophotométrique et par analyse des profils de distribution de longueur de chaîne des produits de réaction de branchement pour évaluer la contribution de chaque forme.

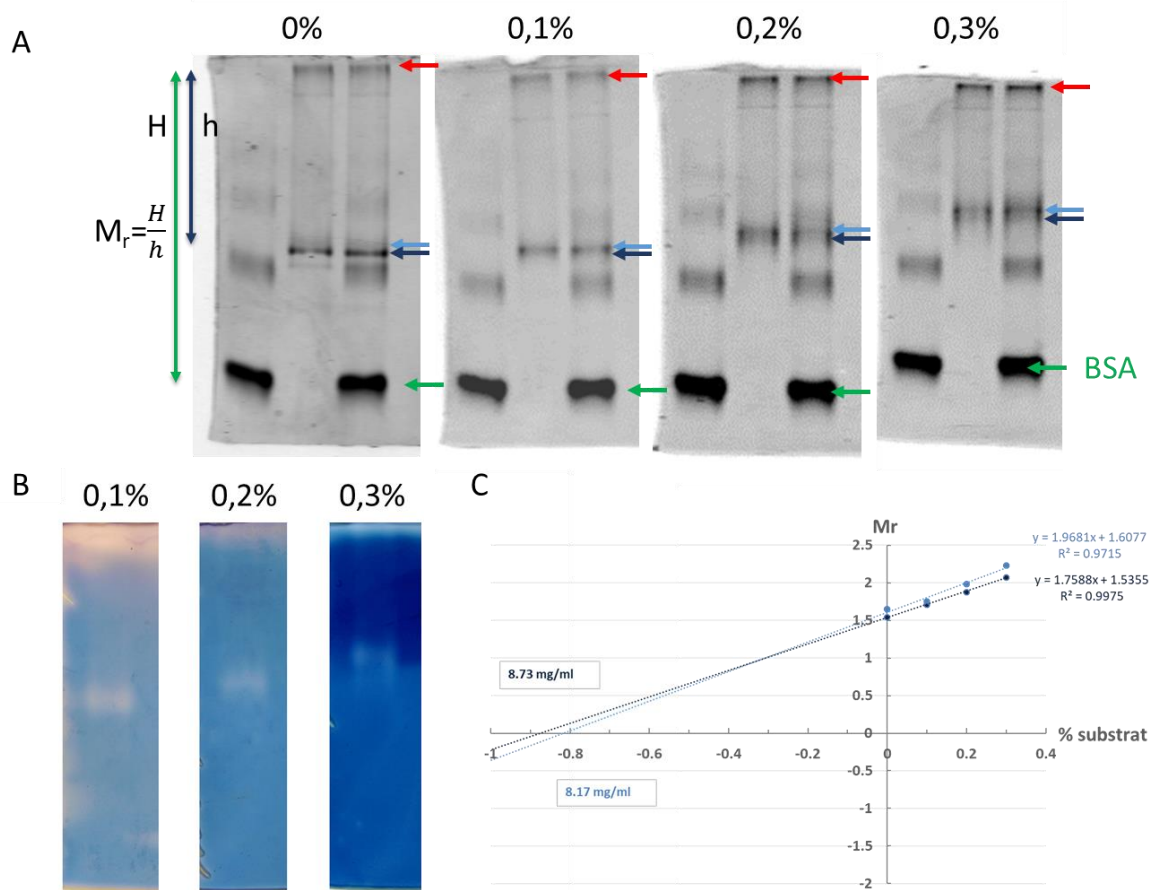
Une analyse par SAXS pourra également être entreprise sur les deux autres pics de BE2.1 observés par HPLC (Figure 31B). Il conviendra alors d'utiliser une colonne d'exclusion stérique permettant la séparation de protéines de très haut poids moléculaire.

Dans le cas des zymogrammes contenant du A600, les mêmes analyses seront réitérées, cette fois en incubant les gels avec la phosphorylase « a » pour déterminer de manière plus précise le nombre de formes actives présentes.

La réticulation des gels ainsi que la quantité de protéines déposées pourront également être modifiées afin de mieux visualiser le nombre de formes présentes et leur séparation en présence de substrat.

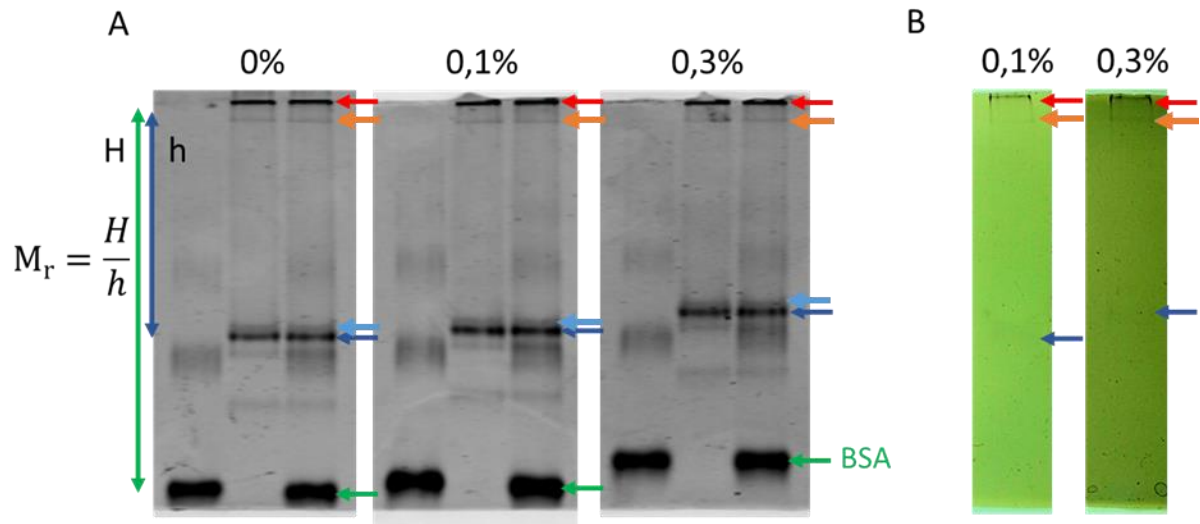


**Figure 41 : Détermination de l'affinité de BE2.1 purifiée pour l'amylopectine.** (A) 2  $\mu$ g de BSA (à gauche), 1,5  $\mu$ g de BE2.1 (au centre) et un mélange de 2  $\mu$ g de BSA et 1,5  $\mu$ g de BE2.1 (à droite) sont chargés sur un gel de polyacrylamide, contenant 0 à 0,3 % d'amylopectine de pomme de terre (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence d'amylopectine dans le gel, cette dernière est utilisée comme standard de migration. Le rapport entre les distances de migration de la BSA et de BE2.1 ( $M_r$ ) est calculé pour les formes de BE2.1 indiquées par une flèche bleu clair et bleu foncé. (B) Zymogramme des activités hydrolytiques de 1,5  $\mu$ g de BE2.1. A l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé à l'eau puis incubé sur la nuit dans du Tris 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et DTT 2 mM, les activités modifiant l'amylopectine sont ensuite révélées par coloration à l'iode (C) Représentation du rapport de migration entre la BSA et BE2.1 ( $M_r$ ) en fonction de la concentration en substrat (%), les valeurs obtenues sont soumises à une régression linéaire. Chaque droite correspond aux valeurs obtenues pour les différentes formes de BE2.1, plus ou moins retenues dans le gel (en bleu clair et bleu foncé respectivement). L'intersection entre la droite de régression et l'axe des abscisses permet d'obtenir la constante d'affinité de BE2.1 pour l'amylopectine ( $K_s$ ). Les valeurs encadrées représentent le  $K_s$  de chaque forme de BE2.1 observée qui sont de 5,2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la forme la plus retenue dans le gel (en bleu clair), et 7,83  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la forme la moins retardée (en bleu foncé).



**Figure 42: Détermination de l'affinité de BE2.1 purifiée pour l'amylose.** (A) 2  $\mu\text{g}$  de BSA (à gauche), 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1 (au centre) et un mélange de 2  $\mu\text{g}$  de BSA et 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1 (à droite) sont chargés sur un gel de polyacrylamide, contenant 0 à 0,3 % d'amylose de pomme de terre (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence d'amylose dans le gel, cette dernière est utilisée comme standard de migration. Le rapport entre les distances de migration de la BSA et de BE2.1 ( $M_r$ ) est calculé pour les formes de BE2.1 indiquées par une flèche bleu clair et bleu foncé. (B) Zymogramme des activités hydrolytiques de 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1. A l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé à l'eau puis incubé sur la nuit dans du Tris 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM et DTT 2 mM, les activités modifiant l'amylose sont ensuite révélées par coloration à l'iode (C) Représentation du rapport de migration entre la BSA et BE2.1 ( $M_r$ ) en fonction de la concentration en substrat (%), les valeurs obtenues sont soumises à une régression linéaire. Chaque droite correspond aux valeurs obtenues pour les différentes formes de BE2.1, plus ou moins retenues dans le gel (en rouge et bleu clair respectivement). L'intersection entre la droite de régression et l'axe des abscisses permet d'obtenir la constante d'affinité de BE2.1 pour l'amylose ( $K_s$ ). Les valeurs encadrées représentent les  $K_s$  de chaque forme de BE2.1 observée qui sont de 8,17  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la forme la plus retenue dans le gel (en rouge), et 8,73  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la forme la moins retardée (en bleu clair).



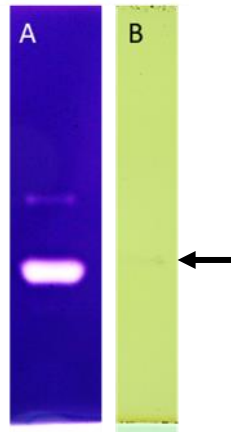


**Figure 43 : Détermination de l'affinité de BE2.1 purifiée pour le A600.** (A) 2  $\mu\text{g}$  de BSA (à gauche), 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1 (au centre) et un mélange de 2  $\mu\text{g}$  de BSA et 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1 (à droite) sont chargés sur un gel de polyacrylamide contenant 0 à 0,3 % de A600 (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées grâce au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence de substrat dans le gel, cette dernière est utilisée comme standard de migration. (B) Zymogramme des activités hydrolytiques de 1,5  $\mu\text{g}$  de BE2.1. A l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé à l'eau puis incubé sur la nuit dans du Tris 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM et DTT 2 mM, les activités modifiant le A600 sont ensuite révélées par coloration à l'iode

### 3.4 Evaluation de l'activité de GlgB par zymogrammes

Les mêmes analyses ont été initiées pour caractériser l'enzyme de branchement GlgB d'*E. coli*. Sur zymogramme amidon, en conditions dénaturantes, (Figure 44A), on distingue la présence de deux formes actives une prépondérante et une moins active plus haute dans le gel. A l'issue de la purification, seule une bande était visible après migration sur gel SDS-PAGE (Figure 30E), ce qui suggère que GlgB puisse être sensible à la congélation. Une optimisation des conditions de conservation de l'enzyme sera nécessaire.

En conditions natives, en revanche, une seule bande d'activité, faiblement marquée, est détectée sur zymogramme en utilisant la phosphorylase « a » (Figure 44B).



**Figure 44 : Zymogrammes de GlgB purifiée.** (A) Zymogramme amidon en conditions dénaturantes. 1,5  $\mu\text{g}$  de GlgB purifié ont été chargés sur un gel de polyacrylamide contenant de l'amidon de pomme de terre comme substrat (à une concentration finale de 0,3 % p/v) et séparés en conditions dénaturantes. Après la migration le gel est rincé trois fois pendant 30 min dans un tampon Tris puis incubé une nuit à température ambiante dans un tampon Tris-Glycine DTT permettant l'activité des BEs. L'activité des enzymes modifiant l'amidon est ensuite révélée par coloration à l'iode. (B) Zymogramme révélant l'activité de branchement. 1,5  $\mu\text{g}$  de GlgB purifié sont chargés sur un gel de polyacrylamide (ne contenant pas de substrat) et séparés en conditions natives. A l'issue de la migration, le gel est rincé deux fois 10 min dans un tampon de lavage HEPES-glycérol puis incubé une nuit à température ambiante dans ce tampon auquel est ajouté du G1P, de l'AMP nécessaire à l'action de la phosphorylase « a ». Les glucanes linéaires ainsi produits par la phosphorylase « a » servent de substrat à GlgB et les polysaccharides branchés ainsi générés sont alors piégés dans le gel. Ces polymères sont révélés par coloration à l'iode.

### 3.4.1 Détermination de l'affinité de GlgB pour différents substrats

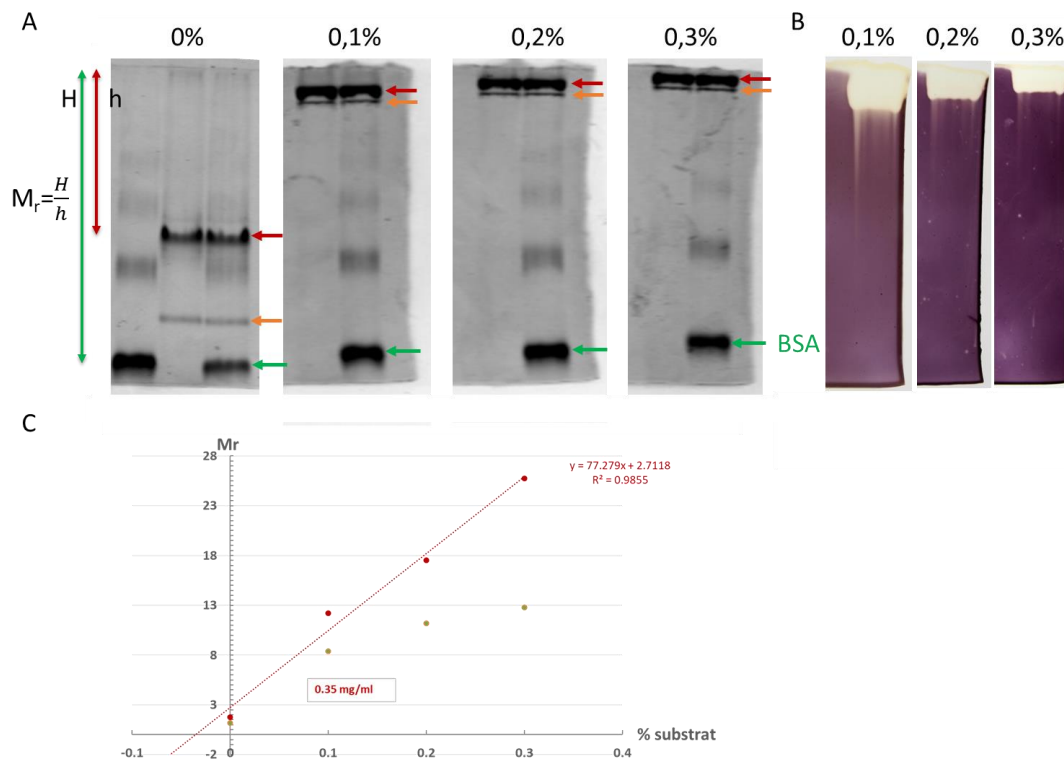
L'affinité de GlgB pour différents substrats (amylopectine, amylose et glucanes linéaires A600) a également été évaluée par une méthode de retard sur gel. Comme dans le cas de BE2.1, l'activité de l'enzyme a été visualisée par zymogramme des activités hydrolytiques.

En absence de substrat, deux bandes sont présentes après coloration au bleu de Coomassie (en rouge et orange, Figure 45A). Lorsque l'amylopectine est additionnée, plus sa concentration est élevée dans le gel, plus la migration de GlgB est retardée (Figure 45A). De plus, les deux formes observées sont retrouvées fortement actives en présence de substrat (Figure 45B). Le rapport entre les distances de migration de GlgB et de la BSA ( $M_r$ ), mesuré pour chaque concentration en amylopectine et pour chacune des deux formes observées, est reporté en figure 45C. Au regard, des rapports de migration obtenus en fonction de la concentration en substrat, seule la forme la plus retardée (en rouge) a un rapport de migration proportionnel à la concentration en substrat dans le gel. Le  $K_s$  déterminé pour cette forme est de  $0,35\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . La forme indiquée en orange (Figure 45A)

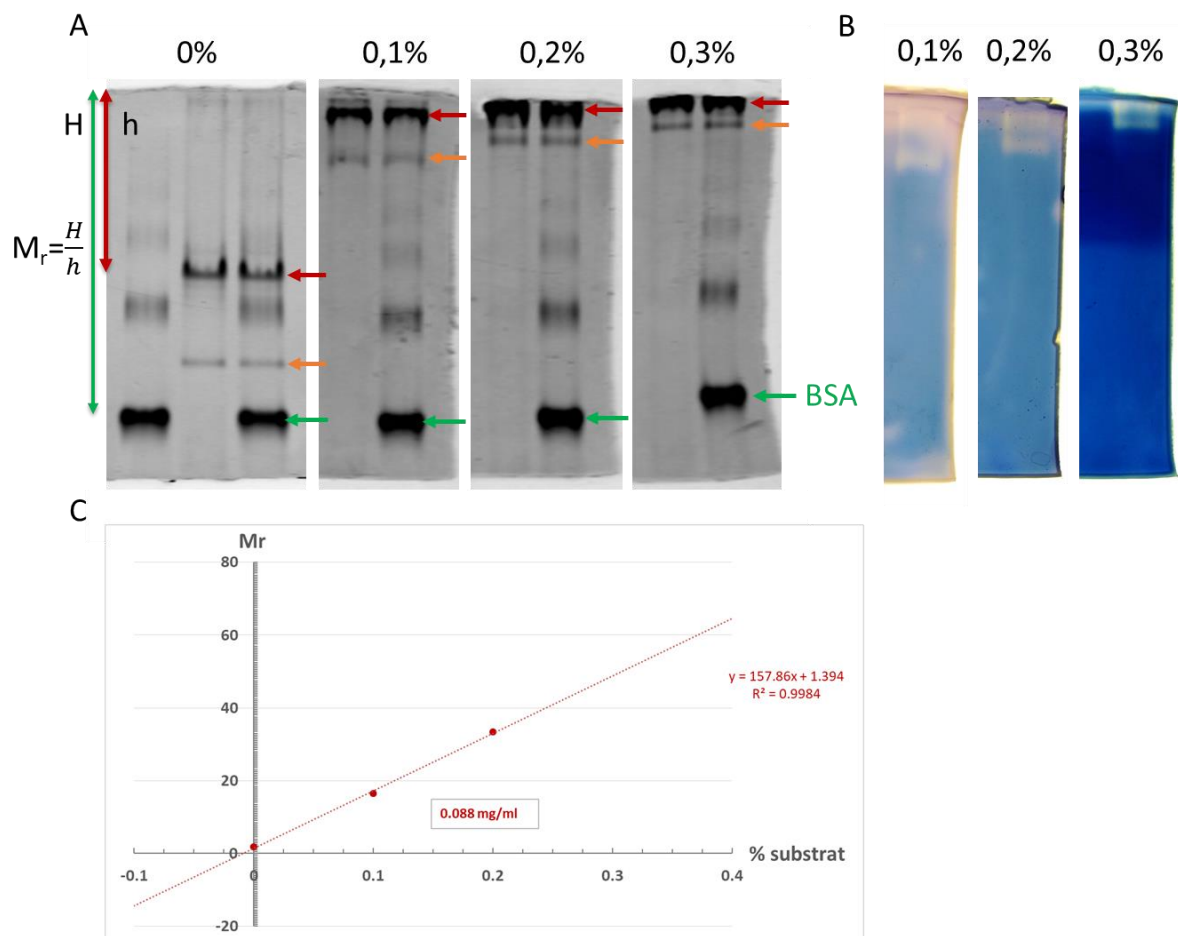
correspond donc probablement à un produit de dégradation de l'enzyme apparu au cours du temps, nous ne l'avons donc pas considérée dans la suite de l'étude.

La même démarche analytique a été effectuée en utilisant de l'amylose comme substrat (Figure 46). Cette fois encore, GlgB se trouve fortement retenue (indiquée en rouge Figure 46A) et active (Figure 46B) quand la présence de substrat augmente dans le gel. Les rapports de migration de GlgB obtenus ont été reportés en figure 46C et ont permis de déterminer un  $K_s$  de  $0,088 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour l'amylose (le rapport de migration pour le gel contenant 0,3 % d'amylose n'a pas pu être mesuré car l'enzyme ne pénètre pas suffisamment dans le gel), le  $K_s$  obtenu pour GlgB est plus élevé avec l'amylopectine qu'avec l'amylose, ce résultat suggère donc que l'enzyme a plus d'affinité pour l'amylose.

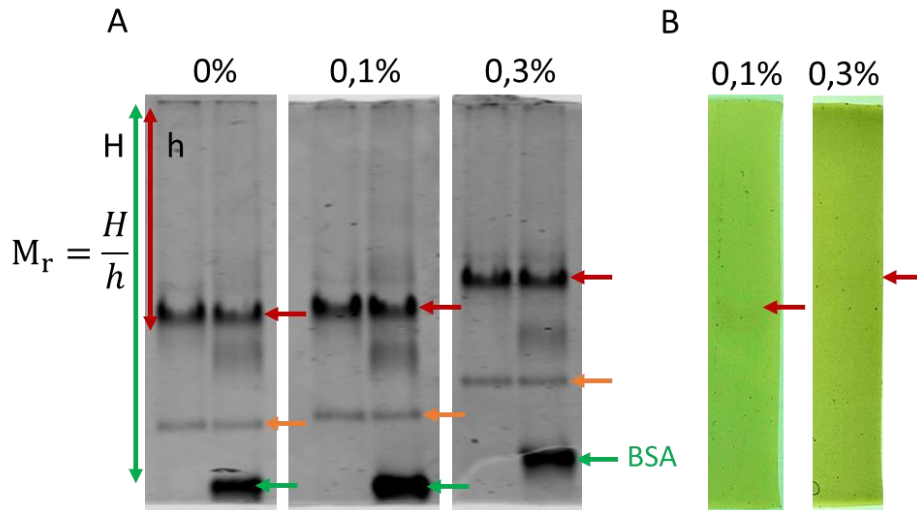
Le comportement électrophorétique de GlgB en présence de glucanes linéaires (A600) a également été évalué. Lorsque le A600 est présent dans le gel, le retard de migration de GlgB (indiqué en rouge Figure 47A) est très faiblement marqué, même à forte concentration en substrat (0,3% final) traduisant une faible affinité de l'enzyme sur ce substrat. Bien qu'active sur les substrats linéaires (également montré Figure 44B), le niveau d'activité de l'enzyme sur le substrat A600 (Figure 47B) est très faible.



**Figure 45 : Détermination de l'affinité de GlgB purifiée pour l'amylopectine.** (A) 1,5  $\mu\text{g}$  de GlgB (à gauche) et un mélange de 2  $\mu\text{g}$  de BSA et 1,5  $\mu\text{g}$  de GlgB (à droite) sont chargés sur un gel de polyacrylamide contenant 0 à 0,3 % d'amylopectine (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées grâce au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence de substrat dans le gel, cette dernière est utilisée comme standard de migration. (B) Zymogramme des activités hydrolytiques de 1,5  $\mu\text{g}$  de GlgB. A l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé à l'eau puis incubé sur la nuit dans du Tris 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM et DTT 2 mM, les activités modifiant le A600 sont ensuite révélées par coloration à l'iode (C) Représentation du rapport de migration entre la BSA et GlgB ( $M_r$ ) en fonction de la concentration en substrat (%), les valeurs obtenues sont soumises à une régression linéaire. La droite correspond aux valeurs obtenues pour GlgB (en rouge). L'intersection entre la droite de régression et l'axe des abscisses permet d'obtenir la constante d'affinité de GlgB pour l'amylopectine ( $K_s$ ), d'une valeur de  $0,35 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



**Figure 46 : Détermination de l'affinité de IgG purifiée pour l'amylose.** (A) 1,5 µg de IgG (à gauche) et un mélange de 2 µg de BSA et 1,5 µg de IgG (à droite) sont chargés sur un gel de polyacrylamide contenant 0 à 0,3 % d'amylose (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées grâce au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence de substrat dans le gel, cette dernière est utilisée comme standard de migration. (B) Zymogramme des activités hydrolytiques de 1,5 µg de IgG. A l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé à l'eau puis incubé sur la nuit dans du Tris 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et DTT 2 mM, les activités modifiant le A600 sont ensuite révélées par coloration à l'iode



**Figure 47 : Détermination de l'affinité de GlgB purifiée pour le A600.** (A) 1,5  $\mu$ g de GlgB (à gauche) et un mélange de 2  $\mu$ g de BSA et 1,5  $\mu$ g de GlgB (à droite) sont chargés sur un gel de polyacrylamide contenant 0 à 0,3 % de A600 (en concentration finale) et séparés en conditions natives. Après la migration, chaque gel est rincé à l'eau puis les protéines du gel sont colorées grâce au bleu de Coomassie (InstantBlue™, expedeon). Comme la migration de la BSA n'est pas affectée par la présence de substrat dans le gel, cette dernière est utilisée comme standard de migration. (B) Zymogramme des activités hydrolytiques de 1,5  $\mu$ g de GlgB. A l'issue de la migration (décrite en A), chaque gel est lavé à l'eau puis incubé sur la nuit dans du Tris 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et DTT 2 mM, les activités modifiant le A600 sont ensuite révélées par coloration à l'iode

#### 4. Détermination des paramètres cinétiques des BEs d'*A. thaliana* et de la GlgB d'*E. coli*

Les paramètres cinétiques des BEs ont été déterminés *in vitro* grâce à un test spectrophotométrique qui permet de suivre de manière indirecte la réaction de branchement au cours du temps par la mesure de l'absorbance, à 660 nm. Cette longueur d'onde correspond au maximum d'absorption du complexe iode-amylose. Sous l'action d'une enzyme de branchement, des liaisons  $\alpha$ -1,4 O-glucosidiques du substrat sont clivées puis les glucanes libérés sont branchés par création d'une liaison  $\alpha$ -1,6. Cette réaction se traduit par la réduction de la longueur moyenne des glucanes et donc par une diminution de l'absorbance mesurée. Les données obtenues nous permettent de déterminer l'activité spécifique (AS) de l'enzyme. Ces mesures de l'activité spécifique effectuées à différentes températures d'incubation ou en faisant varier le pH du tampon de réaction permettent de déterminer la température et le pH optimal de l'enzyme (Figures 48, 49 et 50).

Pour BE2.2, les AS atteignent un maximum à pH 7 et à une température d'incubation de 25°C (Figure 48A et 48B). Ces paramètres sont légèrement différents pour la seconde isoforme d'enzyme de branchement d'*Arabidopsis*. En effet, les AS de BE2.1 sont optimales à pH 6,5 et 20°C (Figures 49A

et 49B). Dans le cas de l'enzyme bactérienne, GlgB possède une activité maximale à pH 7,5 et 37°C (Figures 50A et 50B).

Les AS à différentes concentrations en amylose (Figures 48C et 49C et 50C) ou amylopectine (Figures 48D et 49D) ont également été évaluées. Dans le cas du substrat amylopectine, les AS ont été déterminées en suivant la diminution de l'absorbance du complexe iode-polysaccharide, à une longueur d'onde fixée à 540 nm, car elle correspond au maximum d'absorption du complexe iode-amylopectine.

✚ Lorsque l'activité enzymatique est modulée uniquement par la concentration en substrat alors l'enzyme est dite Michaélienne. Pour ce type d'enzyme, la courbe de représentation de l'AS en fonction de la concentration en substrat s'ajuste à une hyperbole d'équation :

$$AS = \frac{AS_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

AS et  $AS_{max}$  : activité spécifique et activité spécifique maximale

S : concentration en substrat

$K_M$  : concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de sa valeur maximale

C'est ce qui a été observé dans le cas de l'étude de GlgB d'*E. coli*. En effet, la courbe de représentation des AS obtenue à différentes concentrations en amylose s'ajuste à une hyperbole (Figure 50C). L'enzyme Michaélienne possède un  $K_M$  de 11,83 mg.ml<sup>-1</sup> pour ce substrat. Ce type de comportement a déjà été observé pour l'enzyme de branchement bactérienne de *Rhodothermus obamensis* (Roussel, Lancelon-Pin et al. 2013), néanmoins le  $K_M$  pour le substrat amylose de cette dernière est beaucoup plus faible 0,7 mg.ml<sup>-1</sup>.

✚ Pour une enzyme non Michaélienne, la courbe de représentation de l'AS en fonction de la concentration en substrat n'est pas une hyperbole mais une sigmoïde comme dans le cas des enzymes de branchement d'*A. thaliana*. En effet, les valeurs des AS obtenues à différentes concentrations en amylose ou amylopectine s'ajustent à des sigmoïdes, suivant l'équation de Hill:

$$AS = \frac{AS_{max} \times [S]^h}{K_{0.5}^h + [S]^h}$$

AS et  $AS_{max}$  : activité spécifique et activité spécifique maximale

S : concentration en substrat

h : nombre de Hill

$K_{0.5}$  : pour des enzymes non Michaélienne, le terme  $K_{0.5}$  plutôt que  $K_M$  est employé, il correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de sa valeur maximale

Lorsque la liaison au substrat (ou à un ligand) impacte l'affinité de l'enzyme, on parle alors de coopérativité. Le nombre de Hill (h) évalue cette coopérativité. Lorsque h est supérieur à 1, il s'agit de coopérativité positive, ce qui correspond à une augmentation de l'affinité. Si h est égal à 1, on se retrouve dans le cas d'une cinétique Michaélienne, il n'y a pas de coopérativité. Dans le cas où h est inférieur à 1, la coopérativité est négative et se caractérise par une diminution de l'affinité. Dans le cas, des enzymes de branchement d'A. *thaliana*, une coopérativité positive est observée en présence de substrat.

Le  $K_{0.5}$  de BE2.2 déterminé sur le substrat amylose (Figure 48C), de  $1,53 \text{ mg.ml}^{-1}$ , est plus élevé que celui obtenu pour l'amylopectine (Figure 48D), de  $1,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Ces résultats attestent que BE2.2 a plus d'affinité pour l'amylopectine que pour l'amylose et concordent avec les valeurs de  $K_s$  déterminées précédemment.

De la même manière, le  $K_{0.5}$  de BE2.1 pour le substrat amylose (Figure 49C), de  $1,68 \text{ mg.ml}^{-1}$ , est plus élevé que celui obtenu pour l'amylopectine, de  $1,27 \text{ mg.ml}^{-1}$  (Figure 49D). Comme BE2.2, BE2.1 est plus affine pour l'amylopectine que l'amylose.

Les  $K_{0.5}$  obtenus pour BE2.2 et BE2.1, sont en accord avec les valeurs de  $K_s$  déterminées précédemment et reflète une plus grande affinité des deux enzymes pour l'amylopectine plutôt que l'amylose.

Chaque BE est présente sous plusieurs formes que ce soit en présence d'amylose ou d'amylopectine, chacune de ces formes possède une affinité plus ou moins forte pour le substrat. Les valeurs de  $K_{0.5}$  déterminées ici rendent compte de la contribution des différents états protéiques observés suivant leur abondance relative. Ainsi, pour BE2.2, les  $K_{0.5}$  sont proches des valeurs de  $K_s$  déterminées pour la forme la plus retenue dans le gel.

Au regard des valeurs de  $K_s$  très élevées pour les deux formes de BE2.1 observées et, quel que soit le substrat utilisé, il semble que la contribution de la forme la plus retenue soit également la plus abondante et la plus active et soit responsable des faibles valeurs de  $K_{0.5}$  obtenus ici.

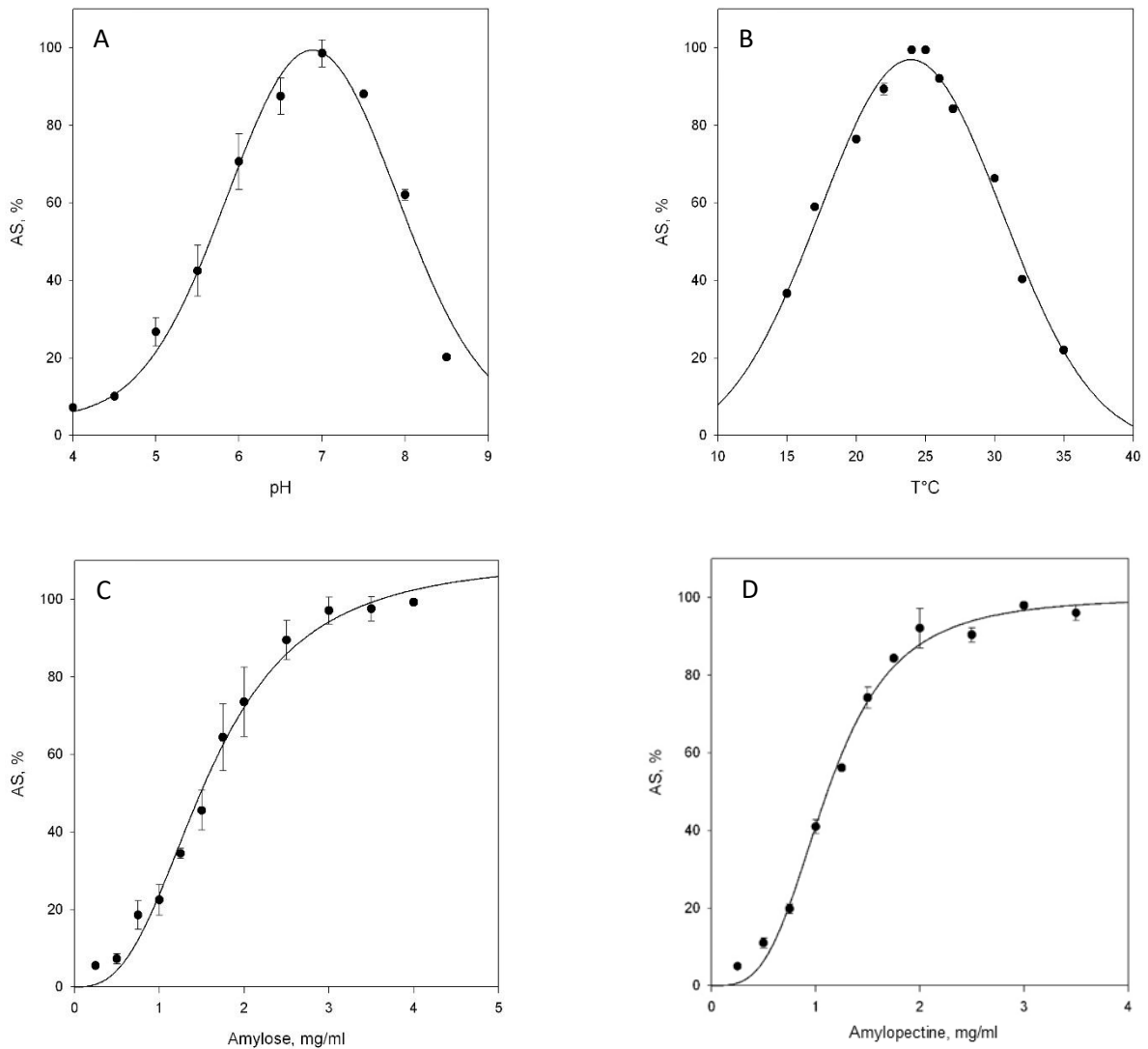
Dans le cas de GlgB, le  $K_s$  déterminé pour le substrat amylose est très faible, attestant d'une grande affinité de l'enzyme pour celui-ci. Néanmoins, le  $K_M$  obtenu pour le substrat amylose est très élevé. Il est possible que cette trop forte affinité pour le substrat diminue la catalyse et soit responsable d'une faible efficacité catalytique.



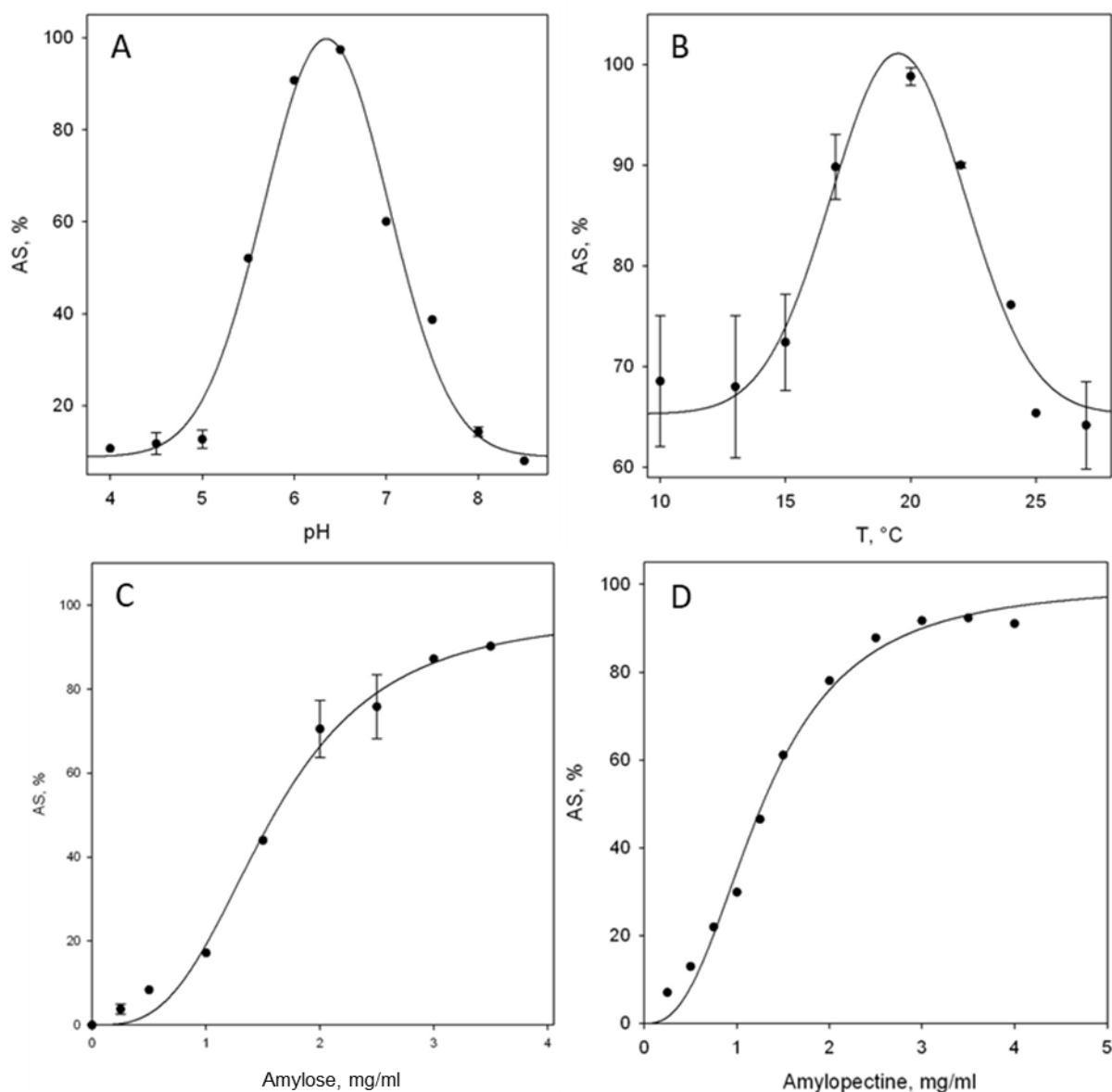
**Table 4 : Récapitulatif des constantes d'affinité déterminées pour les enzymes de branchement d'*A.thaliana* et de *GlgB* d'*E. coli* :**

	amylose		amylopectine	
	$K_{0,5}$ en mg.ml <sup>-1</sup> , (h)	Ks en mg.ml <sup>-1</sup>	$K_{0,5}$ en mg.ml <sup>-1</sup> , (h)	Ks en mg.ml <sup>-1</sup>
BE2.2	1,53, (2,8)	1,81-5,82-9.65	1,1, (3,4)	0,71-1,73-3,28
BE2.1	1,68 (2,7)	8,17-9,73	1,27, (2,6)	5,2-7,83
GlgB	$K_M$ 11,83mg.ml <sup>-1</sup>	0,088	Non déterminé	0,35

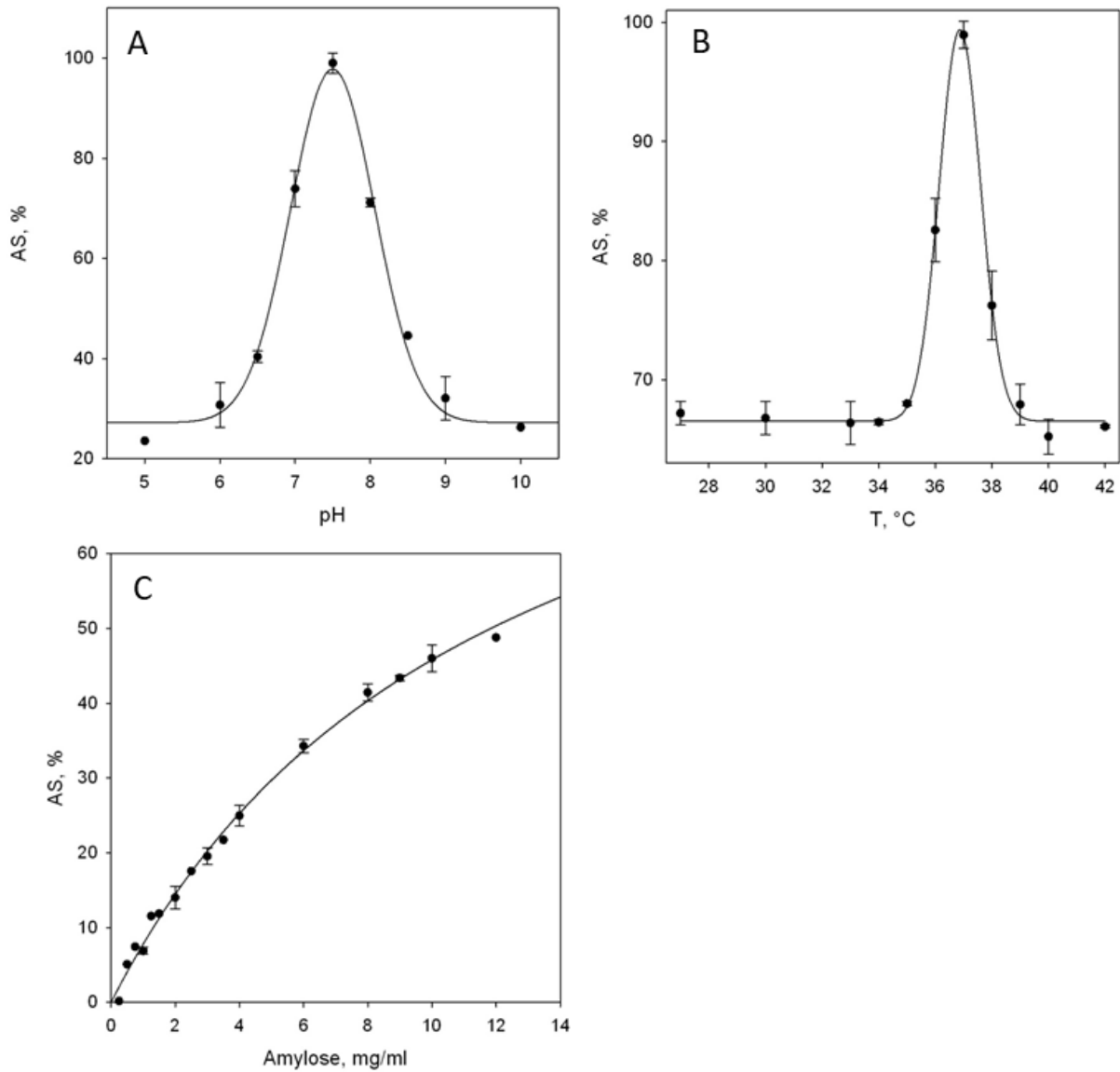
\* les différentes mesures de Ks, indiquées en rouge, bleu clair et bleu foncé correspondent aux valeurs obtenues pour les différentes formes observées sur gel : la forme la plus retardée (quand celle-ci a pu être mesurée), la forme intermédiaire et la forme la moins retardée respectivement, le code couleur est le même que celui utilisé en figures 37, 38, 41 et 42.



**Figure 48 : Détermination des paramètres enzymatiques de BE2.2.** L'activité enzymatique est mesurée par suivi spectrophotométrique (Boyer and Preiss 1978). Ce test est basé sur la diminution d'absorbance à 660 nm ou 540 nm, du complexe iode-polysaccharide, induit respectivement par la réaction de branchement de l'amylose de pomme de terre de type III ou l'amylopectine de pomme de terre. Une unité enzymatique est définie comme la diminution d'une unité d'absorbance par minute. (A) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant 3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose dans un tampon Tris-HCl 120 mM, acide acétique 30 mM et imidazole 30 mM (ajusté de pH 4 à 8,5), et 2  $\mu$ g de BE2.2 sont incubés à 25°C. L'activité spécifique maximale ( $AS_{\text{max}}$ ) est observée à pH 7. (B) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant 3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM à pH 7, et 2  $\mu$ g de BE2.2 sont incubés de 15 à 35°C. L'  $AS_{\text{max}}$  est observée à 25°C. (C and D) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant de 0,25 à 4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose (C) ou d'amylopectine (D) dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM à pH 7, et 2  $\mu$ g de BE2.2 sont incubés à 25°C. L'ajustement des points expérimentaux à une sigmoïde, selon l'équation de Hill ( $h=2,8$  pour l'amylose et 3,4 pour l'amylopectine), permet d'en déduire les paramètres cinétiques de BE2.2, les  $K_{0,5}$  obtenus sont de 1,53 et 1,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour l'amylose et l'amylopectine respectivement.



