



# Habilitation à Diriger des Recherches

**Les polysaccharides de réserves chez les  
plantes et les micro-organismes : métabolisme  
et évolution**

## **Colleoni Christophe**

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

<b>Président :</b>	<b>Jean-Claude Michalski</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>Alan Myers</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>Martin Steup</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>Andreas Weber</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Catherine Boyen</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Wolfgang Löffelhardt</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Christophe D'Hulst</b>
<b>Directeur de Recherche :</b>	<b>Steven Ball</b>

## Sommaire

I-Résumé/abstract	3
II-Itinéraire scientifique	4
II-Curriculum vitae	5
III-Liste des publications	7
IV Avant propos	8
V-introduction	11
VI- Travaux de recherche de la thèse	28
VII-Travaux de recherche Post-doctoraux	29
VIII-Travaux actuels	39
VIII-Projets de recherche	41
Annexes	52

## Résumé /Abstract

---

L'amidon et le glycogène définissent les principales formes de stockage du carbone chez les plantes et les procaryotes. Les modalités de synthèse et de mobilisation de l'amidon impliquent le fonctionnement d'un réseau de plus de 40 gènes qui reste encore à élucider. Nous avons synthétisé l'essentiel des données acquises dans ce domaine chez les plantes et algues vertes. Nous rapportons également l'origine évolutive particulière de cette structure caractéristique du règne végétal chez les cyanobactéries.

**Mots clés** : amidon, amylose, amylopectine, amélioration des plantes cultivées, évolution des métabolismes végétaux

Starch and glycogen define the major form of carbon storage in plants and procaryotes. The pathway of starch synthesis and mobilization which requires the coordinated function of a network of over 40 genes is still not completely elucidated. In this review we summarize the essential features of this complex pathway in land plants and green algae. We also report on the evolutionary origin of this plant-specific structure within cyanobacteria.

**Key words** : starch, amylose, amylopectin, plant breeding of crops, plant metabolism evolution

## Itinéraire Scientifique

---

Lors de la préparation du diplôme de Technicien Supérieur, j'ai effectué un stage dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et des Technologies de Lille, en 1992, sous la direction du Professeur Steven G. Ball. Au cours de ce stage, j'ai participé à un projet qui visait à adapter une nouvelle technique de mutagenèse, par insertion aléatoire du plasmide pARG7.8, chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Le succès qui a couronné cette première expérience a renforcé mes intentions de poursuivre une carrière de chercheur.

Après l'obtention de la Maîtrise de Biochimie, j'ai rejoint en Septembre 1994 ce même groupe, pour entreprendre le Diplôme d'Etudes Approfondies. Le projet de recherche portait sur la caractérisation de nouvelles souches mutantes, produites au cours d'une campagne de mutagenèse insertionnelle. Après une étude sommaire des souches mutantes isolées (quantité d'amidon produit, rapport amylose/amylopectine, présence de polysaccharide soluble dans l'eau), j'ai focalisé mon étude sur la souche mutante Baf V13 car celle-ci synthétise à la fois de l'amidon et un polysaccharide soluble comparable au phytoglycogène. Bien que l'analyse en Southern Blot indiquait l'existence d'un fragment de restriction, présent uniquement dans les recombinants méiotiques mutants, aucune activité enzymatique ne semblait absente dans cette souche en comparaison avec un extrait sauvage. Afin d'écartier la possibilité qu'il puisse s'agir d'une activité mineure ou d'un problème de comigration, les protéines furent fractionnées sur colonne échangeuse d'anions avant d'être séparées sur un gel PAGE-Natif, puis transférées sur un autre gel contenant de l'amidon. Cette technique d'analyse en 2-dimensions m'a permis de mettre en évidence l'absence d'un complexe isoamylasique chez le mutant Baf V13, puis plus tard chez le mutant *su1-P* du maïs au cours de mon stage post-doctoral. L'étude fut ensuite poursuivie de manière plus approfondie par David Dauvillée.

Après le service militaire, j'ai commencé ma thèse en 1996, sous la direction du professeur Steven G. Ball. Le sujet de recherche portait sur l'identification d'une nouvelle souche mutante originale, isolée après mutagenèse aux rayons U.V. Les tests de complémentation ont révélé que cette souche est affectée dans un nouveau locus, baptisé *STA11*. Cette mutation conduit à un effondrement de la synthèse de l'amidon accompagné d'une accumulation de malto-oligosaccharides linéaires. J'ai démontré que ce locus code une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase, encore appelée enzyme Disproportionante.

C'est au cours de mon doctorat que j'ai pu faire connaissance avec le Professeur Alan Myers de l'Université de l'Etat d'Iowa (USA) lors de son séjour sabbatique dans notre laboratoire. Après la soutenance de ma thèse, en décembre 1999, j'ai rejoint son équipe pour participer à l'étude de différents mutants *sugary1* du maïs. Après quatre années de stage post-doctoral, j'ai rejoint le groupe de S.G. Ball en septembre 2003 en tant que maître de conférences.

## *Curriculum vitae*

---

Né le 13 Janvier 1972 à Valenciennes (59), France  
Nationalité française  
Marié, deux enfants

**Adresse personnelle :**

78 A rue de l'Europe  
Arques 62510

**Adresse professionnelle :**

Université de Lille1  
Laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle  
UMR 8576  
Villeneuve d'Ascq 59655  
Tél : 0320436543  
Fax : 0320436555  
e-mail : [christophe.colleoni@univ-lille1.fr](mailto:christophe.colleoni@univ-lille1.fr)

### ***Carrière professionnelle***

---

**Depuis Septembre 2003-** : Maître de conférences à l'Université de Lille I

**2002-2003** : Chercheur Associé à l'Université d'Etat d'Iowa (USA).

**2000-2002** : Post-Doc à l'Université d'Etat d'Iowa

**Septembre 1996-Décembre 1999** : Thèse de doctorat à L'UST de Lille au laboratoire de Chimie Biologique (UMR 111 du CNRS, UST de Lille) au sein du groupe de Génétique Microbienne (Pr S.G. Ball).

« L' $\alpha$ -1,4 glucanotransférase est impliquée dans la biosynthèse de l'amidon chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* »

Mention Très Honorable avec les Félicitations du Jury inscrites au procès-verbal.

**1995-1996** : Service National

**1994-1995** : DEA des Sciences de la Vie et de la Santé de l'UST de Lille. Stage de DEA effectué à l'UMR111 du CNRS de l'UST de Lille.

### **Activités d'encadrements**

---

#### **Stagiaires BTS et de licence:**

**3 janvier-11 février 2005:** Encadrement de Monsieur Grégory Desvaux Mémoire de stage première année: Etude de l'interaction de deux mutations *sta2-2* et *sta11* sur la synthèse de l'amidon chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*.

**3 janvier- 10 février 2006 :** Encadrement de Monsieur Grégory Desvaux. Mémoire de stage deuxième année : Etude de deux cyanobactéries : Cyanothèce ATCC51142 et une souche « mexicaine ».

**2 juin-11 juillet 2008 :** Encadrement de Mademoiselle Clémence Carré. Mémoire de stage (module de stage S5) : Clonage et construction de vecteurs d'expression de gènes provenant de cyanobactéries diazotrophes.

#### **Master 2 et thèse**

**2003-2004 :** Co-encadrement de Monsieur Clément Nempont. Mémoire de stage de Master 2 : « L'extension processive de l'amylopectine par la GBSSI définirait le mécanisme principal de synthèse d'amylose chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. »

**2004-2005 :** Co-encadrement de Mademoiselle Charlotte Plancke. Mémoire de stage de Master 2 : « Caractérisation des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon chez le glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. »

**2005-2008 :** Co-encadrement de Mademoiselle Charlotte Plancke. Mémoire de thèse : « Etude du métabolisme de l'amidon chez les Archaeplastida : le cas de l'algue glaucophyte modèle unicellulaire *Cyanophora paradoxa* et de l'algue rouge multicellulaire *Chondrus crispus*. »

**Depuis 2006 :** Co-encadrement des activités de recherche de Jennifer Nirmal Raj. Mémoire sur l'étude de la biosynthèse d'un polysaccharide cristallin chez la cyanobactérie diazotrophe unicellulaire CLg1

#### **Autres activités**

---

-Participation en tant qu'expert scientifique pour le recrutement d'un poste CNRS d'Ingénieur d'étude.

## Liste des publications

---

**Colleoni C, Deschamps P, Nakamura Y, Suzuki E, Putaux JL, Buléon A, Haebel S, Ritte G, Steup M, Falcón LI, Moreira D, Löffelhardt W, Raj JN, Plancke C, d'Hulst C, Dauvillée D, Ball S.** (2008) Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom. *Mol Biol Evol.* 25(3):536-48.

**Shimonaga T, Konishi M, Oyama Y, Fujiwara S, Satoh A, Fujita N, Colleoni C, Buléon A, Putaux JL, Ball SG, Yokoyama A, Hara Y, Nakamura Y, Tsuzuki M.** (2008) Variation in Storage  $\alpha$ -Glucans of the Porphyridiales (Rhodophyta). *Plant Cell Physiol.* 49(1):103-16.

**Plancke C, Colleoni C, Deschamps P, Dauvillée D, Nakamura Y, Haebel S, Ritte G, Steup M, Buléon A, Putaux JL, Dupeyre D, d'Hulst C, Ral JP, Löffelhardt W, Ball SG.** (2008) Pathway of cytosolic starch synthesis in the model glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. *Eukaryot Cell.* 7(2):247-57.

**Dauvillée, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., Ral, JP., Colleoni, C., Hicks, G., Wattebled, F., Deschamps, P., d'Hulst, C., Lienard, L., Cournac, L., Putaux, JL., Depeyer, D., Ball, SG.** (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 48(2):274-285.

**Colleoni, C., Ral, JP., Wattebled, F. Dauvillée, D., Nempont, C., Deschamps, P. Li, Z., Morell, MK, Chibbard, R., Purton, S., d'Hulst, C., Ball, SG.** (2006) Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 142(1):305-17

**Deschamps, P., Haferkamp, I., Dauvillée, D. Haebel, S. Steup, M., Buleon, A., Putaux, JL., Colleoni, C. d'Hulst, C Plancke, C. Goud, S. Maier, U., Neuhaus, HE., Ball, S.G.** (2006) Nature of the periplastidial pathway of starch synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Eukaryot Cell.* 5(6), 954-63.

**Zhang, X., Colleoni, C., Ratushna, V., Colleoni-Sirghie, M., James, M. and Myers, A.** (2004). Molecular characterization of the zea maize gene sugary 2. determinant of starch structure and functionality. *Plant Mol Biol* 54(6), 865-879

**Dinges, J. R., Colleoni, C., James, M. G. and Myers, A. M.** (2003). Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell* 15, 666-680.

**Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M. G.** (2003). One- and two-dimensional native PAGE activity gel analyses of maize endosperm proteins reveal functional interactions between specific starch metabolizing enzymes. *J. Appl. Glycosci.* 50, 207-212.

**Wu, C., Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M. G.** (2002). Enzymatic properties and regulation of ZPU1, the maize pullulanase-type starch debranching enzyme. *Arch Biochem Biophys* 406, 21-32.

**Dinges, J. R., Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M. G.** (2001). Molecular structure of three mutations at the maize sugary1 locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiol* 125, 1406-18.

**Dauvillee, D., Colleoni, C., Mouille, G., Buleon, A., Gallant, D. J., Bouchet, B., Morell, M. K., d'Hulst, C., Myers, A. M. and Ball, S. G.** (2001). Two loci control phyto-glycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **125**, 1710-22.

**Dauvillee, D., Colleoni, C., Mouille, G., Morell, M. K., d'Hulst, C., Wattedled, F., Lienard, L., Delvalle, D., Ral, J. P., Myers, A. M. et al.** (2001). Biochemical characterization of wild-type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol* **125**, 1723-31.

**Dauvillee, D., Mestre, V. V., Colleoni, C., Slomianny, M., Mouille, G., Delrue, B., d'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J. and Ball, S.** (2000). The debranching enzyme complex missing in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* displays an isoamylase-type specificity. *Plant Science* **157**, 145-156.

**Colleoni, C., Dauvillee, D., Mouille, G., Morell, M., Samuel, M., Slomianny, M. C., Lienard, L., Wattedled, F., d'Hulst, C. and Ball, S.** (1999). Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* **120**, 1005-14.

**Colleoni, C., Dauvillee, D., Mouille, G., Buleon, A., Gallant, D., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., d'Hulst, C. et al.** (1999). Genetic and biochemical evidence for the involvement of  $\alpha$ -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiol*. **120**, 993-1004.

**Dauvillee, D., Colleoni, C., Shaw, E., Mouille, G., d'Hulst, C., Morell, M., Samuel, M. S., Bouchet, B., Gallant, D. J., Sinskey, A. et al.** (1999). Novel, starch-like polysaccharides are synthesized by an unbound form of granule-bound starch synthase in glycogen-accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **119**, 321-30.

### **Communications Orales**

**11-13 décembre 2006:** Colloque du GDR Assemblage des molécules végétales : Caractérisation structurale de granules de réserve produits par des cyanobactéries diazotrophes (Villeneuve d'Ascq, France).

**Septembre 2003** 45<sup>th</sup> annual maize genetics conference (Portland, Oregon, USA): starch round table. "Characterization of a novel starch hydrolytic enzyme in developing maize endosperm."

**Juillet 2000:** Plant Sciences Institute Symposia: Biosynthesis of Glucose Polysaccharides (Ames, USA)  
"Characterization of soluble carbohydrates that accumulate along with starch granules in maize endosperm: Identification of a novel large, branched, soluble glucan in non-mutant maize"

**Juin 1998:** 17<sup>èmes</sup> Journées de la Chimie et de la Biochimie des Glucides (Tregastel, FRANCE). "STA8: un nouveau locus de *Chlamydomonas* impliqué dans l'épissage du phyto-glycogène et de la synthèse de l'amylopectine"

**Janvier 1997** : Colloque Université Libre de Bruxelles-Comité Stratégique Régional de Recherche en Biologie et Santé de Lille ; Université Libre de Bruxelles, Campus Erasme

#### **Présentations par affiche**

**1-3 septembre 2005** : Meeting on Biosynthesis and dégradation of reserve carbohydrates in plants. Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* (Bern, Suisse).

**19 avril 2002**: ISU/Pioneer Scientific exchange Poster session Carver Conference Center, Johnston, Iowa, USA. Dinges, J., Colleoni, C., Myers, A. and James, M. "Genetic analysis indicates that pullulanase-type debranching enzyme ZPU1 functions in both synthesis and degradation of maize starch"

**14-17 mars 2002**: 44<sup>th</sup> 4annual maize genetics conference (Kissimmee, Florida, USA). Colleoni, C., Dinges, J., Myers, A. and James, M. "Insight into the roles of debranching enzymes in starch biosynthesis from carbohydrate profiling of an allelic series of *sugary1* mutants."

**10-13 mai 2001**: Post-transcriptional control of gene expression in plants (Ames, Iowa, USA). Colleoni, C., Marsh, R., Myers, A. and James, M. "Zymogram analysis of starch metabolic enzyme activities in developing wild type and mutant kernels."

**14-18 mars 2001**: 43<sup>rd</sup> annual maize genetics conference (Lake Geneva, Wisconsin, USA).  
-Colleoni, C., Marsh, R., Myers, A. and James, M. Zymogram analysis of starch metabolic enzyme activities in developing wild type and mutant kernels  
-Dinges, J. Colleoni, C., Myers, A. and James, M. "Allelic effects of maize starch debranching enzyme gene *sugary1* and *zpu1*."

#### **Séjours-invitations**

**Novembre-décembre 1997** : (1mois) Caractérisation structurale des polysaccharides solubles produits par des souches mutants de *Chlamydomonas* au laboratoire de Matthew Morell (Canberra, Australie).

**Juin 2002** : (2 jours) Invitation au laboratoire de Biogemma (groupe Limagrain) dirigé par Dr Tina Barsby (Cambridge, UK). Titre du séminaire : « Structural characterization of *su1* allèle mutants of maize ».

**Juillet-août 2005** : (1 mois) Caractérisation d'une nouvelle alpha-amylase dans l'albumen de maïs au laboratoire d'Alan Myers et Martha James de l'Université d'Iowa State (USA).

**Avril 2007** : (15 jours) Invitation au laboratoire de Martin Steup de l'Université de Postdam (Allemagne). Titre du séminaire : « semi-crystalline storage polysaccharide biosynthesis in photosynthetic eukaryotes and their non-photosynthetic dérivatives. »

**Juillet 2007** : (1mois) Etude de différents allèles mutants *su1* de maïs au laboratoire d'Alan Myers et Martha James de l'Université d'Iowa State (USA).

**Avril 2008** : (15 jours) Etude du métabolisme de l'amidon chez l'algue rouge *Chondrus crispus*. Au laboratoire de Catherine Boyen de la Station Biologique de Roscoff (France).

## Avant-propos

---

Ce mémoire est divisé en trois parties :

- Une introduction qui résume les dernières avancées dans notre compréhension sur le métabolisme de l'amidon et son origine évolutive.

-La deuxième partie décrit mes différentes contributions au cours de ma thèse, de mon stage Post-doctoral et des travaux publiés depuis mon arrivée dans l'équipe de S.G Ball.

-La dernière partie porte sur le projet de recherche que je souhaite développer au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et fonctionnelle.

## Introduction

Les homopolymères de D-glucose occupent une place prépondérante dans le règne vivant. On les retrouve soit comme exopolysaccharides (la cellulose, le pullulan et les dextrans) soit en tant que polysaccharides de réserves (l'amidon, le glycogène, le granulose<sup>1</sup> et le paramylon<sup>2</sup>) des cellules eucaryotes ou procaryotes.

L'amidon, le glycogène et le granulose font partie d'une classe de polysaccharides dit de réserves très largement répandue dans le monde vivant : celle des alpha-1,4-glucanes ramifiés en alpha-1,6. Ces polysaccharides se présentent la plupart du temps sous forme soluble dans l'eau (le glycogène) et plus rarement sous forme insoluble (l'amidon, le granulose).

**Le glycogène** représente de loin la structure la plus communément rencontrée puisqu'on le retrouve largement distribué dans les 3 domaines du vivant (archéens, bactéries et eucaryotes). Les particules de glycogène contiennent entre 8 à 12% de liaisons de type alpha-1,6 appelées points de ramification ou « branchements » uniformément et symétriquement distribués dans la particule. Cette distribution de la ramification provoque un accroissement progressif de la densité des chaînes à la périphérie du grain jusqu'à une valeur de seuil de 42 nm (Melendez *et al.*, 1993). Ce seuil correspond à l'empaquetage périphérique de densité maximale au-delà duquel il deviendrait impossible d'accommoder l'espace défini par les dimensions des sites catalytiques des enzymes. En effet les particules beta de glycogène visualisées en microscopie électronique ne dépassent jamais ces dimensions<sup>3</sup>.

**Le granulose et l'amidon** forment des granules insolubles dans l'eau que l'on retrouve respectivement chez certaines bactéries anaérobiques Gram+ du genre *Clostridium* et les organismes photosynthétiques. La structure des granuloses n'est pas clairement établie et semble dépendre de l'espèce de *Clostridium*. Les travaux de Whyte and Strasidine (1972) suggèrent que les granuloses produits par la souche *C.botulinum* de type E présentent une structure proche de celle de l'amylopectine alors que, d'autres travaux sur *C.pasteurianum* suggèrent plutôt un assemblage amorphe et insoluble d'alpha-1,4 glucanes dépourvus de ramifications (Robson *et al.* 1974)<sup>4</sup>.

