

N° d'ordre: 679

68 366

50376  
1991  
74

50376  
1991  
74

# THESE

présentée à

**l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois**

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE FLANDRES ARTOIS**

**Spécialité: Sciences de la Vie et de la Santé**

par

**Corinne VIGNERON-LESENS**



**L'ENZYME DE BRANCHEMENT DU  
GLYCOGENE DE LEVURE DE BOULANGERIE**

Présentée devant la commission d'examen  
le 17 Janvier 1991

Président: J. MONTREUIL  
Rapporteur: J.L. SOUCIET  
Rapporteur: F. MESSENGUY  
Rapporteur: J. KREMBEL  
Examineur: J. GUILLAUME  
Examineur: S. BALL

*Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur S.G. BALL au sein du Laboratoire de Chimie Biologique, dirigé par Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Mixte du C.N.R.S. n°111 : Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires).*

Au moment d'achever cette thèse, je suis heureuse d'exprimer ma gratitude à tous les membres de l'Unité Mixte du C.N.R.S. n°111 qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements s'adressent particulièrement au Professeur J. Montreuil qui, depuis 7 années, m'a prodigué le goût et la passion d'étudier la Biochimie et, maintenant, l'envie de relever le défi d'enseigner cette matière.

Je remercie le Professeur S. Ball qui m'a dirigée avec un intérêt bienveillant lors de cette thèse et qui m'a communiqué son sens de la rigueur scientifique.

Je remercie très sincèrement le Professeur J. Krembel qui m'a conseillée et encouragée aussi bien dans mon travail de recherche que d'enseignement.

Je remercie le Professeur J. Guillaume qui m'a beaucoup aidée dans le choix de ma formation.

Je remercie le Professeur J.L. Souciet pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie le Docteur F. Messenguy pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je tiens à remercier spécialement T. Marianne-Pépin qui m'a judicieusement conseillée lors de l'étude biochimique de l'enzyme de branchement.

Un très grand merci à M. Benaïssa et à A. Pierce qui m'ont journalièrement aidées grâce à leur solide expérience en Biologie Moléculaire et leur naturel dévouement.

Je remercie très vivement P.M. Jacquinot qui n'a pas compté les heures de travail afin d'achever avec moi techniquement cette thèse.

Finalement, j'aimerais remercier J. Celen pour la réalisation des photographies et la reproduction de ce travail.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un contrat d'allocataire de recherche du Ministère de la Recherche et de la Technologie.

Ce travail a fait l'objet de plusieurs communications et publication:

**Communications par affiche:**

- L'enzyme de branchement du glycogène de *Saccharomyces cerevisiae*, dosage et activation.

C. VIGNERON-LESENS, K. TATCHELL, J. MONTREUIL et S. BALL.

*XVIème Forum des Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Biologique.* Sophia Antipolis, Nice, du 2 au 6 Juillet 1989.

- Etude génétique de l'enzyme de branchement du glycogène de la levure de boulangerie.

C. VIGNERON-LESENS, K. TATCHELL, J. MONTREUIL et S. BALL.

*XVIIème Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire.* Lille, du 3 au 6 Juillet 1990.

**Communication orale:**

Etude biochimique et génétique de l'enzyme de branchement du glycogène de la levure de boulangerie.

C. VIGNERON-LESENS, K. TATCHELL, J. MONTREUIL et S. BALL.

*XIIIèmes Journées de la Chimie et de la Biochimie des Glucides.* Avignon, du 21 au 23 Mai 1990.

**Publication:**

Coordinate control of glycogen metabolism enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: induction of glycogen branching enzyme synthesis.

C. VIGNERON-LESENS, T. MARIANNE-PEPIN, K. TATCHELL, J. MONTREUIL and S. BALL.

*The Biochemical Journal* (1990), soumis pour publication.

TABLE DES MATIERES

	Pages
<b>INTRODUCTION.....</b>	13
<b>GENERALITES.....</b>	15
<b>I. <u>Présentation de l'enzyme de branchement</u>.....</b>	15
1) <u>L'activité de branchement</u> .....	15
2) <u>Amidon et glycogène</u> .....	15
3) <u>Dosage de l'activité de branchement</u> .....	22
<b>II. <u>Etude de l'enzyme de branchement chez</u></b>	
<b><u>différents organismes</u>.....</b>	24
1) <u>L'enzyme de branchement chez les bactéries</u> .....	25
2) <u>L'enzyme de branchement chez les algues bleues</u> .....	31
3) <u>L'enzyme de branchement chez les plantes</u> .....	32
a) L'enzyme de branchement du maïs.....	34
b) L'enzyme de branchement de pomme	
de terre, <i>Solanum tuberosum</i> .....	39
c) L'enzyme de branchement du pois,	
<i>Pisum sativum l.</i> .....	43
d) L'enzyme de branchement d'autres plantes.....	45
4) <u>L'enzyme de branchement chez les animaux</u> .....	45
a) Mécanisme d'action de l'enzyme	
de branchement.....	48
b) L'enzyme de branchement du	
glycogène du muscle.....	49
c) L'enzyme de branchement du glycogène	
d'autres tissus animaux.....	53
d) L'enzyme de branchement du	
glycogène du foie.....	53
e) La glycogénose de type IV.....	58
<b>III. <u>Hypothèses de travail</u>.....</b>	59
1) <u>Présentation et situation du sujet</u> .....	59
2) <u>Buts et intérêts du travail</u> .....	63
a) Etude biochimique de l'enzyme	
de branchement de la levure.....	63
b) Etude génétique de l'enzyme	
de branchement de la levure.....	63

	Pages
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>65</b>
<b>I. <u>Matériel</u>.....</b>	<b>65</b>
1) <u>Présentation des souches utilisées</u> .....	65
a) Les souches bactériennes utilisées.....	65
b) Les souches de levure utilisées.....	65
2) <u>Présentation des vecteurs utilisés</u> .....	66
a) YEp13.....	66
b) YEp24.....	66
c) YCp50.....	68
d) M13 mp18 et M13 mp19.....	68
<b>II. <u>Méthodes</u>.....</b>	<b>70</b>
1) <u>Les milieux de culture</u> .....	70
a) Les milieux de culture pour les bactéries.....	70
b) Les milieux de culture pour les levures.....	72
2) <u>Conservation des souches</u> .....	74
a) Conservation des souches bactériennes.....	74
b) Conservation des souches de levures.....	74
3) <u>Dosage enzymatique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u> .....	74
a) Préparation d'extraits enzymatiques.....	74
b) Préparation d'extraits enzymatiques à partir de la souche mutante <i>cdc 35</i> .....	75
c) Dosage de l'enzyme de branchement du glycogène.....	75
d) Dosage de la glycogène synthétase de levure.....	76
e) Dosage de la glycogène phosphorylase de levure.....	76
f) Dosage des protéines totales.....	77
g) Dosage du glycogène.....	77
h) Spectroscopie d'absorption du polysaccharide branché synthétisé <i>in vitro</i> .....	78
4) <u>Purification de l'enzyme de branchement         du glycogène de levure</u> .....	78

5) <u>Caractérisation biochimique de l'enzyme</u>	
<u>de branchement de levure.....</u>	79
a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide	
en présence de SDS.....	79
b) Electrophorèse en gel avec gradient 8-25%	
en polyacrylamide en présence de SDS,	
selon le système "Phast".....	80
c) Isoélectrofocalisation préparative.....	80
d) Isoélectrofocalisation avec révélation de	
l'activité de l'enzyme de branchement sur gel.....	81
e) Electrophorèse non dénaturante et	
révélation de l'activité de l'enzyme	
de branchement sur gel.....	82
6) <u>Clonage et sous-clonage du gène codant pour</u>	
<u>l'enzyme de branchement du glycogène de levure.....</u>	82
a) Transformation d' <i>Escherichia coli</i> par	
la méthode au chlorure de calcium.....	82
b) Transformation d' <i>Escherichia coli</i> par	
la méthode au chlorure de rubidium.....	84
c) Transformation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
par la méthode à l'acétate de lithium.....	85
d) Préparation et purification de l'ADN	
plasmidien par "lyse alcaline".....	86
e) Extraction de l'ADN total de	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	87
f) Ligation des ADN.....	88
g) Déphosphorylation d'un vecteur.....	88
h) Construction de la banque génomique de	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> dans le plasmide YCp50...	89
7) <u>Construction de la carte de restriction.....</u>	90
a) Restriction par des endonucléases spécifiques.....	90
b) Electrophorèse des ADN sur gel d'agarose.....	90
c) Transfert de l'ADN selon	
la méthode de Southern.....	91
d) Purification des fragments d'ADN.....	91
e) Fabrication d'une sonde selon	
la technique "multiprime".....	92

8) <u>Localisation chromosomique du gène étudié</u>	
<u>par électrophorèse en champs pulsés</u> .....	92
a) Préparation d'ADN chromosomique de levure.....	92
b) Electrophorèse en champs pulsés.....	93
c) Transfert d'ADN chromosomique.....	93
9) <u>Etude des ARN de levure</u> .....	95
a) Création d'un environnement dépourvu de ribonucléase.....	95
b) Extraction des ARN totaux de levure par billes de verre.....	95
c) Electrophorèse des ARN dans un gel en présence de formaldéhyde.....	96
d) Transfert des ARN: "Northern".....	97
10) <u>Séquence de l'ADN</u> .....	97
a) Clonage dans M13 mp18 et M13 mp19.....	97
b) Transfection d' <i>Escherichia coli</i> TGI.....	97
c) Préparation de l'ADN simple-brin.....	98
d) Réactions de séquence.....	99
e) Electrophorèse en gel d'acrylamide.....	100
11) <u>Microscopie électronique à balayage des levures</u> .....	102
<b>RESULTATS</b> .....	104
<b>I. <u>Induction de l'activité de branchement lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance en présence de glucose</u></b> .....	104
1) <u>Dosage de l'activité de l'enzyme de branchement</u> .....	104
2) <u>Spectre d'absorption du produit formé après action de l'enzyme de branchement</u> .....	106
3) <u>Expériences témoins du dosage de l'activité de l'enzyme de branchement du glycogène</u> .....	108
<b>II. <u>Purification partielle de l'enzyme de branchement de levure</u></b> .....	109

<b>III. <u>Caractérisation biochimique de l'enzyme</u></b>	
<b><u>de branchement du glycogène de levure</u></b> .....	109
1) <u>Estimation de la masse moléculaire de</u> <u>l'enzyme de branchement du glycogène de levure</u> .....	109
2) <u>Détermination du point isoélectrique de</u> <u>l'enzyme de branchement du glycogène de levure</u> .....	112
3) <u>Révélation de l'activité de branchement</u> <u>sur gel de polyacrylamide sans SDS</u> .....	114
4) <u>Electrophorèse de la forme de point isoélectrique</u> <u>égale à 5,7 de l'enzyme de branchement de levure</u> <u>selon la méthode Phast</u> .....	116
<b>IV. <u>Régulation post-traductionnelle de l'enzyme</u></b>	
<b><u>de branchement du glycogène de levure</u></b> .....	118
1) <u>Les activités de la glycogène synthétase et</u> <u>de l'enzyme de branchement au cours de la</u> <u>croissance sur milieu glucose</u> .....	118
a) La glycogène synthétase.....	118
b) L'enzyme de branchement du glycogène.....	120
2) <u>Effet du glucose sur les activités glycogène</u> <u>synthétase et enzyme de branchement</u> .....	122
a) Effet du glucose sur la synthèse de glycogène.....	122
b) Effet du glucose sur l'activité de l'enzyme de branchement du glycogène.....	124
<b>V. <u>Régulation transcriptionnelle de l'enzyme</u></b>	
<b><u>de branchement du glycogène de levure</u></b> .....	126
1) <u>Clonage et sous-clonage du gène codant pour</u> <u>l'enzyme de branchement du glycogène de levure</u> .....	127
a) Caractérisation du mutant <i>JM 19</i> .....	127
* Construction et caractéristiques génétiques de <i>JM 19</i> .....	127
* Observation en microscopie de la souche mutante <i>JM 19</i> et de la souche sauvage <i>JC 482</i> ....	131
b) Isolement de plasmides hybrides contenant le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.....	131
* Extraction de la banque génomique de levure.....	131
* Transformation de la souche <i>JM 19</i> avec la banque génomique de levure.....	135

c) Vérification de la sélection du transformant contenant le plasmide porteur du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène.....	136
d) Stabilité mitotique du transformant EB1.....	138
e) Localisation chromosomique par électrophorèse en champs pulsés du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.....	141
* Choix des sondes utilisées.....	141
* Localisation chromosomique des sondes n°1 et n°2.....	142
f) <u>Sous-clonage du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.....</u>	142
* Extraction et digestion du plasmide YEp24.....	144
* Extraction et digestion partielle du plasmide hybride YCp50 provenant du transformant EB1.....	145
* Constitution du mélange de ligation.....	146
* Transformation d' <i>E. coli</i> HB101 par le mélange de ligation.....	146
* Transformation de <i>JM 19</i> avec les plasmides hybrides YEp24.....	146
* Vérification de la taille du fragment des plasmides hybrides YEp24.....	146
g) <u>Carte de restriction des plasmides hybrides porteur du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène.....</u>	147
* Transformation de <i>JM 19</i> par le plasmide pAH20...	149
* Comparaison des cartes de restriction des trois plasmides: YCp-11, YEp-4 et pAH20.....	149
* Construction de la sonde EcoRI-HindIII de 0,5 kpb.....	149
* <i>GLC 3</i> est le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.....	152

h) <u>GLC 3 serait le gène de structure de l'enzyme de branchement du glycogène de levure</u> ....	152
* Vaporisation à l'iode des transformants.....	152
* Dosage de l'activité de l'enzyme de branchement des différentes souches .....	155
* Révélation de l'activité de l'enzyme de branchement sur gel de polyacrylamide des différentes souches.....	155
2) <u>Etude des ARN messagers de GLC 3 au cours de la croissance en milieu glucose</u> .....	158
<b>VI. <u>Séquence du gène GLC 3, codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure</u></b> .....	160
<b>DISCUSSION</b> .....	163
1) <u>La morphologie anormale de la souche mutante JM 19</u> .....	163
2) <u>L'enzyme de branchement de levure assurerait une synthèse séquentielle de polysaccharides</u> .....	163
3) <u>Caractérisaiton biochimique de l'enzyme de branchement du glycogène de levure</u> .....	165
a) Masse moléculaire de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.....	165
b) L'enzyme de branchement existe sous forme d'une famille d'isoenzymes.....	165
4) <u>Stabilité du plasmide centromérique YCp-11</u> .....	167
5) <u>Régulation du métabolisme du glycogène</u> .....	169
a) La glycogène synthétase.....	170
b) La glycogène phosphorylase.....	171
c) La phase de transition et la phase stationnaire...	171
d) Un mécanisme dépendant ou indépendant du taux d'AMPc.....	174
e) Action coordonnée des enzymes du métabolisme du glycogène.....	176
<b>CONCLUSION</b> .....	177
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	179

**ABREVIATIONS UTILISEES**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADPG** : Adénosine diphosphate glucose  
**AMP** : Adénosine monophosphate  
**AMPC** : Adénosine 3', 5' monophosphate cyclique  
**Ap** : Ampicilline  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNm** : Acide ribonucléique messenger  
**Asn** : Asparagine  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**CHEF** : "Contour clamped homogeneous electric fields"  
**CTP** : Cytidine triphosphate  
**Da** : Daltons  
**dATP** : Désoxyadénosine 5'-triphosphate  
**dCTP** : Désoxycytidine 5'-triphosphate  
**ddATP** : Didésoxyadénosine 5'-triphosphate  
**ddCTP** : Didésoxycytidine 5'-triphosphate  
**ddGTP** : Didésoxyguanosine 5'-triphosphate  
**ddNTP** : Didésoxynucléotide 5'-triphosphate  
**ddTTP** : Didésoxythymidine 5'-triphosphate  
**dGTP** : Désoxyguanosine 5'-triphosphate  
**dNTP** : Désoxynucléotide 5'-triphosphate  
**DO** : Densité optique  
**DTT** : Dithiothréitol  
**dTTP** : Désoxythymidine 5'-triphosphate  
**EDTA** : Acide éthylène diamine tétracétique  
**Gln** : Glutamine  
**GTP** : Guanosine triphosphate  
**HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique  
**IPTG** : Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
**kb** : Kilobases  
**Leu** : Leucine  
**MOPS** : Acide Morpholinopropanesulfonique  
**pb** : Paires de bases  
**PEG** : Polyéthylène glycol  
**PPI** : Pyrophosphate inorganique  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire  
**RNase** : Ribonucléase  
**SDS** : Sodium dodécylsulfate  
**Tc** : Tétracycline  
**TEMED** : N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine  
**TRIS** : Hydroxyméthylaminométhane  
**Trp** : Tryptophane  
**TTP** : Thymidine triphosphate  
**UDPG** : Uridine diphosphate glucose  
**Ura** : Uracile  
**Xgal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Alors que Gregor Mendel décrivait, en 1865 (1), dans son étude sur les lois de l'hérédité, la différence de forme de pois mûrs, *Pisum sativum*, Madan Bhattacharyya en 1990 (2) prouve que cette différence est causée par une insertion de type transposon dans un gène codant pour l'enzyme de branchement de l'amidon. Ainsi "trouver la substance des gènes, expliquer leur mode d'action, combler le vide entre le gène et le caractère, tels resteront les buts des généticiens"(F. Jacob).

Bien que la déficience de l'enzyme de branchement crée chez l'Homme une maladie héréditaire sévère, le glycogénose de type IV (3), cette enzyme était la moins étudiée de celle intervenant dans la biosynthèse des polysaccharides de réserve. Cependant, depuis 1986, l'enzyme de branchement est le sujet d'étude de plusieurs programmes aussi bien dans un but fondamental, que dans un but appliqué. En effet, le clonage des gènes codant pour l'enzyme de branchement chez différents micro-organismes a été proposé afin de produire suffisamment d'enzyme et de le caractériser (4). Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier "l'enzyme de branchement du glycogène de la levure de boulangerie" biochimiquement et génétiquement. Cette enzyme est capable d'utiliser également l'amidon comme substrat. Son potentiel est d'augmenter le degré de branchement des amidons et de ses composants, permettant alors la production d'ingrédients ayant une moindre tendance à la rétrogradation. Or la rétrogradation est d'une importance commerciale considérable, car elle est le principal responsable du rassissement du pain et de la déshydratation (synérèse) des sauces, des soupes en conserve (5). Ainsi, une farine traitée par l'enzyme de branchement de *Bacillus megaterium* donne un pain d'excellentes saveur et texture qui, de plus, sont maintenues longtemps (6). L'amidon gélatinisé (9005-25-8) traité par ce même enzyme puis fractionné en un amidon

élastique soluble dans l'eau (9005-84-9) est utilisé comme agent épaississant. Son addition aux cookies favorise leur croquant (7).

Actuellement, l'enzyme de branchement de la levure de boulangerie est à l'étude, car la levure est une source d'enzymes approuvée, la biomasse-levure, sous-produit de fermentations industrielles serait développée avec profit, afin de produire de nouveaux polysaccharides aux propriétés fonctionnelles intéressantes, en vue d'applications commerciales variées (8).

# **GENERALITES**

## GENERALITES

### I. Présentation de l'enzyme de branchement.

#### 1) L'activité de branchement.

Alors que l'amidon synthétase [ADP-D-glucose: (1,4)- $\alpha$ -D-glucane 4- $\alpha$ -glucosyltransférase, E.C.2.4.1.21] ou la glycogène synthétase [UDP-glucose: glycogène 4- $\alpha$ -glucosyltransférase, E.C.2.4.1.11] catalyse uniquement la synthèse des liaisons  $\alpha$ -1,4, l'enzyme de branchement [ $\alpha$ -1,4 glucane:  $\alpha$ -1,4 glucane 6-glucosyltransférase, E.C.2.4.1.18] forme les liaisons  $\alpha$ -1,6, faisant de l'amidon et du glycogène, des polymères ramifiés (Fig. 1). La liaison  $\alpha$ -1,6 est présente chez les 2 plus importants polysaccharides de réserve, l'amidon des plantes et le glycogène des bactéries, des mammifères et des levures. L'amidon est constitué d'amylose, polymère linéaire et d'amylopectine, polymère branché contenant 4% de liaisons  $\alpha$ -1,6. Le glycogène avec 8 à 10% de points de branchement présente une plus grande solubilité dans l'eau, que l'amidon. La flexibilité de la liaison  $\alpha$ -1,6 est essentielle pour obtenir des particules denses de polysaccharides et pour introduire des régions solubles (9). Une méthode de synthèse organique d'un trisaccharide O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1,4)-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl(1,6)]-D-glucopyranose représentant un point de branchement a été décrite afin de pouvoir étudier ultérieurement la structure tridimensionnelle de l'amylopectine et du glycogène (10).

#### 2) Amidon et glycogène.

15 à 30% de l'amidon est constitué par l'amylose, polymère linéaire de plus de 6000 unités glucose, reliées par des liaisons  $\alpha$ -1,4 (Fig. 2) (11, 12). Une très faible quantité de points de branchement serait présente dans la molécule d'amylose (13, 14). L'amylose branché

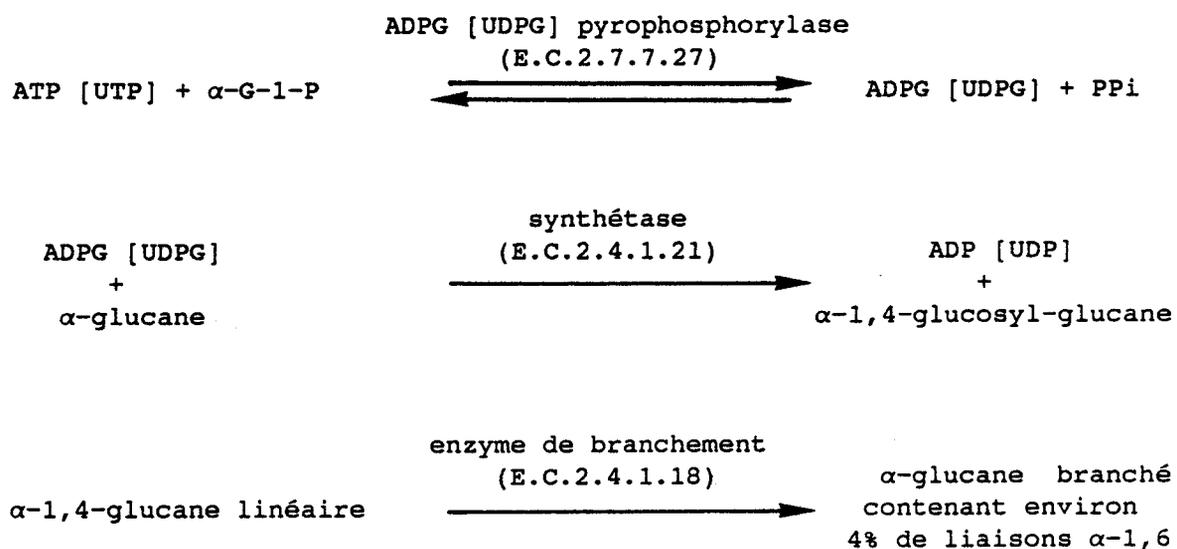


Fig. 1: Enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon ou du glycogène.

serait constitué de 3 à 20 chaînes d'une longueur de 500 résidus glucose (15, 16). Le degré de polymérisation dépend de la source d'amidon: il est de 1000 à 6000 unités glucose pour la pomme de terre et de 200 à 1200 pour le maïs. L'amylose forme des complexes essentiellement insolubles dans l'eau avec l'iode et certains composés organiques. En effet la molécule d'amylose forme une spire constituée de segments linéaires de structure hélicoïdale. Les segments sont construits de 2 à 20 tours et chacun d'entre eux contient 6 à 8 unités glucose anhydre (17, 18). Il est probable qu'entre les résidus glucose voisins se créent des ponts hydrogène (Fig. 3)(19).

Le rapport amylose/amylopectine dépend du type d'amidon. L'amylose est principalement responsable du processus de rétrogradation, car les chaînes d'amylose s'orientent parallèlement et forment entre elles des ponts hydrogène. A 100-160°C, les particules peuvent se redissoudre dans l'eau. Le meilleur taux de rétrogradation, c'est à dire la solubilité minimum de l'amylose est atteinte quand le degré de polymérisation est de 100 à 200 résidus glucose (20).

L'amylopectine de structure branchée est constituée de petites chaînes d'un degré de polymérisation de 10 à 60 résidus glucose (Fig. 4 et 5). La longueur moyenne des chaînes externes est de 12 résidus glucose et des chaînes internes est de 8 (14). La masse moléculaire de l'amylopectine est 1000 fois celle de l'amylose, soit plus de  $200 \times 10^6$  Da. L'existence de points de branchement séparés par un glucose suggère des régions denses dites en "cluster"(21). Les points de branchement seraient organisés comme dans la figure 6. La structure branchée inhibe la rétrogradation.

Le glycogène, deux fois plus branché que l'amylopectine, est soluble et favoriserait le stockage de l'eau. Le modèle en "arbre de Meyer", fondé sur un rebranchement régulier pose un problème stérique (22). En

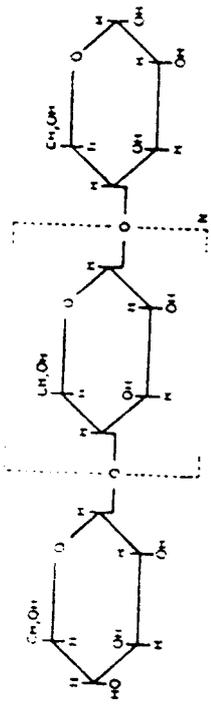


Fig. 2: Structure linéaire de la molécule d'amylose.

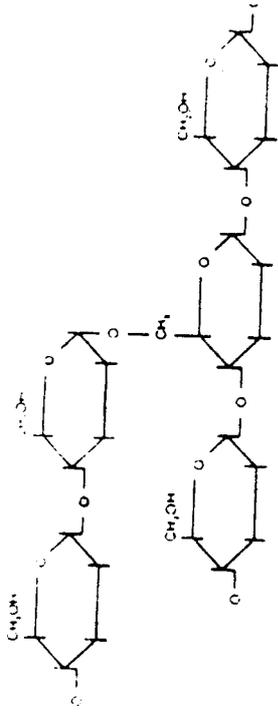


Fig. 4: Structure des points de branchement en  $\alpha$ -1,6.

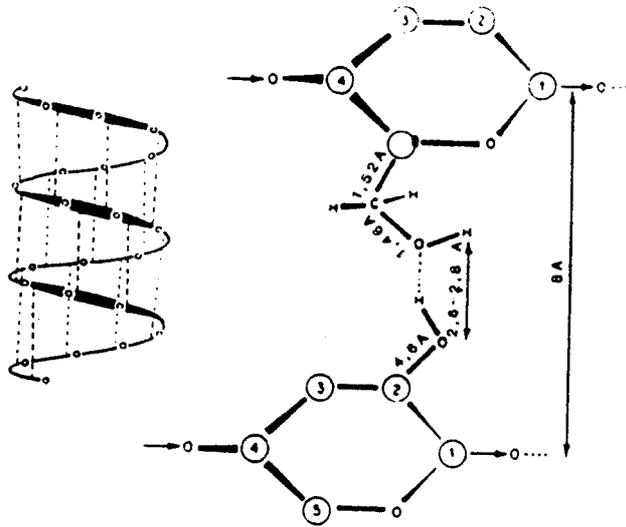


Fig. 3: Formation de ponts hydrogène entre les glucoses des tours voisins de l'hélice d'amylose.

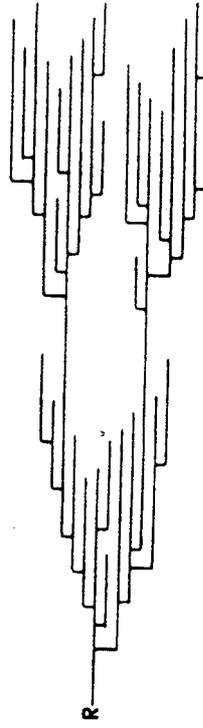
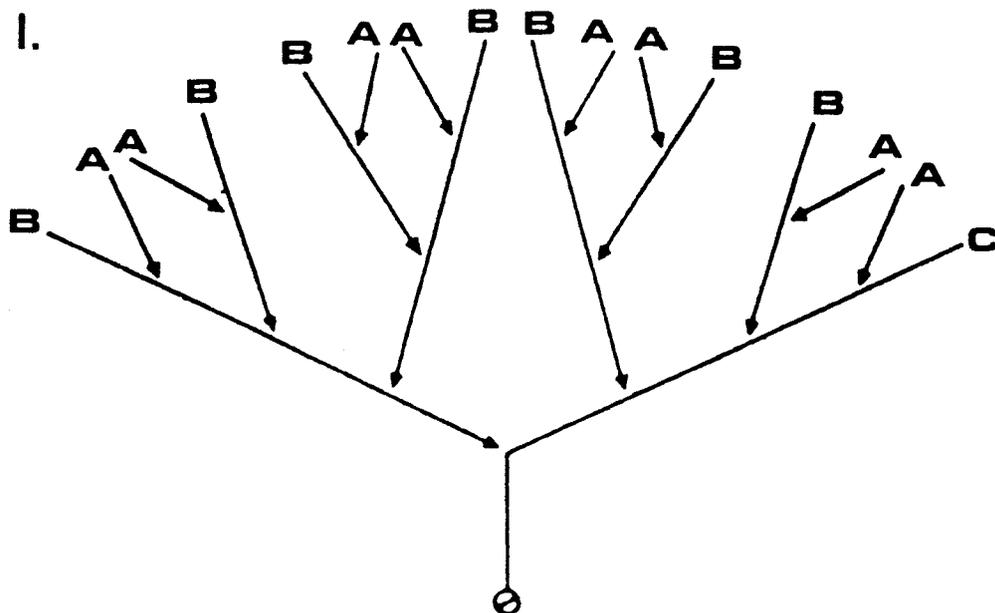
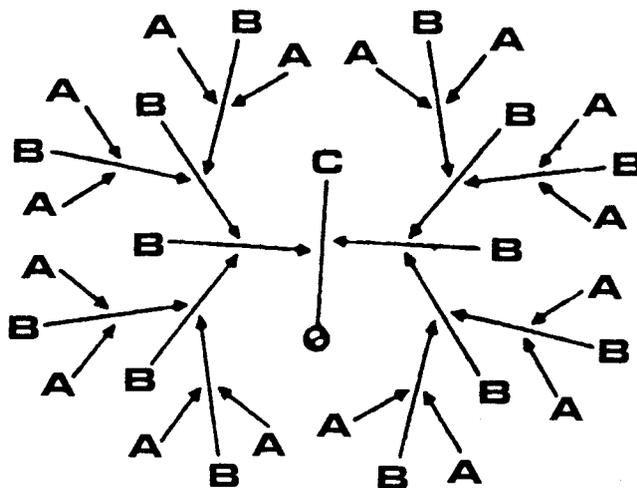


Fig. 5: Modèle d'une molécule d'amylopectine selon Manners (21).  
R : extrémité réductrice.

effet, la périphérie de la molécule deviendrait tellement dense qu'il deviendrait stériquement impossible de continuer un branchement régulier (23). La digestion enzymatique montre que 10% des résidus glucose occupent des positions aux extrémités non réductrices et que 60% sont dans les chaînes externes (24). Les chaînes internes auraient une longueur de 4 résidus glucose et les chaînes externes de 10 à 14 (25). Ainsi il y aurait des regroupements très denses de branchement et de petites chaînes internes, en accord avec le modèle proposé par Gunja-Smith et al (26). Alors que les méthodes physiques telles la viscosimétrie suggèrent que la molécule de glycogène soit sphérique, régulièrement branchée et très hydratée, d'une masse moléculaire au plus de  $5 \text{ à } 6 \times 10^6$  Da, le glycogène extrait dans des conditions très douces a une masse moléculaire évaluée à quelques millions voir à plusieurs centaines de millions (27). La molécule de glycogène serait composée *in vivo* de petites unités sphériques, très branchées de quelques millions, agrégées grâce à des liaisons encore discutées (28). Les différentes propositions sont récapitulées dans la figure 7 (29). Les larges particules de glycogène, les particules  $\alpha$  de 200 nm de diamètre, se clivent partiellement après traitement à l' $\alpha$ -amylase, ce qui suggère qu'elles sont composées de particules fondamentales de 20 à 30 nm de diamètre, les particules  $\beta$  de  $10 \times 10^6$  Da, reliées par des chaînes en  $\alpha$ -1,4. La résonance magnétique nucléaire du  $^{13}\text{C}$  du glycogène démontre que le glycogène est une macromolécule, qui grâce à sa structure très branchée, possède un volume vide important ce qui introduit de nombreux mouvements locaux en présence d'eau (33). Le glycogène est visible en RMN du  $^{13}\text{C}$  à 100% à température ambiante, ce qui permettra des études du métabolisme du glycogène *in vivo* directement par spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$  (34).



II.



**Fig. 6:** Hypothèse de structure de la molécule de glycogène ou d'amylopectine.

I. Structure selon le modèle en "arbre" de Meyer du glycogène ou de l'amylopectine.

II. Représentation schématique du glycogène ou de l'amylopectine (26)

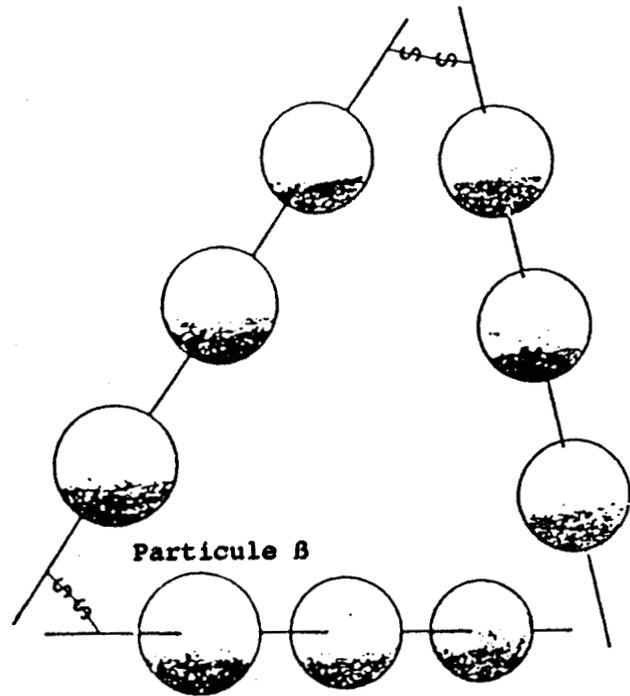
∅ : extrémité réductrice

A : chaîne connectée par son extrémité réductrice à une autre chaîne

B : chaîne qui porte une chaîne A et/ou B par un ou plusieurs de ces groupements hydroxyl primaires

C : chaîne unique non substituée à son extrémité réductrice

II.



III.