**Figure 49 : Détermination des paramètres enzymatiques de BE2.1.** L'activité enzymatique est mesurée par suivi and spectrophotométrique (Boyer and Preiss 1978). Ce test est basé sur la diminution d'absorbance à 660 nm ou 540 nm, du complexe iode-polysaccharide, induit respectivement par la réaction de branchement de l'amylose de pomme de terre de type III ou l'amylopectine de pomme de terre. Une unité enzymatique est définie comme la diminution d'une unité d'absorbance par minute. (A) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant 3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose dans un tampon Tris-HCl 120 mM, acide acétique 30 mM et imidazole 30 mM (ajusté de pH 4 à 8,5), et 3  $\mu$ g de BE2.1 sont incubés à 20°C. L' $AS_{\text{max}}$  est observée à pH 6,5. (B) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant 3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM à pH 6,5, et 3  $\mu$ g de BE2.1 sont incubés de 10 à 27°C. L' $AS_{\text{max}}$  est observée à 20°C. (C and D) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant de 0,25 à 4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose (C) ou d'amylopectine (D) dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM à pH 6,5, et 3  $\mu$ g de BE2.1 sont incubés à 20°C. L'ajustement des points expérimentaux à une sigmoïde, selon l'équation de Hill ( $h=2,7$  pour l'amylose et 2,6 pour l'amylopectine), permet d'en déduire les paramètres cinétiques de BE2.1, les  $K_{0,5}$  obtenus sont de 1,68 et 1,28  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour l'amylose et l'amylopectine respectivement.

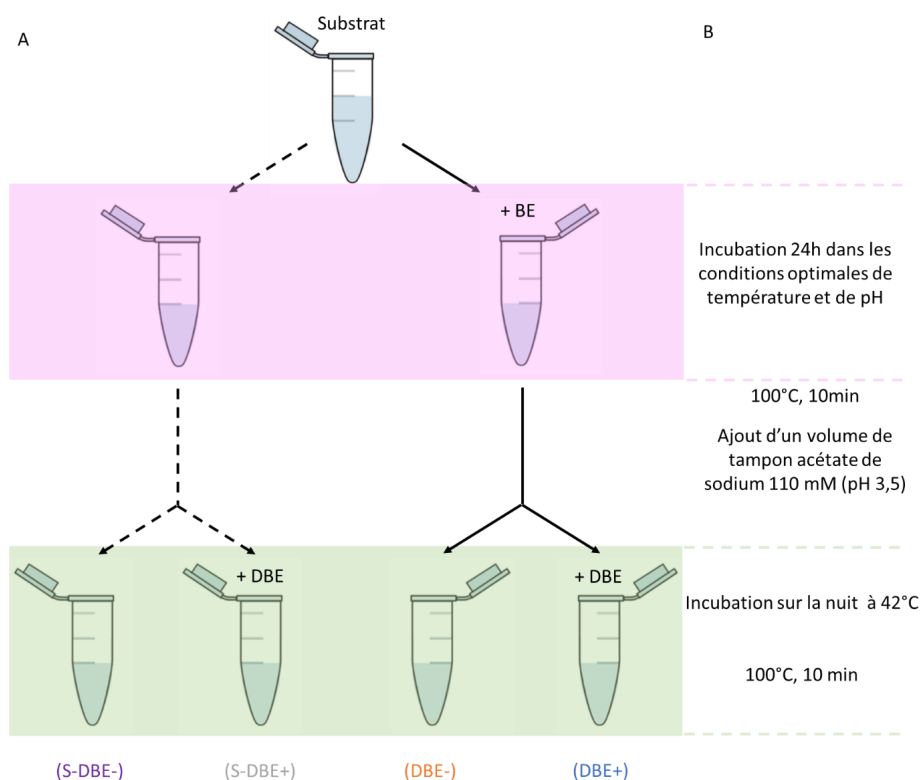


**Figure 50 : Détermination des paramètres enzymatiques de GlgB.** L'activité enzymatique est mesurée par suivi spectrophotométrique (Boyer and Preiss 1978). Ce test est basé sur la diminution d'absorbance à 660 nm, du complexe iode-polysaccharide, induit respectivement par la réaction de branchement de l'amylose de pomme de terre de type III. Une unité enzymatique est définie comme la diminution d'une unité d'absorbance par minute. (A) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant 3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose dans un tampon Tris-HCl 120 mM, acide acétique 30 mM et imidazole 30 mM (ajusté de pH 5,5 à 9), et 15  $\mu$ g de GlgB sont incubés à 37°C. L'activité spécifique maximale (AS) est observée à pH 7,5. (B) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant 3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM à pH 7,5, et 15  $\mu$ g de GlgB sont incubés de 17 à 42°C. L'activité spécifique maximale (AS) est observée à 37°C. (C et D) 280  $\mu$ l d'un mélange contenant de 1 à 12  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'amylose (C) dans un tampon phosphate 50 mM, NaCl 50 mM à pH 7,5, et 15  $\mu$ g de GlgB sont incubés à 37°C. L'ajustement des points expérimentaux à une hyperbole permet d'en déduire le  $K_M$  de GlgB pour l'amylose qui est de 11,83  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

## 5. Caractérisation des substrats donneurs et des chaînes transférées par les BEs

L'analyse des produits obtenus après réaction des différentes BEs avec des substrats glucaniques linéaires ou branchés permet de visualiser les modifications du substrat induites par les BEs. La comparaison de la distribution de longueur de chaîne des substrats avant et après réaction de branchement permet ainsi de déterminer la taille minimale de la chaîne glucanique utilisée comme substrat et la longueur des chaînes transférées.

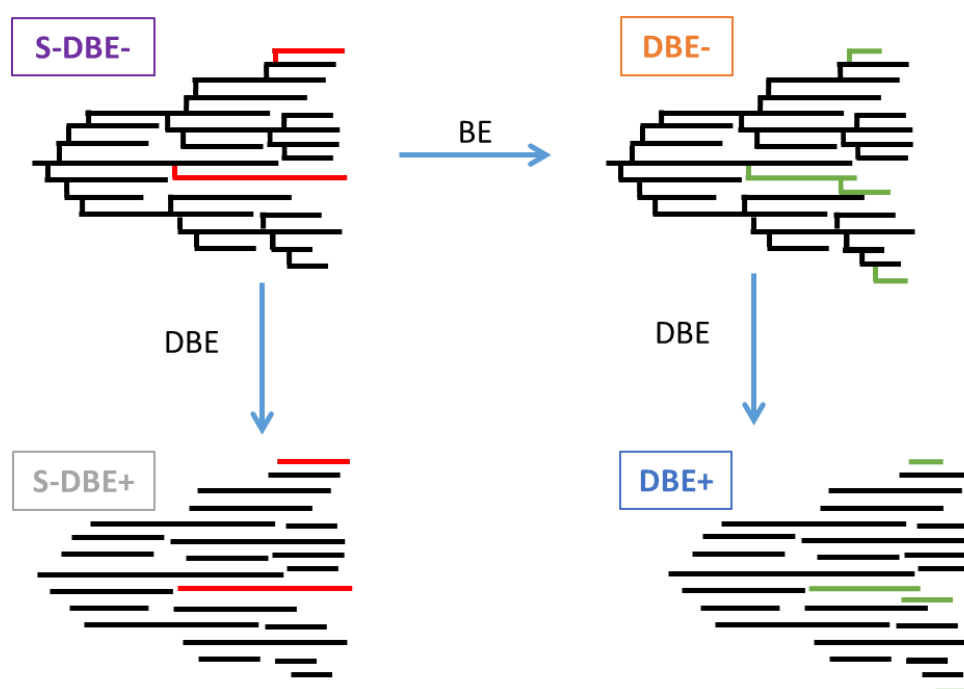
Pour cela, chaque substrat est soumis à l'action d'une unité de BE (déterminée par spectrophotométrie sur le substrat amylose) durant 24h, dans ses conditions optimales de température et de pH. La réaction est ensuite stoppée par chauffage puis l'échantillon est divisé en deux. Une partie n'est pas soumise au débranchement enzymatique, l'autre est incubée avec un cocktail d'enzymes de débranchement qui permet d'hydrolyser l'ensemble des liaisons  $\alpha$ -1,6 (la stratégie expérimentale exposée dans la partie *matériels et méthodes* et rappelée en figure 51).



**Figure 51 : Représentation schématique du protocole expérimental permettant l'obtention des polysaccharides modifiés ou non sous l'action d'une BE.** (A) Traitement du substrat non soumis à une BE (indiqué par des flèches brisées) ou soumis à l'action d'une enzyme de branchement (indiqué par des flèches pleines). En couleur, au bas de la figure, sont spécifiés les différents échantillons obtenus. Ils seront ensuite analysés par HPAEC-PAD. (B) Les conditions expérimentales communes à chaque étape.

L'analyse des produits obtenus après réaction des différentes BEs avec des substrats glucaniques linéaires ou branchés est effectuée par chromatographie échangeuse d'anions à haut pH avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD). Cette technique sépare les glucanes selon leur degré de polymérisation, ce qui permet d'obtenir la distribution de longueur de chaîne (DLC) d'un mélange polydispense. Cette analyse permet de déterminer la taille minimale de la chaîne de glucose utilisée comme substrat et la longueur des chaînes transférées. L'action des BEs sur les différents polysaccharides utilisés comme substrat induit la création de liaisons  $\alpha$ -1,6. Les produits de la réaction sont analysés par HPAEC-PAD avant (DBE-) et après (DBE+) clivage des liaisons  $\alpha$ -1,6. Les différents profils DLC obtenus peuvent ensuite être comparés par analyse différentielle permettant ainsi de déterminer quels glucanes ont été consommés et quels sont ceux qui ont été créés au cours de la réaction de branchement.

Le substrat est également soumis aux enzymes de débranchement. Dans le cas d'un substrat branché, le profil de DLC du substrat après débranchement enzymatique (S-DBE+) est utilisé comme témoin et comparé au produit de réaction qui aura été débranché (DBE+) (Figure 52).



**Figure 2 : 52 : Représentation schématique de l'amylopectine modifiée ou non sous l'action d'une BE.** Représentation schématique de l'amylopectine avant (S-DBE-) et après débranchement enzymatique (S-DBE+) et de l'amylopectine ayant été soumise à la réaction de branchement par une BE, avant (DBE-) et après l'action des enzymes de débranchement (DBE+). En rouge et en vert sont représentées les chaînes glucaniques modifiées par les BE avant et après réaction de branchement respectivement.

## 5.1 Caractérisation des substrats donneurs et des chaînes transférées par BE2.2

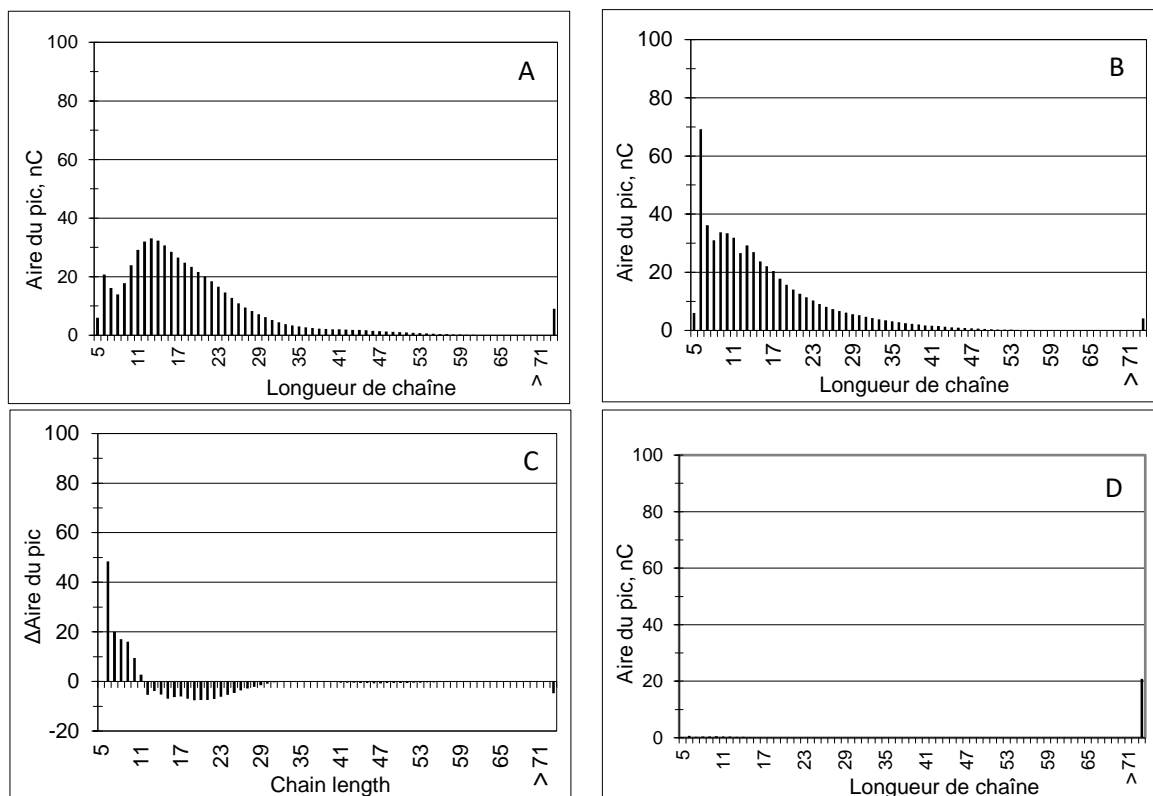
### 5.1.1 Action de BE2.2 sur l'amylopectine

Le profil de DLC de l'amylopectine débranchée (S-DBE+) (Figure 53A) est comparé à celui des produits de réaction de BE2.2 ayant subi un débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 53B). Lorsque des différences dans la distribution de longueur de chaîne, entre ces deux profils, sont observées ; elles résultent de la modification du substrat par l'enzyme de branchement et attestent donc que la réaction a bien eu lieu. Ces profils peuvent donc être comparés par une analyse différentielle : La différence entre les profils de DLC des produits de réaction de BE2.2 débranchés (DBE+) et de l'amylopectine débranchée(S-DBE+) est présentée en figure 53C. Dans ce différentiel, les valeurs négatives correspondent aux glucanes ayant été consommés au cours de la réaction et permettent donc de déterminer la taille minimale du substrat donneur. Les valeurs positives correspondent quant à elles aux glucanes créés durant la réaction.

Les glucanes de  $DP \geq 12$  sont représentés par des valeurs négatives. Cela suggère que ces glucanes ont été utilisés comme substrat donneur par BE2.2. La taille minimale du substrat nécessaire à l'action de branchement par BE2.2 est donc un substrat constitué d'au moins 12 résidus de glucose. Dans ce même différentiel (Figure 53C), les glucanes de  $DP < 12$  correspondent aux glucanes créés au cours de la réaction de branchement. Parmi ces glucanes, ceux de DP 6 sont fortement augmentés après réaction de BE2.2. Le nombre de glucanes de DP 7-11 augmente également après réaction mais dans une moindre mesure en comparaison au DP 6. Ces glucanes courts (de DP 6-11) peuvent être directement issus du transfert par BE2.2 ou résulter d'un raccourcissement de glucanes plus long, qui s'accumulent au cours de la réaction car ils ne peuvent plus être utilisés comme substrat donneur.

Il a été démontré que certaines enzymes de branchement, comme la BE de *Rhodothermus obamensis* (Roussel, Lancelon-Pin et al. 2013) peuvent, lorsqu'elles sont incubées avec de l'amylopectine, conduire à la libération de glucanes de faible DP. Ces glucanes libérés correspondent soit à une réaction de cyclisation (le glucane est branché sur lui-même et une partie de la chaîne glucanique est libérée/hydrolysée), soit à une hydrolyse (une molécule d'eau devient acceptrice de la réaction) et dans ce cas, l'enzyme fonctionne comme une endo-amylase.

Le profil de DLC des produits de réaction de BE2.2 sans étape de débranchement (DBE-), présenté (Figure 53D), montre qu'aucun glucane court n'est donc libéré au cours de la réaction de branchement. Il n'y a donc pas de réaction de cyclisation, ni d'hydrolyse comme cela a été observé dans le cas de *Rhodothermus obamensis*.

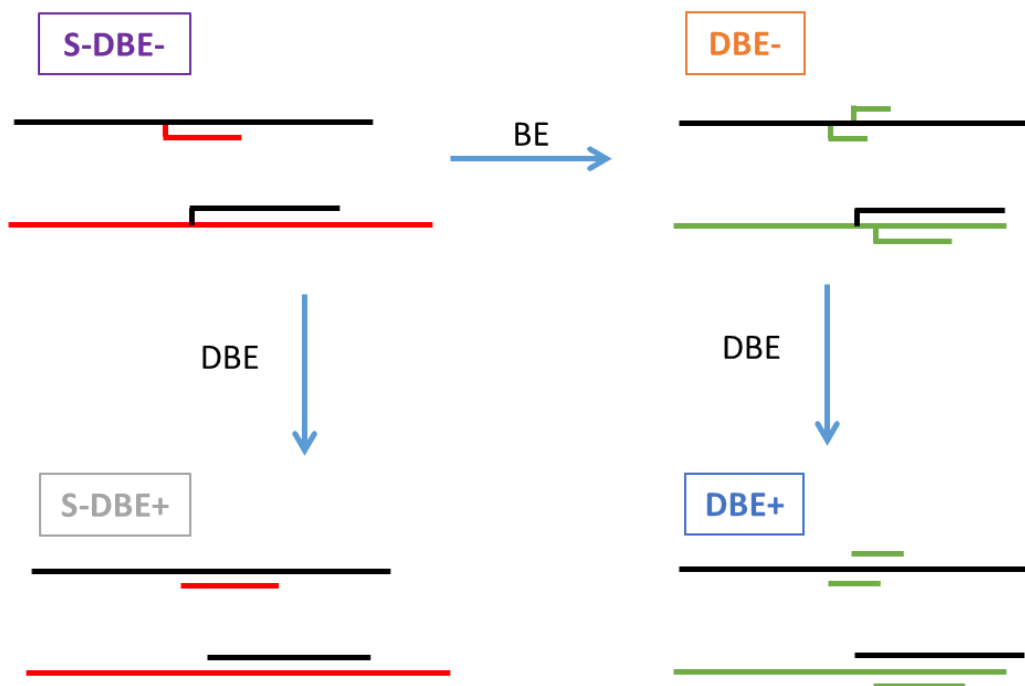


**Figure 53 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) de l'amylopectine de pomme de terre avant et après réaction de branchement par BE2.2.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC de l'amylopectine native après débranchement enzymatique (S-DBE+). (B) DLC de l'amylopectine incubée avec 1U de BE2.2 durant 24 h à 25°C pH 7 et soumise à un débranchement enzymatique (DBE+). (C) Différence entre les profils de DLC de l'amylopectine incubée avec BE2.2 puis débranchée (B) et l'amylopectine native débranchée (A) (profil B – profil A). (D) DLC de l'amylopectine incubée avec 1U de BE2.2 durant 24 h à 25°C pH 7 sans débranchement enzymatique (DBE-).

### 5.1.2 Action de BE2.2 sur l'amylose

La même démarche analytique a été effectuée, en utilisant cette fois l'amylose comme substrat de la réaction de branchement (Figure 54). L'amylose est constituée de longues chaînes de glucose liés en  $\alpha$ -1,4 et possédant peu de ramifications (moins de 1% de liaisons  $\alpha$ -1,6).



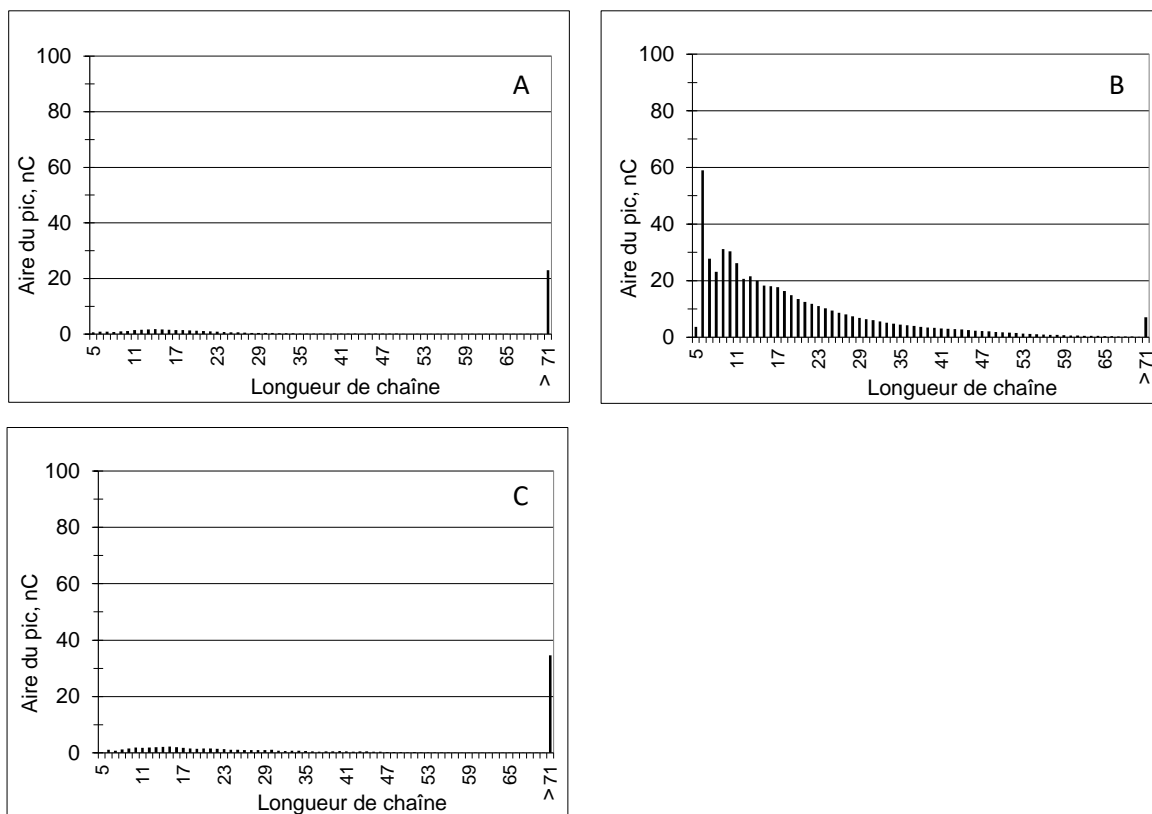


**Figure 54: Représentation schématique de l'amylose modifiée ou non sous l'action d'une BE.** Représentation schématique, de l'amylose avant (S-DBE-) et après débranchement enzymatique (S-DBE+) et de l'amylose ayant été soumise à la réaction de branchement par une BE (DBE-) puis soumise à l'action des enzymes de débranchement (DBE+). En rouge et en vert sont représentées les chaînes glucaniques modifiées par les BEs avant et après réaction de branchement respectivement.

Lorsque l'amylose est soumise à un débranchement enzymatique (S-DBE+), seule une faible proportion de glucanes de DP<70 est libérée au cours de la réaction (Figure 55A). Ce résultat est cohérent avec le faible pourcentage de ramification décrit dans la littérature. Le profil de DLC du substrat débranché (S-DBE+) est utilisé comme témoin et sera comparé au produit de réaction débranché (DBE+).

Après incubation de l'amylose avec BE2.2 puis débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 55B), on distingue la production de glucanes de DP<70. De manière intéressante, comme dans le cas de l'amylopectine, les glucanes de DP 6 sont les principaux produits de la réaction de branchement par BE2.2.

Lorsque les produits de réaction de BE2.2 sur l'amylose sont analysés sans étape de débranchement (Figure 55C), on observe un profil similaire à celui obtenu à partir d'amylose non débranché (Figure 55A). Ce résultat indique qu'aucune réaction de cyclisation ou encore d'hydrolyse n'a eu lieu au cours de la réaction de branchement.



**Figure 55: Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) de l'amylose de pomme de terre avant et après réaction de branchement par BE2.2.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC de l'amylose native après débranchement enzymatique (S-DBE+). (B) DLC de l'amylose incubée avec 1U de BE2.2 durant 24 h à 25°C pH 7 et soumise à un débranchement enzymatique (DBE+). (C) DLC de l'amylose incubée avec 1 U de BE2.2 durant 24h à 25°C pH 7 sans débranchement enzymatique (DBE-).

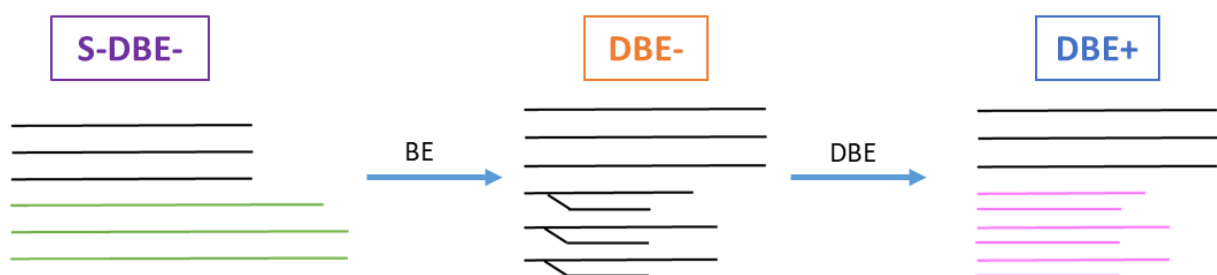
### 5.1.3 Action de BE2.2 sur des glucanes linéaires

Le A600 est un substrat strictement linéaire constitué d'un mélange d' $\alpha$ -1,4 glucanes dont le degré de polymérisation est majoritairement compris 5 et 50 résidus de glucoses (S-DBE-) (Figure 57A). Ce dernier est incubé avec BE2.2 puis les produits de réactions sont soumis à un débranchement enzymatique et analysés par HPAEC-PAD (DBE+) (Figures 56 et 57C).

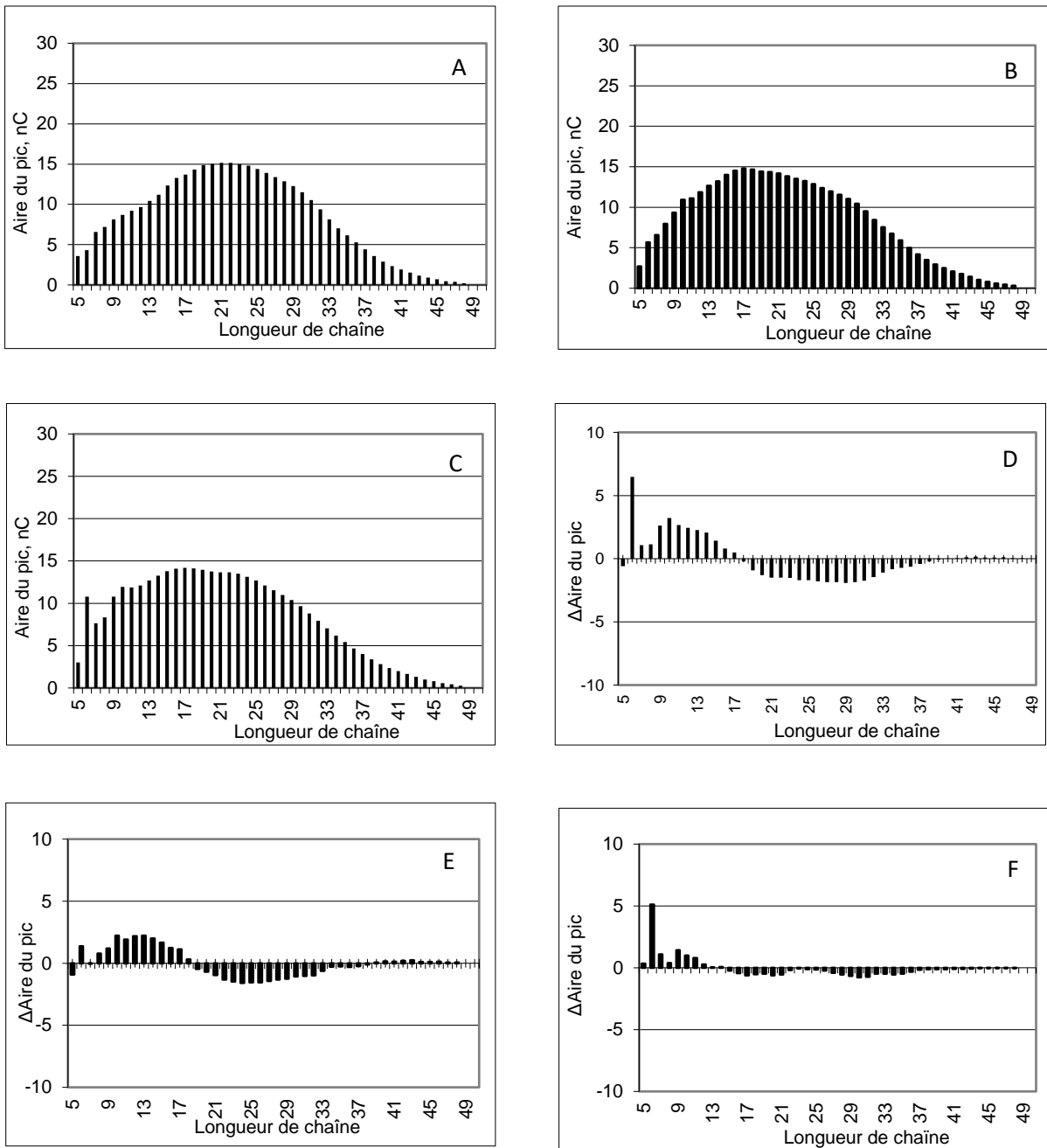
Le différentiel entre les produits de réaction débranchés (DBE+) et le A600 natif (S-DBE-) présenté en figure 57D montre que ce substrat a bien été modifié par BE2.2. En effet, on peut observer l'augmentation de glucanes de DP 6-15 (présentés par des valeurs positives et donc créés au cours de la réaction de branchement) et une diminution des glucanes de DP 19 à 34 après incubation avec BE2.2 (représentés par des valeurs négatives et donc consommés au cours de la réaction de branchement).

Une fois encore les glucanes de DP 6 représentent les principaux glucanes produits au cours de la réaction de branchement par BE2.2.

Lorsque les produits de la réaction de BE2.2 sans débranchement enzymatique (DBE-) sont analysés par HPAEC-PAD (Figure 57B), les polysaccharides branchés sont élués aux mêmes temps de rétention que les glucanes linéaires (par exemple, un glucane branché de DP 12 est élué au même temps de rétention qu'un glucane linéaire de DP 12). Le profil de DLC de ces produits de réaction avant débranchement enzymatique (DBE-) (Figure 57B) est très similaire au profil de DLC des produits de réaction après débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 57C), à l'exception des glucanes de DP 6, faiblement présents avant débranchement enzymatique (Figure 57E). Cela implique que ces glucanes de DP 6 étaient principalement impliqués dans une liaison  $\alpha$ -1,6. En effet, dans le différentiel après et avant débranchement enzymatique, les valeurs positives correspondent aux glucanes qui étaient impliqués dans un point de branchement. Dans ce différentiel (Figure 57F), les glucanes de DP<12 sont représentés par des valeurs positives où les glucanes de DP 6 sont prépondérants.



**Figure 56: Représentation schématique de glucanes linéaires modifiés ou non sous l'action d'une BE.** Représentation schématique de glucanes linéaires avant (S-DBE-) et après réaction de branchement par une BE (DBE-) puis soumise à l'action des enzymes de débranchement (DBE+). En vert sont représentées les chaînes glucaniques utilisées comme substrat donneur par les BEs et en rose les produits de réaction de branchement libérés : ces glucanes constituent les chaînes qui étaient impliquées dans un point de branchement.



**Figure 57 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) du A600 avant et après réaction de branchement par BE2.2.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC du A600 natif (S-DBE-). (B) DLC du A600 incubé avec 1U de BE2.2 durant 24 h at 25°C, pH 7 sans débranchement enzymatique (DBE-) (C) DLC du A600 incubé avec 1U de BE2.2 durant 24 h at 25°C, pH 7 et soumis à un débranchement enzymatique (DBE+). (D) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec BE2.2 puis débranché (C) et le A600 natif (A) (profil C – profil A). (E) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec BE2.2 (B) et le A600 natif (A) (profil B – profil A) (F) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec BE2.2 après (C) et avant débranchement (B) (profil C – profil B).

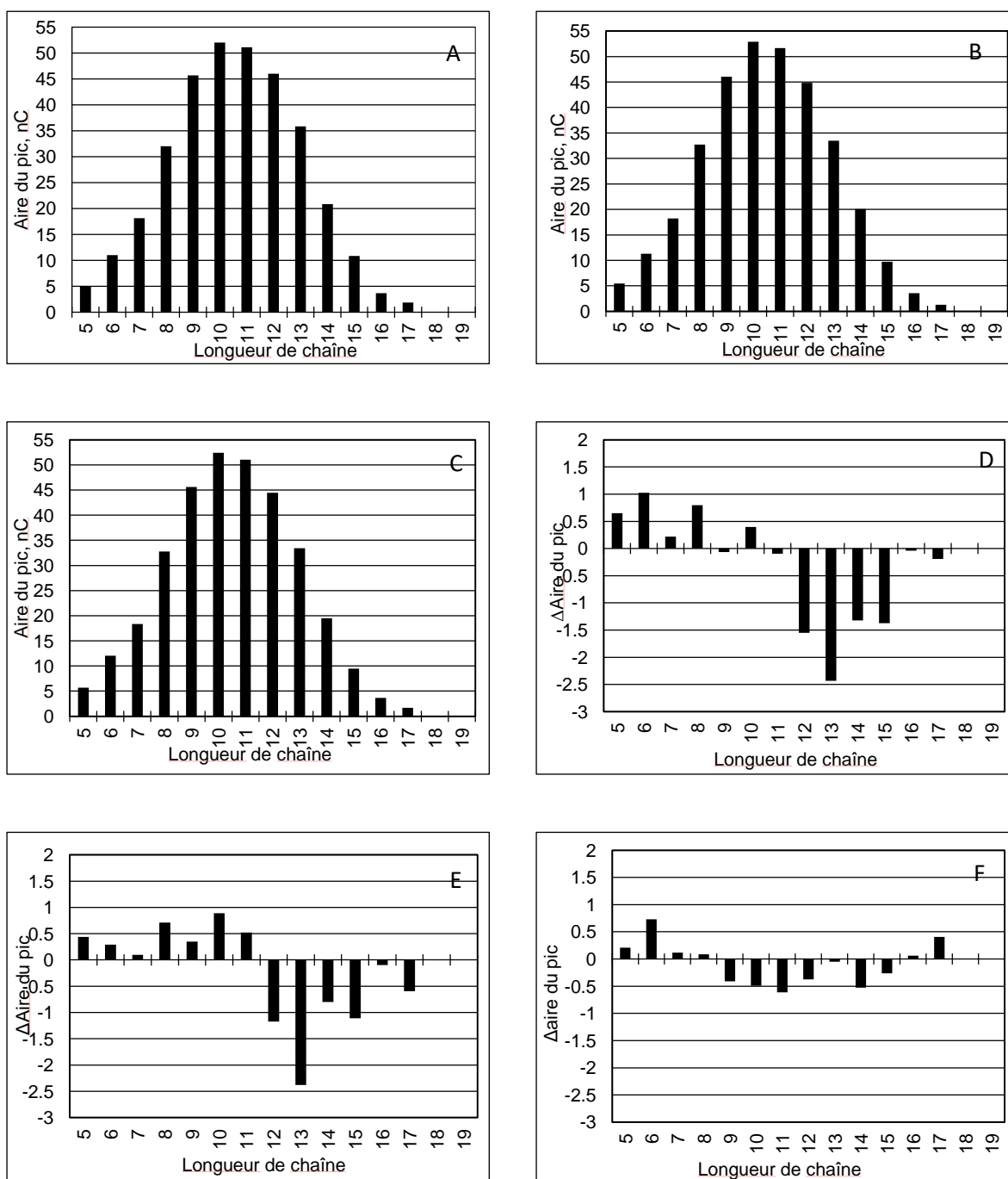
Des glucanes linéaires présentant une distribution de longueur de chaîne plus étroite, de DP 4 à 19 et de DP 14 à 28, ont également été utilisés comme substrat de BE2.2 (Figures 58A et 59A).

Ces substrats ont été incubés avec BE2.2 puis les produits de réactions sont soumis à un débranchement enzymatique et analysés par HPAEC-PAD (DBE+) (Figures 58C et 59C).

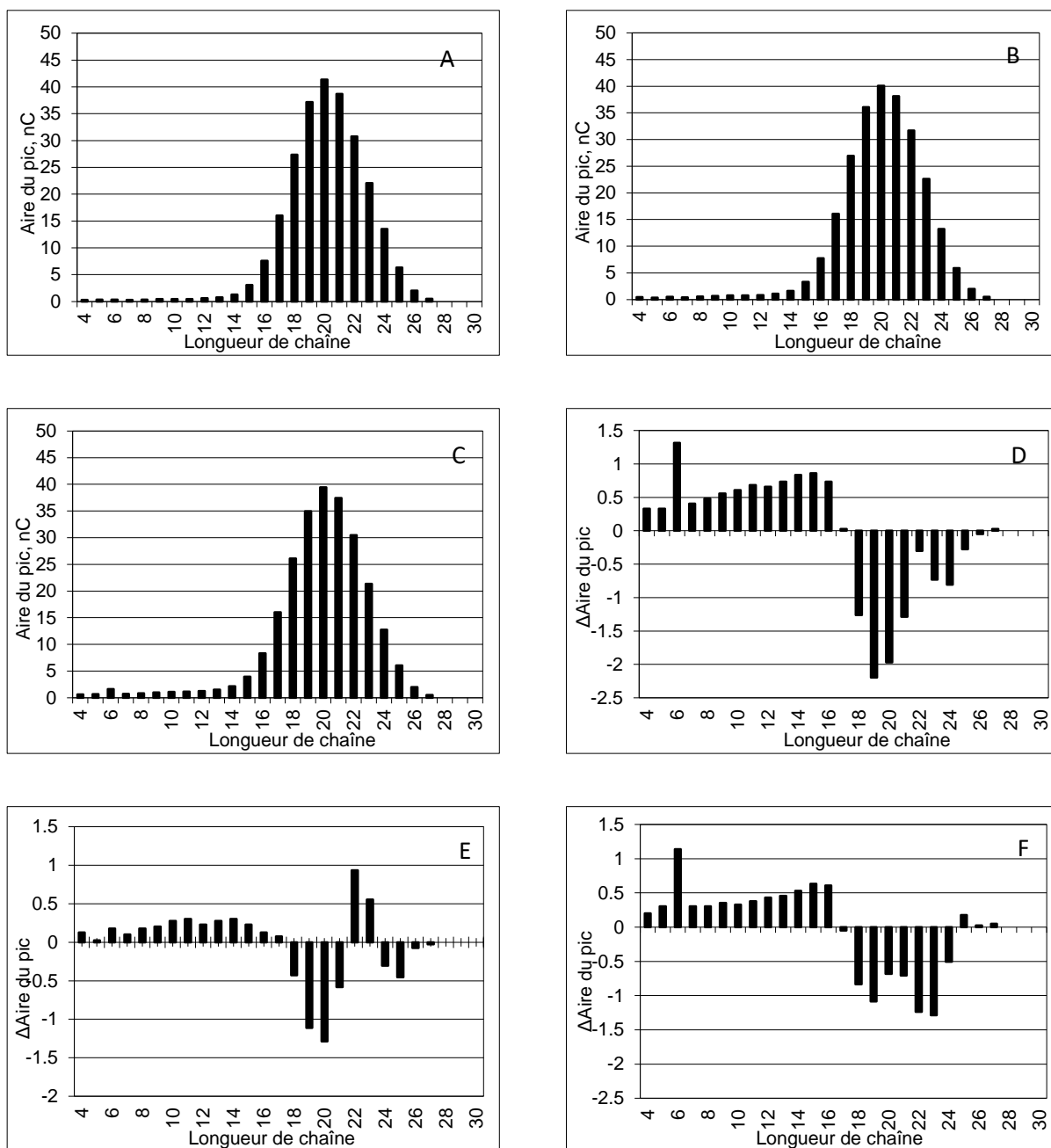
Dans chaque cas, le différentiel entre les produits de réactions débranchés (DBE+) et le substrat natif (S-DBE-) révèle les modifications subies par le substrat sous l'action de BE2.2 (Figures 58D et 59D).

- ➔ En effet, on peut observer l'augmentation des glucanes de DP 5-10 (ceux-ci sont présentés par des valeurs positives et donc créés au cours de la réaction de branchement) et une diminution des glucanes de DP 12 à 17 après incubation avec BE2.2 (représentés par des valeurs négatives et donc consommés au cours de la réaction de branchement), après incubation avec le DP 4-19 (Figure 58D).
- ➔ Lorsque le DP 14-28 est utilisé comme substrat, on constate une augmentation des glucanes de DP 4-16 et une diminution des glucanes de DP 18 à 26 après incubation avec BE2.2 (Figure 59D).

Le profil de DLC de ces produits de réaction avant débranchement enzymatique (DBE-) (Figures 58B et 59B) est très similaire au profil de DLC des produits de réaction après débranchement enzymatique (DBE+) (Figures 58C et 59C). Lorsque ces profils sont comparés par analyse différentielle (Figures 58F et 59F), les valeurs positives correspondent aux glucanes qui étaient impliqués dans un point de branchement. Bien que ces variations soient extrêmement faibles et proches du seuil de détection, on constate une fois encore que les glucanes de DP 6 sont les principaux glucanes impliqués dans une liaison  $\alpha$ -1,6. Ces faibles variations laissent également suggérer que BE2.2 est très peu réactive sur ces glucanes linéaires.



**Figure 58 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) du DP 4-19 avant et après réaction de branchement par BE2.2.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC du DP 4-19 natif (S-DBE-). (B) DLC du DP 4-19 incubé avec 1U de BE2.2 durant 24 h at 25°C, pH 7 sans débranchement enzymatique (DBE-) (C) DLC du DP 4-19 incubé avec 1U de BE2.2 durant 24 h at 25°C, pH 7 et soumis à un débranchement enzymatique (DBE+). (D) Différence entre les profils de DLC du DP 4-19 incubé avec BE2.2 puis débranché (C) et le DP 4-19 natif (A) (profil C – profil A). (E) Différence entre les profils de DLC du DP 4-19 incubé avec BE2.2 (B) et le DP 4-19 natif (A) (profil B – profil A). (F) Différence entre les profils de DLC du DP 4-19 incubé avec BE2.2 après (C) et avant débranchement (B) (profil C - profil B).



**Figure 59: Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) du DP 14-28 avant et après réaction de branchement par BE2.2.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC du DP 14-28 natif (S-DBE-). (B) DLC du DP 14-28 incubé avec 1U de BE2.2 durant 24 h à 25°C, pH 7 sans débranchement enzymatique (DBE-) (C) DLC du DP 14-28 incubé avec 1U de BE2.1 durant 24 h à 25°C, pH 7 et soumis à un débranchement enzymatique (DBE+). (D) Différence entre les profils de DLC du DP 14-28 incubé avec BE2.2 puis débranché (C) et le DP 14-28 natif (A) (profil C – profil A). (E) Différence entre les profils de DLC du DP 14-28 incubé avec BE2.2 (B) et le DP 14-28 natif (A) (profil B – profil A). (F) Différence entre les profils de DLC du DP 14-28 incubé avec BE2.2 après (C) et avant débranchement (B) (profil C – profil B).