Quant à l'amidon, celui-ci se définit comme un mélange de deux types de polymères : l'amylopectine et l'amylose. L'amylopectine, fraction modérément ramifiée (5% de branchements) forme l'ossature semi-cristalline du grain d'amidon au sein de laquelle s'enchaînent les longues chaînes d'amylose peu ou pas ramifiées (<1% de branchements). La distribution asymétrique de la ramification donne lieu à un regroupement de chaînes en grappes (voir Figure 1 et pour une discussion plus détaillée, Buléon *et al.*, (1998)). Au sein de celles-ci les chaînes s'enlacent, forment des doubles hélices et co-cristallisent donnant lieu à

---

<sup>1</sup> Polysaccharide de réserve présent sous forme de granules dans le cytosol de nombreuses espèces de *Clostridium* : *C.pasteurianum*, *C.perfringens*, *C.botulinum*,... Les granuloses sont mobilisés au cours de la sporulation. Les mutants touchés dans l'ADP-glycose pyrophosphorylase, enzyme clef dans la biosynthèse du polysaccharide réserve, ne sont plus capables de sporuler (Mackey and Morris, 1974)

<sup>2</sup> Le paramylon s'accumule chez les euglenophytes la nuit sous forme de grains cristallins insolubles dans l'eau. Les granules sont formés de microfibrilles de glucose liés en beta-1,3 (Kiss *et al.*, 1988).

<sup>3</sup> Des dimensions supérieures peuvent être observées lors de la formation de conglomerats de particules de glycogène.

<sup>4</sup> Robson *et al.*, ont caractérisé la granulose synthase et la granulose phosphorylase. Ils ont ainsi montré d'une part que la granulose synthase liée aux granuloses et d'autre part qu'elle n'est active qu'en présence de cette matrice polysaccharidique (Robert *et al.*, 1974).

l'effondrement de la structure hydratée et à la formation d'un empilement macrogranulaire insoluble et semi-cristallin : le grain d'amidon.

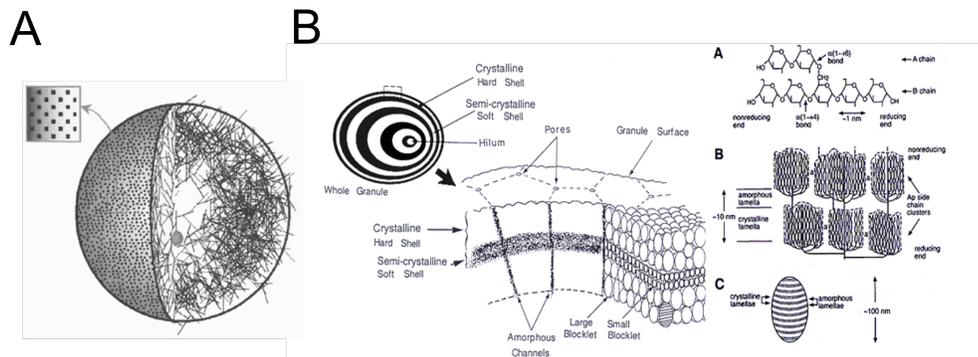


Figure 1 : Représentations schématiques de l'organisation des chaînes de glucose au sein d'une particule de glycogène (A) et d'un grain d'amidon (B). Le schéma en A représente une particule de glycogène modélisée selon un algorithme établi par Melendez *et al.*, (1993). La distribution symétrique des points de branchement conduit à un encombrement stérique des extrémités non-réductrices à la surface de la particule de glycogène. Ces extrémités non-réductrices deviennent alors inaccessibles aux activités d'élongation et de branchement. La taille d'une particule de glycogène ne pourra donc pas dépasser 42nm. (B) Une coupe d'un grain d'amidon montre l'alternance de cercles concentriques noirs et blancs qui symbolisent les anneaux de croissance que l'on peut observer après un traitement ménagé à l'acide. Les anneaux de croissance diffèrent par leur niveau de cristallinité. Les anneaux en noir, beaucoup plus cristallins, sont formés par un assemblage de « blocklet »(BC) eux-même constitués par une alternance de régions semi-cristallines et amorphes (Gallant *et al.*, 1997). L'analyse par diffraction des rayons X (BB) montre que la région cristalline est constituée par des doubles hélices de chaînes de glucose séparées par des régions amorphes contenant les points de branchement. Cette organisation particulière, dite en grappe, explique les propriétés physico-chimiques de l'amidon (insolubilité dans l'eau, cristallinité, taille théoriquement illimitée).

L'amidon est retrouvé dans le chloroplaste des algues vertes et de toutes les plantes terrestres qui en dérivent. Un amidon aux propriétés similaires est aussi retrouvé dans le cytoplasme des algues rouges (pour revue voir Viola *et al.*, 2001 ; Shimonaga *et al.*, 2008), des glaucophytes (Plancke *et al.*, 2008), des dinoflagellées (Deschamps *et al.*, 2008c), de certains parasites apicomplexa (Coppin *et al.*, 2005) et dans le periplaste des algues cryptophytes (Deschamps *et al.*, 2006). Tous ces organismes dérivent soit directement (algues vertes et plantes terrestres, algues rouges, glaucophytes) ou indirectement (dinoflagellées, parasites apicomplexes et cryptophytes) de l'endosymbiose primaire du plaste qui s'est déroulée il y a approximativement 1,5 milliards d'années (Yoon *et al.*, 2004). A cette époque, la rencontre d'une cellule eucaryote et d'une cyanobactérie s'est soldée par l'ingestion de cette dernière et l'établissement d'une relation symbiotique entre celle-ci et son hôte. Cet événement, d'une importance considérable a abouti à l'acquisition par les cellules eucaryotes d'un métabolisme typiquement bactérien : la photosynthèse oxygénique. La cyanobactérie allait lentement évoluer en organite cellulaire et se transformer progressivement en plaste (appelé chloroplaste, rhodoplaste ou cyanelle respectivement chez les algues vertes et rouges et les glaucophytes). Trois lignées distinctes ont ensuite émergé de cette endosymbiose : les algues vertes qui donneront ensuite toutes les plantes terrestres, les algues rouges et les glaucophytes. Ces lignées également baptisées lignées d'endosymbiose primaire se

distinguent par la nature de leurs antennes photosynthétiques constituées soit de chlorophylle b et a, soit de chlorophylle a et de phycobilisomes, soit encore des seuls phycobilisomes, en ce qui concerne respectivement les algues vertes, les algues rouges, et les glaucophytes. Les glaucophytes ont divergé en premier de l'ancêtre commun, les algues rouges et vertes se différenciant plus tardivement (Reyes-Prieto et Bhattacharya, 2007). Dans ce contexte et pour beaucoup d'autres raisons, non reprises ici mais détaillées par Deschamps *et al.* (2008a), il est logique de penser que la présence d'amidon dans le cytoplasme définit un caractère ancestral, tandis que la présence d'amidon dans les plastes serait un caractère dérivé. Pour des raisons historiques, l'amidon cytosolique sera baptisé amidon floridéen, les premières algues rouges analysées sur ce plan faisant partie du groupe des Florideophycideae (Viola *et al.*, 2001). Dans cette synthèse nous nous attacherons à résumer l'état de nos connaissances sur le métabolisme de l'amidon chez les algues vertes et les végétaux terrestres. Nous nous pencherons également sur l'origine évolutive de cette structure si particulière au règne végétal.

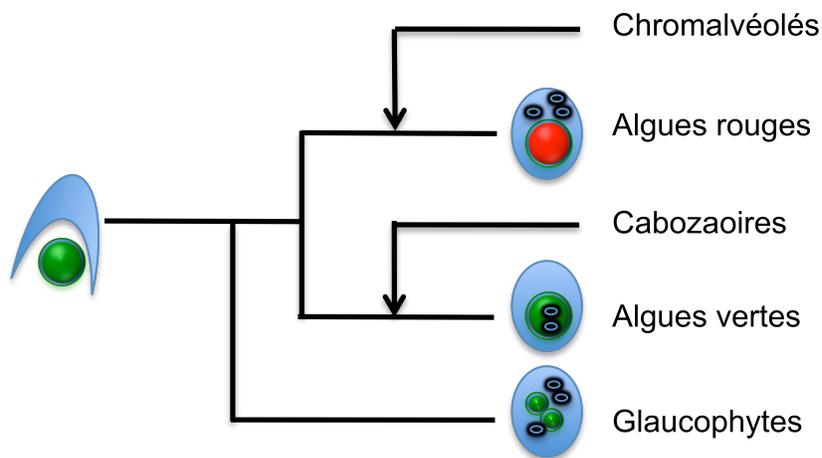


Figure 2 : Représentation simplifiée de l'évolution des organismes photosynthétiques et des organismes dérivés. Les récentes études phylogénétiques suggèrent que les trois lignées photosynthétiques : la lignée rouge (algues rouges), la lignée verte (algues vertes et plantes) et la lignée des Glaucophytes descendent d'une cellule photosynthétique ancestrale commune. Cette dernière serait apparue, il y a 1,5 milliards d'années, au cours d'une endosymbiose « primaire » entre une cellule eucaryote hétérotrophe et une cyanobactérie. Cette dernière donnera naissance au chloroplaste dans la lignée verte (sphère verte), au rhodoplaste dans la lignée rouge (sphère rouge) et aux cyanelles dans la lignée des Glaucophytes (sphères vertes). Plus tard, deux autres endosymbioses « secondaires » se sont produites entre 500-600 millions d'années : la première entre une algue verte et une cellule eucaryote et la deuxième entre une algue rouge et une cellule eucaryote. Ces deux événements donneront naissance aux chromalvéolés et aux cabozoaires. Les chromalvéolés regroupent les alvéolés (les protozoaires, les dinoflagellés, les apicomplexes et les chromerides) et les chromistes (les haptophytes, les cryptophytes, les hétérokontes). Les Cabozoaires regroupent les euglenophytes et les chlorarachniophytes, les hétérolobosea et les euglyphina qui accumulent des beta-glucanes comme polysaccharide de réserve. L'amidon, quant à lui, est retrouvé dans toutes les lignées (cercles noirs) dans le chloroplaste ou dans le cytosol.

## La synthèse de l'amidon chez les Chloroplastida

La lignée verte (Chloroplastida) comprend la plupart des algues vertes et l'intégralité des plantes terrestres. Comme on peut s'en douter, vu l'importance économique des plantes cultivées, l'essentiel des premières études concernaient l'amidon dit de réserve accumulé

dans les graines au niveau de l'albumen des céréales (surtout le maïs et le riz et dans une moindre mesure l'orge) ou des embryons de pois. La toute première expérience de génétique réalisée sur les pois lisses et ridés par Grégor Mendel impliquait d'ailleurs une lignée défectueuse pour l'enzyme de branchement de l'amidon (Bhattacharyya *et al.*, 1990). C'est Luis Leloir et son équipe en 1961 qui, les premiers ont révélé que la synthèse d'amidon se réalisait essentiellement par l'entremise de l'ADP-glucose (Recondo et Leloir, 1961). Cette propriété semblait rapprocher le métabolisme du polysaccharide végétal de celui du glycogène des bactéries (Preiss et Romeo, 1989). En effet, toutes les lignées eucaryotes productrices de glycogène le synthétisent à partir d'UDP-glucose qui définit un carrefour métabolique commun à un grand nombre de voies de biosynthèse très différentes. Par contre, l'ADP-glucose n'est utilisé chez les bactéries et les plantes que pour la synthèse des polysaccharides de réserves (Preiss et Romeo, 1989). La synthèse d'ADP-glucose dans ces deux cas définit donc la première étape spécifique de la voie de synthèse de l'amidon. Comme c'est souvent le cas, ce sera cette première étape qui sera sujette à la régulation métabolique la plus fine, et ce sera donc elle qui contrôlera l'essentiel du flux de carbone dans cette voie. Cette hypothèse a été validée par un grand nombre d'études réalisées non seulement chez les plantes cultivées mais aussi plus récemment chez les systèmes modèles tel que la crucifère *Arabidopsis thaliana* ou la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Lin *et al.*, 1988a,b ; van den Koornhuysse *et al.*, 1996 ; Zabawinski *et al.*, 2001). Il est donc possible d'accroître ou au contraire de diminuer la teneur en amidon de n'importe quels tissus et dans n'importe quelle plante en manipulant l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, l'enzyme responsable de la synthèse du nucléotide sucre. Cette enzyme qui synthétise l'ADP-glucose à partir de glucose-1-P et d'ATP est activée par le 3-phosphoglycerate et inhibée par l'orthophosphate (pour revue voir Ballicora *et al.*, 2003). Cette régulation est retrouvée à l'identique chez les cyanobactéries. Il ne fait d'ailleurs aucun doute que le gène codant cette enzyme n'ait été hérité de celui de la cyanobactérie définissant l'ancêtre du plaste.

Le glucose du nucléotide-sucre est ensuite transféré en position alpha-1,4 à l'extrémité non réductrice d'une chaîne en croissance. Cette réaction catalysée par des enzymes d'élongation baptisées amidon synthases est retrouvée à l'identique chez les bactéries pour la synthèse de glycogène. D'ailleurs la phylogénie des enzymes végétales les rapproche à nouveau incontestablement des cyanobactéries. La plupart de ces enzymes sont incapables d'amorcer la réaction *de novo* sans l'aide d'une amorce oligo ou polysaccharidique. Cette remarque doit être cependant nuancée, en tous cas pour les activités bactériennes, et probablement aussi pour les enzymes végétales qui en dérivent. En effet, certaines enzymes bactériennes se sont récemment révélées capables d'initier la réaction de synthèse, une propriété qui ne semble pas partagée par les glycogène synthases fongiques ou animales (Ugalde *et al.*, 2003). Ces dernières sont assistées pour l'initiation de la synthèse par des enzymes aux propriétés autoglucosylantes : les glycogénines. Il semble bien que celles-ci n'aient aucun rôle à jouer dans la synthèse de l'amidon dans la mesure où elles sont absentes des génomes de 6 algues vertes récemment séquencés (Deschamps *et al.*, 2008b). Pas moins de 4 amidons synthases solubles (parfois 5 ou 6) différentes sont requises pour la synthèse de l'amidon. Elles sont toutes impliquées dans des facettes différentes de l'édification de sous-structures de l'amylopectine. Ces enzymes multiples sont aussi partiellement redondantes : une amidon synthase particulière étant souvent capable de prendre partiellement en charge la synthèse de chaînes majoritairement sous la dépendance d'une autre amidon synthase. Pour résumer, nous dirons que chaque enzyme d'élongation semble contrôler au sein de l'amylopectine la synthèse de classes de chaînes de tailles différentes avec des domaines de recouvrement fonctionnels importants. Un rôle plus particulier semble toutefois se dessiner pour la SSIV (amidon synthase soluble IV). En effet, des mutants ou lignées transgéniques

sous-exprimant ou sur-exprimant cette enzyme voient le nombre totaux de grains synthétisés parfaitement corrélé au niveau de cette activité (Roldan *et al.*, 2007). Cette observation semble donc donner à cette enzyme une fonction importante dans l'initiation de la formation de nouveaux grains. Aucune des amidons synthases solubles n'a de rôle à jouer dans la formation de l'amylose. La synthèse de cette sous-fraction dépend uniquement de la seule enzyme présente et uniquement active au sein de la matrice semi-cristalline du grain amidon : la GBSS (granule-bound starch synthase) ou amidon synthase liée au grain (pour revue voir Ball *et al.*, 1998). Cette enzyme, séquestrée dans le grain d'amidon, synthétise de manière processive de longues chaînes de glucose qui ne sont que rarement accessibles aux enzymes de branchement. En effet ces dernières, comme l'intégralité des autres enzymes du métabolisme de l'amidon à l'exception de la GBSS sont actives dans la phase soluble du plaste (le stroma) et non au sein du grain, n'ont de ce fait pas accès aux chaînes d'amylose protégées par la matrice polysaccharidique. Si les amidons synthases solubles participent uniquement à la synthèse de l'amylopectine, la GBSS participe à la synthèse des deux fractions (Maddelein *et al.*, 1994). En effet, la GBSS semble partager avec la SSIII un rôle très particulier dans la synthèse des plus longues chaînes de l'amylopectine, celles qui relient les différentes grappes entre elles. La plupart des végétaux renferment trois enzymes de branchement différentes dont deux appartiennent à une même sous-famille (la sous-famille des BEII). Ces enzymes hydrolysent des liaisons alpha-1,4 et prennent en charge un segment de chaîne hydrolysée pour le transférer en position alpha-1,6 sur une chaîne voisine. L'importance des BEII est clairement attestée par l'analyse d'un grand nombre de mutants dans différents systèmes (pour revue voir Ball et Morell, 2003). Par contre celle des BEI semble moins évidente et il existe quelques rares espèces de plantes dont le génome en est dépourvu. Les BE participent avec les SS (amidon synthases solubles) à l'édification de l'amylopectine. Le système se caractérise par sa complexité et sa non linéarité. Chaque amidon synthase soluble forme un produit susceptible d'être un substrat pour une autre amidon synthase ou une enzyme de branchement dont le produit peut redevenir un substrat pour la première enzyme. Ce système non linéaire est peut-être plus ordonné qu'il n'y paraît. En effet des associations en complexe multi-enzymatique dont la formation et la dissociation semble dépendre de l'état de phosphorylation des sous-unités ont été clairement documentées chez le maïs et le blé (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008 ; Tetlow *et al.*, 2008). Une majorité des enzymes d'élongation et ramification semblent partie prenante de ces complexes dont les géométries doivent encore être précisées. Il se pourrait donc que les différentes enzymes d'élongation et de ramification aient un mode de fonctionnement conjoint hiérarchisé qui reste encore à élucider. Malgré cette organisation, les enzymes d'élongation et de ramification semblent incapables de synthétiser un polysaccharide dont la distribution asymétrique des ramifications conduise à la cristallisation du polymère et à son agrégation au sein d'un grain insoluble. Malgré de nombreuses tentatives, personne n'a réussi à produire de l'amidon *in vitro* à partir d'enzymes d'élongation et de ramification végétales. Par contre, la synthèse de glycogène ou d'oligosaccharides peut être aisément reproduite *in vitro* que ce soit à partir d'enzymes végétales ou d'enzymes d'origines diverses. Il est probable que même les complexes multienzymatiques précités soient incapables *in vivo* d'assurer la synthèse d'amylopectine semi-cristalline. Les premiers indices suggérant l'existence d'un procédé additionnel, requis pour la cristallisation de l'amylopectine, sont venus de l'analyse du phénotype de mutants particuliers chez le maïs et la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* par l'équipe d'Alan Myers à l'Iowa State University et par notre équipe à Lille (James *et al.*, 1995 ; Mouille *et al.*, 1996). Dans les deux cas la mutation portait sur une activité débranchante que l'on pensait impliquée dans la dégradation de l'amidon et pas dans sa synthèse. Plusieurs gènes codant pour ces activités sont attestées chez les végétaux : trois

gènes ISA1, ISA2 et ISA3 codent pour des protéines de type isoamylase et un gène appelé ZPU1 chez le maïs ou AtPU1 chez *Arabidopsis* code, pour une activité de type pullulanase. Les activités débranchantes se distinguent par leur capacité à hydrolyser les liaisons alpha-1,6 des alpha-polysaccharides et en particulier celles du pullulan. Contrairement à la pullulanase, les isoamylases sont incapables de digérer le pullulan (polysaccharide formé de résidus maltotriosyl branchés). La fonction des différentes activités débranchantes dans le métabolisme de l'amidon vient principalement de la caractérisation de mutants touchés dans ces activités. Ainsi par cette approche fonctionnelle, nous savons que les activités débranchantes, pullulanase et ISA3, interviennent principalement dans la dégradation de l'amidon au cours de la germination des graines de maïs (Dinges *et al.*, 2003b) ou la nuit dans le chloroplaste des feuilles (Wattebled *et al.*, 2005). De manière surprenante et contre toute attente, les mutants défectueux pour ISA1 ou/et ISA2 substituent la synthèse d'amidon partiellement ou totalement par celle de glycogène. Pour expliquer ce phénotype singulier, un modèle expliquant les différences principales entre métabolismes du glycogène et de l'amidon a été construit (Ball *et al.*, 1996). Dans ce modèle (figure 3), il est proposé que la fonction de l'isoamylase serait d'épissier le précurseur de l'amylopectine (la préamylopectine) synthétisé par les complexes multienzymatiques précités, en hydrolysant des branches qui ne sont pas fortement rapprochées les unes des autres autorisant de cette manière la formation des grappes, l'entrelacement des chaînes voisines et leur cristallisation. En absence de cette activité correctrice, le système biosynthétique aboutira à la synthèse de glycogène.