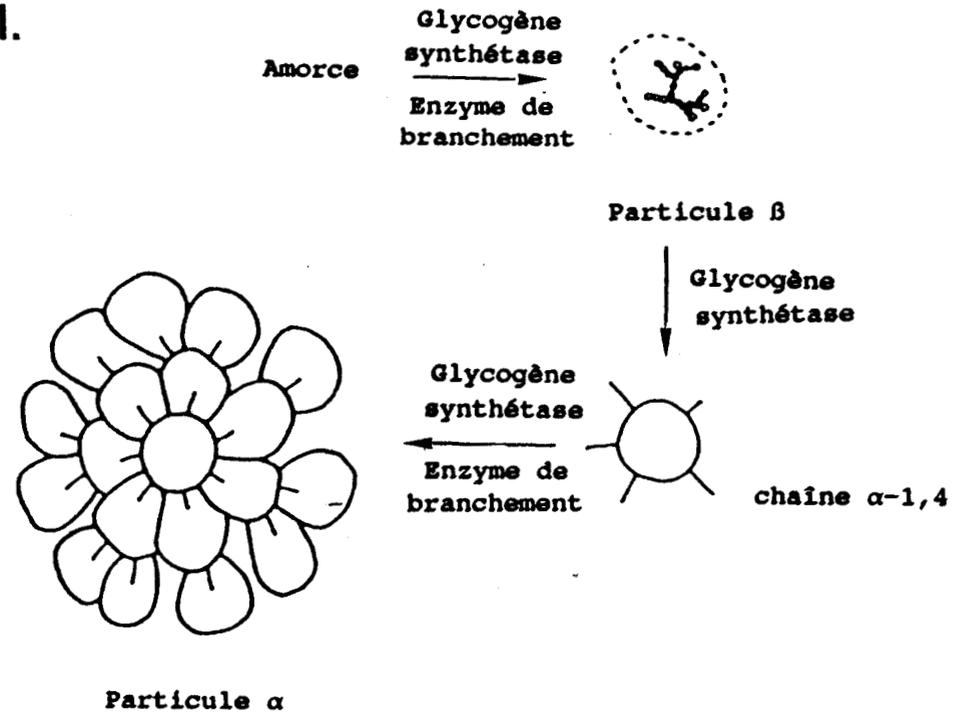


Fig. 7: I. Diagramme représentant la biosynthèse du glycogène (30)  
II. Représentation schématique d'une molécule de glycogène de haut poids moléculaire (31)  
III. Modèle d'une particule de glycogène (32)

### 3) Dosage de l'activité de branchement.

Bien que l'enzyme de branchement transfère un fragment de chaîne, obtenue par rupture d'une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un donneur, à un accepteur, qui est ou n'est pas le donneur d'origine, avec la formation d'une liaison en  $\alpha$ -1,6, ce mécanisme n'implique pas une nette synthèse de D-glucane (35). C'est pourquoi l'activité de l'enzyme de branchement est difficile à doser quantitativement. Elle peut être dosée en suivant le branchement, mesuré par la diminution d'absorbance à 660 ou à 525 nm du complexe iode-CaCl<sub>2</sub> de l'amylopectine ou de l'amylose, produit par un degré croissant de branchement causé par l'action de l'enzyme (36, 37). La molécule d'amylose "emprisonnerait" l'iode en formant une hélice (38-39). Par conséquent l'amylose donnera une coloration bleue ( $\lambda$  max=650 nm), l'amylopectine une coloration violette ( $\lambda$  max=550 nm) et le glycogène une coloration rouge-marron ( $\lambda$  max=450 nm) (40). Bien que le dosage soit simple, il a les inconvénients d'être peu sensible, difficile à interpréter et non quantitatif. Le produit sera faiblement branché et ne sera pas converti en une molécule de type glycogène (41, 42). Une autre méthode est basée sur la stimulation, causée par l'addition d'enzyme de branchement, de la synthèse sans amorce d'un  $\alpha$ -D-glucane à partir d' $\alpha$ -D-gluco-syl-1-phosphate par la phosphorylase a. Cette stimulation est due à l'augmentation du nombre d'extrémités non réductrices dans l' $\alpha$ -glucane sous l'action du branchement. Ainsi le nombre de sites pouvant être utilisés pour l'élongation catalysée par la phosphorylase augmente. La réaction catalysée par la phosphorylase est aisément réversible *in vitro*, en présence de glucose-1-phosphate 50 mM. Ce dosage est plus sensible de 50 à 100 fois que le dosage précédent et peut être quantitatif par détermination de l'incorporation du glucose marqué dans la fraction insoluble en présence d'éthanol (43). Le substrat initial est un petit  $\alpha$ -glucane, en cours d'élongation et

atteint un degré de polymérisation suffisant pour être branché. Le glucane branché résultant est ensuite allongé et présente de longues chaînes en  $\alpha$ -1,4 prêtes pour un futur branchement. L'élongation et le branchement de l' $\alpha$ -D-glucane refléteraient le réel processus physiologique en vue de la synthèse du glycogène quand la glycogène synthétase est l'enzyme d'élongation. Krisman et Kopun, afin d'éliminer l'interférence avec l' $\alpha$ -amylase, propose une autre méthode basée sur la synthèse d'un polysaccharide branché, en présence d'une faible quantité de glycogène comme amorce, de glucose-1-phosphate de phosphorylase et l'échantillon à doser (44). Le polysaccharide synthétisé est analysé par la méthode à l'iode (45). Finalement une méthode, basée sur la mesure directe des points de branchement introduits par différentes quantités d'enzyme, implique la synthèse d'un polysaccharide branché, sa purification et finalement sa dégradation par l'action coordonnée de la phosphorylase et de l'enzyme de débranchement (46). Cette dernière méthode est quantitative et très sensible. Basées sur la synthèse *de novo* de glycogène par le système catalytique: phosphorylase-enzyme de branchement et sur la coloration à l'iode, d'autres méthodes de détection ont été proposées. Ainsi l'activité de branchement peut être directement révélée par coloration à l'iode d'un disque de polyacrylamide, contenant la phosphorylase de muscle de Lapin immobilisée (47).

On peut également observer en microscopie électronique des particules macromoléculaires de polyglucosides synthétisés histochimiquement en présence de glucose-1-phosphate, grâce à l'action de la phosphorylase et de l'enzyme de branchement (48-50). Cette synthèse peut être réalisée *in vitro* ou *in vivo*. Cependant la réaction apparaît plus intense *in vitro*, car les particules de polyglucosides sont plus denses et celles d'un diamètre inférieur à 100 Å sont plus nombreuses qu'*in vivo* (51). Les

particules synthétisées *in vivo* se colore mieux au citrate de plomb et ressemblent aux particules de glycogène. L'histochimie *in vivo* reflète un aspect dynamique de la vie de la cellule et peut apporter des informations métaboliques et de réels aspects morphologiques de la situation *in vivo*. Ainsi un polyglucoside, localisé dans le cytoplasme et ressemblant au glycogène natif a pu être synthétisé dans la parabolle de la rétine de Poulet, *in vivo* (52). De même, la présence de glycogène dans le cristallin alors qu'il ne peut pas pénétrer par la capsule a été élucidé par la détection des enzymes de biosynthèse du glycogène dans le cristallin. Seulement dans le cristallin de Rat, l'enzyme de branchement est détectable, *in vitro*; pour d'autres espèces (Homme, Bovin, Pigeon, Porc, Lapin) la méthode de détection ne semble pas être assez sensible (53). Dans les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins du muscle du tibia de Lapin, le polyglucoside synthétisé *in vitro* apparaît comme une macromolécule constituée de corps sphériques branchés (54). La comparaison des polyglucosides synthétisés *in vitro* dans les cellules cancéreuses de l'estomac, dans l'épithélium métastatique intestinal de la muqueuse gastrique et dans l'épithélium de la muqueuse gastrique foetale a montré que la distribution, l'aspect et la taille des particules sont irréguliers dûs à des variations enzymatiques. Les larges particules synthétisées par les cellules cancéreuses, ressemblant à celles synthétisées par l'épithélium foetal, laisse suggérer une déviation enzymatique lors d'un cancer vers une enzyme foetale (55).

## II. Etude de l'enzyme de branchement chez différents organismes.

Découverte pour la première fois chez la pomme de terre et la fève en 1944 (56), l'enzyme de branchement a été étudiée chez les bactéries, les algues, les plantes, les animaux et les levures. Nous présenterons donc

l'enzyme de branchement chez ces différents organismes, afin d'élucider en partie le mécanisme d'action de cette enzyme, sa structure moléculaire et sa régulation génique.

1) L'enzyme de branchement chez les bactéries.

Plus de 50 espèces bactériennes accumulent le glycogène en réponse à des conditions de croissance particulières en présence d'un excès de source de carbone (11). Le glycogène apparaît en phase stationnaire, du fait de carences en azote (57-62), en sulfate (60-63) ou en phosphate (60) ou sous des conditions extrêmes de pH (60). Le glycogène n'est pas nécessaire à la croissance bactérienne comme le montrent plusieurs mutants affectés dans les niveaux d'enzymes de la biosynthèse du glycogène et surtout le mutant d'*Escherichia coli* portant une délétion de son ADN, où les gènes de structure des enzymes de biosynthèse sont présents (64-65). Le glycogène serait utilisé pour l'énergie et comme source de carbone nécessaire au maintien de l'intégrité cellulaire quand une source exogène de carbone manque. En plus d'énergie pour la croissance, la bactérie nécessite une "énergie de maintenance" qui assure le renouvellement des ARN, des protéines, qui permet la mobilité, la régulation osmotique, la réponse chémotactique et qui maintient le pH intracellulaire (66-70). Ces organismes contenant du glycogène survivent mieux que les mêmes organismes sans glycogène (62, 71-72). Chez *Clostridia*, le glycogène s'accumulant jusqu'à 60% du poids sec, servirait de source endogène de carbone et d'énergie pour la formation des spores et leur maturation (73-75). Ainsi le glycogène est un produit de réserve et sa principale fonction est de fournir l'énergie et le carbone dans des périodes de non-croissance.

L'enzyme de branchement est présent dans différents extraits bactériens (76). Le mécanisme d'action de l'enzyme de branchement dans

plusieurs systèmes bactériens a donc pu être étudié. Nous présenterons les substrats utilisés *in vitro* par l'enzyme de branchement, son activité combinée avec la glycogène synthétase, les caractéristiques de cette enzyme après purification et finalement sa régulation génique.

L'enzyme de branchement de *Streptococcus mitis* (77) branche les maltodextrines avec un degré moyen de polymérisation de plus de 20, elle agit préférentiellement sur les substrats branchés plutôt que sur les polysaccharides linéaires et son activité augmente quand la longueur des chaînes du substrat est importante. Ainsi l'enzyme agit sur l'amylose, l'amylopectine et augmente aussi le nombre de points de branchement du glycogène. L'action d'*Arthrobacter globiformis* a également permis d'obtenir de l'amylopectine synthétique à partir d'amylose ou d'amylopectine (78).

L'enzyme de branchement et la glycogène synthétase d'*Escherichia coli*  
ont une action combinée lors de la synthèse de polyglucosides en absence  
d'amorce. La glycogène synthétase, se présentant sous une forme unique après chromatographie sur DEAE-Sephadex, est capable de catalyser les deux activités de synthèse: l'une avec amorce, l'autre sans amorce (79). Des mutants défectueux pour la glycogène synthétase catalysent, sans amorce, le transfert de glucosyl, mais des mutants défectueux pour l'enzyme de branchement catalysent très faiblement cette réaction. Un activateur, supposé absent chez les mutants n'ayant pas d'activité de branchement, est copurifié avec l'enzyme de branchement des souches défectueuses pour la glycogène synthétase. Cet activateur de la glycogène synthétase est donc l'enzyme de branchement lui même. De plus, l'incorporation de glucose dans les fractions insolubles au méthanol et à l'acide trichloroacétique d'extraits bactériens, sans amorce, est stimulée par une forte concentration en citrate 0,25 M (diminution du Km de la glycogène synthétase pour le glycogène de 11 à 15 fois) et par

l'enzyme de branchement (80, 81). La concentration en amorce nécessaire diminue en présence d'enzyme de branchement et la réaction diminue 13 à 16 fois, quand la glycogène synthétase est prétraitée avec l' $\alpha$ -amylase et la glucoamylase. La fraction insoluble à l'acide trichloroacétique n'est pas solubilisée par la pronase et le produit de la réaction contient des chaînes linéaires. Finalement, la synthèse de novo du glycogène serait donc due à un  $\alpha$ -glucane endogène associé de façon non covalente à la synthétase, activée par l'enzyme de branchement et non à la formation d'une glucoprotéine d'initiation (82). Pour *Escherichia coli* K12, la réaction sans amorce est fortement stimulée par la présence de sels et d'enzyme de branchement, que ce soit avec l'ADPG ou l'UDPG (83). Cependant, l'activité de synthèse avec l'UDPG diminue rapidement à faible concentration en enzyme de branchement et est inhibée à des concentrations physiologiques alors qu'avec l'ADPG l'activité est maximale dans ces conditions. L'ADPG est donc le plus important donneur dans la biosynthèse du glycogène bactérien.

Dans le tableau I, sont présentées les caractéristiques des enzymes de branchement bactériens purifiées. Leur masse moléculaire de 80 à 90 kDa est très similaire à celle de l'enzyme de branchement du muscle de Lapin ou du Maïs (35-90). L'enzyme de branchement de bactéroïdes de *Rhizobium lupini* semble être une ribonucléoprotéine, comme l'enzyme de branchement du muscle de Lapin (91). L'ARN isolé présente en effet une activité de branchement.

La synthèse du glycogène bactérien est assurée par: la glycogène synthétase, l'enzyme de branchement et l'ADPG pyrophosphorylase, dont les gènes de structure: *GLG A*, *GLG B* et *GLG C* respectivement ont été clonés (92-93). En effet, de l'ADN chromosomique (10,5 kb) a été inséré au site PstI de pBR322 et les gènes (*GLG*) ont été sélectionnés par cotransformation d'un gène voisin: ASD (aspartate semialdéhyde

Tableau I : Purification et propriétés des enzymes de branchement bactériens.

Source	Méthodes	Résultats	Caractéristiques	Références
<i>Escherichia coli B</i>	* Chromatographie sur DEAE-cellulose et 4-aminobutyl-sepharose.	2 fractions, I et II :	I est dans le surnageant après centrifugation à 70000 g. Son activité spécifique est de 460 µmol/mg. II coélue avec la synthétase. Son activité spécifique est de 299 µmol/mg.	84
	* Double diffusion.	Il y a identité de I et II.	I et II sont immunologiquement identiques.	85
	* Electrophorèse de I et II.	4 bandes :	Seules les bandes majeures présentent une activité de branchement.	
	* Electrophorèse en SDS.	1 bande majeure et 0 à 3 bandes mineures.	La bande majeure correspond à une masse moléculaire de 84000 ± 2000 Da.	
	* Ultracentrifugation sur gradient de sucrose de I et II.	1 pic majeur et 1 pic mineur pour I et 1 pic pour II.	Le pic majeur correspond à une masse moléculaire de 95000 Da et le pic mineur à 178000 Da.	86
			Le pic obtenu pour II correspond à une masse moléculaire de 87000 Da. Principalement monomérique que l'enzyme de branchement d' <i>E. coli</i> peut exister sous forme dimérique.	87
<i>Escherichia coli K12</i>	* Gel filtration sur sephadex G100.	1 pic.	L'enzyme a été partiellement purifiée.	88
<i>Bacillus megaterium</i>	* Chromatographie sur DEAE-sephadex et 4-aminobutyl-sepharose.	1 fraction ayant l'activité de branchement.	L'enzyme de branchement à une masse moléculaire de 85000 Da et un pHi de 4,5. Elle utilise l'amylose, l'amydon soluble et l'amylopectine pour donner un produit ressemblant au glycogène.	89

déhydrogénase), dont on connaît maintenant la séquence (94). Les trois enzymes ont été purifiées (84, 95-97) et leur séquence nucléotidique a été déterminée (87, 98-99). Les gènes se succèdent dans l'ordre suivant: *ASD - GLG B - GLG X - GLG C - GLG A - GLG P* et sont localisés à 75 min. sur le génôme d'*Escherichia coli* (*GLG P* code pour la glycogène phosphorylase et *GLG X* code probablement pour une glucanase ou une glucosyltransférase) (100-102). La synthèse des trois enzymes semble dépendre d'une régulation complexe, influencée par la dérégulation nutritionnelle et aussi par le taux de croissance (103-106). Les travaux de Preiss proposent une dérégulation coordonnée des trois enzymes lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance (107-111). Ainsi, en milieu 1% glucose, le niveau d'enzyme de branchement est multiplié par 5 et celui de l'ADPG pyrophosphorylase et de la glycogène synthétase par 11 à 12 fois, en fin de phase exponentielle (112). En milieu minimum, la dérégulation de l'enzyme de branchement est observée plus tôt, dès la phase exponentielle et le même niveau qu'en milieu riche est alors atteint. Le rassemblement des trois gènes sur le génôme et la dérégulation coordonnée de leurs trois produits supposent l'existence d'un "opéron-glycogène" chez *Escherichia coli* (112, 113) et chez *Salmonella typhimurium* (114). Les souches transformées par un plasmide hybride, contenant les trois gènes surproduisent de 7 à 40 fois les trois enzymes en fin de phase exponentielle. *GLG C* et *GLG A* sont activés 26 à 10 fois respectivement par l'AMPc et la CRP (cAMP Receptor Protein) et leur expression est stimulée 3,6 et 1,8 fois par la guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate, alors que *GLG B* est faiblement touché par ces activateurs (115-116). La régulation transcriptionnelle complexe des enzymes de la biosynthèse du glycogène implique plusieurs promoteurs et le contrôle direct de

l'expression de ces gènes nécessite au moins deux systèmes de régulation.

*GLG B* de 2181 pb code pour l'enzyme de branchement, protéine de 727 acides aminés (87). La séquence en acides aminés déduite de celle en nucléotides concorde avec l'analyse en acides aminés de la protéine pure, avec la masse moléculaire déterminée par électrophorèse en SDS, avec la séquence N-terminale déjà obtenue et avec l'analyse en acides aminés de différents peptides obtenus par dégradation au BrCN d'enzyme de branchement purifié. L'enzyme de branchement a une composition en acides aminés similaire à la glycogène synthétase, mais ne présente pas avec cette enzyme une réaction immunologique croisée (85). Les enzymes de branchement et les glycogène synthétases d'autres entérobactéries sont antigéniquement très similaires, mais sont différentes des enzymes des bactéries photosynthétiques.

De nombreux mutants pour l'enzyme de branchement bactérien ont été isolés. Ainsi quatre groupes de mutants d'*Escherichia coli* K12 accumulent différentes quantités d'un polysaccharide linéaire, similaire à l'amylose, formant de petits granules et des inclusions de densité variable (117). Le type d'agrégats change d'un mutant à l'autre. D'autres mutants du gène *GLG B* ont été construits par une technique de remplacement génique entre le chromosome et un plasmide portant la mutation du gène *GLG B* (118).

Finalement, par homologie avec un fragment du gène *GLG B* d'*Escherichia coli*, le gène de l'enzyme de branchement de *Cyanobacterium synechococcus* sp. a été cloné et séquencé (4, 119). Ce gène donne naissance, à partir de deux codons de départ différents, à deux protéines de 84 et 72 kDa. L'activité de branchement est optimale à 35°C soulignant la nature mésophile de l'enzyme clonée.

2) L'enzyme de branchement chez les algues bleues.

Chez les *Cyanophyceae*, la formation de polysaccharides de stockage résulte des activités des phosphorylases, synthétases et enzymes de branchement. Ensemble ils forment coopérativement un système qui assure la survie de ces cellules primitives qui le possèdent. L'électrophorèse des glucosyltransférases de l'algue *Oscillatoria princeps*, suivie d'une immunodiffusion contre les anticorps de sérum de Lapin antiphosphorylase, présente une réaction croisée forte avec les deux isoformes de la phosphorylase et synthétase de cette algue et une réaction croisée faible avec les isoformes de l'enzyme de branchement (120). Ainsi une origine ancestrale commune des phosphorylases, synthétases et enzymes de branchement a été proposée par J.F. Frederick. Une même protéine précurseur serait capable d'assurer les liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 à la fois, ce qui laisse supposer que la possibilité de former soit des liaisons  $\alpha$ -1,4, soit des liaisons  $\alpha$ -1,6 s'est différenciée au cours de l'évolution avant que les synthétases ne dérivent des phosphorylases (121). En effet, les phosphorylases et synthétases des *Cyanophyceae* ayant des compositions en acides aminés qui se ressemblent et présentant une réaction immunologique croisée semblent avoir une origine commune. La phosphorylase étant capable d'assurer la synthèse des liaisons  $\alpha$ -1,4 dans certaines conditions, on peut supposer que les synthétases plus spécialisées dérivent des phosphorylases.

D'*Oscillatoria princeps*, de *Nostoc muscorum* et de *Gloeocapsa dimidiata*, ont été séparées après électrophorèse en gel de polyacrylamide plusieurs isoformes pour l'enzyme de branchement qui branchent des polyglucosides comme l'amylose en phytoglycogène (122). D'autres part, que ce soit chez *Plectonema nostocotum* (cyanophyte thermophile qui vit à des pH avoisinant 13) ou chez *Oscillatoria princeps* (qui vit à pH neutre) ou chez *Cyanidium caldarium* (acidophile

et thermophile)(123), un même polysaccharide de stockage est synthétisé (124). Ainsi les isoformes de l'enzyme de branchement sont du type enzyme de branchement capable de brancher l'amylopectine plutôt que du type enzyme Q des plantes.

### 3) L'enzyme de branchement chez les plantes.

L'amidon existe dans les plantes vertes et dans presque tous les types de tissus des plantes: fruits, graines, feuilles, racines, pousses et tiges. L'accumulation d'amidon est le résultat de la fixation du carbone lors de la photosynthèse. L'amidon disparaît des feuilles exposées à une faible lumière ou mise dans l'obscurité 24 à 48 heures et sert de source d'énergie alors que les granules d'amidon se reforment dans les chloroplastes après au moins une heure d'exposition à la lumière (125). La biosynthèse et le catabolisme de l'amidon est un processus dynamique, dans la feuille. Dans les tissus de stockage, la synthèse a lieu lors du développement et la dégradation lors de la germination, ce qui n'exclue pas un renouvellement de la molécule d'amidon pendant ces phases.

L'enzyme de branchement des plantes ou enzyme Q transforme l'amylose en amylopectine selon un mécanisme d'action qui est différent de celui de l'enzyme de branchement des mammifères et des bactéries. En effet le produit, l'amylopectine, est moins branché que celui synthétisé grâce à l'action de l'enzyme de branchement des mammifères ou des bactéries. De plus l'enzyme de branchement, ainsi que l'amidon synthétase des plantes existent sous plusieurs isoformes (35, 43, 126-130) que l'on sépare par chromatographie sur DEAE-cellulose alors que l'enzyme de branchement et la glycogène synthétase des mammifères et des bactéries existent sous une seule forme enzymatique. Après avoir présenté les isoformes de l'enzyme de branchement de quelques plantes et avoir exposé le mécanisme

probable d'action de l'enzyme de branchement, nous exposerons les fonctions éventuelles de ces isoformes suggérées par J. Preiss et C.D. Boyer (131).

Les travaux de Whelan sur la structure du glycogène et de l'amylopectine permettent de suggérer que les isoformes d'enzyme de branchement et d'amidon synthétase ont des spécificités différentes pour le branchement et l'élongation et peuvent interagir pour synthétiser des chaînes de longueurs différentes retrouvées dans l'amylopectine (26, 130). Ainsi quand l'amylopectine, le glycogène ou le phytoglycogène sont débranchés avec les enzymes de débranchement appropriées puis les produits résultants sont fractionnés par gel filtration, le glycogène présente un unique pic large contenant des oligosaccharides de 3 à 25 résidus glucose, le phytoglycogène donne un pic d'oligosaccharides dont les tailles sont moins uniformes et l'amylopectine présente deux groupes de chaînes: l'un d'une taille supérieure à 49 résidus glucose et l'autre de 12 à 42. L'amylopectine a donc une structure asymétrique par comparaison au glycogène. Il est donc possible que l'amidon synthétase I et l'enzyme de branchement IIb, et, l'amidon synthétase II et l'enzyme de branchement IIa (L'enzyme de branchement chez le maïs) constituent deux complexes enzymatiques différents avec des spécificités différentes, qui donneraient le produit asymétrique, l'amylopectine (131). De plus, l'existence de complexes enzymatiques, où l'action de l'enzyme de branchement et de l'amidon synthétase serait concertée (132) permettrait en partie d'élucider une énigme: pourquoi l'amylose de la plante échappe au branchement, alors que l'enzyme de branchement est présente (133)?

a) L'enzyme de branchement du maïs.

Trois formes d'enzyme de branchement I, IIa et IIb de masses moléculaires s'échelonnant de 80 à 90 kDa ont été isolées de l'endosperme de maïs, après séparation par chromatographie sur DEAE-cellulose (35, 128). La fraction I est éluée avec le tampon de lavage, elle n'est pas associée à une activité amidon synthétase. Les fractions IIa et IIb coéluent, après addition du gradient salin, avec l'amidon synthétase I et II respectivement. Les formes I et IIa/IIb ont également été séparées par chromatographie sur amino-alkyl-sepharose et par électrophorèse. Les formes IIa et IIb ont été séparées par chromatographie sur 4-amino-butyl-sepharose.

Afin d'attribuer une fonction à ces trois formes d'enzyme de branchement, différents mutants de l'endosperme de maïs, dont le contenu en amidon est affecté, ont été étudiés (134, 135). En effet, les altérations de l'amidon sont liées à la présence des différentes formes de synthétases et d'enzyme de branchement.

D'après le tableau II, la mutation ae (amylose extender) provoque une perte de l'activité de branchement de la forme IIb, confortée par une augmentation importante du pourcentage en amylose. L'endosperme de l'amylomaïs contient au moins les trois formes d'enzyme de branchement (136). La forme I présente des propriétés similaires à celle de la forme I de branchement isolée de l'endosperme de grain de maïs normal. Cependant l'endosperme de l'amylomaïs ne présente que 33% de la quantité d'enzyme de branchement de l'endosperme du maïs normal. Ainsi la diminution de la fraction amylopectine serait associée à la diminution du contenu total en enzyme de branchement. De plus, il existe une relation linéaire entre le dosage de l'allèle dominant Ae et l'activité de branchement IIb. Des substitutions alléliques au locus ae sont sans effet sur l'activité de branchement des formes I et IIa (137). Par conséquent IIb aurait pour gène de structure Ae (138). L'amidon

Tableau II: Etude du contenu en amidon d'endosperme de maïs de différents mutants touchés dans le branchement des polysaccharides de réserve.

Type de grain	amylose	amylor-pectine	Déficiences
Grain normal	26%	74%	-
Grain homozygote pour l'allèle récessif ae	66%	34%	Il y a perte de l'activité de la forme IIB de l'enzyme de branchement. L'activité de l'amylosynthétase I, stimulée en présence de citrate diminue et cette activité est régénérée par l'addition en excès d'enzyme de branchement.
Grain homozygote pour l'allèle récessif du	60%	40%	L'activité de la forme IIA de l'enzyme de branchement diminue et l'amylosynthétase perd 60% de son activité.
Grain homozygote pour les allèles récessifs ae/du	-	-	Il y a perte de l'activité de la forme IIB et diminution de l'activité de la forme IIA de l'enzyme de branchement. Les activités amylosynthétase I et II diminuent.
Grain homozygote pour l'allèle récessif su-1	25 à 30%	de polysaccharide très branché	L'activité de branchement de la forme I est modifiée. L'activité de l'enzyme de débranchement est déficiente. Le polysaccharide, soluble dans l'eau, est du phytyloglycogène.

synthétase I, qui assure la synthèse d'un  $\alpha$ -glucane en absence d'amorce exogène ( $K_m = 0,033$  mM pour l'ADPG en tampon citrate 0,05 M) voit son activité diminuer. Cette réaction, en présence de citrate, est stimulée 10 fois après addition d'enzyme de branchement en excès (139). Le citrate augmente l'affinité de l'amidon synthétase I pour l'amorce endogène.

La mutation *du* (dull) entraîne une diminution des activités de l'amidon synthétase II et de la forme IIa de l'enzyme de branchement. La fraction amylopectine extraite de l'amidon du mutant *ae* est beaucoup plus branchée que celle extraite de l'amidon du mutant *du* ou du grain normal. La double mutation *ae du* indique que les deux mutants agissent indépendamment, car les déficiences dues à chaque mutation s'additionnent (131, 140). Ainsi le contrôle génétique des différentes formes d'enzyme de branchement et d'amidon synthétase de l'endosperme de maïs semble être indépendant. La mutation *su-1* (sugary-1) modifie l'activité de branchement de la forme I (141). En effet, la forme I crée des points de branchement sur l'amylose, l'amylopectine, mais pas sur le glycogène. Ainsi la forme I, qui est capable de transformer l'amylopectine en une molécule plus branchée "glycogène-like", jouerait un rôle dans la formation du phytoglycogène (142). Ce polysaccharide très branché, soluble dans l'eau (143), étant inexistant dans le grain normal de maïs, on suppose, que l'amylopectine ne serait pas accessible à la forme I de l'enzyme de branchement. Par contre, dans les cellules de l'endosperme du grain muté *su*, il y a conversion en un glucane "phytoglycogène-like", résultant d'une modification de l'activité de branchement de la forme I. Il a également été montré que tous les mutants *su* étudiés sont déficients pour l'enzyme de débranchement (144).

Afin d'étudier les homologues entre les différentes formes d'enzyme de branchement, des réactions immunologiques ont été effectuées. Ainsi,

d'après le tableau III, immunologiquement, les trois formes IIA et IIB sont similaires alors que I est distincte (145). De plus la composition en acides aminés et la carte peptidique obtenue après digestion à la trypsine et la chymotrypsine ne présentent pas de différences entre IIA et IIB, mais de significatives différences avec I. On observe également une réaction immunologique croisée entre l'enzyme de branchement du glycogène d'*Escherichia coli* et l'enzyme de branchement de l'amidon de maïs (146), en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la fraction I ou IIA et IIB ou l'enzyme de branchement de maïs ou contre l'enzyme de branchement d'*Escherichia coli*. Il existe par conséquent une similarité immunologique entre l'enzyme de branchement du maïs et d'*Escherichia coli*. Dans la feuille de maïs, 75% de l'enzyme de branchement sont dans les cellules de l'enveloppe (147-149) alors que les enzymes de dégradation sont mieux distribuées dans le mésophylle (150). On retrouve deux formes I et II d'enzyme de branchement, après passage sur DEAE-cellulose. Les réactions de dosage d'activité, d'immunodiffusion et de neutralisation d'activité montrent que la forme I de la feuille a des propriétés similaires à celles de la forme I du grain de maïs et que la forme II de la feuille est proche de la forme IIA du grain. Il existe donc des relations entre l'enzyme de branchement de la feuille et de l'endosperme de maïs, mais la forme IIB retrouvée dans l'endosperme n'est pas retrouvée dans la feuille. L'expression de l'enzyme de branchement IIB serait tissu-spécifique, ce qui expliquerait la tissu spécificité de l'expression du gène Ae (151).

Les trois formes d'enzyme de branchement du grain de maïs sont très homologues à celles du grain de téosinte, également au nombre de trois (152).

D'après le tableau IIIbis, l'anticorps anti-enzyme de branchement natif de tubercule de pomme de terre inhibe fortement l'activité de la

**Tableau III:** Expériences d'immunodiffusion permettant de mettre en évidence les homologues entre les différentes formes d'enzyme de branchement.

Anticorps utilisés	Formes d'enzyme de branchement		
	I	IIa	IIb
Anti I	+	-	-
Anti IIa	-	+	réaction croisée
Anti IIb	-	réaction croisée	+
Anticorps monoclonaux des lignées (1A1D7, 1A1C3 et 4D2A9D8)	+	+	+
Anticorps monoclonaux des lignées (4D2D10, 4D2F9 et 2A6C12)	-	+	+

**Tableau IIIbis:** Expériences de neutralisation d'activité permettant de mettre en évidence les homologues entre l'enzyme de branchement du maïs et *Solanum tuberosum*.

Anticorps dirigés contre l'enzyme (de branchement de <i>Solanum tuberosum</i> )	Enzyme de branchement de maïs.	
	natif	dénaturé
Anticorps anti enzyme de branchement natif	+	-
Anticorps anti enzyme de branchement dénaturé	+	+

forme I de l'enzyme de branchement de maïs. Ainsi on pense que l'enzyme de branchement de *Solanum tuberosum* (79 kDa) et la forme I de l'enzyme de branchement de maïs (82 kDa) présente un haut degré de similarité, sous leurs formes natives et dénaturées (153). Une réaction croisée entre l'enzyme de branchement de *Solanum tuberosum* et les formes IIa et IIb de l'enzyme de branchement du maïs a été observée, seulement après dénaturation, ce qui laisse supposer des similarités de séquence entre les espèces.

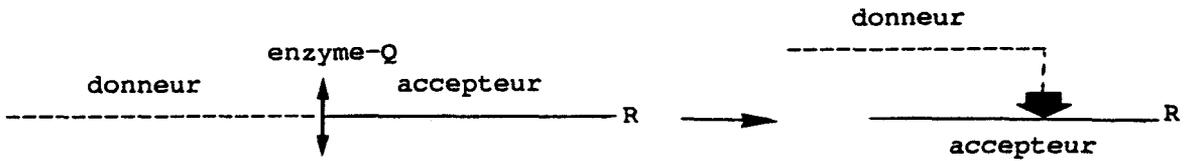
**b) L'enzyme de branchement de la pomme de terre, *Solanum tuberosum*.**

L'enzyme de branchement de la pomme de terre, purifiée en 1975, est une protéine monomérique de 85 kDa (154). La mise en évidence d'une simple protéine, sans activité hydrolytique envers l'amylose, contraste avec les travaux de H.L. Griffin et Y.U. WU de 1971 (155), qui rapportent que l'enzyme de branchement est constituée de deux composantes: une hydrolase (70 kDa) et une transférase (20 kDa). Des travaux plus récents (156) caractérisent l'enzyme de branchement de la pomme de terre, comme une protéine monomérique de 79 kDa, homologue à la forme I de l'enzyme de branchement de maïs (ces travaux sont confortés par les résultats immunologiques précédemment cités).

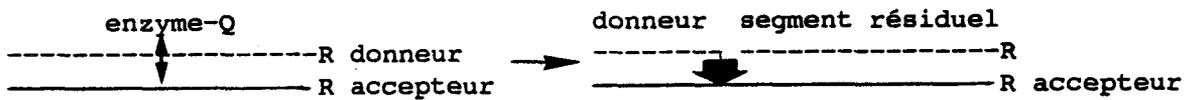
L'enzyme de branchement ou enzyme-Q agit sur de l'amylose natif ou synthétique pour donner des produits ressemblant à l'amylopectine native, mais dont les chaînes sont en fort pourcentage des maltohexaoses (137). L'enzyme-Q peut introduire des points de branchement dans l'amylopectine de la pomme de terre, mais le produit résultant ne ressemble pas au phytoglycogène (153). L'étude du mécanisme d'action de l'enzyme-Q a permis de mettre en évidence la formation des points de branchement par un transfert intrachaine et interchaîne (Fig. 8) (157-158).

L'enzyme utilise des chaînes de 30 à 40 résidus glucose ou plus comme accepteurs (159-160), ce qui correspond à la taille minimum requise pour stabiliser la formation d'une double hélice avec les deux chaînes d'amylose et pour créer des forces, grâce à une telle conformation, suffisamment importantes. En effet des modèles moléculaires montrent que les glucanes en  $\alpha$ -1,4 peuvent s'assembler, probablement par des ponts hydrogène, en une double hélice compacte (23). De plus, la longueur minimum de chaîne d'amylose nécessaire à l'interaction du branchement diminue à 10 résidus glucose quand la température est de 4°C (159, 160). L'étude en diffraction des rayons X d'amyloses A ou B cristallisés de pomme de terre a mis en évidence des structures en double hélice (161, 162). Ainsi, deux hypothèses de mécanismes intermédiaires lors du transfert interchaîne, faisant intervenir la formation de double hélice d'amylose ont été proposées (Fig. 8)(157). Afin de tester si le substrat de l'enzyme-Q est un complexe formé de deux chaînes, si l'activité de branchement est une "transglycosylation" par transfert interchaîne et si la formation du point de branchement entre les deux chaînes stabilise leur interaction et accélère la création d'autres points de branchement, un substrat modèle de faible masse moléculaire a été étudié (158). Ainsi, une amyloextrine branchée isolée par hydrolyse acide partielle de granules d'amidon de maïs waxy, a été utilisée. L'enzyme-Q catalyse le transfert de portions radioactives d'une chaîne à l'autre chaîne d'amylose de longueur différente, suggérant que la formation de points de branchement en  $\alpha$ -1,6 peuvent se produire par transfert interchaîne (Fig. 9). Le point de branchement en  $\alpha$ -1,6 de l'amyloextrine branchée stabiliserait la formation de la double hélice à partir de deux chaînes courtes, de moins de 40 résidus glucose, constituant alors un substrat pour l'enzyme de branchement.

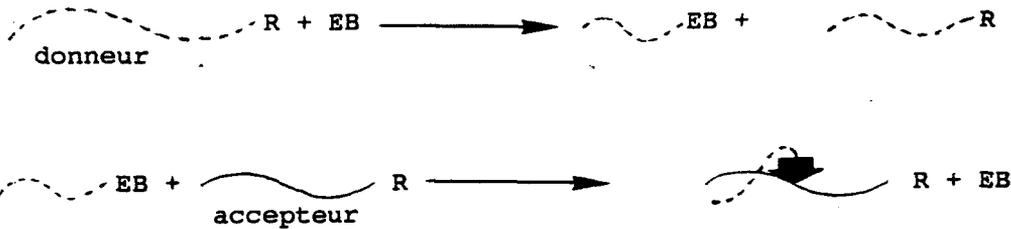
1. Transfert intra-chaine.