## 5.2 Caractérisation des substrats donneurs et des chaînes transférées par BE2.1

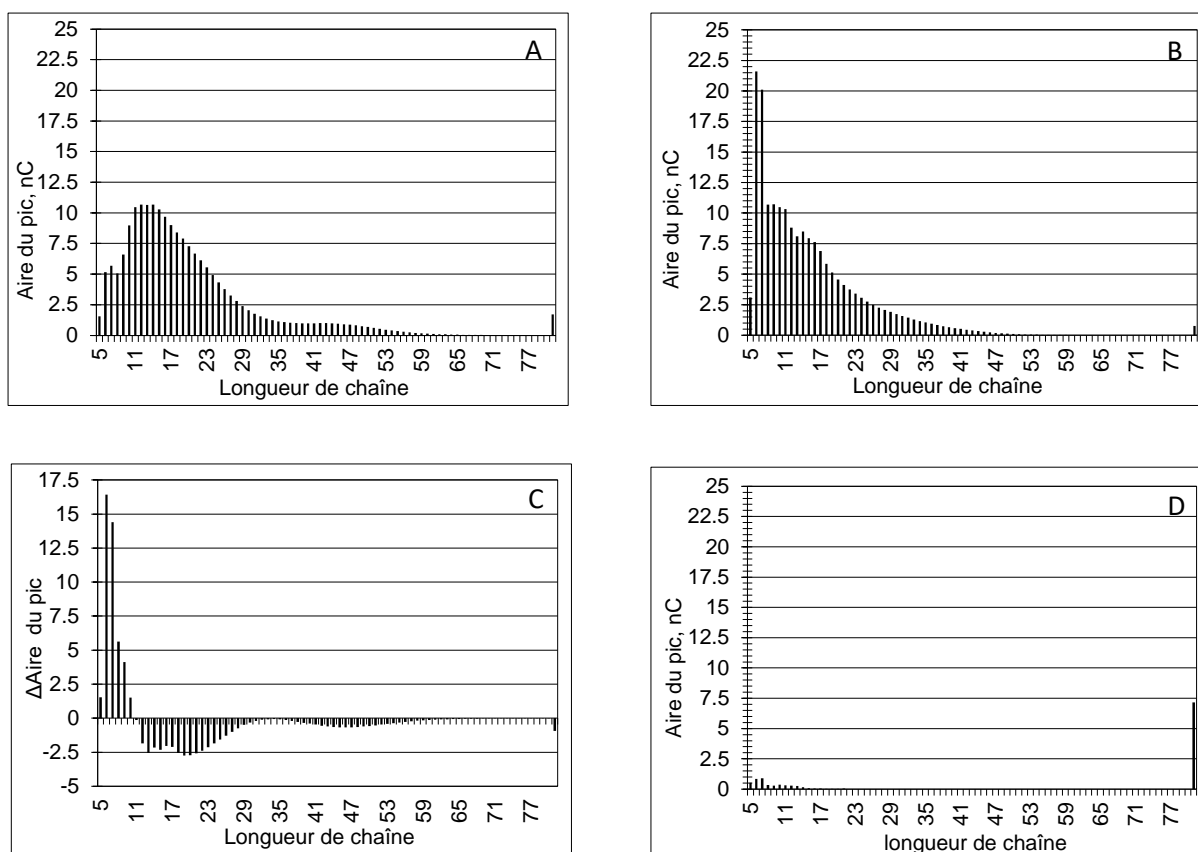
### 5.2.1 Action de BE2.1 sur l'amylopectine

Le profil de DLC de l'amylopectine débranchée (S-DBE+) (Figure 60A,) est comparé à celui des produits de réaction de BE2.1 ayant subi un débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 60B). Lorsque des différences dans la distribution de longueur de chaîne, entre ces deux profils, sont observées ; elles résultent de la modification de l'amylopectine par BE2.1 et attestent donc que la réaction a bien eu lieu. Ces profils ont donc été comparés par une analyse différentielle : la différence entre les profils de DLC des produits de réaction de BE2.1 débranchés (DBE+) et de l'amylopectine débranchée (S-DBE+) est présentée en figure 60C. Dans ce différentiel, les glucanes de  $DP \geq 12$  sont représentés par des valeurs négatives et correspondent aux glucanes ayant été consommés au cours de la réaction, les valeurs positives correspondent quant à elles aux glucanes créés durant la réaction (de  $DP < 12$ ).

Parmi les glucanes créés au cours de la réaction, ( $DP < 12$ , Figure 60C), ceux de DP 6 et 7 sont fortement augmentés après réaction de BE2.1. Le nombre de glucanes de DP 5 et DP 8-11 augmente également après réaction mais dans une moindre mesure en comparaison aux glucanes de DP 6 et 7. Ces glucanes courts peuvent être directement issus du transfert par BE2.1 ou résultent d'un raccourcissement de glucanes plus long, qui s'accumulent au cours de la réaction car ils ne peuvent plus être utilisés comme substrat donneur.

Le profil de DLC des produits de réaction de BE2.1 sans étape de débranchement (DBE-), présenté en figure 60D, montre l'apparition de glucanes de faible degré de polymérisation ( $DP \leq 21$ ), au cours de la réaction de branchement. Bien que présents en faible quantité, ces glucanes observés de manière reproductible témoignent de l'existence, en faible proportion, de réactions de cyclisation ou d'hydrolyse.





**Figure 60 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) de l'amylopectine de pomme de terre avant et après réaction de branchement par BE2.1.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC de l'amylopectine native après débranchement enzymatique (S-DBE+). (B) DLC de l'amylopectine incubée avec 1U de BE2.1 durant 24 h à 20°C pH 6,5 et soumise à un débranchement enzymatique (DBE+). (C) Différence entre les profils de DLC de l'amylopectine incubée avec BE2.1 puis débranchée (B) et l'amylopectine native débranchée (A) (profil B – profil A). (D) DLC de l'amylopectine incubée avec 1U de BE2.1 durant 24 h à 20°C pH 6,5 sans débranchement enzymatique (DBE-).

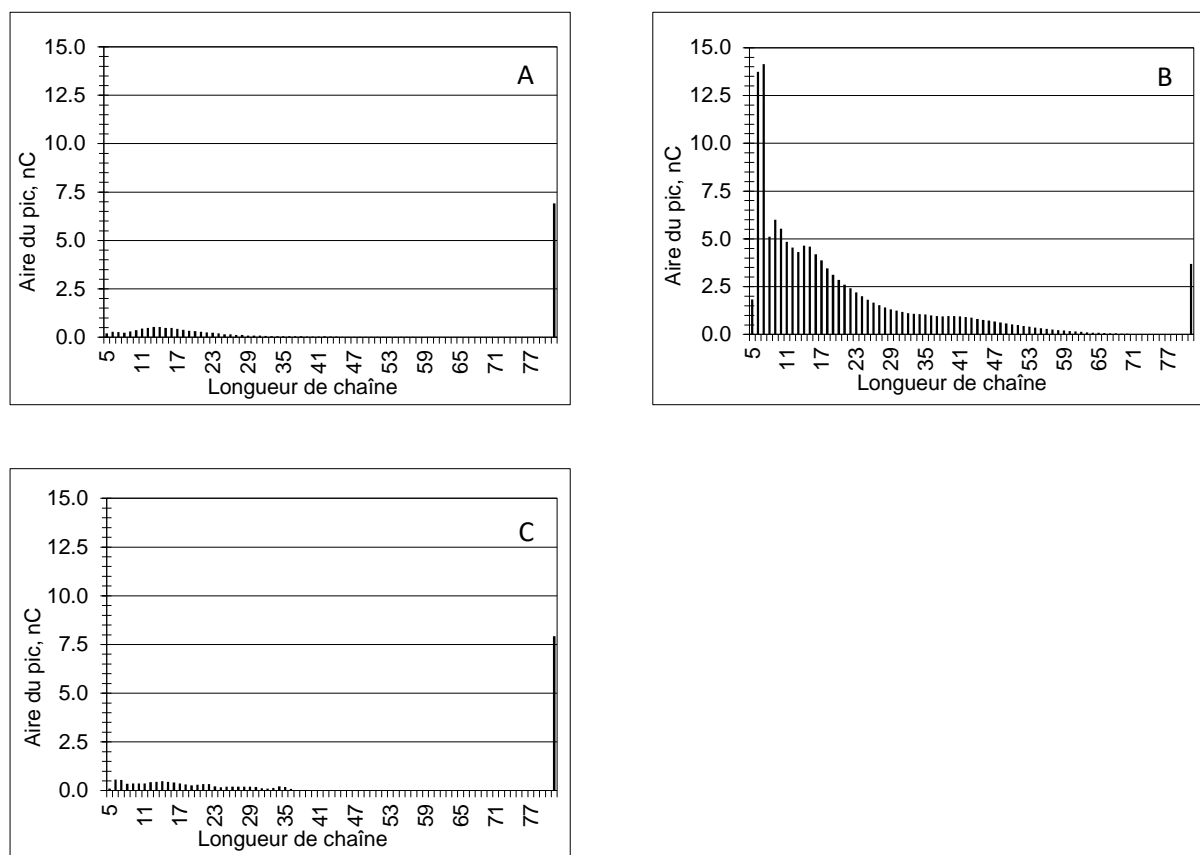
### 5.2.2 Action de BE2.1 sur l'amylose

La même démarche analytique a été effectuée, en utilisant l'amylose comme substrat de la réaction de branchement catalysée par BE2.1 (Figure 61).

Après incubation de l'amylose avec BE2.1 puis débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 61B), on observe la libération de glucanes de DP<65. De manière intéressante, comme dans le cas de l'amylopectine, les glucanes de DP 6 et 7 sont les principaux produits de la réaction de branchement par BE2.1.

Lorsque les produits de réaction de BE2.1 sur l'amylose sont analysés sans étape de débranchement (DBE-) (Figure 61C), encore une fois on distingue l'apparition de glucanes de DP 5 à

37 qui étaient absents de l'analyse effectuée sur le substrat de départ (Figure 61A). Ce résultat confirme l'existence, en faible proportion, d'une réaction de cyclisation ou d'hydrolyse au cours de la réaction de branchement par BE2.1.



**Figure 61: Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) de l'amylose de pomme de terre avant et après réaction de branchement par BE2.1.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC de l'amylose native après débranchement enzymatique (S-DBE+). (B) DLC de l'amylose incubée avec 1U de BE2.1 durant 24 h à 20°C pH 6,5 et soumise à un débranchement enzymatique (DBE+). (C) DLC de l'amylose incubée avec 1 U de BE2.1 durant 24 h à 20°C pH 6,5 sans débranchement enzymatique (DBE-).

### 5.2.3 Action de BE2.1 sur des glucanes linéaires

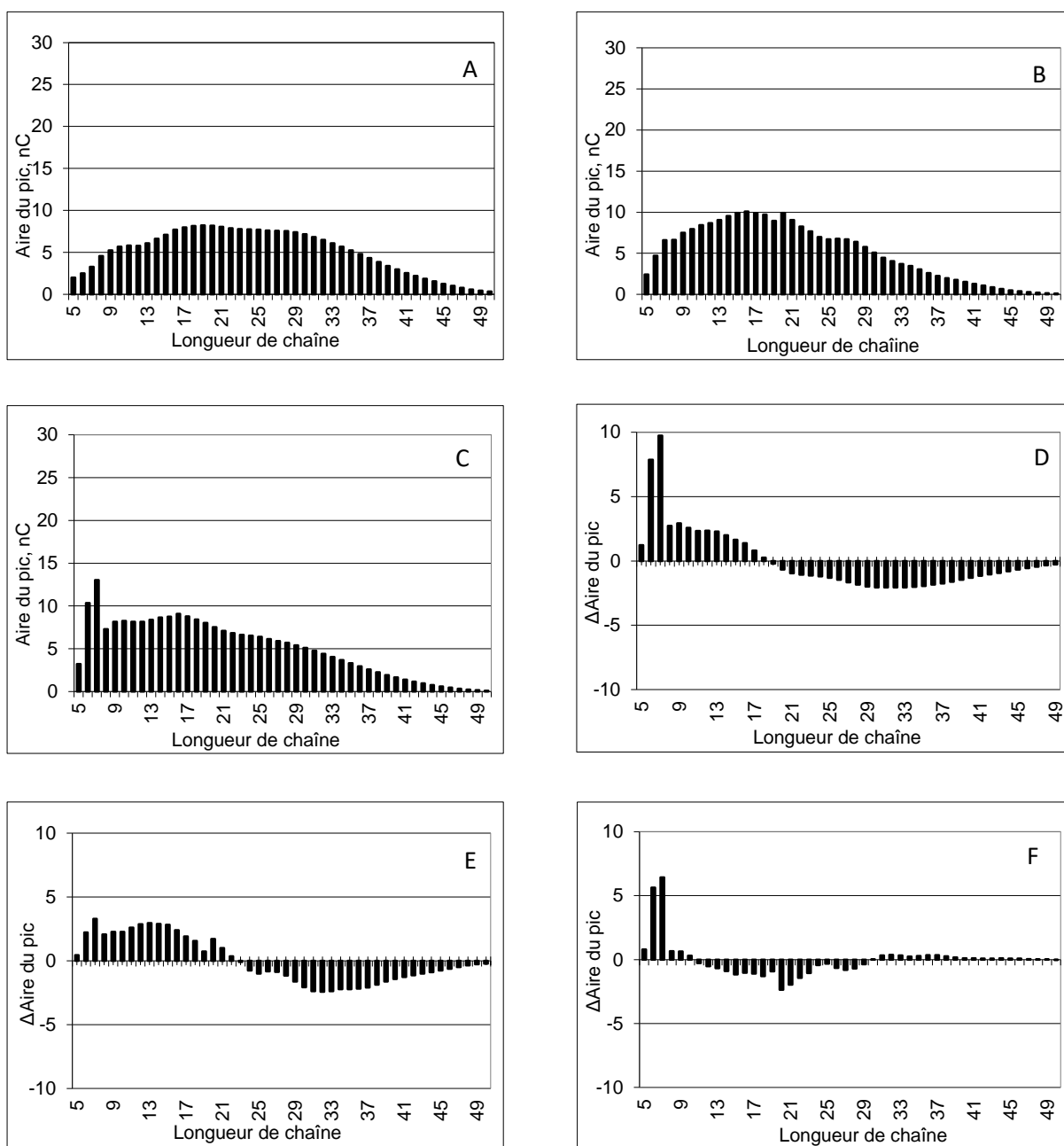
Le substrat A600 (Figure 62A) a été incubé avec BE2.1 durant 24h puis les produits de réactions ont été analysés par HPAEC-PAD avant (DBE-) (Figure 62B) et après débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 62C).

Le différentiel entre les produits de réaction débranchés (DBE+) et le A600 natif (S-DBE-) présenté en figure 62D montre que ce substrat a bien été modifié par BE2.1. En effet, on peut observer l'augmentation de glucanes de DP 5-18 (ceux-ci sont présentés par des valeurs positives et donc créés au cours de la réaction de branchement) et une diminution des glucanes de DP $\geq$ 19 après incubation

avec BE2.1 (représentés par des valeurs négatives et donc consommés au cours de la réaction de branchement). Une fois encore les glucanes de DP 6 et 7 représentent les principaux glucanes produits au cours de la réaction de branchement par BE2.1.

Lorsque les produits de réaction de BE2.1 sans débranchement enzymatique (DBE-) sont analysés par HPAEC-PAD (Figure 62B), le profil de DLC obtenu est comparé au profil de DLC des produits de réaction après débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 62C). Les principales différences entre ces deux profils sont les glucanes de DP 6 et 7 qui varient fortement. Ces derniers sont faiblement présents avant débranchement enzymatique (DBE-) (Figure 62E) et fortement présents après débranchement enzymatique (DBE+). Le différentiel obtenu en comparant les profils de DLC après et avant débranchement enzymatique révèle que les principaux glucanes impliqués dans un point de branchement sont les glucanes de DP 6 et 7 représentés par des valeurs positives (Figure 62F). Ce résultat est en adéquation avec ce qui avait été observé en utilisant l'amylopectine comme substrat de BE2.1.

Par ailleurs, on peut observer l'apparition de glucanes courts durant la réaction de branchement (Figure 62E)



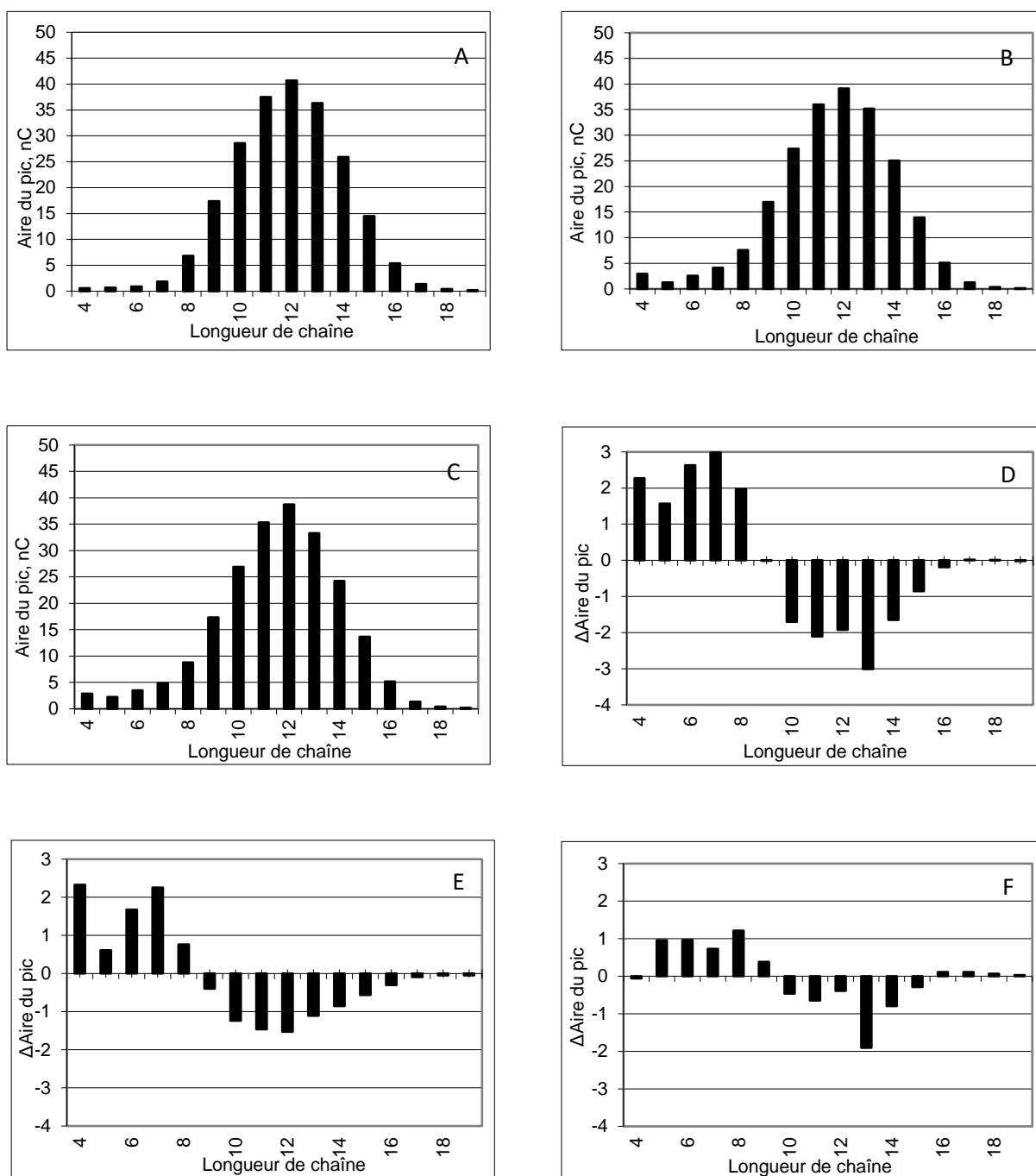
**Figure 62 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) du A600 avant et après réaction de branchement par BE2.1.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC du A600 natif (S-DBE-). (B) DLC du A600 incubé avec 1U de BE2.1 durant 24 h at 20°C, pH 6,5 sans débranchement enzymatique (DBE-) (C) DLC du A600 incubé avec 1U de BE2.1 durant 24 h at 20°C, pH 6,5 et soumis à un débranchement enzymatique (DBE+). (D) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec BE2.1 puis débranché (C) et le A600 natif (A) (profil C – profil A). (E) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec BE2.1 (B) et le A600 natif (A) (profil B - profil A). (F) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec BE2.1 après (C) et avant débranchement (B) (profil C – profil B).

Le DP 4-19 (Figure 63A) a été utilisé comme substrat par BE2.1 puis les produits de réaction après débranchement enzymatique sont analysés par HPAEC-PAD (DBE+) (Figure 63C).

Dans le différentiel entre les produits de réaction débranchés (DBE+) et le substrat natif (S-DBE-) présenté en figure 63D, on constate que le substrat est bien modifié par l'enzyme. En effet, on peut observer l'augmentation de glucanes de DP 4 à 8 (ceux-ci sont présentés par des valeurs positives) et une diminution des glucanes de DP 10 à 19 après incubation avec BE2.1 (représentés par des valeurs négatives et donc consommés au cours de la réaction de branchement). Il semble donc que la taille minimale du substrat nécessaire à l'action de BE2.1 soit d'au moins 10 résidus de glucose.

Lorsque les produits de réaction de BE2.1 sans débranchement enzymatique (DBE-) sont analysés par HPAEC-PAD (Figure 63B) et comparés au substrat natif (Figure 63D), on peut constater la libération de glucanes de DP<8 au cours de la réaction de branchement.

De même, les profils de DLC avant (Figure 63B) et après débranchement enzymatique (Figure 63C) sont très similaires. La comparaison de ces profils par analyse différentielle révèle néanmoins que la réaction de branchement a bien eu lieu même si les variations observées sont très faibles, les glucanes qui étaient impliqués dans un point de branchement sont des glucanes de DP<10 résidus de glucoses.

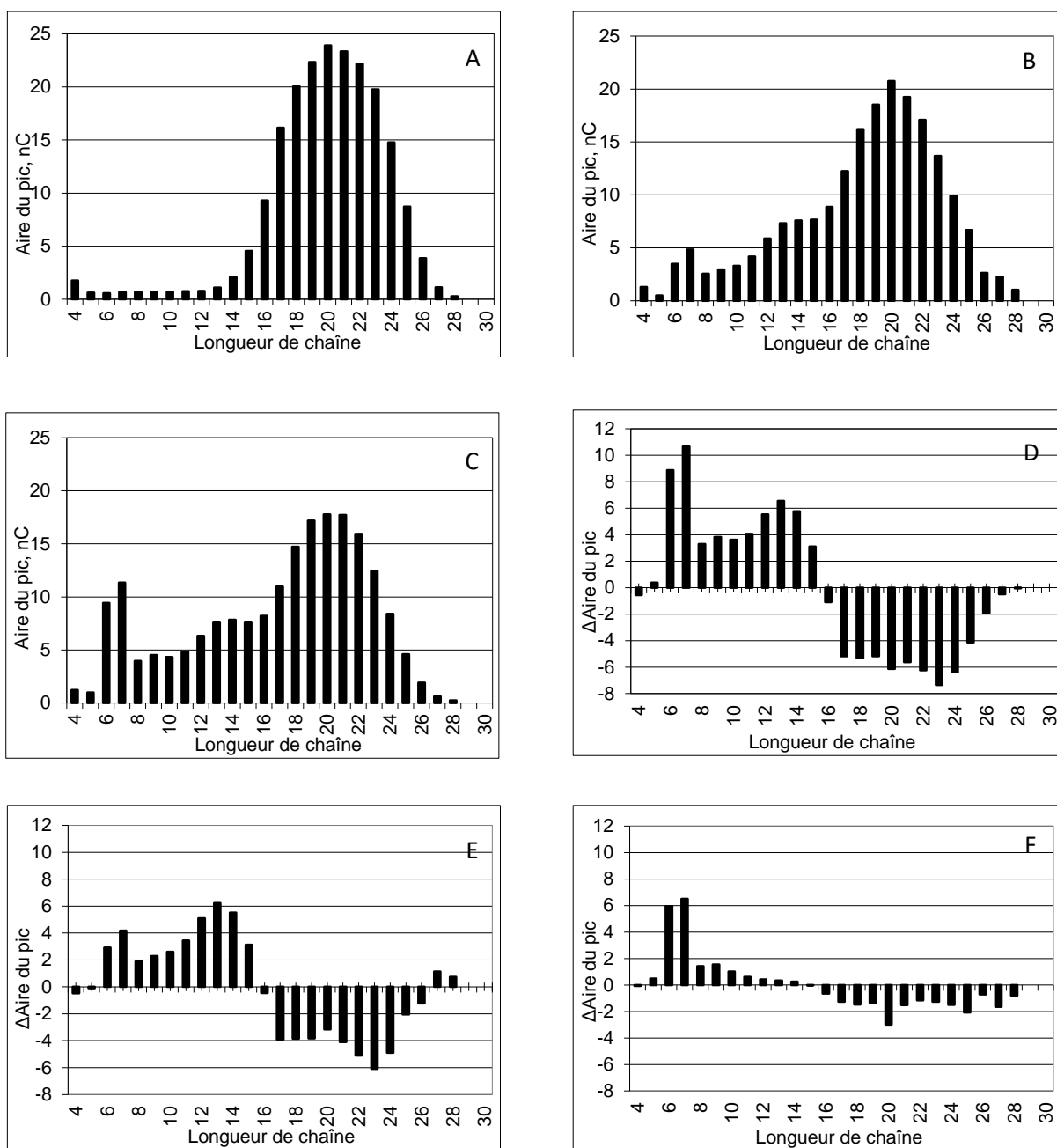


**Figure 63 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) du DP 4-19 avant et après réaction de branchement par BE2.1.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC du DP 4-19 natif (S-DBE-). (B) DLC du DP 4-19 incubé avec 1U de BE2.1 durant 24 h à 20°C, pH 6,5 sans débranchement enzymatique (DBE-) (C) DLC du DP 4-19 incubé avec 1U de BE2.1 durant 24 h à 20°C, pH 6,5 et soumis à un débranchement enzymatique (DBE+). (D) Différence entre les profils de DLC du DP 4-19 incubé avec BE2.1 puis débranché (C) et le DP 4-19 natif (A) (profil C – profil A). (E) Différence entre les profils de DLC du DP 4-19 incubé avec BE2.1 (B) et le DP 4-19 natif (A) (profil B – profil A). (F) Différence entre les profils de DLC du DP 4-19 incubé avec BE2.1 après (C) et avant débranchement (B) (profil C - profil B).

Lorsque le DP 14-28 est utilisé comme substrat, cette fois la variation de la DLC avant (S-DBE-) (Figure 64A) et après branchement enzymatique (DBE-) est clairement observable (Figure 64B). Lorsque les produits de réaction de BE2.1 sont soumis à un débranchement enzymatique et analysés par HPAEC-PAD (DBE+) (Figure 64C), le différentiel entre les produits de réaction débranchés (DBE+) et le substrat natif (S-DBE-) présenté en figure 64D montre qu'il y a bien eu réaction de branchement. On peut observer l'augmentation de glucanes de DP 5-15 (ces derniers sont présentés par des valeurs positives et donc créés au cours de la réaction de branchement) et une diminution des glucanes de DP 16 à 28 après incubation avec BE2.1 (représentés par des valeurs négatives et donc consommés au cours de la réaction de branchement). Cette fois encore les glucanes de DP 6 et 7 représentent les principaux glucanes produits au cours de la réaction de branchement par BE2.1, qui semble nettement plus active sur les glucanes de DP 14-28 que sur le mélange contenant des substrats de DP 4 à 19.

De plus, la comparaison des profils avant (S-DBE-) et après réaction de branchement (DBE-) (Figure 64E) indique que des glucanes de DP<16 ont été libérés au cours de la réaction de branchement.

Le différentiel après et avant débranchement enzymatique, présenté en figure 64F, indique que ces glucanes de DP 6 et 7 correspondent aux glucanes impliqués dans un point de branchement.



**Figure 64: Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) du DP 14-28 avant et après réaction de branchement par BE2.1.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC du DP 14-28 natif (S-DBE-). (B) DLC du DP 14-28 incubé avec 1U de BE2.1 durant 24 h at 20°C, pH 6,5 sans débranchement enzymatique (DBE-) (C) DLC du DP 18-24 incubé avec 1U de BE2.1 durant 24 h at 20°C, pH 6,5 et soumis à un débranchement enzymatique (DBE+). (D) Différence entre les profils de DLC du DP 14-28 incubé avec BE2.1 puis débranché (C) et le DP 14-28 natif (A) (profil C – profil A). (E) Différence entre les profils de DLC du DP 14-28 incubé avec BE2.1 (B) et le DP 14-28 natif (A) (profil B – profil A). (F) Différence entre les profils de DLC du DP 14-28 incubé avec BE2.1 après (C) et avant débranchement (B) (profil C – profil B).

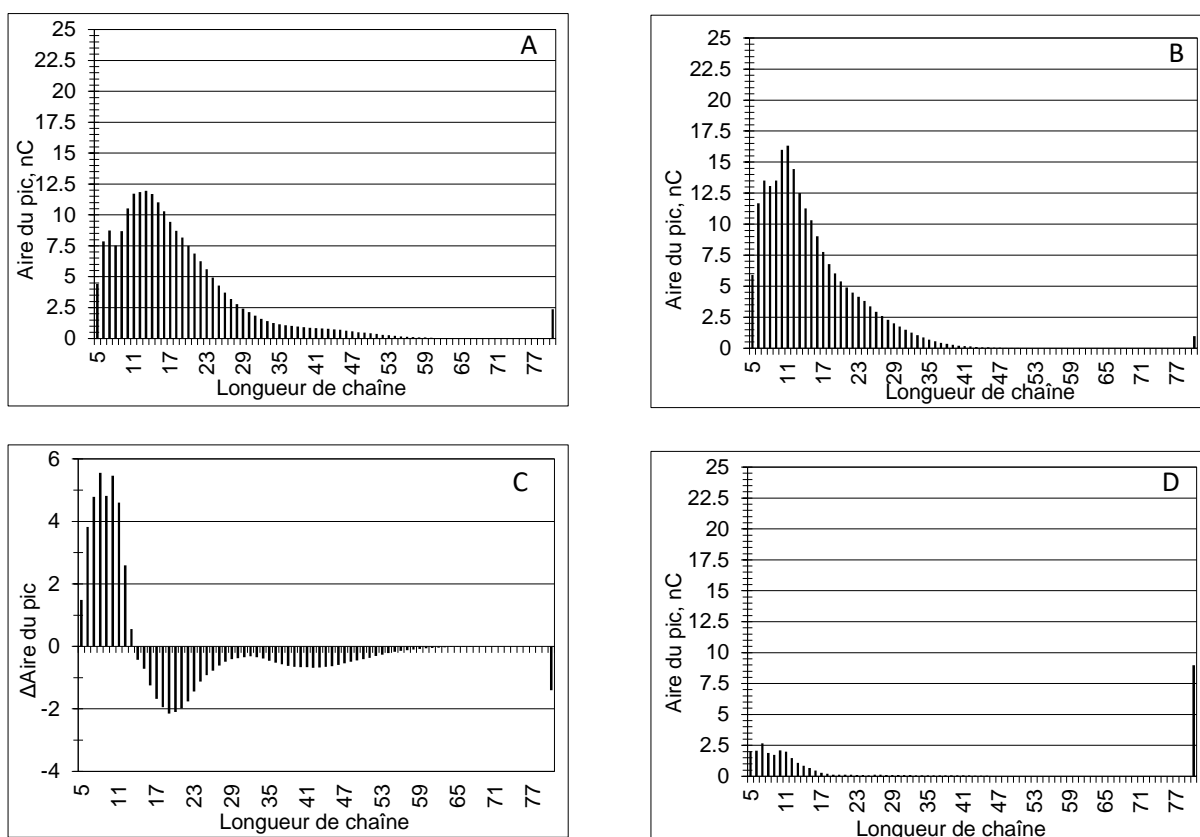


## 5.3 Caractérisation des substrats donneurs et des chaînes transférées par GlgB

### 5.3.1 Action de GlgB sur l'amylopectine

Le profil de DLC de l'amylopectine débranchée (S-DBE+) (Figure 65A) est comparé à celui des produits de réaction de GlgB ayant subi un débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 65B). Les différences observées entre ces deux profils attestent que l'amylopectine a bien été modifiée par GlgB.

L'analyse différentielle entre les profils de DLC des produits de réaction de GlgB débranchés (DBE+) et de l'amylopectine débranchée (S-DBE+) est présentée en figure 65C, les glucanes de  $DP \geq 14$  y sont représentés par des valeurs négatives, ils ont donc été utilisés comme substrat donneur par GlgB. Les glucanes de  $DP \leq 13$ , représentés par des valeurs positives, ont quant à eux été créés durant la réaction. A la différence des enzymes de branchement d'*Arabidopsis thaliana* où les glucanes de DP 6 et/ou 7 sont les plus fortement représentés après débranchement enzymatique, aucun glucane n'est produit de manière préférentielle dans le cas de GlgB. On observe au contraire une augmentation de l'ensemble des glucanes de  $DP \leq 13$  au cours de la réaction. Cela suggère que GlgB est beaucoup moins spécifique que BE2.2 et BE2.1. Néanmoins comme dans le cas de BE2.1, lorsque les produits de réaction de GlgB sur l'amylopectine sont analysés sans étape de débranchement (DBE-) (Figure 65D), le profil de DLC révèle l'apparition de glucanes courts (de  $DP \leq 47$ ) au cours de la réaction de branchement. Bien que la proportion de ces glucanes reste faible (par comparaison à ce qui est observé chez *Rhodothermus obamensis* (Roussel, Lancelon-Pin et al. 2013), il est possible d'en déduire que des réactions de cyclisation et/ou d'hydrolyse ont lieu au cours de la réaction de branchement par GlgB.

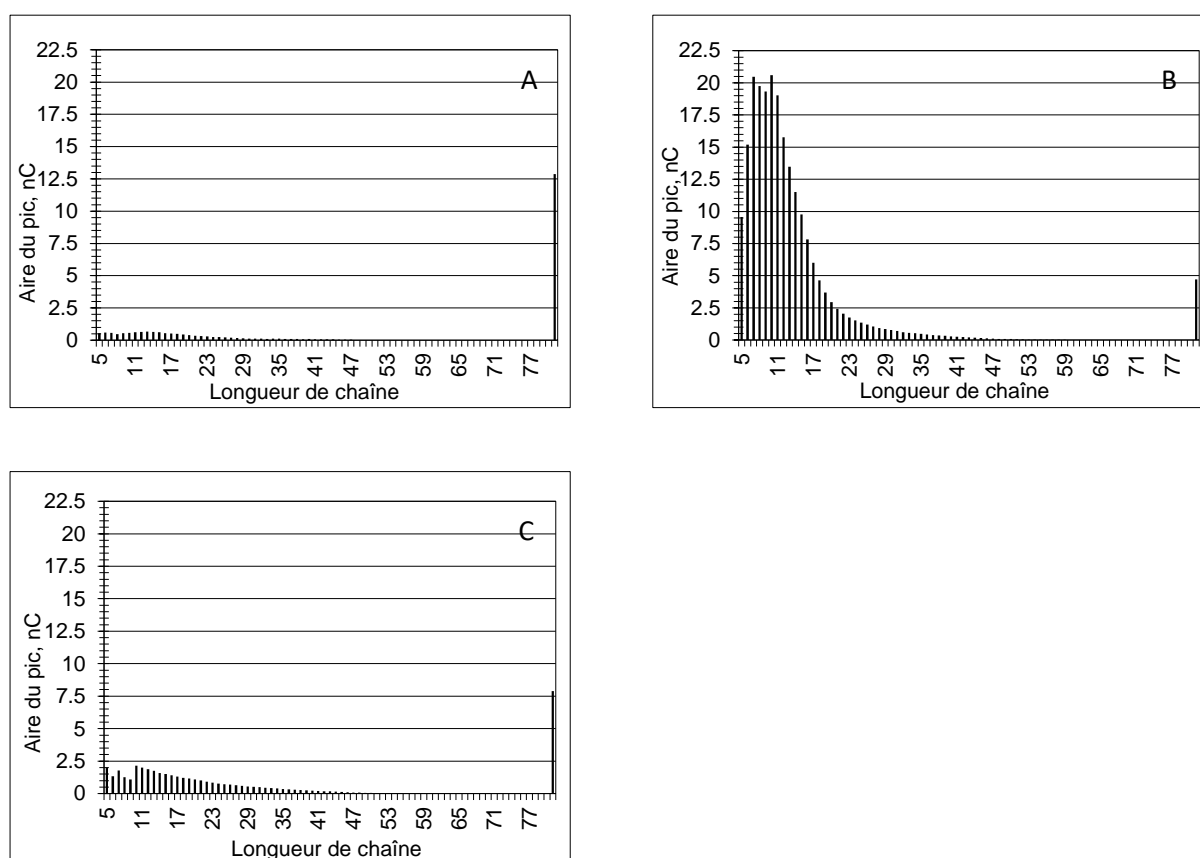


**Figure 65 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) de l'amylopectine de pomme de terre avant et après réaction de branchement par GlgB.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC de l'amylopectine native après débranchement enzymatique (S-DBE+). (B) DLC de l'amylopectine incubée avec 1U de GlgB durant 24 h à 37°C pH 7,5 et soumise à un débranchement enzymatique (DBE+). (C) Différence entre les profils de DLC de l'amylopectine incubée avec GlgB puis débranchée (B) et l'amylopectine native débranchée (A) (profil B – profil A). (D) DLC de l'amylopectine incubée avec 1U de GlgB durant 24 h à 37°C pH 7,5 sans débranchement enzymatique (DBE-).

### 5.3.2 Action de GlgB sur l'amylose

La comparaison du profil de DLC de l'amylose débranchée (S-DBE+) (Figure 66A) avec celui de l'amylose incubée avec GlgB puis soumise à un débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 66B), révèle que le substrat a bien été modifié par l'enzyme de branchement. On peut alors distinguer la production de glucanes de DP<47 au cours de la réaction (Figure 66B). Comme dans le cas de l'amylopectine, les glucanes de DP<14 sont les principaux produits de la réaction de branchement par GlgB.

Lorsque les produits de réaction de GlgB sur l'amylose sont analysés, cette fois, sans étape de débranchement (DBE-) (Figure 66C), nous pouvons également constater la libération de glucanes de DP≤59 ce qui confirme qu'une réaction de cyclisation ou d'hydrolyse a eu lieu au cours de l'incubation avec l'enzyme de branchement.



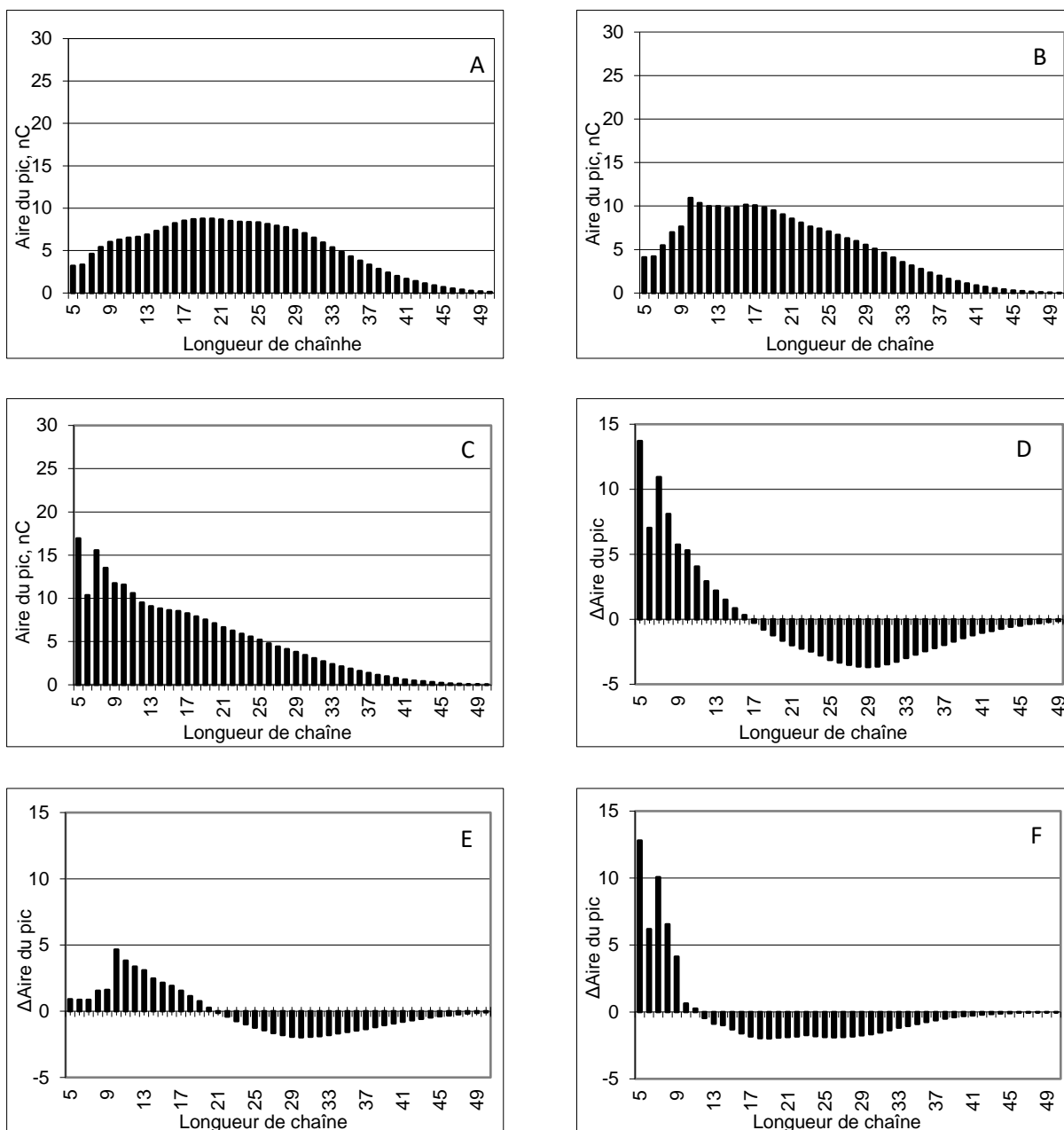
**Figure 66 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) de l'amylose de pomme de terre avant et après réaction de branchement par GlgB.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC de l'amylose native après débranchement enzymatique (S-DBE+). (B) DLC de l'amylose incubée avec 1U de GlgB durant 24 h à 37°C pH 7,5 et soumise à un débranchement enzymatique (DBE+). (C) DLC de l'amylose incubée avec 1 U de GlgB durant 24 h à 37°C pH 7,5 sans débranchement enzymatique (DBE-).

### 5.3.3 Action de GlgB sur des glucanes linéaires

L'action de GlgB sur le substrat A600 a également été évaluée. Lorsque ce dernier est incubé avec GlgB puis les produits de réaction sont soumis à un débranchement enzymatique (DBE+) (Figure 67C), on remarque des variations dans la DLC en comparaison avec le substrat natif (S-DBE-) (Figure 67A) attestant que le substrat a bien été modifié par GlgB.

En effet, le différentiel entre la DLC des produits débranchés (DBE+) et le A600 natif (S-DBE-) présenté en figure 66D montre une augmentation des glucanes de DP 5-16 (ces derniers sont présentés par des valeurs positives et donc créés au cours de la réaction de branchement) et une diminution des glucanes de DP 17 à 50 après incubation avec GlgB (représentés par des valeurs négatives et donc consommés au cours de la réaction de branchement).

Lorsque les produits de réaction de GlgB sans débranchement enzymatique (DBE-) sont analysés par HPAEC-PAD (Figure 67B), on peut remarquer la libération de glucanes courts. Ces glucanes courts sont clairement surreprésentés après débranchement enzymatique (Figure 67C). Cette augmentation atteste qu'un branchement a bien eu lieu. La comparaison des profils de DLC des produits de réaction après et avant débranchement enzymatique a donc été réalisée (Figure 67F). Dans ce différentiel on retrouve les glucanes de DP<12 représentés par des valeurs positives, ces glucanes étaient donc impliqués dans un point de branchement.

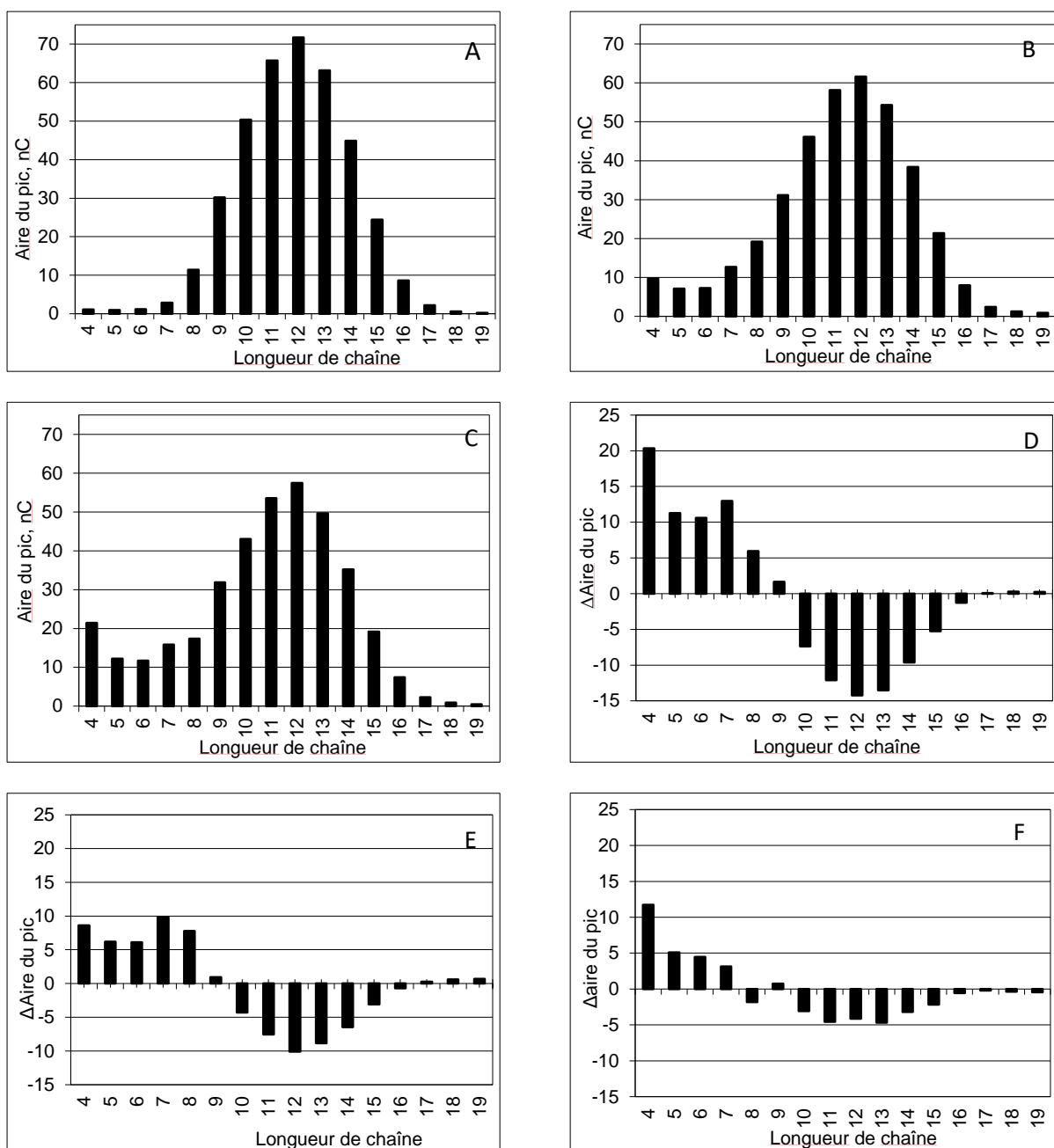


**Figure 67 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) du A600 avant et après réaction de branchement par GlgB.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC du A600 natif (S-DBE-). (B) DLC du A600 incubé avec 1U de GlgB durant 24 h at 37°C, pH 7,5 sans débranchement enzymatique (DBE-) (C) DLC du A600 incubé avec 1U de GlgB durant 24 h at 37°C, pH 7,5 et soumis à un débranchement enzymatique (DBE+). (D) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec GlgB puis débranché (C) et le A600 natif (A) (profil C – profil A). (E) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec GlgB (B) et le A600 natif (A) (profil B – profil A). (F) Différence entre les profils de DLC du A600 incubé avec GlgB après (C) et avant débranchement (B) (profil C – profil B).