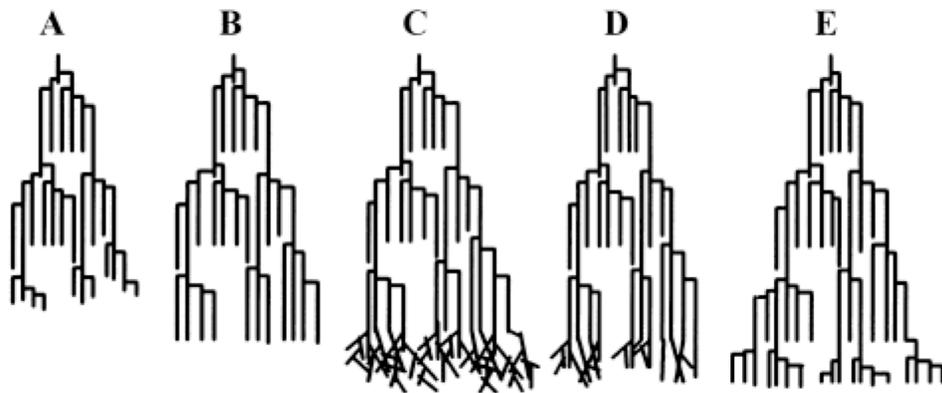


Figure 3 : Modèle de l'épissage des glucanes. L'élongation démarre à la base de la lamelle amorphe (A) et passe par la forme (B) jusqu'à une longueur critique permettant aux enzymes de branchement d'agir. Les activités de branchement conduisent à une structure intermédiaire hyperbranchée, appelée pré-amylopectine (C). L'activité de débranchement entre simultanément en jeu pour éliminer certains points de branchement et donner la structure (D). C'est cette activité qui préviendra de la synthèse du phytoglycogène et épargnera les points de branchement trop proches qui généreront ensuite la prochaine lamelle amorphe.

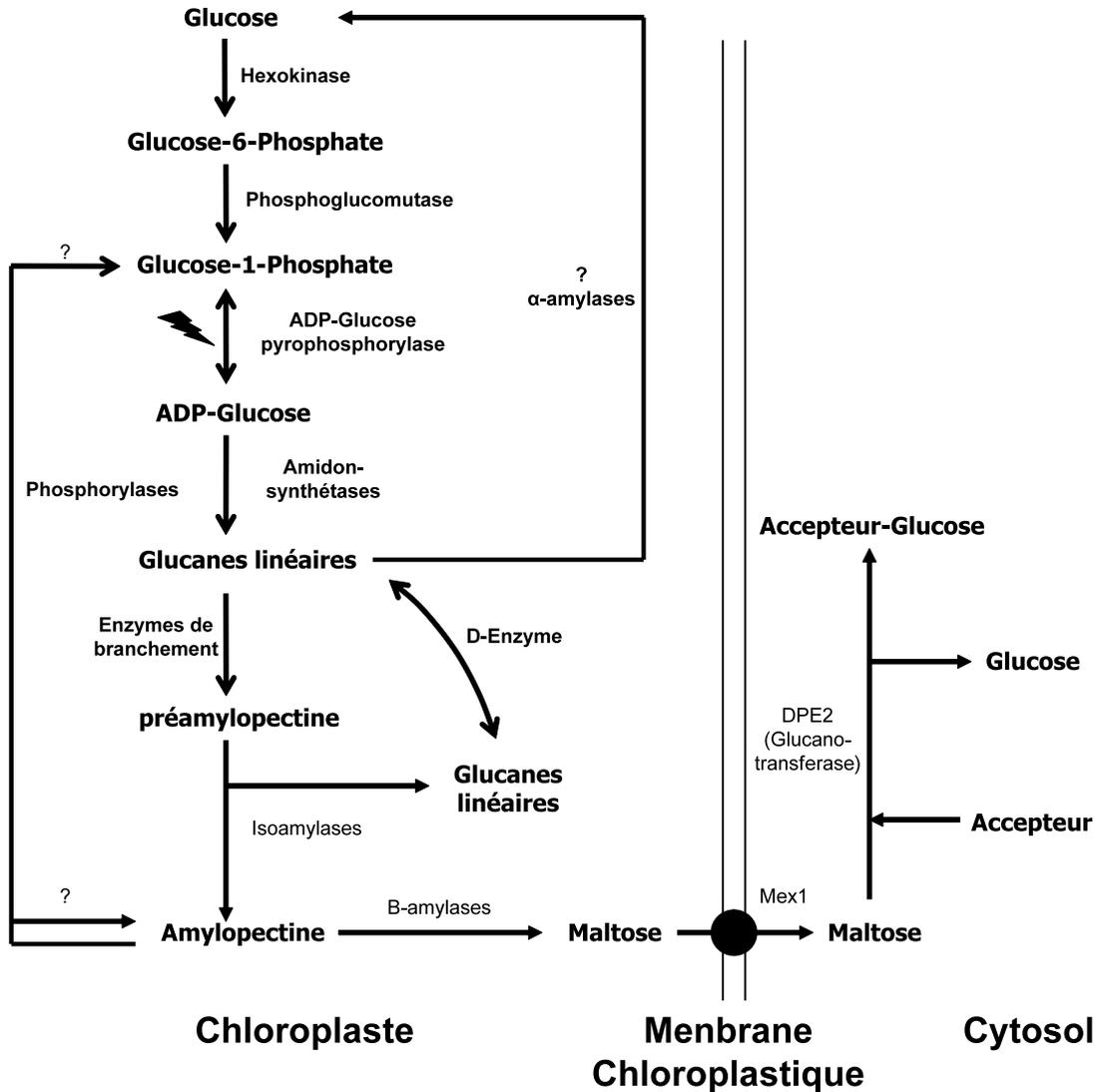
Ce modèle proposé en 1996 rend compte encore aujourd'hui de l'ensemble des résultats obtenus. Les travaux génétiques chez *Chlamydomonas*, chez le maïs et chez le riz ont très tôt mis en évidence l'existence de complexes isoamylasiques formés de plusieurs sous-unités dont l'architecture semble au moins aussi importante que l'activité (Fujita *et al.*, 1999 ; Dauvillée *et al.*, 2001a,b, Utsumi et Nkamura, 2006, Dinges *et al.*, 2001a , voir également la partie stage post doctoral). A l'évidence, l'isoamylase en libérant les chaînes mal placées, pose le problème du métabolisme de ces dernières et surtout de l'économie énergétique du

processus. A nouveau, l'analyse génétique de mutants de *Chlamydomonas* allait révéler l'importance de l'enzyme disproportionnante (D-enzyme), une alpha-1,4 glucanotransférase capable de transférer des segments de chaînes de malto-oligosaccharides donneurs aux chaînes acceptrices constituées soit par d'autres malto-oligosaccharides soit par les chaînes externes du polysaccharide en croissance (la pré-amylopectine) (Colleoni *et al.* 1999a,b). Dans le cas d'un transfert sur la pré-amylopectine, l'économie énergétique de l'épissage se borne à deux ATP par chaîne déplacée quelle qu'en soit la longueur. Chez *Chlamydomonas*, l'absence d'enzyme disproportionnante aboutit à un effondrement de la synthèse d'amidon qui résulte des contraintes énergétiques imposées par un mauvais recyclage des oligosaccharides libérés par l'isoamylase (Colleoni *et al.*, 1999a). L'ensemble du système de biosynthèse précité est compartimenté dans le stroma des plastes photosynthétiques ou dans celui des amyloplastides des organes de réserves. Les voies de synthèse dans les deux types de plastes sont identiques. Il faut cependant ajouter que dans le cas des albumens de grains de céréales, le système biosynthétique est complété par l'existence d'une forme supplémentaire d'ADP-glucose pyrophosphorylase localisée dans le cytosol. L'ADP-glucose cytosolique est importé dans l'amyloplaste des albumens de grains de céréales par l'intermédiaire d'un transporteur localisé sur les enveloppes de l'organelle (pour revue voir Ball et Morell, 2003).

## La mobilisation récurrente de l'amidon chez les Chloroplastida

La mobilisation récurrente de l'amidon, dans les chloroplastes des feuilles ou dans les plastes non photosynthétiques des différents organes de la plante, définit un processus physiologique très différent de la dégradation spécialisée des réserves lors de la germination des graines. Nous ne nous attacherons pas à décrire cette dernière qui s'accompagne d'ailleurs de déstructurations et décompartimentations cellulaires importantes qui ne se produisent pas dans d'autres circonstances. De fait, la dégradation récurrente de l'amidon qui se produit dans la plupart des tissus de la plante est un processus de complexité analogue à sa synthèse. Il n'est pas inutile de rappeler que la plupart des enzymes végétales hydrosolubles n'ont aucune prise sur l'amidon semi-cristallin intact. Les équipes dirigées par Jens Kossmann et Martin Steup à Golm en Allemagne ont les premières démontré la présence de protéines capables de phosphoryler l'amidon et qui semblaient requises pour sa dégradation récurrente dans les chloroplastes de feuille (Lorberth *et al.*, 1998 ; Ritte *et al.*, 2002). Ces protéines appelées GWD (glucan-water dikinase) renferment un domaine de liaison au grain d'amidon et un domaine dikinase assurant la phosphorylation du carbone 6 du glucose de l'amylopectine cristalline. Les équipes de Martin Steup et d'Andreas Blenow de Copenhague ont ensuite démontré l'existence d'autres dikinases responsables de la phosphorylation du glucose de l'amylopectine sur le carbone 3 (Baunsgaard *et al.*, 2005 ; Kötting *et al.*, 2005). Ces dernières, appelées PWD (phosphoglucan dikinase), ne sont d'ailleurs capables de phosphoryler l'amidon que si celui-ci a été préphosphorylé en position 6. Le rôle suggéré de ces phosphorylations consisterait à rendre plus hydrophiles et accessibles les doubles hélices de l'amylopectine cristalline (Hejazi *et al.*, 2008). Ces dernières sont ensuite attaquées par des beta-amylases qui produisent du beta-maltose de manière récurrente à partir des extrémités non réductrices de ces doubles hélices phosphorylées (Scheidig *et al.*, 2002). Les chaînes de l'amylopectine seraient ensuite déramifiées par une enzyme débranchante spécifique appelée ISA3 (Edner *et al.*, 2007). Le beta-maltose ne peut être digéré à l'intérieur du plaste. Il ne définit d'ailleurs pas un substrat utilisable par la D-enzyme plastidiale. Par contre, il existe dans le cytosol une alpha-1,4 glucanotransférase capable de cliver la liaison glycosidique du beta-maltose, pourvu qu'un des deux résidus de glucose du disaccharide soit transféré sur un polysaccharide accepteur. L'inactivation de cette

transglucosidase cytosolique conduit d'ailleurs à une inhibition de la mobilisation de l'amidon et une accumulation de maltose (Lu et Sharkey, 2004 ; Lloyd JR *et al.*, 2004 ; Chia *et al.*, 2004). Le beta-maltose semble être transporté par l'entremise d'une protéine exportatrice de maltose présente sur les enveloppes du plaste (Niittylä *et al.*, 2004). Le phénotype des mutants de ce transporteur est d'ailleurs analogue à celui des plantes privées de transglucosidase. Le meilleur accepteur polysaccharidique de la transglucosidase *in vitro* est défini de loin par le glycogène. Or il n'existe pas de glycogène dans le cytosol des cellules végétales. Martin Steup et son équipe ont découvert l'existence d'un hétéroglycane cytosolique dont les chaînes externes sont constituées de chaînes de glucose liés en alpha-1,4 (Fettke *et al.*, 2004). Ces chaînes seraient donc allongées par la transglucosidase pour être ensuite dégradées par une phosphorylase cytosolique (Fettke *et al.*, 2006). Les phosphorylases sont les enzymes principales de la dégradation du glycogène fongique animal ou bactérien. Elles attaquent le glucose en position terminale non réductrice en présence d'orthophosphate pour générer du glucose-1-P et ne peuvent dégrader les branches ou des chaînes ou oligosaccharides de moins de 5 résidus de glucose de longueur. Il existe chez les végétaux des phosphorylases plastidiales et cytosoliques. On soupçonne les phosphorylases plastidiales de jouer un rôle important dans une voie de dégradation intraplastidiale de l'amidon, indépendante de la production de beta-maltose. Cette voie permettrait de maintenir une glycolyse intraplastidiale active à l'obscurité. Pour l'instant aucun mutant n'est venu véritablement étayer ce rôle supposé. La même remarque vaut pour les alpha-amylases plastidiales et la pullulanase. Le seul phénotype rapporté pour une déficience en phosphorylase plastidiale consiste en un défaut de synthèse d'amidon analogue à celui que l'on enregistre chez des mutants déficients en enzyme de branchement (Dauvillée *et al.*, 2006). Ce défaut s'expliquerait par l'existence d'un complexe mutienzymatique impliquant la phosphorylase et les enzymes de branchement. L'ensemble des résultats concernant le métabolisme de l'amidon chez les chloroplastida est résumé dans la figure ci-dessous.



## Origine évolutive du métabolisme de l'amidon

Comme nous l'avons précisé plus haut, la présence du métabolisme de l'amidon corrèle avec l'endosymbiose plastidale. Des études biochimiques, bioinformatiques et génétiques ont été entreprises dans les lignées sœurs des Chloroplastida : les algues rouges (Rhodophyceae) et les glaucophytes (Coppin *et al.*, 2005; Plancke *et al.*, 2008). Ces études mettent en lumière une origine phylogénétique commune du métabolisme de l'amidon dans les trois lignées qui confirment leur origine unique désormais prouvée (Rodriguez-Ezpeleta *et al.*, 2005). Les glaucophytes et les algues rouges diffèrent cependant des Chloroplastida non seulement par la localisation de l'amidon qui est cytosolique, mais aussi par la présence d'un métabolisme basé sur l'UDP-glucose comme c'est le cas pour le glycogène chez les eucaryotes. Les amidon synthases de ces deux lignées ont d'ailleurs, contrairement aux Chloroplastida, une phylogénie eucaryote (Coppin *et al.*, 2005 ; Plancke *et al.*, 2008 ; Deschamps *et al.*, 2008a). De plus, les enzymes de branchement, les beta-amylases, les phosphorylases et la transglucosidase font également preuve d'une origine eucaryote commune dans les trois lignées de l'endosymbiose (Deschamps *et al.*, 2008a). Les seules

fonctions d'origine cyanobactérienne présentes chez les glaucophytes et les algues rouges sont constituées par l'isoamylase et la GBSS. Ces deux activités sont associées soit à la production de polysaccharides semi-cristallins soit encore à la synthèse d'amylose au sein de la matrice semi-cristalline. Il est désormais clair que le métabolisme de l'amidon est défini par une mosaïque de gènes d'origine soit eucaryote soit cyanobactérienne qui résulte de la rencontre d'une cellule eucaryote heterotrophe et d'une cyanobactérie voici 1,5 milliards d'années (Coppin *et al.*, 2005 ; Deschamps *et al.*, 2008a). Mais d'où vient cette structure si particulière qui n'est retrouvée en apparences chez aucune cyanobactérie ni aucun eucaryote indépendamment de l'endosymbiose ?

La présence chez les végétaux, d'enzymes de phylogénie eucaryote et cyanobactérienne laisse penser que les deux partenaires de l'endosymbiose synthétisaient chacun des polysaccharides formés de glucose lié en alpha-1,4 et ramifiés en alpha-1,6. Mais sous quelle forme ? Le fait que l'isoamylase et la GBSS toutes deux associées à la nature semi-cristalline de l'amidon soient de phylogénie cyanobactérienne nous a suggéré que des structures analogues à l'amidon végétal existaient peut-être parmi elles.

La plupart des cyanobactéries accumulent cependant du glycogène. Le groupe de Yasunori Nakamura (Nakamura *et al.*, 2005) au Japon a le premier rapporté des structures de glycogène anormal baptisé semi-amylopectine dans un sous groupe particulier de cyanobactéries : le sous-groupe V selon la classification de Honda *et al.* (1999). Parmi les cyanobactéries du sous-groupe V, nous avons à Lille identifié et axénisé une cyanobactérie marine fixatrice d'azote qui contenait des grains de morphologie et dimensions comparables à l'amidon des végétaux. Nous avons révélé que ces grains contenaient de l'amylose et de l'amylopectine et qu'ils affichaient des spectres de diffraction aux RX identiques à ceux qui caractérisent l'amidon (Deschamps *et al.*, 2008a). Après avoir analysé les protéines liées au grain d'amidon, nous avons eu la surprise d'y découvrir une GBSS capable de synthétiser de l'amylose *in vitro*. Cette découverte était importante car malgré sa phylogénie bactérienne, la distribution de la GBSS semblait jusque là restreinte aux plantes. Pourquoi seules les cyanobactéries du sous groupe V synthétisent-elles de telles structures ? La réponse est évidente lorsqu'on examine les particularités physiologiques de ce sous groupe. Les cyanobactéries du sous groupe V accumulatrices d'amidon sont toutes unicellulaires et fixatrices d'azote (diazotrophe). La diazotrophie impose l'isolement de l'enzyme fixatrice d'azote atmosphérique baptisée nitrogénase relativement à l'oxygène ambiant. Or la photosynthèse oxygénique pratiquée par les cyanobactéries et les plantes qui en ont hérité dégage des quantités importantes d'oxygène par photolyse de l'eau. Comment donc protéger la nitrogénase de son inactivation par l'oxygène ? Les cyanobactéries ont résolu le problème de deux manières. Les espèces filamenteuses multicellulaires cantonnent la diazotrophie à des cellules spécialisées appelées hétérocystes, qui ne sont pas photosynthétiques et s'isolent de l'air ambiant par une paroi beaucoup épaisse. Les cyanobactéries unicellulaires diazotrophes du sous-groupe V ne pouvant faire de même séparent la diazotrophie de la photosynthèse temporellement en cantonnant la fixation d'azote à la nuit grâce à une régulation médiée par l'horloge circadienne (Schneegurt *et al.*, 1994).

La diazotrophie étant particulièrement gourmande en énergie, cette stratégie d'isolement impose la mise en réserve de l'énergie captée la journée par la photosynthèse pour son utilisation la nuit. Les quantités d'énergie à mettre en réserve pour ces cyanobactéries sont donc beaucoup plus importantes que pour les autres membres du groupe. L'invention des polysaccharides semi-cristallins par ces cyanobactéries a permis de réduire la dégradation du polysaccharide de réserves pendant le jour en insolubilisant des polymères qui, *ipso facto*, deviennent inaccessibles aux enzymes de dégradation. Cette invention a permis de

mettre en réserve d'avantage de glucose sous forme osmotiquement inerte que ne l'aurait permis le glycogène.

## Conclusions et perspectives :

L'amidon et le glycogène constituent les deux principaux polysaccharides de réserve du monde vivant, chacun répondant pour le mieux aux contraintes énergétiques de la cellule. Ainsi l'agencement des chaînes de glucose au sein d'une particule de glycogène représente la structure optimale pour une demande ou un stockage rapide de carbone et donc d'énergie pour les cellules eucaryotes ou procaryotes. La structure dynamique du glycogène contraste avec celle de l'amylopectine qui a évolué pour confiner un maximum de résidus de glucose dans un minimum d'espace.