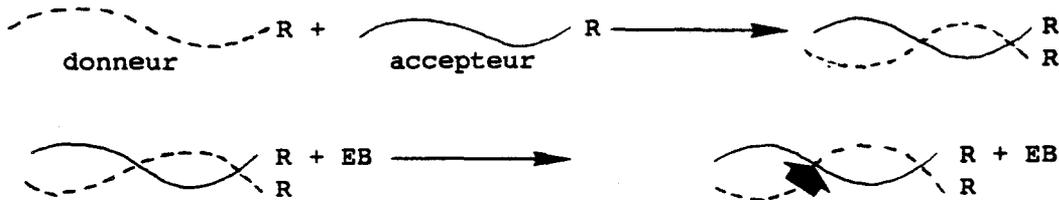
2. Transfert inter-chaine.



a) Première hypothèse :



b) Deuxième hypothèse :



**Fig. 8:** Mécanisme d'action de l'enzyme de branchement (EB) de tubercule de pomme de terre.

- : segment donneur.
- : segment accepteur.
- ▣ : point de branchement.
- R : extrémité réductrice.
- ↔ : point de coupure par l'enzyme-Q.

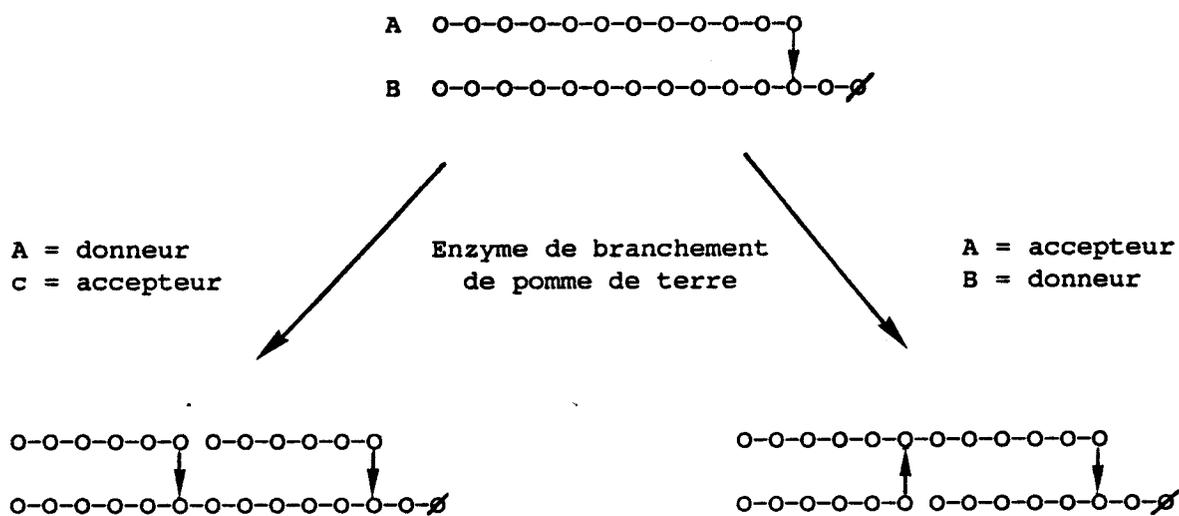


Fig. 9: Hypothèses d'action de l'enzyme-Q sur l'amylopectine.  
/ : extrémité réductrice.

c) L'enzyme de branchement du pois, *Pisum sativum* L..

Le premier caractère décrit par G. Mendel dans son étude sur les règles de base de l'hérédité était la différence de formes des graines mûres de pois, dont l'apparence était soit lisse, soit ridée (1, 162). Un unique locus *rugorus* ou *r* gouverne ce phénotype lisse (*RR* ou *Rr*) ou ridé (*rr*) (164). Cependant les effets phénotypiques du locus *rb* correspondent également à la description faite par G. Mendel. L'effet du locus *rb* sur le contenu en amidon de la graine est assuré par une altération de l'activité de l'ADPG-pyrophosphorylase lors du développement (164). La mutation *rb*, n'ayant été importée en Europe qu'en 1934, n'a donc pas pu être décrite par G. Mendel (166). La mutation *r* provoque une diminution de la biosynthèse d'amidon (Tableau IV), menant à l'accumulation de sucrose lors du développement, provoquant alors des changements de pression osmotique, de rétention d'eau, de taille des cellules et de forme de la graine. Par conséquent le changement de morphologie du grain d'amidon serait dû à la présence d'"amylose long" (177). Tous les effets de la mutation *r* seraient la conséquence d'une réduction de la synthèse d'amidon causée par une réduction l'activité de l'enzyme de branchement (177, 178-179). Réellement, l'isoforme SBE I (Starch Branching Enzyme I), active au début du développement est absente chez la graine ridée (*rr*). Un polymorphisme important pour le gène SBE I entre les lignées *RR* et *rr* présente 100% de coségrégation avec le locus *r*, établissant le gène *SBEI* au locus *r* (2). Le gène *SBEI*, dans les lignées *rr*, est interrompu par une insertion de 0,8 kb, très similaire aux éléments transposables de la famille Ac/Ds du maïs. Cette insertion causerait la perte de 61 acides aminés de la protéine SBE I. L'accumulation de sucrose provoquerait un changement de l'osmolarité, pour laquelle la biosynthèse de l'amidon ou des protéines de stockage est liée. Ainsi l'osmolarité serait le facteur

Tableau IV (suite):

Caractéristiques :	Graine lisse (RR)	Graine ridée (rr)	Références
(Activité de bran- (chement au cours (du développement :	L'activité de branchement augmente du 8ème : au 18ème jour après l'anthèse et diminue : après le 26ème jour.	L'activité de branchement n'augmente qu'aux : derniers stades du développement.	: 176 )
(Purification de (l'enzyme de bran- (chement par chro- (matographie sur (DEAE-cellulose ( ( (	: 2 isoformes, dont une est majeure, l'autre : mineure, différant par leur masse molécu- : laire, leur rôle dans la stimulation de la : phosphorylase, dans le branchement de : l'amylose et par leur activité dans diffé- : rents tampons apparaissent entre le 12ème : et 18ème jour.	: Il n'y a pas de pic distinct d'enzyme de : branchement et l'activité représente moins : de 10% de l'activité totale retrouvée dans : les graines (RR). : Il n'y a pas d'isoforme SBEI active au début : du développement.	: : 177 : : 178 : 179 )
(Taille du (fragment porteur (du génotype (	: 3,3 kb : : :	: 4,1 kb. Le gène codant pour SBEI est inter- : rompu par une insertion de 0,8 kb très simi- : laire à la famille Ac/Ds d'éléments transpo- : sables du maïs.	: : : 2 )

[ ] : nombre de génotypes étudiés .

a, b et c indiquent des études avec des lignées isogéniques proches de plantes RR et rr.

déterminant, qui expliquerait tous les effets causés par la mutation au locus *r*. Dans les feuilles *rr*, on ne constate pas d'augmentation de la synthèse de sucrose, mais la photosynthèse diminue plus encore à basse température, également le niveau d'ADPG et de 3-Phosphoglycérate est plus élevé que dans les feuilles *RR* (180). L'impact de cette diminution de l'activité de branchement sur la régulation de la formation d'amidon pendant la photosynthèse est actuellement étudié sur les feuilles de *Pisum sativum*.

d) **L'enzyme de branchement d'autres plantes.**

De multiples formes d'enzyme de branchement, récapitulées dans le tableau V, ont été séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose. Leurs masses moléculaires sont généralement de l'ordre de 80 à 90 kDa, comme celles retrouvées pour le maïs ou la pomme de terre.

4) L'enzyme de branchement chez les animaux.

Isolé pour la première fois du foie par C. Bernard (196), le glycogène est la principale forme de stockage de carbohydrates chez l'animal. Il est une forme de mise en réserve du glucose facilement mobilisable. Chez un homme de 70 kg, le glycogène représente 5% du poids dans le foie soit 90g et 1% dans le muscle squelettique soit 350g. Le métabolisme du glycogène est important, car il régule le taux de glucose sanguin, il assure un réservoir de glucose pour une activité musculaire intense et il nécessite une régulation hormonale où l'AMPc intervient dans le contrôle coordonné de la synthèse et de la dégradation. L'enzyme de branchement agit de concert avec la glycogène synthétase afin d'assurer la biosynthèse du glycogène.

L'enzyme de branchement des mammifères a été étudiée en détail pour le foie de Rat (36, 197-198) et le muscle squelettique de Lapin (41-42,

Tableau V (suite):

Source d'amidon	Fractions obtenues après chromatographie sur DEAE-cellulose	Remarques	Références
( <i>Commelina communis</i> )		L'enzyme de branchement est localisée dans la fraction chloroplastique des cellules protectrices.	187
(Endosperme du grain de riz, <i>Oryza sativa</i> L.)	2 à 3 formes, dont les propriétés sont les mêmes que celles trouvées pour d'autres plantes: sauf que la masse moléculaire est plus faible (40 kDa), sont obtenues après passage sur colonne Mono-Q.	La relation entre la qualité de l'amidon de riz et les caractéristiques de l'enzyme de branchement est actuellement étudiée.	188
(Suspension cellulaire à partir de riz)	1 forme majeure d'enzyme de branchement, différentes des multiples formes retrouvées dans l'endosperme.	Le taux d'enzyme de branchement, est plus élevé dans l'endosperme que dans la feuille.	189 190
(Feuilles de coton)		L'enzyme Q est responsable de la biosynthèse de l'amylopectine abondante dans l'amidon de feuilles de coton. Après dialyse de l'extrait contre l'EDTA, suivie d'un traitement sur gel d'alumine, les interférences dues à l' $\alpha$ -amylase, qui attaque le glucane branché, sont éliminées. Les granules d'amidon sont liés à l' $\alpha$ -amylase et l'enzyme Q. Le nombre de glucanes branchés par l'enzyme Q augmente avec celui des maltodextrines et avec l'activité $\alpha$ -amylasique liée.	191

Tableau V (suite):

Source d'amidon	Fractions obtenues après chromatographie sur DEAE-cellulose	Remarques	Références
( Feuilles d'épinard	: 2 formes I et II ont des activités similaires: L'enzyme Q est associé aux chloroplastes : en présence d'amylose de pomme de terre, : des cellules des feuilles d'épinard. : d'amylose en présence de phosphorylase ou : La fraction I est plus active en tampon : d'amidon synthétase pour donner un glucane : phosphate ou bicine qu'en tampon citrate. : résistant à l'hydrolyse complète par la β-amy- : La fraction II est plus active en tampon : lase (37-50%) et l'α-amylase (20-31%), mais : citrate à pH = 5,5/6,5. : est hydrolysé totalement par la pullulanase et: : la β-amylase. I et II stimulent 11 à 14 fois : : l'amidon synthétase III en présence de citrate: : La fraction I représentant 10 à 20% de l'acti-: : vité totale est associée à la synthétase III; : : une chromatographie sur ADP-hexanolamine-: : sepharose 4B permet leur séparation.	193	
( Feuilles de <i>Vitis vinifera</i>	: L'enzyme Q de feuilles et grains de maïs : provoque une stimulation de 100 fois : sans amorce de l'amidon synthétase de : feuilles de <i>Vitis vinifera</i> .	129	
( Feuille de tabac	: L'activité de branchement est la même dans: : les tiges, feuilles et pousses, mais est : : plus élevée dans les plants, qui ont pous-: : sés à la lumière.	194 195	

90, 199). Après avoir exposé le mécanisme d'action de l'enzyme de branchement et son action combinée avec la glycogène synthétase, nous présenterons les travaux traitant de l'enzyme de branchement du muscle, d'autres organes et finalement du foie, puis nous décrirons la glycogénose de type IV caractérisée par l'absence d'activité de branchement.

a) Mécanisme d'action de l'enzyme de branchement.

L'enzyme de branchement du foie de Rat catalyse la formation de nouveaux points de branchement en  $\alpha$ -1,6 à partir de préparations de glycogène constitué de chaînes de 11 à 21 résidus de glucose (198). L'enzyme de branchement d'origine animale agit comme une transglucosidase. En effet, un segment linéaire de 6 résidus glucose au minimum constituant la portion terminale d'une chaîne latérale d'un  $\alpha$ -1,4 glucane, peut être clivé par l'enzyme de branchement de foie de Rat (197) ou de muscle squelettique de Lapin (90), transféré et rebranché en  $\alpha$ -1,6 à une nouvelle chaîne extérieure. Cependant, l'enzyme de branchement de muscle squelettique de Lapin partiellement purifié transfère préférentiellement des segments de 7 résidus glucose quand il agit sur un polysaccharide allongé préalablement *in vitro* sous l'action de la glycogène synthétase de Lapin (E.C. 2.4.1.11) en présence d'UDPG (199). L'enzyme de branchement doit être spécifique. Ainsi on suppose qu'un segment d'au moins 6 résidus glucose comprenant l'extrémité non réductrice et provenant d'une chaîne d'au moins 11 résidus sera transféré et ramifié au moins à 4 résidus de distance d'un point de branchement existant (197). Les facteurs déterminant la spécificité de l'enzyme de branchement ne sont pas connus. Pour les plantes et les bactéries, ce schéma hypothétique n'a pas été retrouvé. L'enzyme de branchement du foie (36) et du muscle (41) utilise comme substrat

l'amylose, l'amylopectine et la  $\beta$ -limite-dextrine (obtenue par action de la  $\beta$ -amylase sur l'amylopectine). Ce dernier polysaccharide, utilisé comme substrat, indique que les chaînes branchées sont transférées.

Une propriété importante de l'enzyme de branchement découverte par B. Illingworth, D.H. Brown et C.F. Cori est à la base du dosage de l'enzyme de branchement (42). En effet, la phosphorylase et l'enzyme de branchement ensemble constituent un système catalytique pour la synthèse de novo du glycogène.

L'enzyme de branchement de muscle de Lapin constitue un système combiné avec la glycogène synthétase et augmente le taux de transfert d'unités de glucose en présence d'une quantité minimum de glycogène accepteur. Cette stimulation est analogue à celle observée chez les plantes ou les bactéries (41).

**b) L'enzyme de branchement du glycogène du muscle.**

Le glycogène est présent dans le muscle sous forme de granules sphériques denses localisés à proximité du réticulum sarcoplasmique. On distingue trois types de granules différents par la taille, la densité électronique. Ainsi les particules de diamètre important, constituées de corps macromoléculaires branchés sphériques, se retrouvent dans les fibres rouges, les particules d'un diamètre inférieurs à 150 Å, dans les fibres blanches et celles d'un diamètre de l'ordre de 346 Å, dans les fibres intermédiaires (49). L'activité de l'enzyme de branchement et de la phosphorylase du muscle squelettique de Rat et de Lapin adultes (*quadriceps femoris*, *gastrocnemius*, *tibialis* et *peronus*) a été retrouvée histochimiquement dans ces trois types de fibres, par coloration à l'iode de polyglucosides synthétisés *in vitro* (200). Les fibres blanches sont colorées en bleu foncé, les rouges en rouge-marron et les intermédiaires en violet. Cette coloration reflète le métabolisme du

glycogène dans une fibre individualisée. En effet, la taille des particules constituant les différentes fibres semble dépendre de l'équilibre entre les activités glycogène phosphorylase et enzyme de branchement. D'ailleurs l'inhibition de l'activité de branchement provoque la diminution de la coloration rouge-marron des myofibrilles rouges du muscle *sternomandibularis* bovin, et augmente la coloration bleue, caractéristique de longues chaînes de résidus glucose, des myofibrilles blanches (201). On suppose donc que dans les fibres rouges, l'enzyme de branchement serait très active et que la phosphorylase aurait une activité modérée et inversement dans les fibres blanches.

Toujours dans le but de comprendre le métabolisme du glycogène dans le muscle, le muscle oxydatif dit lent ou rouge (*soleus*) a été comparé au muscle glycolytique dit rapide ou blanc (*extensor digitorum longus*). Ainsi, depuis le premier jour de vie postnatale du Rat, l'activité de branchement et de débranchement augmente pour les deux muscles rapidement et atteint son niveau adulte plus tôt que celle de la glycogène synthétase et phosphorylase (202). A l'état adulte, l'activité de branchement est très importante pour le muscle oxydatif, alors que pour le muscle glycolytique les activités phosphorylase et de débranchement prédominent (203). Pour ces deux muscles, la glycogène synthétase est au même niveau. Le taux de renouvellement du glycogène change fortement avec la fonction musculaire même pour un léger travail et il est plus important dans le muscle oxydatif que dans le muscle glycolytique. Par ailleurs il a été montré que chez l'Homme, un entraînement intensif pendant 12 semaines, provoque une augmentation du taux de glycogène du muscle squelettique (*vastus lateralis*) et de l'activité de branchement par un facteur 2. Un exercice fatigant non épuisant mène à une diminution du taux de glycogène du groupe d'individus entraînés à des valeurs analogues à celles du niveau de

fatigue du groupe non entraîné, ainsi qu'une diminution de l'activité de branchement (204). L'activité des enzymes de biosynthèse du glycogène est hautement corrélée à la concentration en glycogène au repos du muscle squelettique et à la forme physique du sujet. La diminution de la concentration en glycogène du muscle glycolytique du Rat, 12 à 24 h après dénervation, dépend du type de muscle, de l'âge et de l'exercice préalable de l'animal (205). La concentration de ces enzymes du métabolisme du glycogène, dans le muscle glycolytique du Rat de plus de 100 g, est constante pendant la croissance, alors que dans un muscle sensible aux androgènes (*levator ani*) les changements sont probablement influencés par une induction grâce à la testostérone (206). La nature du muscle influence fortement le métabolisme du glycogène. En effet, la concentration en glycogène, les activités glycogène synthétase, phosphorylase et de débranchement du muscle cardiaque ventriculaire gauche de Lapin sont moins élevés que dans le muscle squelettique (207). Par contre l'activité de branchement est au même niveau. Ces enzymes dans le muscle oxydatif sont régulés également plus fortement par les protéines kinases AMPC dépendantes que par les protéines phosphatases (208).

L'enzyme de branchement du muscle squelettique de Rat a été partiellement purifié en 1971 et jusqu'à totale homogénéité en 1980, dans le but d'élucider les bases moléculaires de la glycogénose de type IV (90, 209). Ainsi l'enzyme de branchement placerait de nouveaux points de branchement à 4 résidus glucose du point le plus proche préexistant d'un polysaccharide de départ partiellement branché. L'enzyme de branchement purifié 10000 fois, après précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie sur DEAE-cellulose, fractionnement avec du polyéthylèneglycol 6000, chromatographie sur DEAE-sepharose et gel filtration sur sephadex G150, apparaît homogène sur gel de

polyacrylamide en présence de SDS et est une protéine monomérique de masse moléculaire de 77 kDa, proche de celle des plantes et des bactéries. Petrova et Fillipova ont isolé en 1971 l'enzyme de branchement de muscle de Lapin sous forme d'une ribonucléoprotéine de forme asymétrique, contenant un ARN 2,5S d'une masse moléculaire de 10000 (210-213). Une purification de 1215 fois, après chromatographie sur DEAE-cellulose, révèle: une ribonucléoprotéine (17-20 S) contenant 20% d'ARN ayant une très haute activité de branchement à pH=7,5, à des températures inférieures à 50°C et étant très affine pour l'amidon ( $K_m = 3,6 \times 10^{-9}$  M), et une protéine (6 S) ne contenant pas d'ARN, n'assurant que 20% de l'activité totale de branchement (214-216). La structure primaire de l'ARN a été établie par hydrolyse avec des ribonucléases spécifiques de la guanidine ou des pyrimidines (217). Il est constitué de 31 nucléotides dont 32% sont modifiés (méthylcytidine, méthylguanosine, pseudouridine) et 40% de résidus guanine (218-219). La structure secondaire (220) en épingle à cheveux a été proposée, impliquant 5 paires de GC et une paire de pseudouridine. Les résidus terminaux non appariés, sensibles à l'action de la ribonucléases, participeraient à la fixation à la protéine. En effet une trypsinolyse ménagée donne un produit résistant, riche en lysine, recouvrant 70% de la protéine, 50% de l'activité initiale et tout l'ARN 2,5 S (221). L'ARN attaché fermement protégerait l'enzyme de branchement et empêcherait sa perte d'activité. L'ARN est essentiel à l'activité de branchement, il est présent dans les complexes intermédiaires enzyme-substrat (213). La séparation de l'ARN par passage sur G100 ou après traitement à la ribonucléase provoque une chute de l'activité spécifique (212), la reconstitution du complexe nucléoprotéique restaure cette activité (222). L'ARN agirait donc comme un cofacteur. La formation d'un complexe polysaccharide-ARN, lors de la biosynthèse de glycogène ou d'amidon a

été démontrée (223). L'ARN 2,5 S est spécifique de la réaction de branchement (224). L'enzyme de branchement appartient donc à ce groupe d'enzymes baptisés ribonucléozymes par Balasingam et Ferdinand (225). L'ARN 2,5 S possède de réelles propriétés enzymatiques (226). L'activité de branchement de l'ARN seul demande 20h pour atteindre un maximum, contre 3h pour l'enzyme originale. L'amylopectine est le meilleur substrat pour l'ARN, ensuite l'amidon et le glycogène (227). Par contre l'amylose n'est pas un bon substrat. On peut donc considéré l'ARN 2,5 S comme un ribozyme (228-229). La détection des propriétés catalytiques de l'ARN dans le branchement d'un  $\alpha$ -glucane est le premier cas, où le substrat pour un ribozyme est un polysaccharide plutôt qu'un polyribonucléotide (230). L'interaction polyribonucléotide et carbohydrate est étudiée actuellement.

**c) L'enzyme de branchement du glycogène d'autres tissus animaux.**

Dans le tableau VI, sont récapitulés des travaux, traitant de l'activité de branchement d'autres tissus animaux.

**d) L'enzyme de branchement du glycogène du foie.**

L'enzyme de branchement étant capable de catalyser la synthèse de novo de glycogène a suscité de nombreux travaux sur le développement du foie de Rat foetal. Ainsi l'activité de branchement du foie de Rat foetal augmente en parallèle avec le contenu en glycogène et les activités de la glycogène synthétase et de la phosphorylase jusqu'au 20,5ème jour (242). L'activité de la synthétase a augmente rapidement entre le 18ème et 19ème jour (243). Entre le 20,5ème et 21,5ème jour, l'activité de branchement double alors que celle de la synthétase et de la phosphorylase augmente faiblement. Lorsque le foetus est privé de

Tableau VI (suite):

Source	Informations	Références
(Peau de Rat	: L'activité de branchement du glycogène dans la peau augmente graduellement jusqu'à la 7ème	:
(	: application de naphthalane raffiné, contenant des produits du pétrole, puis diminue jusqu'à un:	237
(	: niveau normal. Ces variations sont corrélées au contenu et à la distribution en glycogène des:	)
(	: structures épithéliales.	)
(Cellules de	: Les cellules sensorielles électroréceptrices contiennent les activités phosphorylase et de	:
(l'organe	: branchement. La modulation de l'activité électrique aurait une influence sur le métabolisme	:
(bulbeux de	: du glycogène. Le glycogène serait une des sources d'énergie nécessaire au maintien de l'acti-	238
( <i>Gnathonemus</i>	: vité électrique de cet organe récepteur cutané.	:
( <i>petersii</i>	:	)
( <i>Electropho-</i>	: 60 jours après dénervation, l'activité de branchement du tissu électrogénique, ayant augmenté:	:
( <i>rus electri-</i>	: demeure élevée.	239
( <i>cus</i>	:	)
( <i>Hymenolepsis</i>	: Les activités de la phosphorylase a et de l'enzyme de branchement sont retrouvées dans les	:
( <i>diminuta</i>	: oncosphères et les cycticoïdes, où le glycogène est localisé. Elles sont très élevées dans	240
(cestoda	: les tissus du parasite, mais sont principalement localisées dans le tissu du parenchyme, réel:	)
(	: réservoir de glycogène. Les molécules de glycogène synthétisées dans le parenchyme des jeunes:	241
(	: proglottides sont faiblement branchées, du fait d'une activité de branchement élevée.	)

corticostéroïdes le taux de glycogène, l'activité de la synthétase diminuent et l'enzyme de branchement perd 50% de son activité. L'administration de cortisol restaure l'activité de branchement et celle de la synthétase b uniquement le taux de glycogène devient supérieur au taux normal (244). Apparemment il n'y a pas de relation entre la synthèse de glycogène dans le foie de Rat foetal et l'activité de la synthétase a. La privation en adrénaline ne provoque aucun changement significatif. Dans le foie d'embryon de Poulet, l'activité de branchement augmente du 8ème au 13ème jour et se stabilise jusqu'à l'éclosion. Lorsque l'on fait une incision au lobe latéral gauche du foie de rat, 30 min après, l'activité de la phosphorylase et de branchement disparaît en périphérie de la blessure, au moment où l'aire nécrotique se développe (245). L'activité mitotique des cellules du parenchyme du foie en bordure du tissu hépatique sain serait précédée de changements métaboliques (32h après l'incision) où seulement les activités de la cytochrome oxidase, phosphorylase et de branchement augmentent. Ainsi ces enzymes joueraient un rôle dans le processus de régénération. D'autres expériences ont permis de montrer que l'enzyme de branchement du foie de Rat, exposé aux rayons X (1200 rads) ou à un mélange de radiations gamma et neutrons est inhibée, alors que la glycogène synthétase est activée (246). On observe, 48h après l'irradiation, de larges dépôts de glycogène dans le foie. Egalement, un choc anaphylactique, provoqué par l'action d'un antigène, mène à la diminution des activités phosphorylase et de branchement dans le foie de porc "guinea", alors qu'un choc, induit par l'histamine, provoque son augmentation (247). On suppose donc que l'histamine exogène active le système: phosphorylase-enzyme de branchement du glycogène dans le foie.

Une chromatographie d'affinité sur glycogène-adipoyldihydrazide-

sepharose-4B permet de retenir la glycogène synthétase, la phosphorylase, l'enzyme de branchement et l'enzyme de débranchement, ainsi que 9 et 5 composants protéiques inconnus du foie et du muscle de Rat, respectivement. La caractérisation de ces composants permettra d'identifier leur rôle possible dans les mécanismes de contrôle du métabolisme du glycogène dans les tissus de mammifères (248).

Bien que l'enzyme de branchement du muscle squelettique de Lapin ait été purifiée et partiellement caractérisée (90, 209), cette source d'enzyme étant de trop faible quantité, elle n'a pas permis une caractérisation de la structure moléculaire de la protéine et une étude détaillée de son mécanisme catalytique. Le foie de Lapin est une source d'enzyme de branchement, car il contient 30 fois plus d'activité de branchement que le muscle pour un poids de tissu donné. Une première purification de l'enzyme de branchement de foie de lapin a été proposée en 1972 (249) et une purification de 590 fois a été publiée en 1983 (250). Ainsi l'enzyme de branchement du foie de Lapin est un monomère dont la masse moléculaire a été évaluée à 71 kDa par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. La masse moléculaire apparente en gradient de sucrose est de 93 kDa est en gel filtration sur sephacryl S-300 est de 52 kDa. Dans la protéine ne sont détectés ni glucosamine, ni mannosamine, ni galactosamine, ni acide sialique, qui seraient à l'origine d'une variation du pHi. Le spectre UV de l'enzyme de branchement est celui d'un simple polypeptide ( $A_{280}/A_{260nm} = 1,56$ ), dépourvu d'ARN. En effet deux formes d'enzyme de branchement I et II de foie de Rat, d'une masse moléculaire de 82 kDa estimée par électrophorèse en SDS, ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur glycogène-adipoyl-dihydrazide-sepharose-4B et glycogène-éthylène-diamine-sepharose-4B respectivement après passage sur hexylamine-

sepharose-4B (251). L'étude du spectre UV et la détection d'ARN sur gel ont permis de prouver que I est associée, comme pour le muscle squelettique de Lapin, à un ARN. Comme II a la moitié de l'activité spécifique de I, l'ARN n'est pas indispensable à l'activité de branchement. Des expériences d'immunodiffusion montrent que l'ARN n'a pas d'effet sur les réactions enzyme-anticorps. L'enzyme de branchement purifié présente différentes formes actives séparées par isoélectrofocalisation. La forme majeure d'un pHi de 5,7 et au moins trois formes mineures ont un pHi de 5,6 à 5,8. Cette même famille de formes d'enzyme de branchement a été retrouvée pour le muscle squelettique (21 U/g de tissu), le cerveau (103 U/g), le foie (660 U/g) et le coeur de Lapin. Le muscle cardiaque et squelettique, le foie et le cerveau de Rat présentent cinq mêmes formes mineures. On retrouve plusieurs formes également pour le foie et le cerveau Humain (252). L'activité de branchement est plus élevée dans les tissus du cortex cérébral de patient atteint d'épilepsie *Lafora* myoclonale, que chez les patients normaux. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide révèle 2 bandes ou plus, présentant l'activité de branchement pour les extraits de cortex normaux et 4 bandes, ayant migré plus rapidement pour ceux atteints de *Lafora*. Apparemment cette épilepsie n'implique pas une déficience de l'enzyme de branchement, mais la protéine semble être plus acide, ce qui signale une anomalie dans un autre système métabolique, impliquant la maturation des protéines. L'enzyme de branchement de Lapin ou de Rat ne semble pas être sous des formes tissu-spécifiques. L'origine des différentes formes mineures n'est pas encore élucidée. En effet l'enzyme de branchement n'est pas complexé avec des sucres ou un ARN et il est peu probable que les formes diffèrent d'un degré de phosphorylation (252).

e) La glycogénose de type IV.

La glycogénose de type IV est une maladie rare de stockage du glycogène, congénitale, fatale, elle est due à une déficience de l'enzyme de branchement du glycogène. Plus de 15 enfants ont été signalés atteints par cette forme de maladie (253-257). Ils semblent être normaux à la naissance, mais ont un faible développement, une atrophie musculaire et une hypotonie (258). On observe une hépatomégalie dans les premiers mois et une splénomégalie, un taux élevé de transaminases et une cirrhose progressive, menant à la mort à la deuxième année. L'accumulation d'un polysaccharide anormal dans le coeur mène également à une dilatation cardiaque dans certains cas (253-254, 259). Le taux de glycogène reste normal, mais sa structure est anormale.

Illingworth et Cori, après l'étude du glycogène d'un patient original d'Andersen (3, 256), suggèrent une déficience de l'enzyme de branchement (253, 260-261). Brown et Brown observent cette déficience dans le foie et les leucocytes d'une petite indienne de 15 mois atteinte d'"amylopectinosis". Elle est également retrouvée dans le muscle, les fibroblastes de peau en culture (262-264). Un glycogène incomplètement branché, ressemblant à l'amylopectine, de faible masse moléculaire: 8000-15000 est constitué de longues chaînes non branchées; on évalue des chaînes de 17 à 18 résidus glucose par point de branchement (90, 265). Il diffère de l'amylopectine, car ses chaînes internes sont plus courtes et ses chaînes extérieures sont plus longues (266). Il peut être branché *in vitro* par l'enzyme de branchement purifié de muscle de Lapin (90). Les tissus de type IV n'ont que 0 à 10% d'activité de branchement. Comment un polysaccharide faiblement branché peut-il être synthétisé alors qu'aucune activité de branchement n'a été détectée dans le cas M.G. (261, 267)? Il a été suggéré que les tissus de type IV contiennent une deuxième enzyme de branchement, moins active, utilisant un autre

substrat spécifique et qui est sous un contrôle génétique séparé (261, 254), ou une enzyme foetal, dont l'activité diminue à la naissance, impliquant une déficience partielle plutôt que complète (258) ou une enzyme de débranchement ayant une activité réversible (266). Un élément de réponse a été apporté grâce aux travaux de Brown et Brown (268). Les cellules de type IV ont une réaction croisée moins importante avec l'anticorps IgG de Lapin dirigé contre l'enzyme de branchement purifié que les cellules normales. Les fibroblastes d'enfants atteints et de leurs parents hétérozygotes contiendraient une quantité de protéines inactives, mais qui réagissent avec les anticorps.

La glycogénose de type IV serait une maladie génétique autosomique récessive (264, 269). Le traitement est celui préconisé pour les insuffisances hépatiques (263, 269). La détection de porteurs hétérozygotes de la maladie et un diagnostic anténatal des foetus à risque est maintenant possible (268).

### III. HYPOTHESES DE TRAVAIL

#### 1) Présentation et situation du sujet

Parce que la levure est largement reconnue comme un microorganisme eucaryote idéal pour les analyses biochimiques et génétiques, nous avons choisi d'étudier "l'enzyme de branchement du glycogène de la levure de boulangerie, *Saccharomyces cerevisiae*". Afin d'aborder l'étude de l'organisation et du fonctionnement des cellules supérieures, il nous faut comprendre le fonctionnement d'un, ou plusieurs, des organismes eucaryotes inférieurs, de manière aussi précise d'*Escherichia coli*.

Nous avons choisi de travailler sur la levure, mais chez un autre eucaryote inférieur, *Neurospora crassa*, l'enzyme de branchement a été étudiée. L'enzyme de branchement de *Neurospora crassa* a une masse moléculaire de 84800 Da. L'enzyme est constituée de 749 acides aminés et

d'un polysaccharide de 15 résidus glucose (270). Elle est active à pH=8 et à 27°C. Son point isoélectrique est de 5,6 et elle est stable entre pH=7,3-8,1 et à des températures inférieures à 35°C. (271). Chez *Neurospora crassa*, un mutant déficient pour l'enzyme de branchement présente une morphologie dite coloniale (colonies compactes), quand il croît sur sucrose ou maltose, mais change partiellement sa morphologie en une croissance filamenteuse en présence de substrats branchés: amidon de pomme de terre ou isomaltose (272). Après passage sur DEAE-cellulose, on trouve une activité de branchement chez le mutant, par élimination d'un inhibiteur thermolabile de plus de 100 kDa, qui inhibe également la glycogène synthétase. L'action combinée de l'enzyme de branchement et de la glycogène synthétase donne un produit de synthèse, ressemblant au glycogène, mais les chaînes sont différentes. Son action sur l'amylopectine de pomme de terre donne un polysaccharide ressemblant au glycogène, mais plus branché dont les chaînes ont une longueur de 6 unités glucose (273). Les constantes de dissociation de l'enzyme de branchement pour le glycogène d'huitre et l'amylopectine de pomme de terre sont de 13,3 et 0,355 mM respectivement. L'enzyme de branchement de *Neurospora crassa* a plus d'affinité pour les substrats ayant de longues chaînes externes. La longueur de chaîne requise pour le branchement est de plus de 12 résidus glucose (274).

Notre travail a été effectué sur la levure, car la levure constitue un système génétique simple. Elle contient trois fois et demie plus d'ADN dans son capital génétique haploïde qu'*Escherichia coli* alors que *Drosophila* en contient 25 fois plus et que les cellules de vertébrés supérieurs en contiennent au moins 1000 fois plus. La levure est un bon "outil génétique", car elle est stable sous forme haploïde ou diploïde, sa croissance est rapide, elle demeure viable avec un grand nombre de marqueurs, elle permet d'isoler des mutants et la dissection de tétrades

est possible. La génétique classique permet d'identifier les mutations par la sélection des individus présentant de nouvelles propriétés qui seront analysées par croisement génétique. Plus récemment, l'ADN de levure peut être étudié grâce à la biologie moléculaire. Ainsi les gènes de structure peuvent être clonés par complémentation de mutation. Des plasmides peuvent être introduits dans les cellules de levure, comme molécules réplicatives ou par intégration dans le génôme. L'effet d'une mutation peut donc être directement étudié en réintroduisant une molécule d'ADN mutée dans la levure à sa localisation chromosomique propre ou comme élément d'un chromosome artificiel.

Un autre facteur en faveur de l'étude de la levure est d'ordre économique.