Le DP 4-19 a également été utilisé comme substrat (S-DBE-) de GlgB. (Figure 68A). Lorsque les produits de réaction de GlgB sont soumis à un débranchement enzymatique et analysés par HPAEC-PAD (DBE+) (Figure 68C), le différentiel entre les produits de réaction débranchés (DBE+) et le substrat natif (S-DBE-) présenté en figure 68D montre qu'il y a bien eu réaction de branchement. On peut observer l'augmentation de glucanes de DP 4-9 (ces glucanes sont présentés par des valeurs positives et donc créés au cours de la réaction de branchement) et une diminution des glucanes de DP 10 à 19 après incubation avec GlgB (représentés par des valeurs négatives et donc consommés au cours de la réaction de branchement). La taille minimale du substrat nécessaire à l'activité de l'enzyme est donc d'au moins 10 résidus de glucose.

La comparaison des profils avant (S-DBE-) et après réaction de branchement (DBE-) (Figure 68E) indique que des glucanes de DP<10 ont été libérés au cours de la réaction de branchement. L'augmentation des glucanes de faibles DP est nettement plus marquée après débranchement enzymatique, ce qui atteste que la réaction de branchement a bien eu lieu.

La comparaison des profils après et avant débranchement enzymatique, présenté en figure 68F indique que les glucanes de DP<10, représentés par des valeurs positives, étaient impliqués dans un point de branchement.



**Figure 68 : Profil de distribution de longueur de chaîne (DLC) du DP 4-19 avant et après réaction de branchement par GlgB.** Les glucanes sont séparés et détectés puis quantifiés par HPAEC-PAD. (A) DLC du DP 4-19 natif (S-DBE-). (B) DLC du DP 4-19 incubé avec 1U de GlgB durant 24 h à 37°C, pH 7,5 sans débranchement enzymatique (DBE-) (C) DLC du DP 4-19 incubé avec 1U de GlgB durant 24 h à 37°C, pH 7,5 et soumis à un débranchement enzymatique (DBE+). (D) Différence entre les profils de DLC du DP 4-19 incubé avec GlgB puis débranché (C) et le DP 4-19 natif (A) (profil C – profil A). (E) Différence entre les profils de DLC du DP 4-19 incubé avec GlgB (B) et le DP 4-19 natif (A) (profil B – profil A). (F) Différence entre les profils de DLC du DP 9-15 incubé avec GlgB après (C) et avant débranchement (B) (profil C - profil B).

**Table 5 : Récapitulatif des résultats obtenus au cours de la caractérisation des produits de réaction des BEs d'A. thaliana et de GlgB d'E. coli :**

	BE2.2	BE2.1	GlgB
Taille minimale du substrat	DP 12	DP 10	DP 10
Chaînes impliquées dans un point de branchement	DP 6	DP 6 et 7	DP<14
Libération de glucanes courts durant la réaction	Non	Oui	Oui



# DISCUSSION

Les enzymes de branchement sont des enzymes clés dans la synthèse de l'amidon. En leur absence, les plantes ne sont plus capables de synthétiser ce polysaccharide. Elles seules sont responsables de la formation des liaisons  $\alpha$ -1,6 entre résidus de glucose au sein du polymère. Pour cela, elles catalysent le clivage d'une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un glucane et transfèrent la portion de chaîne clivée sur la même chaîne glucanique, on parle alors de mécanisme intramoléculaire, ou sur une chaîne glucanique adjacente, il s'agit alors d'un mécanisme intermoléculaire. Ce transfert conduit à la création d'une liaison  $\alpha$ -1,6 appelée ramification ou point de branchement. Sur la base de leur séquence protéique, les enzymes de branchement de la famille GH13 ont été classées en 2 groupes (I et II). Par la suite, des analyses biochimiques réalisées sur des BEs de chaque groupe ont permis de préciser les spécificités de chacune. Ainsi les BEs de type I ont plus d'affinité pour le substrat amylose et transfèrent de longues chaînes. A l'inverse, les BEs de types II sont plus affines pour l'amylopectine et transfèrent de courtes chaînes. Chez la plupart des monocotylédones, 2 isoformes de types II (dont une est spécifiquement localisée dans les organes de réserve) et une BE de type I sont retrouvées. En revanche, chez les dicotylédones, seule une BE de type I et une de type II sont présentes. Sur ce point, *Arabidopsis thaliana*, plante dicotylédone fait figure d'exception puisque 2 isoformes génétiquement indépendantes de BEs de type II, BE2.2 et BE2.1, sont impliquées dans la synthèse d'amidon transitoire dans les feuilles. L'analyse de mutants déficients pour l'une ou l'autre des isoformes a révélé une importante redondance fonctionnelle entre les deux protéines. Une caractérisation de ces 2 enzymes a donc été effectuée afin de déterminer leurs spécificités.

## Caractérisation biochimique de BE2.2 :

L'enzyme recombinante BE2.2 a été produite et purifiée. L'analyse par zymogramme a confirmé qu'aucun contaminant ayant une activité sur les  $\alpha$ -glucanes n'était présent dans les échantillons protéiques (Figure 30A). De plus, une étude par SAXS a permis de déterminer que BE2.2 en solution est présente sous forme monomérique en absence de substrat. Lorsque cette dernière est soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dépourvu de substrat en condition native, seule une bande d'activité est observée quelle que soit la méthode utilisée pour visualiser l'activité de branchement : par stimulation de l'activité de branchement grâce à la phosphorylase « a » ou par transfert sur un gel contenant de l'amylopectine (Figure 36B et 36D). La température et le pH optimum de BE2.2 ont été obtenus à 25°C et pH 7. Ces valeurs sont en accord avec celles déterminées pour la BE de type II chez la pomme de terre, également dicotylédone (Drummond, Smith et al. 1972). Au cours de cette caractérisation, il a été montré que BE2.2 possède plus d'affinité pour l'amylopectine que

pour l'amylose et que le substrat nécessaire à l'activité de BE2.2 est un  $\alpha$ -glucane composé d'au moins 12 résidus de glucose (Figure 53). L'analyse des produits de réaction obtenus après action de BE2.2 sur des substrats linéaires (A600, Figure 57 ; DP 4-19 Figure 58 et DP 14-28 Figure 59) et des substrats plus ou moins branchés (amylopectine Figure 53 et amylose Figure 55), a permis de démontrer que BE2.2 transfère majoritairement des glucanes de DP 6. Cette taille de glucane transféré est cohérente avec ce qui a été décrit pour d'autres enzymes de branchement où les glucanes de DP 6 sont les principaux glucanes transférés au cours de la réaction de branchement (Sawada, Nakamura et al. 2014). De plus, l'analyse structurale d'une enzyme de branchement cyanobactérienne (cceBE1 de *Cyanothece*), cristallisée en présence ou en absence de glucanes linéaires a permis aux auteurs de proposer un mécanisme dans lequel cceBE1 serait capable de fixer 6 résidus de glucose dans son site actif (Hayashi, Suzuki et al. 2017).

Le mécanisme par lequel les enzymes de branchement transfèrent la portion de chaîne clivée sur la chaîne glucanique initiale ou sur une chaîne adjacente est variable suivant l'origine des BEs étudiée. Par exemple, dans le cas de *Rhodothermus obamensis*, le mécanisme de la BE est principalement inter-moléculaire. Cette enzyme est ainsi capable de produire un polysaccharide comparable au glycogène, possédant 15% de liaison  $\alpha$ -1,6 à partir de glucanes linéaires (Roussel, Lancelon-Pin et al. 2013). Dans le cas d'un mécanisme de branchement inter-moléculaire, la chaîne clivée est transférée sur un autre glucane, la portion de chaîne n'ayant pas été transférée est alors libérée/hydrolysée durant de la réaction et conduit donc à l'apparition de glucanes plus courts. Dans le cas de BE2.2, l'incubation de l'enzyme avec le même type de substrat n'aboutit pas à la formation de particules de haut poids moléculaire comme dans le cas de la BE de *Rhodothermus obamensis*. De plus, lorsque BE2.2 est incubée avec de l'amylose, aucun glucane de faible degré de polymérisation n'est libéré au cours de la réaction. Ces résultats indiquent qu'aucune réaction de cyclisation ne s'est produite contrairement à ce qui a été décrit pour l'enzyme bactérienne de *Bacillus stearothermophilus* (Takata, Takaha et al. 1994; Takata, Takaha et al. 1996). L'absence de glucanes de faibles DP, libérés au cours de la réaction, suggère également qu'aucune hydrolyse n'a eu lieu et donc qu'aucune molécule d'eau ne peut servir d'accepteur à la chaîne glucanique préalablement clivée. L'ensemble de ces résultats corrèle avec un mécanisme de branchement intra-moléculaire pour la BE2.2 d'*Arabidopsis thaliana*.

Les activités spécifiques de BE2.2 obtenues en utilisant différentes concentrations en amylose ou en amylopectine comme substrat ont été ajustées à des sigmoïdes (Figure 48C et D). Ces résultats indiquent qu'en présence d'un substrat plus ou moins branché, BE2.2 subit un changement (conformationnel et/ou d'oligomérisation). Cette conclusion corrèle avec les résultats obtenus après migration, en conditions natives, de BE2.2 sur différents gels de polyacrylamide contenant des

concentrations variables en substrat (Figures 37 et 38). Dans ces conditions de migration, BE2.2 a la possibilité d'interagir avec le substrat présent dans le gel et des retards de migration de BE2.2, dépendant de la concentration en substrat, ont pu être évalués. Les variations du profil de migration peuvent être causées par l'affinité au substrat et/ou être liées à une conformation différente ou encore à des états d'oligomérisation différents de la protéine. En absence de substrat dans le gel, l'enzyme n'est présente que sous une seule forme, active (Figure 36C et 36E). Lorsque de l'amylose ou de l'amylopectine est additionné au gel, 3 formes actives correspondant à BE2.2 sont détectées. Ces 3 états sont présents quelle que soit la concentration en amylose ou amylopectine dans le gel. Néanmoins, plus la concentration en substrat dans le gel augmente, plus le retard de migration est important. De plus, le type de glucane utilisé comme substrat influence également le profil de migration. Le retard de migration est plus prononcé lorsque de l'amylopectine est utilisé comme substrat plutôt que de l'amylose. Cette observation confirme le fait que l'affinité de BE2.2 est plus importante pour les substrats branchés (Figures 37C et 38C). En revanche, lorsque des  $\alpha$ -1,4 glucanes linéaires (A600) sont additionnés au gel, quelle que soit la concentration utilisée, l'affinité de l'enzyme pour ce substrat n'est pas suffisante pour retarder sa migration (Figure 39). De plus, seule une bande d'activité est observée en présence de glucanes linéaires suggérant qu'ils n'induisent pas de changement dans la conformation de l'enzyme, même à forte concentration (0,3 %). La présence de 3 formes actives correspondant à BE2.2 est donc uniquement induite par l'interaction de l'enzyme avec des substrats branchés. La formation de ces 3 espèces enzymatiquement actives peut expliquer le fait que les activités spécifiques déterminées *in vitro* s'ajustent à une sigmoïde (Figure 48C et D). L'ensemble de ces résultats implique qu'un processus d'association coopérative positive impacte la cinétique de réaction BE2.2, ce processus a déjà été décrit pour l' $\alpha$ -glucosidase I de l'abeille asiatique (*Apis cerana japonica*), un autre membre de la famille GH13 (Wongchawalit, Yamamoto et al. 2006; Porter and Miller 2012).

La résolution de la structure de l'enzyme de branchement de type I du riz a mis en évidence plusieurs sites d'interaction avec le substrat (Chaen, Noguchi et al. 2012). Les auteurs ont alors proposé qu'un processus d'oligomérisation de l'enzyme puisse avoir lieu lorsqu'elle est en présence de son substrat. Bien que les résidus impliqués dans cette interaction ne soient pas strictement conservés chez BE2.2 (Annexe 6), il est possible qu'un mécanisme semblable puisse intervenir pour l'enzyme de branchement d'*Arabidopsis*. Basé sur l'ensemble de nos résultats, nous ne pouvons pas discriminer si BE2.2 est présente sous différents états d'oligomérisation lorsqu'elle est en présence de substrats branchés ; si ces derniers influencent la conformation de l'enzyme monomérique (Porter and Miller 2012) se trouvant alors dans des états présentant plus ou moins d'affinité pour le substrat piégé dans le gel; ou encore si les deux processus ont lieu.

Néanmoins, l'analyse par SAXS a démontré que l'enzyme BE2.2 recombinante est présente sous forme monomérique en absence de substrat, il est possible que l'interaction avec des substrats branchés induise un changement conformationnel de l'enzyme menant à une augmentation de l'affinité et expliquant les sigmoïdes obtenues (Figure 48C et D). De telles observations ont déjà été faites pour la glucokinase humaine, enzyme monomérique, qui existe sous 2 formes, une conformation ouverte inactive et une fermée active (Kamata, Mitsuya et al. 2004). En se basant sur le modèle établi pour l'enzyme cceBE1 de *Cyanothece*, il est possible que la liaison à un substrat donneur branché dans le sillon catalytique et la formation de glucane de DP 6 (transféré par la suite sur une molécule acceptrice) facilitent l'insertion du substrat accepteur dans le même sillon catalytique permettant ainsi le transfert du glucane sur la même molécule. Le modèle moléculaire obtenu pour BE2.2 corrèle avec l'insertion de six glucoses dans le sillon catalytique et semble donc indiquer qu'un même mécanisme que celui proposé pour cceBE1 puisse avoir lieu dans le cas de BE2.2.

L'étude par SAXS suggère que l'organisation des domaines de BE2.2 est similaire à celle décrite pour l'enzyme de branchement de *Mycobacterium tuberculosis* MtBE1. Néanmoins, cette forme enzymatique de BE2.2 correspondrait à la forme moins active. L'interaction avec un substrat branché pourrait alors conduire à un changement conformationnel, et l'enzyme sous cette forme active adopterait alors avoir une structure proche de celle décrite pour cceBE1.

## Caractérisation biochimique de BE2.1

L'enzyme recombinante BE2.1 a également été produite et purifiée. L'analyse par zymogramme a confirmé qu'aucun contaminant ayant une activité sur les  $\alpha$ -glucanes n'était présent dans les échantillons protéiques (Figure 40A). L'analyse du profil de migration de BE2.1 par chromatographie d'exclusion stérique (Figure 30B) a révélé que l'enzyme est présente sous différents états oligomériques en absence de substrat : une forme de très haut poids moléculaire, éluée dans le volume mort de la colonne, une forme dont le poids moléculaire estimé correspondrait à un dimère de BE2.1 et une forme monomérique. Au regard de ces résultats, il semble que BE2.1, en solution sans substrat, soit capable de former des oligomères. La formation de multimères a déjà été observée pour les BEs de type II chez le blé. Les auteurs ont mis en évidence la formation de dimères de BEIIa et également de BEIIb (Tetlow, Beisel et al. 2008).

Lorsque BE2.1 est soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dépourvu de substrat en condition native, au moins trois bandes, plus ou moins intenses sont observées (Figure 40C). Ces 3 espèces pourraient correspondre aux trois formes oligomériques observées par

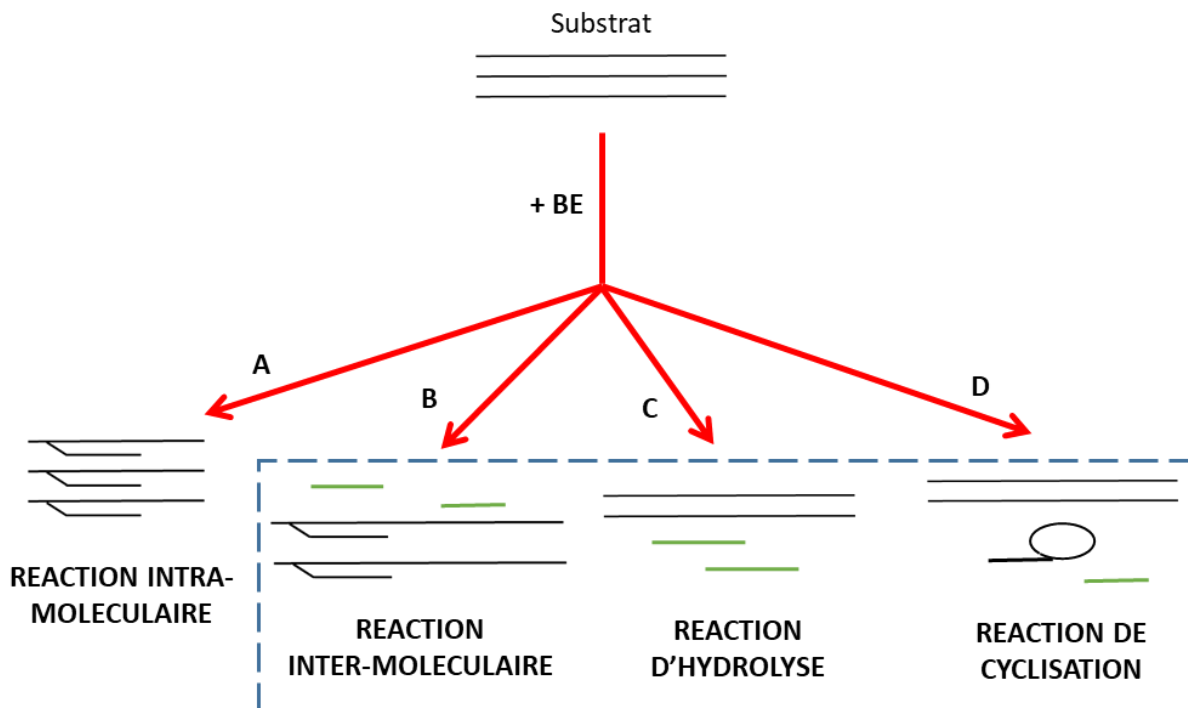
chromatographie d'exclusion stérique. Néanmoins, l'activité de ces différentes formes diffère : seule une bande d'activité, intense et très haute dans le gel est observée en visualisant l'activité de branchement par stimulation grâce à la phosphorylase « a » (Figure 40B). En revanche, une bande d'activité, plus basse dans le gel, faiblement intense, est observée après transfert sur un gel contenant de l'amylopectine (Figure 40D). Il est possible que ces différentes formes soient plus ou moins actives sur le substrat mis en présence (glucanes linéaires dans un cas et amylopectine dans l'autre cas) et/ou que les différentes formes n'aient pas pu être transférées sur le gel contenant de l'amylopectine ou encore qu'il y ait eu une perte d'activité au cours du transfert.

Les résultats obtenus après migration, en conditions natives, de BE2.1 sur différents gels de polyacrylamide contenant des concentrations variables en substrat (Figures 41 et 42) ont montré que ces différentes formes ont un profil de migration différent. Dans ces conditions de migration, BE2.1 peut interagir avec le substrat présent dans le gel et des retards de migration de BE2.1, dépendant de la concentration en substrat, ont pu être évalués. Ces variations de profil de migration peuvent être causées par l'affinité au substrat et/ou liées à des états d'oligomérisation différents de la protéine ou encore à plusieurs états conformationnels. En absence de substrat dans le gel, l'enzyme est présente sous plusieurs formes, actives (Figure 40B, C et D). Lorsque l'amylose ou l'amylopectine est additionné au gel, aux moins trois formes actives correspondant à BE2.1 sont détectées. Ces différentes formes sont présentes quelle que soit la concentration en amylose ou amylopectine dans le gel. La forme protéique très retenue dans le gel est active et semble être très abondante. Cette dernière ne pénétrant pas dans le gel, quel que soit le substrat ou la concentration utilisée, ses constantes d'affinités envers différents substrats n'ont pu être évaluées. Lorsque la concentration en substrat dans le gel augmente, le retard de migration est plus important pour les autres bandes d'activité. Comme dans le cas de BE2.2, le type de glucane utilisé comme substrat influence également le profil de migration. Le retard de migration est plus prononcé lorsque de l'amylopectine est utilisé comme substrat plutôt que de l'amylose pour les deux formes qui migrent dans le gel. Pour ces deux formes, les  $K_s$  déterminées attestent que l'affinité de BE2.1 est plus importante pour les substrats branchés (Figures 41C et 42C). En revanche, lorsque le substrat linéaire A600 est additionné au gel, quelle que soit la concentration en  $\alpha$ -1,4 glucanes utilisée, l'affinité de l'enzyme pour ce substrat est très faible et l'enzyme n'est pas retardée dans le gel (Figure 43). La présence de différentes espèces/oligomères enzymatiquement actifs, ayant une affinité plus ou moins forte pour le substrat peut expliquer le fait que les activités spécifiques de BE2.1 obtenues en utilisant différentes concentrations en amylose ou en amylopectine comme substrat ont été ajustées à des sigmoïdes (Figure 49C et D). Dans le cas de certaines enzymes oligomériques, il a été montré que la fixation du substrat sur une sous-unité peut être responsable d'un changement structural et/ou conformationnel qui modifie l'affinité du site actif

d'une autre sous unité. Cette interactivité induit alors un mécanisme enzymatique qui ne suit pas le modèle de Mickaelis-Menten. Cela expliquerait le processus d'association coopérative positive qui impacte la cinétique de réaction de BE2.1. Par ailleurs, les activités spécifiques de BE2.1 déterminées en utilisant différentes concentrations en amylose ou en amylopectine ont confirmé que BE2.1 possède une affinité plus importante pour l'amylopectine. Au cours de cette caractérisation, la température et le pH optimum de BE2.1 ont été obtenus à 20°C et pH 6.5. Il a été montré que la BEIIb du maïs a également une activité maximale dans cette gamme de température (entre 15 et 20°C ; (Takeda, Guan et al. 1993)).

Nous avons pu démontrer que le substrat nécessaire à l'activité de BE2.1 est un  $\alpha$ -glucane composé d'au moins 10 résidus de glucose après incubation avec des glucanes de faible degré de polymérisation (Figure 63). L'analyse des produits de réaction obtenus après action de BE2.1 sur des substrats linéaires (A600, Figure 62 ; DP4-19 Figure 63 et DP 14-28 Figure 64) et des substrats plus ou moins branchés (amylopectine Figure 60 et amylose Figure 61), a permis de démontrer que BE2.1 transfère majoritairement des glucanes de DP 6 et 7. Cette taille de glucane transféré est cohérente avec ce qui a été décrit pour d'autres enzymes de branchement de type II, comme la BEIIb du riz où les glucanes de DP 6 et 7 sont les principaux glucanes transférés au cours de la réaction de branchement (Sawada, Nakamura et al. 2014). La comparaison du modèle moléculaire obtenu pour BE2.1 avec la structure de l'enzyme de branchement cyanobactérienne (cceBE1 de *Cyanothece*), cristallisée en présence de glucanes linéaires (Hayashi, Suzuki et al. 2017) montre que BE2.1 peut également insérer six résidus de glucose dans son site actif. Néanmoins, le modèle moléculaire de BE2.1 met en évidence une orientation différente de la boucle  $\beta_3 \rightarrow \alpha_3$  (incluant le site B) et une boucle en aval de la région IV du domaine catalytique (incluant le site C) en comparaison avec le modèle de BE2.2. Bien qu'uniquement basées sur un modèle moléculaire, ces différences pourraient suggérer la présence d'un sillon catalytique plus grand pour BE2.1 que pour BE2.2 et permettrait donc à l'enzyme d'accueillir un glucane plus grand, de DP 7 par exemple.

Le mécanisme par lequel BE2.1 transfère la portion de chaîne clivée est difficile à évaluer. En effet, la libération de chaînes glucaniques courtes durant la réaction de branchement peut être due à des réactions parasites d'hydrolyse ou de cyclisation. De même, au cours d'une réaction intermoléculaire, on observe également l'apparition de glucanes courts qui correspondent aux portions de chaînes clivées qui ne sont pas transférées sur d'autres chaînes glucaniques (Figure 69).



**Figure 69: Représentation schématique des différentes réactions pouvant avoir lieu après incubation d'un substrat avec une enzyme de branchement.** (A) Une réaction intra-moléculaire, l'incubation avec une BE conduit à un réarrangement des chaînes glucaniques sans variation du degré de polymérisation des chaînes. (B) Une réaction inter-moléculaire, la BE clive une chaîne glucanique et transfère la portion de chaîne clivée sur une chaîne glucanique adjacente. Il y a libération de glucanes courts (vert) et production de glucanes de plus grand DP. (C) Une réaction d'hydrolyse qui mène à la libération de glucanes courts (vert). (D) Une réaction de cyclisation, le glucane est branché sur lui-même et une partie de la chaîne glucanique est libérée (vert). En bleu, sont encadrés les trois types de réaction (inter-moléculaire, d'hydrolyse et de cyclisation) conduisant à la libération de glucanes courts.

Quel que soit le substrat utilisé (amylopectine, amylose, ou  $\alpha$ -glucanes linéaires), on observe une libération de glucanes courts durant la réaction de branchement. Lorsque les glucanes linéaires, de DP 14 à 28, sont utilisés comme substrat, la production de glucanes de faible DP au cours de la réaction est très fortement marquée (Figure 64B). Ce résultat suggère qu'un mécanisme inter-moléculaire puisse avoir lieu. Dans le cas d'un mécanisme inter-moléculaire, on observe la formation de glucanes de plus haut degré de polymérisation ainsi que la libération de chaînes courtes durant la réaction (Figure 69B). La production de glucanes de plus haut DP, après réaction de BE2.1 avec des glucanes linéaires, n'a pas été observée ou ces derniers ne sont pas présents en quantité suffisante pour être détectés. Néanmoins l'apparition de glucanes de DP 6 et 7 après débranchement enzymatique atteste que la réaction de branchement a bien eu lieu et que ces glucanes sont les principaux produits de la réaction de branchement (Figure 64F).



L'analyse de la séquence protéique de BE2.1 a révélé l'existence d'un domaine N-terminal plus long que BE2.2, cette région prédite désordonnée corrèle avec le domaine allongé et dynamique mis en évidence par l'analyse SAXS de BE2.1 (Figure 35A). Bien que cette région N-terminale n'est pas été prédite comme impliquée dans des interactions protéine-protéine (Figure 27B), il est possible qu'elle soit responsable de la formation d'oligomère de BE2.1, qui viendrait stabiliser l'enzyme.

## Caractérisation biochimique de GlgB

Après production et purification de l'enzyme de branchement d'*E. coli* GlgB (Figure 30E), cette dernière est soumise à une électrophorèse en conditions natives, sur gel de polyacrylamide contenant du substrat (amylopectine). Une seule bande d'activité caractéristique de l'enzyme a pu être observée (Figure 30F).

Comme pour les BEs d'*Arabidopsis*, les conditions optimales de température et de pH de l'enzyme ont été déterminées *in vitro*, à savoir pH 7,5 et 37°C (Figure 50A et B). Bien que ces valeurs semblent cohérentes avec les conditions optimales pour la culture des bactéries, la température optimale déterminée ici semble être plus élevée que celle déterminée *in vitro* par Guan et collaborateurs (de 30°C). Dans leur étude, les auteurs ont utilisé un test d'activité qui permet le dosage des ramifications créées par les BEs. Pour cela, les enzymes de branchement sont incubées avec de l'amylose réduit. Les produits de la réaction sont ensuite soumis à un débranchement enzymatique, de nouvelles extrémités réductrices sont alors libérées. Le pouvoir réducteur de celles-ci pourra être dosé. Il est possible que les conditions utilisées dans leur étude, par exemple le tampon, soient à l'origine des différences observées en comparaison avec nos résultats.

Contrairement aux enzymes de branchement d'*Arabidopsis*, GlgB se comporte comme une enzyme de type Michaélienne. En effet, les activités spécifiques obtenues à différentes concentrations en amylose s'ajustent à une hyperbole (Figure 50C). Ce comportement a déjà été observé pour l'enzyme de branchement impliquée dans la synthèse du glycogène chez *Rhodothermus obamensis* qui présente également une cinétique Michaélienne. Néanmoins cette dernière est beaucoup plus réactive sur le substrat amylose avec un  $K_M$  de 0,7 mg.ml<sup>-1</sup> qui est 17 fois supérieur à celui de GlgB (11,83 mg.ml<sup>-1</sup>).

La caractérisation des produits de réaction de l'enzyme incubée avec des substrats linéaires et branchés a également été effectuée. Lorsque GlgB est incubée avec des substrats linéaires, au moins 10 résidus de glucose sont nécessaires à l'activité de l'enzyme (Figure 68). Contrairement aux enzymes de branchement d'*A. thaliana*, aucun glucane n'est préférentiellement produit au cours de la réaction de branchement.

De manière intéressante, le profil de DLC après débranchement des produits de réaction obtenus en incubant GlgB avec de l'amylopectine ou de l'amylose, montre une distribution de longueur de chaîne similaire à celle observée pour le glycogène (Yoo, Keppel et al. 2007), ce qui n'est pas le cas lorsque le A600 ou le DP 4-19 sont utilisés comme substrat. En effet, dans le profil de DLC du glycogène chez *E. coli*, on observe une distribution bimodale où les glucanes de DP 5 à 20 sont les plus représentés avec un léger épaulement autour du DP 22. Il est donc possible que le A600 et le DP 4-19 ne soient pas de bons analogues du substrat naturel de GlgB. Lorsque l'amylopectine est utilisée comme substrat, la réaction de branchement par GlgB conduit à la libération de glucanes de DP<14 (Figure 65C). Dans le glycogène, la répartition des points de branchement se fait de manière uniforme au sein du polymère, avec une liaison  $\alpha$ -1,6 tous les 10 à 13 résidus de glucose (Lerner and Krisman 1996). Les résultats obtenus ici pour GlgB sont donc cohérents avec ce qui est retrouvé *in vivo*.

Comme la BE de *R. obamensis* (RoBE), l'enzyme de branchement d'*E. coli* est capable de libérer des glucanes au cours de la réaction de branchement mais cette libération de glucanes de faibles DP est beaucoup moins marquée que celle de RoBE et semble plus proche de ce qui est observé dans le cas de BE2.1. Comme pour cette dernière, la libération de glucanes courts durant la réaction de branchement avec des substrats linéaires (Figure 68B) laisse suggérer qu'un mécanisme intermoléculaire puisse avoir lieu. Néanmoins, de la même façon que pour BE2.1, aucun glucane de plus haut DP n'est détecté par HPAEC-PAD, lorsque l'enzyme est incubée avec des substrats linéaires.

L'affinité de GlgB pour des glucanes linéaires et branchés a également été évaluée par retard sur gel. Cependant, les résultats issus de ces travaux sont à considérer avec précautions et les analyses devront être répétées. En effet, après migration sur zymogramme en conditions dénaturantes, deux formes sont présentes et actives (Figure 44A), suggérant que GlgB puisse être sensible à la congélation. Une optimisation des conditions de conservation de l'enzyme sera nécessaire.

Après migration, dans des conditions natives et en absence de substrat, deux formes sont également détectées par coloration au bleu de Coomassie (Figure 45A), bien que l'activité d'une seule de ces deux formes ait été mise en évidence par stimulation avec la phosphorylase « a » (Figure 44B). Lorsque de l'amylose ou de l'amylopectine est additionné au gel, deux formes actives sont détectées et ces dernières sont présentes quelle que soit la concentration en amylose ou amylopectine dans le gel. Néanmoins, la forme minoritaire, moins retardée, ne présente pas un rapport de migration proportionnel à la quantité de substrat présente dans le gel, et pourrait correspondre à un produit de dégradation de GlgB.

Lorsque la concentration en substrat dans le gel augmente, le retard de migration de la forme majoritaire de GlgB devient plus important. De plus, le type de glucane utilisé comme substrat

influence également le profil de migration. Le retard de migration est plus prononcé lorsque de l'amylose est utilisé comme substrat plutôt que de l'amylopectine. Cette observation indique que GlgB a plus d'affinité pour l'amylose (Figures 45C et 46C). Ce résultat concorde avec les résultats obtenus par Guan et collaborateurs et également sur d'autres enzymes de branchement comme RoBE (Guan, Li et al. 1997; Shinohara, Ihara et al. 2001). En revanche, lorsque des substrats strictement linéaires (A600) sont additionnés au gel, quelle que soit la concentration utilisée en  $\alpha$ -1,4 glucanes, l'affinité de l'enzyme pour ce substrat n'est pas suffisante pour retarder sa migration (Figure 47).

Le  $K_s$  obtenu sur l'amylose est très faible ( $0,088 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) en comparaison au  $K_M$  ( $11,83 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) déterminé pour ce substrat. Il est possible que la très forte affinité de GlgB pour ce substrat soit responsable d'une faible efficacité catalytique de l'enzyme.

L'analyse des BEs recombinantes d'*Arabidopsis thaliana*, a révélé que ces dernières ont une spécificité de glucanes transférés similaire à celle observée chez les BEs de type II déjà caractérisées, à savoir le transfert de chaînes courtes. De plus, elles possèdent plus d'affinité pour des substrats branchés, avec une préférence pour l'amylopectine plutôt que l'amylose, ce qui concorde également avec les données connues sur les enzymes de branchement de type II.

Néanmoins, leur activité semble différemment influencée par la nature du substrat. Bien qu'elles soient toutes deux faiblement affines pour des substrats linéaires, au regard des migrations sur gels de polyacrylamide contenant du A600, BE2.2 est très peu réactive sur ces derniers au contraire de BE2.1 qui semble réagir sur ces substrats. En effet, les profils de DLC des produits de réaction de BE2.2 avec des glucanes linéaires de faible DP 4-19 et 14-28 ne montrent aucune modification significative du substrat par l'enzyme. BE2.1 diffère sur ce point et est capable de modifier significativement les glucanes linéaires, en particulier le mélange composé de DP 14 à 28.

L'interaction de BE2.2 et BE2.1 avec des  $\alpha$ -1,4 glucanes branchés induit, pour chaque isoforme, des changements conformationnels dont la nature reste à déterminer. Ces observations sont renforcées par les sigmoïdes obtenues au cours de la détermination des activités spécifiques des enzymes en présence d'amylose et d'amylopectine. Si BE2.1 est capable d'exister sous plusieurs formes oligomériques même en absence de substrat, dans le cas de BE2.2, la formation de différentes espèces de l'enzyme est uniquement provoquée par l'interaction avec des glucanes branchés.

**Table 6 : Récapitulatif des résultats obtenus au cours de la caractérisation biochimiques des BEs d'*A. thaliana* et de GlgB d'*E. coli* :**

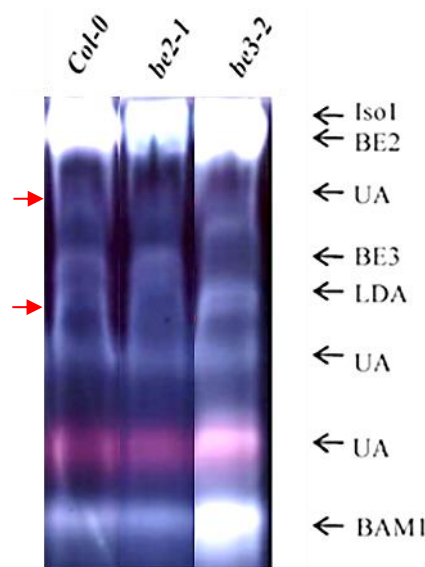
	BE2.2	BE2.1	GlgB
oligomérisation	Putative en présence de substrats branchés	Oui	Non
R <sub>g</sub> en Å	34,5	49,7	
D <sub>max</sub> en Å	126	200	
K <sub>s</sub> (amylose) mg.ml <sup>-1</sup>	1,81-5,82-9,65	8,17-9,73	0,088
K <sub>0.5</sub> (amylose) mg.ml <sup>-1</sup> , (nombre de Hill)	1,53, (2,8)	1,68, (2,7)	K <sub>M</sub> 11,83mg.ml <sup>-1</sup>
K <sub>s</sub> (amylopectine) mg.ml <sup>-1</sup>	0,71-1,73-3,28	5,2-7,83	0,35
K <sub>0.5</sub> (amylopectine) mg.ml <sup>-1</sup> , (nombre de Hill)	1,1, (3,4)	1.27, (2,6)	Non déterminé
Température optimale en °C	25	20	37
pH optimal	7	6,5	7,5
Taille minimale du substrat	DP 12	DP 10	DP 10
Chaînes impliquées dans un point de branchement	DP 6	DP 6 et 7	DP<14
Libération de glucanes courts durant la réaction	Non	Oui	Oui

\* les différentes mesures de K<sub>s</sub>, indiquées en rouge, bleu clair et bleu foncé correspondent aux valeurs obtenues pour les différentes formes observées sur gel : la forme la plus retardée (quand celle-ci a pu être mesurée), la forme intermédiaire et la forme la moins retardée respectivement. Le code couleur est le même que celui utilisé en figures 37, 38, 41 et 42.

## Etude des mutants dépourvus de BE2.2, BE2.1 ou exprimant GlgB chez *Arabidopsis*

Au regard des résultats obtenus pour BE2.2 recombinante, de nouvelles interprétations ont pu être faites concernant l'activité de l'enzyme *in planta*. Après avoir fait migrer des extraits cellulaires de feuille d'*Arabidopsis* sur un gel de polyacrylamide contenant de l'amidon à 0,3 % comme substrat, Dumez *et al*, 2006 ont initialement identifié une bande d'activité, très haute dans le gel, correspondant à BE2.2. Cette bande est absente dans le mutant déficient pour l'isoforme BE2.2 et présente dans la référence sauvage (indiquée à droite du gel et nommée BE2 Figure 32). Cependant, 2 bandes d'activité

disparaissent également dans les pistes correspondant à l'extrait dépourvu de BE2.2 (indiquées par une flèche rouge Figure 70). Ces 2 bandes d'activité n'avaient pu être attribuées à l'époque à une activité connue. Au regard des résultats obtenus au cours de ma thèse, il est donc fortement probable que ces 3 formes correspondent aux 3 formes observées pour BE2.2 recombinante. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure le fait que ces formes actives puissent résulter de l'interaction de BE2.2 avec d'autres enzymes du métabolisme de l'amidon comme cela a été décrit pour les BEs et les amidon-synthases par exemple (Tetlow, Morell et al. 2004; Hennen-Bierwagen, Liu et al. 2008; Tetlow, Beisel et al. 2008; Hennen-Bierwagen, Lin et al. 2009; Crofts, Abe et al. 2015).



**Figure 70 : Zymogrammes des activités modifiant l'amidon (adapté du Dumez et al., 2006).** 100 µg de protéines extraites de feuilles d'*Arabidopsis* sont soumises à une migration sur gel de polyacrylamide (contenant 0,3 % d'amidon) en conditions natives. A l'issue de la migration, le gel est incubé sur la nuit à température ambiante dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,0, DTT 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM. L'activité des protéines modifiant l'amidon est ensuite révélée par coloration à l'iode. Col-0: correspond au témoin sauvage, be2-1 et be3-2 à des mutants déficients pour BE2.et BE2.1 respectivement. Iso1: activité isoamylase (Wattebled et al., 2005); AtBAM1 correspond au gène At4g15210 codant une β-amylase. Pullulanase correspond au gène At5g04360 (Wattebled et al. 2005).

A l'heure actuelle, la présence d'une forme très retenue de BE2.1 n'a pas été observée à partir d'extraits protéiques de feuilles d'*Arabidopsis* (Figure 70). Son existence *in vivo* n'est donc pas vérifiée. Son observation au cours de mon travail de thèse pourrait résulter d'un artéfact de production de la protéine recombinante ou alors cette forme de BE2.1 est effectivement présente dans l'extrait cellulaire mais serait masquée sur le zymogramme de la figure 70 par une autre activité comme celle de BE2.2 ou d'une isoamylase.

La comparaison des profils de migration de BE2.2 et BE2.1, extraites des feuilles d'*Arabidopsis*, semble néanmoins indiquer que l'isoforme BE2.1 a moins d'affinité que BE2.2 pour le substrat amidon. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus pour les enzymes BE2.2 et BE2.1 recombinantes pour lesquels BE2.2 présente une affinité plus grande que BE2.1 pour l'amylopectine, composant majoritaire de l'amidon.

Les enzymes recombinantes BE2.2 et BE2.1 possèdent des spécificités de réaction proches (forte affinité pour l'amylopectine, longueur des chaînes transférées, conditions optimales d'activité), ce qui est cohérent avec les phénotypes semblables des simples mutants observés chez la plante. De plus, chez le mutant dépourvu de BE2.2 on observe une très forte diminution des glucanes de DP 6 tandis que les lignées dépourvues de BE2.1 présentent un déficit plus important des glucanes de DP 7 (Dumez et al, 2006). Ces résultats corrént avec ceux obtenus après incubation de BE2.2 et BE2.1 avec divers substrats (table 6).

Si BE2.2 recombinante est très peu réactive sur les substrats linéaires, au contraire BE2.1 recombinante semble réagir sur ces derniers. Il est possible que BE2.1 puisse donc agir en amont de BE2.2 chez la plante. BE2.1 produirait alors une ou plusieurs molécule(s) branchée(s) servant de substrat pour BE2.2.

Au cours d'un cycle jour/nuit, les plantes sont soumises à des variations de température. Le pH du stroma varie au cours de la journée et augmente progressivement (de 7,2 en début de phase lumineuse à 7,9 en fin de jour) (Heldt, Werdan et al. 1973), l'activité enzymatique de BE2.1 dans ces conditions oscille entre 60 et 20 % de son activité maximale (observée à pH 6,5). De plus, il a été montré que l'expression de BE2.1 varie au cours de la journée chez la plante, celle de BE2.2 en revanche reste constante au cours du jour et de la nuit (Smith, 2004). L'expression de BE2.1 plus élevée en fin de jour pourrait être due à un processus de compensation de la plante qui en produit une plus grande quantité pour pallier la baisse d'activité liée à l'augmentation du pH en fin de jour. Ces observations renforcent l'idée d'une activité de BE2.1 en amont de celle de BE2.2.

L'état de phosphorylation des BEs de type II est également un facteur influençant l'activité de ces dernières. Chez le blé (Tetlow, Morell et al. 2004), il a été montré que la phosphorylation augmente l'activité enzymatique des 2 isoformes de BEs. Il est donc possible d'envisager que des phosphorylations de BE2.2 et BE2.1 puissent avoir lieu dans la plante et qu'elles puissent également influencer l'activité de celles-ci, en augmentant l'activité de BE2.2 envers des glucanes linéaires par exemple. Chez le maïs, Makhmoudova et collaborateurs, ont identifié plusieurs serines pouvant être des sites de phosphorylation. Ces serines sont conservées dans les BEs de plantes et sont également présentes au sein des BEs d'*Arabidopsis* (S<sup>230</sup> et S<sup>241</sup> pour BE2.2 et S<sup>289</sup> et S<sup>300</sup> pour BE2.1) (Makhmoudova, Williams et al. 2014).

Au cours de l'expression de BE2.2 et BE2.1 recombinantes, il est peu probable que ces serines soient phosphorylées dans *E. coli*, mais dans la plante leur phosphorylation pourrait avoir un rôle de régulation de la catalyse.