Bien que ces deux polysaccharides partagent des réactions enzymatiques communes dans leurs synthèses et leurs dégradations, le métabolisme de l'amidon chez les plantes vertes se caractérise non par le fonctionnement coordonné de 6 loci mais par la présence d'un réseau de plus de 40 gènes (Deschamps *et al.*, 2008b). Ce réseau est notoirement moins complexe chez les algues rouges, les cyanobactéries ou les apicomplexes (*Toxoplasma gondii*).

A partir de ce constat, au moins deux questions se posent : y-a-t-il une relation entre la localisation chloroplastique de l'amidon et le maintien de ces 40 gènes au cours de l'évolution chez la lignée verte ? Est-ce qu'un processus alternatif de cristallisation de l'amylopectine s'est mis en place chez les autres organismes qui utilisent un nombre de gènes plus restreint ?

Il y a encore une dizaine d'années, on pouvait attribuer ce réseau important de gènes à la complexité des organismes étudiés. Chez le maïs, par exemple, il existe trois gènes codant pour des isoformes d'enzyme de branchement, BEIIa, BEIIb et BEI. L'isoforme BEIIb est présente uniquement dans l'albumen et non dans les feuilles. Il était alors légitime de penser que l'expression tissu-spécifique était une raison suffisante pour le maintien de ces isoformes.

Cependant aujourd'hui, le nombre croissant de génomes complètement séquencés et disponibles, nous permet de retracer l'évolution de voies métaboliques chez des organismes ayant une histoire commune. Nous avons ainsi pu montrer d'une part, que le métabolisme de l'amidon est constitué d'une mosaïque de gènes provenant de la cyanobactérie phagocytée et de la cellule eucaryote ancestrale et d'autre part, que ce réseau de gènes soit maintenu dans toute la lignée verte et en particulier chez la plus petite algue verte *Ostreococcus tauri* (1  $\mu$ M de diamètre) dont le génome comprend uniquement 12,6 Mbp (le nombre d'isoformes est réduit dans les autres voies métaboliques).

Plus récemment, nous avons proposé que le réseau très développé de gènes observés dans la lignée verte soit lié au retour de la synthèse d'amidon dans le plaste. Lors de l'établissement de l'endosymbiose, plusieurs étapes ont été requises dont une qui a consisté à transférer la plupart des gènes de la cyanobactérie au niveau du génome de la cellule eucaryote. Le retour de la synthèse d'amidon dans le chloroplaste a ensuite nécessité la présence d'un peptide de signalisation vers le plaste. C'est justement au cours de cette étape d'étiquetage qu'une duplication de gènes se serait déroulée dans la cellule ancestrale (Deschamps *et al.*, 2008b).

Si cette hypothèse permet d'expliquer le nombre important de gènes dans la lignée verte, elle n'apporte aucune explication sur la pression de sélection qui a conduit à une compartimentation chloroplastique de l'amidon uniquement dans cette lignée. Cependant, Ekkehard Neuhaus et son équipe viennent peut être d'apporter un début d'explication (Reinhold *et al.*, 2007). Ils ont caractérisé un mutant d'*Arabidopsis* dépourvu des deux transporteurs d'ATP, NT1 et NT2, localisés dans la membrane chloroplastique. La fonction de

ces transporteurs, qui n'était pas encore élucidée, est d'importer de l'ATP du cytosol vers le chloroplaste. En absence de ces deux transporteurs, les plantes mutantes sont naines et les feuilles présentent des lésions nécrotiques. De manière surprenante, ces deux phénotypes disparaissent si les plantes sont exposées à une quantité de lumière importante, et au contraire plus sévère si la quantité de lumière reçue est faible. L'hypothèse avancée par les auteurs pour expliquer le rôle de la lumière dans la guérison des phénotypes observés repose sur la quantité d'amidon accumulée dans les chloroplastes en fonction des différentes conditions d'exposition. Si les plantes mutantes sont surexposées à la lumière, la quantité d'amidon résiduelle est suffisante pour fournir via la voie de la glycolyse un pool d'ATP chloroplastique qui est absent dans les mutants sous exposés à la lumière. Ce nucléotide synthétisé est utilisé par une chelatase qui neutralise un produit intermédiaire de la synthèse de la chlorophylle : la protoporphyrine IX. Cet intermédiaire est très réactif à la lumière et conduit à la formation de ROS (Reactive Oxydant Species) responsable de la nécrose des feuilles.

On peut supposer que le retour de la synthèse de l'amidon dans la lignée verte a pu être motivé dans le but de protéger le chloroplaste du stress oxydatif généré par la synthèse importante de chlorophylle dans la lignée verte. La construction de triples mutants touchés dans l'ADP-glucose pyrophosphorylase et les deux transporteurs d'ATP, devrait, par ailleurs, confirmer le rôle de l'amidon dans ce processus de protection. En absence totale d'amidon, les lésions nécrotiques sur les feuilles d'*Arabidopsis* devraient être permanentes quelles que soient les conditions expositions.

La caractérisation de polysaccharides cristallins de type amidon chez les cyanobactéries soulève certaines interrogations. Chez les plantes et les algues vertes, il semble évident que les activités de débranchement de type isoamylase et de type pullulanase interviennent à la fois dans la dégradation, mais aussi dans l'élaboration des grappes d'amylopectine.

Chez les procaryotes, un seul gène, appelé *glgX*, code pour une activité débranchante de type isoamylase. Le rôle de l'isoamylase dans le catabolisme du glycogène a été clairement démontré chez *E.coli* et *Synechococcus*. Hors les cyanobactéries unicellulaires diazotrophes, qui accumulent un polysaccharide de réserve cristallin, ne possèdent qu'un seul gène *glgX*.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de définir la fonction exacte de l'isoamylase chez ces cyanobactéries diazotrophes. Cette activité débranchante pourrait intervenir soit dans la synthèse et la dégradation des grappes d'amylopectine soit dans la voie catabolique comme les autres *GlgX*. Si cette dernière hypothèse s'avère exacte, cela suggère que d'autres activités telles que les activités de branchement pourraient être impliquées dans la formation des structures en grappe de l'amylopectine.

Cette possibilité est confortée par l'étude du parasite *Toxoplasma gondii*. Cet apicomplexe synthétise des grains d'amidon dépourvus d'amylose avec : une amidon synthétase, trois activités de branchement et une activité de débranchement de type indirecte (GDE glycogen debranching enzyme), Cette dernière est phylogénétiquement proche des enzymes eucaryotes. Les GDE sont composées d'un domaine catalytique alpha-1,4 glucanotransférase et d'un domaine amylo-1,6 glucosidase. Le bilan de la réaction est la libération d'une molécule de glucose. Comme les activités *GlgX*, les GDE interviennent dans le catabolisme du glycogène en clivant les liaisons alpha-1,6 d'une molécule de glycogène dont les chaînes ont été préalablement rognées par une phosphorylase. Il est donc intéressant d'observer que dans deux contextes différents faisant intervenir deux types d'activité de débranchement différentes, GDE et *GlgX*, il soit possible d'aboutir à la synthèse d'un polysaccharide cristallin proche sur le plan structural de celui des plantes. Le futur défi dans

l'étude de cette voie métabolique, portera donc sur l'identification d'un processus alternatif de cristallisation mis en place dans ces organismes.

### Références

Ball S, Guan HP James M, *et al.* From glycogen to amylopectin: a model explaining the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 1996 ; 86: 349-52.

Ball S, van de Wal M, Visser R. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Sciences* 1998 ; 3: 462-67.

Ball SG, Morell MK. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Ann Rev Plant Biol* 2003 ; 54: 207-33.

Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J. ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003 ; 67: 213–25.

Baunsgaard L, Lütken H, Mikkelsen R, *et al.* A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated  $\alpha$ -glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005 ; 41: 595–605.

Bhattacharyya MK, Smith AM, Ellis, *et al.* The wrinkled-seed character of a pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell* 1990 ; 60: 115-22.

Buléon A, Colonna P, Planchot V, *et al.* Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 1998 ; 23 : 85-112.

Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, *et al.* A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J* 2004 ; 37: 853–63.

Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, *et al.* Genetic and biochemical evidence for the involvement of  $\alpha$ -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiol* 1999 ; 120: 993-1003.

Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, *et al.* Biochemical characterization of the *Chlamydomonas*  $\alpha$ -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* 1999 ; 120: 1005-14.

Coppin A, Varre JS, Lienard L, *et al.* Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J Mol Evol* 2005 ; 60: 257-67.

Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, *et al.* Two loci control phytoglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 2001a ; 125: 1710-22.

Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, *et al.* Biochemical characterization of wild type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol* 2001b ; 125: 1723–31.

- Dauvillée D, Chochois V, Steup M, *et al.* Plastidial phosphorylase is required for normal starch granule biogenesis in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 2006 ; 48: 274-85.
- Deschamps P, Haferkamp I, Dauvillée D *et al.* The nature of the periplastidial pathway of amylose synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Eukaryot Cell* 2006 ; 5: 954-63.
- Deschamps P, Colleoni C, Moreira D, *et al.* Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom. *Mol Biol Evol* 2008a ; 25: 536-48.
- Deschamps P, Moreau H, Worden AZ *et al.* Early Gene Duplication within Chloroplastida and its correspondence with Relocation of Starch Metabolism to Chloroplasts. *Genetics* 2008b ; 178 : 2373-87
- Deschamps P, Guillebeault D, Devassine J, *et al.* The heterotrophic dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* defines a model genetic system to investigate cytoplasmic starch synthesis. *Eukaryot Cell* 2008c ; 7 (5) : 872-80
- Dinges, J. R., Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M. G. Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell* 2003 b ; 15 : 666-680.
- Dinges, J. R., Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M. G. Molecular structure of three mutations at the maize sugary1 locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiol* 2001a ; 125 :1406-1418.
- Edner C, Li J, Albrecht T, *et al.* Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial  $\beta$ -amylases. *Plant Physiology* 2007 ; 145:17–28.
- Fettke J, Chia T, Eckermann N, *et al.* A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J* 2006 ; 46: 668–84.
- Fettke J, Eckermann N, Poeste S, *et al.* The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. *Plant J* 2004 ; 39: 933–46.
- Fujita N, Kubo A, Francisco PB Jr, *et al.* Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta* 1999 ; 208: 283–93.
- Gallant DJ, Bouchet B et Baldwin. Microscopy of Starh: Evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr. Polymers*. 1997. 32; 177-191.
- Hejazi M, Fettke J, Haebel S, *et al.* Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *Plant J* 2008 ; doi:10.1111/j.0960-7412.2008.03513.x.

Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, *et al.* Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiol* 2008 ; 146: 1892–908.

James MG, Robertson DS, Myers AM. Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* 1995 ; 7: 417-29.

Honda D, Yokota A, Sugiyama J. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J Mol Evol* 1999 ; 48: 723–39.

Kiss JZ, Roberts EM, Brown RM and Triemer, RE. X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma* 1988 ; 146:150-156

Kötting O, Pusch K, Tiessen A, *et al.* Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves: the phosphoglucan, water dikinase (PWD). *Plant Physiol* 2005 ; 137: 242–52.

Lin TP, Caspar T, Somerville C *et al.* Isolation and characterisation of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynath lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol* 1988a ; 86: 1131–35.

Lin TP, Caspar T, Somerville C *et al.* A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADPglucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant Physiol* 1988b ; 88 : 1175–81.

Lorberth R, Ritte G, Willmitzer L, *et al.* Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat Biotechnol* 1998 ; 16: 473–77.

Lloyd JR, Blennow A, Burhenne K, *et al.* Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiol* 2004 ; 134: 1347–54

Lu Y, Sharkey TD. The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* 2004 ; 218: 466–73.

Maddelein ML, Libessart N, Bellanger F, *et al.* Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule: Determination of granule-Bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J Biol Chem* 1994 ; 269: 25150-57.

Mackey BM and JG Morris. Isolation of a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* defective in granulose degradation. *FEBS Letters* 1974 ; 48, 64-67

Melendez-Hevia E, Waddell TG, Shelton ED. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem J* 1993 ; 295: 477– 83.

Mouille G., Maddelein ML, Libessart N, *et al.* Preamylopectin Processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* 1996 ; 8: 1353-66.

Nakamura Y, Takahashi J, Sakurai A, *et al.* Some cyanobacteria synthesize semi-amylopectin type  $\alpha$ -polyglucans instead of glycogen. *Plant Cell Physiol* 2005 ; 46:539-45.

Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, *et al.* A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 2004 ; 303: 87–9.

Nyvall P, Pelloux J, Davies HV, *et al.* Purification and characterisation of a novel starch synthase selective for uridine 5'-diphosphate glucose from the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 1999 ; 209: 143-52.

Plancke C, Colleoni C, Deschamps P, *et al.* Pathway of cytosolic starch synthesis in the model glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. *Eukaryot Cell* 2008 ; 7: 247-57.

Preiss J, Romeo T. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv Microb Physiol* 1989 ; 30: 183–238.

Recondo E, Leloir L. Adenosine diphosphate glucose and starch biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1961 ; 6: 85–8.

Reinhold T., Alawady A., Grimm B., *et al.*, Limitation of nocturnal import of ATP into Arabidopsis chloroplasts leads to photooxydative damage. *Plant J.* 2008 ; 50 : 293-304

Reyes-Prieto A, Bhattacharya D. Phylogeny of nuclear encoded plastid targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae. *Mol Biol Evol* 2007 ; 24: 2358-61.

Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, *et al.* The starch-related R1 protein is an  $\alpha$ -glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99: 7166–71.

Robson R, Robson RM Morris, JG. The biosynthesis of granulose by *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. J.* 1974 ; 144, 503-511.

Robson R and Morris, JG. Mobilisation of Granulose in *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. J.* 1974 ; 144, 513-517.

Rodriguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, *et al.* Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: Green plants, red algae, and glaucophytes. *Current Biology* 2005 ; 15: 1325-30.

Roldán I, Wattebled F, Lucas MM, *et al.* 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* 2007 ; 49, 492-504.

Scheidig A, Fröhlich A, Schulze S, *et al.* Downregulation of a chloroplast-targeted *b*-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* 2002 ; 30: 581–91.

Schneegurt MA, Sherman DM, Nayar S, *et al.* Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J Bacteriol* 1994 ; 176: 1586–97.

Shimonaga T, Konishi M, Oyama Y, *et al.* Variation in Storage  $\alpha$ -Glucans of the Porphyrionales (Rhodophyta). *Plant Cell Physiol.* 2008 ; 49(1):103-16.

Tetlow IJ, Beisel KG, Cameron S, *et al.* Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol* 2008 ; 146: 1878–91.

Ugalde JE, Parodi AJ, Ugalde, RA. *De novo* synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003 ; 100, 10659–63.

Utsumi Y and Nakamura Y. Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1-isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm. *Planta* 2006 ; 225 :75-87

Van den Koornhuysse N, Libessart N, Delrue B, *et al.* Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 1996 ; 271: 16281-8.

Viola R, Nyvall P, Pedersen M. The unique features of starch metabolism in red algae. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2001 ; 268: 1417-22.

Wattebled F, Dong Y, Dumez S, Delvallé D, Planchot V, Berbezy P, Vyas D, Colonna P, Chatterjee M, Ball S, D'Hulst C. Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phyto glycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol.* 2005 ; 1:184-95.

Whyte JNC and Strasdine GA. An intracellular alpha-D-glucose from *Clostridium Botulinum*, type E. *Carbohydr. Res.* 1972 ; 25, 435-441

Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, *et al.* A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 2004 ; 21: 809–18.

Zabawinski C, Van den Koornhuysse N, D'Hulst C, *et al.* Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of an heterotetrameric ADPglucose pyrophosphorylase. *J Bacteriol* 2001 ; 183: 1069-77.

## Travaux de recherche de la thèse: Septembre 1996-Décembre 1999

---

### Résumé

Nous savons maintenant que les enzymes de débranchement participent de manière active à la biosynthèse de l'amidon pour former la structure finale en grappe de l'amylopectine. Au cours de mon travail de thèse, j'ai décrit une nouvelle mutation chez *Chlamydomonas reinhardtii* entraînant un effondrement de la synthèse d'amidon ainsi que des modifications structurales majeures du polysaccharide résiduel. De plus, cette défectuosité s'accompagne d'une accumulation de malto-oligosaccharides linéaires. Cette mutation ségrège avec l'absence d'une alpha-1,4 glucanotransférase, encore appelée enzyme disproportionnante (enzyme D). Bien que l'enzyme D transfère des chaînes de glucoses liés en alpha-1,4 provenant d'un donneur sur des malto-oligosaccharides accepteurs plus courts, j'ai pu montrer que l'enzyme catalyse aussi *in vitro* le transfert de malto-oligosaccharides sur les chaînes externes de l'amylopectine. Nous avons proposé, par conséquent, que l'enzyme D joue un rôle clef dans la biosynthèse de l'amidon. Celle-ci métabolise les malto-oligosaccharides libérés par les enzymes de débranchement, soit en les réincorporant sur les chaînes externes du précurseur de l'amylopectine (la préamylopectine), soit en facilitant leur dégradation par les voies hydrolytiques et phosphorylitiques.

### Liste des publications au cours de la thèse.

Dauvillee, D., **Colleoni, C.**, Mouille, G., Morell, M. K., d'Hulst, C., Wattebled, F., Lienard, L., Delvalle, D., Ral, J. P., Myers, A. M. et al. (2001). Biochemical characterization of wild-type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol* **125**, 1723-31.

Dauvillee, D., Mestre, V. V., **Colleoni, C.**, Slomianny, M., Mouille, G., Delrue, B., d'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J. and Ball, S. (2000). The debranching enzyme complex missing in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* displays an isoamylase-type specificity. *Plant Science* **157**, 145-156.

**Colleoni, C.**, Dauvillee, D., Mouille, G., Morell, M., Samuel, M., Slomianny, M. C., Lienard, L., Wattebled, F., d'Hulst, C. and Ball, S. (1999). Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* **120**, 1005-14.

**Colleoni, C.**, Dauvillee, D., Mouille, G., Buleon, A., Gallant, D., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., d'Hulst, C. et al. (1999). Genetic and biochemical evidence for the involvement of alpha-1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiol.* **120**, 993-1004.

Dauvillee, D., **Colleoni, C.**, Shaw, E., Mouille, G., D'Hulst, C., Morell, M., Samuel, M. S., Bouchet, B., Gallant, D. J., Sinskey, A. et al. (1999). Novel, starch-like polysaccharides are synthesized by an unbound form of granule-bound starch synthase in glycogen-accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **119**, 321-30.

## Travaux de recherche post-doctoraux : Janvier 2000-septembre 2003

---

### Avant propos

Le sujet de mon stage post-doctoral portait sur l'étude de différents allèles mutants *su1*. Le but de ce travail visait à expliquer pourquoi différents allèles de ce gène conduisent à des phénotypes aussi variables de l'albumen. J'ai donc dans un premier temps effectué des caractérisations structurales et enzymatiques des allèles mutants *su1*-. L'ensemble des travaux portant sur l'étude de l'isoamylase chez le maïs devrait faire l'objet d'une nouvelle publication. Parallèlement, à cette étude, je me suis intéressé à l'identification par zymogramme des activités enzymatiques présentes dans l'albumen de maïs. J'ai pu ainsi contribuer à différentes études telles que la caractérisation de la pullunase, l'amidon synthase IIa du maïs et caractériser une nouvelle activité enzymatique, SHE (Starch Hydrolytic Enzyme).