Le glycogène et le tréhalose (275) sont les deux réserves hydrocarbonées de la levure. La concentration en glycogène peut atteindre 40% du poids sec (276). Le glycogène s'accumule lorsque la croissance cellulaire ralentit ou lors de la sporulation (277-279). La synthèse de glycogène s'intensifie en début de phase stationnaire, lors de la croissance en milieu glucosé riche (280-283). L'accumulation commence quand 50% du glucose du milieu a été consommé (282, 284). Comme chez les bactéries, le glycogène s'accumule aussi en carence azotée (282, 285-288), en soufre ou en phosphate (282). La présence d'oxygène augmente le taux de glycogène: en aérobiose, il est 2 à 3 fois plus élevé qu'en anaérobiose (289-291). Le glycogène constituerait le réservoir énergétique nécessaire à la synthèse des enzymes respiratoires et gluconéogéniques au cours de la phase stationnaire (292). Il assurerait le maintien en survie des levures soumises à de longues carences nutritionnelles. Cependant la survie des cellules dépend de la présence de tréhalose (282). Une excellente viabilité et une meilleure activité boulangère sont obtenues en présence de fortes concentrations

en tréhalose (289, 293). Enfin, le glycogène serait une source de glucose pour la synthèse de tréhalose, car la dégradation de glycogène libère autant de glucose nécessaire à la synthèse du tréhalose (282, 284). Cependant certains auteurs proposent une synthèse du tréhalose à partir de précurseurs gluconéogéniques (294, 295).

L'enzyme de branchement, la moins étudiée des enzymes intervenant dans le métabolisme du glycogène, a été analysée chez les plantes, les bactéries et les mammifères. L'enzyme de branchement de levure de boulangerie ne compte que 7 publications: 5 dans les années 1960 et 2 en 1989. Isolée par fractionnement à  $-5^{\circ}\text{C}$  en présence d'un mélange éthanol 50%; citrate de sodium 0,01 M pH=6,8, l'enzyme de branchement de levure a pu être étudiée (296-299). L'enzyme de branchement branche l'amylose à un pH optimum de 7,0 à  $20^{\circ}\text{C}$  et est inhibée par le chlorure de mercure (0,5 mM). L'activité de branchement est caractérisée par une diminution importante du pouvoir de coloration à l'iode et de la limite de  $\beta$ -amylolyse du substrat sans production de groupements réducteurs libres. L'enzyme de branchement agit sur l'amylose pour donner un polysaccharide de type amylopectine, puis en ajoutant l'enzyme, l'amylopectine est convertie en un polysaccharide de type glycogène. L'enzyme n'introduit pas de nouveaux points de branchement dans le glycogène. Le mécanisme de l'enzyme de branchement sur une  $\beta$ -dextrine, ayant des chaînes de 2 à 3 résidus glucose, implique la rupture d'une liaison  $\alpha$ -1,4 d'une chaîne intérieure et le transfert d'un segment auquel est attachée une petite chaîne de 2 à 3 résidus glucose; le branchement de ce segment ramifié en  $\alpha$ -1,6 s'effectue de telle sorte qu'une faible proportion de chaînes extérieures nouvellement formées contiennent plus que 3 résidus glucose (300). L'enzyme de branchement de levure transporte donc aussi bien des chaînes branchées, que linéaires, lors de la conversion de polysaccharides de type amylopectine en type

glycogène. Récemment l'enzyme de branchement de la levure de boulangerie a été partiellement purifiée après précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur DEAE-sephacel (8). L'enzyme partiellement purifiée est utilisée dans la modification d'amidons dans le but de commercialiser des produits aux propriétés fonctionnelles nouvelles (5).

## 2) Buts et intérêts du travail

### a) Etude biochimique de l'enzyme de branchement de la levure.

Le but du travail a été de doser l'activité de branchement du glycogène au cours de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu glucosé. L'enzyme de branchement ne s'exprime en effet pas de façon constitutive au cours de la croissance, mais apparaît précisément en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire, moment où le glycogène s'accumule dans les cellules de levure. La purification partielle de l'enzyme de branchement à ce stade a permis une caractérisation biochimique de l'enzyme.

Comme l'enzyme de branchement agit de concert avec la glycogène synthétase pour assurer la synthèse de glycogène, une première hypothèse a été éprouvée: la régulation de l'enzyme de branchement serait calquée sur la régulation post-traductionnelle de la glycogène synthétase.

La régulation de l'enzyme de branchement n'étant pas en faveur d'un mécanisme de phospho-déphosphorylation, une deuxième hypothèse a été proposée: la régulation de l'enzyme de branchement serait transcriptionnelle.

### b) Etude génétique de l'enzyme de branchement de la levure.

Afin d'apporter la preuve que l'enzyme de branchement est régulée transcriptionnellement, il a été nécessaire d'étudier les ARNm du gène, codant pour l'enzyme de branchement de levure. Ainsi pour la première

fois, le gène codant pour l'enzyme de branchement d'un eucaryote a été cloné par complémentation de mutation d'une levure mutante, déficiente pour l'enzyme de branchement. L'électrophorèse en champs pulsés et la cartographie de restriction ont permis de localiser chromosomiquement et de caractériser génétiquement le gène de l'enzyme de branchement. La séquence du gène de l'enzyme de branchement du glycogène de levure a été commencée également dans ce travail.

# **MATERIEL ET METHODES**

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1) Présentation des souches utilisées

a) **Les souches bactériennes utilisées.**

Les souches suivantes d'*Escherichia coli* ont été utilisées au cours de ce travail. Elles sont déficientes en endonucléase R, afin de les rendre transformables par des plasmides non modifiés.

\* *Escherichia coli* HB 101 (301)

$F^-$  pro leuB thi lac str<sup>r</sup> end I<sup>-</sup> recA hsr<sup>-</sup><sub>k</sub> hsm<sup>-</sup><sub>k</sub>

La mutation leuB peut être complémentée par le gène Leu2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

\* *Escherichia coli* TG 1 (302)

SupE hsd 5 thi (lac-proAB) F'[traD 36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lac Z M15]

b) **Les souches de levures utilisées.**

\* *Saccharomyces cerevisiae* JC 482 (levure sauvage envoyée par K.

Tatchell)

Mata leu2 ura 3-52 his4

\* *Saccharomyces cerevisiae* JM 19 (levure mutante envoyée par

K.Tatchell)

Mata leu2 ura 3-52 his4 glycogen defect

JM 19 a été obtenue par la mutagenèse à l'éthane-méthane-sulfonate de la souche JC 482 et sélectionnée comme levure mutante déficiente dans l'accumulation de glycogène. Ce travail a été effectué par J. Manupello.

\* *Saccharomyces cerevisiae* cdc 35 (levure envoyée par A. Petitjean)

$\alpha$  cdc35-10 arg1 et  $\alpha$  cdc35-10 arg1

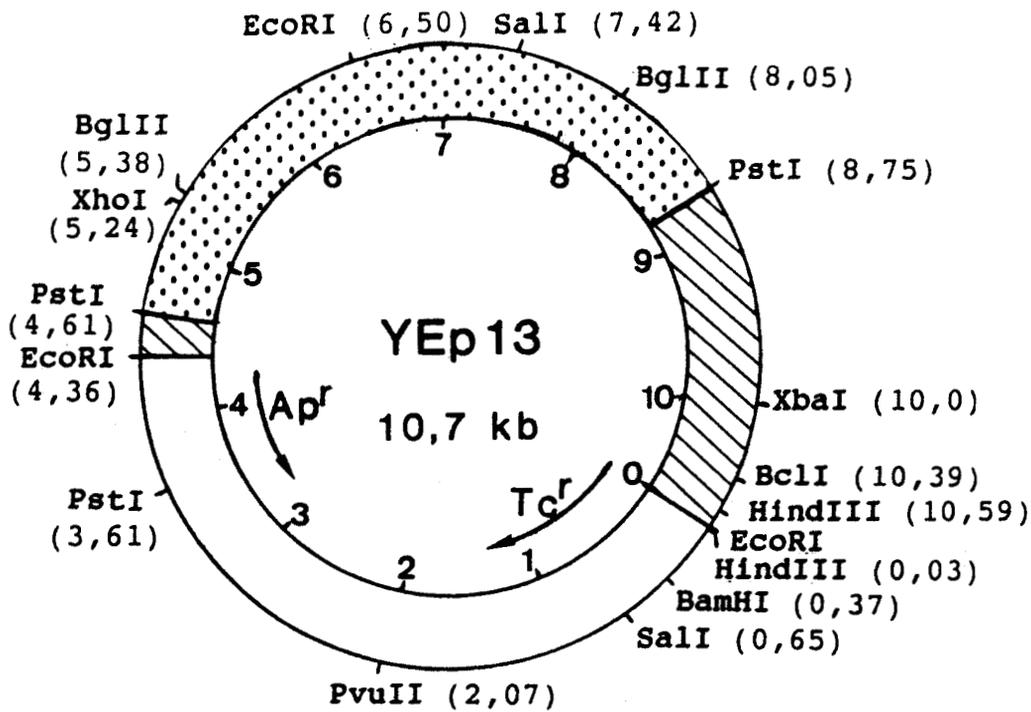


Fig. 10: Carte de restriction du plasmide YEp13.

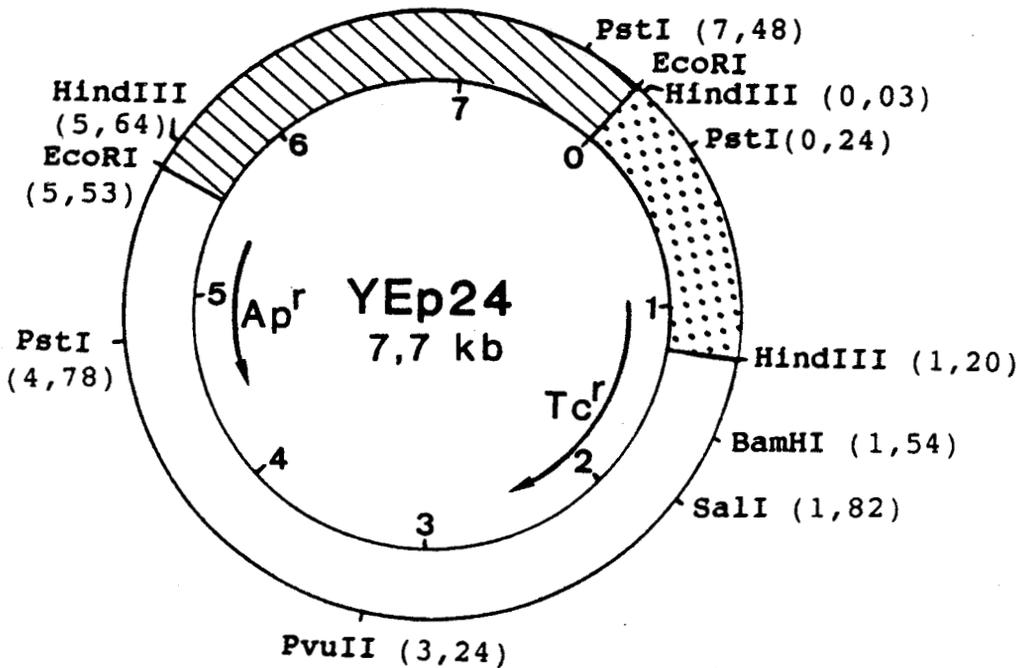
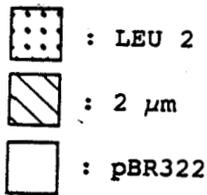
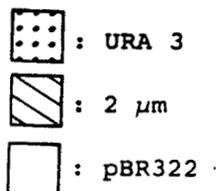


Fig. 11: Carte de restriction du plasmide YEp24.



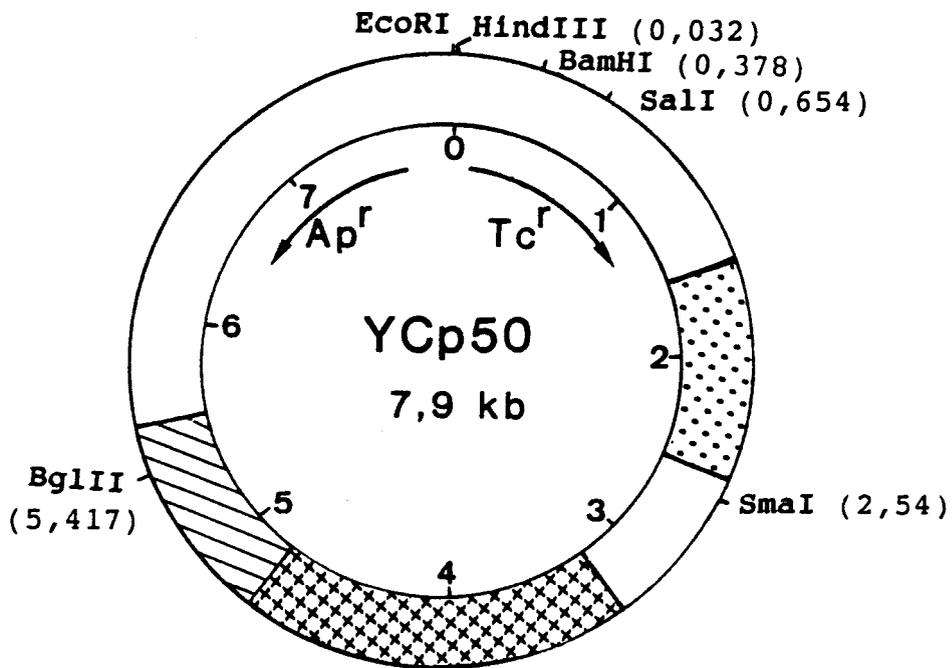


Fig. 12: Carte de restriction du plasmide YCp50.

-  : pBR322
-  : URA 3
-  : ARS 1
-  : CEN 4

c) YCp50 (Fig. 12)

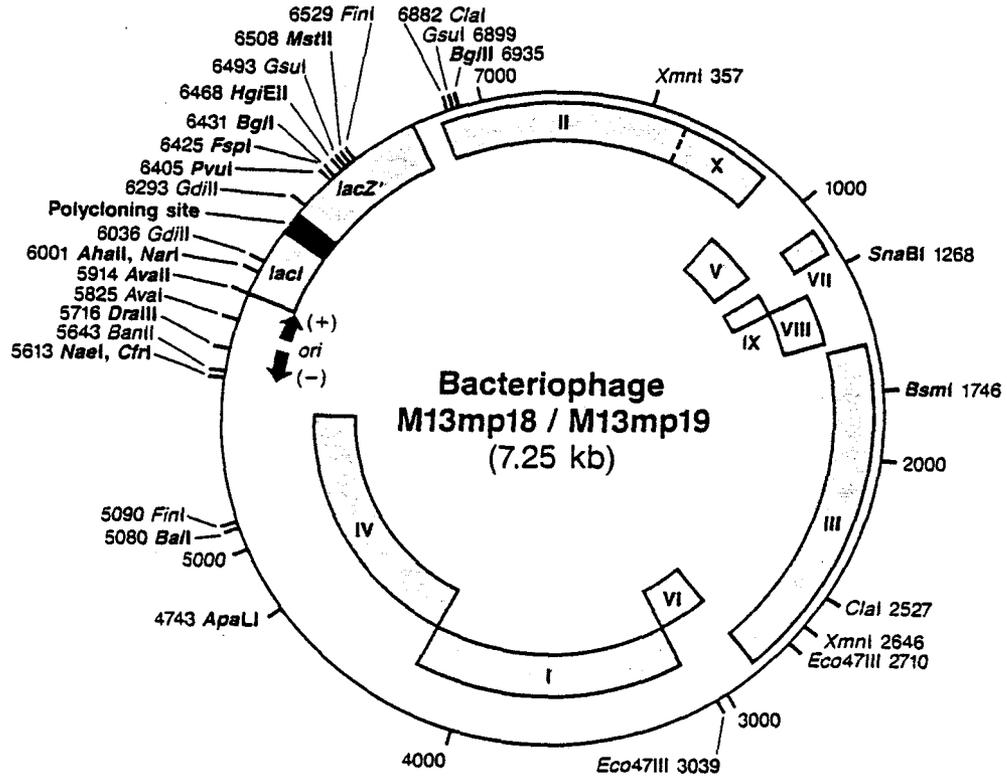
Le plasmide YCp50 d'une taille de 7,95 kb a été construit par M. Johnston et R.W. Davis (communication non publiée). Sa construction est basée sur les séquences de pBR322, le gène URA3 (309), CEN4 (310) et ARS1 (Autonomous Replication Site)(311-312). YCp50 contient une séquence de réplication chromosomique plutôt que l'ADN 2  $\mu$ m. La présence d'une séquence centromérique permet d'éliminer les inconvénients des plasmides multicopies tels YEp13 ou YEp24 : impossibilité de cloner un gène toxique quand il est surexprimé tel le gène de l'actine, de l' $\alpha$ -tubuline (313) ou de KAR1 (314), instabilité dans la levure et impossibilité d'évaluer les facteurs de régulation d'un gène surexprimé. YCp50 est généralement à 1 ou 2 copies par cellule et est stable lors de la mitose (moins de 1% de perte par cellule et par génération)(315).

d) M13 mp18 et M13 mp19 (Fig. 13)

Les bactériophages M13 mp18 et M13 mp19 (316-321) servent de vecteur de clonage pour les réactions de séquence.

La forme répllicative du M13 est un ADN circulaire double-brin. Il peut être isolé de bactéries infectées, utilisé pour le clonage de fragments d'ADN et réintroduit chez *Escherichia coli* par transfection. Les cellules infectées libèrent des particules phagiques, lesquelles contiennent un ADN simple-brin. Cet ADN isolé en grande quantité est utilisé comme matrice pour le séquençage.

Pour les bactériophages M13 mp18 et M13 mp19, ont été introduits deux types de séquence dans une région appelée séquence intergénique. Le premier est un fragment de l'opéron lactose d'*Escherichia coli* contenant la région régulatrice et l'information codante pour les 146 premiers acides aminés du gène de la  $\beta$ -galactosidase (Z). La portion aminotermine de la  $\beta$ -galactosidase (peptide  $\alpha$ ) produite dans les cellules infectées est capable de compléter (322) le gène défectueux



**M13mp18**

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	7	8	
Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCG	AGC	TCG	GTA	CCC	GGG	GAT	CCT	CTA	GAG	TCG	ACC	TGC	AGG	CAT	GCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC
				EcoRI		SacI		KpnI		SmaI XmaI		BamHI		XbaI		SalI AccI HincII		PstI		SphI		HindIII				

**M13mp19**

1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	5	6	7	8	
Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGG	TCG	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CGG	GTA	CCG	AGC	TCG	AAT	TCA	CTG	GCC
				HindIII		SphI		PstI		SalI AccI HincII		XbaI		BamHI		SmaI XmaI		KpnI		SacI		EcoRI				

Fig. 13: Carte de restriction des vecteurs M13 mp18 et M13 mp19.

pour la  $\beta$ -galactosidase présent sur l'épisome F de la cellule hôte. Cette  $\alpha$ -complémentation produit une  $\beta$ -galactosidase active, qui donne une coloration bleue, quand le phage et les cellules sont cultivées en présence de l'inducteur isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) et le substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactoside). Le second type de séquence est un fragment d'ADN, le "polylinker", contenant plusieurs sites de restriction uniques pour le clonage, introduit dans la portion aminoterminal du gène de la  $\beta$ -galactosidase. Cette insertion n'affecte pas la possibilité au peptide  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase de compléter, mais l'introduction d'un ADN étranger détruit la complémentation. Ainsi les phages, contenant un ADN étranger, destiné à être séquencé, donnent des plages de lyse blanches en présence d'IPTG et de X-gal.

Les sites d'insertion de M13 mp18 et M13 mp19 sont opposés, ce qui permet de séquencer dans le sens 5'-3' et 3'-5' le fragment cloné.

## II. METHODES

### 1) Les milieux de culture

L'eau utilisée pour les milieux de culture est de l'eau desionisée.

#### a) Les milieux de culture pour les bactéries.

\* Milieu complet L (Luria)

Le milieu liquide contient par litre: 10 g de Bactopeptone (Difco);  
5 g de Yeast extract (Difco) et 5 g de NaCl.

\* Milieu LB (Luria-Bertoni)

Le milieu liquide contient par litre: 10 g de Bactotryptone; 5 g de Yeast extract et 5 g de NaCl. Le pH est ajusté à 7,5 par NaOH.

\* Milieu LB ampicilline

Après stérilisation, on ajoute l'ampicilline à une concentration de 25 µg/ml dans le milieu LB.

\* Milieu KCl/MgSO<sub>4</sub>

Le milieu liquide contient par litre: 20 g de Bactotryptone; 5 g de Yeast extract; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgSO<sub>4</sub> 0,4% (ajouté au moment de l'emploi à partir d'une solution à 20%).

\* Milieu KCl/MgSO<sub>4</sub>/Glucose

Le milieu liquide est le milieu KCl/MgSO<sub>4</sub>, auquel on ajoute par litre 20 ml de Glucose 2 M stériliment.

\* Milieu M9 minimum

Le milieu solide contient par litre:

- 15 g d'agarose dans 900 ml d'eau
- 100 ml de sels M9 10X
- 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M
- 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M
- 1 ml de thiamine HCl 1 M
- 10 ml de glucose 20%

Chaque constituant est stérilisé séparément, puis mélangé après refroidissement, stérilement.

\* Sels M9 10X

La solution contient par litre: 60 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 30 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 g de NH<sub>4</sub>Cl et 5 g de NaCl. Elle est conservées à 4°C.

\* Milieu TY 2X

Le milieu liquide contient par litre: 16 g de Bactotryptone, 10 g de Yeast extract et 5 g de NaCl.

Les milieux solides contiennent en plus 15 g d'agar-agar par litre.

\* Boîtes H

Le milieu solide contient par litre: 10 g de Bactotryptone, 8 g de NaCl et 12 g d'agar.

\* Top agar H

Le milieu solide contient par litre: 10 g de Bactotryptone, 8 g de NaCl et 8 g d'agar.

Les milieux de culture pour bactéries sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 min. à 120°C.

b) Les milieux de culture pour les levures.

\* Milieu complet YPAD

Le milieu liquide contient par litre: 10 g de Yeast extract; 20 g de Bactopeptone (Difco); 20 g de glucose et 0,003% d'adénine-sulfate.

\* Milieu YPG

Le milieu liquide contient par litre: 10 g de Yeast extract; 20 g de Bactopeptone et 3% (v/v) de glycérol.

Le milieu ne contient pas de source de carbone fermentescible, il ne permet donc pas la croissance des levures  $\varphi^-$  ou petites.

\* Milieu SD

Le milieu liquide contient par litre: 6,7 g de Bacto-yeast-nitrogen-base sans acides aminés (Difco) et 20 g de glucose.

\* Milieu SDG

Le milieu liquide contient par litre: 6,7 g de Bacto-yeast-nitrogen-base sans acide aminé; 3% de glycérol et 1 g de glucose.

\* Milieu SG

Le milieu liquide contient par litre: 6,7 g de Bacto-yeast-nitrogen-base sans acide aminé et 3% de glycérol.

\* Milieu complet minimum

Les constituants du tableau VII sont additionnés aux milieux SD, SG ou SDG pour donner les milieux SDC, SGC ou SDGC, respectivement. Les solutions stocks stériles sont conservées à 4°C, sauf indications particulières.

**Tableau VII: Constituants entrant dans la composition du milieu complet minimum.**

(	Constituant	: finale (mg/l)	: Concentration : Pesée pour 100 ml: de solution stock:	Volume (ml) de solutin stock	)
(	:	:	:	: pour 1 litre	)
(	adénine-sulfate	: 20	: 200 mg *	: 10	)
(	uracile	: 20	: 200 mg *	: 10	)
(	L-tryptophane	: 20	: 1 g	: 2	)
(	L-histidine-HCl	: 20	: 1 g	: 2	)
(	L-arginine-HCl	: 20	: 1 g	: 2	)
(	L-méthionine	: 20	: 1 g	: 2	)
(	L-tyrosine	: 7,5	: 50 mg <sup>a</sup>	: 15	)
(	L-leucine	: 30	: 1 g	: 3	)
(	L-isoleucine	: 30	: 1 g	: 3	)
(	L-lysine-HCl	: 30	: 1 g	: 3	)
(	L-phénylalanine	: 50	: 1 g *	: 5	)
(	L-glutamate	: 100	: 1 g *	: 10	)
(	L-aspartate	: 100	: 250 mg <sup>*a</sup>	: 40	)
(	L-valine	: 150	: 3 g	: 5	)
(	L-thréonine	: 200	: 4 g <sup>*a</sup>	: 5	)
(	L-sérine	: 400	: 8 g	: 5	)

\* : à conserver à température ambiante.

<sup>a</sup> : à stériliser par filtration et à ajouter au milieu après autoclavage.

Les milieux solides contiennent en plus 20 g d'agar-agar par litre.

Les milieux sont stérilisés par autoclavage 20 min. à 120°C. Les milieux contenant du glucose sont autoclavés 30 min. à 105°C.

## 2) Conservation des souches

### a) **Conservation des souches bactériennes.**

5 ml de préculture bactérienne sont additionnés à 1 ml de glycérol stérile et conservés à -70°C.

### b) **Conservation des souches de levures.**

Les souches sont cultivées sur milieu solide YPAD. Les cellules de levure sont prélevées avec un batonnet stérile et mises en suspension dans 1 ml de glycérol à 15% (v;v) stérile, puis conservées à -70°C indéfiniment.

Les levures sont également conservées pendant 2 mois à 4°C dans des tubes inclinés gélosés en YPAD.

## 3) Dosage enzymatique chez *Saccharomyces cerevisiae*

### a) **Préparation d'extraits enzymatiques.**

Les extraits sont réalisés à partir d'une culture en YPAD, à 30°C sous agitation, de levures à différents temps de la croissance, depuis le début de la phase exponentielle, jusqu'en phase stationnaire.

Les cellules sont centrifugées 5 min. à 2300 g et lavées deux fois par 50 ml d'eau stérile, à froid. Les cellules sont reprises par un volume v d'eau stérile, tel que la concentration soit de  $10^9$  cellules/ml. Les enzymes sont libérés par éclatement des levures à la presse de French à 12000 psi.

La suspension est transférée dans des tubes "Eppendorf" et les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 5 min. à 10000 g à 4°C. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique.

**b) Préparation d'extraits enzymatiques à partir de la souche mutante *cdc 35* (323).**

Les levures mutantes *cdc 35* sont cultivées en milieu YPAD à 26°C jusqu'à ce que la densité cellulaire soit de  $5 \times 10^7$  cellules /ml. Les cellules sont récoltées après 5 min. de centrifugation à 2300 g et sont lavées deux fois avec de l'eau et resuspendues à la concentration de 10 mg de poids frais de levure/ml dans une solution contenant: succinate de sodium 50 mM; KCl 8 mM;  $MgCl_2$  5 mM;  $KH_2PO_4$  2 mM; thiamine 5  $\mu$ M; pH=5,5 ajusté avec HCl. Les cellules sont incubées pendant une heure à 26°C ou 35°C avant l'addition du 2-deoxy-glucose à une concentration finale de 100 mM et laissées encore 30 min à 26°C ou 35°C. Les cellules sont alors collectées rapidement sous vide sur des filtres de nitrocellulose (47 mm de diamètre; 0,45  $\mu$ m de porosité) et sont raclées avec une spatule, puis congelées à -70°C, ainsi les modifications métaboliques (324) et enzymatiques sont minimisées. Les cellules sont finalement éclatées à la presse de French comme précédemment décrit dans 5 ml de tampon citrate de sodium 0,1 M pH=7.

**c) Dosage de l'enzyme de branchement du glycogène (35).**

Le mélange réactionnel contient, dans un volume final de 20  $\mu$ l: citrate de sodium 0,1M pH=7; AMP 1mM;  $\alpha$ -D-[ $^{14}$ C]glucosyl-1-phosphate 50mM ( $5 \times 10^4$  c.p.m./ $\mu$ mol) (Amersham UK); 40  $\mu$ g phosphorylase a de muscle de lapin (Boehringer Mannheim, FRG) et 10 à 60  $\mu$ l d'extrait enzymatique. La réaction commence par addition de l' $\alpha$ -D-glucosyl-1-phosphate.

La réaction est réalisée 30 min. à 30°C. On arrête la réaction par addition de 1ml d'acide trichloroacétique à 10%, dans la glace.

L' $\alpha$ -glucane synthétisé *de novo* est récupéré par filtration sur filtres GF/C (Whatman Springfields Mills, England), lavés avec 20 ml d'acide trichloroacétique à 5%, 10 ml d'eau distillée et séchés avec 5 ml d'éthanol à 90%.

Une unité d'activité d'enzyme de branchement est définie comme l'incorporation d'1  $\mu$ mol de D-glucose dans le D-glucane par minute. Les contrôles ne contenant pas d'enzyme de branchement, ou de l'enzyme dénaturée 10 min à 100°C, incorporent moins de 20 nmol de D-glucose dans la fraction D-glucane.

**d) Dosage de la glycogène synthétase de levure (323).**

Le mélange réactionnel contient, dans un volume final de 200  $\mu$ l: glycylglycine 50 mM pH=7,4; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM; EDTA 2,5 mM; UDP-[6-<sup>3</sup>H]glucose 0,25 mM (35 x 10<sup>3</sup> c.p.m./nmol) (Amersham UK); 1% de glycogène de muscle de Lapin (Boeringer Mannheim, FRG) et 10 à 60  $\mu$ l d'extrait enzymatique.

Après 30 min à 30°C, la réaction est arrêtée par précipitation à l'éthanol à 60%. Les filtres GF/C sont lavés avec 30 ml d'éthanol à 60%.

Une unité d'activité de la glycogène synthétase est le taux d'enzyme, qui catalyse la conversion d'1  $\mu$ mol d'UDPG par minute.

**e) Dosage de la glycogène phosphorylase de levure (323).**

L'activité de la glycogène phosphorylase est mesurée dans le sens de la synthèse en utilisant le glycogène de muscle de Lapin comme amorce (325).

Le mélange réactionnel contient, dans un volume final de 200  $\mu$ l: succinate de sodium 50 mM pH=5,8; EDTA 2,5 mM; [U-<sup>14</sup>C]glucose-1-phosphate

5 mM (300 c.p.m./nmol) (Amersham, UK) et 1% de glycogène de muscle de Lapin.

Après 30 min d'incubation à 30°C, la réaction est arrêtée par précipitation à l'éthanol à 70%. Les filtres GF/C sont lavés avec 30 ml d'éthanol à 70%.

Une unité d'activité de glycogène phosphorylase est le taux d'enzyme, qui catalyse la conversion d'1  $\mu$ mol de glucose-1-phosphate par minute.

Le taux d'incorporation de radioactivité pour ces dosages est déterminé par un compteur à scintillation liquide (Beckman LS 3801).

#### **f) Dosage des protéines totales.**

La méthode utilisée pour la détermination de la quantité de protéines totales dans les extraits est celle de Bradford (326). Elle est fondée sur la liaison aux protéines du colorant Bleu de Coomassie G-250, qui provoque un déplacement de son maximum d'absorption de 465 à 595 nm. La mesure de  $A_{595\text{nm}}$  permet de calculer la quantité de protéines dans l'extrait.

Une courbe étalon est établie à partir de sérum albumine bovine.

#### **g) Dosage du glycogène (327).**

Le glycogène total de chaque extrait enzymatique est déterminé avant centrifugation à 10000 g. Le glycogène est hydrolysé en glucose à pH=4,6 en présence de 200  $\mu$ l d'amyloglucosidase (14 U/ml) à 57°C, 15 min. Le D-glucose obtenu est dosé enzymatiquement par l'action de l'hexokinase et de la glucose-6-phosphate-déhydrogénase à pH=7,6 (328) (kit de dosage Boehringer Mannheim, FRG).

**h) Spectroscopie d'absorption du polysaccharide branché synthétisé *in vitro*.**

Le mélange réactionnel contient dans un volume final de 50  $\mu$ l: AMP 2 mM; Glucose-1-Phosphate 75 mM; phosphorylase a de muscle de Lapin 40  $\mu$ g et 10 à 30  $\mu$ l d'extrait enzymatique. La réaction est réalisée 10 à 30 min à 30°C et arrêtée par l'addition de 20  $\mu$ l de réactif de Lugol (iode 0,5 g; iodure de potassium 1 g qsp 100 ml) et de 1 ml d'eau. Le spectre du polysaccharide branché formé est alors réalisé sur un spectrophotomètre Hitachi U-2000 entre 400 et 700 nm.

**4) Purification de l'enzyme de branchement du glycogène de levure (8).**

Les cellules sont obtenues à partir d'un litre de culture en YPAD de JC 482 à la densité de  $3 \times 10^8$  cellules/ml. Les cellules sont récupérées par centrifugation de 5 min à 2300 g et lavées deux fois dans de l'eau stérile. Les cellules sont resuspendues dans 60 ml de Tris-HCl 50 mM pH=7,5; DTT 1 mM et éclatées par passage à la presse de French à 15000 psi. La suspension est centrifugée 30 min à 10000 g, à 4°C. Les protéines sont concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium 56%. Après centrifugation de 30 min à 10000 g à 4°C, le culot est repris dans 5 ml de tampon Tris-HCl 50 mM pH=7,5; DTT 1 mM et dialysé une nuit à 4°C.

L'extrait dialysé est purifié par chromatographie échangeuse d'anion. Il est chargé sur un colonne de 2 x 20cm de DEAE-Trisacryl (IBF) avec un gradient de NaCl de 0 à 0,5 M. L'activité de l'enzyme de branchement, le glycogène et les protéines sont dosées sur les fractions de 3 ml.

5) Caractérisation biochimique de l'enzyme de branchement de levure.

Afin de déterminer la masse moléculaire et le point isoélectrique de l'enzyme de branchement du glycogène partiellement purifiée, différents types d'électrophorèse des protéines ont été utilisées.

a) **Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS**

(329-330).

1 à 10 µg de protéines dans du tampon d'échantillon 1X (Tris-HCl 0,05 M pH=8,9; SDS 2%; glycérol 4%) sont déposés sur le gel de concentration (acrylamide 5%; N, N'-méthylène bis (acrylamide) 0,13 %; Tris-HCl 0,1 M pH=6,8; SDS 0,1%; TEMED 15 µl pour 20 ml de gel; persulfate d'ammonium 0,075%) et séparés dans le gel de séparation (acrylamide 10%; N, N'-méthylène bis (acrylamide) 0,25%; Tris-HCl 0,3 M pH=8,9; SDS 0,1%; TEMED 25 µl pour 50 ml de gel; persulfate d'ammonium 0,05%). L'électrophorèse s'effectue dans une cuve (Bio-Rad) en tampon Tris 0,025 M; glycolle 0,192 M; SDS 0,1% pH=8,6 pendant 5 heures à 30 mA. Le gel est coloré par 200 ml de solution de coloration (Bleu brillant de Coomassie 0,25%; méthanol 50%; acide acétique 10%) pendant une heure et décoloré pendant au moins 15 heures dans du décolorant (méthanol 5%; acide acétique 7,5%).

Le gel est calibré grâce au dépôt de marqueurs de poids moléculaires: 94000 Da (phosphorylase b de muscle de Lapin); 67000 Da (serum albumine bovine); 43000 Da (ovalbumine); 30000 Da (anhydrase carbonique d'érythrocyte bovin); 20100 Da (inhibiteur tryptique de soja); 14000 Da ( $\alpha$ -lactalbumine de lait de Vache)(Pharmacia).

**b) Electrophorèse en gel avec gradient 8-25% en polyacrylamide en présence de SDS, selon le système "Phast"(Pharmacia).**

200 à 250 ng de protéines dans 1  $\mu$ l de tampon d'échantillon 1X (Tris-HCl 0,05 M pH=8,9; SDS 2%) sont déposées sur un gel de 0,45 mm d'épaisseur (Phast Gel Gradient 8-25), contenant une zone de concentration de 13 mm (4,5%T, 3%C) et une zone de 32 mm constituée d'un gradient continu 8-25%. Le tampon d'électrophorèse (Phast Gel SDS Buffer) contient: Tris 0,2 M; tricine 0,2M; SDS 0,55%; pH=7,5. L'électrophorèse est programmée selon la méthode "SEP 2-1": 250 v, 10 mA, 3.0 W, 15°C, 30 min. Le gel est coloré automatiquement 8 min. à 50°C dans une solution de coloration: "Phast Gel Blue R" 0,02% dans le méthanol à 30% et l'acide acétique à 10% dans l'eau distillée. Le gel est décoloré à 50°C dans 3 bains de décolorant: méthanol 30%; acide acétique 10% dans l'eau distillée (3:1:6) pendant 5 min, 8 min et 10 min. Le gel est finalement traité par la solution suivante: glycérol 5%, acide acétique 10% dans l'eau pendant 5 min. à 50°C, puis séché.