Plusieurs équipes de recherche ont démontré, chez les céréales, que les enzymes de branchement sont impliquées dans différents complexes hétéromultimériques impliquant des amidon-synthases et/ou des amidon-phosphorylases et que la formation de ces complexes est dépendante de la phosphorylation des protéines (Tetlow, Morell et al. 2004; Hennen-Bierwagen, Lin et al. 2009; Liu, Makhmoudova et al. 2009). L'interaction entre différentes enzymes du métabolisme de l'amidon pourrait impacter l'affinité de chacune d'entre elles pour leur substrat ou leur accessibilité (due à l'encombrement stérique). Chez le maïs, la suppression et/ou l'inactivation d'une BE de type II engendre des modifications dans l'édification de ces complexes et impacte la structure du polysaccharide produit (Liu, Makhmoudova et al. 2009; Liu, Ahmed et al. 2012). Il est fort probable que le même type de complexes existe chez *Arabidopsis thaliana*.

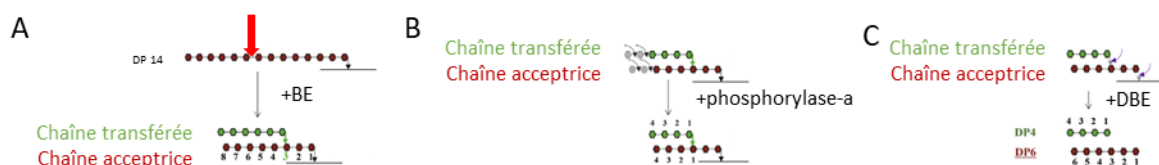
Ainsi BE2.2 et BE2.1 pourraient intervenir au sein de complexes avec les amidons-synthases comme cela a été observé chez les céréales. La réactivité de BE2.2 envers les glucanes linéaires pourrait, par ce biais, être augmentée. De même, au regard de l'affinité de BE2.1 pour les glucanes linéaires, il est possible d'imaginer l'existence d'un complexe qui impliquerait BE2.1 et SS1 par exemple. SS1 synthétiserait alors des glucanes de faible DP pouvant être modifiés par BE2.1.

# PERSPECTIVES



Afin de discriminer par quel mécanisme BE2.1 et GlgB transfèrent les chaînes glucaniques, des cinétiques d'incubations avec des substrats linéaires seront réalisées. Les produits de réaction seront ensuite analysés par électrophorèse capillaire. Cette technique permet de séparer et détecter des glucanes de degré de polymérisation plus élevé ( $\approx$ DP 150). Elle a également l'avantage d'être très sensible et quantitative. Si des glucanes de plus haut DP sont créés par les BEs, ils pourraient alors être détectés.

Un traitement par des glucoamylases pourra être effectué sur les produits de réaction de chaque BE. Ces enzymes sont des exo-amylases qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 à partir des extrémités non réductrices. Si la réaction d'une BE avec le substrat n'aboutit pas à une cyclisation des glucanes alors les produits branchés formés seront hydrolysés. En revanche, si des glucanes cyclisés sont présents, les glucoamylases ne pourront pas dégrader ces derniers qui pourront alors être précipités à l'éthanol (Takata, Takaha et al. 1996). Sawada et collaborateurs, ont démontré que GlgB est capable d'agir sur des chaînes internes. De même, GlgB privilégie les chaînes externes comme chaînes acceptrices des glucanes transférés. Les auteurs ont pu déduire que GlgB transférerait spécifiquement sur le 3<sup>e</sup> résidu de glucose de l'extrémité réductrice de la chaîne acceptrice. Pour déterminer la position des points de branchement au sein des produits formés, ces derniers ont été soumis à une phosphorylyse, grâce à la phosphorylase « a ». En présence de phosphate inorganique, cette enzyme clive les liaisons  $\alpha$ -1,4 à partir de l'extrémité non réductrice et libère du G1P. De plus, elle ne peut pas agir sur les liaisons  $\alpha$ -1,6 et s'arrête à quatre résidus du point de branchement. La molécule ainsi obtenue après digestion est appelée limite dextrine et correspond de manière simplifiée au squelette de la molécule branchée. Les limites dextrines sont ensuite soumises à un débranchement enzymatique et les glucanes libérés sont analysés (Figure 71). Le même type d'analyse pourra être entrepris pour les BEs d'*Arabidopsis* afin de déterminer plus spécifiquement la position des points de branchement au sein du polysaccharide produit.



**Figure 71 : Représentations schématiques des analyses permettant la détermination de la position du point de branchement après réaction avec une BE.** (A) Le substrat est incubé avec une BE qui clive une liaison  $\alpha$ -1,4 (indiquée par une flèche rouge) et transfère la portion de chaîne clivée (en vert) sur une chaîne glucanique acceptrice (en marron). (B) Les produits de réaction de la BE sont soumis à l'action de la phosphorylase « a » qui hydrolyse les résidus de glucose (indiqués en gris) à partir des extrémités non réductrices et libère du G1P. La phosphorylyse des glucanes branchés s'arrête à 4 résidus de la liaison  $\alpha$ -1,6. Les produits ainsi obtenus sont appelés limites dextrines. (C) Les limites dextrines sont soumis à l'action des DBEs qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,6.

L'analyse par SAXS de BE2.2 suggère que l'organisation des domaines de BE2.2 est similaire à celle décrite pour MtBE1 et que cette forme enzymatique correspondrait à la forme moins active. L'interaction avec un substrat branché pourrait alors conduire à un changement conformationnel de l'enzyme qui sous cette forme active, aurait une structure proche de celle décrite pour cceBE1. De plus, cette étude a également révélée que BE2.2 est stable et dépourvue de région désordonnée. La résolution de la structure de BE2.2 seule et en complexes avec des substrats branchés par cristallographie aux rayons X (actuellement en cours au laboratoire), permettra alors de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, de déterminer le rôle des différents domaines dans la spécificité de substrat et permettra de déterminer l'implication éventuelle des sites A, B et C dans la catalyse.

En revanche, BE2.1 présente une région N-terminale plus longue que BE2.2 et dynamique, susceptible de perturber la cristallisation de l'enzyme. Afin de cristalliser la protéine, un clivage de cette région devra être réalisé. Néanmoins, il est possible que l'association en multimères puisse stabiliser BE2.1. Une étude par SAXS des différents oligomères de BE2.1 sera effectuée, si ces derniers sont plus stables, ils pourront alors être purifiés et des essais de cristallisation pourront être entrepris.

Après migration sur gel de polyacrylamide ne contenant pas de substrat, l'analyse de l'activité de branchement de BE2.1, par stimulation grâce à la phosphorylase « a » et par transfert sur un gel contenant de l'amylopectine, a révélé que différentes formes de BE2.1 sont présentes et semblent avoir des niveaux d'activité variables dépendamment du substrat utilisé. Une forme très retenue dans le gel, en absence de substrat, semble corréluer au pic de haut poids moléculaire observé par chromatographie d'exclusion stérique. Cette forme est la plus réactive sur les substrats linéaires (qu'ils soient produits par la phosphorylase « a » ou sur le A600).

La purification des différents oligomères de BE2.1 et leur incubation avec des substrats linéaires permettra d'évaluer la réactivité de chaque forme sur le substrat.

De même, les analyses de retard sur gel seront réitérées. La réticulation des gels sera modifiée pour permettre à la forme très retenue de pénétrer dans ces derniers. Ses constantes d'affinité envers divers substrats pourront alors être déterminées.

Dans la plante, les enzymes de branchement agissent de manière conjointe avec les autres enzymes du métabolisme de l'amidon, très probablement sous forme de complexes actifs. Suite à l'étude des BEs *in vitro*, il convient à présent d'analyser leur fonctionnement d'une manière plus globale. Des études, menées par nos collaborateurs sont en cours afin de déterminer la nature des complexes présents dans les feuilles d'*Arabidopsis* d'une lignée sauvage mais également de lignées mutantes déficientes pour BE2.2, BE2.1 ou dépourvues de BEs endogènes et exprimant GlgB.

Ces études permettront de déterminer les partenaires protéiques de BE2.2 et BE2.1 dans un contexte sauvage et simple mutant.

Elles permettront également de déterminer si GlgB est capable de former des complexes dans la plante. En effet, *E. coli*, GlgB n'est pas prédite comme pouvant être impliquée dans des interactions protéine-protéine (Annexe 11). Néanmoins, plusieurs bandes d'activité de branchement ont été observées sur zymogramme par stimulation grâce à la phosphorylase « a », réalisée à partir d'extraits de feuilles d'*Arabidopsis* de mutant *be2be3* exprimant GlgB. Ces résultats semblent indiquer que GlgB pourrait intervenir dans des complexes qui diffèrent du sauvage (Boyer, Roussel et al. 2016).

La production et la purification des différentes isoformes d'amidon-synthases d'*Arabidopsis* est actuellement en cours au laboratoire. Une fois la nature des complexes protéiques présents dans les feuilles déterminée, une étude de l'activité de branchement de chaque isoforme pourra alors être entreprise en complexe avec ses partenaires afin de déterminer si l'interaction avec ces derniers module l'activité des BEs.

De la même manière, le comportement enzymatique des amidon-synthases au sein des complexes avec BE2.2 et/ou BE2.1 inactive(s) sera analysé pour déterminer si la seule présence d'une BE engendre des modifications de leurs spécificités.

Des travaux de cristallisation de BE2.2 et BE2.1 au sein de ces complexes seront également entrepris, en parallèle de l'étude enzymologique et permettront de déterminer les spécificités d'interaction des enzymes.

Les résidus serine identifiés par Makmoudova et al, et conservés chez les BEs d'*Arabidopsis* pourront être phosphorylés *in vitro* après incubation des BEs avec des kinases chloroplastiques ou remplacés par des mimes de phosphorylation par mutagenèse dirigée. Une caractérisation enzymatique des BEs phosphorylées sera alors entreprise afin d'évaluer l'impact de la phosphorylation sur l'activité de ces dernières (seule ou au sein de complexes).

# BIBLIOGRAPHIE

- Abad, M. C., K. Binderup, et al. (2002). "The X-ray crystallographic structure of Escherichia coli branching enzyme." *J Biol Chem* **277**(44): 42164-42170.
- Aberle T, Burchard W, et al. (1994). "Conformational Contributions of Amylose and Amylopectin to the Structural Properties of Starches from Various Sources " *Starch/Stärke* **46**(9): 329-335.
- Ahmed, Z., I. J. Tetlow, et al. (2015). "Protein-protein interactions among enzymes of starch biosynthesis in high-amylose barley genotypes reveal differential roles of heteromeric enzyme complexes in the synthesis of A and B granules." *Plant Sci* **233**: 95-106.
- Arnold, K., L. Bordoli, et al. (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." *Bioinformatics* **22**(2): 195-201.
- Bailey, J. M. and W. J. Whelan (1961). "Physical properties of starch. I. Relationship between iodine stain and chain length." *J Biol Chem* **236**: 969-973.
- Ball, S., C. Colleoni, et al. (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.
- Ball, S., H. P. Guan, et al. (1996). "From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule." *Cell* **86**(3): 349-352.
- 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.
- Ballicora, M. A., A. A. Iglesias, et al. (2003). "ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(2): 213-225, table of contents.
- Bertoft, E. (2004). "On the nature of categories of chains in amylopectin and their connection to the super helix model." *Carbohydrate Polymers* **57**(2): 211-224.
- Bertoft, E. (2017). "Understanding Starch Structure: Recent Progress." *Agronomy* **7**(3).
- Bertoft, E., K. Piyachomkwan, et al. (2008). "Internal unit chain composition in amylopectins." *Carbohydrate Polymers* **74**: 527-543.
- Biasini, M., S. Bienert, et al. (2014). "SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information." *Nucleic Acids Research* **42**(Web Server issue): W252-W258.
- Binderup, K., R. Mikkelsen, et al. (2000). "Limited proteolysis of branching enzyme from Escherichia coli." *Arch Biochem Biophys* **377**(2): 366-371.
- Binderup, K., R. Mikkelsen, et al. (2002). "Truncation of the amino terminus of branching enzyme changes its chain transfer pattern." *Arch Biochem Biophys* **397**(2): 279-285.
- Blauth, S. L., K. N. Kim, et al. (2002). "Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in Zea mays L." *Plant Mol Biol* **48**(3): 287-297.
- Blauth, S. L., Y. Yao, et al. (2001). "Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn." *Plant Physiol* **125**(3): 1396-1405.
- Bordoli, L., F. Kiefer, et al. (2008). "Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace." *Nat. Protocols* **4**(1): 1-13.
- Boyer, C. D. and J. Preiss (1978). "Multiple forms of starch branching enzyme of maize: evidence for independent genetic control." *Biochem Biophys Res Commun* **80**(1): 169-175.
- Boyer, C. D. and J. Preiss (1981). "Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzymes and starch synthases." *Plant Physiol* **67**(6): 1141-1145.
- Boyer, L., X. Roussel, et al. (2016). "Expression of Escherichia coli glycogen branching enzyme in an Arabidopsis mutant devoid of endogenous starch branching enzymes induces the synthesis of starch-like polyglucans." *Plant Cell Environ* **39**(7): 1432-1447.
- Brummell, D. A., L. M. Watson, et al. (2015). "Overexpression of STARCH BRANCHING ENZYME II increases short-chain branching of amylopectin and alters the physicochemical properties of starch from potato tuber." *BMC Biotechnol* **15**: 28.
- Buleon, A., D. J. Gallant, et al. (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.

- Burton, R. A., J. D. Bewley, et al. (1995). "Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development." *Plant J* **7**(1): 3-15.
- Cakir, B., S. Shiraishi, et al. (2016). "Analysis of the Rice ADP-Glucose Transporter (OsBT1) Indicates the Presence of Regulatory Processes in the Amyloplast Stroma That Control ADP-Glucose Flux into Starch." *Plant Physiol* **170**(3): 1271-1283.
- Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, et al. (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D233-238.
- Cao, H., J. Imparl-Radosevich, et al. (1999). "Identification of the soluble starch synthase activities of maize endosperm." *Plant Physiol* **120**(1): 205-216.
- Cao, H., M. G. James, et al. (2000). "Purification and characterization of soluble starch synthases from maize endosperm." *Archives of biochemistry and biophysics* **373**(1): 135-146.
- Cao, Y., L. K. Steinrauf, et al. (1995). "Mechanism of glycogenin self-glycosylation." *Arch Biochem Biophys* **319**(1): 293-298.
- Chaen, K., J. Noguchi, et al. (2012). "Crystal structure of the rice branching enzyme I (BEI) in complex with maltopentaose." *Biochem Biophys Res Commun* **424**(3): 508-511.
- Cheng, C., J. Mu, et al. (1995). "Requirement of the self-glycosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **15**(12): 6632-6640.
- Cockburn, D. W. and N. M. Koropatkin (2016). "Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease." *J Mol Biol* **428**(16): 3230-3252.
- Colleoni, C., A. Myers, et al. (2003). One- and Two-dimensional Native PAGE Activity Gel Analyses of Maize Endosperm Proteins Reveal Functional Interactions between Specific Starch Metabolizing Enzymes.
- Commuri, P. D. and P. L. Keeling (2001). "Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties." *Plant J* **25**(5): 475-486.
- Coutinho, P. M., E. Deleury, et al. (2003). "An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases." *J Mol Biol* **328**(2): 307-317.
- Craig, J., J. R. Lloyd, et al. (1998). "Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos." *Plant Cell* **10**(3): 413-426.
- Crevillen, P., M. A. Ballicora, et al. (2003). "The different large subunit isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme." *The Journal of biological chemistry* **278**(31): 28508-28515.
- Crofts, N., N. Abe, et al. (2015). "Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes." *J Exp Bot* **66**(15): 4469-4482.
- Crumpton-Taylor, M., M. Pike, et al. (2013). "Starch synthase 4 is essential for coordination of starch granule formation with chloroplast division during *Arabidopsis* leaf expansion." *New Phytol* **200**(4): 1064-1075.
- Dang, P. L. and C. D. Boyer (1988). "Maize leaf and kernel starch synthases and starch branching enzymes." *Phytochemistry* **27**(5): 1255-1259.
- Dang, P. L. and C. D. Boyer (1989). "Comparison of soluble starch synthases and branching enzymes from leaves and kernels of normal and amylose-extender maize." *Biochemical genetics* **27**(9-10): 521-532.
- David, G. and J. Pérez (2009). "Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline." *Journal of applied crystallography* **42**(5): 892-900.
- Delatte, T., M. Trevisan, et al. (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.
- Delvalle, D., S. Dumez, et al. (2005). "Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves." *Plant J* **43**(3): 398-412.

- Deschamps, P., H. Moreau, et al. (2008). "Early gene duplication within chloroplastida and its correspondence with relocation of starch metabolism to chloroplasts." Genetics **178**(4): 2373-2387.
- Drummond, G. S., E. E. Smith, et al. (1972). "Purification and Properties of Potato." The FEBS Journal **26**(2): 168-176.
- Dumez, S., F. Wattedled, et al. (2006). "Mutants of Arabidopsis lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation." Plant Cell **18**(10): 2694-2709.
- Emes, M. J., C. G. Bowsher, et al. (2003). "Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm." Journal of Experimental Botany **54**(382): 569-575.
- Emond, S., S. Mondeil, et al. (2008). "Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*." FEMS microbiology letters **285**(1): 25-32.
- Facon, M., Q. Lin, et al. (2013). "Distinct functional properties of isoamylase-type starch debranching enzymes in monocot and dicot leaves." Plant physiology **163**(3): 1363-1375.
- Fioravanti, A., C. Fumeaux, et al. (2013). "DNA binding of the cell cycle transcriptional regulator GcrA depends on N6-adenosine methylation in *Caulobacter crescentus* and other Alphaproteobacteria." PLoS Genet **9**(5): e1003541.
- Fischer, H., M. d. Oliveira Neto, et al. (2010). "Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale." Journal of applied crystallography **43**(1): 101-109.
- Fisher, D. K., M. Gao, et al. (1996). "Two closely related cDNAs encoding starch branching enzyme from *Arabidopsis thaliana*." Plant Mol Biol **30**(1): 97-108.
- Fontaine, T., C. D'Hulst, et al. (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): 16223-16230.
- Froese, D. S., A. Michaeli, et al. (2015). "Structural basis of glycogen branching enzyme deficiency and pharmacologic rescue by rational peptide design." Human molecular genetics **24**(20): 5667-5676.
- Gallant, D. J., B. Bouchet, et al. (1997). "Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization." Carbohydrate Polymers **32**(3): 177-191.
- Gao, M., D. K. Fisher, et al. (1996). "Evolutionary conservation and expression patterns of maize starch branching enzyme I and IIb genes suggests isoform specialization." Plant molecular biology **30**(6): 1223-1232.
- Gao, M., D. K. Fisher, et al. (1997). "Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb. Isolation and characterization of a Sbe2a cDNA." Plant Physiol **114**(1): 69-78.
- Grimaud, F., H. Rogniaux, et al. (2008). "Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis." Journal of experimental botany **59**(12): 3395-3406.
- Guan, H., P. Li, et al. (1997). "Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme." Arch Biochem Biophys **342**(1): 92-98.
- 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.
- Hanashiro, I., J. Abe, et al. (1996). "A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography." Carbohydrate Research **283**: 151-159.
- Hanashiro, I., K. Itoh, et al. (2008). "Granule-bound starch synthase I is responsible for biosynthesis of extra-long unit chains of amylopectin in rice." Plant Cell Physiol **49**(6): 925-933.
- Hanashiro, I., M. Tagawa, et al. (2002). "Examination of molar-based distribution of A, B and C chains of amylopectin by fluorescent labeling with 2-aminopyridine." Carbohydr Res **337**(13): 1211-1215.

- Hanashiro, I. and Y. Takeda (1998). "Examination of number-average degree of polymerization and molar-based distribution of amylose by fluorescent labeling with 2-aminopyridine." Carbohydr Res **306**(3): 421-426.
- Harn, C., M. Knight, et al. (1998). "Isolation and characterization of the zSSIa and zSSIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm." Plant Mol Biol **37**(4): 639-649.
- Hayashi, M., R. Suzuki, et al. (2017). "Bound Substrate in the Structure of Cyanobacterial Branching Enzyme Supports a New Mechanistic Model." J Biol Chem.
- Hedin, N., J. Barchiesi, et al. (2017). "Identification and characterization of a novel starch branching enzyme from the picoalgae *Ostreococcus tauri*." Arch Biochem Biophys **618**: 52-61.
- Heldt, H. W., K. Werdan, et al. (1973). "Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **314**(2): 224-241.
- Hendriks, J. H., A. Kolbe, et al. (2003). "ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species." Plant Physiol **133**(2): 838-849.
- Hennen-Bierwagen, T., M. James, et al. (2012). Involvement of debranching enzymes in starch biosynthesis.
- Hennen-Bierwagen, T. A., Q. Lin, et al. (2009). "Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts." Plant Physiol **149**(3): 1541-1559.
- Hennen-Bierwagen, T. A., F. Liu, et al. (2008). "Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes." Plant Physiol **146**(4): 1892-1908.
- Henrissat, B. (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochem J **280 ( Pt 2)**: 309-316.
- Henrissat, B. and A. Bairoch (1993). "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochem J **293 ( Pt 3)**: 781-788.
- Henrissat, B., I. Callebaut, et al. (1996). "Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5674.
- Henrissat, B. and G. Davies (1997). "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases." Curr Opin Struct Biol **7**(5): 637-644.
- Hizukuri, S. (1986). "Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance." Carbohydrate Research **147**(2): 342-347.
- Hong, S. and J. Preiss (2000). "Localization of C-terminal domains required for the maximal activity or for determination of substrate preference of maize branching enzymes." Arch Biochem Biophys **378**(2): 349-355.
- Huang, B., T. A. Hennen-Bierwagen, et al. (2014). "Functions of multiple genes encoding ADP-glucose pyrophosphorylase subunits in maize endosperm, embryo, and leaf." Plant Physiol **164**(2): 596-611.
- Iakoucheva, L. M., A. L. Kimzey, et al. (2001). "Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA." Protein Science **10**(7): 1353-1362.
- Imberty, A., H. Chanzy, et al. (1988). "The double-helical nature of the crystalline part of A-starch." Journal of molecular biology **201**(2): 365-378.
- Imparl-Radosevich, J. M., P. Li, et al. (1998). "Purification and characterization of maize starch synthase I and its truncated forms." Arch Biochem Biophys **353**(1): 64-72.
- Inouchi, N., D. V. Glover, et al. (1987). "Chain Length Distribution of Amylopectins of Several Single Mutants and the Normal Counterpart, and Sugary-1 Phytoglycogen in Maize (*Zea mays* L.)." Starch - Stärke **39**(8): 259-266.
- Ito, H., S. Hamada, et al. (2004). "Functional characteristics of C-terminal regions of starch-branching enzymes from developing seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." Plant Science **166**(5): 1149-1158.



- Janecek, S. (1997). "alpha-Amylase family: molecular biology and evolution." Prog Biophys Mol Biol **67**(1): 67-97.
- Janecek, S., B. Svensson, et al. (2011). "Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals." Enzyme Microb Technol **49**(5): 429-440.
- John, M., J. Schmidt, et al. (1983). "Iodine—maltosaccharide complexes: relation between chain-length and colour." Carbohydrate Research **119**(Supplement C): 254-257.
- Jones, D. T. and D. Cozzetto (2015). "DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity." Bioinformatics **31**(6): 857-863.
- Kamata, K., M. Mitsuya, et al. (2004). "Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase." Structure **12**(3): 429-438.
- Katsuya, Y., Y. Mezaki, et al. (1998). "Three-dimensional structure of Pseudomonas isoamylase at 2.2 Å resolution." J Mol Biol **281**(5): 885-897.
- Kim, K. N., D. K. Fisher, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of the Amylose-Extender gene encoding starch branching enzyme IIB in maize." Plant Mol Biol **38**(6): 945-956.
- Kim, K. N. and M. J. Guiltinan (1999). "Identification of cis-acting elements important for expression of the starch-branching enzyme I gene in maize endosperm." Plant physiology **121**(1): 225-236.
- Klein, C. and G. E. Schulz (1991). "Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution." J Mol Biol **217**(4): 737-750.
- Konarev, P. V., M. V. Petoukhov, et al. (2006). "ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis." Journal of applied crystallography **39**(2): 277-286.
- Konarev, P. V., V. V. Volkov, et al. (2003). "PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis." Journal of applied crystallography **36**(5): 1277-1282.
- Kozin, M. B. and D. I. Svergun (2001). "Automated matching of high-and low-resolution structural models." Journal of applied crystallography **34**(1): 33-41.
- Kubo, A., C. Colleoni, et al. (2010). "Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch-debranching enzymes in developing maize endosperm." Plant Physiol **153**(3): 956-969.
- Kuriki, T. and T. Imanaka (1999). "The concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism." J Biosci Bioeng **87**(5): 557-565.
- Kuriki, T., D. C. Stewart, et al. (1997). "Construction of chimeric enzymes out of maize endosperm branching enzymes I and II: activity and properties." J Biol Chem **272**(46): 28999-29004.
- Lerner, L. R. and C. R. Krisman (1996). "Differential action of branching enzymes according to its source." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **42**(5): 599-608.
- Li, S., X. Wei, et al. (2017). "OsBT1 encodes an ADP-glucose transporter involved in starch synthesis and compound granule formation in rice endosperm." 7: 40124.
- Lin, Q., M. Facon, et al. (2013). "Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the Zea mays leaf." The New phytologist **200**(4): 1009-1021.
- Lin, T. P., T. Caspar, et al. (1988). "A Starch Deficient Mutant of Arabidopsis thaliana with Low ADPglucose Pyrophosphorylase Activity Lacks One of the Two Subunits of the Enzyme." Plant Physiol **88**(4): 1175-1181.
- Liu, F., Z. Ahmed, et al. (2012). "Allelic variants of the amylose extender mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein-protein interactions." J Exp Bot **63**(3): 1167-1183.
- Liu, F., A. Makhmoudova, et al. (2009). "The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts." J Exp Bot **60**(15): 4423-4440.
- Liu, F., Q. Zhao, et al. (2016). "Modification of starch metabolism in transgenic Arabidopsis thaliana increases plant biomass and triples oilseed production." Plant Biotechnol J **14**(3): 976-985.
- Lu, K. J., S. Streb, et al. (2015). "Molecular Genetic Analysis of Glucan Branching Enzymes from Plants and Bacteria in Arabidopsis Reveals Marked Differences in Their Functions and Capacity to Mediate Starch Granule Formation." Plant Physiol **169**(3): 1638-1655.

- MacGregor, E. A., S. Janecek, et al. (2001). "Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes." *Biochim Biophys Acta* **1546**(1): 1-20.
- Makhmoudova, A., D. Williams, et al. (2014). "Identification of multiple phosphorylation sites on maize endosperm starch branching enzyme IIb, a key enzyme in amylopectin biosynthesis." *The Journal of biological chemistry* **289**(13): 9233-9246.
- Melendez, R., E. Melendez-Hevia, et al. (1998). "Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach." *Biophys J* **75**(1): 106-114.
- Mizuno, K., T. Kawasaki, et al. (1993). "Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds." *J Biol Chem* **268**(25): 19084-19091.
- Morell, M. K., A. Blennow, et al. (1997). "Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm." *Plant Physiol* **113**(1): 201-208.
- Morell, M. K., B. Kosar-Hashemi, et al. (2003). "Barley sex6 mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties." *Plant J* **34**(2): 173-185.
- Morell, M. K., M. S. Samuel, et al. (1998). "Analysis of starch structure using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis." *Electrophoresis* **19**(15): 2603-2611.
- Mouille, G., M. L. Maddelein, et al. (1996). "Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants." *The Plant cell* **8**(8): 1353-1366.
- Mukerjea, R. and J. F. Robyt (2012). "De novo biosynthesis of starch chains without a primer and the mechanism for its biosynthesis by potato starch-synthase." *Carbohydr Res* **352**: 137-142.
- Murakami, T., T. Kanai, et al. (2006). "A novel branching enzyme of the GH-57 family in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1." *J Bacteriol* **188**(16): 5915-5924.
- Mutisya, J., P. Sathish, et al. (2003). "Starch branching enzymes in sorghum (*Sorghum bicolor*) and barley (*Hordeum vulgare*): comparative analyses of enzyme structure and gene expression." *J Plant Physiol* **160**(8): 921-930.
- 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.
- Nakamura, Y., S. Aihara, et al. (2014). "In vitro studies of enzymatic properties of starch synthases and interactions between starch synthase I and starch branching enzymes from rice." *Plant Sci* **224**: 1-8.
- Nakamura, Y., P. B. Francisco, et al. (2005). "Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice varieties." *Plant Molecular Biology* **58**(2): 213-227.
- Nakamura, Y., Y. Utsumi, et al. (2010). "Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm." *Plant Cell Physiol* **51**(5): 776-794.
- Nishi, A., Y. Nakamura, et al. (2001). "Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm." *Plant Physiol* **127**(2): 459-472.
- Noguchi, J., K. Chaen, et al. (2011). "Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L with implications for catalysis and substrate binding." *Glycobiology* **21**(8): 1108-1116.
- OECD/FAO *OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026*, OECD Publishing.
- Pal, K., S. Kumar, et al. (2010). "Crystal structure of full-length *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv glycogen branching enzyme: insights of N-terminal beta-sandwich in substrate specificity and enzymatic activity." *J Biol Chem* **285**(27): 20897-20903.
- Palomo, M., S. Kralj, et al. (2009). "The unique branching patterns of *Deinococcus* glycogen branching enzymes are determined by their N-terminal domains." *Appl Environ Microbiol* **75**(5): 1355-1362.
- Palomo, M., T. Pijning, et al. (2011). "Thermus thermophilus glycoside hydrolase family 57 branching enzyme: crystal structure, mechanism of action, and products formed." *J Biol Chem* **286**(5): 3520-3530.

- Paul J. Jenkins, Ruth E. Cameron, et al. (1993). "A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources." *Starch/Stärke* **45**(12): 417-420.
- Porter, C. M. and B. G. Miller (2012). "Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites." *Bioorganic Chemistry* **43**(Supplement C): 44-50.
- Potocki de Montalk, G., M. Remaud-Simeon, et al. (2000). "Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties." *FEBS letters* **471**(2-3): 219-223.
- Rahman, S., A. Regina, et al. (2001). "Comparison of starch-branching enzyme genes reveals evolutionary relationships among isoforms. Characterization of a gene for starch-branching enzyme IIa from the wheat genome donor *Aegilops tauschii*." *Plant Physiol* **125**(3): 1314-1324.
- Ral, J. P., C. Colleoni, et al. (2006). "Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant physiology* **142**(1): 305-317.
- Regina, A., A. Bird, et al. (2006). "High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3546-3551.
- Regina, A., B. Kosar-Hashemi, et al. (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.
- Roldan, I., F. Wattedled, et al. (2007). "The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation." *Plant J* **49**(3): 492-504.
- Roussel, X., C. Lancelon-Pin, et al. (2013). "Characterization of substrate and product specificity of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis*." *Biochimica et biophysica acta* **1830**(1): 2167-2177.
- Rydberg, U., L. Andersson, et al. (2001). "Comparison of starch branching enzyme I and II from potato." *Eur J Biochem* **268**(23): 6140-6145.
- Satoh, H., A. Nishi, et al. (2003). "Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm." *Plant Physiol* **133**(3): 1111-1121.
- Sawada, T., Y. Nakamura, et al. (2014). "Diversity of reaction characteristics of glucan branching enzymes and the fine structure of alpha-glucan from various sources." *Arch Biochem Biophys* **562**: 9-21.
- Schwarte, S., H. Brust, et al. (2013). "Intraspecific sequence variation and differential expression in starch synthase genes of *Arabidopsis thaliana*." *BMC Res Notes* **6**: 84.
- Seo, B. S., S. Kim, et al. (2002). "Functional interactions between heterologously expressed starch-branching enzymes of maize and the glycogen synthases of Brewer's yeast." *Plant Physiol* **128**(4): 1189-1199.
- Seung, D., S. Soyk, et al. (2015). "PROTEIN TARGETING TO STARCH is required for localising GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE to starch granules and for normal amylose synthesis in *Arabidopsis*." *PLoS Biol* **13**(2): e1002080.
- Shinohara, M. L., M. Ihara, et al. (2001). "A novel thermostable branching enzyme from an extremely thermophilic bacterial species, *Rhodothermus obamensis*." *Applied microbiology and biotechnology* **57**(5-6): 653-659.
- Skryhan, K., J. A. Cuesta-Seijo, et al. (2015). "The Role of Cysteine Residues in Redox Regulation and Protein Stability of *Arabidopsis thaliana* Starch Synthase 1." *PLoS One* **10**(9): e0136997.
- Stam, M. R., E. G. Danchin, et al. (2006). "Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins." *Protein Eng Des Sel* **19**(12): 555-562.
- Stanley Peat, W. J. Whelan, et al. (1952). "Evidence of multiple branching in waxy maize starch." *Journal of the Chemical Society*: 3025-3030.
- Streb, S., T. Delatte, et al. (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.

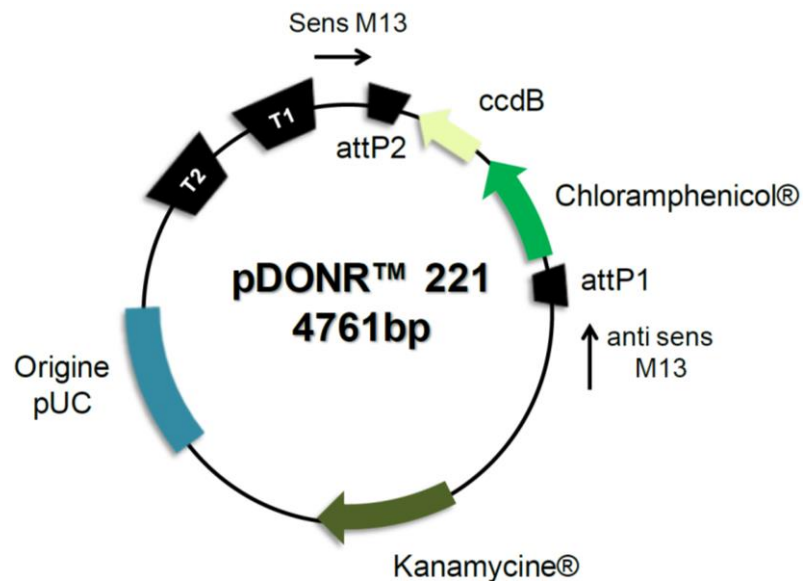
- Suzuki, E. and R. Suzuki (2016). "Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes." Cellular and molecular life sciences : CMLS **73**(14): 2643-2660.
- Svergun, D. I., M. V. Petoukhov, et al. (2001). "Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering." Biophysical journal **80**(6): 2946-2953.
- Szydlowski, N., P. Ragel, et al. (2011). "Integrated functions among multiple starch synthases determine both amylopectin chain length and branch linkage location in Arabidopsis leaf starch." J Exp Bot **62**(13): 4547-4559.
- Takata, H., T. Takaha, et al. (1994). "Properties and active center of the thermostable branching enzyme from Bacillus stearothermophilus." Applied and environmental microbiology **60**(9): 3096-3104.
- Takata, H., T. Takaha, et al. (1996). "Structure of the cyclic glucan produced from amylopectin by Bacillus stearothermophilus branching enzyme." Carbohydrate research **295**: 91-101.
- Takata, H., T. Takaha, et al. (1996). "Cyclization reaction catalyzed by branching enzyme." Journal of bacteriology **178**(6): 1600-1606.
- Takeda, Y., H.-P. Guan, et al. (1993). "Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm." Carbohydrate Research **240**: 253-263.
- Takeda, Y. and S. Hizukuri (1987). "Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules " Carbohydrate Research(165): 139-145.
- Takeda, Y. and S. Hizukuri (1987). "Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine  
" Carbohydrate Research **168**(1): 79-88.
- Tetlow, I. J., K. G. Beisel, et al. (2008). "Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes." Plant Physiol **146**(4): 1878-1891.
- Tetlow, I. J., K. G. Beisel, et al. (2008). "Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes." Plant Physiol **146**.
- Tetlow, I. J. and M. J. Emes (2014). "A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis." IUBMB life **66**(8): 546-558.
- Tetlow, I. J., M. K. Morell, et al. (2004). "Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants." J Exp Bot **55**(406): 2131-2145.
- Tetlow, I. J., R. Wait, et al. (2004). "Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions." Plant Cell **16**(3): 694-708.
- Tiessen, A., J. H. Hendriks, et al. (2002). "Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply." Plant Cell **14**(9): 2191-2213.
- Tompa, P. (2002). "Intrinsically unstructured proteins." Trends in biochemical sciences **27**(10): 527-533.
- Topping, D. L., M. Fukushima, et al. (2003). "Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art." Proc Nutr Soc **62**(1): 171-176.
- Torija, M. J., M. Novo, et al. (2005). "Glycogen synthesis in the absence of glycogenin in the yeast Saccharomyces cerevisiae." FEBS Lett **579**(18): 3999-4004.
- Toyosawa, Y., Y. Kawagoe, et al. (2016). "Deficiency of Starch Synthase IIIa and IVb Alters Starch Granule Morphology from Polyhedral to Spherical in Rice Endosperm." Plant physiology **170**(3): 1255-1270.
- Tuncel, A., J. Kawaguchi, et al. (2014). "The rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit is essential for optimal catalysis and allosteric regulation of the heterotetrameric enzyme." Plant Cell Physiol **55**(6): 1169-1183.
- Ugalde, J. E., A. J. Parodi, et al. (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.

- Umemoto, T. and N. Aoki (2005). "Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase IIa that alter starch gelatinisation and starch association of the enzyme." Functional Plant Biology **32**(9): 763-768.
- Umemoto, T., N. Aoki, et al. (2004). "Natural variation in rice starch synthase IIa affects enzyme and starch properties." Functional Plant Biology **31**(7): 671-684.
- 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.
- Valdez, H. A., M. V. Busi, et al. (2008). "Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*." Biochemistry **47**(9): 3026-3032.
- Vamadevan, V. and E. Bertoft (2014). "Structure-function relationships of starch components." Starch - Stärke **67**: 1-14.
- van de Wal, M., C. D'Hulst, et al. (1998). "Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin." The Journal of biological chemistry **273**(35): 22232-22240.
- Ventriglia, T., M. L. Kuhn, et al. (2008). "Two *Arabidopsis* ADP-Glucose Pyrophosphorylase Large Subunits (APL1 and APL2) Are Catalytic." Plant physiology **148**(1): 65-76.
- Volkov, V. V. and D. I. Svergun (2003). "Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering." Journal of applied crystallography **36**(3): 860-864.
- Wang, Y., P. J. White, et al. (1993). "Characterization of Starch Structures of 17 Maize Endosperm Mutant Genotypes with Oh43 Inbred Line Background." Cereal Chemistry **70**(2): 171.
- Wattebled, F., A. Buleon, et al. (2002). "Granule-bound starch synthase I. A major enzyme involved in the biogenesis of B-crystallites in starch granules." European journal of biochemistry **269**(15): 3810-3820.
- Wattebled, F., Y. Dong, et al. (2005). "Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytoglycogen and an abnormal form of amylopectin." Plant Physiol **138**(1): 184-195.
- Wattebled, F., V. Planchot, et al. (2008). "Further evidence for the mandatory nature of polysaccharide debranching for the aggregation of semicrystalline starch and for overlapping functions of debranching enzymes in *Arabidopsis* leaves." Plant physiology **148**(3): 1309-1323.
- Wayllace, N. Z., H. A. Valdez, et al. (2010). "The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*." The FEBS journal **277**(2): 428-440.
- Wongchawalit, J., T. Yamamoto, et al. (2006). "Purification and characterization of alpha-glucosidase I from Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*) and molecular cloning of its cDNA." Bioscience, biotechnology, and biochemistry **70**(12): 2889-2898.
- Yamamori, M., S. Fujita, et al. (2000). "Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose." Theoretical and Applied Genetics **101**(1): 21-29.
- Yandeu-Nelson, M. D., L. Laurens, et al. (2011). "Starch-branching enzyme IIa is required for proper diurnal cycling of starch in leaves of maize." Plant Physiol **156**(2): 479-490.
- Yao, Y., D. B. Thompson, et al. (2004). "Maize starch-branching enzyme isoforms and amylopectin structure. In the absence of starch-branching enzyme IIb, the further absence of starch-branching enzyme Ia leads to increased branching." Plant Physiol **136**(3): 3515-3523.
- Yoo, S.-H., C. Keppel, et al. (2007). "Effects of growth condition on the structure of glycogen produced in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." International Journal of Biological Macromolecules **40**(5): 498-504.
- Zabawinski, C., N. Van Den Koornhuyse, et al. (2001). "Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase." J Bacteriol **183**(3): 1069-1077.

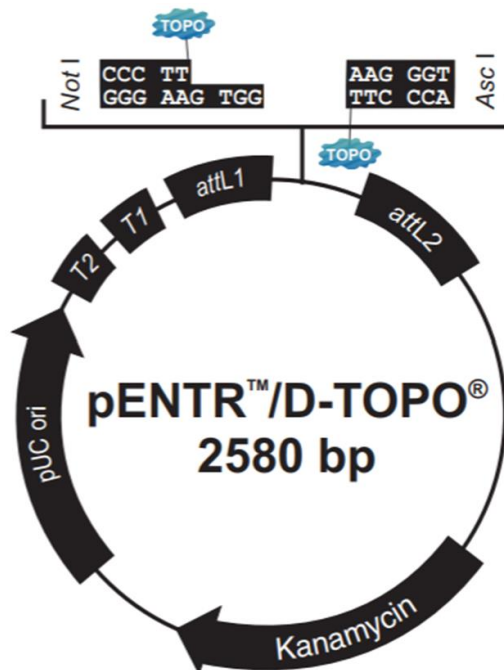
- Zeeman, S. C., T. Umemoto, et al. (1998). "A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen." The Plant cell **10**(10): 1699-1712.
- Zeqiraj, E. and F. Sicheri (2015). "Getting a handle on glycogen synthase - Its interaction with glycogenin." Mol Aspects Med **46**: 63-69.
- Zhang, X., A. M. Myers, et al. (2005). "Mutations affecting starch synthase III in Arabidopsis alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis." Plant Physiol **138**(2): 663-674.
- Zhang, X., N. Szydlowski, et al. (2008). "Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in Arabidopsis." BMC Plant Biology **8**(1): 96.
- Zhou, W., J. Yang, et al. (2015). "Impact of amylose content on starch physicochemical properties in transgenic sweet potato." Carbohydr Polym **122**: 417-427.