### Etude des allèles *su1* chez le maïs.

Le gène *Sugary1* code pour une activité de débranchement de type isoamylasique. Une mutation dans ce gène entraîne plusieurs modifications dans la composition en carbohydrate de l'albumen (i) baisse importante du contenu en amidon (phénotype frippé de l'albumen mature) (ii) présence d'un polysaccharide soluble ou phytoglycogène (iii) augmentation de la teneur en saccharose, c'est d'ailleurs pour cette raison que le mutant *sugary1* est aussi appelé maïs doux.

Il existe une variabilité importante dans l'expression phénotypique des allèles *sugary1*. Ainsi les mutants *sugary1-reference (su1-ref)* et le mutant nul *su1-4582* présentent un phénotype très marqué avec des albumens translucides et frippés alors que les mutants *su1-P* et *su1-amylaceous (su1-am)* sont difficilement identifiables parmi des albumens sauvages. Quant aux mutants *su1-Brown (su1-bn)/su1-starchy (su1-st)*, leurs albumens présentent un phénotype intermédiaire.

Un examen à la loupe binoculaire de coupes d'albumens *su1*- colorées avec une solution d'iode révèle de manière surprenante une hétérogénéité dans l'albumen des mutants (figure 1). Particulièrement pour les mutants *su1-4582* et *su1-ref*, on pouvait s'attendre chez ces mutants dépourvus d'isoamylase active à une coloration parfaitement homogène au niveau de l'albumen. Cependant, des régions colorées en noir apparaissent au niveau de l'albumen sur la face postérieure (1) et au niveau de l'embryon (3). Cette hétérogénéité est encore plus marquée pour les mutants intermédiaires *su1-st* et *su1-bn*. Pour les mutants *su1-P* et *su1-am*, ceux-ci sont comparables à l'albumen sauvage sauf pour l'échantillon de l'année 2001, *su1-P* 2001 qui montre une zone centrale orangée qui témoigne probablement de la présence de phytoglycogène. Cette simple étude d'observation nous indique deux choses ; d'une part que selon le contexte cellulaire (âge et la cellule), le profil d'expression des gènes conduit à la formation de granules et d'autre part que les facteurs environnementaux peuvent affecter la composition en phytoglycogène dans le mutant *su1-P*. Ces résultats sont à rapprocher de ce qui a été observé chez le riz où l'amidon est présent à la périphérie de l'albumen de riz dans les mutants *su1*-.

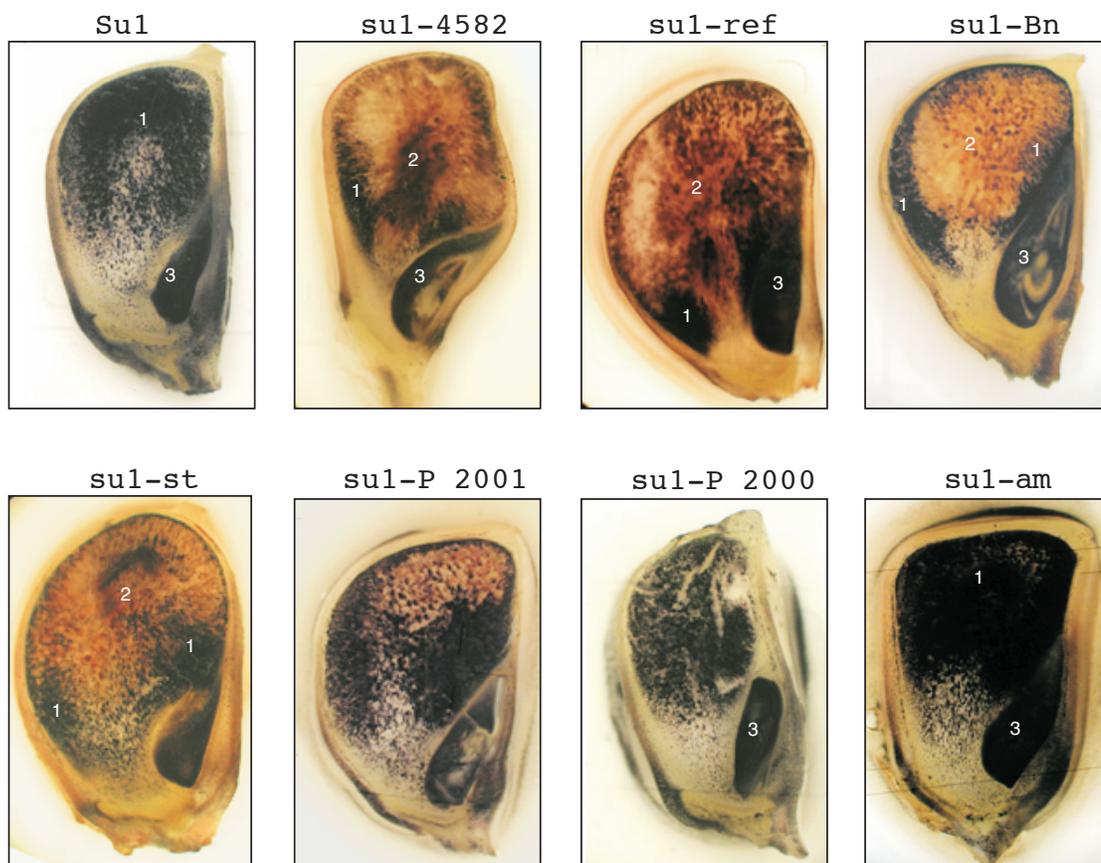


Figure 1 : Coupes sagittales d'albumen de maïs sauvage *Su1* et des allèles *su1-* examinées à la loupe binoculaire. Les albumens de 20 jours après pollinisation ont été découpés et colorés avec une solution d'iode. Selon la nature du polysaccharide accumulé, le complexe iode-polysaccharide donnera une coloration noire avec l'amidon présent dans l'albumen (1) et l'embryon (3) ou une coloration brune dans le cas du phytoglycogène (2). Les coupes *su1-P 2001* et *su1-P 2000* révèlent que les conditions environnementales peuvent influencer la présence de phytoglycogène.

### Caractérisations biochimiques et structurales de l'amidon des mutants *su1-*.

La mutation *su1-ref* entraîne plusieurs modifications importantes dans la composition glucidique de l'albumen, telles qu'une concentration importante de saccharose, une baisse de la quantité d'amidon et la présence de phytoglycogène. Une étude plus complète sur l'ensemble des mutants *su1-* montre que, contrairement à la quantité d'amidon, le taux de glucides solubles augmente de manière importante avec la sévérité du phénotype observé. L'étude du ratio amylose/amylopectine dans l'amidon produit par les différents mutants *sugary1* met en évidence une corrélation entre la quantité d'amylose et le phénotype observé. J'ai noté que l'amidon résiduel produit par les mutants *su1-ref*, *su1-4582*, *su1-bn2*, *su1-st* contient respectivement 60, 58, 44 et 34% d'amylose, alors que l'amidon produit par un albumen sauvage contient entre 20 et 25% d'amylose. Par contre, aucune modification apparente dans la quantité et le ratio amylose/amylopectine n'a été noté dans les mutants *su1-P* et *su1-am*.

La distribution en longueur de chaîne de l'amylopectine des différents allèles *su1-* montre une modification structurale de l'amylopectine qui s'accompagne d'un enrichissement en courtes

chaînes de degrés de polymérisation (DP) compris entre 4 et 13 résidus de glucose et d'une absence d'une population de chaînes avec un DP compris entre 33 et 70 résidus de glucose. Ces modifications structurales tendent à s'estomper dans les phénotypes légers et intermédiaires (Figure 2).

L'accumulation de glucides solubles et l'effondrement de la synthèse de l'amidon dans les différents mutants *su1*- mettent en évidence un contrôle de l'isomylase dans la synthèse correcte de l'amylopectine. L'absence des chaînes de DP compris entre 33 et 70 résidus de glucose suggère également une désorganisation dans la structure de l'amylopectine.

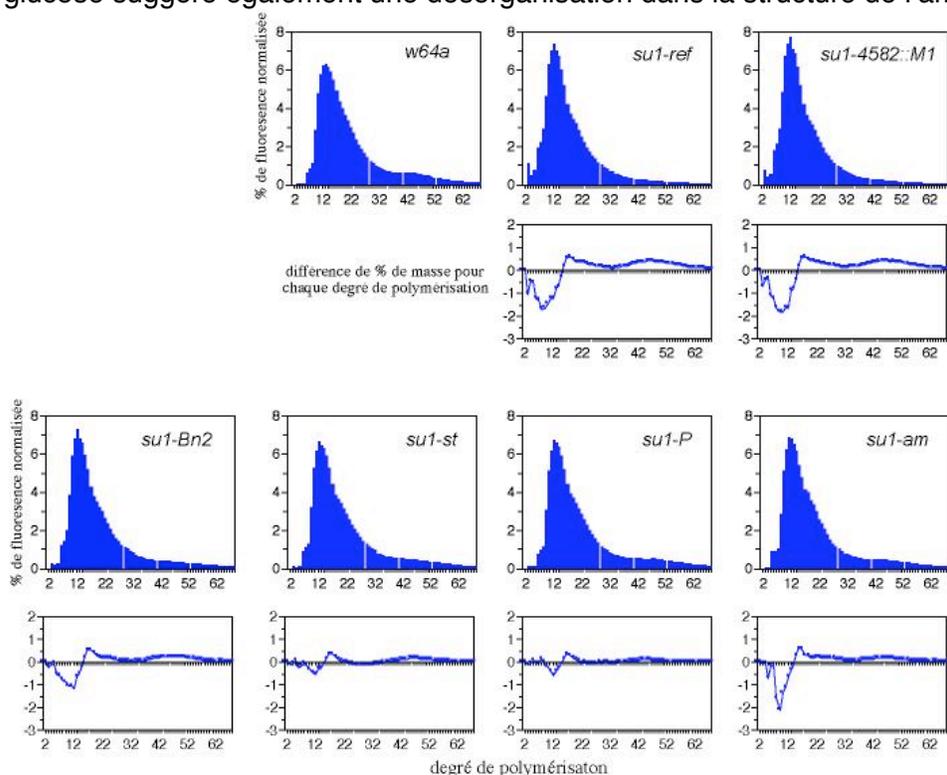


Figure 2: Distributions en longueur de chaîne des amylopectines synthétisées dans l'albumen des différents mutants *su1*- et sauvage (W64A). L'amylopectine a été purifiée par chromatographie de tamisage moléculaire après extraction de l'amidon résiduel. Après débranchement avec une isoamylase bactérienne et marquage des extrémités réductrices avec un composé fluorescent chargé négativement, les chaînes de glucose formant l'amylopectine ont été séparées par électrophorèse capillaire, selon leur degré de polymérisation. Les aires d'intégration correspondant à chaque degré de polymérisation (DP) ont été normalisées (% de masse). Afin de visualiser plus facilement les modifications structurales, une analyse soustractive a été réalisée. Les résultats sont exprimés par différence de % de masse pour chaque DP entre la souche sauvage et les différents mutants *su1*-.

## Preuve indirecte de la formation de complexe homomultimérique ISA1

Toutes les mutations *sugary1* ont été identifiées. L'allèle *su1-ref* résulte d'une mutation ponctuelle dans le site actif. Les allèles *su1-4582* et *su1-st* ont été engendrés respectivement par l'insertion d'un élément transposable M1 dans le premier exon et par d'un nouveau élément transposable appelé « Toad ». Ce dernier génère la formation de sites cryptiques d'épissage, conduisant à la formation de trois ARNm. Parmi ces ARNm, un seul transcrit est correct pour la formation d'une protéine pleinement active.

Toutefois, la quantité d'enzyme de débranchement reste insuffisante pour être visible après concentration sur chromatographie d'échange d'anions. La présence d'une activité

résiduelle est donc indirectement basée sur l'observation du phénotype intermédiaire du mutant *su1-st* et des d'albumens hétérozygotes *su1-ref/su1-st* et *su1-4582/su1-st*. Le test d'allélismes montre que l'allèle *su1-ref* est dominant sur l'allèle *su1-st*, mais qu'au contraire l'allèle *su1-st* est dominant sur l'allèle *su1-4582* ( $su1-ref > su1-st > su1-4582$ ). Ces résultats s'expliquent facilement si l'on considère que l'activité isoamylasique est constituée de sous-unités protéiques.

Les travaux concernant la caractérisation de la mutation *su1-st* ont été publiés dans Dinges et al., 2001. Sa signature en deuxième position se justifie par l'utilisation des données structurales et enzymatiques obtenues pour les mutants *su1-st*, *su1-ref* et *su1-4582*. Ces résultats ont ainsi complété les caractérisations moléculaires des mutations entreprises par Jason Dinges au cours de sa thèse.

### Les complexes isoamylasiques chez le maïs.

L'analyse sur gel d'activité montre la présence de trois bandes d'activité de débranchement chez l'albumen sauvage. Ces bandes d'activité disparaissent dans les mutants *su1-ref* et *su1-4582*. Bien qu'aucune différence n'est observée sur un gel contenant de l'amidon, la spécificité de chaque forme peut être mise en évidence sur des gels contenant de l'amylopectine ou de la beta-limite dextrine (figure 3).

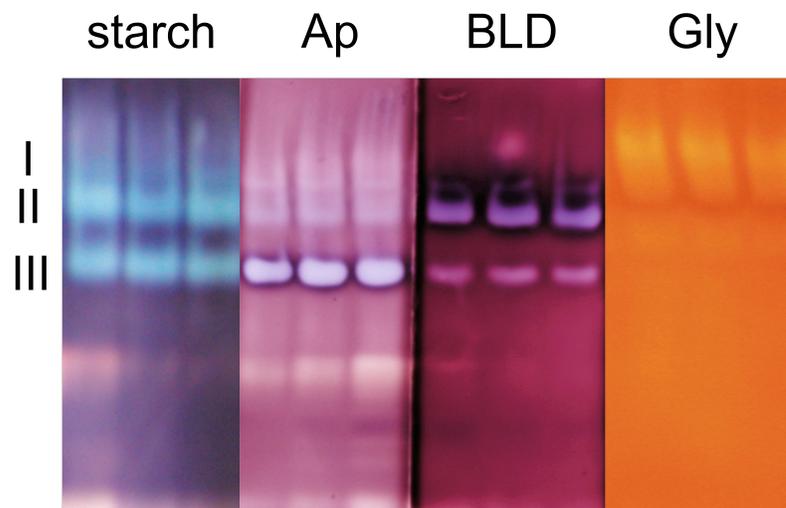


Figure 3 : Les complexes isoamylasiques ont été partiellement purifiés et concentrés à l'aide d'une Q-sepharose à partir d'albumen de maïs sauvage âgé de 20 jours. Les fractions contenant les complexes isoamylasiques ont été séparés sur un gel natif de polyacrylamide. Les complexes isoamylasiques ont été ensuite transférés sur des gels de polyacrylamide contenant différents polysaccharides Starch (amidon) ; Ap (amylopectine) ; BLD (Beta-Limite Dextrine) et Gly (Glycogène). Après une nuit de transfert, les gels sont colorés avec une solution d'iode.

Le complexe III débranche activement l'amylopectine alors que les complexes I et II débranchent préférentiellement la beta-limite dextrine. L'analyse en Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines ISA1 et ISA2, ainsi que l'analyse par zymogramme du mutant nul ISA2 montre que le complexe III est constitué uniquement de protéines ISA1 et les complexes I et II sont formés de protéines ISA1 et ISA2. Les westerns blots ne sont pas montrés à cause de la faible intensité des signaux obtenus avec les anticorps ISA1 et ISA2 au niveau des complexes I et II. En effet, afin de pouvoir corrélérer la position du signal en western blot et le complexe incriminé, j'ai du travailler en conditions non-dénaturantes afin de transférer

les complexes séparés sur un gel PAGE contenant de l'amidon (pour visualiser les activités) et en parallèle sur une membrane PVDF (western blot). Dans ces conditions, les protéines sont peu dénaturées rendant la reconnaissance par les anticorps plus problématique. Aucun signal n'a été observé avec un anticorps dirigé contre ISA3 dans les différents complexes. Ce résultat corrèle l'absence ou le très faible niveau d'ARNm ISA3 observé Jason Dinges dans l'albumen en cours de formation.

### Rôle de l'hétérocomplexe ISA1/ISA2 dans la synthèse de l'amidon de réserve de l'albumen de maïs.

Tous les mutants décrits, jusqu'à présent, sont défectueux dans la formation soit de l'homocomplexe (ISA1-ISA1) soit dans l'hétérocomplexe (ISA1-ISA2). Le mutant *su1-P* est original, puisque celui-ci est dépourvu de complexes homomériques (ISA1-ISA1) mais conserve les deux complexes hétéromériques (ISA1-ISA2) (figure 4). La caractérisation moléculaire de l'allèle *su1-P* montre une mutation ponctuelle (Ile308Arg) au niveau d'une région non-conservée. L'hypothèse, la plus simple est que la présence d'ISA2 est nécessaire à la stabilité et à l'activité de la protéine mutante ISA1<sup>Ile308Arg</sup> ou permet une conformation correcte de la protéine ISA1.

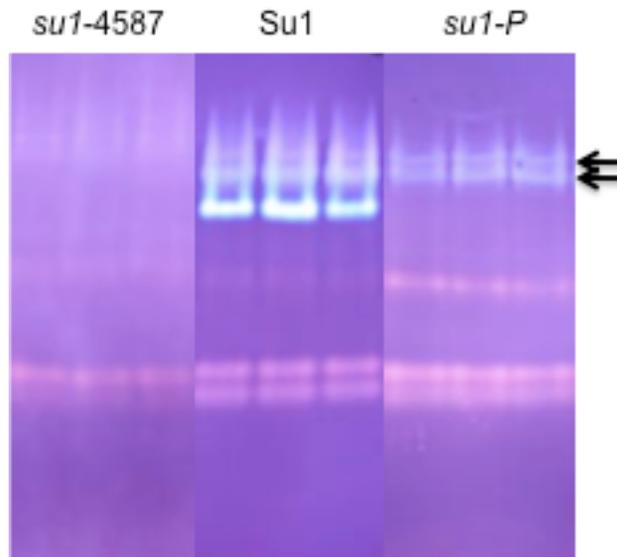


Figure 4 : Caractérisation des complexes isoamylasiques dans le mutant *su1-P*. Les protéines totales des albumens du mutant nul *su1-4587*, du sauvage *Su1* et du mutant *su1-P* ont été déposées et éluées sur une colonne échangeuse d'anions. Les fractions contenant les complexes isoamylasiques ont été séparées puis transférées sur un gel de polyacrylamide contenant de l'amidon. Après transfert, les activités isoamylasiques sont visualisées après coloration du gel avec une solution d'iode.

### Conclusion

Chez le maïs, il existe plusieurs allèles mutants *su1-* qui conduisent à des phénotypes très variables de l'albumen. Ainsi les mutants *su1-st* et *su1-P* présentent, respectivement, un phénotype intermédiaire et quasi-sauvage. Ces différences phénotypiques sont corrélées avec les modifications dans la composition glucidique et structurales de l'amylopectine.

Sur le plan moléculaire, l'insertion d'un transposon dans le premier exon du gène ISA1 entraîne dans le mutant *su1-st*, la formation de trois transcrits dont un codant pour une protéine ISA1 normale. Toutefois, cette activité résiduelle n'est pas visible sur zymogramme même suivi

d'une étape de concentration. Le phénotype intermédiaire observé (38% à 88% d'amidon par rapport au sauvage) nous renseigne sur le niveau de l'activité isoamylasique nécessaire à la synthèse d'amylopectine qui est relativement bas et suggère que la quantité d'isoamylase est en large excès chez le sauvage.