**c) Isoélectrofocalisation préparative.**

Sur un gel de 11 cm x 20,5 cm x 0,15 cm d'acrylamide 4,85%; N, N'-méthylène bis (acrylamide) 0,15%; ampholines 2%; glycérol 5%; persulfate d'ammonium 0,025%; tel que l'éventail de pH soit de 5,5 à 8,5, sont déposés 1 mg de protéines dans la zone de pH=7. Les tampons d'électrode sont HEPES 0,4 M et NaOH 0,1 M. L'isoélectrofocalisation s'effectue dans une cuve horizontale LKB, à 1500 volts, 30 W pendant 3 heures, avec une réfrigération à 6°C.

Le gel est ensuite découpé en bandes de 0,5 cm. Chaque bande est incubée une nuit à 4°C dans 1 ml d'eau. Les ampholines et les protéines sont alors libérées dans le surnageant, permettant la mesure du pH et de l'activité de l'enzyme de branchement pour chaque bande.

d) Isoélectrofocalisation avec révélation de l'activité de l'enzyme de branchement sur gel (47, 250).

0,5 mg de protéines sont déposées sur un gel de 11 cm x 20,5 cm x 0,15 cm d'acrylamide 4,85%; N, N'-méthylène bis (acrylamide) 0,15%; ampholines 2% (3/4 d'ampholines 5-7 et 1/4 d'ampholines 6-8); glycérol 5% et maltoheptaose 0,1%. Le maltoheptaose est inclu comme une amorce pour la synthèse du polysaccharide branché afin de révéler l'activité de l'enzyme de branchement par coloration. Bien que la présence de maltoheptaose ne soit pas indispensable pour le développement de la coloration, elle améliore la révélation de l'activité. Le gel est photopolymérisé en présence de 0,0005% de riboflavine ajoutée après le dégazage de la solution. Les tampons d'électrode sont l'acide phosphorique 1 M et NaOH 1M. Le gradient de pH s'établit grâce à une préélectrophorèse de 40 min à 350 volts, 10 W. Les protéines sont déposées dans la zone de pH=7 et l'isoélectrofocalisation est réalisée pendant 3 heures, à 1500 volts, 30 W avec réfrigération à 6°C.

L'activité de l'enzyme de branchement est révélée en incubant le gel à 30°C dans 50 ml de solution contenant: AMP 2 mM; glucose-1-phosphate 50 mM et phosphorylase a de muscle de Lapin 1 mg (47, 250). Le gel est agité occasionnellement et observé attentivement. En effet les bandes de couleur blanchâtre de polysaccharides apparaissent dans le gel après 1 à 2 heures d'incubation. Le temps d'incubation dépend de la concentration en enzyme de branchement, mais de façon non linéaire et les polysaccharides sont synthétisés très rapidement après un temps de latence très variable.

Le gel est coloré par la solution de lugol à 2% et les bandes de polysaccharides produisent des colorations du bleu au brun-rouge.

e) **Electrophorèse non dénaturante et révélation de l'activité de l'enzyme de branchement sur gel (252).**

L'électrophorèse est effectuée dans un gel vertical de 16 cm x 15,5 cm x 0,15 cm. Le gel de concentration est en acrylamide 2,34%; N, N'-méthylène bis (acrylamide) 0,78%; acide phosphorique 5 mM; Tris 40 mM pH=5,5; sucrose 20%; riboflavine 0,0005% et 11,5 µl de TEMED pour 20 ml de gel. Le gel de séparation contient: acrylamide 4%; N, N' méthylène bis (acrylamide) 0,21%; Tris-HCl 60 mM pH=7,5; maltoheptaose 0,1%; riboflavine 0,0005% et 10 µl de TEMED pour 30 ml de gel. Le tampon d'électrophorèse est composé d'acide diéthylène barbiturique 30 mM et Tris 7 mM pH=7 (331).

30 µl d'échantillon sont mélangés à 30 µl de sucrose à 40 % et déposés. L'électrophorèse est menée 3 heures à 200 volts.

L'activité de l'enzyme de branchement est révélée comme précédemment. Le faible pourcentage en acrylamide du gel est indispensable pour que la phosphorylase a puisse diffuser dans le gel.

6) Clonage et sous-clonage du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure

a) **Transformation d'*Escherichia coli* par la méthode au chlorure de calcium (332-333).**

A partir de 1,5 ml d'une préculture de nuit d'*E. coli* HB 101 en milieu LB liquide, on ensemence 30 ml de milieu L dans un erlen de 100 ml. La croissance se poursuit à 37°C sous agitation, pendant au moins 1h30, jusqu'à ce que la  $DO_{550nm} = 0,5$  ( $5 \times 10^7$  cellules/ml). La culture est refroidie 10 min sur la glace afin d'arrêter la croissance. La suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 4000 g à 4°C et le surnageant est éliminé.

Les cellules sont resuspendues à froid dans 15 ml de  $CaCl_2$  50 mM; Tris- HCl 10 mM pH=8 stérile et froid. La suspension cellulaire est

placée dans un bain de glace 30 min. et est centrifugée 5 min à 4000 g à 4°C.

Les cellules sont resuspendues dans 1,5 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM; Tris-HCl 10 mM pH=8 stérile et froid. La suspension cellulaire est répartie en aliquots de 200  $\mu\text{l}$  dans des tubes stériles et froid. Les cellules sont conservées à 4°C pendant 2 à 24 heures.

Ce traitement au  $\text{CaCl}_2$  rend les bactéries compétentes, c'est à dire capables d'adsorber l'ADN. L'efficacité de la transformation sera maximale si les cellules sont en phase exponentielle de croissance ( $5 \times 10^7$  cellules/ml) et elle sera augmentée 4 à 6 fois (334) par conservation des cellules dans la glace 12 à 24 heures en présence de  $\text{CaCl}_2$ .

Pour la transformation, on ajoute par tube un volume maximum de 20  $\mu\text{l}$  d'ADN, contenant plus de 40 ng d'ADN. L'addition d'un plus grand volume d'ADN diminue l'efficacité de transformation.

Après agitation, les tubes sont laissés 15 min sur la glace, afin que l'ADN s'adsorbe aux cellules. Un choc thermique de 2 min. à 42°C ou de 10 min à 37°C permet l'entrée de l'ADN dans les bactéries. 1 ml de milieu L est ajouté dans chaque tube et les bactéries sont laissées à 37°C pendant 1 heure, sans agitation.

Les cellules sont centrifugées 5 min. à 4000 g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans la goutte de surnageant restant dans le tube. La suspension est étalée sur milieu LB ampicilline.

Les boîtes sont placées à 37°C pendant 16 à 24 heures, puis à 4°C. Après 24 heures à 37°C, la  $\beta$ -lactamase secrétée dans le milieu par les transformants résistants à l'ampicilline rapidement épuise l'antibiotique dans une région périphérique à la colonie permettant l'apparition de colonies satellites sensibles à l'ampicilline.

Le taux de transformation est exprimé en nombre de transformants par  $\mu\text{g}$  d'ADN mis en jeu.

**b) Transformation d'*Escherichia coli* par la méthode au chlorure de rubidium (335).**

Cette technique est plus efficace que la précédente. De plus les bactéries compétentes peuvent être conservées à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Une colonie de bactéries *HB 101* est reprise dans 5 ml de milieu  $\text{KCl/MgSO}_4$  et mise sous agitation à  $37^{\circ}\text{C}$ , jusqu'à ce que la  $\text{DO}_{550\text{nm}}=0,3$ . A partir de 1 ml de suspension cellulaire, on ensemence 100 ml de milieu  $\text{KCl/MgSO}_4$  préchauffé à  $37^{\circ}\text{C}$  et la croissance se poursuit à  $37^{\circ}\text{C}$ , sous agitation jusqu'à la  $\text{DO}_{550\text{nm}}=0,48$ .

Les cellules sont mises sur la glace et transférées dans des tubes de 50 ml puis centrifugées 5 min à 1200 g à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le culot est repris à froid dans 25 ml de  $\text{RbCl}$  100 mM (Sigma);  $\text{MnCl}_2$  50 mM;  $\text{CaCl}_2$  10 mM; acétate de potassium 10 mM; glycérol 15%;  $\text{pH}=5,8$  ajusté avec de l'acide acétique 0,2 M. Les cellules sont conservées 90 à 120 min. sur la glace, puis sont centrifugées 5 min à 1200 g à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Les bactéries sont reprises très doucement à froid dans 6,5 ml de MOPS 10 mM  $\text{pH}=7$  ajusté avec NaOH;  $\text{RbCl}$  10 mM;  $\text{CaCl}_2$  75 mM; glycérol 15%. Les cellules sont réparties en aliquots de 200  $\mu\text{l}$  dans des tubes de 5 ml froid et stockées à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Les cellules sont décongelées et laissées sur la glace 5 à 10 min. On ajoute par tube 10  $\mu\text{l}$  d'ADN, contenant moins de 100 ng d'ADN. Les cellules sont laissées 20 min sur la glace et subissent un choc thermique de 90 sec. à  $42^{\circ}\text{C}$  ou de 2 min. à  $37^{\circ}\text{C}$ , puis sont placées 1 à 2 min sur la glace.

On ajoute 1 ml de milieu  $\text{KCl/MgSO}_4/\text{glucose}$  et la suspension est incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation douce pendant 1 heure.

Les cellules sont étalées sur milieu LB + ampicilline et incubées à 37°C, 16 à 24 heures.

c) Transformation de *Saccharomyces cerevisiae* par la méthode à l'acétate de lithium (336).

A partir de 10  $\mu$ l de préculture de levures en YPG à  $3 \times 10^8$  cellules/ml, on ensemence 50 ml de milieu YPAD et la croissance se poursuit à 30°C, jusqu'à  $2 \times 10^7$  cellules/ml. On répartit la culture en aliquots de 10 ml et on centrifuge 15 min à 1800 g. Les cellules sont resuspendues dans 1 ml d'eau stérile et transférées en "ependorf".

Les cellules sont centrifugées 1 min à 10000 g et resuspendues dans la solution suivante fraîchement préparée: 1 ml de Tris-HCl 10 mM pH=7,5; EDTA 1 mM; acétate de lithium 0,1 M pH=8 ajusté avec de l'acide acétique. Les levures sont centrifugées 1 min à 10000 g et resuspendues dans 100  $\mu$ l de la solution précédente et incubées 1 à 24 heures à 29°C.

On ajoute dans chaque tube 10  $\mu$ l d'ADN, contenant 2 à 5  $\mu$ g d'ADN, 5  $\mu$ l d'ADN "carrier" à 10  $\mu$ g/ $\mu$ l et les cellules sont incubées 30 min. à 29°C. On ajoute par tube 700  $\mu$ l de Tris-HCl 10 mM pH=7,5; EDTA 1 mM; acétate de lithium 0,1 M pH=8; PEG 4000 à 40% et on mélange doucement, puis on incube 30 à 60 min à 29°C. Un choc thermique de 5 min à 42°C est suivi d'une centrifugation de quelques secondes à 10000 g. Le surnageant est éliminé et le culot soigneusement séché, puis lavé par 1ml de TE1X. Les cellules sont reprises dans 400  $\mu$ l de TE1X et étalées sur boîtes de sélection.

Après une incubation de 72 heures à 30°C, on obtient 100 à 200 colonies transformantes par boîte.

**d) Préparation et purification de l'ADN plasmidien par "lyse alcaline" (337).**

Les bactéries contenant le plasmide à extraire sont inoculées dans 10 ml de milieu liquide de LB + ampicilline. La préculture est mise à 37°C sous agitation une nuit. Quand la  $DO_{660nm} = 0,6$ , on ensemence avec 1 ml de préculture 200 ml du même milieu et la croissance se poursuit à 37°C, sous agitation jusqu'à ce que la  $DO_{660nm} = 0,8$ . L'étape d'amplification des plasmides est facultative. On peut en effet ajouter du chloramphénicol (170 mg/l) ou de la streptomycine (300 mg/l) et remettre la culture sous agitation à 37°C pendant 12 à 16 heures. Au cours de cette période, la synthèse des protéines et la répllication de l'ADN chromosomique sont bloquées suite à l'addition de l'antibiotique, mais la répllication de l'ADN plasmidien n'est pas affectée (338-339). Le nombre de copies de plasmides par cellules peut être ainsi multiplié par un facteur de 100 ou plus.

La culture de 200 ml est centrifugée 15 min à 4000 g à 4°C. Le culot bactérien est repris à froid par 12 ml de glucose 50 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl 25 mM pH=8; 4 mg/ml de lysozyme (Sigma) et incubé 5 min. à température ambiante. On ajoute alors 24 ml de NaOH 0,2 M; SDS 1%, on homogénéise par inversion et on laisse 5 min. sur la glace. On ajoute finalement 20 ml de la solution suivante: 60 ml d'acétate de potassium 5 M; 11,5 ml d'acide acétique glacial; 28,5 ml d'eau et on homogénéise par inversion et on laisse sur la glace 5 min. Après une centrifugation de 30 min. à 10000 g à 4°C, le surnageant (contenant l'ADN plasmidien) est transféré dans un pot propre. On ajoute 60 ml de la solution suivante: 500 ml de phénol; 480 ml de chloroforme; 20 ml d'alcool isoamylique. Après centrifugation de 5 min. à 10000g à 4°C, la phase supérieure aqueuse contenant l'ADN est précipitée par 100 ml d'éthanol absolu à température ambiante pendant 15 min. Le culot d'ADN est récupéré par centrifugation de 5 min à 10000 g, séché et lavé par

140 ml d'éthanol à 70%. Le culot est séché, puis remis doucement en solution dans 500 $\mu$ l de TE1X pH=8.

La purification des plasmides s'effectue par centrifugation en gradient de chlorure de césium (Boehringer)(340). Pour un tube d'ultracentrifugation de 5 ml (Quick-Seal, Beckman), on introduit à la seringue le mélange suivant: 0,625 de bromure d'éthidium à 10 mg/ml; 4,5 g de chlorure de césium; 500  $\mu$ l d'ADN; 3,875 ml de TE1X et on scelle le tube. On ultracentrifuge 18 heures à 246000 g (L8-70M, Beckman) à 18°C et on récupère la bande d'ADN plasmidien sous lumière UV à l'aide d'une seringue. On élimine le bromure d'éthidium par 3 traitements avec un volume d'isopropanol. La préparation de plasmides est ensuite dialysée au moins trois fois successivement contre 1 litre de TE1X pH=8 stérile à 4°C.

La concentration en ADN est déterminée par électrophorèse. La solution plasmidienne est précipitée par 1/10ème de volume d'acétate de sodium 2,5 M pH=5,2 et 2 volumes d'éthanol absolu et conservée à -20°C.

**e) Extraction de l'ADN total de *Saccharomyces cerevisiae* (341).**

La préparation de l'ADN se fait à partir de 40 ml d'une culture de levures en phase stationnaire, en milieu YPAD. Après centrifugation de 5 min. à 3300 g à température ambiante, les cellules sont reprises dans 3 ml de sorbitol 0,9 M; EDTA 0,1 M pH=7,5. On ajoute 0,1 ml de zymolyase 60000 (Seikagaku Kogyo, Miles) à 2,5 mg/ml et on incube 1 heure à 37°C. Les sphéroplastes sont récoltés par centrifugation 5 min. à 1000 g et suspendus dans 5 ml de Tris-HCl 50 mM pH=7,4; EDTA 20 mM. On ajoute 0,5 ml de SDS 10%, on homogénéise et on incube 30 min. à 65°C. Après avoir ajouté 1,5 ml d'acétate de potassium 5 M et laissé sur la glace 60 min, l'ADN est récupéré par centrifugation de 10 min à 10000 g et précipité à température ambiante par 2 volumes d'éthanol absolu. Après

centrifugation de 15 min à 3300 g, l'ADN est séché, puis repris dans 3 ml de Tris-HCl 10 mM pH=7,4; EDTA 1 mM. L'ADN est centrifugé 15 min à 10000 g et le surnageant est traité par 150 µl de ribonucléase pancréatique (Calbiochem.) à 1 mg/ml et incubé 30 min. à 37°C. On ajoute 1 volume d'isopropanol et on mélange doucement afin d'obtenir un "cocon" de fibres, que l'on resuspend dans 0,5 ml de Tris-HCl 10 mM pH=7,4; EDTA 1 mM. La concentration finale en ADN total de levure est d'environ 200 µg/ml.

**f) Ligation des ADN.**

La ligase d'ADN T4 catalyse la formation de liens phosphodiester entre les extrémités 5'-phosphate et 3'-hydroxyl adjacentes de deux fragments d'ADN double-brin. Elle permet la ligation de fragments d'ADN présentant des bouts francs ou des bouts collants complémentaires.

Le fragment d'ADN à cloner et le vecteur ouvert déphosphorylé sont mis en présence dans un rapport 5/1 en poids. Le mélange réactionnel pour un volume final de 50 µl contient: 5 µl de tampon de ligation 10X (Tris-HCl 500 mM pH=7,5; MgCl<sub>2</sub> 70 mM; DTT 10 mM); 0,5 µl d'ATP 10 mM pH=7,5; 0,5 µl de ligase T4 à 4 U/µl. Les différents composants sont réunis dans le "kit de ligation Stratagène". On incube une nuit à 4°C.

**g) Déphosphorylation d'un vecteur.**

La déphosphorylation d'un vecteur ouvert permet d'éviter que le vecteur ne se referme sur lui même lors de la ligation. La phosphatase alcaline intestinale de Veau (Boehringer Mannheim) élimine le groupement 5'-phosphate du vecteur ouvert. Par conséquent la ligation du vecteur ne peut se faire qu'avec un fragment d'ADN ayant un groupement 5'-phosphate intact. 2 µg de vecteur ouvert dans 19 µl d'eau stérile sont mélangés à 20 µl de tampon CIP 2X (Tris-HCl 20 mM pH=9,2; EDTA 0,2 mM) et à 1 µl de

phosphatase intestinale à 10 U/ 200  $\mu$ l de tampon CIP 1X. La réaction est menée 30 min à 45°C et on rajoute 1  $\mu$ l de phosphatase intestinale et on réincube 30 min à 45°C.

Le vecteur ouvert déphosphorylé est précipité par 2 volumes d'éthanol absolu et 1/10ème de volume d'acétate de sodium 2,5 M pH=5,5 et conservé à -20°C. Le vecteur sera utilisé à une concentration de 10 ng/ $\mu$ l de TE 1X.

**h) Construction de la banque génomique de *Saccharomyces cerevisiae* dans le plasmide YCp50 (342).**

Construite par M.D. Rose, cette banque recouvre le génôme de *S. cerevisiae*. L'ADN de levure a été digéré partiellement par Sau3A en utilisant différentes concentrations en enzyme de restriction afin d'éviter les coupures préférentielles. Les fragments d'ADN d'une taille de 10 à 15 kpb, sélectionnés sur gradient préparatif de sucrose (337), sont dialysés contre le TE 1X.

L'ADN du vecteur YCp50 est ouvert par BamHI, déphosphorylé et mélangé dans le rapport 2/1 (en poids) avec les fragments d'ADN. Les fragments de 10 à 15 kpb sont mis en ligation à 30  $\mu$ g/ml d'ADN total.

La souche *HB 101* est alors transformée (332) et les bactéries ayant intégrées le plasmide sont sélectionnées sur le milieu LB contenant 25  $\mu$ g/ml d'ampicilline. Les bactéries transformantes sont collectées en lavant la surface de la boîte avec du LB liquide et elles sont suspendues dans du glycérol stérile à 50% à la concentration de  $1 \times 10^9$  cellules/ml, puis conservées à -70°C. Dans cette banque 90% des plasmides contiennent un fragment d'ADN de levure, qui mène à la perte de la résistance à la tétracycline.

## 7) Construction de la carte de restriction

### a) **Restriction par des endonucléases spécifiques.**

L'analyse de l'ADN nécessite d'obtenir de façon reproductible des fragments séparables par électrophorèse. On génère ces fragments grâce à l'utilisation d'endonucléases de restriction. Les endonucléases de restriction utilisées dans ce travail reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN de 4 ou 6 bases. Les enzymes sont fournies par Boehringer, Pharmacia, Appligène, Biolabs et BRL; les tampons utilisés sont ceux préconisés par le fabricant ou par Maniatis (337).

La réaction se fait généralement sur 0,2 à 1  $\mu\text{g}$  d'ADN dans un volume final de 20  $\mu\text{l}$  ou moins. On mélange l'ADN avec 18  $\mu\text{l}$  de TE1X, on ajoute 2  $\mu\text{l}$  de tampon de digestion 10X approprié et on additionne 1 à 5 unités d'enzyme de restriction. On incube 1 à 2 heures à la température adéquate, on arrête la réaction par addition de 6  $\mu\text{l}$  de bleu de bromophénol 0,25%; xylène cyanol 0,25%; sucrose dans l'eau à 40% (p;v), et on dépose sur gel d'agarose.

Une unité d'enzyme est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour couper complètement 1  $\mu\text{g}$  d'ADN de phage en une heure d'incubation à la température appropriée.

### b) **Electrophorèse des ADN sur gel d'agarose.**

Les gels d'agarose sont utilisés de manière analytique pour la détermination du poids moléculaire de fragments de restriction, ou de manière préparative pour la purification de ces mêmes fragments. L'électrophorèse se fait sur gel d'agarose horizontal (343) de 0,7% à 1,5%, contenant 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de bromure d'éthidium, en tampon TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; acide borique 89 mM; EDTA 25 mM; pH=8,3). Ces pourcentages d'agarose permettent de séparer des fragments d'une taille comprise entre 300 et 10000 pb. Après une électrophorèse d'environ

2 heures à 50 volts dans une cuve (Bio-Rad), on visualise la position des bandes d'ADN par transillumination aux UV longs (365 nm). La taille des fragments est déterminée par comparaison avec un témoin constitué de fragments de phage , digéré par HindIII (0,125/0,564/2,027/2,322/4,361/6,557/9,416/23,130) (344).

**c) Transfert de l'ADN selon la méthode de Southern (345).**

Après migration et visualisation, le gel est dénaturé deux fois 40 min dans du NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M, puis neutralisé deux fois 40 min dans du Tris-HCl 0,5 M; NaCl 3 M; pH=6 à 7. Le gel est recouvert d'une feuille de nitrocellulose (BA85 0,45  $\mu$ m Schleicher et Schell) imbibée de SSC 6X (NaCl 0,9 M; citrate trisodique 0,09 M; pH=7 ajusté avec NaOH 10 N), de 2 feuilles de papier Whatman 1MM et d'une épaisseur d'environ 10 cm de papier absorbant. Le montage est surmonté d'un poids de 1 kg et laissé pendant la nuit afin de permettre le transfert de l'ADN.

L'ADN est fixé par cuisson à 80°C pendant 2 heures. La membrane est préhybridée au moins 1 heure à 42°C avec 20ml de tampon d'hybridation (SSC 5X; Denhardt 5X;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Formamide 50%; ADN de sperme de saumon dénaturé 100  $\mu$ g/ml). La membrane est hybridée 24 heures à 42°C en présence de 20 ml de tampon d'hybridation et  $20 \times 10^6$  cpm de sonde radioactive marquée au dCTP $\alpha$ <sup>32</sup>P, après avoir été dénaturée 30 min à 80°C.

La membrane est lavée quatre fois pendant 15 min. à 55°C dans du SSC 0,1X; SDS 0,1%, elle est séchée puis mise en autoradiographie à -70°C, entre deux écrans (Cronex).

**d) Purification de fragments d'ADN.**

Les différents fragments sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 0,7% à bas point de fusion ("low melting point" BRL) (346)

dans un tampon TAE (Tris-acétate 40 mM; EDTA 2 mM pH=8). La bande à récupérer est découpée sous UV, pesée et introduite dans un "eppendorf". On utilise alors le "kit geneclean" (Ozyme). On ajoute 2 volumes de NaI 6 M et on incube 5 min. à 55°C, afin que l'agarose se dissolve. On additionne 10 µl de billes de silice, on mélange 5 min. et les billes sont lavées 3 fois avec du "New Wash", contenu dans le kit. Les billes sont finalement reprises par 15 µl d'eau stérile, incubées 5 min. à 55°C et éliminées par centrifugation 2 min. à 10000 g. L'ADN est dans le surnageant.

**e) Fabrication d'une sonde selon la technique**

**"multiprime"(347).**

25 à 50ng d'ADN purifié, contenu dans moins de 34µl, est dénaturé 3 min. à 100°C et placé immédiatement dans la glace 2 min. On ajoute 10 µl du mélange suivant: dATP 5 mM, dTTP 5 mM, dGTP 5 mM et 5 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol) soit 50 µCi, on complète à 49 µl avec de l'eau stérile et on ajoute 1 µl de fragment d'ADN polymérase Klenow. On incube 30 à 60 min. à 37°C. Les différents composants de cette réaction sont contenus dans le "kit oligolabelling with <sup>32</sup>P"(Amersham). La sonde est utilisée pour des hybridations avec l'ADN ou l'ARN.

**8) Localisation chromosomique du gène étudié par électrophorèse en champs pulsés**

**a) Préparation d'ADN chromosomique de levure (348).**

20 ml d'une culture en YPAD de levure à 3-4 x 10<sup>8</sup> cellules/ml sont centrifugés 15 min. à 530 g. Le culot est lavé à froid deux fois avec une solution d'EDTA 50 mM pH=7,5. Les cellules sont reprises dans 650 µl de cette même solution. 600 µl de la suspension cellulaire, 1 ml d'agarose à bas point de fusion (BRL) à 1% dans l'EDTA 125 mM pH=7,5 et

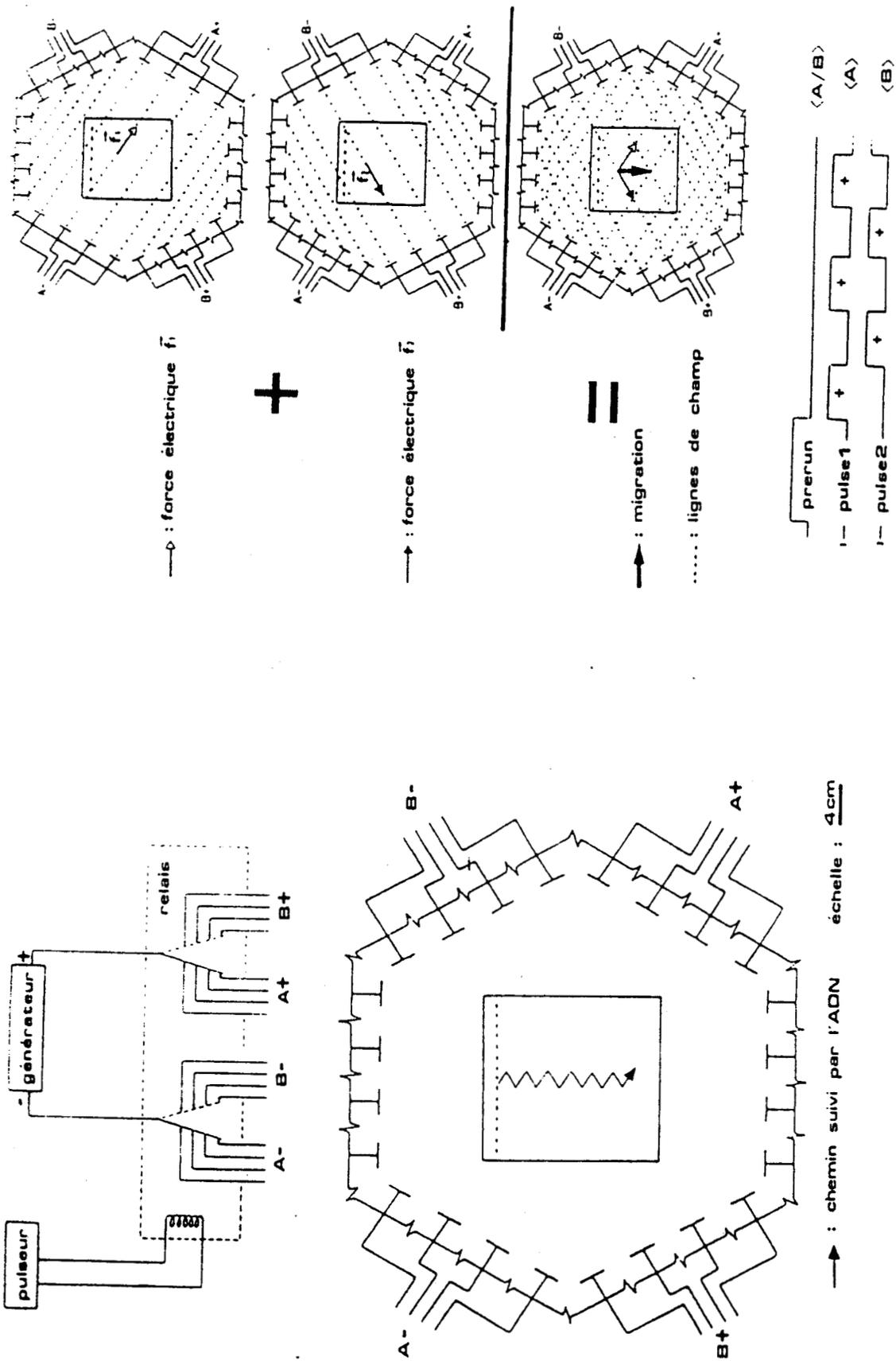
0,2 ml de la solution suivante: sorbitol 1M; citrate de sodium 100 mM; EDTA 60 mM;  $\beta$ -mercaptoéthanol 5%; zymolyase à 1 mg/ml pH=7, sont mélangés et coulés sur glace dans des petits moules (0,6x0,15x0,9 cm) d'une contenance de 80  $\mu$ l. Après solidification (30 min), les blocs d'ADN sont incubés une nuit à 37°C dans 5 ml de Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,45 M;  $\beta$ -mercaptoéthanol 7,5%; pH=8. On remplace par 5 ml de Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,45 M; Sarcosyl 1%; protéinase K (Boeringer) à 1 mg/ml; pH=8 et on incube 1 nuit à 50°C. L'ADN chromosomique est conservé à 4°C dans l'EDTA 0,5 M pH=9.

**b) Electrophorèse en champs pulsés (349).**

Née en 1984, grâce aux travaux de Schwartz et Cantor, l'électrophorèse en champs pulsés permet dans un gel d'agarose à 1% dans le tampon TBE 0,25X la séparation de molécules d'ADN d'une taille de 50 à 9000 kpb. Ainsi les chromosomes de levure peuvent être séparés. Soumises pendant un cycle d'électrophorèse 300 sec 1 h/120 sec 18 h/80 sec 24 h alternativement à deux champs électriques de 4,5 volts/cm pendant 1 h puis 6 volts/cm pendant 42 h croisés à 120°C (350) (Fig. 14), les molécules serpentent et migrent dans le gel selon un "phénomène de reptation" à la température maintenue constante à 9°C par un circuit de refroidissement.

**c) Transfert d'ADN chromosomique.**

Après coloration du gel au bromure d'éthidium et visualisation, l'ADN est dépuriné par un traitement du gel par HCl 0,25 N 15 min. Le transfert d'ADN et l'autoradiographie s'effectuent comme précédemment décrits.



**Fig. 14:** Principe de l'électrophorèse en champs pulsés selon la méthode CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Fields), d'après G. Chu, D. Vallrath et R. Davis.

9) Etude des ARN de levure

a) **Création d'un environnement dépourvu de ribonucléase.**

Afin de préparer des ARN, toutes contaminations par des ribonucléases doivent être éliminées. C'est pourquoi une série de traitements est nécessaire pour réduire les risques de contamination (351).

La vaisselle en verre est stérilisée une nuit à 180°C. Les "eppendorf", les cônes pour micropipettes, les pots de centrifugation sont autoclavés 2 heures à 130°C. Les produits chimiques et la vaisselle sont utilisés neufs et réservés uniquement à la manipulation des ARN. Toutes les solutions sont traitées au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) (352), qui est un inhibiteur non spécifique des ribonucléases. Pour le traitement, les solutions sont ajustées à 0,1% (v;v) en DEPC, agitées et laissées une nuit sous hotte. Le DEPC est éliminé par autoclavage. Les tampons contenant du Tris sont préparés avec de l'eau traitée au DEPC et ensuite réautoclavés, car le Tris réagit avec le DEPC (353). Le phénol est saturé avec du tampon traité au DEPC. On ajoute de plus 0,1% (p;v) de 8-hydroxyquinoline, qui est un antioxydant et un inhibiteur partiel de ribonucléases (354). Toutes les manipulations se font avec des gants.

b) **Extraction des ARN totaux de levure par billes de verre**

(355-356).

Elle permet d'extraire 10 mg d'acide nucléique total à partir de 500 ml de culture et est directement applicable pour des volumes de culture de 200 à 500 ml.

On inocule 200 ml de milieu YPAD avec un volume approprié d'une préculture fraîche et on inocule à 30°C, sous agitation, une nuit, jusqu'à la densité cellulaire voulue. On ajoute 50 µg/ml de cycloheximide (Sigma) et on met sous agitation 15 min. La cycloheximide inhibe l'étape d'élongation des synthèses protéiques. Les cellules sont

plongées dans la glace afin de protéger les ARNm en les maintenant sous forme de polysomes. Après 5 min. de centrifugation à 4°C à 3000 g, les cellules sont reprises à froid par 2,5 ml de LETS: LiCl 0,1M; EDTA 0,01 M; Tris-HCl 0,01 M pH=7,4; SDS 0,2%; DEPC 0,1%. La suspension cellulaire est introduite dans un tube à centrifugation, contenant 11 g de billes de verre lavées d'un diamètre de 0,4 mm et 3 ml de phénol équilibré dans du LETS. Les cellules sont cassées par 6 cycles d'agitation vigoureuse au vortex de 30 sec, suivis de 30 sec dans la glace. La destruction peut être suivie par observation au microscope à contraste de phase. Quand 90% des cellules sont cassées, on ajoute 5 ml de LETS froid et on mélange et on centrifuge 5 min. à 7500 g pour séparer les phases. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un tube propre et extraite 2 fois avec 5 ml de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25;25;1) et une fois par le chloroforme. On aliquote la phase aqueuse par fractions de 1 ml. Finalement on ajoute 1/10ème du volume de LiCl 5 M et les ARN précipitent à -80°C pendant 3 heures. Les ARN peuvent être conservés sous forme de précipité.

**c) Electrophorèse des ARN dans un gel en présence de formaldéhyde.**

Après 15 min. de centrifugation à 10000 g, le précipité d'ARN est lavé avec de l'éthanol à 80%, séché et resuspendu dans 10 µL d'eau stérile. On ajoute 20 µl de formamide déionisée, 4 µl de MOPS 10X (acide morpholinopropane sulfonique 0,2 M; acétate de sodium 0,05 M; EDTA 0,01 M; pH=7) et 6 µl de formaldéhyde filtrée. On dénature 5 min. à 60°C et on ajoute 4 µl de glycérol 50%; EDTA 1 mM; bleu de bromophénol 0,4%; xylène cyanol 0,4%.

L'ARN est déposé dans un gel d'agarose 1,5%, MOPS 1X et formaldéhyde 15%. L'ARN migre pendant 4 heures à 4°C sous une tension de 160 volts.

Une moitié du gel est colorée au bromure d'éthidium à 5 µg/ml dans le MOPS 1X, l'autre moitié est destinée au transfert des ARN. En effet la coloration au bromure d'éthidium entrave le transfert.

Le gel est calibré grâce à une échelle de taille: 0,24/1,4/2,4/4,4/7,5/9,5 kb visualisée sous UV à 254 nm, commercialisée par BRL.

**d) Transfert des ARN : "Northern" (357).**

Le gel est équilibré 20 min. dans du SSC 20X et l'ARN est transféré en SSC 20X sur une membrane de nylon (Hybond N) surmontée de feuilles de papier Whatman n°3 et d'un poids de 1 kg, pendant une nuit. La membrane est lavée rapidement dans du SSC 2X et est exposée sous UV à 312 nm pendant 3 min , afin que l'ARN soit fixé.

L'hybridation des ARN avec une sonde marquée dénaturée est identique à celle de l'ADN. La membrane sera lavée 4 fois avec du SSC 2X; SDS 0,1% à 42°C.

**10) Séquence de l'ADN**

**a) Clonage dans M13 mp18 ou M13 mp19.**

La ligation a lieu entre le fragment d'ADN double-brin à séquencer et la forme répliquative du vecteur M13. On met en ligation 20 ng de vecteur et 100 ng de fragment à séquencer.