# ANNEXES

Annexe 1 : Carte du vecteur pDONR™221

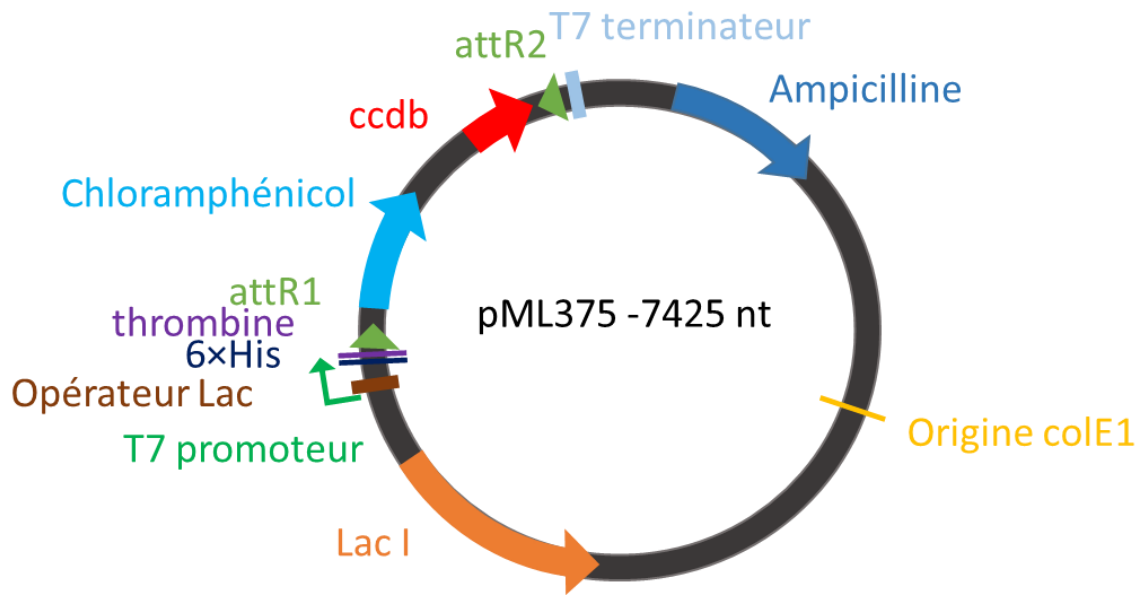


Annexe 2 : Carte du vecteur pENTR™/D-TOPO®

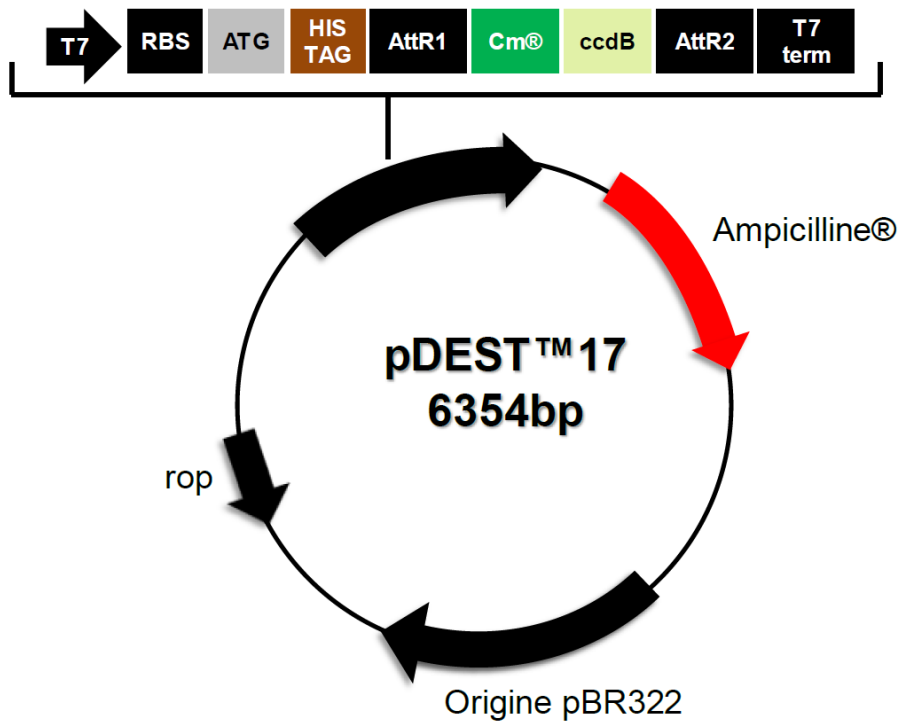




Annexe 3 : Carte du vecteur pml375



Annexe 4 : Carte du vecteur pDEST17



## Annexe 5 : Alignement de séquences des enzymes de branchement d'*A. thaliana*

```

BE2.2 -----ASEKVLVDPNLDLDD
BE2.1 -FSLRKDSRSSGKVFARKPSYDSDSSSLATTASEKLRGHQSDSSSSASDQVQSRDTSDD
          **::* *::**

BE2.2 PRGFSQIFD-----LESQTMEYTEAV-----RTEDQTMNVVKERGVKPRIVPPPGD
BE2.1 TQVLGNVDVQKTEEAQETETLDQTSALSTSGSISYKEDFAKMSHSVDQEVGQRKI PPPGD
          : :.: : *::*: *.*: : : .* : : * * :*****

BE2.2 GKKIYEIDPMLRITYNNHLDYRYGQYKRLREEIDKYEGGLEAFSRGYEKLGFSRSDAGITY
BE2.1 GKRIYDIDPMLNSHRNHLDYRYGQYKRLREEIDKNEGGLEAFSRGYEIFGFTRSATGITY
          **::*:*****.: :.*****:::***** ***** :*:** :****

          SITE A
BE2.2 REWAPGAKAASLIQDFNNWNSNADIMTRNEFGVWEIFIPNNTDGSIPAIPHGSRVKIRMDT
BE2.1 REWAPGAKAASLIQDFNNWNAKSDVMARNDFGVWEIFIPNNA DGSIPAIPHGSRVKIRMDT
          *****: :*:*:*:*****

BE2.2 PSGIKDSIPAWIKFSVQAPGEIPFNGIYYDPPEEEKYVFKHPQKRPKSLRIYEAHVGMS
BE2.1 PSGIKDSIPAWIKYSVQPPGEIPYNGVYYDPPEEDKYAFKHPRPKKPTSLRIYESHVGMS
          *****:*** *****:*.*:*****:*. * ***:**.*.*****:*****

BE2.2 STEPMVNTYANFRDDVLPRIKKLGYNAVQIMAIQEHSSYASFGYHVTNFFAPSSRCGTPE
BE2.1 STEPKINTYANFRDDVLPRIKKLGYNAVQIMAIQEHAYYASFGYHVTNFFAPSSRFGTPD
          *** :*****:*****:***** ** :

          SITE B
BE2.2 ELKSLIDRAHELGLVVLMDIVHSHASKNTLDGLNMF DGTDAHYFHSGPRGYHWMWDSRLF
BE2.1 DLKSLIDKAHELGLVVLMDIVHSHASKNTLDGLDMFDGTDGQYFHSGSRGYHWMWDSRLF
          :*****:*****:*****:*****:*****

BE2.2 NYGSWEVLRYLLSNARWWLEEYKFDGFRFDGVTSM MYTHHGLSVGFTGNYTEYFGLQTDV
BE2.1 NYGSWEVLRYLLSNARWWLEEYKFDGFRFDGVTSM MYTHHGLQVEFTGNYNEYFGYSTDV
          *****:*****.* *****.* **

BE2.2 DAVNYLMLVNDMIHGLYPEAIVVGEDVSGMPTFCIPVQDGGVGF DYRLHMAIADKWIEML
BE2.1 DAVVYLMVNDLIHGLYPEAIVVGEDVSGMPAFCV PVEDGGVGF DYRLHMAVADKWIELL
          *** *****:*****.*****:*.*:*****:*****.*

BE2.2 KKRDEDWQMGDI IYTLTNRWSEKICISYAESHDAQALVGDKTIAFWLMDKDMYDFMAVDRP
BE2.1 KKRDEDWQVGDITFTLTNRWGEKCVVYAESHDQALVGDKTIAFWLMDKDMYDFMAVDRQ
          *****:*** :*****.**: *****:*****

          SITE C
BE2.2 STPLIDRGIALHKMIRLITMGLGGEGYLNFMGNEFGHPEWIDFPRGEQRLSDGSVIPGNN
BE2.1 ATPRVDRGIALHKMIRLITMGLGGEGYLNFMGNEFGHPEWIDFPRTDQHL PDGRVIAGNN
          :** :*****:*****:*****:*****:*****

BE2.2 FSYDKRRRFDLGDADYLR YRGLQEFDQAMQHLEENYGFMTSEHQFISRKDEADRVIVFE
BE2.1 GSYDKRRRFDLGD AEYLR YHGLQEFDRAMQNLEETYGFMTSEHQYISRKDEGDRVIVFE
          *****:***:*****:*.*:**.* *****:*****.*****








BE2.2 RGDLVFVFNHWTSSYFDYRIGCSKPGKYKIVLDSDDPLFGGFNRLDRKAEYFTYDGLYD
BE2.1 RGNLLFVFNHWTNSYSDYRIGCSVPGKYKIVLDSDNSLFGGFNRLDDSAEFFTS DGRHD
          **.*:*****.* ***** *****:*****.* **:* ** *
    
```

```

BE2.2  ERPCSEFMVYAPCRTAVVYALANHD-----
BE2.1  DRPCSEFMVYAPCRTAVVYAAVD DDDDDERSLVP IGLLPEDV
      :***** .:.*

```

Légende:

- |   |   |   |   |
|---|---|---|---|
|  | Régions prédites désordonnées (DISOPRED3) |  | Région I à IV conservées  |
|  | Nt, en amont du site catalytique          |  | Ct, en aval du site catalytique                                 |
|  | CBM48                                     |  | Site A, B et C: différences entre les modèles de BE2.2 et BE2.1 |
|  | Domaine catalytique                       |   |   |



```

BEI      -----GNNWSYDKCRRQWSLVDTDHLRYKYMNAFDQAMNALEEEFSFLSSSKQIVSDM
BE2.2   SDGSVIPGNNFSYDKCRRRFDLGDADYLRYRGLQEFDQAMQHLEENYGFMTSEHQFISRK
BE2.1   PDGRVIAGNNGSYDKCRRRFDLGDAEYLRHGLQEFDRAMQNLEETYGFMTSEHQYISRK
          *** *****:.* *:::***:  :: **.*:  *** :.*::.*:.* :.*

BEI      NEKDKVIVFERGDLVVFVFNHFNPKTYKGYKVGCDLPGKYRVALDSDALVFGGHGRVGHDV
BE2.2   DEADRVIVFERGDLVVFVFNHWTSSYFDYRIGCSKPGKYKIVLSDDDPLFGGFNRLDRKA
BE2.1   DEGDRVIVFERGNLLFVFNHWTNSYSDYRIGCSVPGKYKIVLSDNSLFGGFNRLDDSA
          :.* *:::*****:.*:***** ..:* .*:::***. *****:.* ***** :***..*.. ..

BEI      DHFTSPEGMPGVPETNFNRRPNSFKVLSPPRTCVAYYRVDEEDREELRRGGAVASGKIVTE
BE2.2   EYFTYD-----GLYDERPCSFMVYAPCRTAVVYALANHD-----
BE2.1   EFFTSD-----GRHDDRPCSFMVYAPCRTAVVYAAVDDDDDDERS-SLVPIGLLPED
          :.* **          .:::** ** * : * **.*.* ..:*

BEI      YIDVEATSGETISGGWKGSEKDDCGKKGMKFVFRSSDEDCK
BE2.2   -----
BE2.1   V-----

```

Légende:

- |   |   |
|---|---|
| <span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px; vertical-align: middle;"></span> pas de données RX    | <span style="background-color: orange; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px; vertical-align: middle;"></span> Site 3 (Chaen, 2012)                   |
| <span style="background-color: pink; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px; vertical-align: middle;"></span> Régions non modélisées | <span style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">} [</span> Délimitations des domaines Nt, Ct et catalytique (Annexe 6)  |
| <span style="background-color: green; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px; vertical-align: middle;"></span> Site 1 (Chaen, 2012)  |   |
| <span style="background-color: gray; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px; vertical-align: middle;"></span> Site 2 (Chaen, 2012)   | <span style="border: 1px solid orange; display: inline-block; width: 15px; height: 10px; vertical-align: middle;"></span> Site A, B et C: différences entre les modèles de BE2.2 et BE2.1 |

## Annexe 7: Alignement de séquences des enzymes de branchement d'*A. thaliana* avec les BEI du maïs

Maïs-SBEIIb MATRVSGAVLGGAVRAPRLTGGGEGSLVFRHTGLFLTRGARVGCSTHGAMRAAAAARKA  
 Maïs-SBEIIa MRTVLSCAGAPGKVLV---PGGGSDLLSSAEPVVDTPPEELQIPE-----AE  
 BE2.2 -----ASEK  
 BE2.1 -FSLRKDSRSSGKVF--RKPSYSDS---SSLATTASEKLRGHQSD----SSSSASDQ

Maïs-SBEIIb VMVPEGENGLA--SRADSAQFQSELEVP--DISEET-----TCGAGV--ABAQA  
 Maïs-SBEIIa LTVEKTSSTQTTSVAEASSGVEAEERP--ELSEVIGVGGTGGTKIDGAGIKAKAPLV  
 BE2.2 VLVDPNLDLDPGRGFSQIFD-----LESQTMETEA-----RTEDQT-MNVVKER  
 BE2.1 VQSRDQTVSDDTQVLCNVVDVQ-KTEEAQETETLDQTSALSTSGSISYKEDFAK-MSHSVDQ  
 : . . . \* : . .

Maïs-SBEIIb LNRVRVPPPSDQKIFQIDPMLQGYKYHLEYRYSLYRRIKRSIDIDEHEGGLEAFSRSYEK  
 Maïs-SBEIIa EEKPRVIPPDPGQRIYEIDPMLGFRGHLDYRYSEYKRLRAIDQHEGGLEAFSRSYEK  
 BE2.2 GVKPRIVPPDPGDKKIYEIDPMLRTYNNHLDYRYGQYKRLREEDIKYEGGLEAFSRSYEK  
 BE2.1 EVGQRKIPPPDPGDKRIYDIDPMLNSHRNHLDYRYGQYKRLREEDIKNEGGLEAFSRSYEI  
 \* :\*\*\*. \*\*: :\*\*\*\*. . . \*\* :\*\*\*. \* : : \* \*\* : \*\*\*\* :\*\*\*\*. \*\*

Maïs-SBEIIb FGFNRS AEGITYREWAPGAFSAALVGFDFNNWDPNADRMSKNEFGVWEIFL PNNADGTSPI  
 Maïs-SBEIIa LGFTRSAEGITYREWAPGAYSALVGFDFNNWPNADAMARNEYGVWEIFL PNNADGSPA  
 BE2.2 LGFTRSDAGITYREWAPGAKAASLIGDFNNWNSNADIMTRNEFGVWEIFL PNNADGSPA  
 BE2.1 FGFTRSATGITYREWAPGAKAASLIGDFNNWNAKSDVMARNDFGVWEIFL PNNADGSPA  
 :\*\*.\* \*\* \*\*\*\*\* :\*: :\*\*\*\*\*: : : \* : : : :\*\*\*\*\* :\*\* : \*

Maïs-SBEIIb PHGSRVKVRMDTPSGIKDSIPAWIKYSVQAPGEIPYDGIYYDPPEEVKYVFRHAQPKRPK  
 Maïs-SBEIIa PHGSRVKIRMDTPSGVKDSIPAWIKFSVQAPGEIPYNGIYYDPPEEKYVFKHPQPKRPK  
 BE2.2 PHGSRVKIRMDTPSGIKDSIPAWIKFSVQAPGEIPFNGIYYDPPEEKYVFKHPQPKRPK  
 BE2.1 PHGSRVKIRMDTPSGIKDSIPAWIKYSVQPPGEIPYNGVYYDPPEEDKYAFKHPRPPKPT  
 \*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\* \*\*\*\*\* : :\*\*\*\*\* \*\* : \* : :\*\*\*. \*

Maïs-SBEIIb SLRIYETHVGMSSPEPKINTYVNFREVLPRIKKLGYNVQIMAIQEHSYYGSFGYHVTN  
 Maïs-SBEIIa SLRIYESHVGMSSPEPKINTYANFRDVLPRIKKLGYNVQIMAIQEHSYYASFGYHVTN  
 BE2.2 SLRIYEAHVGMSSSTEPMVNTYANFRDDVLPRIKKLGYNVQIMAIQEHSYYASFGYHVTN  
 BE2.1 SLRIYESHVGMSSSTEPKINTYANFRDDVLPRIKKLGYNVQIMAIQEHSYYASFGYHVTN  
 \*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* \*\* :\*\*\*. \*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\* :\*\*\*\*\*

Maïs-SBEIIb FFAPSSRFGTPEELKSLIDRAHELGLLVLM DVVHSHASSNTLDGLNGFDGTDTHYFHS GP  
 Maïs-SBEIIa FFAPSSRFGTPEELKSLIDKAHELGLLVLM DIVHSHSSNTLDGLNGFDGTDTHYFHGGP  
 BE2.2 FFAPSSRCGTPEELKSLIDRAHELGLLVLM DIVHSHASKNTLDGLNMF DGTDAHYFHS GP  
 BE2.1 FFAPSSRFGTPDDLKSLIDKAHELGLLVLM DIVHSHASKNTLDGLDMF DGTGQYFHS GS  
 \*\*\*\*\* \*\* : :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\* \*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\* : \*

Maïs-SBEIIb RGHHMMWDSRLFNYSWEVLRFLLSNARWWLEEKYKDFGRFDGVTSM MYTHHGLQVFTTG  
 Maïs-SBEIIa RGHHMMWDSRLFNYSWEVLRFLLSNARWWLEEKYKDFGRFDGVTSM MYTHHGLQVFTTG  
 BE2.2 RGYHHMMWDSRLFNYSWEVLRFLLSNARWWLEEKYKDFGRFDGVTSM MYTHHGLVSGFTTG  
 BE2.1 RGYHHMMWDSRLFNYSWEVLRFLLSNARWWLEEKYKDFGRFDGVTSM MYTHHGLQVEFTTG  
 \* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\* \*\*\*\*\*

Maïs-SBEIIb NFN EYFGFATD VDAVVYLMVNDLIHGLYPEAVTIGEDVSGMPTFCIPVQDGGVGF DYRL  
 Maïs-SBEIIa NYGEYFGFATD VDAVVYLMVNDLIRGLYPEAVS IGEDVSGMPTFCIPVQDGGVGF DYRL  
 BE2.2 NYTEYFGLET D VDAVVYLMVNDMIHGLYPEA I TVGEDVSGMPTFCIPVQDGGVGF DYRL  
 BE2.1 NYNEYFGYST D VDAVVYLMVNDLIHGLYPEA I VVGEDVSGMPAF CVPVEDGGVGF DYRL  
 \* : \*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* : :\*\*\*\*\* : :\*\*\*\*\* :\* :\*\*\*\*\*

Maïs-SBEIIb HMAVADKWI DLLKQSD ETWKMGDIVHTLTNRRWLEKCVTYAESHD QALVGDKTI AFWLMD  
 Maïs-SBEIIa HMAVPDKWIELLKQSD EYWEMGDIVHTLTNRRWLEKCVTYCESHD QALVGDKTI AFWLMD  
 BE2.2 HMAIADKWI EMLKRD EDWQMDI IYTLTNRRWSEK CISYAESH D QALVGDKTI AFWLMD  
 BE2.1 HMAVADKWI ELLKRD EDWQVDI FTLTNRRWGEK CVVYAESH D QALVGDKTI AFWLMD  
 \*\*\* : \*\*\*\* :\*\* : \* : :\*\*\* .\*\*\*\*\* \*\* : \* .\*\*\*\*\*

Maïs-SBEIIb KDMYDFM ALDRPSTPTIDRGIALHKMIRLITMGLGEGYLNFMGNEFGHPEWIDF PRGPQ  
 Maïs-SBEIIa KDMYDFM ALDRPSTPRIDRGIALHKMIRLVTMGLGEGYLNFMGNEFGHPEWIDF PRGPQ  
 BE2.2 KDMYDFMAVDRPSTPLIDRGIALHKMIRLITMGLGEGYLNFMGNEFGHPEWIDF PRGEQ  
 BE2.1 KDMYDFMAVDRQATPRVDRGIALHKMIRLITMGLGEGYLNFMGNEFGHPEWIDF PRDQ  
 \*\*\*\*\* :\* :\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\* \*\*\*\*\*



## Annexe 8: Alignement de séquences des enzymes de branchement d'*A. thaliana* avec cceBE1 de *Cyanotheca*

cce	-----MISADQVNQIIYNLHHD	
BE2.2	-----ASEKVLVPDNLDDDP	
BE2.1	FSLRKDSRSSGKVFARKPSYSDSSSSLATTASEKLRGHQSDSSSSASDQVQSRDITVSDDT	
		*.: .:.*
cce	FEILGCHL---LEEGKNTKKWVVRAYLPKAEAAWVIRPTERKEDPMNSVHHPNFECIEE	
BE2.2	RG-FSQIFD-----LESQTMETEAIV-----RTEDQTMNVVKERGVKPRIV-	
BE2.1	QV-LGNVDVQKTEEAQETETLDQTSALSTS---GSIS-YKEDFAKMSHSDQEVGQRKI-	
	:. :.:	: . * . . . :
cce	TPELNHYQLKVKEGEHEKVIYDPYAFSSPYL-----TDEDIYLFS--EGNHHR	
BE2.2	-----PPPGDGKKIYEIDPMLRTYNNHLDYRYGQYKRLREEIDKYEGGLEAFSR	
BE2.1	-----PPPGDGKRIYDIDPMLNSHRNHLDYRYGQYKRLREEIDKNEGGLEAFSR	
	. * ** : : :	*:* . . *
cce	IYEKLGAVHGEINGVKGVYFAVWAPNARNVSVIGDFNNWDGREHQMRKRYTIWELFVPE	
BE2.2	GYEKL---GFSRSDAGITYREWAPGAKAASLIGDFNNWNSNADIMTRNEFGVWEIFLIPN	
BE2.1	GYEIF---GFTRSATGITREWAPGAKAASLIGDFNNWNAKSDVMARNDGFWWEIFLIPN	
	** : * .. * : : **.* : . :***** : . . * : : : **.* : *	
cce	IGSGTVYKYEIKNSEGHIYEKSDPYGFYREVRPNTASI-----VVDIDNIYQWH-DEEW	
BE2.2	NTDGPAPHPG---SRVKIRMDTPSGIKDSI-PAWIKFSVQAPGEIPFNGIYDPPPEEK	
BE2.1	NADGSPAPHPG---SRVKIRMDTPSGIKDSI-PAWIKYSVQPPGEIPYNGVYDPPPEEK	
	. * : . . . . * * : . : * . . . : : : * * : *	
cce	LEKRRNSDPLKQPVSVYEVHLSWHLGSSAEKMPLLNGEADPVIWSEWNPGRFLSYEEL	
BE2.2	YVFKHPQPKRPSLRIYEAHVGMSS-----STEPMVNTYANF	
BE2.1	YAFKHPRPKKPTSLRIYESHVGMSS-----STEPKINTYANF	
	: : : : ** * : *	. . . : * : :
cce	AEKLIPYVKDMGYTHIELLPIAEHPFDGSGWYQVTGFYSPTSRFGRPEDFMYFVDKCHEN	
BE2.2	RDDVLPRIKKLGYNAVQIMAIQEHSHYASFGYHVTNFFAPSSRCGTPEELKSLIDRAHEL	
BE2.1	RDDVLPRIKKLGYNAVQIMAIQEHAYYASFGYHVTNFFAPSSRFGTDDKSLIDKAHEL	
	: : : * : * : * . : : : * * : * : * * * : * : * * : * : * : *	
cce	GIGVILDWVPGHFPHK-SHGLAYFDGTHLYE-HADPRIGEHEKWEGLTVFNFYGRHEVRNFLV	
BE2.2	GLVVLMDIVHSHASKNTLDGLNMFDDGTDHAYFHSGPRGYHMMWDSRLFNYSWEVLRYL	
BE2.1	GLVVLMDIVHSHASKNTLDGLDMFDGTDGQYFHSGSRGYHMMWDSRLFNYSWEVLRYL	
	* : * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
cce	ANVLFWFDKYHVDGIRVDAVASMLYRNYLRKEG--EWIANEYGGDEHIEAVSFIREVNTL	
BE2.2	SNARWWLEEYKFDGFRFDGVTSMYTHHGLSVGFTGNYTEYFGLTDDVAVNYLMLVNDM	
BE2.1	SNARWWLEEYKFDGFRFDGVTSMYTHHGLQVEFTGNYNEYFGYSTDDAVVYLMLVNDL	
	: * . : * : : * : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : *	
cce	LFEYFPGLISIAEESTEWKVSRPVYDGLGFLNWKWDMGMMHMLDYFNIDPYFRQYHQN	
BE2.2	IHGLYPEAITVGEDVSGMPTFCIPVQDGGVGFYRLHMAIADKWIEMLLKRDE--DWQMG	
BE2.1	IHGLYPEAIVVGEDVSGMPAFCVPVEDGGVGFYRLHMAVADKWIEMLLKRDE--DWQVG	
	: . * * : : * : : . . * * * * * : * . . . : : : : : :	
cce	NVTFSM--LYYYNENFMLALSHDEIVHGKSNMLG-KMPGDEWQKYANV-----	
BE2.2	DIITYTLNRRWSEKCSIAESHQALVGDKTIAFWLMKDMYDFMAVDRPSTPLIDRGIA	
BE2.1	DIITTLNRRWGEKCVVAESHQALVGDKTIAFWLMKDMYDFMAVDRQATPRVDRGIA	
	: : : : : : . * * * * : * . . . : * * : * :	
cce	-RALFTYMYTH--PGKTMFMSMEFGQWSEWNVGDLEWHL-----	
BE2.2	LHKMIRLITMGLGGEGLNFMGNEFGH-PEWIDFPRGEQRLSDGSVIPGNMFSYDKCRRR	
BE2.1	LHKMIRLITMGLGGEGLNFMGNEFGH-PEWIDFPRTDQHLPDGRVIAGNIGSYDKCRRR	
	: : : : * * * * * : * * : * :	
cce	-----LQYEPHQQLKQFFTDLNALYQQEPALYTHDFEYHGEWIDCNDNTHSVVSFL	
BE2.2	FDLGDADYLRVRLQEFQAMQHLEENY-----GFMTSEHQFISRKDEADRVIVFE	
BE2.1	FDLGDAEYLRVHGLQEFDRAMQNLEETY-----GFMTSEHQYISRKDEGDRVIVFE	
	* : * . * : : : : * : * . * : : * : * : * : * : * : *	
cce	RRSDDPNDSLTVVVCNFT-PQPHSHYRIGVPEAGYVELFNSDAKQYGGSNMGNLGGKWA-	
BE2.2	R-----GDLVVFVFNFWHTSSYFDYRIGCSKPKYKIVLSDDDPLFGGFNRLDRKAEYFT	
BE2.1	R-----GNLLFVFNFWHTNSYSDYRIGCSVPKGYKIVLSDNSLFGGFNRLDLSAEFFT	
	* . . * : * * * . . : * * * * * * * : * * * : * * * : . . :	
cce	DEWSFHNKPYSLDCLPLAVLILKLD-PTKVPEGTTIKEIAADEEEE-	
BE2.2	YDGLYDERPCSFVMYAPCRTAVVYALANHD-----	
BE2.1	SDGRHDDRPCSFVMYAPCRTAVVYAAVDDDDDDERSLVPIGLLPEDV	
	: . . : * * : : * : : :	

Site A

Site B

Site C



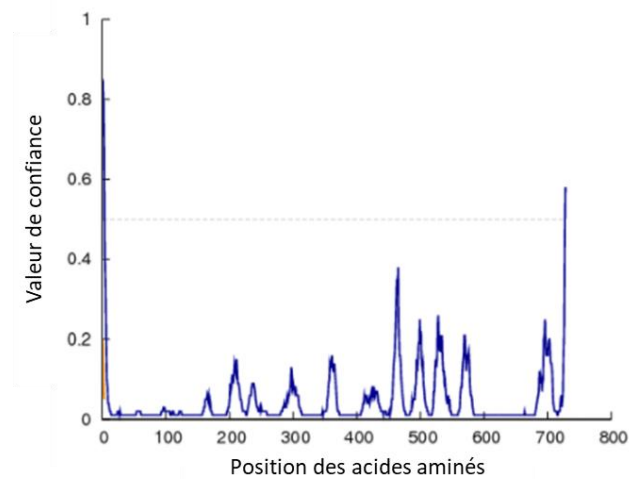
## Annexe 9: Alignement de séquences des enzymes de branchement d'*A. thaliana* avec MtBE1

MtBE1	-----EHLAPEPAEMAR-----LVA-GTHNP	
BE2.2	-----ASEKLVLPDNLDDDP	
BE2.1	FSLRKDSRSSGKVFARKPSYDSSSSSLATTASEKLRGHQSDSSSSASDQVQSRDITVSDDT	
		: :
MtBE1	HGILGAHEYDDHTVIRAFRPHAVEVVALVGKDRFSLQHLDSGLFAVALPFVDLIDYRLQV	
BE2.2	RGFSQI---FD-----LESQTMEY-----TEAV-----RTED	
BE2.1	QVLGNV---DVQKTEEAQETETLDQ-----TSALSTSGSISYKEDF	
	: :	: * : :
MtBE1	-----TYEGCE-----PHTVADAYRFLPTLGEVDLHL-FAEGRHERLWEVL-----	
BE2.2	QTMNVVKERGVKPRIVPPPGDGKKIYEDPMLRTYNNHLDYRYGQYKRLREEIDKYEGGL	
BE2.1	AKMSHSVDQEVGQRKIPPPGDGKRIYDIDPMLNSHRNHLDYRYGQYKRLREEIDKNEGGL	
	.	* : * * * * : * : * : * * :
MtBE1	GAHPRSFT--TADGVVSGVSFAVWAPNAKGVSLIGEFNGWNGHEAPMRVLGPGSGVWELFW	
BE2.2	EAFSRGYEKLGFERSDAGITYREWAPGAKAASLIGDFNNWNSADIM-TRNEFGVWEIFL	
BE2.1	EAFSRGYEIFGFTRSATGITYREWAPGAKAASLIGDFNNWNAKSDVM-ARNDFGVWEIFL	
	* . * : :	: * : * * . * * . * * : * * . * * : *
MtBE1	PDFPC-----DGLYKFRVHGADGVVTDRADEPFAFGTEVPPQTASRVTSDDYTWGDDDW	
BE2.2	PNNTDGSIPAIPHGSRVKIRMDTPSGIKDSIPAWIKFSVQAPGEIP--FNGIYDPPPEEK	Site A
BE2.1	PNNAOGSPAIPHGSRVKIRMDTPSGIKDSIPAWIKYSVQPPGEIP--YNGVYDPPPEEK	
	* : . . * : * . * : . . * : . . * : :	
MtBE1	MAGRALRNPVNEAMSTYEVHLSWRPG--LSYRQLARELTDYIVDQGFTHVELLPVAEH	
BE2.2	YVFKHPQPKRPSLRIYEAHVGMSSTEPMVNTYANFRDDVLPRIKKLGYNAVQIMAIQEH	
BE2.1	YAFKHPRPKPTSLRIYESHVGMSSTEPKINTYANFRDDVLPRIKKLGYNAVQIMAIQEH	
	. : :	: * * * * : * : * : * . * : * : * * :
MtBE1	PFAGSWGQVTSYYAPTSRFGTDDFRALVDALHQAGIGVIVDWPVPAHFPKDAW--ALGRF	
BE2.2	SYASFGYHVTNFFAPSSRCGTPEELKSLIDRAHELGLVVLMDIVHSHASKNTLDGLNMF	Site B
BE2.1	AYYASFGYHVTNFFAPSSRFGTDDLKSLIDKAHELGLVVLMDIVHSHASKNTLDGLDMF	
	: * : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
MtBE1	DGTPLYEHSDPKRGQQLDWGTYVDFGRPEVRNLFVANALYWLQEFHIDGLRVDVAVASML	
BE2.2	DGTDAAHYFHSGPRGYHMMWDSRLEFNYSWEVLRYLKSNARWWLEEKYKDFGRFDGVTSM	
BE2.1	DGTDGQYFHSGSRGYHMMWDSRLEFNYSWEVLRYLKSNARWWLEEKYKDFGRFDGVTSM	
	* * * . . * * : * : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
MtBE1	YLDYSRPEG--GWTPNVHGGRENLEAVQFLQEMNATAHKVAPGIVTIAEESTPWSGVTRP	
BE2.2	YTHHGLSVGFTGNYTEYFGLSTDVAVNYLMLVNDMIHGLYPEAITVGEDVSGMPTFCIP	
BE2.1	YTHHGLQVEFTGNYNEYFGYSTVDVAVVYMLVNDLIHGLYPEAIVVGEDVSGMPAFCVP	
	* . . . * : . * : * * * : * : * * : * : * : * : * : * : * : *	
MtBE1	TNIGGLGFSMKWMMGWMDTLDYVSRDPVYRSYHHHEMTFSMLY-AFSE-NYVLPVLSHDE	
BE2.2	VQDGGVGFYRDLHMAIADKWIEMLKRRDE--DWQMGDIITYLTNRRWSEKCSYAESHQ	
BE2.1	VEDGGVGFYRDLHMAVADKWIEMLKRRDE--DWQVGDITFTLTNRRWGEKCVVYAESHQ	
	. : * * : * : * . . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MtBE1	VVHGKGTL--WGR-----MPGNH-----VKAAGLR---SLLAYQWAHPGKQLLFMGQ	
BE2.2	ALVGDKTIAFWLMDKDMYDFMAVDRPSTPLIDRGIALHKMIRLITMGL-GGEGYLNFMGN	
BE2.1	ALVGDKTIAFWLMDKDMYDFMAVDRQATPRVDRGIALHKMIRLITMGL-GGEGYLNFMGN	
	. : * . * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MtBE1	EFQRAEWSQ--RGLDWF----QLDENGFNGIQRVLDIND--IYRCHPALW----SLD	
BE2.2	EFGHP-EWIDFPRGEQRLSDGSVIPGNNFSYDKRRRFDLGDADYLRYP-GLQEFDRAMQ	
BE2.1	EFGHP-EWIDFPRTDQHLPDGRVIA GNNFSYDKRRRFDLGDADYLRYP-GLQEFDRAMQ	Site C
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MtBE1	TTPEGY-----SWIDANDSANNVLSFMRYGSDGSVLACVFNFA-GAEHRDYRLGLPRA	
BE2.2	HLEENYGFMTSEHQFISRKDEADRIVIFER-----GDLVVFVNFHWTSSYFDYRIGCSKP	
BE2.1	NLEETYGFMTSEHQYISRKDEGDRIVIFER-----GNLLVFVNFHWTNSYSDYRIGCSVP	
	* * . . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MtBE1	GRWREVLNTDATIYHGSGIGNLG-GVDATDDPWHGRPASAVLVLPPTSALWLTPA-----	
BE2.2	GKYKIVLSDDDPLFGGFNRLDRKAEYFTYDGLYDERPCSFMVYAPCRTAVVYALANHD--	
BE2.1	GKYKIVLSDSDNSLFGGFNRLDSDAEFFTS DGRHDDRPCSFMVYAPCRTAVVYAAVDDDDD	
	* : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MtBE1	-----	
BE2.2	-----	
BE2.1	DERSSLVPIGLLPEDV	

## Annexe 10 : Alignement de séquences des enzymes de branchement d'*A. thaliana* avec GlgB de *E. coli*

GlgB	-MSDR-----IDRD-----VINALIAGHFADP-----	
BE2.2	-----ASEKVLVDPNLLDD	
BE2.1	-FSLRKDSRSSGKVFARKPSYSDSSSLATTASEKLRGHQSDSSSSASDQVQSRDVTSSD	
GlgB	---FVSLGMHKTTAGLEVRALLPDATDVVWVIEP--KTGRKLAKLECLDSRGGFFSGVIPRR	
BE2.2	PRGFSQIFD-----LESQTIMEY--TEAV-----RTEDQTMNVVKEKRGVPRIVPPP	
BE2.1	TQVLGNVDVQKTEEAQETETLDQ--TSALSTSGSISYKEDFAKMSHSVDQEVGQRKIPPP	
	: . : * : : * . . . . . : . : *	
GlgB	-KNFFRYQLAVVWHGQQNLIDDPYRFGP---LIQEMDAWLLSEGTHLRPYETLGAHADTM	
BE2.2	GDGKKIYEIDPMLRTYNNHL--DYRYGQYKRLREEIDKYEGGLEAFSRGYEKLGFSD	
BE2.1	GDGKRIYDIDPMLNSHRNHL--DYRYGQYKRLREEIDKNEGGLEAFSRGYEIFGFT---	
	. . : : : . * : * : * * . . . * * * : *	
GlgB	DGVTGTRFSVWAPNARRVSVVGQFNWYWDGRRHPMLRKRKESGIWELFIPGAHNGQLYKY--	
BE2.2	RSDAGITYREWAPGAKAASLIGDFNWNNSNADIM--TRNEFGVWEIFLNNNDGSPAIPHG	Site A
BE2.1	RSATGITYREWAPGAKAASLIGDFNWNNAKSDVM--ARNDFGVWEIFLNNNDGSPAIPHG	
	. : * : * * : * : * : * * * . . . * * : * : * : * : *	
GlgB	-----EMIDANGNLRKSDPYAFEAQMRPETA-----SLICGLPEKVVQTEERKKANQFDA	
BE2.2	SRVKIRMDTPSGIKD--SIPAWLKFSVQAPGEIPFNGIYYDPPEEEK--YVFKHPQPKRK	
BE2.1	SRVKIRMDTPSGIKD--SIPAWIKYSVQPPGEIPYNGVYYDPPEEDK--YAFKHPRPKPT	
	. * . * * * : : : . . : : * : : * : : * : : *	
GlgB	PISIEVHLGSRWRHTDNNFWSYRELADQLVPYAKWMGFTHLELLPINEHPPFDGSGWGYQ	
BE2.2	SLRIYEAHVGMSSSTEPM---VNTYANFRDDVLPRIKKLGYNAVQIMAIQEHSHYASFGYH	
BE2.1	SLRIYESHVGMSSSTEPK---INTYANFRDDVLPRIKKLGYNAVQIMAIQEHAYYASFGYH	
	: * * * * : * . : * : * : * * * : * : * : * : * : * : *	
GlgB	PTGLYAPTRRFGRDFFRYFIDAHAAGLNVLVDWVPGHFPTDDF--ALAEFDGNTLYEHS	
BE2.2	VTNFFAPSSRCGTPEELKSLIDRAHELGLVVLMDIVHSHASKNTLDGLNMFDTGTDAYFH	Site B
BE2.1	VTNFFAPSSRFPTDDLKSLIDKAHELGLVVLMDIVHSHASKNTLDGLDMFDGTDGQYFH	
	* : * : * : * * * : : : : * * * * * * * * * * * * . . : . * * * * : *	
GlgB	DPREGYHQDWNTLIYNYGRREVSNFLVGNALYWIERFGIDALRVDASMIYRDYSRKEG	
BE2.2	SGPRGYHWMWDSRFLFNYGSWEVLRYLRLSNARWWLEEYKFDGFRFDGVTSMYTHHGLSVG	
BE2.1	SGSRGYHWMWDSRFLFNYGSWEVLRYLRLSNARWWLEEYKFDGFRFDGVTSMYTHHGLQVE	
	. . * * * * : * : : * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * . . .	
GlgB	--EWIPNEFGGRENLEAIEFLRNTNRILGEQVSGAVTMAEESTDFPGVSRPQDMGGLGFW	
BE2.2	FTGNYTEYFGLTDDVDVAVNYLMLVNDMIHGLYPEAITVGEDVSGMPTFCIPVQDGGVGF	
BE2.1	FTGNYTEYFGYSTDDVAVVYLMVNDLIHGLYPEAIVVGEDVSGMPAFVCPVEDGGVGF	
	: * * * * : * : * : * * * * * * * : * : * : * : * : * : * * * * *	
GlgB	YKWNLGMWHTLDYMKLDPVYRQYHDKLTFGILYN--Y--TENFVPLSHDEVVHGKKSIL	
BE2.2	YRLHMAIADKWIEMLKKRDE--DWQMGDIYTLTNRWSEKCSISYAESHQALVGDKTIA	
BE2.1	YRLHMAVADKWIEMLKKRDE--DWQVGDITFTLTNRWGEKCVVYAESHQALVGDKTIA	
	* : : . . : : * : : : . . : : . . : . . * * * : * : * *	
GlgB	DRMPGDAWQKAFAN-----LRAYYG--WMAF--PGKLLFMGNEFAQGREWNH	
BE2.2	FWLMDKMDYDFMAVDRPSTPLIDRGIALHKMIRLITMGLGGEGLNFMGNEFGHP--EWID	
BE2.1	FWLMDKMDYDFMAVDRQATPRVDRGIALHKMIRLITMGLGGEGLNFMGNEFGHP--EWID	
	: . . *	
GlgB	DASLDWHLLEG-----GNWHHGVRQLVRDL----NLTYRH----HKAMHELDLDPYGF--	
BE2.2	FPRGEQLSDGSVIPGNNFSYDKCRRRFDLGDAYLRYRGLQEFDAQMQLH--EENYGFMT	Site C
BE2.1	FPRDQHLDPGRVIAGNNGSYDKCRRRFDLGDAEYLRHGLQEFDRAMQLH--EETYGFT	
	: * : * * * * : . . * * * * * * : * * * * * * : * * * * * * * * *	
GlgB	---EVLVDDKERSVLI FVRRDKEGNEI IVASNFTVPRHDYRFGINQPGKWEILNTDS	
BE2.2	SEHQFISRKDEADRVIVFER----GDLVVFVNFHWTSSYFDYRIGCSKPGKYKIVLSDSD	
BE2.1	SEHQYISRKDEGDRVIVFER----GNLLFVFNHWTNSYSDYRIGCSVPGKYKIVLSDSN	
	: : * : *	
GlgB	MHYHGSNAGNGGTVHSDEIASHGRQ----HSLSLTLPLATI--WLVREAE-----	
BE2.2	PLFGGFNRLDRKAAY--FTYDGLYDERPCSFMV--YAPCRTAVVYALANHD-----	
BE2.1	SLFGGFNRLDSSAEF--FTSDGRHDDRPCSFMV--YAPCRTAVVYAAVDDDDDDERSSLV	
	: * * : : . : : * * * * * * : : * * * * : : :	
GlgB	-----	
BE2.2	-----	
BE2.1	PIGLLPEDV	

## Annexe 11 : Prédiction de désordre et d'interaction protéine-protéine pour GlgB d'*E. coli*



**Figure 72: Prédiction de désordre et d'interaction protéine-protéine pour GlgB.** Le graphique représente les valeurs de confiance en fonction de la position des acides aminés (en bleu), le seuil au-delà duquel les résidus sont considérés comme désordonnés est indiqué par des tirets gris. En orange sont indiqués les résidus pouvant être impliqués dans des interactions protéine-protéine avec le niveau de confiance correspondant.

**Biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* Starch Branching Enzyme 2.2 reveals an enzymatic positive cooperativity**

A. Wychowski<sup>a</sup>, C. Bompard<sup>a</sup>, F. Grimaud<sup>b</sup>, G. Potocki-Véronèse<sup>b</sup>, C. D'Hulst<sup>a</sup>, F. Wattebled<sup>a</sup>, X. Roussel<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Univ. Lille, CNRS, UMR8576 – UGSF – Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France.*

<sup>b</sup>*LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France*

\* Corresponding author: [xavier.rousseau@univ-lille1.fr](mailto:xavier.rousseau@univ-lille1.fr); Phone: +33 3 20 33 72 41; Fax : +33 3 20 43 65 55

## Abstract

Starch Branching Enzymes (SBE) catalyze the formation of  $\alpha(1\rightarrow6)$  branching points on starch polymers: amylopectin and amylose. SBEs are classified in two groups named type 1 and 2. Both types are present in the entire plant kingdom except in some species such as *Arabidopsis thaliana* that expresses two type 2 SBEs: BE2.1 and BE2.2. The present work describes in vitro enzymatic characterization of the recombinant BE2.2.

The function of recombinant BE2.2 was characterized in vitro using spectrophotometry assay, native PAGE and HPAEC-PAD analysis. Size Exclusion Chromatography separation and SAXS experiments were used to identify the oligomeric state and for structural analysis of this enzyme.

Optimal pH and temperature for BE2.2 activity were determined to be pH 7 and 25°C. A glucosyl donor of at least 12 residues is required for BE2.2 activity. The reaction results in the transfer in an  $\alpha(1\rightarrow6)$  position of a glucan preferentially composed of 6 glucosyl units. In addition, BE2.2, which has been shown to be monomeric in absence of substrate, is able to adopt different active forms in presence of branched substrates, which affect the kinetic parameters.

BE2.2 has substrate specificity similar to those of the other type-2 BEs. We propose that the different conformations of the enzyme displaying more or less affinity toward its substrates would explain the adjustment of the kinetic data to the Hill equation.

This work describes the enzymatic parameters of *Arabidopsis* BE2.2. It reveals for the first time conformational changes for a branching enzyme, leading to a positive cooperative binding process of this enzyme.

## Keywords

*Starch Branching Enzyme; Starch; Arabidopsis thaliana; in vitro analysis; glycoside hydrolase family 13; kinetic cooperativity*

## 1. Introduction

Starch and glycogen are two  $\alpha$ -glucans produced by living cells to serve as carbon and energy storage polysaccharides. They both share a common chemical primary structure made of glucosyl residues linked together by  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidic bonds, to form linear glucans, and  $\alpha(1\rightarrow6)$  linkages also called branching points [1, 2]. However, both polysaccharides can be differentiated by their macromolecular architecture. In glycogen, branch points are regularly distributed (one  $\alpha(1\rightarrow6)$  linkage every 8 to 13 glucosyl residues) leading to the formation of homogenous, spherical, amorphous and water-soluble particles. Conversely, starch is a heterogeneous polysaccharide made by the combination of two structurally distinct polymers: amylose and amylopectin. It is organized in the form of huge, dense and semi-crystalline particles. Amylopectin is the main fraction of starch defining the matrix of the storage-polysaccharide. It has a specific branching pattern in which  $\alpha(1\rightarrow6)$  branch points are concentrated at the basis of a structure designated as "cluster". Each cluster is composed of an amorphous lamella at its basis where  $\alpha(1\rightarrow6)$  bonds are concentrated and a crystalline lamellae where the  $\alpha(1\rightarrow4)$  linked linear chains intertwine to form double helices.

The synthesis mechanisms of starch and glycogen are similar. They rely on the activity of elongating enzymes starch- or glycogen-synthases (EC 2.4.1.11 or EC 2.4.1.21) that transfer glucose of a precursor, ADP-Glucose or UDP-glucose, to the non-reducing end of an  $\alpha$ -glucan allowing the elongation of the molecule by creating  $\alpha(1\rightarrow4)$  linkages [3]. Ramifications (i.e.  $\alpha(1\rightarrow6)$  bonds) are then created by branching enzymes (BEs or 1,4-alpha-glucan branching enzyme EC 2.4.1.18) [4, 5].

More precisely, BEs cleave an  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucosidic bond of a donor glucan and transfer the released fragment to an acceptor glucan by introducing an  $\alpha(1\rightarrow6)$  branch point. This acceptor can be part of the original glucan chain (intramolecular mechanism) or an adjacent glucan chain (intermolecular mechanism) [6].

Like  $\alpha$ -amylases with which they share structural and mechanistic similarities, BEs are classified within both the Glycoside Hydrolase family 13 (GH13) and 57 (GH57) of the CAZy classification [7]. These two families share a similar catalytic mechanism, but they strongly differ in their amino acid sequences and tertiary structure. Furthermore, while the GH57 family is only formed with prokaryotic enzymes, GH13 family is divided into two subfamilies, GH13\_8 and GH13\_9 comprising eukaryote and prokaryote enzymes respectively [8-11].