La caractérisation du mutant *su1-P* est intéressante pour aborder la fonction des hétérocomplexes (ISA1-ISA2) dans la biosynthèse de l'amidon. Cet allèle résulte d'une mutation ponctuelle dans une région non-conservée. Seules les hétérocomplexes sont observés dans ce mutant. La quantité et la structure de l'amylopectine sont proches de celles du sauvage et la présence de phytoglycogène semble dépendre des conditions environnementales (figure1). La mutation ponctuelle dans le gène ISA1 conduit probablement à une instabilité de la protéine qui nécessite alors la présence de la protéine ISA2. La mutation *su1-P* mime en quelque sorte le comportement de la protéine sauvage ISA1 d'*Arabidopsis thaliana*. En effet, en absence de la protéine ISA2, l'activité isoamylasique disparaît complètement dans les feuilles d'*Arabidopsis* (mutant *dbe1*).

Le rôle de l'homocomplexe (ISA1-ISA1) dans le mutant ISA2 de maïs est en cours d'étude. La quantité et la structure de l'amylopectine (analysée en FACE) semblent normales et la présence ou non de phytoglycogène n'a pas été encore confirmée. Chez *Chlamydomonas*, le mutant *sta8*, qui est homologue au gène ISA2, présente une défectuosité dans la synthèse d'amidon et accumule du phytoglycogène. Comme le mutant ISA2, la distribution en longueur de chaîne comprise entre 2 et 20 résidus de glucose est comparable au sauvage. Cependant l'altération concerne uniquement les longues chaînes comprise entre 20 et 100 résidus de glucose.

### Identification des activités enzymatiques présentes dans l'albumen de maïs

La technique du zymogramme simple dans sa réalisation est très résolutive puisqu'elle permet d'observer de manière spécifique une activité enzymatique contenue dans un mélange protéique. Si des activités comigrent, il est alors possible d'effectuer une première séparation sur une colonne échangeuse d'anions. Cette analyse en deux dimensions présente l'avantage à la fois de concentrer les activités mineures et de séparer les activités enzymatiques. Les activités enzymatiques présentes dans l'albumen de maïs ont été, ainsi, identifiées à l'aide de mutants défectueux dans les activités de branchement (BEIIa, BEIIb, BEI) et de débranchement de type pullulanase (ZPU1) et isoamylase (SU1).

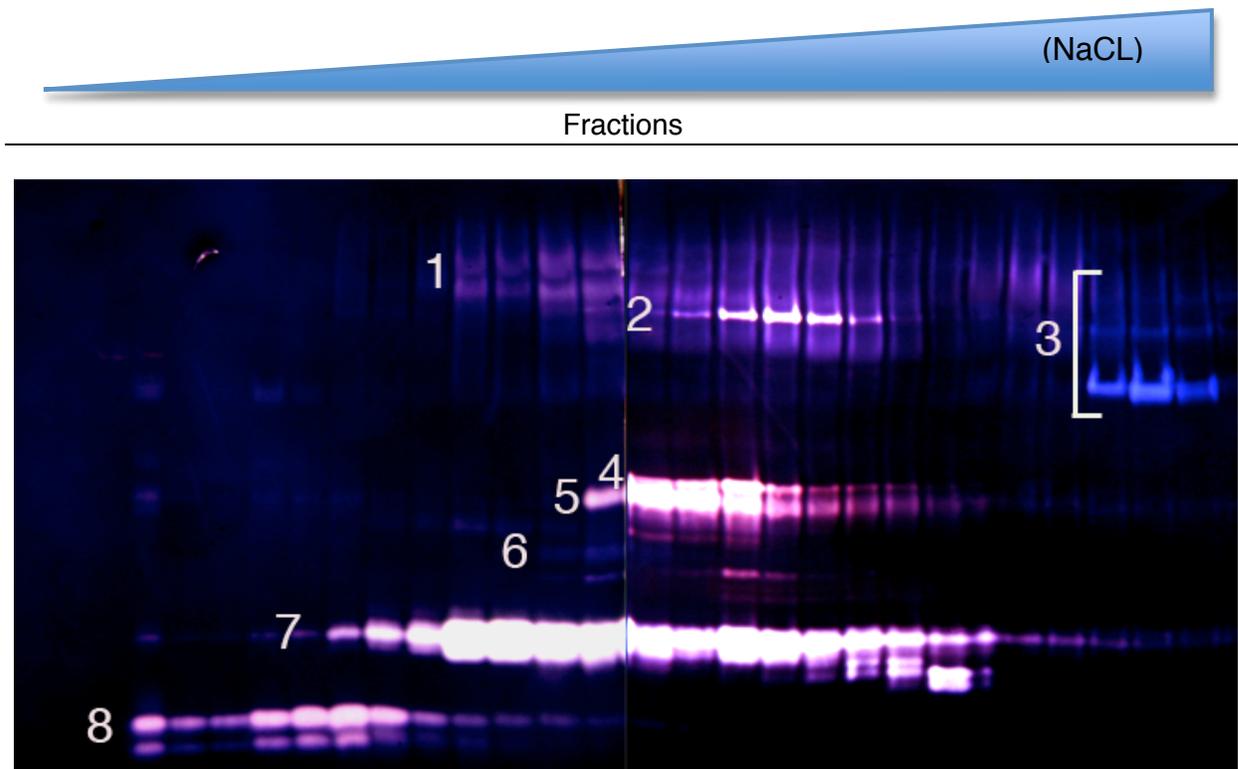


Figure 4 : Analyse 2D des activités enzymatiques métabolisant l'amidon dans l'albumen de maïs. Les protéines présentes dans les albumens de maïs sauvage ont été éluées d'une colonne échangeuse d'anions à l'aide d'un gradient de NaCl. Les protéines contenues dans chaque fraction ont ensuite été séparées sur un gel natif de polyacrylamide. Après la migration, les activités enzymatiques ont été transférées sur un gel natif de polyacrylamide contenant 0,3% d'amidon de pomme de terre : (1) Beta-amylases, (2) alpha-amylase (3) complexes isoamylasiques (4) enzyme de branchment IIa (5) enzyme de branchement IIb (6) pullulanase (7) amylase (8) beta-amylase. L'activité de branchement BEI n'est pas retenue sur la colonne échangeuse d'anions. Elle n'est donc pas visible sur zymogramme

Les activités 1 et 2 ont été identifiées comme étant respectivement des activités beta-amylasiques et alpha-amylasiques. Cette dernière, appelée SHE (Starch Hydrolytic Enzyme), a été caractérisée de manière plus approfondie. Contrairement à l'activité alpha-amylasique utilisée comme contrôle (activité 7 sur la figure 4), l'activité SHE ne libère pas de malto-

oligosaccharides après une nuit d'incubation avec de l'amylopectine (figure 5A). L'amylopectine est cependant hydrolysée comme en témoigne le profil de la chromatographie de tamisage moléculaire (GPC) (figure 5B). La comparaison des poids moléculaires observés sur gel SDS-PAGE (94 kD) et par GPC (366kD), suggère la formation d'un complexe multimérique formé de quatre sous-unités. La purification d'amyloplaste montre que cette dernière est localisée dans l'amyloplaste et non dans le cytosol.

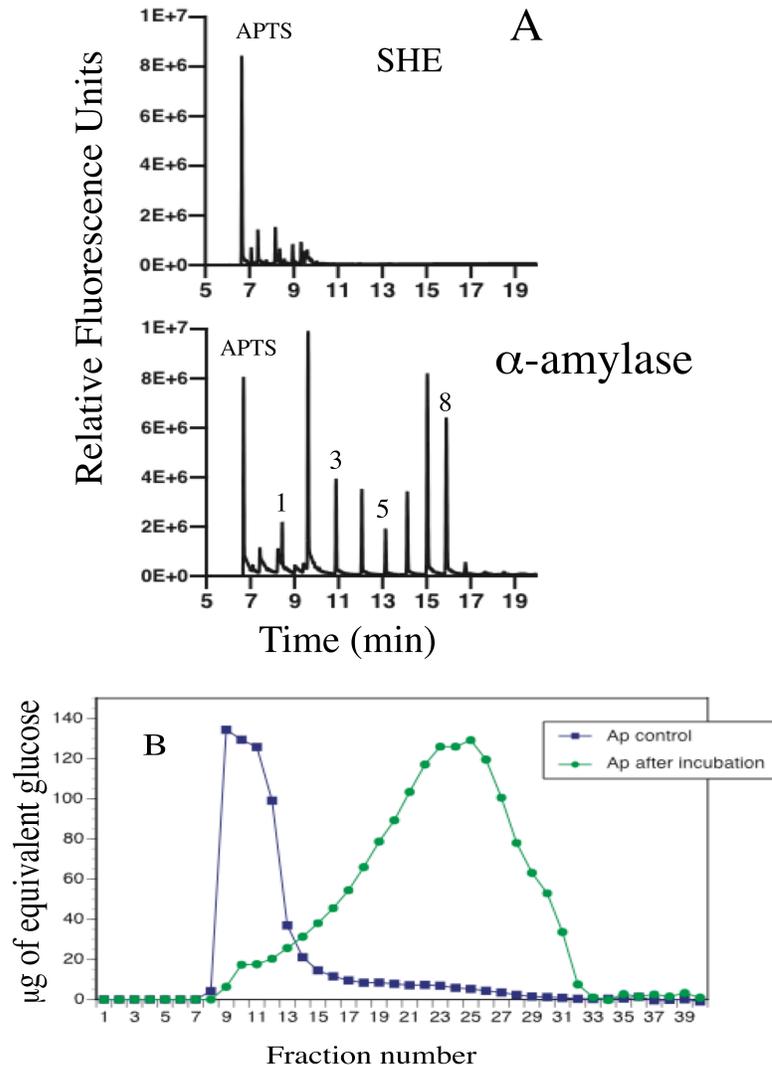


Figure 5 : Caractérisation des produits d'hydrolyse par électrophorèse capillaire après marquage à l'APTS (FACE) et par GPC de l'amylopectine incubée une nuit avec SHE purifiée. Les pics de fluorescence observés correspondent à l'éluion des malto-oligosaccharides. Les degrés de polymérisation (DP) sont indiqués au dessus de quelques pics (1 ;3 ;5 ;8). Les produits d'hydrolyse (cercle vert) et l'amylopectine contrôle (rectangle bleu) ont également été analysés en GPC (sépharose CL2B). La quantité de glucose ( $\mu\text{g}$ ) a été mesurée dans chaque fraction.

Les fragments tryptiques analysés en spectrométrie de masse nous ont ensuite permis d'identifier une alpha-amylase de 90kD homologue chez le riz. Le poids moléculaire anormalement élevé pour ces alpha-amylases, s'explique par un domaine N-terminal supplémentaire qui présente des séquences communes avec la protéine SEX1 ou Glucane Water Dikinase (GDW : voir introduction) (Figure 6).

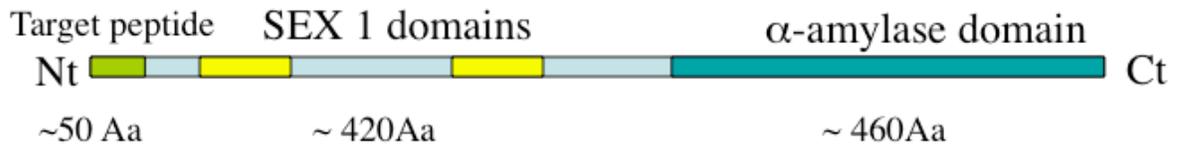
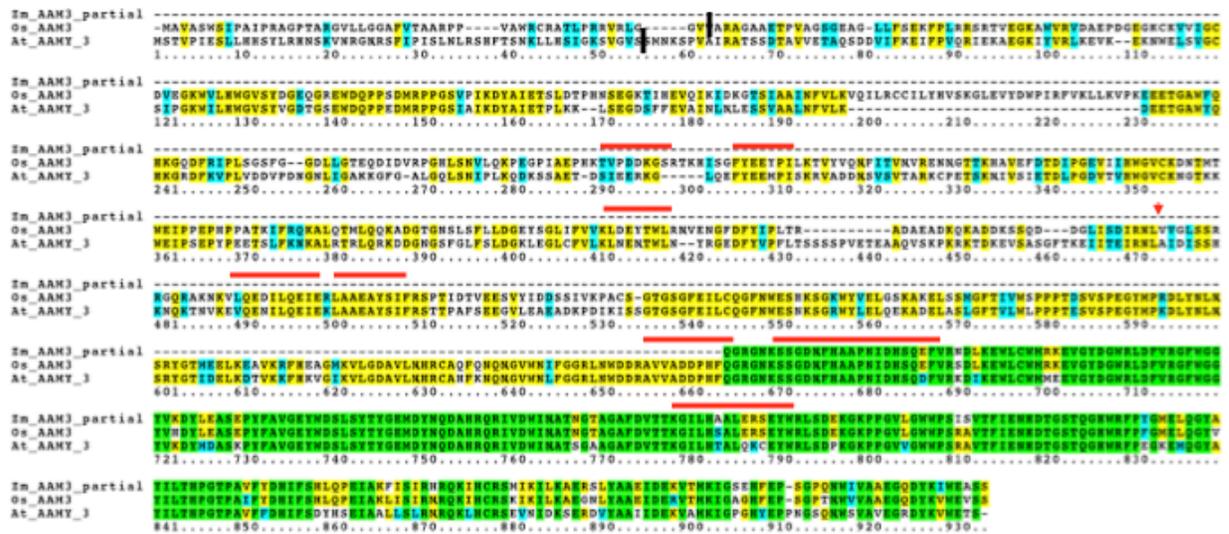


Figure 6 : Alignement des séquences en acides aminés des alpha-amylases de Riz et d'Arabidopsis et de la séquence partielle de maïs. Les traits noirs représentent les sites de clivage des peptides de transit. Les traits rouges symbolisent les fragments tryptiques obtenus de la protéine SHE qui ont permis d'identifier l'alpha-amylase de riz. Représentation schématique de l'organisation de l'alpha-amylase de 90kD.

### Conclusion

Les végétaux possèdent trois activités alpha-amylasiques : deux cytosoliques de 50-60 kD et une plastidiale de 90 kD. Chez le maïs, l'activité SHE correspond à l'activité alpha-amylasique plastidiale. Les alpha-amylases sont définies comme des activités hydrolytiques qui clivent de manière aléatoire dans un polysaccharide les liaisons alpha-1,4. Cependant, les expériences d'incubation montrent que l'activité SHE ne libère pas de malto-oligosaccharides malgré une activité hydrolytique visible sur l'amylopectine. Cela signifie que sous forme de complexe tétramérique l'activité SHE agit spécifiquement sur les longues chaînes (50-100 résidus de glucose) de l'amylopectine et non sur les chaînes courtes externes de type A (environ 12 résidus de glucose). Des réactions clivages dans les chaînes de 12 résidus de glucose auraient nécessairement entraîné la libération de malto-oligosaccharides visibles en FACE. Cette spécificité de clivage pourrait dépendre de la formation du complexe tétramérique. Le rôle de cette activité dans la dégradation de l'amidon reste cependant à éclaircir. Chez Arabidopsis, les mutants défectueux pour cette activité ne sont pas perturbés dans la voie catabolique (Yu TS, Zeeman SC, Thorneycroft D, et al., alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. J Biol Chem. 2005 Mar 18;280(11):9773-9). Par ailleurs, Yu et al., ont également montré que cette alpha-amylase est liée aux grains d'amidon d'Arabidopsis.

Un rôle potentiel de cette activité pourrait être le clivage des longues chaînes de glucose synthétisées par la GBSS au cours de la synthèse d'amylose. Les expériences de chasse réalisées chez *Chlamydomonas* indiquent que la GBSS synthétise l'amylose à partir des extrémités non-réductrices de l'amylopectine. Après élongation, les longues chaînes glucaniques sont clivées de l'amylopectine et retrouvées dans la fraction amylosique. Une activité hydrolytique intervient donc à un moment dans la synthèse d'amylose.

Sa spécificité de clivage et sa co-localisation avec la GBSS font de cette enzyme une bonne candidate pour remplir cette fonction.

### Liste des publications au cours du stage post-doctoral 2000-2003

**Zhang, X., Colleoni, C., Ratushna, V., Colleoni-Sirghie, M., James, M. and Myers, A.** (2004). Molecular characterization of the *zea mays* gene sugary 2. determinant of starch structure and functionality. *Plant Mol Biol* 54(6), 865-879

**Dinges, J. R., Colleoni, C., James, M. G. and Myers, A. M.** (2003). Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell* 15, 666-680.

**Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M. G.** (2003). One- and two-dimensional native PAGE activity gel analyses of maize endosperm proteins reveal functional interactions between specific starch metabolizing enzymes. *J. Appl. Glycosci.* 50, 207-212.

**Wu, C., Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M. G.** (2002). Enzymatic properties and regulation of ZPU1, the maize pullulanase-type starch debranching enzyme. *Arch Biochem Biophys* 406, 21-32.

**Dinges, J. R., Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M. G.** (2001). Molecular structure of three mutations at the maize sugary1 locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiol* 125, 1406-18.

**James M., Myers A., Colleoni C., Strokes, K.**

Brevet 2004: Identification and characterization of a novel alpha-amylase from maize endosperm United States Patent 7270988.

## Travaux actuels : Septembre 2003 à aujourd'hui

---

### Avant propos :

Dès mon arrivée au sein de l'équipe de Steven Ball, j'ai participé à l'étude du contrôle du métabolisme de l'amidon par l'horloge circadienne chez *Chlamydomonas reinhardtii* et contribué à l'étude de la phosphorylase plastidiale chez le mutant *sta4*. Parallèlement à ces travaux, le laboratoire s'engageait vers une diversification des modèles d'étude dans le but de mieux comprendre l'émergence de l'amidon dans les lignées photosynthétiques et dans les organismes qui en sont dérivés. Ainsi les algues *Cryptothecodinium cohnii*, *Cyanophora paradoxa* furent introduites respectivement comme les organismes modèles des algues rouges et de la lignée des Glaucophytes. Je me suis particulièrement investi dans l'étude du métabolisme de l'amidon chez *Cyanophora paradoxa* en participant à l'encadrement de la thèse de Charlotte Plancke.

Plus tard, je me suis intéressé à une cyanobactérie diazotrophe Cyanothèce ATCC51142 qui avait été isolée et décrite par le groupe de Louis Sherman comme accumulant des granules de réserve insolubles dans l'eau et constitués uniquement de glucose. C'est au cours d'une recherche bibliographique concernant cette souche, que j'ai découverte un autre article portant sur la description d'une nouvelle cyanobactérie diazotrophe isolée de l'océan Pacifique par Louisa Falcòn. Je fut doublement chanceux parce que cet article faisait partie d'un numéro promotionnel gratuit du « Journal of Phycology » dans lequel figurait des observations de MET de cette souche. Il était clair que les granules accumulés par cette souche ressemblaient étrangement à des grains d'amidon. Après avoir axénisée cette souche, j'ai pu entreprendre des études structurales. Parallèlement au Japon, l'équipe de Nakamura publia un article concernant la caractérisation de granules provenant d'autres souches de cyanobactéries. Nous avons entrepris une collaboration sur ce thème et participé à la caractérisation structurale des amidons provenant des algues rouges *Porphyridium sordidum* et *Porphyridium purpureum*.

### Contrôle du métabolisme de l'amidon par l'horloge circadienne.

L'horloge circadienne est un mécanisme de contrôle de la transcription des gènes universellement répandu dans le règne vivant. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la présence d'une horloge circadienne a été observée pour les phénomènes de phototaxie, de résistance aux rayons UV et plus récemment dans le contrôle du métabolisme de l'amidon.