**b) Transfection d'*Escherichia coli* TG1.**

La souche TG1 est épuisée sur milieu M9 minimum et cultivée en milieu liquide TY 2X. 300 µl de cellules TG1 rendues compétentes par un traitement au CaCl<sub>2</sub> 50 mM (Transformation d'*E. coli* par la méthode au chlorure de calcium) sont additionnées de 25 µl de mélange de ligation. Un premier tube témoin reçoit 10 ng de vecteur M13 ouvert et un deuxième, 10 ng de vecteur M13 natif. Les cellules sont incubées au

moins une heure sur la glace et sont soumises à un choc thermique de 3 min à 42°C, puis remises dans la glace.

On ajoute alors 200 µl d'*E. coli TGI* en fin de phase exponentielle (cellules indicatrices) dans du TY 2X, 40 µl d'IPTG 100 mM et 40µl de X-gal à 2% dans de la diméthylformamide, dans chaque tube. On additionne 3 ml de Top agar H, conservé à 55°C et le mélange est coulé dans des boîtes contenant déjà du milieu H solide et les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

Les bactéries *TGI* infectées par le phage forment des plages plus claires dans le tapis de cellules indicatrices, correspondant à des cellules à croissance ralentie. Les bactéries infectées par le phage natif forment des plages de couleur bleue et celles en présence de phage ouvert ne forment aucune colonie retardée. Par contre si le gène *Lac Z* du phage M13 est interrompu par le fragment d'ADN cloné, les plages resteront blanches.

**c) Préparation de l'ADN simple-brin (358).**

100 ml de milieu TY 2X sont inoculés par 1 ml de préculture de *TGI* et aliquotés en fractions de 1,5 ml. On inocule chaque tube à partir d'une plage transparente. On choisit 4 plages différentes. La culture est mise sous agitation à 37°C pendant 6 heures, puis est transférée dans un tube "eppendorf". Après 5 min. de centrifugation à 10000 g, le surnageant est transféré dans un nouveau tube sans prendre les cellules. On recommence cette étape afin d'éliminer toutes les cellules. On ajoute alors 200 µl de PEG 6000 à 20%; NaCl 2,5 M et on laisse précipiter 15 min à température ambiante.

Les phages sont récoltés par centrifugation de 5 min à 10000g et le surnageant est soigneusement éliminé. Le culot est repris par 100 µl de TE 1X et 50 µl de phénol équilibré dans le TE 1X. La préparation est



laissée 15 min à température ambiante et centrifugée 3 min à 10000 g. La phase supérieure aqueuse est traitée par 50  $\mu$ l du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:25:1). Ainsi l'enveloppe protéique des particules virales est enlevée. L'ADN simple-brin est finalement concentré par une précipitation par 250  $\mu$ l d'éthanol absolu et 10  $\mu$ l d'acétate de sodium 3 M pH=6 et conservé une nuit à -20°C. Après une centrifugation de 10 min. à 10000g, le culot est lavé par 1 ml d'éthanol absolu froid et séché puis repris dans 10  $\mu$ l de TE 1X. L'ADN recombinant simple-brin, utilisé comme matrice pour les réactions de séquence, peut être conservé à -20°C.

**d) Réactions de séquence (359-360).**

La réaction de séquence est basée sur la synthèse d'un brin d'ADN *in vitro* à partir de la matrice d'ADN simple-brin. La synthèse commence à une unique région, où un oligonucléotide amorce se fixe à la matrice. La synthèse se termine par incorporation d'un nucléotide analogue, qui ne permet pas l'élongation du brin d'ADN. Ces nucléotides analogues sont les 2', 3'-dideoxynucléotides 5'-triphosphates (ddNTPs), dont le manque d'hydroxyl en 3'arrête l'élongation. Quand le mélange réactionnel contient les d NTPs et un des 4 ddNTPs, l'enzyme catalysant la polymérisation s'arrêtera à chaque fois qu'un ddNTP sera incorporé, pour une population de brins d'ADN. 4 réactions préparées avec un ddNTP différent donnent une séquence complète. Un nucléotide marqué est introduit lors de la synthèse, afin que les brins d'ADN de différente longueur puissent être visualisés par autoradiographie après séparation par électrophorèse.

L'enzyme, catalysant la polymérisation, est de la "sequenase"(361), comprise dans le "kit de séquence version 2.0" commercialisée par USB. C'est une ADN polymérase complètement dépourvue de l'activité 3'-5'

exonucléasique.

5  $\mu$ l d'ADN simple-brin du phage M13 à séquencer (environ 1  $\mu$ g) sont mélangés à 2  $\mu$ l d'eau stérile, 2  $\mu$ l de tampon de séquence 5X (Tris-HCl 200 mM pH=7,5;  $MgCl_2$  100 mM; NaCl 250 mM) et 1  $\mu$ l d'ADN amorce (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' à 0,5 pmol/ $\mu$ l). Le tube contenant ce mélange est porté 2 min. à 65°C, puis la température est ramenée à 30°C en une heure. On ajoute à ce mélange d'hybridation 1  $\mu$ l de DTT 0,1 M; 2  $\mu$ l de mélange de marquage 5X (dGTP 7,5  $\mu$ M; dCTP 7,5  $\mu$ M dTTP 7,5  $\mu$ M) dilué 5 fois; 0,6  $\mu$ l de [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l)(Amersham) et 2  $\mu$ l de "sequenase" non diluée 8 fois dans le tampon suivant; Tris-HCl 10 mM pH=7,5; DTT 5 mM; sérum albumine bovine 0,5 mg/ml. On incube 10 min à température ambiante. On prépare 4 tubes annotés A, C, G et T dans lesquels on introduit 2,5  $\mu$ l de mélange ddA, ddC, ddG et ddT respectivement (Tableau VIII). On préchauffe 5 min. à 37°C, puis on introduit dans chacun des 4 tubes 3,5  $\mu$ l de mélange marqué et on incube 5 min à 37°C. La réaction de séquence est arrêtée par l'addition de 4  $\mu$ l de solution stop: formamide 95%; EDTA 20 mM; bleu de bromophénol 0,05%; xylène cyanol 0,05% et conservée à -20°C.

**e) Electrophorèse en gel d'acrylamide (362).**

L'électrophorèse des séquences d'ADN est réalisée dans un appareil BRL, qui possède un système d'égalisation de la température sur toute la surface de la plaque de verre postérieure.

Les plaques de verre sont lavées, séchées et passées à l'alcool soigneusement. Une face de chaque plaque est traitée au diméthylchlorosilane à 2% dans le chloroforme afin d'empêcher que le gel adhère. On prépare, pour un gel, 100 ml de solution à 6% en acrylamide à partir d'une solution stock à 40% en acrylamide (acrylamide 38%; N, N'-méthylène-bis-acrylamide 2%). A ces 15 ml de solution stock,

**Tableau VIII:** Composition des mélanges réactionnels de la réaction de séquence.

mélange	ddA	ddC	ddG	ddT
dATP 80 $\mu$ M	+	+	+	+
dCTP 80 $\mu$ M	+	+	+	+
dGTP 80 $\mu$ M	+	+	+	+
dTTP 80 $\mu$ M	+	+	+	+
ddATP 8 $\mu$ M	+	-	-	-
ddCTP 8 $\mu$ M	-	+	-	-
ddGTP 8 $\mu$ M	-	-	+	-
ddTTP 8 $\mu$ M	-	-	-	+
NaCl 50 mM	+	+	+	+

on ajoute 42 g d'urée (BRL) pour obtenir une solution 7 M en urée, 10 ml de tampon de séquence 10X (Tris-HCl 1,34 M pH=8,8; acide borique 0,44 M; EDTA 0,026 M) et on complète à 100 ml avec de l'eau stérile. On ajoute 600 µl de persulfate d'ammonium à 10% et 80 µl de TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène-diamine). Le gel est alors coulé entre les plaques de verre et polymérisé en 30 min.

Après avoir été dénaturé 2 min à 75°C, les échantillons sont déposés. La migration est réalisée dans du tampon de séquence 1X et à une puissance constante de 60W de manière à maintenir la température du gel à environ 50°C. La température élevée, la forte concentration en urée et le pH basique du tampon empêchent la formation de structures secondaires, qui provoqueraient une migration anormale de l'ADN.

Après électrophorèse, le gel est fixé 20 min dans l'acide acétique à 10%, séché sur une feuille de papier Whatman n°3 30 min à 70°C sous vide, afin d'augmenter la résolution des bandes de haut poids moléculaire (363) et autoradiographié à température ambiante sur un film Cronex.

#### 11) Microscopie électronique à balayage des levures

Les levures sont récoltées à partir d'une culture en YPAD à  $3 \times 10^8$  cellules/ml. Elles sont fixées au moins 4 heures au glutaraldéhyde à 2,5% en tampon phosphate 0,1 M sur des lames prétraitées au sérum foetal de veau, afin d'augmenter l'adhérence. Les cellules sont fixées 2 heures à 4°C en présence de tétraoxyde d'osmium à 1% en tampon phosphate 0,1 M. Les cellules sont deshydratées dans l'alcool en concentration croissante: 30%-50%-70%-90%-100%, puis deshydratées dans l'acétone en concentration croissante: 30%-50%-70%-90%-100%, pendant 30 min dans chaque bain.

Les échantillons sont alors passés à l'appareil à point critique et métallisés avec un métalliseur de type SCD 040. Les levures sont observées par microscopie électronique à balayage grâce au système ASID-4D (accessory scanning image detection) à un voltage de 20 kV.

# **RESULTATS**

## RESULTATS

### I. Induction de l'activité de branchement lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance en présence de glucose

#### 1) Dosage de l'activité de l'enzyme de branchement

L'activité de branchement du glycogène est dosée sur des volumes de 10, 30 ou 60  $\mu$ l d'extraits enzymatiques préparés à partir de levures sauvages JC 482, selon la "méthode A" de Boyer et Preiss (35). Les extraits enzymatiques ont été préparés à partir de  $10^{10}$  cellules, prélevées à différents intervalles de temps au cours de la croissance sous agitation à 30°C en milieu riche (YPAD) depuis la phase de latence, la phase exponentielle jusqu'à la phase stationnaire.

Ainsi l'activité de l'enzyme de branchement ne s'exprime pas de façon constitutive, mais au contraire apparaît en fin de phase exponentielle de croissance pour atteindre son maximum à une densité de  $3 \times 10^8$  cellules/ml de milieu de culture (Fig. 15). Indétectable en phase de latence et début de phase exponentielle, l'activité de branchement est induite d'un facteur d'activation de plus de 95% en fin de phase exponentielle.

Le dosage du glycogène synthétisé par la levure au cours de sa croissance en milieu glucose à 2% permet de confirmer, que le glycogène commence à s'accumuler en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire (275-281), moment où 50% du glucose du milieu a été consommé (280-282) (Fig. 15).

Par conséquent, l'enzyme de branchement est induite au moment où le glycogène commence à s'accumuler dans les cellules et atteint son maximum d'activation, quand la vitesse de synthèse du glycogène est maximale.

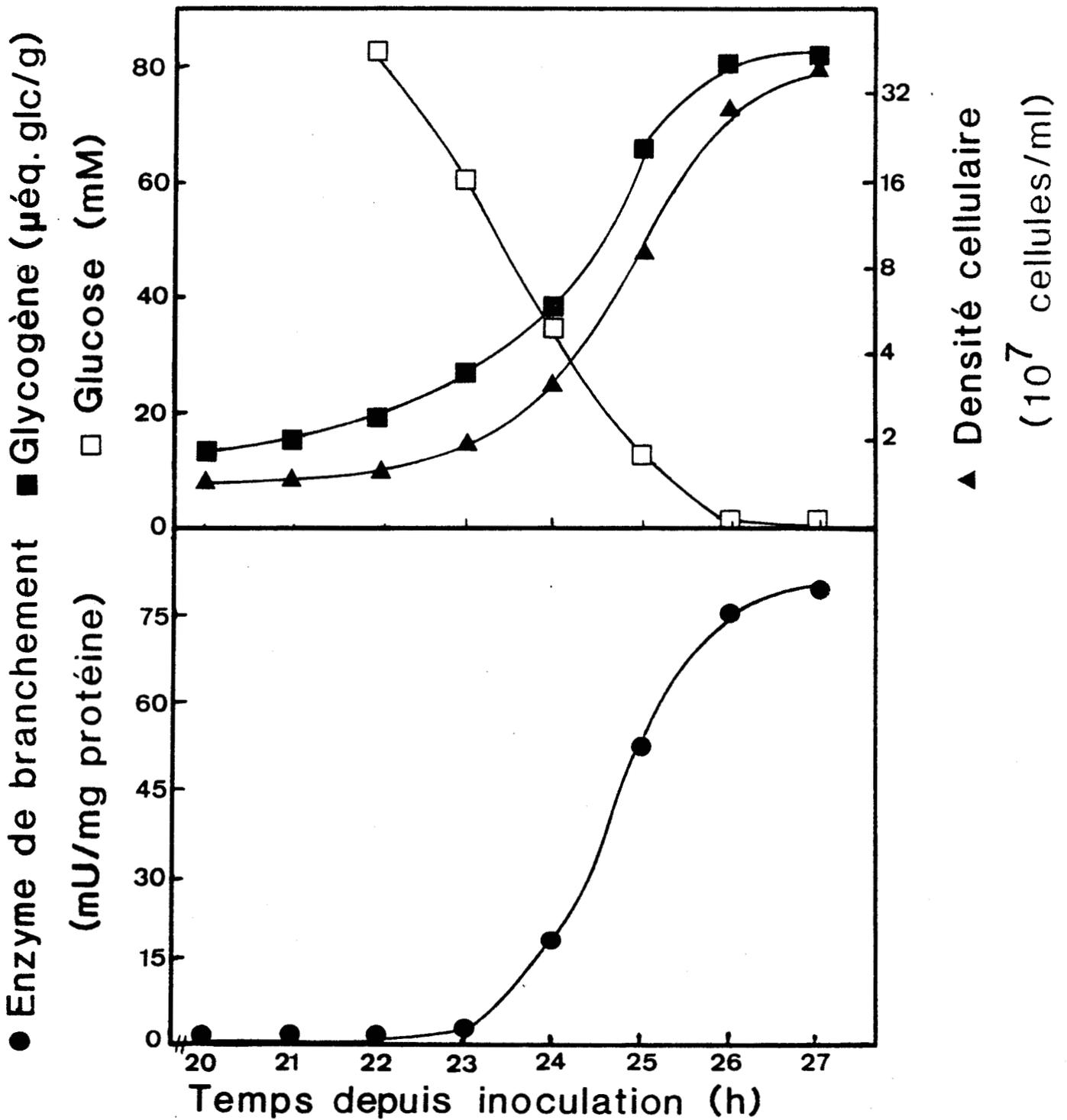


Fig. 15: Changements de la concentration en glycogène et de l'activité de l'enzyme de branchement au cours de la croissance de la levure sur milieu glucosé.

2) Spectre d'absorption du produit formé après action de l'enzyme de branchement.

Afin de caractériser le produit synthétisé sous l'action couplée de l'enzyme de branchement de levure et de la phosphorylase a de muscle de Lapin, le spectre d'absorption du produit formé, coloré à l'iode a été effectué entre 400 et 700 nm (35). En effet, l'amylose adsorbe à 650 nm, l'amylopectine à 550 nm et le glycogène à 450 nm. La figure 16 montre qu'après 10 min. de réaction, 10  $\mu$ l d'extrait enzymatique donne un produit, coloré en bleu à l'iode, ayant un maximum d'absorption à 600 nm, alors que 30  $\mu$ l d'extrait enzymatique donne un produit, coloré en violet à l'iode, ayant un maximum d'absorption à 570 nm. Ainsi avec une concentration croissante en extrait enzymatique, on observe un déplacement du maximum d'absorption du produit formé coloré à l'iode vers de plus faible longueur d'onde et une diminution de l'absorbance du complexe à l'iode.

Par conséquent l'action combinée de l'enzyme de branchement de levure et la phosphorylase a de muscle de Lapin permet la synthèse d'un polysaccharide branché, comparable à l'amylopectine.

Lorsque l'on augmente le temps d'incubation à 30 min en présence de 10  $\mu$ l d'extrait enzymatique, un spectre d'adsorption biphasique est observé (Fig. 16), présentant deux maxima d'absorption : un à 580 nm, l'autre à 460 nm. L'enzyme de branchement permet donc la synthèse de polysaccharides de type amylopectine et de type glycogène. Quand le temps d'incubation dépasse une heure, les polysaccharides synthétisés forment un précipité en présence d'iode insoluble dans l'eau ne permettant plus d'effectuer un spectre d'absorption. Le produit formé ayant un spectre d'absorption ressemblant à un polysaccharide branché, confirme que le couplage de l'enzyme de branchement et de phosphorylase

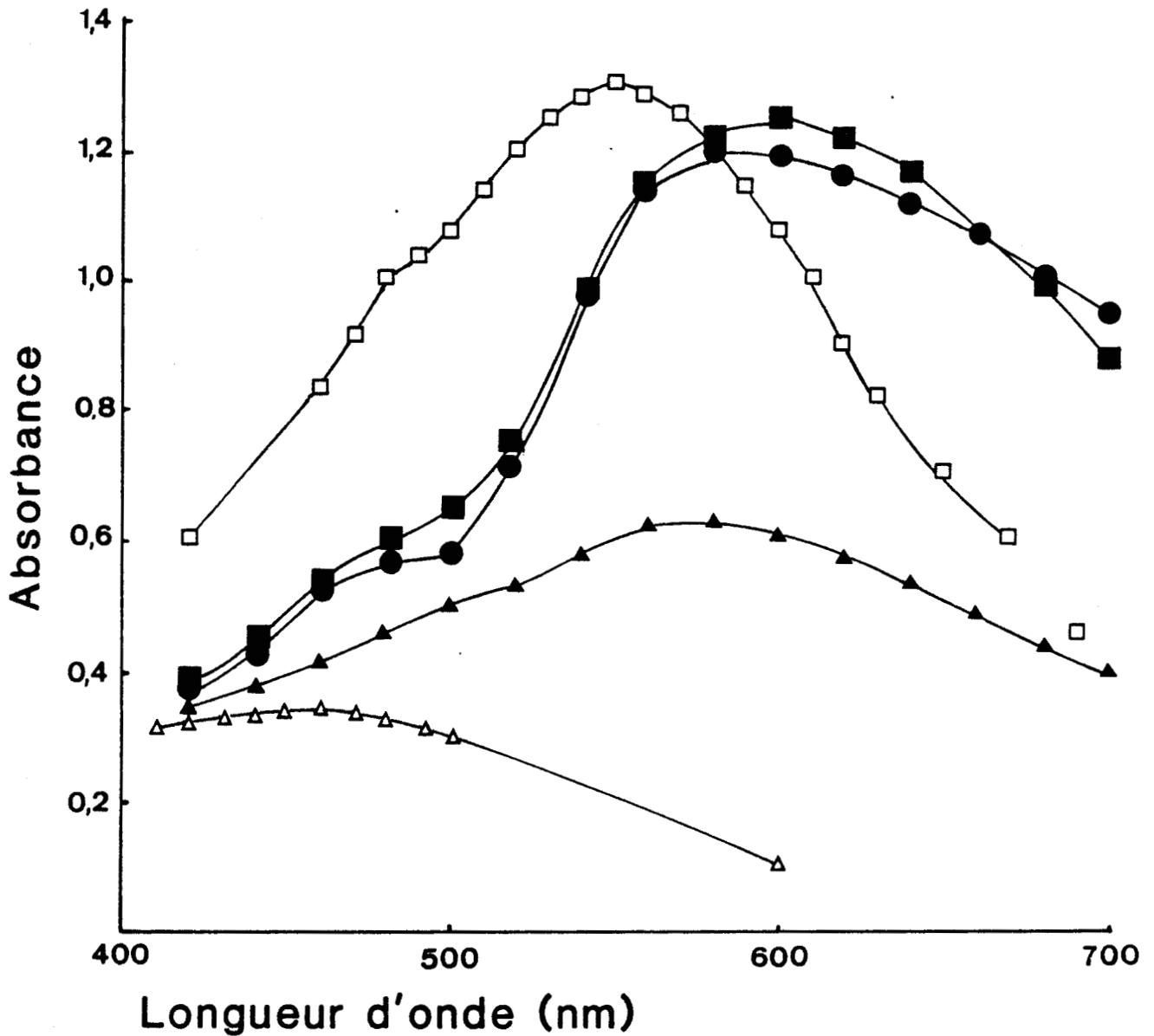


Fig. 16 : Spectre d'absorption du produit formé, coloré à l'iode, après l'action combinée de l'enzyme de branchement de levure et de la phosphorylase  $\alpha$  de muscle de Lapin.

- : Spectre d'absorption du produit formé après l'action de 10  $\mu$ l d'extrait enzymatique, pendant 10 min.
- ▲ : Spectre d'absorption du produit formé après l'action de 30  $\mu$ l d'extrait enzymatique, pendant 10 min.
- : Spectre d'absorption du produit formé après l'action de 10  $\mu$ l d'extrait enzymatique, pendant 30 min.
- : Spectre d'absorption de l'amylopectine de pomme de terre (297)
- Δ : Spectre d'absorption du glycogène de foie de Lapin (297)

a de muscle de Lapin permet effectivement la synthèse d'un produit ramifié.

3) Expériences témoins du dosage de l'activité de l'enzyme de  
branchement du glycogène.

Le dosage de l'activité de branchement est basé sur la stimulation de la synthèse sans amorce d'un  $\alpha$ -D-glucane à partir de glucose-1-phosphate par la phosphorylase a de muscle de Lapin (42). La phosphorylase a synthétise donc une amorce, utilisée par l'enzyme de branchement. De plus, l'accumulation de glycogène commence au moment où l'activité de branchement devient détectable par ce dosage. Il faut donc prouver que l'on ne dose pas l'activité de la phosphorylase plutôt que celle de l'enzyme de branchement lors de ce dosage par couplage, et, que l'on n'observe pas une induction de l'enzyme de branchement par la présence d'une quantité croissante de glycogène endogène, qui servirait d'amorce à la réaction.

Ainsi les réactions témoins, contenant l'enzyme de branchement dénaturée 10 min. à 100°C incorporent moins de 200 nmoles de  $[U-^{14}C]$  glucose-1-phosphate/mg/min. L'initiation de la synthèse *de novo* de glycogène par la phosphorylase a de muscle de Lapin étant sensible à de faibles concentrations en glycogène (42), un deuxième dosage est réalisé identique à la "méthode A" de Boyer et Preiss (35), avec en plus l'addition de glycogène de levure afin d'obtenir une même concentration en glycogène (125  $\mu$ g/200  $\mu$ l de mélange réactionnel) pour chaque dosage, permettant de palier à l'accumulation de glycogène endogène. Le même niveau d'induction de l'activité d'enzyme de branchement est alors obtenu, ce qui prouve que l'induction observée n'est pas due à l'action de la phosphorylase a sur le glycogène endogène.

Afin de doser l'activité de branchement en fin de phase exponentielle, en absence de glycogène, l'enzyme de branchement a été purifiée partiellement.

## II. Purification partielle de l'enzyme de branchement de levure

Les activités totales et spécifiques et les coefficients de purification obtenus au cours de la purification partielle de l'enzyme de branchement de levure sont présentés dans le tableau IX. L'activité de branchement est éluée de la colonne de DEAE-Trisacryl par un gradient linéaire de NaCl (0-0,5 M). Elle apparaît dès le début de l'application du gradient salin (0,1 M) sous forme d'un pic unique et est ainsi séparée du matériel absorbant à 280 nm (Fig. 17). Dans les fractions actives, le glycogène n'a pas été détecté et le dosage de l'activité de l'enzyme de branchement sur ces fractions après dénaturation par la chaleur ne présente aucune activité de branchement détectable. Par contre le glycogène endogène est retrouvé dans le tampon de lavage de la colonne, dans lequel aucune activité de branchement n'est détectable.

Enfin la purification partielle de l'enzyme de branchement d'un facteur de plus de 100 fois, permet définitivement d'écartier la possibilité d'une induction de l'enzyme de branchement par la présence de glycogène endogène.

## III. Caractérisation biochimique de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

- 1) Estimation de la masse moléculaire de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

Après purification partielle de l'enzyme de branchement de levure par chromatographie sur DEAE-Trisacryl, trois fractions présentant la plus

**Tableau IX** : Tableau de purification de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

( Etapes de purification )	( Protéines : (mg) )	( Activité de branchement : (U) )	( Activité spécifique : (U/mg) )	( Rendement : (%) )	( Facteur de purification )
( Extrait enzymatique )	551	48,4	0,087	100	1
( Précipitation au sulfate d'ammonium )	231	33,8	0,146	70	1,7
( Chromatographie sur DEAE trisacryl )	2	21	10,5	43	120
( Isoélectrofocalisation )	0,06	8,4	131	17	1508

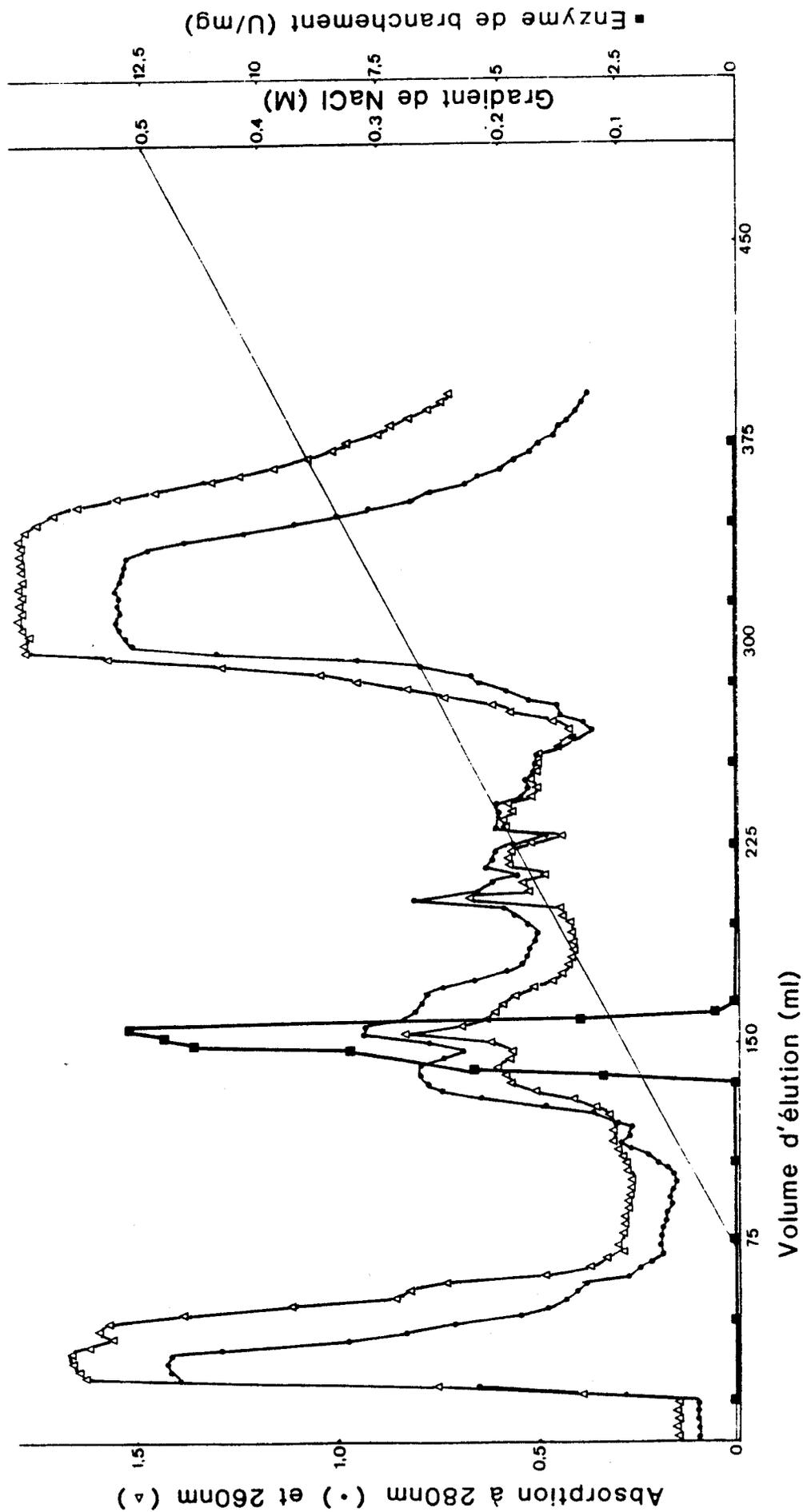


Fig. 17: Purification partielle de l'enzyme de branchement du glycogène de levure par chromatographie sur DEAE-Trisacryl.

forte activité de branchement ont été rassemblées. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS avec ou sans  $\beta$ -mercaptoéthanol (à 5% dans le tampon d'échantillon) de ce groupe de fractions montre la présence d'un polypeptide majoritaire d'une masse moléculaire d'environ 59 kDa et d'autres polypeptides minoritaires en quantités variables d'une masse moléculaire de 70, 36, 34, et 30 kDa (Fig. 18).

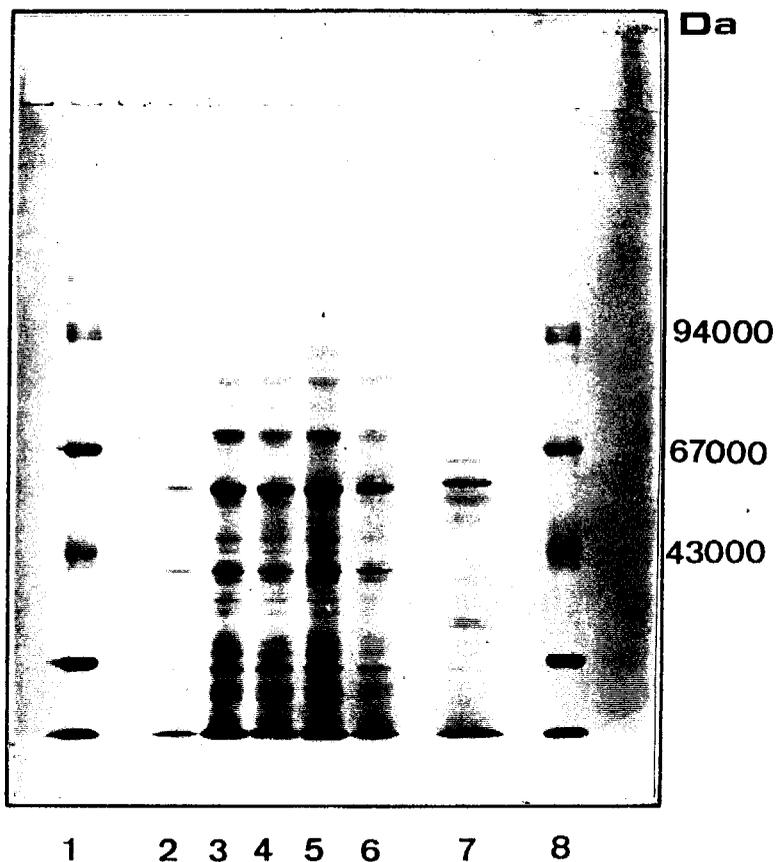
La figure 18 présente le profil d'électrophorèse des protéines de levure présentes en fin de phase exponentielle de croissance sur milieu glucose et des protéines présentes dans le groupe de fractions purifiées. Si le polypeptide majoritaire correspond à l'enzyme de branchement, il n'est pas détectable sur le profil d'électrophorèse des protéines de l'extrait brut.

Ainsi l'enzyme de branchement du glycogène de levure serait monomérique et aurait une masse moléculaire de  $59000 \pm 2000$  Da, si le polypeptide majoritaire est l'enzyme de branchement, ce qui sera étudié lors de l'étape de purification suivante.

## 2) Détermination du point isoélectrique de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

1 mg du groupe de fractions ont été déposés afin d'effectuer une isoélectrofocalisation entre les pH 5,5 et 8,5. La figure 19 montre que l'enzyme de branchement a focalisé entre les pH 5,5 et 5,75. Alors que l'enzyme de branchement semble se présenter sous la forme d'un polypeptide unique lors de l'électrophorèse en présence de SDS, au moins trois formes de points isoélectriques très proches sont révélées par isoélectrofocalisation.

L'activité de l'enzyme de branchement ayant été révélée à la limite de la linéarité du gradient de pH, une isoélectrofocalisation entre les pH 4,5 et 7 a été effectuée. Dans le but de lier ces différentes formes



**Fig. 18:** Profil d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS du groupe de fractions éluées présentant une activité de branchement après chromatographie sur DEAE-Trisacryl.

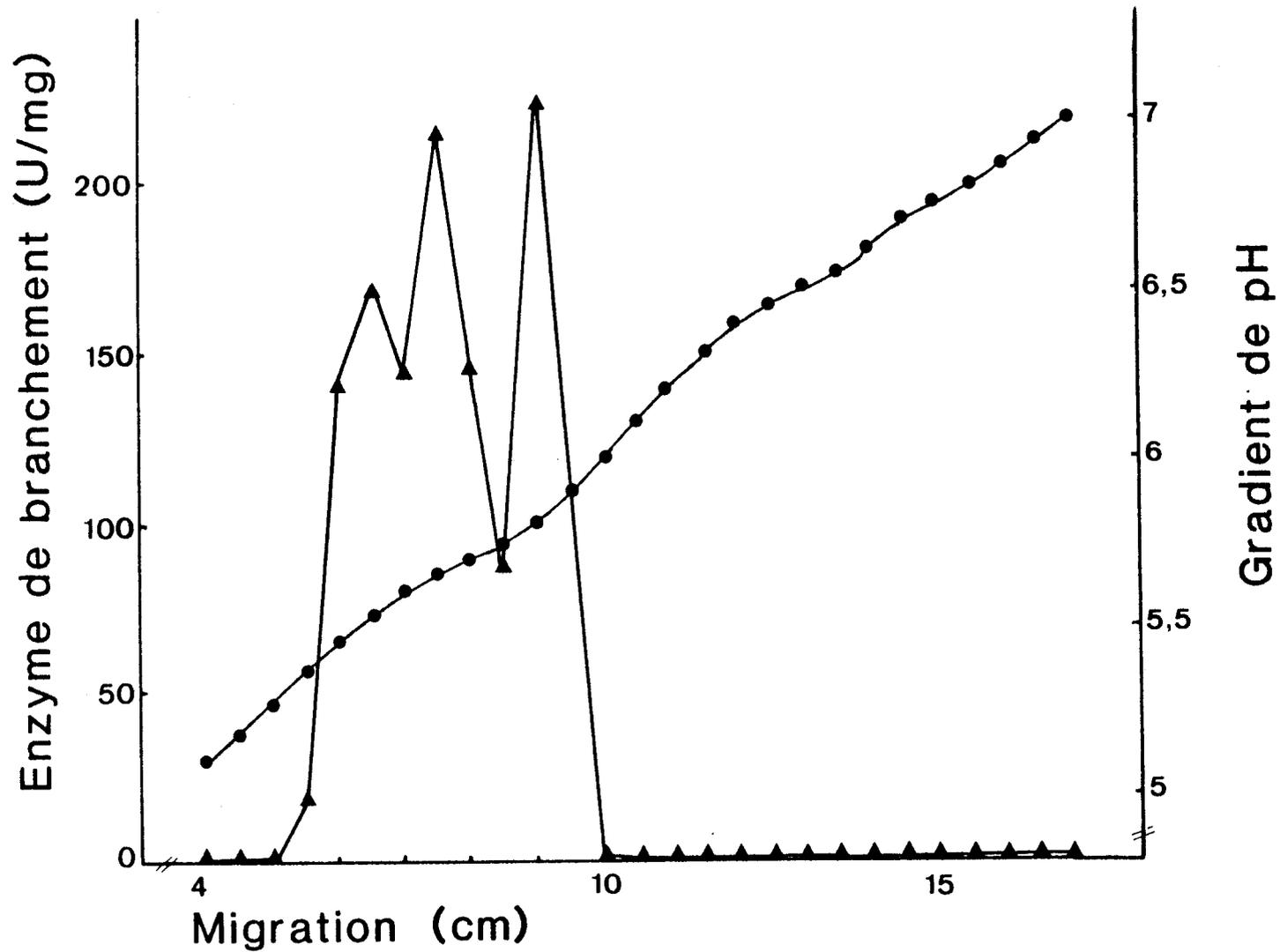
Les canaux 2, 3, 4, 5 et 6 représentent le profil d'électrophorèse des protéines de levure présentes en fin de phase exponentielle de croissance. Le canal 7 représente le profil d'électrophorèse du groupe de fractions éluées après chromatographie sur DEAE-Trisacryl. Les canaux 1 et 8 représentent le profil d'électrophorèse des protéines témoins: glycogène phosphorylase de muscle de Lapin (94000 Da), serum albumine (67000 Da) et ovalbumine (43000 Da).

de l'enzyme de branchement de points isoélectriques différents avec l'activité de l'enzyme de branchement, une révélation sur gel de l'activité de branchement est réalisée. Ainsi après coloration à l'iode du polysaccharide synthétisé dans le gel, on détecte au moins deux bandes dont une est majoritaire à pH=5,7 et l'autre est minoritaire à pH=5,5, confirmant les résultats précédents. Par conséquent l'enzyme de branchement de levure existe sous au moins deux formes actives de points isoélectriques légèrement différents compris entre 5,5 et 5,75.