In plants, starch branching enzymes (BEs) that are involved in starch metabolism are members of the GH13 family. They are classified into two classes, type 1 or B-family and type 2 or A-family [12]. Enzymes belonging to either class differ in the substrate minimum chain length required to be cleaved, its branching pattern and the length of the transferred glucan. The main

characteristics of type 1 or 2 BEs were determined from structural analysis of amylopectin extracted from corresponding mutants. It was concluded that type 1 BEs are able to transfer longer glucan chain ( $DP \leq 40$ ) and that amylose is the preferred substrate, whereas type 2 BEs transfer shorter chains (DP 6 to 15) and preferably use amylopectin as substrate. These results were confirmed by in vitro analysis where recombinant BEs were mixed with either amylose or amylopectin and the subsequent products were structurally characterized [6, 8, 10, 13-16].

To date, five atomic structures GH13 BEs have been solved [8, 17-21]. GH13 BE members share common structural characteristics. The central TIM barrel  $(\beta/\alpha)_8$ , comprising the catalytic domain with the triad made of two aspartate and one glutamate involved in bond cleavage, is highly conserved. This domain is flanked by variable C-terminal and N-terminal regions made by a Carbohydrate Binding Module (CBM48) and a N-terminal domains [8, 17-21]. The N-terminal region of all BEs is involved in the specificity of the transferred molecule, whereas the C-terminal domain determines the affinity for the substrate [8, 18, 20, 22]. Even if at least 10 of them have been biochemically characterized, there are still no structural data for type 2 BEs [23].

In *Arabidopsis thaliana*, only two BEs are involved in transitory starch biosynthesis in leaves: BE2.1 and BE2.2 (products of AtBE3 and AtBE2 genes respectively) [24]. Both enzymes belong to type 2 class. The absence of either BE2.1 or BE2.2 leads to only a slight modification of the amylopectin structure suggesting overlapping functions between the two isoforms [25]. Consequently, starch accumulation collapses in the double mutant defective for both enzymes [25]. Complementation of this double mutant with BEs of plant or prokaryotic origin restores the synthesis of insoluble granules composed of amylopectin- and amylose-like polymers. It was, however, demonstrated that the origin of the enzyme and its expression level influences the structure of the polymers produced [26, 27].

An in-deep characterization of the molecular mechanism underlying BEs activity is therefore required to provide a better understanding of the process of amylopectin / amylose synthesis in leaves. As already mentioned, previous works have provided some clues about the activity of plant BEs in storage organs [28-30]. In this work, we report the enzymatic characterization of the purified recombinant starch BE2.2 from *A. thaliana* leaves (GB: CAB82930.1). We have determined its optimum pH and temperature, its catalytic parameters and affinity constants ( $K_{0.5}$ ) for amylose and amylopectin. In addition, we have characterized the enzyme substrate specificity towards moderately branched, poorly branched and strictly linear glucans as well as product selectivity, providing clues of intra-molecular mechanism. Furthermore, since the structure of type 2 BEs has not been resolved yet, we report a SAXS study allowing us to describe the structural organization of *Arabidopsis* BE2.2 in solution.

## 2. *Materials and methods*

### 2.1 Expression and Purification of the recombinant *A. thaliana* BE2.2

The length of BE2.2 transit peptide was determined in silico using ChloroP method [31]. Synthetic genes encoding BE2.2, deleted of the first 61 amino acids corresponding to the transit peptide, was synthesized with codon usage optimized for *E. coli* (GeneOptimizer®, Geneart, life technology) and cloned into the Gateway® pML375 expression vector [32]. *E. coli* strain BL21 (DE3, Invitrogen®) was used for the expression of recombinant protein with a 6×His tag fused to its N-terminus.

*E. coli* BL21 transformants were grown at 37°C in LB medium supplemented with ampicillin (100 mg.l<sup>-1</sup>) up to an OD<sub>600</sub> of 0.5, induced for protein production with IPTG (1 mM) and incubated for 20h at 18°C. After centrifugation at 4 000 × g for 10 min at 4°C, harvested cells were washed twice in Tris 50 mM, sucrose 250 mM, EDTA 5 mM buffer. The pellet was flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

The cells were suspended in lysis buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 40 mM, pH 7.4, Triton X100 0.1% and one tablet of complete ULTRA protease inhibitor cocktail EDTA-free tablet (Roche) per litter of culture), lysed by French press at 4°C, 1500 psi and centrifuged at 14 000 × g for 30 min at 4°C. The recombinant BE was purified from soluble extract by affinity to Ni<sup>2+</sup> HiTrap IMAC FF (5 mL column, GE Healthcare), connected to AktaStart system, which was pre-equilibrated with 25 mL of lysis buffer. After loading the soluble fraction, the column was washed with 100ml of washing buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, imidazole 40 mM, pH 7.4), and eluted with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 500 mM and imidazole 300 mM, pH 7.4 at a flow rate of 5.0 mL.min<sup>-1</sup>. Affinity chromatography was followed by dialysis performed at 4°C against phosphate buffer saline (PBS) with NaCl 50 mM, glycerol 5%, at pH 7.

## 2.2 PAGE

### 2.2.1 SDS-PAGE

Samples (0.5 and 1 µg) of purified recombinant Arabidopsis BE2.2 were analysed by SDS PAGE for 1h at 15V.cm<sup>-1</sup> (Mini-PROTEAN® Tetra system, migration buffer Tris 25 mM, glycine 192 mM), on 10 % polyacrylamide gel (0.1 % SDS) under the conditions described in [33] and stained with InstantBlue™ (expedon).

### 2.2.2 Denaturing zymogram for starch-modifying enzymes

10 volumes of purified recombinant BE2.2 (corresponding to 0.5 or 1 µg of protein) were boiled for 5 min in combination with 1 volume of β-mercaptoethanol and 1 volume of SDS 20 % (v/v). The mix was then loaded on denaturing starch containing gel (8 % polyacrylamide,



0.3 % potato starch, 0.2% SDS at final concentration). Migration was performed during 1h, at room temperature and  $15 \text{ V.cm}^{-1}$ , in the migration buffer (25mM Tris, 192mM Glycine and 1mM DTT, 0.1 % SDS). After migration, the gel was washed four times, 30 min each, in 40 mM Tris and incubated overnight in 25 mM Tris, 192 mM Glycine and 20 mM DTT (pH 8.3). The gel was rinsed with water and starch-modifying activities were revealed by iodine staining.

### 2.2.3 Native-PAGE

BE2.2 (0.5 or 1  $\mu\text{g}$ ) and BSA (2 $\mu\text{g}$ ) were loaded on native PAGE (7.5 % acrylamide) containing various concentration (0 to 0.3 % final concentration) of potato amylose type III (Sigma); potato amylopectin (Sigma) or linear  $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucans (A600 produced in vitro by the recombinant amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*, [34, 35]). Samples were submitted to an electrophoresis under native conditions at  $4^\circ\text{C}$  at  $15 \text{ V.cm}^{-1}$  for 2h in the migration buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine and 1 mM DTT).

One part of the gel was washed with water and stained with InstantBlue™ (expedion). Other parts of gel were used to visualize branching activity. Another gel containing no glucan was transferred, 15 V over night at room temperature, on native PAGE containing 0.3 % of potato amylopectin (Sigma) to visualize BE activity.

Visualization of BE activity was performed according to the method described in part 2.2.2 and in [36] using phosphorylase “ a ” stimulation assay. Gel were washed twice with washing buffer HEPES 50 mM, glycerol 10 % (v/v) pH 7 and incubated overnight at room temperature in 30 ml of HEPES 50 mM, G 1 P 50 mM, AMP 2.5 mM, glycerol 10 % (v/v), pH 7 and 28 U of rabbit muscle phosphorylase “ a ” (Sigma). The gels were rinsed with water and branching activities were revealed by soaking the gel into iodine solution (0.1 %  $\text{I}_2$  (w/v) and 1 % KI (w/v)).

### 2.3. SAXS data collection

Purified BE2.2 protein sample solution was centrifuged for 10 min at  $10,000 \times g$  prior to X-ray analysis in order to eliminate all aggregates. Protein concentration was measured by UV absorption at  $\lambda=280 \text{ nm}$  on a Thermo Scientific NanoDrop 1000 spectrophotometer. A stock solution was prepared at a final concentration of  $10.73 \text{ mg.ml}^{-1}$ , stored at  $4^\circ\text{C}$ , and then directly used for the experiments. SAXS experiments were conducted on the SWING beamline at Synchrotron SOLEIL ( $\lambda= 1.033 \text{ \AA}$ ). The Avix charge-coupled device detector was positioned to collect data in the Q range of 0.008 to  $0.4232 \text{ \AA}^{-1}$  ( $Q = 4\pi\sin\theta \lambda^{-1}$ , where  $2\theta$  is the scattering angle). The monodisperse sample solution was first subjected to SEC separation at  $15^\circ\text{C}$  followed by an inline SAXS measurement. To this end, two injection volumes (25 and 70  $\mu\text{l}$ ) of protein sample were loaded onto a size-exclusion column (SEC-3 300  $\text{\AA}$  Agilent), equilibrated with PBS (pH 7),

50 mM NaCl, and 5 % glycerol using an Agilent HPLC system and eluted directly into the SAXS flow-through capillary cell at a flow rate of 0.2 ml.min<sup>-1</sup> [37]. SAXS data were collected continuously, with a frame duration of 1 s and a dead time between frames of 0.5 s. Selected frames corresponding to the main elution peak were averaged using FOXTROT [37], a dedicated homemade application. Several frames were collected during the first minutes of the elution, and these were averaged to account for buffer scattering, which was subsequently subtracted from the signal during elution of the protein. Data reduction to absolute units, frame averaging and subtraction were done using FOXTROT [37]. All subsequent data processing, analysis and modelling steps were carried out with PRIMUS and other programs of the ATSAS suite [38]. The molecular weight of BE2.2 was determined using the SAXSMoW2 package, a method to determine the molecular weight of proteins in dilute solution, with an error smaller than ~ 10 %, by using experimental data of a single SAXS curve measured on a relative scale [39].

#### 2.4. SAXS data processing, analysis and *ab initio* modeling

The experimental SAXS data for BE2.2 sample was linear in a Guinier plot of the low  $q$  region, indicating that the proteins had not undergone aggregation. The radius of gyration ( $R_g$ ) was derived by the Guinier approximation  $I(q)=I(0) \exp(-q^2R_g^2/3)$  for a  $qR_g$  value of  $<1.16$  using PRIMUS [40]. Interference-SAXS profiles were estimated by extrapolated the measured scattering curve to infinite dilution. The program GNOM [41] was used to compute the pair-distance distribution functions,  $p(r)$ . This approach also features the maximum dimension of the macromolecule,  $D_{max}$ . BE2.2 shape was derived from the experimental data using 10 runs of the program GASBOR [41]. These models were averaged to determine common structural features and to select the most typical shape using the programs DAMAVER [42] and SUPCOMB [43].

#### 2.5. Enzyme assays

Branching enzyme activity was assayed according to the method described in [44]. This assay is based on monitoring the decrease of absorbance at 660 nm or at 540 nm of the glucan-iodine complex resulting from the branching of amylose type III from Potato (Sigma) or amylopectin from potato (Sigma).

##### 2.5.1 Determination of BE enzyme optimum pH

Mixtures of 280  $\mu$ l containing 3 mg.ml<sup>-1</sup> of amylose in Tris 120 mM, acetic acid 30 mM and Imidazole 30 mM (adjusted at pH from 4 to 8.5), and 2  $\mu$ g of BE2.2 was incubated at 30 °C. Aliquots of 14  $\mu$ l were regularly taken and diluted into 626  $\mu$ l of buffer, and 160  $\mu$ l of iodine solution

(0.1 % I<sub>2</sub> (w/v) and 1 % KI (w/v)). The reaction rate was measured by monitoring the change in absorbance of the glucan–iodine complex at 660 nm with time. One unit of enzyme activity was defined as the decrease of 1.0 unit of absorbance per min. Enzyme specific activity (% of the activity determined at optimal pH) versus pH was fitted using a bell-shaped regression curve.

### 2.5.2 Determination of BE enzyme optimum temperature

BE2.2 (2 µg) was incubated at different temperatures (from 10°C to 35°C) in mixtures of 280 µl containing 3 mg.ml<sup>-1</sup> of amylose in Tris-HCl 50 mM or PBS buffer with NaCl 50 mM at pH 7. Aliquots of 14 µl were regularly taken and diluted into 626 µl of appropriate buffer and 160 µl of iodine solution. The linear reaction rate was determined as in 2.5.1. Enzyme specific activity (%) versus temperature was fitted using a bell-shaped regression curve.

### 2.5.3 Determination of substrate concentration for half-saturation

BE2.2 was incubated at different concentrations of either amylose or amylopectin (from 0 to 4 mg.ml<sup>-1</sup>) in 280 µl final volume of PBS buffer with NaCl 50 mM at both optimum temperature and pH conditions. Aliquots were regularly taken and diluted into 640 µl final volume of buffer and 160 µl of iodine solution were added. The linear reaction rate was determined as described previously. Kinetic parameters were deduced from non-linear least square regression of experimental data sets (n>3), enzyme specific activity (%) versus substrate concentration, according to Hill equation curve.

$$AS = \frac{AS_{max} * [S]^h}{K_{0.5}^h + [S]^h}$$

AS, specific activity; AS<sub>max</sub>, maximal specific activity; h, hill number;  
S, substrate concentration; K<sub>0.5</sub>, substrate concentration for half saturation

## 2.6. Characterization of BE specificities, analysis of the chain length distribution of branched products by HPAEC-PAD

Linear α(1→4) glucans A600, potato amylose or potato amylopectin (2 mg.ml<sup>-1</sup>) were incubated with 1U.ml<sup>-1</sup> of BE2.2 in 0.5 ml in PBS buffer with NaCl 50 mM at both optimum temperature and pH conditions. After 24h incubation, the reactions were stopped by heating for 10 min at 99°C. One volume of sodium acetate buffer 110 mM (pH 3.5) was added to a final concentration of 55 mM. The reaction mixture was divided into two parts of 0.5 ml. One part was not debranched, and the second one was incubated with 4 U of isoamylase isolated from

*Pseudomonas* sp. (Megazyme) and 2 U of pullulanase from *K. pneumoniae* (Megazyme). After overnight debranching at 42 °C, the reaction was stopped by heating for 10 min at 99°C. Both solutions were desalted using Extract Clean Carbo (Grace®). Chain length distributions of each reaction mixture were obtained by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD, Dionex ICS 300, CarboPac PA-200 column: 250 × 3 mm) according to [44]. Linear glucans A600 were used as standards.

### 3 Results

#### 3.1 Expression and Purification of Recombinant Arabidopsis Branching enzyme 2.2 for biochemical and SAXS studies

A polynucleotide fragment corresponding to the Arabidopsis BE2.2 cDNA devoid of its transit peptide was synthesized with a codon usage optimized for *Escherichia coli* expression (GeneArt AG, Regensburg, Germany) and inserted into the pML375 expression vector. The expressed fusion product contains a N-terminal 6His-tagged and a thrombin cleavage site. After IMAC purification, the purity of the expressed protein was assayed by separation in SDS- PAGE followed by Coomassie blue staining (Fig. 1A). One species with a molecular weight corresponding to BE2.2 was observed (89,486 Da).

The activity of this purified recombinant enzyme was then evaluated by different zymogram procedures. In a first approach, denatured purified proteins were loaded onto a starch containing polyacrylamide gel and migration was performed in denaturing conditions. Following the in-gel protein renaturation step, the gel was incubated overnight at room temperature in a branching enzyme activity buffer. In a second approach, migration was performed in native conditions on a gel without substrate. After migration, the gel was either soaked in a buffer containing Glc-1-P and phosphorylase “a” or the proteins were transferred on a starch containing gel. In the first case, linear glucans produced by the phosphorylase “a” become substrates for the branching enzymes and are stuck into the gel. Iodine staining of the gel reveals the presence of these branched polysaccharides (Fig. 1C). In the second case, proteins transferred in native condition onto starch containing gel allow substrate modifications that are highlighted by iodine staining (Fig. 1D). In all cases, only one activity band was detected after iodine-staining treatment, indicating that the purified BE2.2 is active and not contaminated by any other glucan-modifying enzyme.

#### 3.2 SAXS data collection and *ab initio* modeling

The structure of BE2.2 in solution was determined by Small Angle X-ray Scattering (SAXS). In order to determine the shape, size in solution of BE2.2, the purified sample was submitted to

SEC. The elution profile revealed a major peak (Fig S1A), which corresponds to the monomeric form of BE2.2. As previously described, SAXS data collection was performed exclusively on this major peak. SAXS curve obtained from BE2.2 is shown in Fig S1. The slope and intensity at zero angle of the experimental scattering data allowed to calculate the  $R_g$  (34.5 Å) and the monomeric state of BE2.2 in solution was confirmed using SAXSMoW2 [39]. The distance distribution function displayed a biphasic pattern indicating a multi-domain and also elongated shape with a maximum diameter  $D_{max}$  (126 Å). The values of  $R_g$ , and  $D_{max}$  together with the Kratky plot analysis are consistent with an elongated molecule devoid of large unstructured regions (Fig. S1).

The modelling of low-resolution shapes for BE2.2 was performed as described in the material and method section. The most typical form that has the least deviation from other envelopes is shown in Fig. 2. The shape of BE2.2 presents a main globular core with a smaller emerging side domain (Fig. 2A). This result correlates with known structures of GH13\_8/9 enzymes displaying a multi-domain organization [8, 17, 45, 46] which is known to possess a N-terminal domain emerging from a main globular core containing, the CBM48, the  $(\beta/\alpha)_8$  barrel and the C-terminal region. In the two complete BE1 atomic structures of *Mycobacterium tuberculosis* (MtBE1) and of *Cyanotheca* sp. ATCC 51142 (cceBE1), covering a larger sequence in their N-terminal domains than their human and rice (*Oryza sativa*) counterparts, the position of the N-terminal domain was different although their structures were similar [8, 20]. MtBE1 is an elongated protein in which the N-terminal domain is located at one end, in contact only with CBM48. In cceBE1, this domain makes contact with both CBM48 and the TIM barrel domains and is located at the opposite of the active site (Fig. 2B) leading to a more globular shape of the protein. In order to identify the position of the N-terminal domain of BE2.2, we compared the overall structures of both MtBE1 and cceBE1 to the BE2.2 SAXS envelope (Fig. 2). This result showed that contrary to cceBE1, the structure of MtBE1 fits the two described regions of the BE2.2 SAXS envelope suggesting that the four domains of BE2.2 have an organization closer to that described for MtBE1.

### 3.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay: BE2.2 affinity for amylopectin, amylose or linear $\alpha(1\rightarrow4)$ glucans.

The affinity of the recombinant BE2.2 toward various substrates was tested by protein retardation on polyacrylamide gel. Purified BE2.2 was loaded onto native-PAGE containing different concentrations of amylopectin, amylose or linear  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucans. After migration in native conditions, gels were stained with Coomassie Blue (Fig. 3A, 4A, 5A) or incubated in appropriate buffer for BE activity before iodine staining (Fig. 3B, 4B, 5B). Higher was the amylopectin concentration within the gel (0% - 0.3% final concentration), higher was the protein

retardation. Moreover, while only one band corresponding to BE2.2 was observed after Coomassie blue staining in substrate-free gel, up to three bands were distinguished as substrate concentration increases (Fig. 3A) suggesting the formation of different BE2.2 forms. All these forms were enzymatically active (Fig. 3B). Bovine Serum Albumin (BSA) was used as a control to check that the observed protein retardation was not a consequence of steric hindrance due to the presence of increasing concentration of polysaccharides within the gel. This test was carried out either with BSA alone or with BSA mixed with BE2.2. BSA migration profile had remained identical whatever the conditions used indicating that the concentration of substrates within the gel used during this experiment does not alter per se protein migration. Moreover, the use of BSA defined a useful internal standard to estimate the strength of protein retardation imposed by the presence of polysaccharides in the gel. Thus, the ratio between BE2.2 and BSA migration distances allowed the calculation of BE2.2 affinity constant ( $K_s$ ) for amylopectin (Fig. 3C and Table S1). This calculation was made for the different forms of more or less retarded BE2.2. The same set of experiments performed with different concentrations of amylose gave also three different bands of BE2.2 (Fig. 4A), all three being enzymatically active (Fig. 4B). However protein retardation is less pronounced with amylose compared to amylopectin indicating that BE2.2 has less affinity for amylose than for amylopectin (Fig. 4C and Table S2).

Finally, the affinity of BE2.2 toward linear  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucans was also assessed using A600 which is a mix of DP3 to DP<50 linear glucans (chain length distribution profile of A600 is presented in Fig. 9A). In this case, almost no retardation of BE2.2 was observed even when 0.3% of A600 are added to the gel. Moreover, only one band of BE2.2 was distinguished after Coomassie blue staining or by zymogram (Fig. 5A and B). Even if BE2.2 can use linear glucan as substrate (as seen with zymograms performed using the phosphorylase « a » stimulation buffer) its affinity for substrate with DP lower than 100 is very low.

#### 3.4 Determination of the kinetic parameters of BE2.2

Kinetic parameters of BE2.2 were determined using in vitro assay as described in Roussel et al. (2013) [44]. Enzyme activity was monitored by the decrease of absorbance at 660 nm of the glucan-iodine complex resulting from the branching of amylose. BE2.2 specific activity was determined to be optimal at 25°C and pH 7 (Fig. 6A and 6B).

Specific activities obtained for different concentrations of amylose or amylopectin were adjusted to the Hill equation and allowed us determining the substrate concentration for half saturation ( $K_{0.5}$ ) for each substrate.  $K_{0.5}$  for amylose was determined at 1.53 mg.ml<sup>-1</sup> (Fig. 6C) with a Hill number (h) of 2.8. For amylopectin specific enzyme activity was estimated by monitoring

the decrease of absorbance of the polysaccharide-iodine complex at 540 nm. The  $K_{0.5}$  for amylopectin was determined at  $1.1 \text{ mg.ml}^{-1}$  (Fig. 6D) with  $h = 3.4$ .

### 3.5 Characterization of donor substrate and of the transferred $\alpha$ -glucan fragments.

Based on protein retardation experiments, it was clear that the BE2.2 affinity and activity were higher toward amylopectin than toward amylose. The products of branching reactions were characterized after incubation of BE2.2 with different polysaccharides: amylopectin, amylose, and the linear glucans A600. In each case, the change in the chain length distribution (CLD) was monitored by HPAEC-PAD analysis of the final debranched products.

#### 3.5.1 BE2.2 action onto amylopectin

Amylopectin was submitted to the action of 1 U of BE2.2 for 24 h at  $25^{\circ}\text{C}$  for a reaction to completion. The reaction was stopped by heating and the CLD profile of the resulting product was then established after enzymatic debranching. The CLD profiles of amylopectin before (Fig. 7A) and after (Fig. 7B) BE2.2 reaction were different indicating that the substrate was modified as already suggested by iodine spectrophotometry. Difference plot between both profiles (profile B minus profile A) is represented in Fig. 7C. In this profile, negative values correspond to glucans that were consumed during the reaction. Thus, these glucans are likely the donor molecules. Conversely, the positive values represent the glucans that were created in the meantime. This result suggests that DP12 is the shortest glucan that is used as a donor glucan by BE2.2. During the reaction BE2.2 most preferably produces DP6 glucans which number strongly increases during the reaction (4 times more DP6 glucans after the reaction). The number of DP7-11 glucans is also increased but to a lower extent compared to DP6 (2 times increase after the reaction). These short glucans (DP6-11) could be directly transferred from longer one's by BE2.2. They could also arise from the shortening of longer glucans and accumulate because they are too short and cannot be donor substrates anymore. The CLD profile of amylopectin submitted to the action of BE2.2 without debranching of reaction products was also established (Fig. 7D). No  $\text{DP} < 70$  glucans were observed in the profile. This indicates that no glucans were released during the reaction, meaning that no cyclisation reactions occurred and that water molecules were not good acceptors. This is different from the result that was described for other branching enzymes such as the glycogen branching enzyme of *Rodothermus obamensis* [44], which is able to transfer glucans onto water molecules.

### 3.5.2 BE2.2 action onto amylose.

The same set of experiments was carried out with amylose (potato amylose) as substrate. When native amylose was debranched, only very small amounts of short glucans were released, which is coherent with the fact that amylose is poorly branched and mainly composed of very long linear glucans (DP>70) (Fig. 8A). When amylose was incubated with BE2.2 and the resulting product was debranched and analyzed by HPAEC-PAD, glucans of DP6 up to DP50 glucose residues were produced (Fig. 8B). Interestingly, as for amylopectin, DP6 was again by far the main glucan produced during the reaction. When the products resulting from the action of BE2.2 were analyzed without being debranched before HPAEC-PAD, almost no glucan was detected indicating that no glucan was released during the reaction by cyclisation reaction or by transfer onto water molecules (Fig. 8C).

### 3.5.3 BE2.2 action onto strictly linear glucans.

A600, a mix of linear  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucans with a DP of up to 50 glucosyl residues (Fig. 9A, native A600 without modification), was incubated with BE2.2 and the reaction products were debranched and analyzed by HPAEC-PAD (Fig. 9B). The differential plots between the debranched products and the native substrate reveals that A600 is a substrate of BE2.2 (Fig. 9C). Indeed, the number of DP6-15 chains increased, while the number of DP19-34 ones decreased after incubation with BE2.2. Here again DP6 was the main glucan produced during the reaction. When the reaction products were analyzed by HPAEC-PAD before enzymatic debranching, the branched glucans were eluted at the same retention time than the linear ones. A profile very similar to that obtained after debranching (Fig. 9C) except for DP6 glucans, which were found at only a low level without debranching (Fig. 9D). This implies that the DP6 glucans were mostly branched in  $\alpha(1\rightarrow6)$  position during the reaction and were only loosely produced by the shortening of longer glucans used as substrates by BE2.2.

## 4 Discussion

Branching enzymes (BEs) are mandatory enzymes of starch synthesis since they create the  $\alpha(1\rightarrow6)$  linkages of starch polymers [36]. The activity of BEs occurs as follows: they cleave an  $\alpha(1\rightarrow4)$  linkage of a preexisting glucan and transfer the chain bound at the donor sites onto the same glucan chain bound at the acceptor sites (intra-molecular reaction) or to another chain (inter-molecular reaction), by creating an  $\alpha(1\rightarrow6)$  linkage. GH13 BEs were initially classified in two groups (type 1 and type 2) depending on their primary structures [12]. Later on, biochemical analyses performed on the different classes demonstrate that type 2-BEs prefer amylopectin as substrate and transfer shorter chains than type 1-BEs [6]. Cereals possess two type 2-BEs (one being restricted to storage organs) and one type 1-BE, while dicots possess only one BE of each



type. In all these organisms one BE of each type is expressed in the leaves for transient starch synthesis. Arabidopsis establishes one of the exceptions in the plant kingdom since it expresses two genetically independent isoforms of type 2-BEs in photosynthetic organs: BE2.1 and BE2.2 [36]. Genetic analysis highlighted that activities of both enzymes are largely redundant toward starch synthesis in leaves [36]. In the present work we have performed an in-deep characterization of the activity of the isoform BE2.2.

Recombinant BE2.2 was purified to near homogeneity. Zymogram analysis confirmed that the purified enzyme was not contaminated by any other enzymes acting on  $\alpha$ -glucans. SAXS analysis has shown that in the absence of substrate the enzyme remains monomeric in solution (Fig. 2). In native PAGE without substrate added to the gel, the enzyme migrates in the form of only one band of activity whatever the protocol employed for the detection of the branching activity i.e. phosphorylase « a » stimulation (Fig. 1C) or transfer on starch containing gel (Fig. 1D). The optimal temperature and pH for branching activity were determined to be 25°C and 7.0, respectively, which is similar to type 2-BEs of other dicots such as potato [47]. We have also determined that BE2.2 possesses a higher affinity for amylopectin than for amylose and that it is only active on  $\alpha$ -glucans no shorter than 12 glucosyl residues (Fig. 6 and 7). Moreover, we have identified DP6 as the preferred transferred glucans using either amylopectin or amylose as substrate. These values are consistent with the data collected for other  $\alpha$ -glucans branching enzymes [10] for which DP6 was the preferred glucan transferred during the reaction. Moreover, it fits the mechanism proposed after the analysis of the cyanobacterial Cyanothece BE1 (cceBE1) activity and the resolution of its crystal structure [8]. This enzyme preferentially transfers DP6 glucans because it is able to adapt 6 glucose moieties in its active site cleft.

Branching enzymes can perform intra- or inter-molecular reactions depending on the acceptor molecule being part of the initial glucan substrate or not. In the case of *Rhodothermus obamensis* BE, the predominance of the inter-molecular mechanism was established by the formation of highly-branched glycogen-like particles containing more than 15% of  $\alpha(1\rightarrow6)$  linkages after the enzyme was incubated with a mix of linear glucans [44]. In the current work no such particles were detected when BE2.2 was incubated with the same mix of linear glucans. Moreover, when the enzyme was incubated with amylose, no short glucans were released during the reaction. This result indicates that no cyclisation reaction occurred, conversely to what was already documented for several bacterial enzymes [48, 49]. The absence of short glucans release during the branching reaction also suggests that no glucan hydrolysis occurred and that water could not take place in the active site. Taken together our data point to an intra-molecular mechanism for Arabidopsis BE2.2.

In addition, we observed that specific activities obtained using different concentrations of amylose or amylopectin were adjusted to sigmoidal curves (Fig. 6C and D). This result suggests that, in the presence of adequate substrate, protein-state changes occur. Thus, BE2.2 could exist in different states and these latter are substrate-dependent. This idea was reinforced by results of Electrophoretic Mobility Shift Assay in the presence of glucans embedded in the native gel (Fig. 3 and 4). During the migration, since enzymes have not been denatured, they can interact with the substrate and can be subjected to conformational changes that cannot occur in the presence of denaturing agent such as SDS. Using different concentrations of amylose or amylopectin we were able to assess protein delay of migration within the gel that reflects protein affinity for the substrate and/or protein conformation. In the absence of substrate within the polyacrylamide gel only one major band of BE2.2 could be observed (Fig. 3A and 3B left panels). Interestingly, even at low concentration of substrate within the gel, three forms of protein could be observed (Fig. 3A and 3B second panels from the left) while the unique rapid-migrating band observed without substrate completely disappeared. These three forms were conserved, but their migration was more and more delayed as substrate concentration rised within the gel. This allowed us to determine that the affinity of BE2.2 for amylopectin is higher than that for amylose since the delay of the different forms of the enzyme is more pronounced with amylopectin than with amylose (Fig. 3C and 4C). Note that BE2.2 affinity for strictly linear  $\alpha$ -glucans (A600) is not sufficient to affect migration rate in native polyacrylamide gel whatever was the concentration used (Fig. 5). Interestingly, only the rapid-migrating band of BE2.2 was observed in that case suggesting that binding to linear glucans does not induce enzyme conformation change even at high substrate concentration (0.3 %). The three forms of BE2.2 generated by the presence of branched  $\alpha$ -glucans within the gel are enzymatically active and their formation can explain the fact that specific activities measured in vitro fit to a sigmoidal curve as shown in Fig. 6. This result implies that a positive cooperative binding process would impact BE2.2 reaction kinetics as it was described for  $\alpha$ -glucosidase I from Japanese honeybees, another GH13 enzyme [50, 51]. According to these results, new observations could be made regarding the native PAGE activity gel performed with crude leaf-extracts described in [25]. In addition to the loss of the major active band of BE2.2 (designated as "BE2" in that publication) in the corresponding mutant, two other minor bands also specifically disappear. These bands were designated as unknown activities at that time. In the light of the results presented here, it is clear that these two minor bands are related to BE2.2 and correspond to minor active forms of the same enzyme. Although we could not ruled out that these bands arise from the interaction of BE2.2 with other starch metabolizing enzymes (such as starch synthases), it is possible that they correspond to the different activities observed with the recombinant enzyme analyzed in the current work. It is not clear yet whether such process

reflects either the fact that BE2.2 could self-organize in different oligomerization states or corresponds to different monomer conformation displaying more or less affinity toward the substrate embedded within the gel or a mix of both mechanisms [50]. Despite that SAXS data (Fig. 2) shows that the recombinant purified BE2.2 is monomeric in solution in the absence of substrate, it is possible that the addition of branched  $\alpha$ -glucan substrate induce conformational changes, and subsequent cooperativity leading to the sigmoid curve observed in Fig. 6. Such conformational changes in the presence of substrate were already described for the monomeric Human glucokinase which could be found as close and open forms [52]. Considering the structural model of the cceBE1 enzyme described above [8], it is possible that the binding of the donor substrate (a branched  $\alpha$ -glucan) inside the catalytic cleft and the formation of the DP6-glucan that will be transferred to the acceptor facilitate the insertion of the acceptor substrate into the same catalytic cleft for the transfer reaction. SAXS results suggest that the domain organization is similar in both BE2.2 and MtBE1. However, this form of BE2.2 could be less active and the interaction with branched glucans could induce conformational changes producing a more active enzyme which structure will be closer to that of cceBE1. We are currently working on the crystallization of BE2.2 to resolve the 3-D structure of this enzyme alone and in complex with substrates in order to describe the role of the different domains in the substrate specificity and confirm this hypothesis.

BEs have been shown in numerous examples to be involved in protein complexes including starch synthases and/or starch phosphorylases in cereals and that the formation of these complexes is dependent on post-translational modifications such as phosphorylation [53-59]. It is not clear yet whether these protein complexes are directly involved in the synthesis of the starch polymers, although it is highly probable that they are. However the combination of different enzymes in hetero-complexes likely influences their catalytic properties. For instance, this may impact the affinity of the enzymes for the substrates or the accessibility to the substrates (because of steric hindrance), the velocity and the specificity of the reaction and consequently the structure of the final product.

Here we show that the Arabidopsis BE2.2 enzyme has an activity similar to those of the other type-2 BEs. DP6 is the preferred transferred glucan during the reaction. However, the activity is influenced by the structure of the substrate. The recombinant purified enzyme is poorly active when strictly linear  $\alpha$ -glucans are provided. The presence of branched substrates such as amylose or amylopectin induces conformational changes of the protein (whose nature is yet to be determined) witnessed by the sigmoidal curve of specific activity and the formation of several bands in PAGE analysis. Further investigations are required to assess the impact of other

proteins/enzymes on the activity of BE2.2 especially starch metabolic enzymes known to physically interact with BE2.2. Determining if this is a specific feature of the Arabidopsis enzyme or a shared characteristic among all types of BEs requires further investigations.

### ***Acknowledgements***

The authors are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. Access to SOLEIL was granted by Beam Allocation Groups "BAG for Signal transduction, DNA Repair, Marine Glycobiology, bacterial polyketide synthases, dystrophine and IDPs involved in microalgal carbon cycle ". SAXS data were collected on beamline SWING at Synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France). The authors thank the beamline staff for assistance and advice during data collection. This work was supported by BQR grant (to X. R.) of the University of Lille and by the French National Research Agency (Grant ANR-14-CE27-0011-01, project ASPIRE).

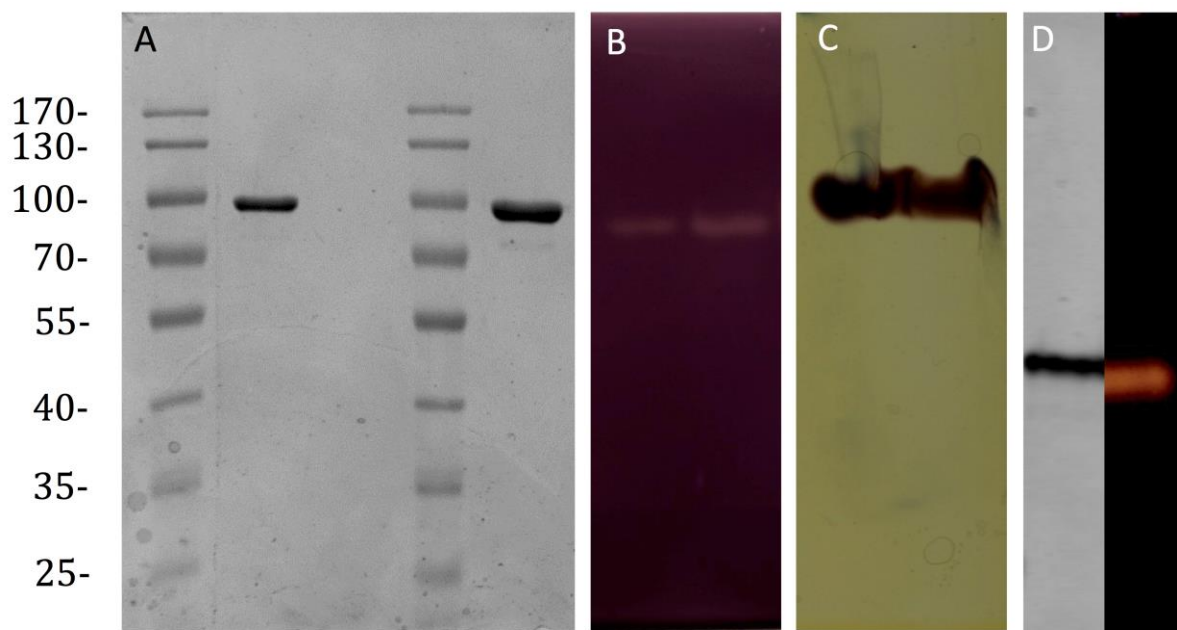


Figure 1: SDS-Page and zymogram analysis of purified recombinant BE2.2. (A) 0.5  $\mu\text{g}$  (left part of the gel) or 1  $\mu\text{g}$  (right part of the gel) of purified BE2.2 was loaded onto a SDS-PAGE and separated in denaturing condition. Molecular weight standard is indicated and expressed in kDa. (B) Zymogram of starch-modifying enzymes. 0.5  $\mu\text{g}$  (left lane) or 1  $\mu\text{g}$  (right lane) of purified BE2.2 was loaded onto a polyacrylamide starch-containing gel (final concentration of soluble potato starch: 0.3% W/V) and separated in denaturing condition. After migration the gel was washed three times (30 minutes each) in a Tris buffer and incubated overnight at room temperature in a buffer for BE activity development. Starch-modifying enzymes activities were revealed by gel iodine-staining. (C) Zymogram of branching enzyme activity. 0.5  $\mu\text{g}$  (left lane) or 1  $\mu\text{g}$  (right lane) of purified BE2.2 was loaded onto a polyacrylamide gel (no substrate) and separated in native conditions. After migration, the gel was washed twice (10 minutes each) with washing HEPES-glycerol buffer and incubated overnight at room temperature in phosphorylase "a" stimulation assay buffer [36]. Branched polyglucans stuck into the gel were revealed by iodine-staining. (D) 1  $\mu\text{g}$  of purified BE2.2 was loaded onto a polyacrylamide gel (no substrate) and separated in native conditions. Proteins were transferred onto a polyacrylamide amylopectin-containing gel (final concentration of soluble potato amylopectin: 0.3% W/V). Gel was washed three times (30 minutes each) in a Tris buffer and incubated overnight at room temperature in a buffer for BE activity development. Starch modifying enzymes activities were revealed by gel iodine-staining. The grey lane is stained with InstantBlue™ and the dark lane shows the BE activity in orange.

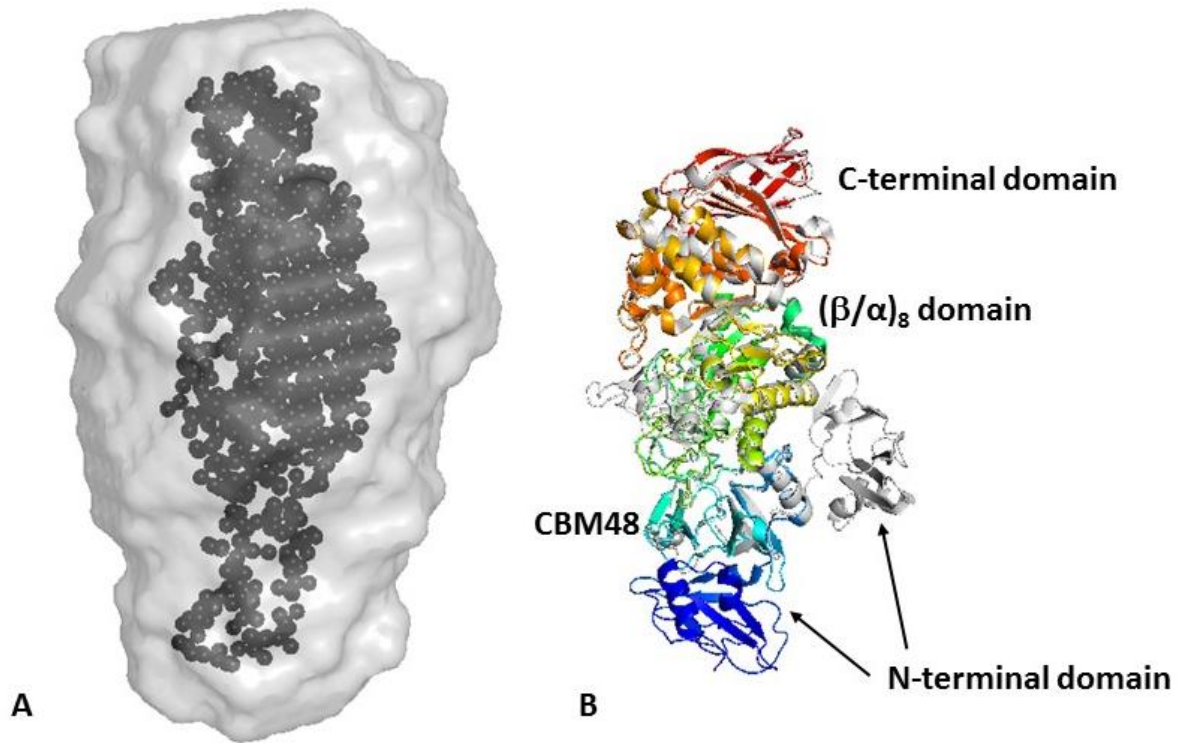


Figure 2: (A) The average ab initio shape predicted by DAMAVER for BE2.2 superimposed with the most typical bead model of BE2 computed with GASBOR. (B) Superimposed models of cyanobacterial BE (LF-WtBE1; PDB code 5GQU) coloured in light grey and BE from *M. tuberculosis* H37RV (MtBE; PDB code 3K1D) rainbow coloured (N-terminal domain, CBM48 domain,  $(\beta/\alpha)_8$  domain, and C-terminal domain are coloured blue, cyan, green and red respectively).

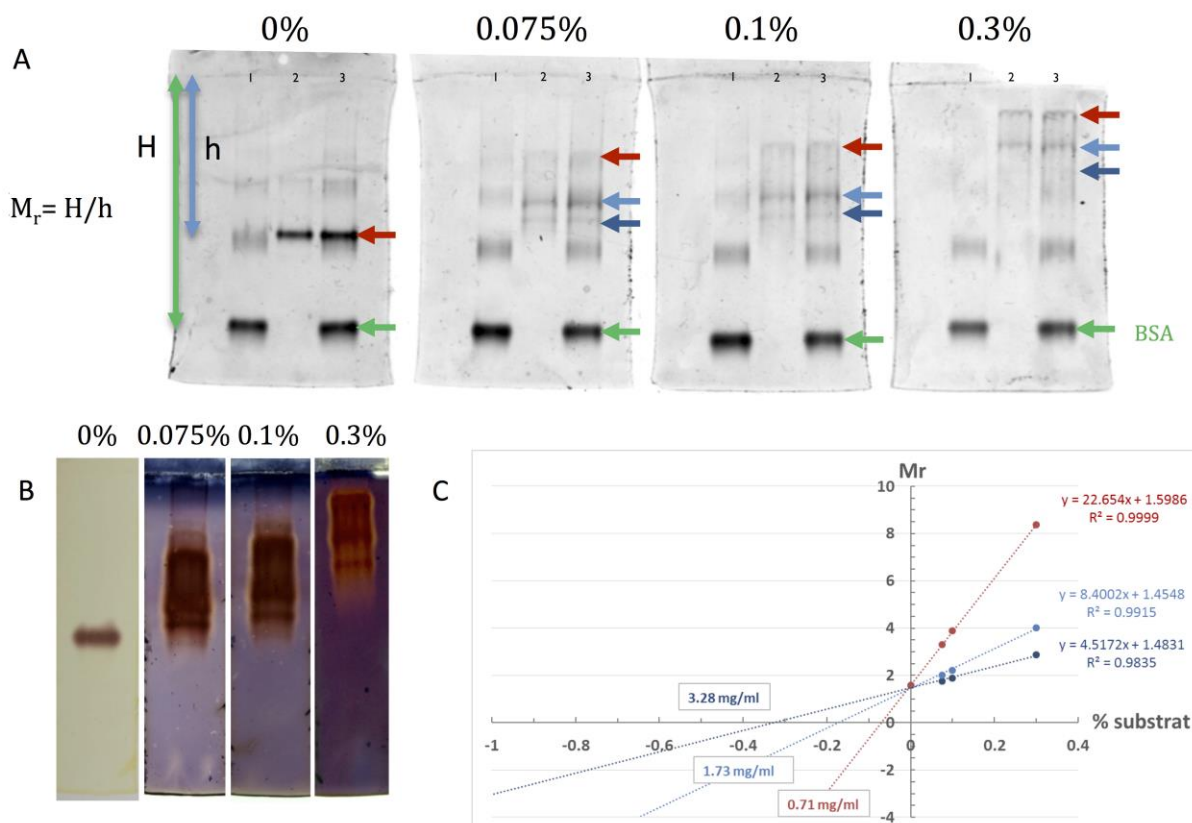


Figure 3: Determination of BE2.2 affinity for amylopectin. (A) 2  $\mu$ g of BSA (lane1), 1  $\mu$ g of purified BE2.2 (lane 2) and a mix of 2  $\mu$ g BSA and 1 $\mu$ g BE2.2 (lane3) were loaded onto native-polyacrylamide gels containing 0 to 0.3 % of potato amylopectin (final concentration). Proteins were separated in native condition. After migration, each gel was washed with water and stained with InstantBlue™. As BSA migration was not affected by the presence of substrate within the gel, BSA was used as internal migration standard. The ratios between BE2.2 and BSA migration distances ( $M_r$ ) were calculated for the different forms of BE2.2 (indicated by the red, light blue and dark blue arrows). (B) Branching activity of 1 $\mu$ g of purified BE2.2 was also assayed by zymogram technique. After migration in the conditions described in (A), each gel was washed twice (10 minutes each) with washing HEPES-Glycerol buffer HEPES and incubated overnight at room temperature in phosphorylase “ a “ stimulation assay buffer [36]. Branched polyglucans produced by BE2.2 stuck into the gel appeared reddish after iodine-staining. (C) Ratio between BE2.2 and BSA migration ( $M_r$ ) was plotted versus substrate concentration (%) and fitted using linear regression. Each plot corresponds to the values obtained for the different forms of more or less retarded BE2.2 (red, blue and dark blue respectively). The intersection between the regression line and the x-axis allowed us to ascertain BE2.2 affinity constant ( $K_s$ ) for amylopectin. The values in the boxes correspond to the  $K_s$  of each BE2.2 form which are 0.71 mg.ml<sup>-1</sup> for the more retarded form, 1.73 mg.mL<sup>-1</sup> for the middle one and 3.28 mg.ml<sup>-1</sup> for the less retarded form. (An average for each  $K_s$  measured in different experiments is showed in Table S1).