En 2001, les premières études réalisées par Zabwinski et al, (2001) suggéraient un contrôle de la transcription du gène de l'ADP-glucose pyrophosphorylase soit au cours de la transition jour-nuit ou soit par l'horloge circadienne. Une différence majeure entre les deux types de contrôle est que dans le cas d'un contrôle circadien, les oscillations observées sont maintenues dans des conditions continues d'éclairage ou d'obscurité. Nous avons donc entrepris de mesurer la quantité d'amidon d'une culture de *Chlamydomonas* entraînée en cycle jour-nuit, puis placée en lumière continue ou en obscurité continue. L'oscillation de la quantité d'amidon en lumière continue ou en obscurité continue indiquait clairement un contrôle du métabolisme de l'amidon par l'horloge circadienne. Nous nous sommes naturellement intéressés à l'ADP-glucose pyrophosphorylase qui est l'enzyme clef du métabolisme de l'amidon. Le dosage de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase a donc été entrepris sur des cultures entraînées en jour-nuit puis placées en lumière continue. Les variations d'activité mesurée corrélaient également avec les quantités d'amidon présentes dans les cellules. Nous avons alors montré à l'aide d'un anticorps dirigé contre la petite sous-unité de l'ADP-pyrophosphorylase, que la quantité d'ADP-glucose pyrophosphorylase est directement liée à la quantité de transcrite. Contrairement aux plantes, la régulation de l'activité ne s'effectue pas par

la formation de dimère inactif mais bien au niveau transcriptionnel. Ces travaux ont également montré grâce à l'utilisation d'un allèle mutant *sta2* codant pour la GBSS et d'un mutant touché dans l'activité synthase 3 (*sta3*) que ces deux activités présentent une redondance fonctionnelle.

### **Contribution à la caractérisation du mutant *sta4* chez *Chlamydomonas*.**

Deux phosphorylases plastidiales (PhoA et PhoB) et une cytosolique (PhoC) sont présentes chez *Chlamydomonas*. Une mutation dans le gène *STA4* entraîne un effondrement de la synthèse en amidon, des granules anormaux qui s'accompagnent d'une altération structurale de l'amylopectine et d'un enrichissement en amylose. Ma contribution à ce travail a consisté à disséquer des tétrades issues d'un croisement entre une souche sauvage et la souche mutante *sta4*. Il fut ainsi possible de corrélérer l'absence de l'activité PhoB et les modifications structurales de l'amidon à la mutation *sta4*.

### **Etude du métabolisme de réserve chez *Cyanophora paradoxa*.**

*Cyanophora paradoxa* appartient à la lignée des Glaucophytes. Les seules données que nous avons à notre disposition, concernaient la localisation cytosolique des grains d'amidon. La première partie de ce projet visait donc à caractériser les grains d'amidon (pourcentage amylopectine / amylose, distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine), puis de caractériser les principales activités enzymatiques impliquées dans cette voie métabolique ; les amidon-synthases, les phosphorylases, les activités de débranchement. Dans ce projet, j'ai participé à la caractérisation des activités enzymatiques et en particulier l'activité débranchement de type isoamylasique.

### **Etude du métabolisme de l'amidon chez deux cyanobactéries diazotrophes.**

Les cyanobactéries, autrefois appelées algues bleues, se distinguent des autres bactéries photosynthétiques, les bactéries pourpres, par l'utilisation de molécules d'eau comme accepteur d'électrons au cours de la photosynthèse libérant ainsi de l'oxygène. Les cyanobactéries sont largement représentées à la surface du globe terrestre. Elles occupent des biotopes très divers ; de l'Antarctique au désert du Sahara mais surtout les océans où elles constituent une biomasse importante et semblent jouer un rôle important dans la fixation du dioxyde de carbone.

Parmi les cyanobactéries, il existe un petit groupe de cyanobactéries (70 espèces) qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique. La réduction de l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) en ammonium s'effectue à l'aide d'une enzyme extrêmement sensible à l'oxygène ; la nitrogénase<sup>5</sup>. Le niveau de résistance de la nitrogénase à l'oxygène détermine les niches écologiques des cyanobactéries diazotrophes.

Jusqu'à ce que dans les années 60, la communauté scientifique pensait que les cyanobactéries filamenteuses par la présence de cellules spécialisées (hétérocystes) pour protéger la nitrogénase étaient les seules capables de fixer l'azote. Toutefois, la description d'une nouvelle cyanobactérie unicellulaire, *Gloeocapsa*, capable de fixer l'azote atmosphérique mettait en défaut ce paradigme. La recherche systématique d'une activité nitrogénase parmi

---

<sup>5</sup> L'origine de la nitrogénase semble très ancienne. Les analyses phylogénétiques suggèrent que les gènes codant les différentes sous-unités de la nitrogénase dérivent d'un gène ancestral commun qui soit apparu avant même la présence d'oxygène dans l'atmosphère terrestre il y a 2,4 et 2,2 milliards d'années. La nitrogénase apparaît hautement conservée parmi les bactéries aux archéobactéries mais n'est pas présente dans aucun des génomes eucaryotes.

les cyanobactéries unicellulaires montra ensuite que plusieurs espèces étaient concernées dont la souche cyanothèce ATCC51142 isolée par Louis Sherman.

### **Cyanothèce ATCC51142 et la souche CLg1**

Les premiers articles portant sur la souche Cyanothèce indiquaient la présence de granules de glycogène anormaux insolubles formés uniquement de glucoses liés en alpha-1,4 et en alpha-1,6.

J'ai donc entrepris la caractérisation des granules synthétisés par les deux cyanobactéries Cyanothèce ATCC51142 et CLg1. Les résultats montraient clairement que le poids moléculaire et la distribution en longueur de chaîne sont comparables à l'amylopectine de plante et non au glycogène. De plus la chromatographie de gel filtration (CL2-B) mettait en évidence une fraction amylosique dans les granules de la souche CLg1. Le séquençage N-terminal et l'analyse en spectrométrie de masse d'un polypeptide de 57 kD liée aux granules de CLg1 nous ont permis d'identifier une protéine homologue chez la cyanobactérie diazotrophe *Crocospaera watsonii*. Son génome complètement séquencé révèle l'existence d'un gène codant une protéine qui présente 50% d'identité avec les GBSS de plantes. Des expériences d'incorporation avec de l'ADP-glucose marqué au <sup>14</sup>C à partir de granules purifiées de CLg1 montra la synthèse processive de longs glucanes qui est caractéristique des activités GBSS.

### **Contribution à la caractérisation structurale d'amidons provenant d'algues rouges.**

Ce projet mené par le groupe de Nakamura concernait la caractérisation structurale d'amidons provenant de différentes souches d'algues rouges appartenant à la sous-classe des Bangiophycidae. Je me suis principalement intéressé à l'hétérogénéité des granules produits par *Porphyridium sordidum*. A l'aide de centrifugations différentielles, des populations de granules ont été purifiées en fonction de leurs vitesses de sédimentation. J'ai pu montrer à l'aide de chromatographies de gel filtration réalisées sur les granules, une corrélation entre la vitesse de sédimentation et la présence d'amylose. Les granules avec une vitesse de sédimentation élevée ne représentent que 6% de la quantité totale de polysaccharide (5 minutes de centrifugation à 2300 g) en comparaison avec les autres granules (55% : 30 minutes à 16000g). Par ailleurs, ces derniers ne résistent pas aux étapes de séchage nécessaire à l'observation en MEB. L'ensemble des données ont mis en avant une hétérogénéité structurale importante dans les granules synthétisés au sein des porphyridiales.

Les travaux mentionnés, ci-dessus, sont retrouvés en annexe.

## **Projet de recherche : La synthèse des polysaccharides de réserves cristallins chez les cyanobactéries diazotrophes et les chromalvéolés.**

---

### **Avant-propos :**

#### **Les cyanobactéries diazotrophes**

Chez les plantes et les algues vertes, la caractérisation de mutants affectés dans l'activité débranchante de type isoamylase a permis de proposer, en 1996, le modèle d'épissage des glucannes. Ce modèle rend compte de la présence de phytoglycogène et de l'enrichissement en courtes chaînes de l'amylopectine (Mouille et al., 1996).

Dans le monde procaryote, une seule activité débranchante de type isoamylase est codée par le gène *glgX*. La caractérisation de mutants, chez *E.coli* (Dauvillée et al., 2005) et chez la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* (Suzuki et al., 2007), montre clairement une défectuosité dans le catabolisme du glycogène. Les deux souches mutantes accumulent un polysaccharide résiduel enrichi en courtes chaînes qui ne peut pas être dégradé par la glycogène phosphorylase (GlgP), celle-ci étant bloquée par les points de branchement.

Plus récemment, la caractérisation de nouveaux polysaccharides cristallins, produits par des cyanobactéries diazotrophes, nous amène à nous interroger sur la fonction de cette activité dans cette voie métabolique. Comme *E.coli* et *S.elongatus*, les cyanobactéries diazotrophes, ne possèdent qu'un seul gène codant pour une activité débranchante de type isoamylase. Une caractérisation sommaire des activités débranchantes semble indiquer que leurs spécificités sont plus ou moins comparables à celles d'*E.coli* et des isoamylases de plantes. Elles sont capables d'hydrolyser efficacement l'amylopectine, la beta-limite dextrine d'amylopectine mais pas le glycogène. On peut toutefois noter la capacité des activités débranchantes issues des souches CLg1 et *Synechocystis* PCC7919 d'agir sur le pullulan (figure1A). Une analyse phylogénétique montre que ces activités restent proches des isoamylases et non des pullulanases (Figure 2). La présence de granules de réserve n'est pas corrélée avec l'activité pullulanase portée par la protéine GlgX puisque les souches CLg1 et *Synechocystis* PCC7919 synthétisent, respectivement des granules insolubles et du glycogène. Cette étude préliminaire nous révèle que d'autres activités telles que les enzymes de branchement, l'amidon synthétase ou de la coopération entre ces deux types d'activités pourraient être responsables de l'élaboration de la structure en grappe de l'amylopectine.

#### **Les chromalvéolés :**

L'étude du métabolisme de l'amidon chez le parasite *Toxoplasma gondii* révèle certains aspects intéressants qui pourrait également souligner la présence d'une voie alternative pour la formation des grappes d'amylopectine. Le génome de cet apicomplexe, qui accumule l'amylopectine comme polysaccharide de réserve, code pour une amidon synthétase, trois activités de branchement et une activité débranchante phylogénétiquement, proche des activités de débranchement indirectes (GDE). Les GDE possèdent deux domaines catalytiques bien distincts : un domaine pour l'activité alpha-1,4 glucanotransférase et un autre domaine pour l'activité amylo-1,6 glucosidase. Contrairement aux isoamylases bactériennes et végétales, la réaction catalysée par cette activité s'effectue en deux étapes : (i) clivage d'une liaison alpha-1,4 et transfert d'un groupe maltotriosyl sur l'extrémité non réductrice de la chaîne adjacente (ii) libération du résidu de glucose branché par l'activité amylo-1,6 glucosidase. Le bilan de la réaction est la libération d'une molécule de glucose (Figure 1B). Comme dans les

mutants *glgX* procaryotes, une déficience dans cette activité enzymatique entraîne une accumulation d'un polysaccharide correspondant à une phosphorylase limite dextrine (maladie de Cori chez l'homme).

Les deux activités débranchantes de type directe (isoamylase) et de type indirecte (GDE) agissent toutes les deux du glycogène dont les chaînes externes ont été préalablement hydrolysées par la phosphorylase.

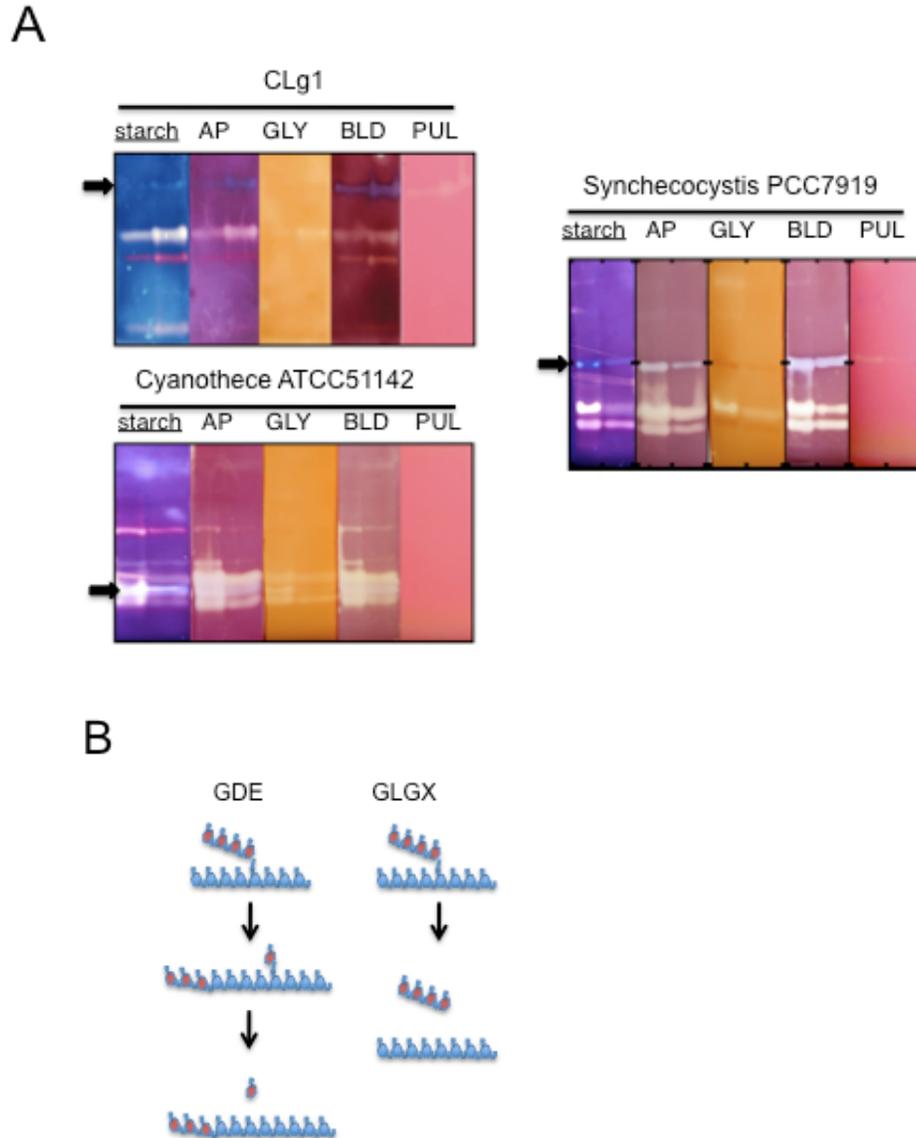


Figure 1 : **(A)** Caractérisation sommaire des activités *GlgX* (flèche noire) vis-à-vis de différents polysaccharides AP (amylopectine) ; GLY (glycogène de foie de lapin) ; BLD (Beta-Limite Dextrine), PUL (Red pullulan) issues de souches de cyanobactérie qui synthétisent des granules de réserve (CLg1 et Cyanothèce ATCC51142) et du glycogène (*Synechocystis* PCC7919). **(B)** Comparaison des différentes étapes de débranchement entre une GDE (Glycogène Débranching Enzyme) et une activité *GlgX*.

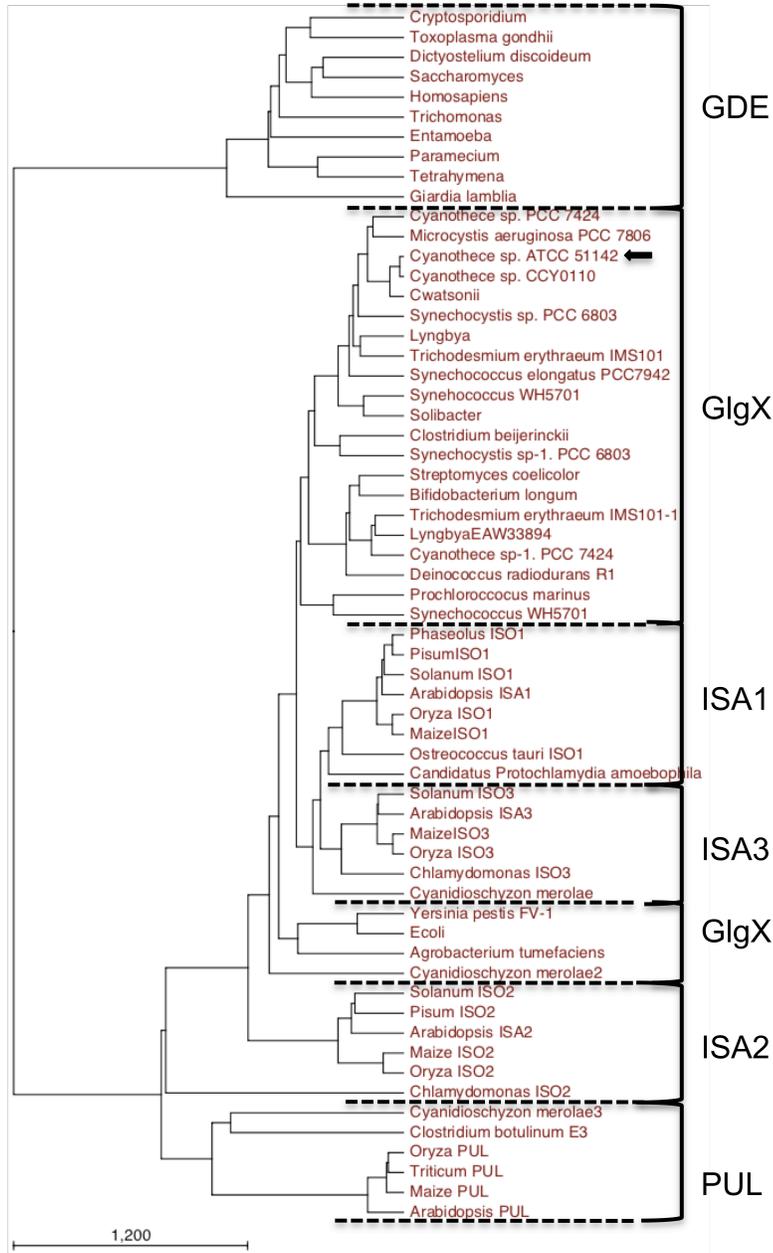


Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur des séquences polypeptidiques des activités débranchantes rencontrées chez les cyanobactéries, les plantes et les bactéries. Les flèches noires pointent les deux souches Cyanothèce ATCC51142 et Crocosphaera watsonii qui accumulent des granules de réserve. Crocosphaera watsonii est phylogénétiquement proche de la souche CLg1 selon l'ARN16S. Les séquences polypeptidiques ont été alignées à l'aide du programme CLUSTALW. Les gaps ont été retirés manuellement à l'aide du programme CLC sequence viewer 4.6. L'arbre phylogénétique a été établi par la méthode du Neighbor-joining (1000 réplifications).

*Toxoplasma gondii* appartient aux chromalvéolés qui regroupent des organismes photosynthétiques et non-photosynthétiques (perte du plaste ou réduction du plaste). Selon l'hypothèse actuelle, appelée « la théorie des chromalvéolés » ces organismes seraient issus

d'une endosymbiose secondaire entre une algue rouge et une cellule eucaryote. Néanmoins, l'origine monophylétique n'est pas encore validée.

Parmi les chromalvéolés, d'autres organismes synthétisent de l'amylopectine ou de l'amidon.