Afin de prouver que l'existence de ces formes n'est pas un artéfact d'isolement, une révélation d'activité de branchement par coloration à l'iode sur gel a été effectuée sur les extraits bruts de levure.

3) Révélation de l'activité de branchement sur gel de polyacrylamide sans SDS.

L'extrait enzymatique et le culot de protéines après précipitation au sulfate d'ammonium lors de la purification partielle de l'enzyme de branchement ont été déposés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant et l'activité de l'enzyme de branchement a été révélée directement sur gel. On observe plusieurs bandes, dont une est majoritaire présentant l'activité de branchement. Lors d'une électrophorèse native à 4% en acrylamide, les protéines migrent en fonction de leur ionisation respective. Ainsi comme pour l'isoélectrofocalisation précédente, la bande minoritaire est plus acide. On observe une traînée colorée à l'iode, correspondant probablement à des traces de polysaccharides de l'extrait, qui jouent le rôle d'amorce pour la phosphorylase a. Un traitement à l' $\alpha$ -amylase pancréatique porcine (2,5  $\mu$ g/ml) pendant une heure à 4°C permettrait d'éliminer ces amorces (252). Un tel traitement a été essayé, mais l'activité de l'enzyme de branchement sur gel, après



**Fig. 19:** Isoélectrofocalisation de l'enzyme de branchement du glycogène de levure partiellement purifiée.

L'enzyme de branchement se présente sous 3 formes actives de points isoélectriques très proches compris entre 5,5 et 5,75.

électrophorèse ne s'est pas révélée. L' $\alpha$ -amylase a probablement migré dans le gel et a attaqué les polysaccharides, qui commencent à être synthétisés dans le gel.

4) Electrophorèse dénaturante de la forme de point isoélectrique égale à 5,7 de l'enzyme de branchement de levure selon la méthode Phast.

La forme focalisant à pH=5,7 est la plus active aussi bien par dosage de son activité de branchement après isoélectrofocalisation ou par révélation par coloration à l'iode sur gel. Cette forme purifiée après isoélectrofocalisation est contaminée par des ampholines, c'est pourquoi l'électrophorèse sera réalisée pendant une heure (plutôt que 30 min) dans un gel avec un gradient de 8 à 25% en acrylamide. Ainsi les ampholines se concentreront dans le bas du gel de séparation, permettant la visualisation des protéines d'une taille de plus de 20 kDa. En parallèle, le groupe de fractions obtenues après chromatographie sur DEAE-Trisacryl est déposé.

L'isoélectrofocalisation ne permet pas de purifier totalement l'enzyme de branchement de levure, puisque d'autres polypeptides demeurent (Fig. 20), mais à ce stade l'enzyme de branchement est purifiée plus de 1500 fois (Tableau IX). On remarque qu'une bande de  $70000 \pm 2000$  Da est alors majoritaire. On ne pourra donc pas conclure précisément sur la masse moléculaire de l'enzyme de branchement, qui à ce stade n'est pas totalement purifiée. La masse moléculaire de l'enzyme de branchement serait de  $70000 \pm 2000$  Da, si la bande majoritaire est l'enzyme de branchement.

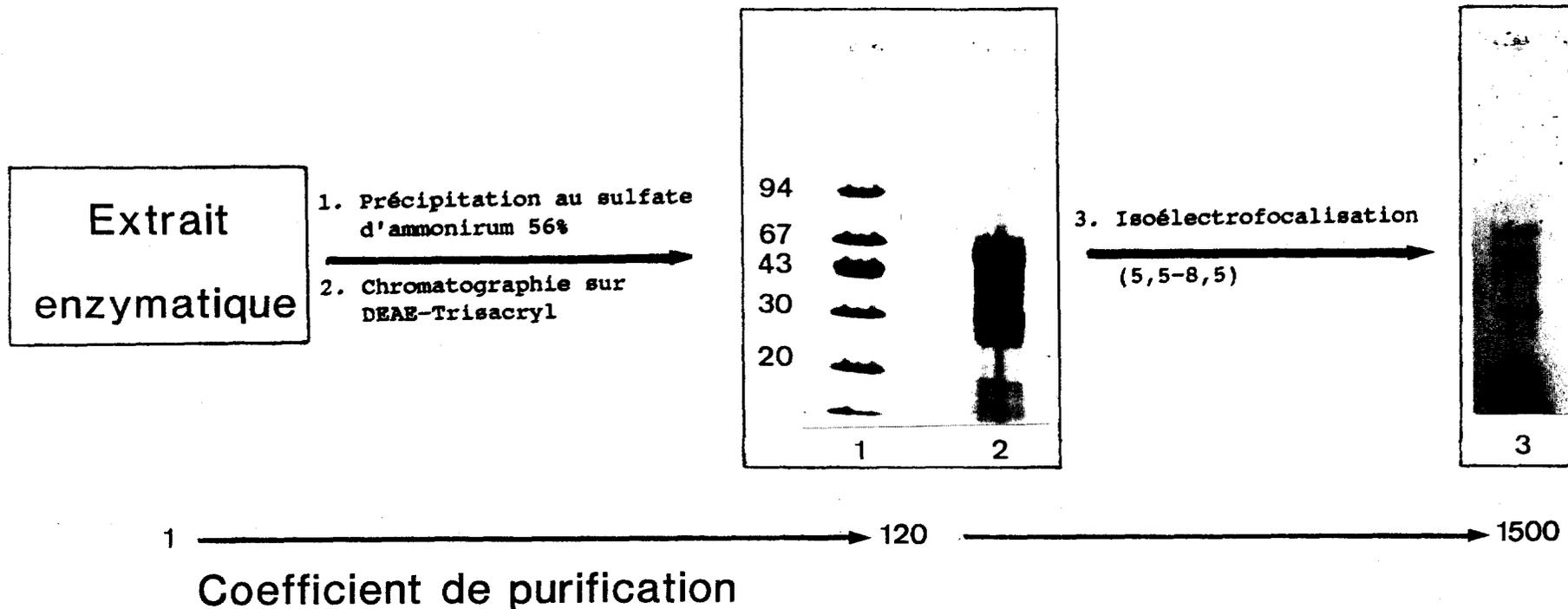


Fig. 20: Profil d'électrophorèse en gradient 8-25% d'acrylamide en présence de SDS des fractions obtenues au cours de la purification partielle de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

Le canal 2 représente le profil d'électrophorèse du groupe de fractions éluées après chromatographie sur DEAE-Trisacryl. Le canal 3 représente le profil d'électrophorèse de la fraction focalisant à pH=5,7 et présentant la plus forte activité de branchement. Le canal 1 représente le profil d'électrophorèse des protéines témoins: phosphorylase de muscle de Lapin (94000 Da), serum albumine (67000 Da), anhydrase carbonique d'érythrocyte Bovin (30000 Da) et l'inhibiteur trypsique de soja (20100 Da).

#### IV. Régulation post-traductionnelle de l'enzyme de branchement du glycogène de levure

Chez la levure, comme dans les tissus animaux, les taux de synthèse et de dégradation du glycogène sont contrôlés par les activités de la glycogène synthétase et de la glycogène phosphorylase respectivement (Fig. 21). Comme l'enzyme de branchement n'apparaît qu'en fin de phase exponentielle et qu'elle agit de concert avec la glycogène synthétase pour assurer la synthèse du glycogène, il a été supposé que la régulation de l'enzyme de branchement est calquée sur la régulation post-traductionnelle de la glycogène synthétase. La glycogène synthétase de levure ayant été étudiée par J. François (323-364), cette étude a été reprise et appliquée à l'enzyme de levure en utilisant les réponses de la glycogène synthétase déjà connues comme témoins.

##### 1) Les activités de la glycogène synthétase et de l'enzyme de branchement au cours de la croissance sur milieu glucose.

###### a) La glycogène synthétase.

La glycogène synthétase partiellement purifiée 500 fois (365) présente un  $K_m$  de 1,2 mM pour l'UDPG. Son pH optimum est de 7,2 et à ce pH, elle est activée au plus trois fois par le glucose-6-phosphate. Elle est inhibée fortement par les anions  $Cl^-$  et  $SO_4^-$  et par l'ADP et l'ATP, mais ces inhibitions sont levées par le glucose-6-phosphate (366-368). Il a donc été proposé, que la glycogène synthétase interagit allostériquement avec le glucose-6-phosphate et les nucléotides adényliques (366-368).

En fin de phase exponentielle de croissance, une diminution de la sensibilité de la glycogène synthétase au glucose-6-phosphate (280) coïncide avec l'accumulation de glycogène et un mutant ne présentant pas ce changement de sensibilité au glucose-6-phosphate n'accumule pas de glycogène. Ainsi la glycogène synthétase existerait sous deux formes

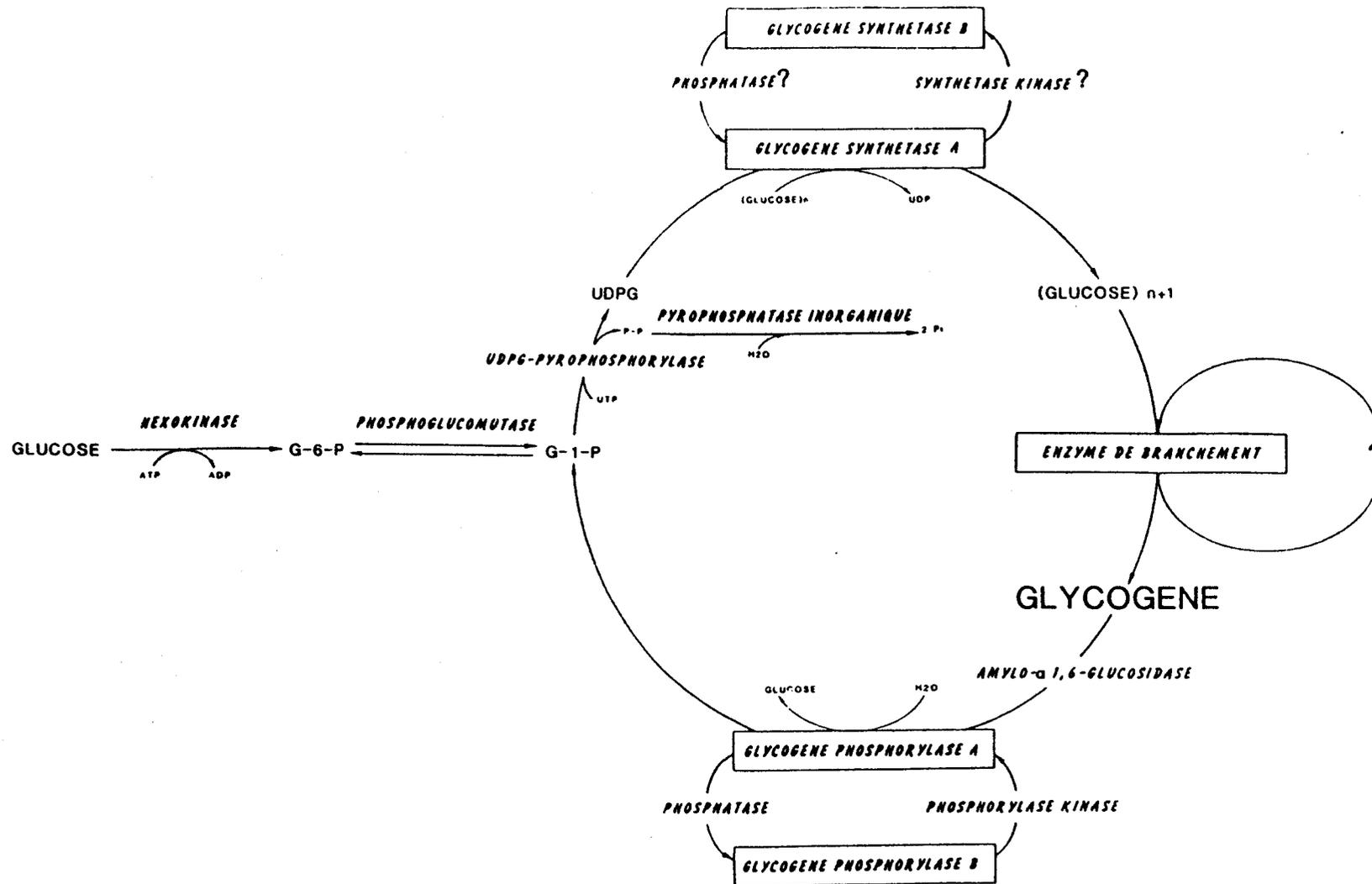
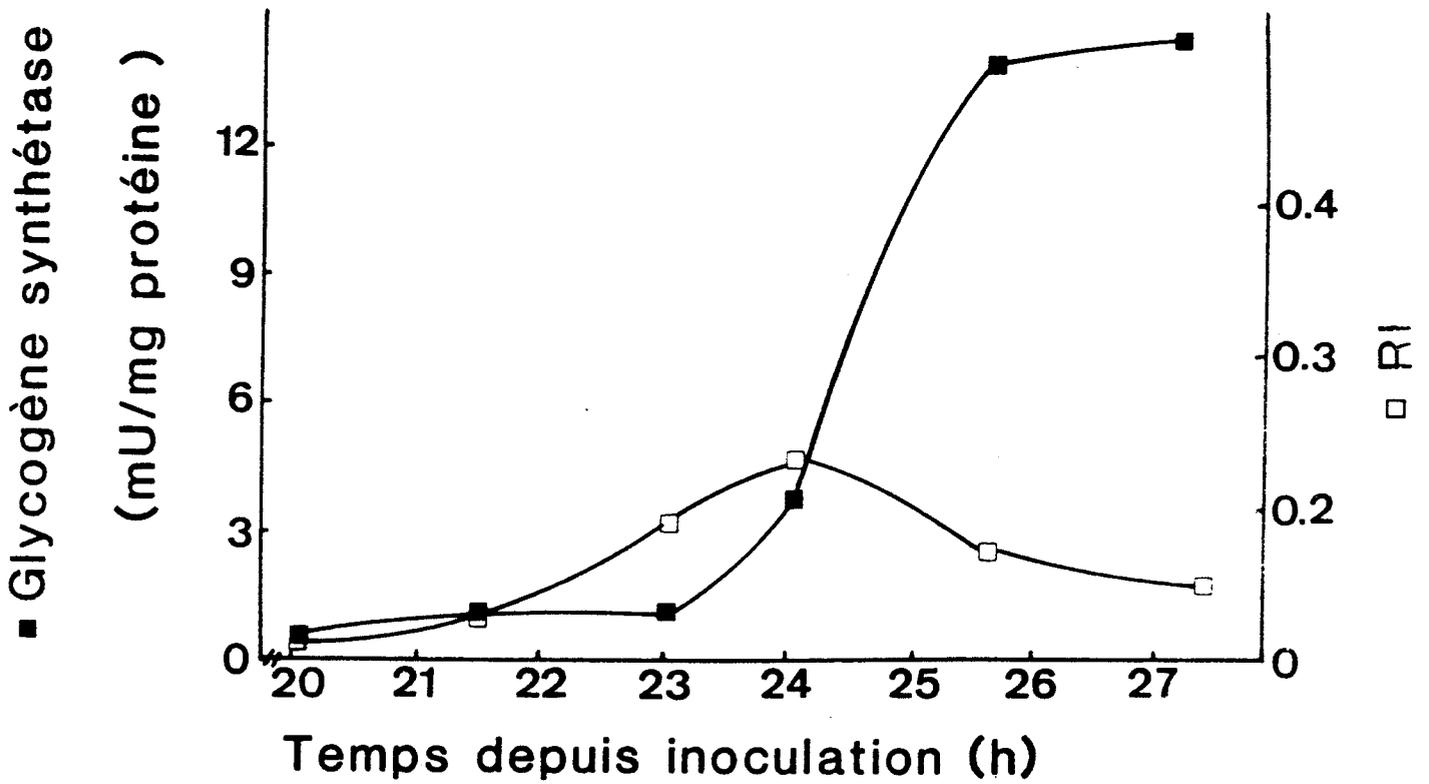


Fig. 21: Métabolisme du glycogène chez *Saccharomyces cerevisiae*.

interconvertibles, l'une dépendante au glucose-6-phosphate (forme D) et l'autre indépendante au glucose-6-phosphate (forme I). L'interconversion de la forme D en I s'accompagne d'une diminution du  $K_a$  pour le glucose-6-phosphate de 0,5 à 0,017 mM. En présence de glucose-6-phosphate, la vitesse maximale de la forme D est augmentée, atteignant, à 20 mM en glucose-6-phosphate, la valeur de la vitesse maximale de la forme I. L'activité totale (D + I) de la glycogène synthétase est dosée en présence de glucose-6-phosphate 10 mM. L'augmentation progressive de l'activité totale de la glycogène synthétase au cours de la croissance sur glucose a été vérifiée (Fig. 22)(280, 284, 287). La glycogène synthétase atteint un degré élevé d'activation (80 à 90%), qui coïncide avec la vitesse maximale de la synthèse du glycogène. Le rapport d'activité de la glycogène synthétase (373), défini comme le rapport de l'activité mesurée sans glucose-6-phosphate sur celle en présence de glucose-6-phosphate 8 mM, augmente depuis le début jusqu'au milieu de la phase exponentielle et finalement décroît en phase stationnaire. La glycogène synthétase serait donc présente sous une forme sensible au glucose-6-phosphate en début de la phase exponentielle et s'interconvertirait en une forme insensible au glucose-6-phosphate, quand le glycogène s'accumule. En phase stationnaire, l'activité totale double encore alors que la forme insensible au glucose-6-phosphate reste à une valeur constante, ce qui entraîne une diminution du rapport d'activité en dessous de 50%.

**b) L'enzyme de branchement du glycogène.**

Afin de savoir si l'enzyme de branchement existe sous une forme sensible au glucose-6-phosphate en début de phase exponentielle, comme existe la glycogène synthétase, l'activité de l'enzyme de branchement a été dosée selon la "méthode A" de Boyer et Preiss en présence de



**Fig. 22:** Changements de l'activité de la glycogène synthétase et du rapport d'indépendance (RI) au cours de la croissance en milieu glucosé.

Le rapport d'indépendance est le rapport de l'activité de la glycogène synthétase mesurée sans glucose-6-phosphate sur celle en présence de glucose-6-phosphate 8 mM.

glucose-6-phosphate 10 mM. Afin d'éviter la synthèse de glycogène assurée par la forme sensible au glucose-6-phosphate de la glycogène synthétase pendant l'incubation, le même dosage a été également effectué avec à la place du glucose-6-phosphate du 2-deoxy-glucose-6-phosphate 10 mM, qui n'est pas métabolisé. Il a été vérifié que la phosphorylase a de muscle de Lapin n'est que faiblement inhibée par le glucose-6-phosphate dans les conditions de dosage (369-370) et n'est pas inhibée par le 2-deoxy-glucose-6-phosphate.

D'après la figure 24, ni le glucose-6-phosphate, ni le 2-deoxy-glucose-6-phosphate 10 mM n'ont d'effet sur l'activité de branchement en début de phase exponentielle. Ainsi l'enzyme de branchement est absent ou présent en très faible quantité ou existe sous une forme indétectable par le dosage, qui pourrait être détectée en présence d'un autre métabolite que le glucose-6-phosphate.

2) Effet du glucose sur les activités glycogène synthétase et enzyme de branchement.

a) Effet du glucose sur la synthèse de glycogène.

En phase exponentielle de croissance, les levures contiennent peu de glycogène (0,7% en poids humide). D'après les travaux de J. François (323, 364), quand les levures sont récoltées et incubées en présence de glucose, à une concentration de 0,1 M, la concentration en glycogène demeure inchangée pendant les 10 premières minutes, puis augmente à une vitesse de 2 à 3  $\mu$ moles de glucose incorporées par min et par g de cellules pendant au moins une heure. L'activité de la glycogène synthétase, après un temps de latence de quelques minutes, augmente progressivement de 4 fois.

Chez le mutant thermosensible déficient en adénylate cyclase (mutant *cdc 35*), le glucose induit la glycogène synthétase d'un facteur 4,

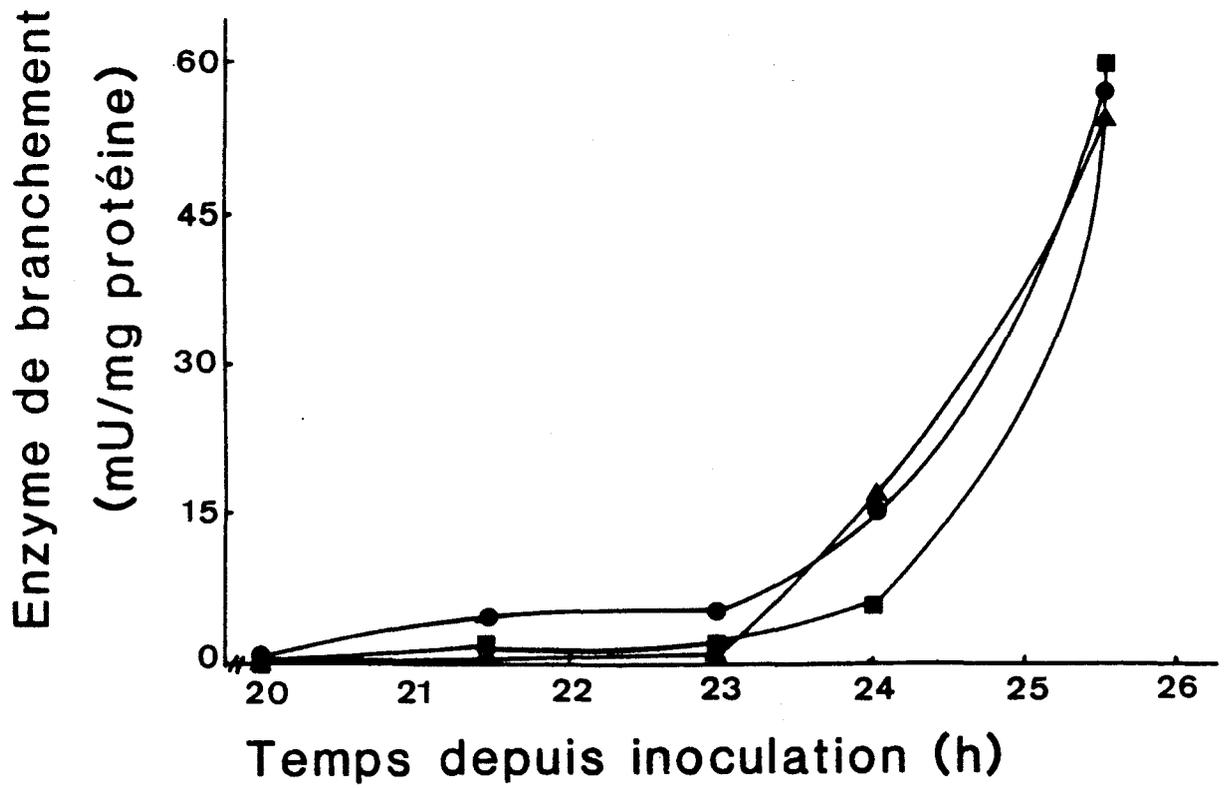


Fig. 23: Changements de l'activité de l'enzyme de branchement au cours de la croissance en milieu glucosé, en absence de glucose-6-phosphate (●), en présence de glucose-6-phosphate (■) ou en présence de 2-déoxy-glucose-6-phosphate (▲).

lorsque le mutant est incubé à la température permissive de 26°C. Par contre à 35°C, température à laquelle le mutant ne forme pas d'AMPC, la glycogène atteint une activité multipliée par un facteur 12.

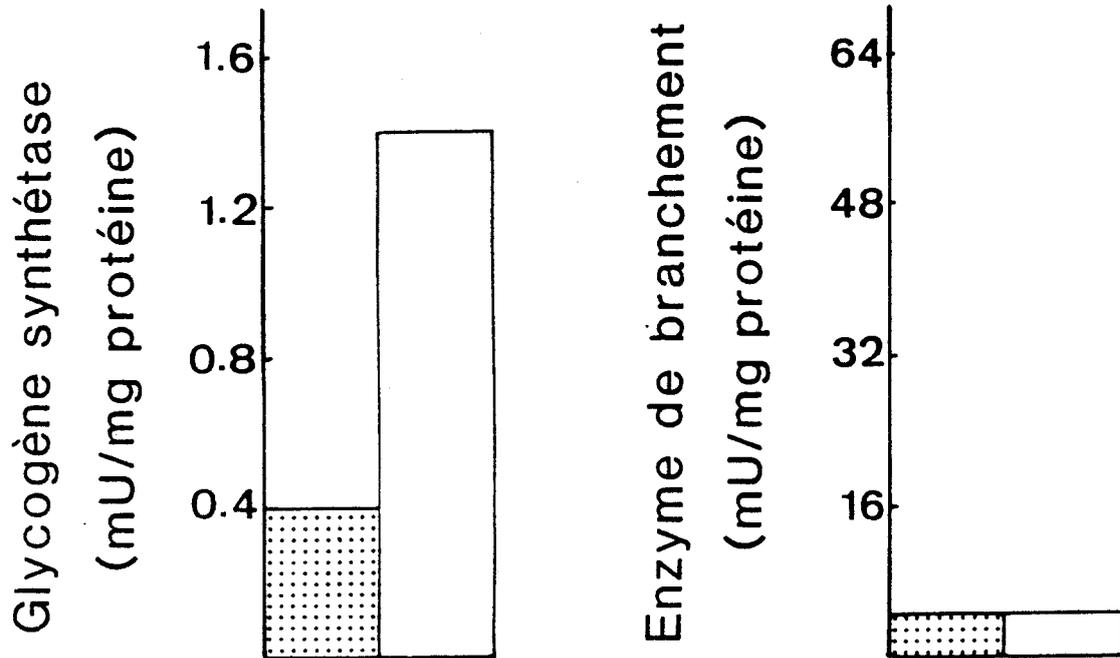
Par conséquent, l'interconversion de la glycogène synthétase, déclenchée par le glucose, peut être clairement observée grâce à ce modèle.

**b) Effet du glucose sur l'activité de l'enzyme de branchement du glycogène.**

Afin de savoir si le glucose occasionne des changements d'activité de l'enzyme de branchement, et afin de savoir si l'enzyme de branchement existe sous deux formes interconvertibles sensibles à la présence ou à l'absence de glucose dans le milieu, l'activité de l'enzyme de branchement a été dosée chez le mutant *cdc 35* à 35°C.

Comme l'induction par le glucose provoque une forte activation de la glycogène synthétase et un accroissement rapide du taux de la synthèse de glycogène dans le milieu réactionnel, le dosage de l'enzyme de branchement risquait d'être masqué par l'utilisation du glycogène nouvellement synthétisé, comme amorce, par la phosphorylase a de muscle de Lapin. C'est pourquoi le 2-deoxy-glucose, plutôt que le glucose a été utilisé comme inducteur. Le 2-deoxy-glucose est phosphorylé par l'hexokinase de levure (371-372), mais son métabolisme via la phosphoglucoisomérase est négligeable (373). De plus le 2-deoxy-glucose provoque un effet inducteur identique à celui exercé par le glucose sur la glycogène synthétase.

Comme le 2-deoxy-glucose semble se fixer au site de fixation du glucose, de la phosphorylase a de muscle de Lapin (374), provoquant alors son inactivation, les extraits enzymatiques obtenus après induction au 2-deoxy-glucose sont soumis à une gel filtration sur



**Fig. 24:** Effet du 2-déoxy-glucose sur l'activité de la glycogène synthétase et de l'enzyme de branchement, chez le mutant thermosensible *cdc 35* déficient en adénylate cyclase, à la température restrictive de 35°C.

Le 2-déoxy-glucose ajouté à une concentration finale de 0,1 M provoque l'activation de la glycogène synthétase par interconversion en forme active, alors que l'activité de l'enzyme de branchement est inchangée.

▣ : En absence de 2-déoxy-glucose

□ : En présence de 2-déoxy-glucose

Bio-Gel P<sub>2</sub>. Ainsi, d'après la figure 24, l'enzyme de branchement demeure insensible au 2-deoxy-glucose, alors que la glycogène synthétase, dans les mêmes conditions est activée.

Finalement, l'enzyme de branchement de levure ne semble pas devoir son induction en fin de phase exponentielle à une interconversion d'une forme moins active, en une forme plus active. La régulation de la glycogène synthétase basée sur l'existence de deux formes interconvertibles, différant par leur sensibilité au glucose-6-phosphate dépend peut être de l'interconversion des deux formes par une phosphorylation et une déphosphorylation. Ce contrôle du métabolisme du glycogène, dans le foie, a été prouvé, mais est très discuté dans le cas de la levure. L'enzyme de branchement semble donc échapper à une régulation post-traductionnelle, calquée sur celle de la glycogène synthétase.

#### V. Régulation transcriptionnelle de l'enzyme de branchement du glycogène de levure

Aucune dépendance au glucose-6-phosphate n'ayant pu être mise en évidence, ni d'induction par le glucose, l'hypothèse d'une régulation de l'enzyme de branchement du glycogène de levure à un niveau transcriptionnel a alors été éprouvée. Pour étudier la régulation transcriptionnelle probable de cette enzyme, le clonage du gène, codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure a été réalisé.

1) Clonage et sous-clonage du gène codant pour l'enzyme de  
branchement du glycogène de levure.

a) **Caractérisation du mutant JM 19.**

\* *Construction et caractéristiques génétiques de JM 19 :*

Une mutagenèse chimique par l'éthyl-méthane-sulfonate (375) de la souche sauvage de levure JC 482 a permis d'isoler une souche mutante pour l'accumulation de glycogène, la souche JM 19. Ce travail de mutagenèse a été effectué par Joe Manupello, étudiant dans le laboratoire de Kelly Tatchell (North Carolina State University).

JM 19 a été sélectionnée, car cette souche se colore en bleu après vaporisation à l'iode des boîtes en milieu YPAD, après 3 jours de croissance (376) alors qu'une souche sauvage se colore en brun-rouge. JM 19 n'accumule que partiellement le glycogène en réponse à une carence en sulfate, mais l'accumule normalement lors d'une carence azotée. La mutation qui affecte JM 19 ségrège 2:2 lors de la méiose (17 tétrades ont été disséquées)(Fig. 25). Cette défectuosité est nucléaire récessive.

Une deuxième mutation occasionnée probablement lors de la mutagenèse touche le gène *trp1*, faisant de JM 19 une souche auxotrophe pour le tryptophane.

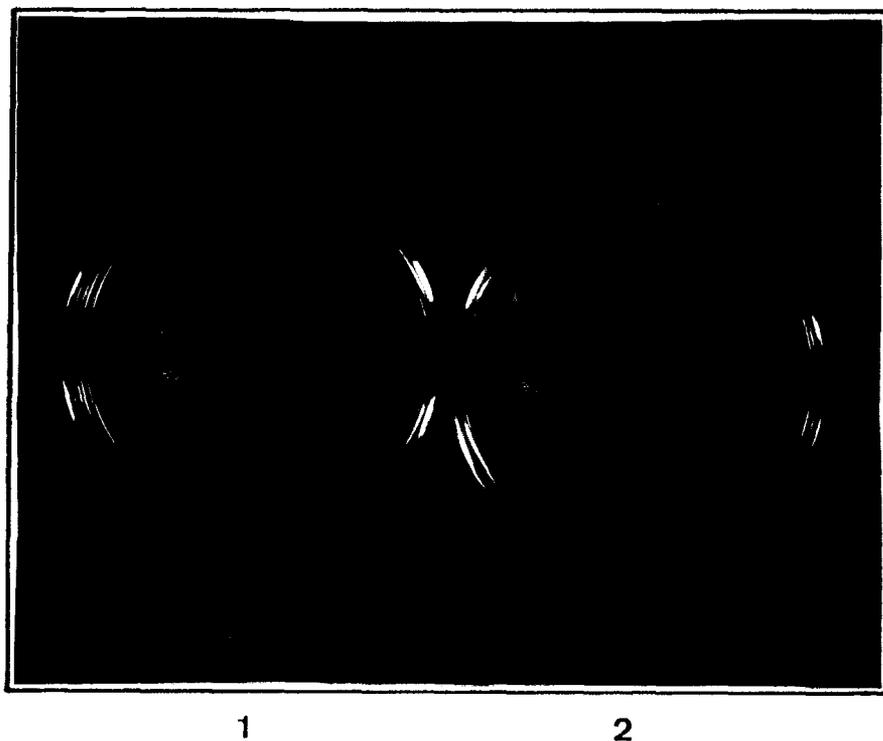
La coloration bleue observée quand le mutant JM 19 est coloré à l'iode après croissance sur milieu YPAD n'est pas observée sur milieu SDC (Fig. 26).

Le polysaccharide de réserve accumulé dans les levures mutantes JM 19 se colorant en bleu à l'iode, caractéristique de l'amylose, doit avoir une structure faiblement ou non branchée. Le mutant JM 19 a une activité glycogène synthétase et glycogène phosphorylase normale, lors de la croissance sur milieu YPAD, de plus il accumule 75% du taux de glycogène d'une souche sauvage en fin de phase exponentielle, mais aucune activité d'enzyme de branchement du glycogène n'est détectable (Fig. 27).



Fig. 25: Vaporisation à l'iode des tétrades, obtenues après dissection, lors du croisement de la souche mutante *JM 19* et d'une souche sauvage.

Les colonies bleues sont les colonies mutantes et les colonies claires sont les colonies sauvages.



**Fig. 26:** Vaporisation à l'iode des tétrades après 3 jours de culture à 30°C sur milieu riche YPAD (1) et sur milieu carencé SDC (2).

Sur milieu YPAD (1), les colonies mutantes sont colorées en bleu et les colonies sauvages sont claires, après vaporisation à l'iode. Sur milieu SDC (2), les colonies mutantes sont claires et les colonies sauvages sont colorées en bleu.

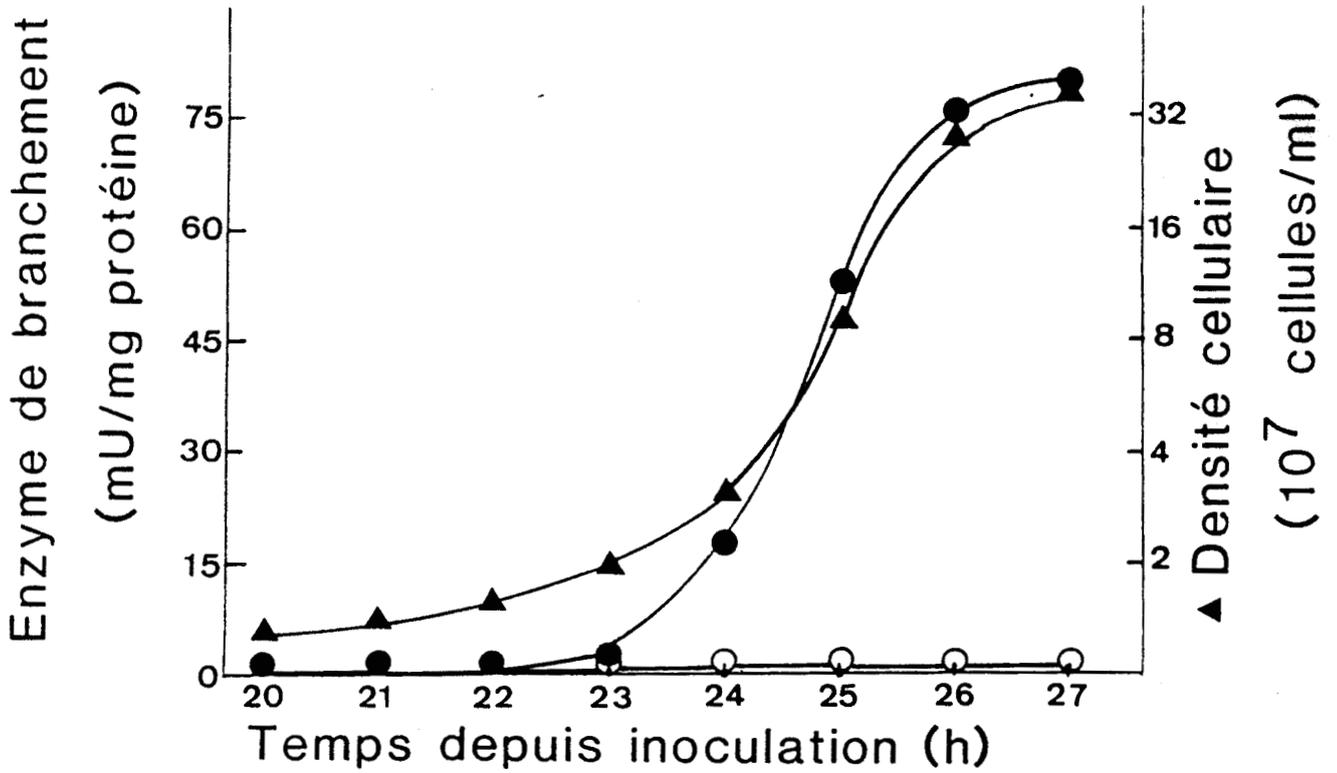


Fig. 27: Différences de l'activité de l'enzyme de branchement, au cours de la croissance sur milieu glucosé, de la souche sauvage *JC 482* et la souche mutante "bleue" *JM 19*.