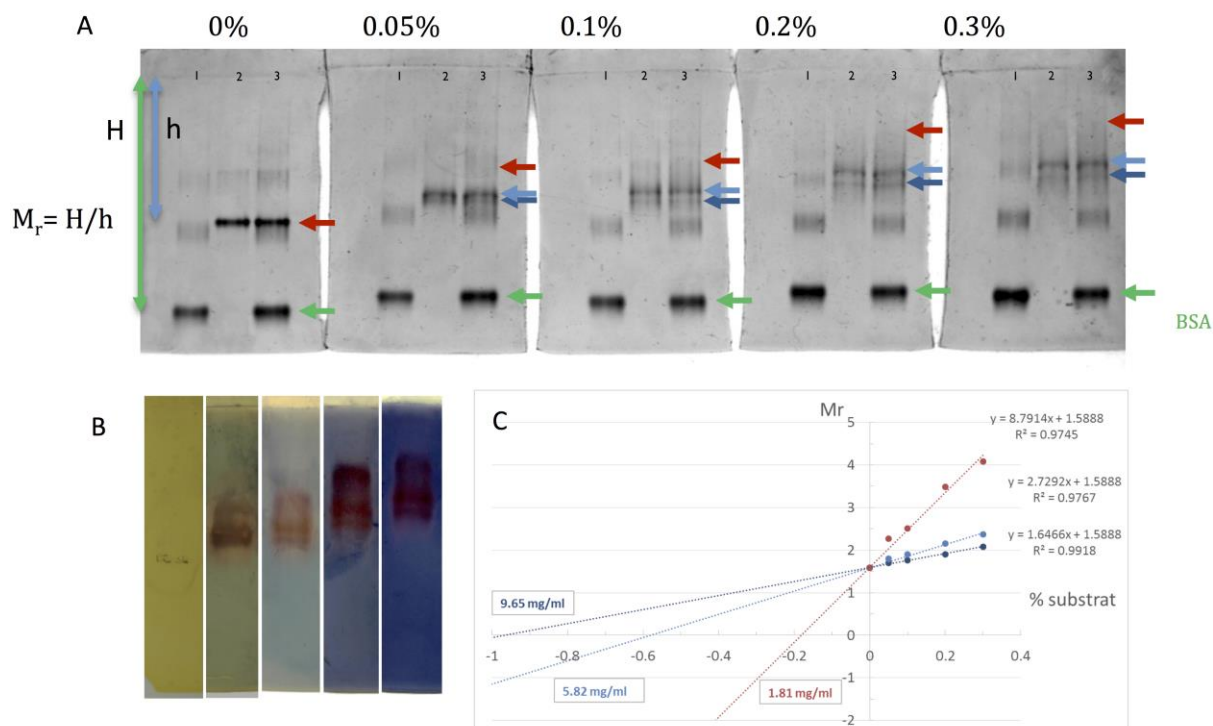


Figure 4: Determination of BE2.2 affinity for amylose. (A) 2  $\mu$ g of BSA (lane1), 1  $\mu$ g of purified BE2.2 (lane 2) and a mix of 2  $\mu$ g BSA and 1  $\mu$ g BE2.2 (lane3) were loaded onto native-polyacrylamide gels containing 0 to 0.3 % of potato amylose (final concentration). Proteins were separated in native condition. After migration, each gel was washed with water and stained with InstantBlue™. As BSA migration was not affected by the presence of substrate within the gel, BSA was used as internal migration standard. The ratios between BE2.2 and BSA migration distances ( $M_r$ ) were calculated for the different forms of BE2.2 (indicated by the red, light blue and dark blue arrows). (B) Branching activity of 1  $\mu$ g of purified BE2.2 was also assayed by zymogram technique. After migration in the conditions described in (A), each gel was washed twice (10 minutes each) with washing HEPES-glycerol buffer and incubated overnight at room temperature in in phosphorylase “ a “ stimulation assay buffer [36]. Branched polyglucans produced by BE2.2 stuck into the gel appeared reddish after iodine-staining. (C) Ratio between BE2.2 and BSA migration ( $M_r$ ) was plotted versus substrate concentration (%) and fitted using linear regression. Each plot corresponds to the values obtained for the different forms of more or less retarded BE2.2 (red, blue and dark blue respectively). The intersection between the regression line and the x-axis allowed us to ascertain BE2.2 affinity constant ( $K_s$ ) for amylose. The values in the boxes correspond to the  $K_s$  of each BE2.2 form which are 1.81.mg.ml<sup>-1</sup> for the more retarded form, 5.82 mg.mL<sup>-1</sup> for the middle one and 9.65 mg.ml<sup>-1</sup> for the less retarded form. (An average for each  $K_s$  measured in different experiments is showed in Table S2).



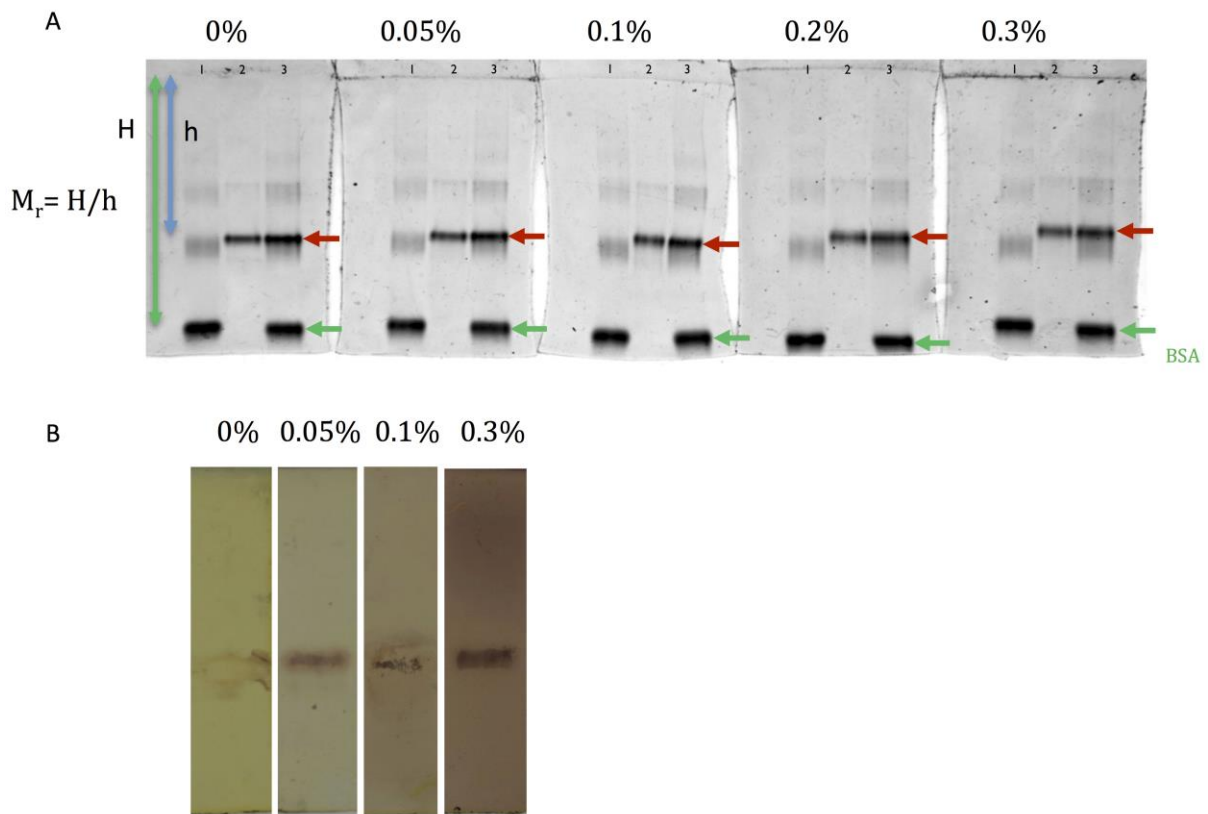


Figure 5: Determination of BE2.2 affinity for A600. (A) 2  $\mu\text{g}$  of BSA (lane1), 1  $\mu\text{g}$  of purified BE2.2 (lane 2) and a mix of 2  $\mu\text{g}$  BSA and 1  $\mu\text{g}$  BE2.2 (lane3) were loaded onto native-polyacrylamide gels containing 0 to 0.3 % of A600 (final concentration). Proteins were separated in native condition. After migration, each gel was washed with water and stained with InstantBlue™. As BSA migration was not affected by the presence of substrate within the gel, BSA was used as internal migration standard. (B) Branching activity of 1  $\mu\text{g}$  of purified BE2.2 was also assayed by zymogram technique. After migration in the conditions described in (A), each gel was washed twice (10 minutes each) with washing HEPES-glycerol buffer and incubated overnight at room temperature in in phosphorylase “ a “ stimulation assay buffer [36]. Branched polyglucans produced by BE2.2 stuck into the gel appeared reddish after iodine-staining.

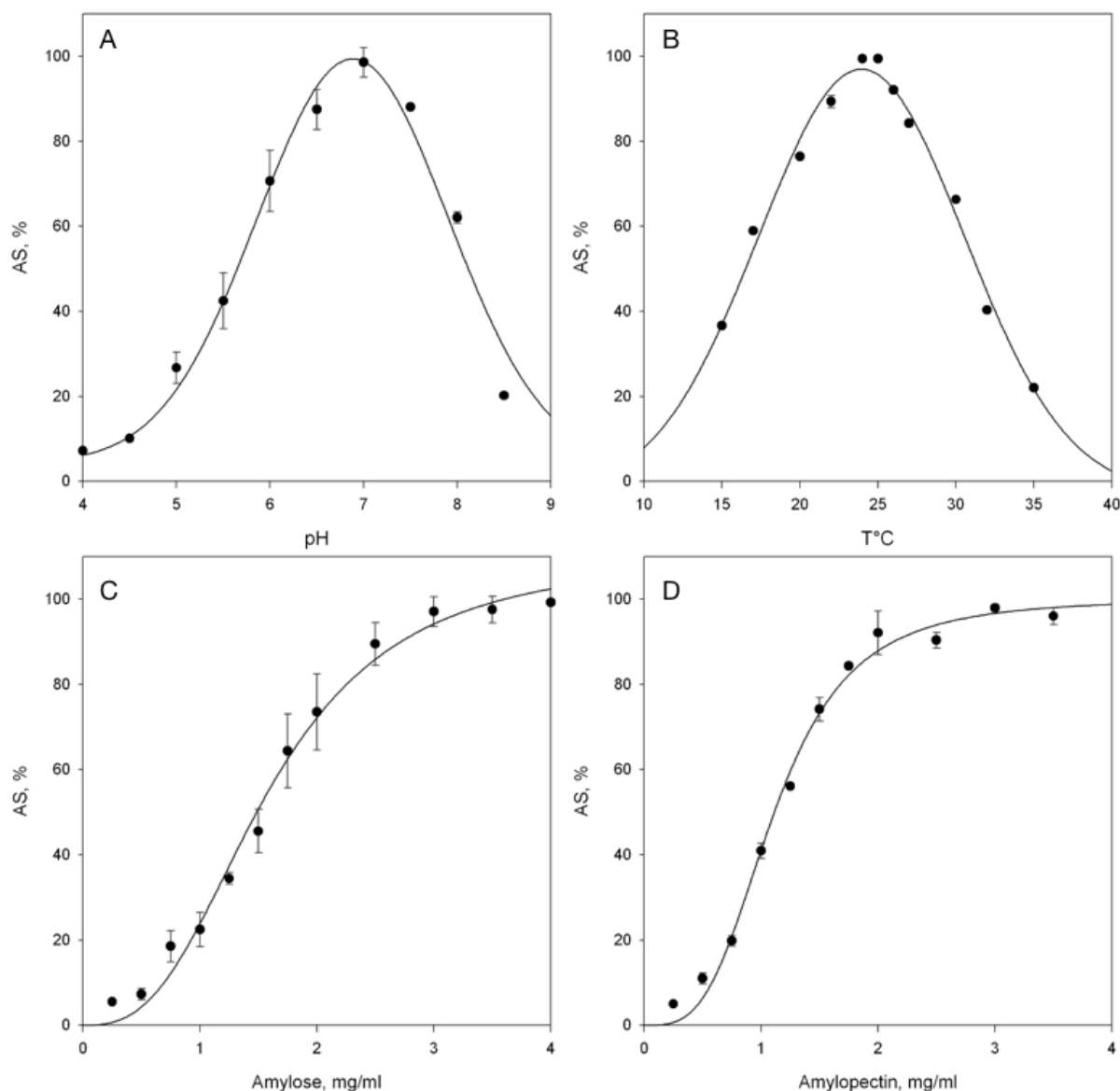


Figure 6: Determination of the enzymatic parameters of BE2.2. The enzyme activity was measured by using the spectrophotometric iodine-staining assay [44] based on monitoring the decrease of the absorbance at 660 nm or at 540 nm of the glucan-iodine complex resulting from the branching of amylose type III or amylopectin from potato respectively. One unit of enzyme activity was defined as the decrease of 1.0 unit of absorbance per min. (A) Mixtures of 280  $\mu$ l containing 3 mg.ml<sup>-1</sup> of amylose in 120 mM Tris-HCl, 30 mM acetic acid and 30 mM imidazol at pH 4 to 8.5, and 2  $\mu$ g of BE2.2 were incubated at 25°C. Maximal specific activity (AS) was reported at pH 7. (B) Mixtures of 280  $\mu$ l containing 3 mg.ml<sup>-1</sup> of amylose in 50 mM phosphate buffer, 50 mM NaCl at pH 7, and 2  $\mu$ g of BE2.2 were incubated at 15 to 35°C. Maximal specific activity (AS) was reported at 25°C. Kinetic parameters were deduced from non-linear least square regression of experimental data sets ( $n > 3$ ), according to a bell-shaped curve. (C and D) Mixtures of 280  $\mu$ l containing 0.25 to 4 mg.ml<sup>-1</sup> of amylose (C) or amylopectin (D) in 50 mM phosphate buffer, NaCl 50 mM at pH 7, and 2  $\mu$ g of BE2.2 were incubated at 25°C. Kinetic parameters were deduced from non-linear least square regression of experimental data sets ( $n > 3$ ), according to Hill equation curve.  $K_{0.5}$  values were 1.58 and 1.1 mg.ml<sup>-1</sup>, Hill numbers were 2.8 and 3.4 for amylose and amylopectin respectively.

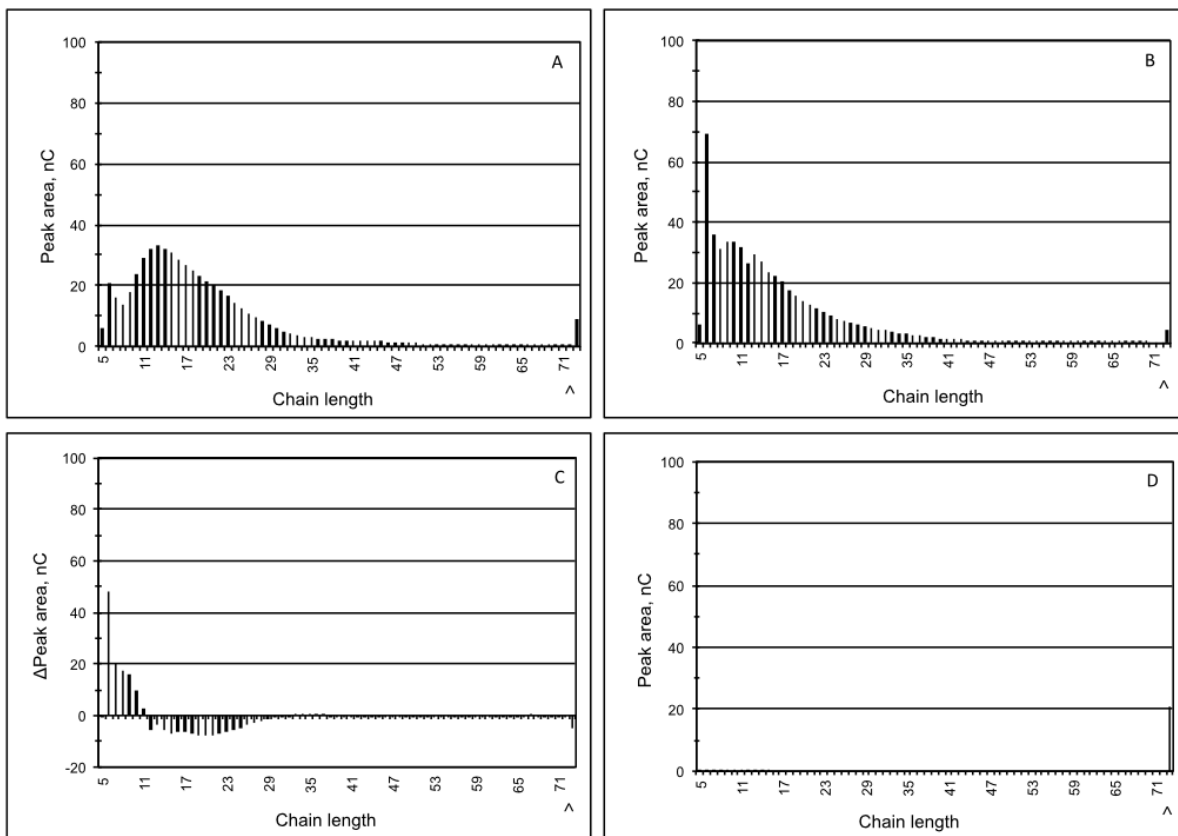


Figure 7: Chain length distribution (CLD) profiles of potato amylopectin before and after modification by BE2.2. Glucans were separated and detected by HPAEC-PAD. (A) Native amylopectin profile after enzymatic debranching. (B) Amylopectin incubated with 1U of BE2.2 during 24 h at 25°C followed by enzymatic debranching. (C) Difference plots between diagrams shown in (B) and (A) (profile B – profile A). (D) CLD of amylopectin incubated with BE2.2 without debranching step prior to HPAEC-PAD analysis.

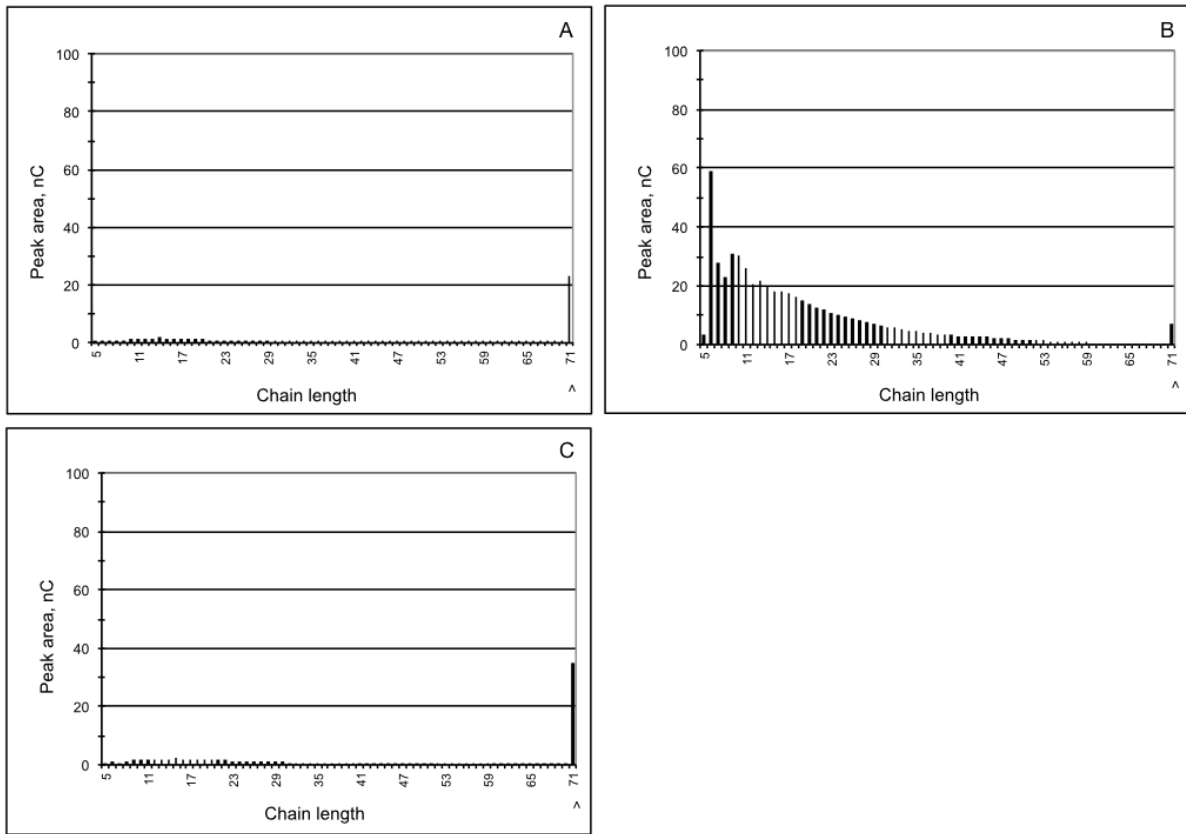


Figure 8: Chain length distribution (CLD) profile of potato amylose before and after modification by BE2.2. Glucans were separated and detected by HPAEC-PAD. (A) CLD profile of amylose after enzymatic debranching. (B) CLD profile of amylose incubated with 1U of BE2.2 during 24 h at 25°C followed by enzymatic debranching. (C) CLD profile of amylose incubated with BE2.2 without debranching step.

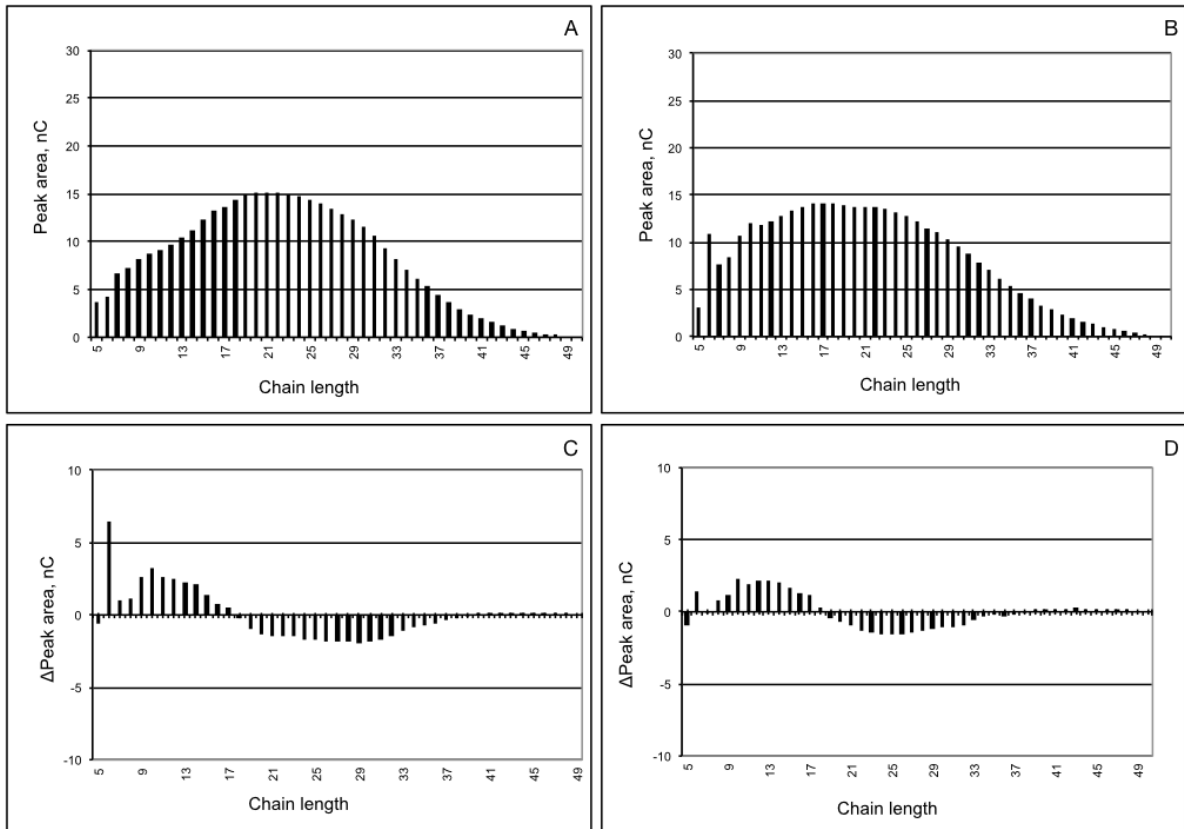


Figure 9: Chain length distribution (CLD) profiles of A600 before and after modification by BE2.2. Glucans were separated and detected, by HPAEC-PAD. (A) CLD profile of native A600. (B) CLD profile of A600 incubated with BE2.2 during 24 h at 25°C with 1U of enzyme followed by enzymatic debranching. (C) Difference plots between diagrams shown in (B) and (A) (profile B – profile A). (D) Difference plots between CLD of A600 incubated with BE2.2 without debranching step and A600 (A).

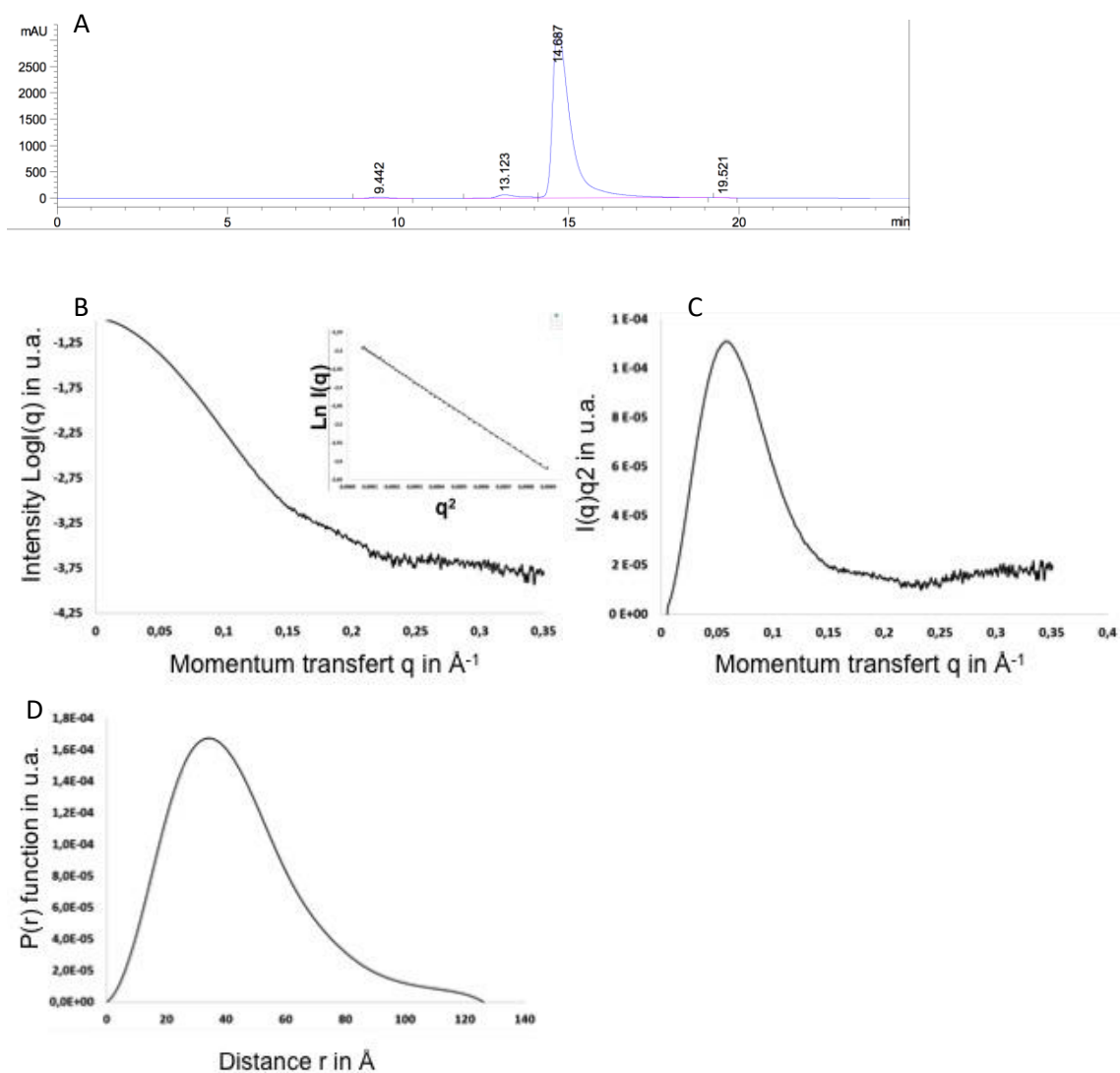


Figure S1: SAXS data on AtBE2.2 (A) Size exclusion chromatography profile (SEC – 3-300  $\text{\AA}$  Agilent) ; (B) Experimental data are plotted as a function of the scattering vector  $q$ , Guinier plot is represented in the inset. C) Kratky plot representation of experimental data, D) The distance distribution function  $P(r)$  indicating the shape of the particles

- [1] A. Buleon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball, Starch granules: structure and biosynthesis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 23 (1998) 85-112.
- [2] D.J. Manners, Recent developments in our understanding of glycogen structure, *Carbohydr Polym*, 16 (1991) 37-82.
- [3] M.E. Larson, D.J. Falconer, A.M. Myers, A.W. Barb, Direct Characterization of the Maize Starch Synthase IIa Product Shows Maltodextrin Elongation Occurs at the Non-reducing End, *J Biol Chem*, 291 (2016) 24951-24960.
- [4] S.G. Ball, M.K. Morell, From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule, *Annu Rev Plant Biol*, 54 (2003) 207-233.
- [5] H.N. Song, T.Y. Jung, J.T. Park, B.C. Park, P.K. Myung, W. Boos, E.J. Woo, K.H. Park, Structural rationale for the short branched substrate specificity of the glycogen debranching enzyme GlgX, *Proteins*, 78 (2010) 1847-1855.
- [6] I.J. Tetlow, Starch: Origins, Structure and Metabolism, Soc For Experimental Bio2013.
- [7] V. Lombard, H. Golaconda Ramulu, E. Drula, P.M. Coutinho, B. Henrissat, The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013, *Nucleic Acids Res*, 42 (2014) D490-495.
- [8] M. Hayashi, R. Suzuki, C. Colleoni, S.G. Ball, N. Fujita, E. Suzuki, Bound Substrate in the Structure of Cyanobacterial Branching Enzyme Supports a New Mechanistic Model, *J Biol Chem*, 292 (2017) 5465-5475.
- [9] E. Suzuki, R. Suzuki, Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes, *Cell Mol Life Sci*, 73 (2016) 2643-2660.
- [10] T. Sawada, Y. Nakamura, T. Ohdan, A. Saitoh, P.B. Francisco, Jr., E. Suzuki, N. Fujita, T. Shimonaga, S. Fujiwara, M. Tsuzuki, C. Colleoni, S. Ball, Diversity of reaction characteristics of glucan branching enzymes and the fine structure of alpha-glucan from various sources, *Arch Biochem Biophys*, (2014).
- [11] K. Blesak, S. Janecek, Sequence fingerprints of enzyme specificities from the glycoside hydrolase family GH57, *Extremophiles*, 16 (2012) 497-506.
- [12] R.A. Burton, J.D. Bewley, A.M. Smith, M.K. Bhattacharyya, H. Tatge, S. Ring, V. Bull, W.D. Hamilton, C. Martin, Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development, *Plant J*, 7 (1995) 3-15.
- [13] Y. Nakamura, Y. Utsumi, T. Sawada, S. Aihara, C. Utsumi, M. Yoshida, S. Kitamura, Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm, *Plant Cell Physiol*, 51 (2010) 776-794.
- [14] M. Palomo, S. Kralj, M.J. van der Maarel, L. Dijkhuizen, The unique branching patterns of *Deinococcus* glycogen branching enzymes are determined by their N-terminal domains, *Appl Environ Microbiol*, 75 (2009) 1355-1362.
- [15] V. Thiemann, B. Saake, A. Vollstedt, T. Schafer, J. Puls, C. Bertoldo, R. Freudl, G. Antranikian, Heterologous expression and characterization of a novel branching enzyme from the thermoalkaliphilic anaerobic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 72 (2006) 60-71.

- [16] H. Guan, P. Li, J. Imparl-Radosevich, J. Preiss, P. Keeling, Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme, *Arch Biochem Biophys*, 342 (1997) 92-98.
- [17] J. Noguchi, K. Chaen, N.T. Vu, T. Akasaka, H. Shimada, T. Nakashima, A. Nishi, H. Satoh, T. Omori, Y. Kakuta, M. Kimura, Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L with implications for catalysis and substrate binding, *Glycobiology*, 21 (2011) 1108-1116.
- [18] M.C. Abad, K. Binderup, J. Rios-Steiner, R.K. Arni, J. Preiss, J.H. Geiger, The X-ray crystallographic structure of *Escherichia coli* branching enzyme, *J Biol Chem*, 277 (2002) 42164-42170.
- [19] D.S. Froese, A. Michaeli, T.J. McCorvie, T. Krojer, M. Sasi, E. Melaev, A. Goldblum, M. Zatsepin, A. Lossos, R. Alvarez, P.V. Escriba, B.A. Minassian, F. von Delft, O. Kakhlon, W.W. Yue, Structural basis of glycogen branching enzyme deficiency and pharmacologic rescue by rational peptide design, *Hum Mol Genet*, 24 (2015) 5667-5676.
- [20] K. Pal, S. Kumar, S. Sharma, S.K. Garg, M.S. Alam, H.E. Xu, P. Agrawal, K. Swaminathan, Crystal structure of full-length *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv glycogen branching enzyme: insights of N-terminal beta-sandwich in substrate specificity and enzymatic activity, *J Biol Chem*, 285 (2010) 20897-20903.
- [21] L. Feng, R. Fawaz, S. Hovde, L. Gilbert, J. Chiou, J.H. Geiger, Crystal Structures of *Escherichia coli* Branching Enzyme in Complex with Linear Oligosaccharides, *Biochemistry*, 54 (2015) 6207-6218.
- [22] H.J. Jo, S. Park, H.G. Jeong, J.W. Kim, J.T. Park, *Vibrio vulnificus* glycogen branching enzyme preferentially transfers very short chains: N1 domain determines the chain length transferred, *FEBS Lett*, 589 (2015) 1089-1094.
- [23] I.J. Tetlow, M.J. Emes, A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis, *IUBMB Life*, 66 (2014) 546-558.
- [24] D.K. Fisher, M. Gao, K.N. Kim, C.D. Boyer, M.J. Guiltinan, Two closely related cDNAs encoding starch branching enzyme from *Arabidopsis thaliana*, *Plant molecular biology*, 30 (1996) 97-108.
- [25] S. Dumez, F. Wattedled, D. Dauvillée, D. Delvallé, V. Planchot, S.G. Ball, C. D'Hulst, Mutants of *Arabidopsis* lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation, *Plant Cell*, 18 (2006) 2694-2709.
- [26] L. Boyer, X. Roussel, A. Courseaux, O.M. Ndjindji, C. Lancelon-Pin, J.L. Putaux, I.J. Tetlow, M.J. Emes, B. Pontoire, C. D'Hulst, F. Wattedled, Expression of *Escherichia coli* glycogen branching enzyme in an *Arabidopsis* mutant devoid of endogenous starch branching enzymes induces the synthesis of starch-like polyglucans, *Plant Cell Environ*, 39 (2016) 1432-1447.
- [27] F. Liu, Q. Zhao, N. Mano, Z. Ahmed, F. Nitschke, Y. Cai, K.D. Chapman, M. Steup, I.J. Tetlow, M.J. Emes, Modification of starch metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana* increases plant biomass and triples oilseed production, *Plant Biotechnology Journal*, 14 (2016) 976-985.
- [28] T. Sawada, Y. Nakamura, T. Ohdan, A. Saitoh, P.B. Francisco, Jr., E. Suzuki, N. Fujita, T. Shimonaga, S. Fujiwara, M. Tsuzuki, C. Colleoni, S. Ball, Diversity of reaction characteristics of glucan branching enzymes and the fine structure of alpha-glucan from various sources, *Arch Biochem Biophys*, 562 (2014) 9-21.



- [29] H.P. Guan, J. Preiss, Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*), *Plant Physiol*, 102 (1993) 1269-1273.
- [30] Y. Takeda, H.-P. Guan, J. Preiss, Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm, *Carbohydrate Research*, 240 (1993) 253-263.
- [31] O. Emanuelsson, H. Nielsen, G. von Heijne, ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites, *Protein Sci*, 8 (1999) 978-984.
- [32] A. Fioravanti, C. Fumeaux, S.S. Mohapatra, C. Bompard, M. Brillì, A. Frandi, V. Castric, V. Villeret, P.H. Viollier, E.G. Biondi, DNA binding of the cell cycle transcriptional regulator GcrA depends on N6-adenosine methylation in *Caulobacter crescentus* and other Alphaproteobacteria, *PLoS Genet*, 9 (2013) e1003541.
- [33] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [34] G. Potocki de Montalk, M. Remaud-Simeon, R.M. Willemot, P. Sarcabal, V. Planchot, P. Monsan, Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties, *FEBS Lett*, 471 (2000) 219-223.
- [35] G. Potocki-Veronese, J.L. Putaux, D. Dupeyre, C. Albenne, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, A. Buleon, Amylose synthesized in vitro by amylosucrase: morphology, structure, and properties, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 1000-1011.
- [36] S. Dumez, F. Wattedled, D. Dauvillee, D. Delvalle, V. Planchot, S.G. Ball, C. D'Hulst, Mutants of *Arabidopsis* lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation, *Plant Cell*, 18 (2006) 2694-2709.
- [37] G. David, J. Pérez, Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: A fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline, *Journal of Applied Crystallography*, 42 (2009) 892-900.
- [38] P.V. Konarev, M.V. Petoukhov, V.V. Volkov, D.I. Svergun, ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis, *Journal of Applied Crystallography*, 39 (2006) 277-286.
- [39] H. Fischer, M. De Oliveira Neto, H.B. Napolitano, I. Polikarpov, A.F. Craievich, Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale, *Journal of Applied Crystallography*, 43 (2010) 101-109.
- [40] P.V. Konarev, V.V. Volkov, A.V. Sokolova, M.H.J. Koch, D.I. Svergun, PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *Journal of Applied Crystallography*, 36 (2003) 1277-1282.
- [41] D.I. Svergun, M.V. Petoukhov, M.H.J. Koch, Determination of domain structure of proteins from x-ray solution scattering, *Biophysical Journal*, 80 (2001) 2946-2953.
- [42] V.V. Volkov, D.I. Svergun, Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering, *Journal of Applied Crystallography*, 36 (2003) 860-864.
- [43] M.B. Kozin, D.I. Svergun, Automated matching of high- and low-resolution structural models, *Journal of Applied Crystallography*, 34 (2001) 33-41.
- [44] X. Roussel, C. Lancelon-Pin, A. Vikso-Nielsen, A. Rolland-Sabate, F. Grimaud, G. Potocki-Veronese, A. Buleon, J.L. Putaux, C. D'Hulst, Characterization of substrate and product specificity

of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis*, *Biochim Biophys Acta*, 1830 (2013) 2167-2177.

[45] K. Pal, S. Kumar, S. Sharma, S.K. Garg, M.S. Alam, H.E. Xu, P. Agrawal, K. Swaminathan, Crystal structure of full-length *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv glycogen branching enzyme: insights of N-terminal beta-sandwich in substrate specificity and enzymatic activity, *Journal of Biological Chemistry*, 285 (2010) 20897-20903.

[46] E.A. MacGregor, S. Janecek, B. Svensson, Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes, *Biochim Biophys Acta*, 1546 (2001) 1-20.

[47] G.S. Drummond, E.E. Smith, W.J. Whelan, Purification and Properties of Potato:  $\alpha$ -1,4-Glucan 6-Glycosyltransferase (Q-Enzyme), *European Journal of Biochemistry*, 26 (1972) 168-176.

[48] H. Takata, T. Takaha, S. Okada, S. Hizukuri, M. Takagi, T. Imanaka, Structure of the cyclic glucan produced from amylopectin by *Bacillus stearothermophilus* branching enzyme, *Carbohydr Res*, 295 (1996) 91-101.

[49] H. Takata, T. Takaha, T. Kuriki, S. Okada, M. Takagi, T. Imanaka, Properties and active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*, *Appl Environ Microbiol*, 60 (1994) 3096-3104.

[50] C.M. Porter, B.G. Miller, Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites, *Bioorg Chem*, 43 (2012) 44-50.

[51] J. Wongchawalit, T. Yamamoto, H. Nakai, Y.M. Kim, N. Sato, M. Nishimoto, M. Okuyama, H. Mori, O. Saji, C. Chanchao, S. Wongsiri, R. Surarit, J. Svasti, S. Chiba, A. Kimura, Purification and characterization of alpha-glucosidase I from Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*) and molecular cloning of its cDNA, *Biosci Biotechnol Biochem*, 70 (2006) 2889-2898.

[52] K. Kamata, M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki, Y. Nagata, Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase, *Structure*, 12 (2004) 429-438.

[53] I.J. Tetlow, R. Wait, Z. Lu, R. Akkasaeng, C.G. Bowsher, S. Esposito, B. Kosar-Hashemi, M.K. Morell, M.J. Emes, Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions, *Plant Cell*, 16 (2004) 694-708.

[54] T.A. Hennen-Bierwagen, F. Liu, R.S. Marsh, S. Kim, Q. Gan, I.J. Tetlow, M.J. Emes, M.G. James, A.M. Myers, Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes, *Plant Physiol*, 146 (2008) 1892-1908.

[55] I.J. Tetlow, K.G. Beisel, S. Cameron, A. Makhmoudova, F. Liu, N.S. Bresolin, R. Wait, M.K. Morell, M.J. Emes, Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes, *Plant Physiol*, 146 (2008) 1878-1891.

[56] R.M. Subasinghe, F. Liu, U.C. Polack, E.A. Lee, M.J. Emes, I.J. Tetlow, Multimeric states of starch phosphorylase determine protein-protein interactions with starch biosynthetic enzymes in amyloplasts, *Plant Physiol Biochem*, 83 (2014) 168-179.

[57] F. Liu, A. Makhmoudova, E.A. Lee, R. Wait, M.J. Emes, I.J. Tetlow, The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts, *J Exp Bot*, 60 (2009) 4423-4440.

[58] F. Liu, Z. Ahmed, E.A. Lee, E. Donner, Q. Liu, R. Ahmed, M.K. Morell, M.J. Emes, I.J. Tetlow, Allelic variants of the amylose extender mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein-protein interactions, *J Exp Bot*, 63 (2012) 1167-1183.

[59] S.-K. Hwang, K. Koper, H. Satoh, T.W. Okita, Rice Endosperm Starch Phosphorylase (Pho1) Assembles with Disproportionating Enzyme (Dpe1) to Form a Protein Complex That Enhances Synthesis of Malto-oligosaccharides, *Journal of Biological Chemistry*, 291 (2016) 19994-20007.