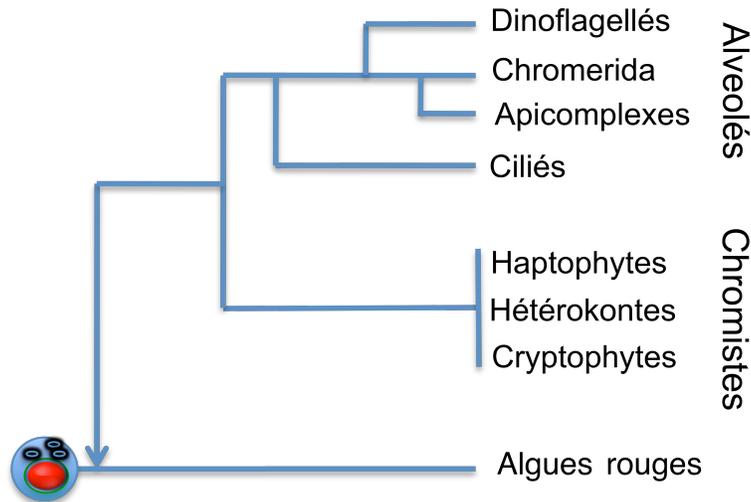


Figure 3 : Représentation simplifiée de l'apparition des chromalvéolés il y a 500-600 millions d'années. Ces organismes seraient issus d'une endosymbiose secondaire entre une algue rouge et une cellule eucaryote. Cependant l'origine monophylétique (théorie des chromalvéolés) reste à prouver.

**Les dinoflagellés** regroupent des algues pour la plupart non-photosynthétiques tel que *Cryptothecodinium cohnii*. Les granules de *Cryptothecodinium cohnii* contiennent de l'amylopectine et de l'amylose. La présence d'amylose est corrélée à la présence d'une activité GBSS liée aux grains d'amidon (Deschamps et al., 2008).

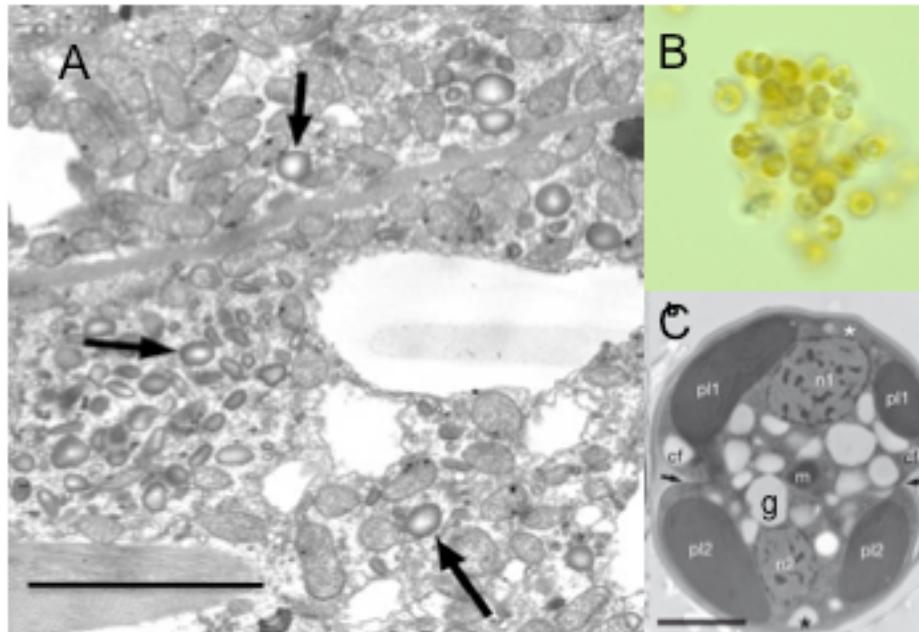
**Les chromerides** ne contiennent pour l'instant qu'un représentant *Chromera velia* (figure 4B). Cet organisme photosynthétique (présence de chlorophylle a) a été isolé en 2001 sur des coraux. L'analyse phylogénétique suggère que cet organisme soit à la base de l'embranchement des apicomplexes. Les observations au MET suggère la présence de granules de réserve probablement constitués d'amylopectine (figure 4C).

**Les apicomplexes** regroupent des organismes parasites qui ont un plaste réduit non photosynthétique (apicoplaste) comme *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* et *Plasmodium falciparum* et des organismes qui ont complètement perdu leur plaste comme *Cryptosporidium*, *Gregarines*. Seul *P.falciparum* ne synthétise pas de l'amylopectine comme polysaccharide de réserve.

**Les ciliés** ne possèdent pas de plaste. Sur les 7000 protozoaires référencés, deux génomes sont séquencés *Tetrahymena thermophila* et *Paramecium tetraurelia*. Le glycogène et le paraglycogène sont les deux polysaccharides de réserve rencontrés chez les ciliés. Le paraglycogène (nom donné par les protozoologistes) représente des granules dont la structure se rapproche des grains d'amylopectine. Il n'est pas évident de connaître la répartition du paraglycogène parmi les 7000 espèces. Quelques protozoaires ont été décrits comme *Spirostomum ambigum*, *Chattonidium setense*, *Peritromus kahli* et *Homalozoon vericulaire* pour accumuler du paraglycogène (figure 3). L'origine des ciliés reste encore aujourd'hui un sujet à discussion. En effet, l'absence de gènes plastidiaux dans les deux génomes de Paramécium et de Tétrahyména ne permet pas de conclure définitivement sur une origine commune avec les dinoflagellés et les apicomplexes. Il n'en reste pas moins que pour

beaucoup d'auteurs, la présence d'alvéoles, la structure des cils et d'autres détails moléculaires rapprochent les ciliés de l'embranchement des dinoflagellés et des apicomplexes.

Les **chromistes** regroupent les haptophytes, les hétérokontes (diatomées) et les cryptophytes. Seuls les Cryptophytes contiennent des organismes qui accumulent de l'amidon comme *Guillardia thêta* (Deschamps et al. 2006).



**Figure 4 :** (A), Observation au microscope électronique de transmission (MET) du protozoaire *Chattodinium setense* (barre= 0.5  $\mu$ M) d'après Modeo et al., 2006. Les flèches noires pointent les granules de paraglycogène. B et C : Observations au microscope optique de la pigmentation (chlorophylle a) de *Chromera velia* (B) et au MET d'une cellule en cours de division (sites constrictions pointés par les flèches ; cf) (C). Les plastes (pl1, pl2), les noyaux (n1, n2) et la mitochondrie (m) Les granules de réserve (g) sont visibles (barre = 2  $\mu$ M) Moore et al., 2008.

D'après cet examen non-exhaustif, on peut constater qu'il existe parmi les chromalvéolés, de nombreux organismes capables de synthétiser des polysaccharides de réserves cristallins formés soit d'amylopectine et d'amylose (*Cryptecodinium cohnii*, *Guillardia thêta*) soit uniquement d'amylopectine (*Toxoplasma gondii*). Les seules données complètes sur le plan structural et moléculaire viennent du parasite *T.gondii* qui est responsable de la toxoplasmose (Coppin et al., 2005). Pour les autres organismes, nous avons des informations fragmentaires qui concernent la caractérisation du polysaccharide de réserve ou/et la caractérisation de quelques enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse. Par contre, aucune caractérisation biochimique de l'activité débranchante n'a été rapportée. Il n'est pas possible de confirmer la présence de complexes basés sur une seule activité débranchante de type GDE chez les chromalvéolés.

Les cyanobactéries diazotrophes et les chromalvéolés nous offrent deux exemples possibles pour lesquels la synthèse de l'amylopectine ne pourrait pas nécessairement reposer

sur l'activité débranchante de type isoamylase c'est-à-dire selon le modèle d'épissage des glucanes.

Le projet de recherche que je propose porte sur la caractérisation biochimique des activités débranchantes et de branchement ainsi qu'une approche fonctionnelle sur des organismes modèles, afin de valider ou non cette hypothèse.

### **Projet 1 : Etude du métabolisme de l'amidon chez la souche CLg1.**

Nous avons isolé dans le passé avec *Chlamydomonas* et plus récemment avec *Crythecodinium cohnii* des mutants affectés dans la synthèse ou dans la structure de l'amylopectine. Cette approche fonctionnelle est uniquement possible grâce aux propriétés d'interaction de l'amidon avec l'iode. Ainsi les plages cellulaires se colorent différemment en fonction de la nature du polysaccharide synthétisé. Ce type d'approche est également envisageable avec la souche CLg1. Les plages cellulaires d'une souche sauvage, CLg1 donnent une coloration noire qui est caractéristique de la présence d'amylopectine et d'amylose (figure ci-dessous). Nous espérons isoler, après mutagenèse UV, des mutants qui soient qualitativement ou quantitativement affectés dans la synthèse d'amidon. Une approche plus ciblée, c'est-à-dire par interruption génique, n'est pas pour l'instant envisageable (problèmes de transformation).



Plages cellulaires vaporisées aux vapeurs d'iode. Les cellules ont été incubées en cycle jour-nuit. Après 15 jours d'incubation sur un milieu ASNIII gélosé, les plages cellulaires sont mises en présence de vapeurs d'iode.

Il est difficile de prévoir le phénotype attendu d'une souche dépourvue d'isoamylase. Si l'activité isoamylasique joue un rôle dans la synthèse des grappes d'amylopectine, on peut alors s'attendre à un phénotype jaune-orangé qui témoignera de la présence de glycogène dans la cellule. Par contre, si son rôle est cantonné à la dégradation de l'amidon, aucune différence phénotypique ne sera observée entre la souche sauvage et la souche mutante en condition de synthèse le jour. La défektivité enzymatique chez les mutants sera identifiée grâce aux zymogrammes après criblage phénotypique. Le gène correspondant sera cloné et séquencé afin de déterminer l'origine de la mutation.

### **Projet 2 : Synthèse *in vivo* et *in vitro* d'amylopectine.**

Les tentatives de synthèse *in vivo* d'amylopectine n'ont pas été jusqu'ici concluantes. Plusieurs explications peuvent rendre compte de ces échecs. Nous savons, aujourd'hui, que les enzymes du métabolisme l'amidon interagissent entre elle pour former des complexes (Hennen-Bierwagen et al., 2008) dont la formation dépend de l'état de phosphorylation de certaines protéines (Tetlow et al., 2004). L'absence de complexe et l'action désordonnée des activités enzymatiques ont abouti généralement à la formation d'une structure proche du glycogène que celle de l'amidon.

Le nombre de gènes impliqués dans la synthèse de polysaccharide cristallin est très restreint chez *Cyanothèce ATCC51142* et *Crocospaera watsonii* en comparaison avec ce qui est observé chez les plantes (voir tableau).

Il est donc tout à fait envisageable de remplacer par recombinaisons homologues les gènes endogènes d'une cyanobactérie synthétisant du glycogène par ceux de *Cyanothèce ATCC51142*. Les protocoles de transformation et les vecteurs plasmidiques sont bien décrits dans la littérature pour les souches *Synechococcus PCC7942* et *Synechocystis PCC6803*.

	polysaccharide	ISO	BE	SS
<i>Crocospaera watsonii</i>	amidon ?	1	2+1 <sup>§</sup>	2*
<i>CLg1</i>	amidon	1	2+1	2*
<i>Cyanothèce ATCC51142</i>	amylopectine	1	2+1	1
<i>Cyanobactérium MBIC</i>	amylopectine	1	2+1	1
<i>SynechocystisPCC6803</i>	glycogène	1	1+1	1
<i>SynechococcusPCC7942</i>	glycogène	1	1+1	1
<i>CyanothècePCC7424</i>	glycogène	1	2+1	1
<i>E.coli</i>	glycogène	1	1	1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	amidon	3	2	6

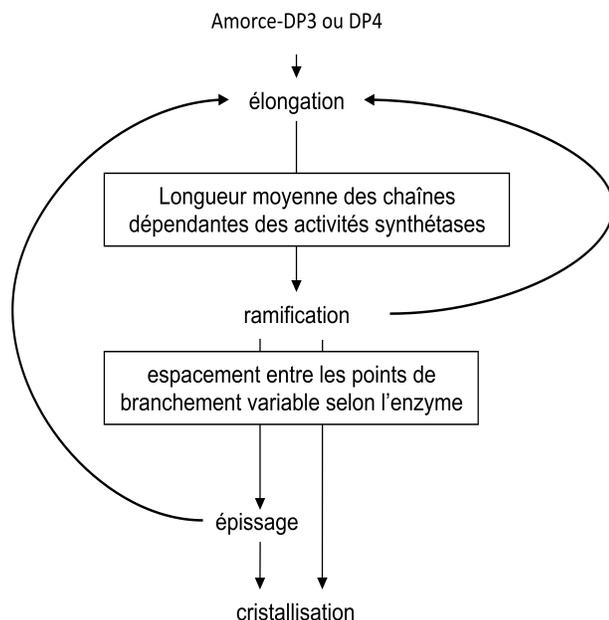
ISO (isoamylase) ; BE( enzyme de branchement) ; SS (starch synthase).(\*) *Clg1* et *Crocospaera watsonii* codent une deuxième activité synthétase qui est phylogénétiquement proche des GBSS de plantes. (°) une autre activité de branchement appartenant à la famille GH57 est présente chez les cyanobactéries.

On peut raisonnablement envisager d'exprimer l'activité débranchante de *Cyanothèce ATCC51142* et ainsi que les activités de branchement. Une analyse structurale sera entreprise sur les transformants et, si nécessaire, une observation en MET confirmera la présence *in vivo* de granules. Les problèmes ou non liés au catabolisme de ces granules cristallins pourront également être abordés. En effet, on trouve une alpha-amylase putative de 110 kD qui est présente uniquement chez ces cyanobactéries diazotrophes.

Ces expériences de synthèse *in vivo* entraîne nécessairement le clonage de ces gènes. Parallèlement, une caractérisation des différentes activités enzymatiques sera donc réalisée ainsi qu'une tentative de synthèse *in vitro* d'amylopectine réalisée à l'aide de ces enzymes. Les synthèses *in vitro* effectuées à ce jour, aboutissent à la formation de granules cristallins appelés sphérulites qui sont obtenus soit par des cycles de refroidissement-chauffage d'une solution d'amylose soit par synthèse enzymatique de longues chaînes de glucose à partir des extrémités non-réductrices du glycogène. Dans les deux expériences, c'est l'organisation des longues chaînes de glucose qui détermine la cristallinité des sphérulites.

Afin d'introduire des points de branchement et d'éviter la présence concomitante des activités d'élongation et de branchement, la synthèse des chaînes de glucose s'effectuera à partir d'oligosaccharides gréffés sur des billes de sépharose. Il sera ainsi facile de contrôler les différentes étapes.

Si les enzymes de branchement sont responsables de la formation des grappes d'amylopectine, après plusieurs cycles de synthèse et de ramification, la présence de structures cristallines pourra être appréciée à l'aide d'un microscopie à lumière polarisée.



La longueur moyenne des chaînes de glucose synthétisées par une amidon synthétase et la spécificité des enzymes de branchement pourront être déterminées par l'analyse après débranchement de la distribution en longueur de chaînes.

### **Projet 3 : Caractérisation biochimique des activités de débranchement chez le cilié *Spirostomum ambiguum* et le dinoflagellé *Cryptothecodinium cohnii*.**

Ce projet se bornera uniquement à la caractérisation structurale et biochimique du métabolisme du paraglycogène chez *Spirostomum ambiguum* et de la caractérisation de l'activité de débranchement de *Cryptothecodinium cohnii*.

#### **La caractérisation structurale du paraglycogène de *Spirostomum ambiguum* et de l'activité débranchante.**

Contrairement aux ciliés *Tétrahyména* et *Paramécium* qui synthétisent du glycogène, les ciliés qui accumulent du paraglycogène sont soit des ciliés anaérobies vivants dans le rumen des ruminants soit des ciliés aérobies mais très difficiles à cultiver. Néanmoins, *Spirostomum ambiguum*, bien qu'exigeant sur la qualité de l'eau, est cultivé sans trop de difficultés au laboratoire. *Spirostomum ambiguum* est un grand cilié puisque sa taille est comprise entre 1 et 2 mm. Ce projet s'effectue en collaboration avec le professeur de Grezgorz du département de l'environnement de l'Université médicale de Warsaw (Pologne). Des études préliminaires sont en cours concernant les conditions optimales pour l'accumulation de paraglycogène et la préparation des extraits protéiques. Toutes les activités enzymatiques, et en particulier la ou les activités de débranchement, seront caractérisées sur le plan biochimique afin de déterminer la nature directe ou indirecte de la réaction de clivage.

Dans la mesure où les conditions de culture auront été définies. La caractérisation structurale du paraglycogène par FACE, GPC, RX et l'identification des protéines liées aux paraglycogènes seront entreprises. Nous rechercherons aussi la présence de GWD (Glucan Water Dikinase) dont l'origine phylogénique reste pour une large part énigmatique. Lors de l'étude du paraglycogène de *Toxoplasma gondii*, nous avons démontré que celui-ci est semi-cristallin et de structure proche de l'amylopectine (Coppin et al., 2005). De plus, le génome de cet apicomplexe contient le gène codant la GWD. Les très faibles quantités de granules

n'avaient pas permis de valider expérimentalement la présence de cette GWD dans les granules.

La présence du paraglycogène chez les ciliés revêt à un intérêt particulier. En effet, si ceux-ci n'ont pas subi l'endosymbiose secondaire (absence de gènes plastidiaux), les ciliés définiraient le premier groupe eucaryote accumulant des polymères semi-cristallins type amidon qui ne descendraient pas directement ou indirectement des plantes.

### **La caractérisation de l'activité de débranchement de *Crypthecodinium cohnii*.**

Cette algue est déjà cultivée dans notre laboratoire. Les conditions de cultures sont maîtrisées de même que son cycle de vie. L'activité débranchante sera suffisamment purifiée pour être dépourvue des activités hydrolytiques. L'enzyme purifiée sera caractérisée en l'incubant avec différents polysaccharides (glycogène, phosphorylase-limite dextrine, amylopectine, beta-limite dextrine). Au cours de l'incubation, l'augmentation du pouvoir réducteur sera suivi ainsi que les produits de débranchement. La spécificité de débranchement sera comparée avec celles issues de la levure, d'*E.coli* et de plantes. Dans le cas d'une activité de débranchement indirecte, seul le glucose sera produit au cours de l'incubation avec de la phosphorylase limite dextrine.

Parallèlement à la caractérisation biochimique de l'activité débranchante, la banque de mutants obtenue par Phillippe Deschamps au cours de sa thèse, sera criblée à l'aide d'un zymogramme spécifique pour visualiser cette activité.

### **Références bibliographiques :**

Coppin A, Varre JS, Lienard L, *et al.* Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J Mol Evol* 2005 ; 60: 257-67

Dauvillée D, Kinderf IS, Li Z, Kosar-Hashemi B, Samuel MS, *et al.* Role of the Escherichia coli glgX gene in glycogen metabolism. *J Bacteriol.* 2005 ;187: 1465–1473.

Deschamps P, Guillebeault D, Devassine J, Dauvillée D, Haebel S, Steup M, Buléon A, Putaux JL, Slomianny MC, Colleoni C, Devin A, Plancke C, Tomavo S, Derelle E, Moreau H, Ball S. The heterotrophic dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii* defines a model genetic system to investigate cytoplasmic starch synthesis. *Eukaryot Cell.* 2008 ;5:872-80.

Deschamps P, Haferkamp I, Dauvillée D, Haebel S, Steup M, Buleon A, Putaux JL, Colleoni C, d'Hulst C, Plancke C, Goud S, Maier U, Neuhaus HE, Ball S.G. Nature of the periplastidial pathway of starch synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Eukaryot Cell.* 2006 ; 6 : 954-63

Modeo L., Rosati G., Andreoli I. *et al.* Molecular systematics and ultrastructural characterization of a forgotten species : *Chattodinium setense* (Ciliophora, heterotrichae). *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 2006 ; 82 : 359-374

Moore RB, Obornik M *et al.* A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 2008 ; 451 : 959-963

Mouille G., Maddelein ML, Libessart N, *et al.* Preamylopectin Processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* 1996 ; 8: 1353-66.

Suzuki E., Umeda K, Nihei S. *al.*, Role of the GlgX protein in glycogen metabolism of the

Colleoni Christophe HDR 2008: Université de Lille

cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *BBA* 2007 ; 1770 : 763-773

Tetlow IJ., Wait R., Lu Z. et al., Protein Phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell*. 16 ; 694-708