- : Activité de l'enzyme de branchement de la souche *JC 482*
- : Activité de l'enzyme de branchement de la souche *JM 19*

*JM 19* est donc à la base du clonage par complémentation de la mutation, affectant le gène intervenant dans l'activité de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

*\* Observation en microscopie de la souche mutante JM 19 et de la souche sauvage JC 482 :*

La morphologie des cellules de la levure mutante *JM 19* observée en microscopie optique est anormale. En effet quand *JM 19* atteint la densité cellulaire de  $10^8$  cellules/ml, les cellules de levure sont rassemblées en massif de plus de 10 cellules en forme de "grappe" (Fig. 28).

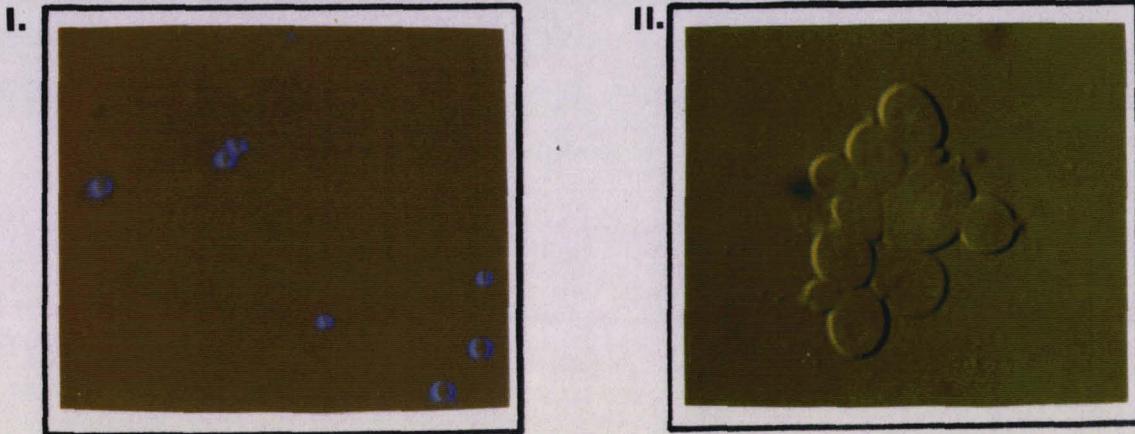
La microscopie électronique à balayage montre, que la paroi des cellules filles demeurent attachée à celle des cellules mères (Fig. 29). De plus on observe un renflement au niveau de ce point d'attache. Ces mêmes observations signalées dans le cas de mutants des gènes *cdc* et *rgr1* (377-380) seront discutées.

Ce travail de microscopie a été réalisé avec le Docteur E. Porchet et avec Monsieur J.C. Deremaux.

**b) Isolement de plasmides hybrides contenant le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.**

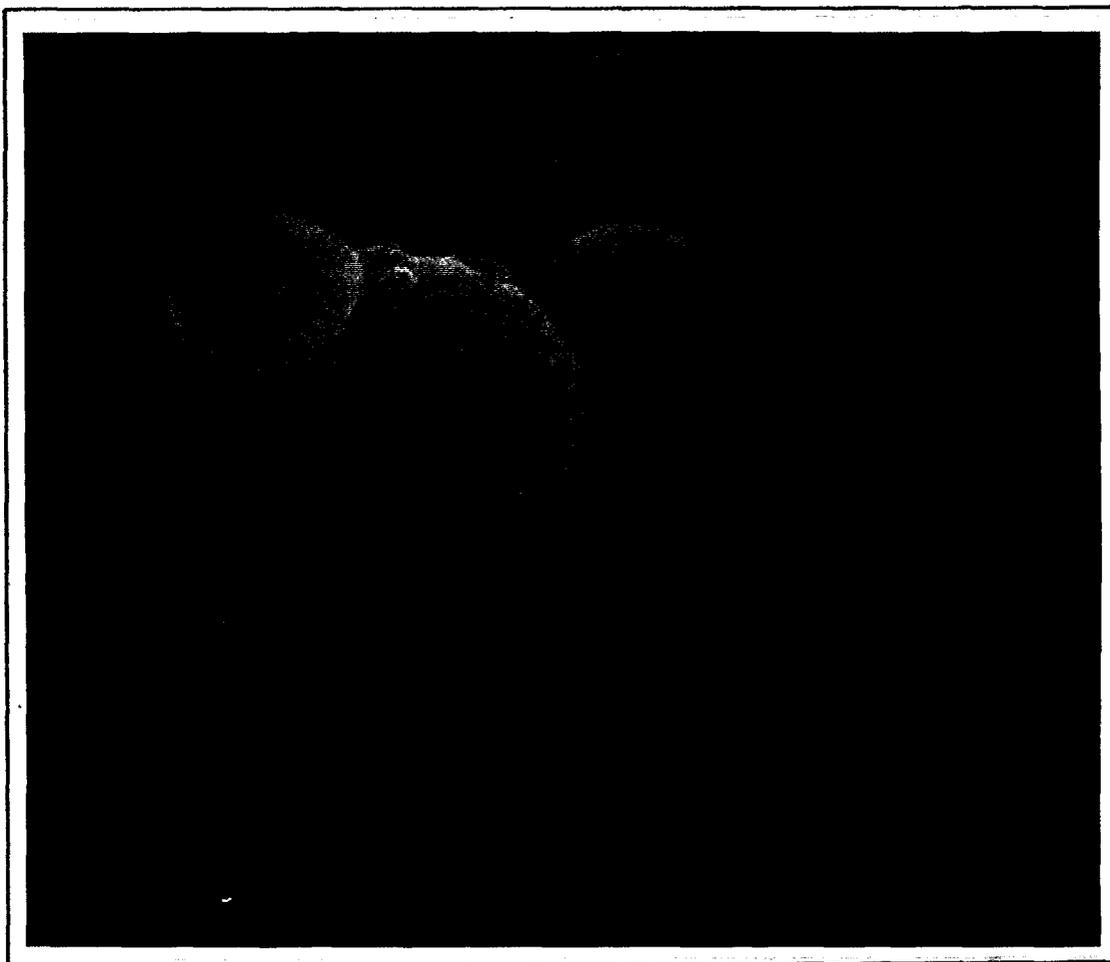
*\* Extraction de la banque génomique de levure :*

La banque génomique de levure construite par M.D. Rose, nous a été fournie par A. Petitjean sous forme de 4 aliquots, contenant  $1 \times 10^9$  cellules/ml dans le glycérol stérile à 50%. 100  $\mu$ l de chaque aliquot ont été mis en préculture dans 5 ml de LB + ampicilline une nuit à 37°C sous agitation. A partir de ces 4 précultures ont été préparés 4 groupes de plasmides selon la méthode par "lyse alcaline" (337).



**Fig. 28:** Observation en microscopie optique des cellules de levure prélevées lors de la croissance en milieu glucosé à une densité de  $10^8$  cellules/ml.

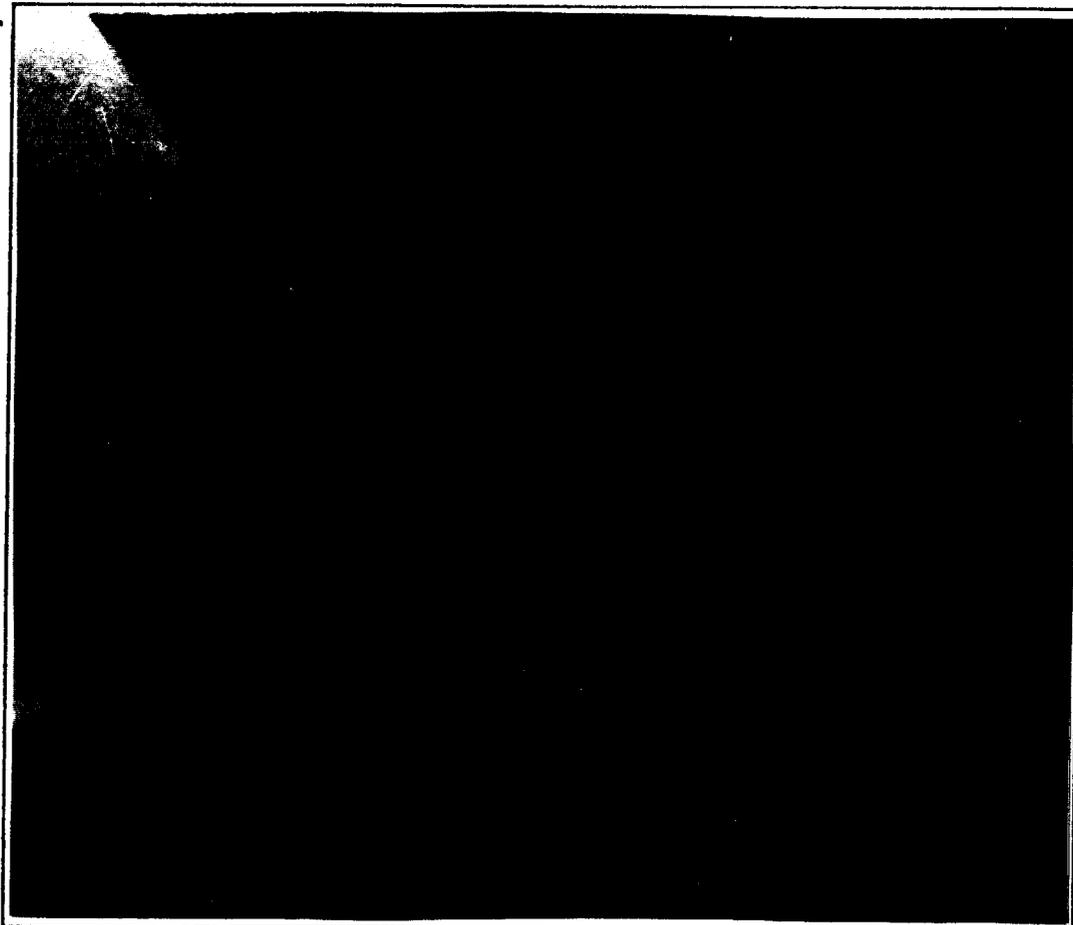
- I. Morphologie normale des cellules de levure de la souche sauvage *JC 482* (x 350).
- II. Morphologie anormale des cellules de levure de la souche mutante *JM 19* (x 1500). Les cellules sont rassemblées en massif de plus de 10 cellules en forme de grappe.



**Fig. 29:** Observation en microscopie électronique à balayage des cellules de levure mutante *JM 19*.

- I. Les cellules de levure mutante *JM 19* (x 8000) sont rassemblées en massif de plus de 10 cellules en forme de grappe.
- II. La paroi de la cellule fille demeure attachée à celle de la cellule mère (x 30000), par un point d'attache.
- III. Observation d'un anneau entre la cellule fille et la cellule mère, au niveau du point d'attache (x 80000).

II.



III.



Fig. 29: (suite)

\* Transformation de la souche JM 19 avec la banque génomique de levure :

Chaque groupe de plasmides a été utilisé pour transformer la souche mutante JM 19 (Mat leu2 ura3-52 his4 déficiente dans l'accumulation du glycogène), déficiente pour l'activité de l'enzyme de branchement du glycogène. L'utilisation de cette souche permet une double sélection (pour les caractères Ura3 et gène codant pour l'enzyme de branchement) des clones transformés par un plasmide YCp50 hybride porteur du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène.

La transformation de la levure a été réalisée selon le protocole de transformation à l'acétate de lithium, où 1 µg d'ADN plasmidien de chaque groupe ont été mis en jeu en présence de 10 µl de suspension de levures ( $2 \times 10^8$  cellules).

Les transformants sont sélectionnés sur le milieu SDGC-ura. En effet la présence de glycérol à 3% permet d'éliminer les colonies "petites", mais les transformants ne poussent que si le milieu contient au moins 0,1% de glucose. Le milieu dépourvu d'uracile, permet de sélectionner les transformants, qui ont reçus le plasmide YCp50.

Ainsi pour chaque groupe, 800 transformants soit 3200 transformants ont été sélectionnés, étalés sur le milieu SDGC-ura et repiqués finalement sur les milieux YPAD, YPG et SDGC-ura. Après 3 jours d'incubation à 30°C, les transformants subissent la deuxième sélection.

En milieu YPAD, le glycogène accumulé dans les levures en 3 jours est coloré par vaporisation des boites avec de l'iode. Les colonies, qui demeurent bleues comme JM 19, ont reçu un plasmide YCp50 hybride, mais ne portant pas le gène de l'enzyme de branchement du glycogène de levure. Par contre, les colonies, qui donnent une coloration brun-rouge, ont reçu le plasmide YCp50 porteur du gène de l'enzyme de branchement.

Le repiquage sur milieu YPG permet de contre sélectionner les

colonies "petites", qui en milieu YPAD après vaporisation à l'iode donne une coloration blanche. Le repiquage sur milieu SDGC-ura permet la conservation des transformants tout en maintenant la pression de la première sélection.

Le taux de transformation obtenu est peu élevé (265 transformants en moyenne/  $\mu\text{g}$  d'ADN), mais la méthode de transformation à l'acétate de lithium donne généralement 600 transformants/ $\mu\text{g}$  d'ADN pour un vecteur épisomique. De plus dans le cas d'un vecteur centromérique, la fréquence de transformation diminue, car une cellule transformée contient un nombre limité de plasmides (F. Winston, communication non publiée; M. Fedor, observation non publiée).

Le résultat le plus important est la sélection d'un unique clone  $\text{ura3}^+$ , susceptible de contenir le plasmide hybride portant le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

**c) Vérification de la sélection du transformant contenant le plasmide porteur du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.**

Cette unique transformant a été désigné EB1 (enzyme de branchement 1). Afin de vérifier que la transformation de JM 19, par le plasmide hybride contenu dans EB1, mène à l'accumulation d'un glycogène coloré en brun-rouge à l'iode, le plasmide hybride a été extrait et amplifié en utilisant la propriété de "vecteur navette" de YCp50. Dans la figure 30, sont récapitulées les différentes étapes permettant cette vérification. La transformation de JM 19, par le plasmide hybride amplifié et pur, mène dans plus de 95% des cas à la restitution du phénotype sauvage. Ce plasmide hybride complète donc la mutation de JM 19.

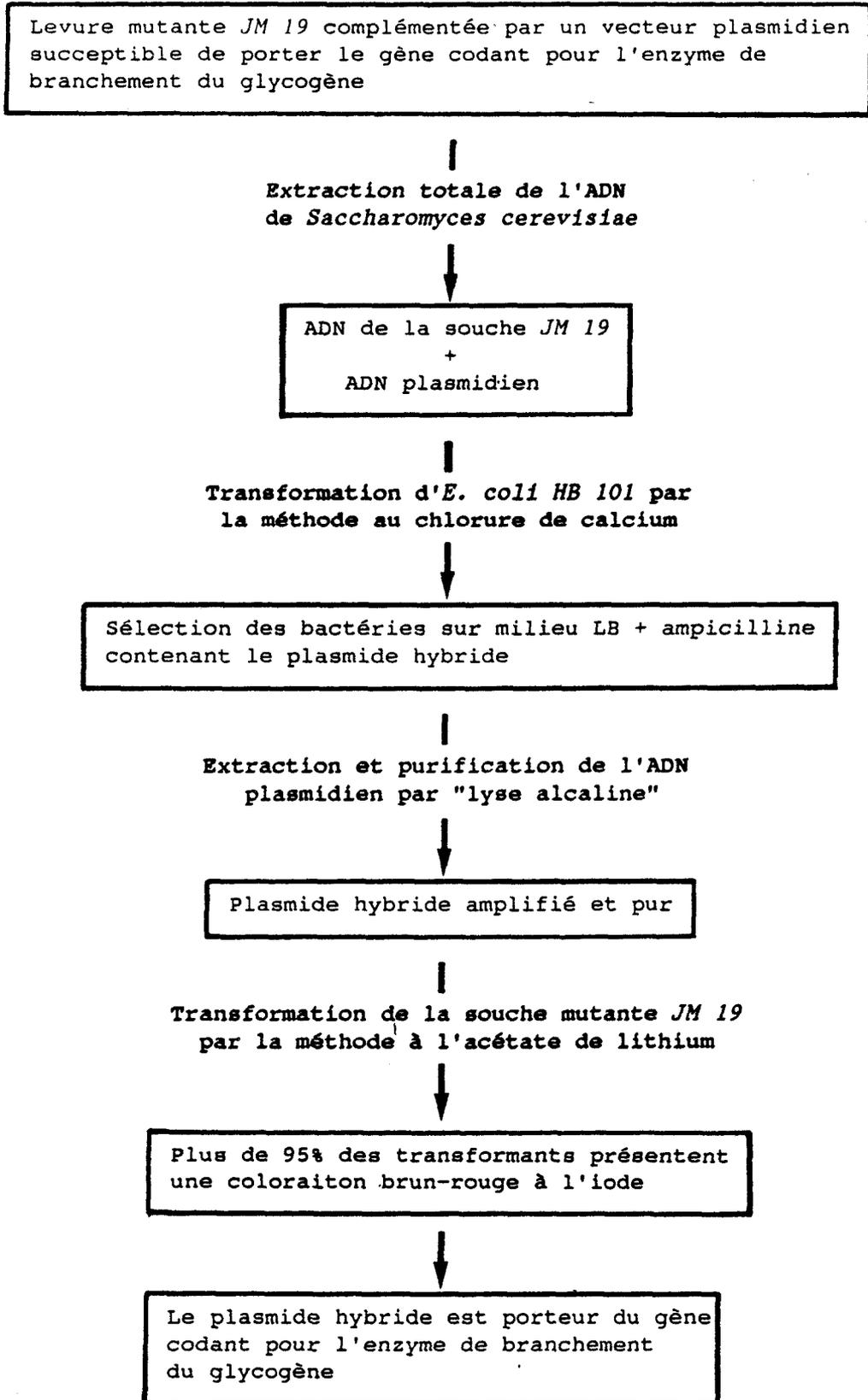


Fig. 30 : Différentes étapes permettant de vérifier, que le vecteur "navette" hybride porte le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

d) **Stabilité mitotique du transformant EB1.**

Une autre preuve, que le transformant EB1 contient un plasmide, qui porte un gène complémentant et non que EB1 soit un "révertant", contenant un plasmide non porteur d'une information intéressante pour ce clonage, est la démonstration que l'activité complémentante coségrège avec le gène *Ura3* de sélection du plasmide. Ainsi la perte du plasmide hybride doit se traduire par une perte simultanée du caractère *Ura3* et du gène codant pour l'enzyme de branchement de levure. La fréquence de ségrégation mitotique d'un plasmide centromérique varie de façon inversement proportionnelle avec la taille du plasmide (381). Les plasmides contenant de grands fragments d'ADN étrangers sont plus stables dans la levure que le vecteur YCp50 sans ADN étranger.

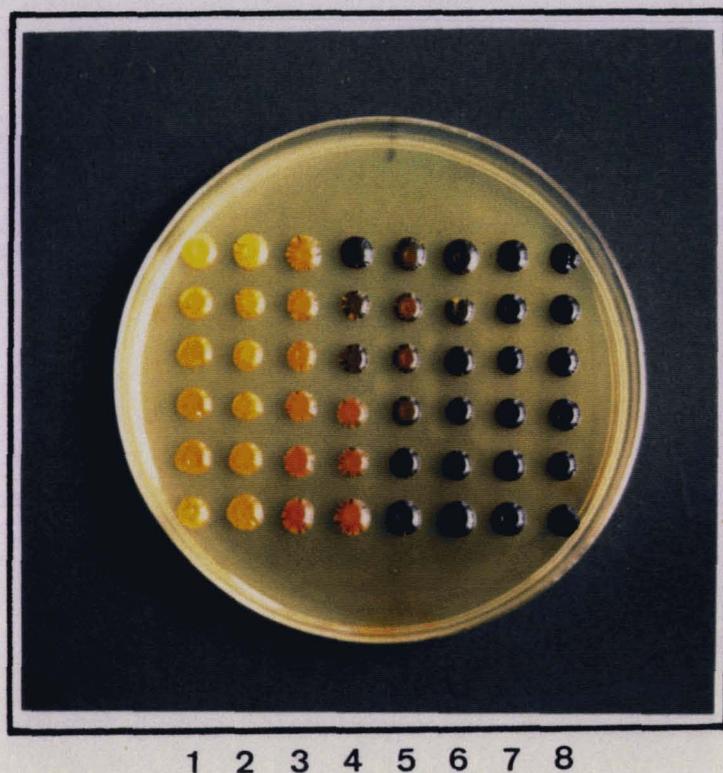
Afin de provoquer tout de même la perte du plasmide stabilisé par son centromère, le test de stabilité mitotique a été effectué au bout de plus de 40 générations, en conditions non sélectives. Ainsi un litre de milieu YPG ont étéensemencé à 10 cellules/ml jusqu'à la phase stationnaire et cette culture de EB1 a permis de réensemencer un litre de milieu YPG à 500 cellules/ml jusqu'à la phase stationnaire, à 30°C, sous agitation. 17 boîtes de milieu YPG ont étéensemencées avec 50  $\mu$ l de la dernière culture diluée  $10^5$  fois. Après environ 30 heures de croissance à 30°C, les colonies sont répliquées sur les milieux SDGC-ura, SDGC+ura, YPG et YPAD. Après trois jours à 30°C, le nombre de colonies apparues sur chacun des milieux de sélection est évalué et la ségrégation mitotique des deux caractères est déterminée (Tableau X).

Ainsi dans 97,1% des cas, on observe une coségrégation entre les deux caractères, prouvant que le plasmide hybride du transformant EB1 porte le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure. Dans 2,85% des cas, on obtient des plasmides recombinés. La figure 31

**Tableau X** : Evaluation du degré de stabilité mitotique du plasmide centromérique du transformant EB1.

( Transformant	:	EB1	)
( Nombre de colonies	:	795	)
( sur milieu YPG	:		)
( Pourcentage de colonies	:	70,7%	)
( $ura^+ / glc^+$	:		)
( Pourcentage de colonies	:	2,1%	)
( $ura^+ / glc^-$	:		)
( Pourcentage de colonies	:	0,75%	)
( $ura^- / glc^+$	:		)
( Pourcentage de colonies	:	26,4%	)
( $ura^- / glc^-$	:		)

Le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure a été appelé *GLC*.



**Fig. 31:** Eventail des différents phénotypes observés lors du test de stabilité du transformant EB1.

Après 45 générations en milieu sélectif, les colonies sont repiquées sur milieu YPAD, incubées 3 jours à 30 °C et vaporisées à l'iode. Le canal 1 représente la coloration de la souche sauvage *JC 482*. Le canal 8 représente la coloration de la souche mutante *JM 19*. Les canaux de 2 à 7 représentent les colorations intermédiaires obtenues lors de la perte progressive du plamide YCp50 hybride.

présente un éventail des différents phénotypes observés. Certaines colonies brun-rouge sectorisées de bleu sont les témoins d'une perte du plasmide dans la descendance, lors de la croissance sur boîte YPAD.

Cependant on observe une perte de plus de 25% du plasmide YCp50 hybride, stabilisé avec un fragment d'ADN de 10 à 15 kpb, en 45 générations. Cette perte plus élevée que celle préconisée par M.D. Rose sera discutée.

**e) Localisation chromosomique par électrophorèse en champs pulsés du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.**

Par électrophorèse en champs pulsés, 15 chromosomes de levure sur 17 (382-383), dont la taille s'échelonne de 260 à 200 kpb, sont séparés. Les chromosomes sont transférés sur nitrocellulose par la méthode de Southern (345). Ainsi hybridé en présence d'une sonde radioactive inhérente du fragment d'ADN porté par le plasmide hybride YCp50, le gène de l'enzyme de branchement du glycogène sera localisé chromosomiquement.

Ce travail a été effectué avec l'agréable collaboration de P. Ruffin.

**\* Choix des sondes utilisées.**

Le plasmide hybride YCp50 digéré par ECoRI présente 5 bandes: une de plus de 10 kpb, qui correspond au plasmide YCp50 et les autres 1,2 kpb, 3,7 kpb, 2,5 kpb et 2,7 kpb représentent le fragment d'ADN de levure (Fig. 35).

La sonde n°1 a été construite par extension d'amorce à partir de la bande de 3,7 kpb et la sonde n°2 a été construite à partir de la bande de 2,7 kpb. Le choix de deux sondes, localisées sur deux zones différentes du fragment d'ADN de levure permet de savoir si tout le

fragment est localisé sur le même chromosome ou si un réarrangement dans la banque génomique de M.D. Rose a pu se réaliser.

*\* Localisation chromosomique des sondes n°1 et n°2.*

La sonde n°1 a permis de révéler (Fig. 32) le chromosome n°V d'une taille de 580 kpb. La sonde n°2 a permis de révéler préférentiellement le chromosome n°V, mais également d'autres chromosomes.

Le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure est donc localisé sur le chromosome n°V. Les sondes n°1 et n°2 révélant préférentiellement le même chromosome, le fragment d'ADN cloné dans le plasmide hybride YCp50 semble être continu.

Cependant la sonde n°2 s'hybride avec d'autres chromosomes, ce qui suggère que cette sonde est complémentaire de séquences répétées. Les séquences centromériques essentielles sont contenues dans une région longue de 82 à 89 pb très riche en AT (plus de 90%) suivie d'une séquence de 10 pb très conservée. Si cette séquence est une séquence centromérique, on peut supposer que le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène est proche du centromère du chromosome n°V (384).

**f) Sous-clonage du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.**

Afin de déterminer le fragment d'ADN de levure le plus petit en taille qui porte le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène, le plasmide hybride YCp50 a été digéré partiellement par Sau3A et les fragments obtenus, dont la taille est sélectionnée, sont insérés au site BamHI du plasmide multicopie YEp24.

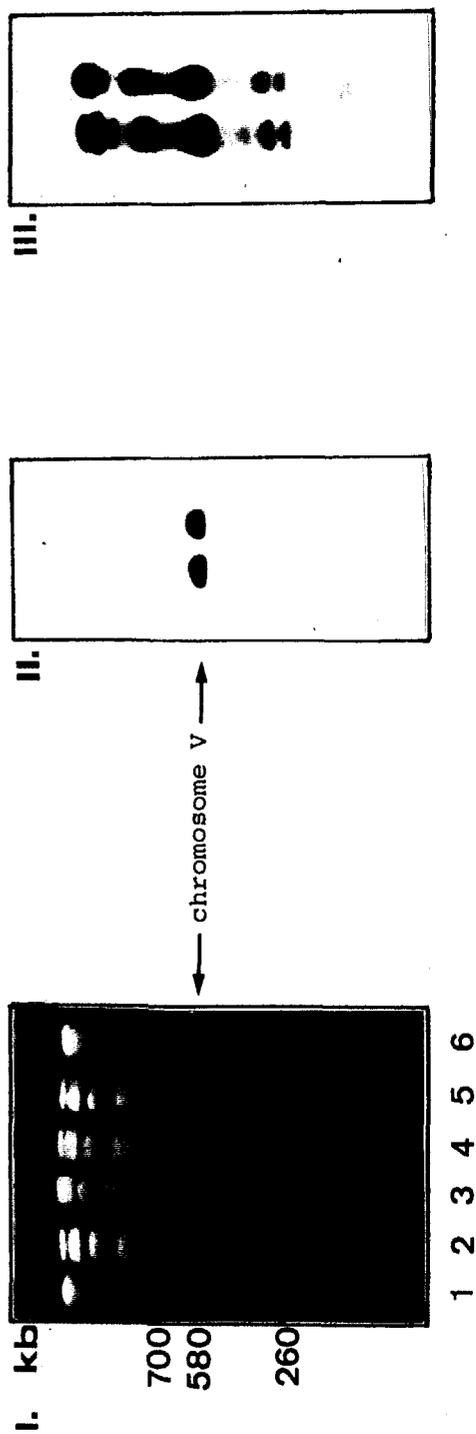


Fig. 32: Profil d'électrophorèse en champs pulsés des chromosomes de levure et hybridation en présence de la sonde n°1 et de la sonde n°2.

I. Séparation des chromosomes de levure par électrophorèse en champs pulsés selon la méthode "CHEF". Les canaux de 2 à 5 représentent le profil d'électrophorèse des différents chromosomes de levure. Les canaux 1 et 6 représentent le profil d'électrophorèse de concatémères de phages  $\lambda$ .

II. Hybridation moléculaire en présence de la sonde EcoRI-EcoRI de 3,7 kpb.

III. Hybridation moléculaire en présence de la sonde EcoRI-EcoRI de 2,7 kpb.

*\* Extraction et digestion du plasmide YEp24.*

Le plasmide YEp24 a été extrait et purifié par "lyse alcaline à partir d'une souche *E. coli* C600.

20 µg de vecteur YEp24 ont été digérés par l'enzyme BamHI, dont la séquence de reconnaissance est 5'-GGATCC-3'. YEp24 ouvert est ensuite déphosphorylé pour éviter une ligation sur lui même et est dosé par électrophorèse.

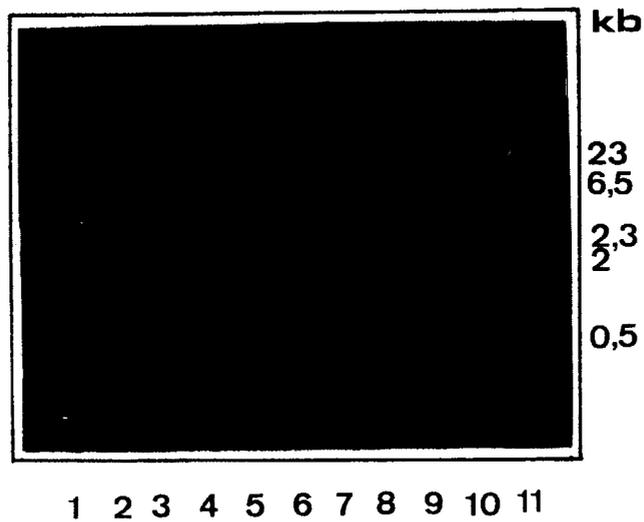
YEp24 possède un site unique de restriction pour BamHI situé dans le gène de résistance à la tétracycline. L'insertion d'un fragment d'ADN à ce site inactive le gène  $Tc^R$  et permet la sélection négative des clones bactériens contenant un plasmide hybride.

*\* Extraction et digestion partielle du plasmide hybride*

*YCp50 provenant du transformant EB1.*

L'endonucléase Sau3A reconnaît la séquence 5'-GATC-3' et libère des fragments possédant des extrémités 5'sortantes complémentaires de celles générées par BamHI. Une digestion partielle du plasmide hybride issu de EB1 permet d'obtenir des fragments de taille appropriée, représentatifs de l'ensemble du plasmide hybride.

Pour déterminer les conditions optimales de la digestion partielle, 8 échantillons contenant chacun 1 µg de plasmide hybride ont été digérés pendant une heure à 37°C par des quantités croissantes d'enzyme Sau3A: 1/128 U, 1/64 U, 1/32 U, 1/16 U, 1/8 U, 1/4 U, 1/2 U et 1 U. Après électrophorèse (Fig. 33), on observe une trainée, qui se déplace vers les petites tailles, quand la quantité d'enzyme Sau3A augmente. A partir du canal n°7, les fragments d'ADN d'une taille comprise entre 5,5 et 3,5 kpb sont purifiés.



**Fig. 33:** Détermination des conditions optimales de restriction partielle par Sau3A du plasmide YCp50 hybride.

Les canaux de 2 à 9 représentent le profil d'électrophorèse d'1  $\mu\text{g}$  d'ADN digéré par 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128 d'unité de Sau3A, respectivement. Le canal 10 représente le profil d'électrophorèse de 0,5  $\mu\text{g}$  d'ADN natif du plasmide YCp50 hybride. Les canaux 1 et 11 représentent le profil d'électrophorèse de l'ADN de phage  $\lambda$  digéré par HindIII.

*\* Constitution du mélange de ligation.*

125 ng de plasmide YEp24 ouvert par BamHI et déphosphorylé et 250 ng de fragments d'ADN digérés partiellement par Sau3A sont mélangés et mis en ligation.

*\* Transformation d'E. coli HB 101 par le mélange de ligation.*

25  $\mu$ l du mélange de ligation sont utilisés pour transformer Hb 101 par la méthode au chlorure de calcium. 52 bactéries transformantes résistantes à l'ampicilline, mais sensibles à la tétracycline ont alors été sélectionnées.

Les plasmides contenus dans ces bactéries ont été extraits et purifiés par "lyse alcaline".

*\* Transformation de JM 19 avec les plasmides hybrides YEp24.*

La souche mutante JM 19 a été transformée par la méthode à l'acétate de lithium par les plasmides hybrides YEp24. Les transformants sont sélectionnés sur milieu SDGC-ura et par pulvérisation à l'iode sur milieu YPAD après 3 jours de croissance à 30°C. On obtient alors en moyenne 3 clones contenant le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène pour 50 transformants *ura+* d'une boîte de sélection.

*\* Vérification de la taille du fragment des plasmides hybrides YEp24.*

*E. coli* HB 101, transformée à partir de l'ADN total d'un transformant, contenant un ou plusieurs plasmides hybrides YEp24, a permis de sélectionner 4 clones sur milieu LB + ampicilline. 4 extractions de plasmides selon la méthode à la "lyse alcaline" ont été alors réalisées.

Les plasmides amplifiés et purifiés sont ensuite digérés par ECoRI, afin d'être analysés par électrophorèse en parallèle avec le plasmide YEp24 intact (utilisé pour le sous-clonage).

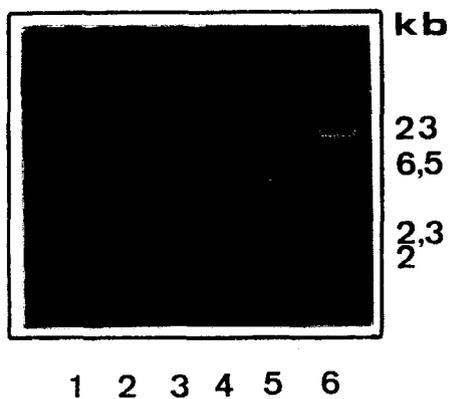
D'après la figure 34, les plasmides présentent les bandes de 2,1 kpb et 5,6 kpb communes au vecteur YEp24, ainsi que deux bandes supplémentaires de 1,8 kpb et 2,4 kpb, caractérisant le fragment d'ADN de levure d'environ 4 kpb, portant le gène de l'enzyme de branchement du glycogène. Les plasmides du canal 2 et 4, ne contenant que ces 4 bandes, ont été retenus.

Ces plasmides complètent la déficience de *JM 19* à plus de 95%. Par conséquent, la taille du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène est inférieure à 4,2 kpb.

**g) Carte de restriction des plasmides hybrides porteur du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène.**

Le plasmide hybride YCp50 isolé du transformant EB1 a été appelé YCp-11 et le plasmide hybride YEp24, dont le profil d'électrophorèse est au niveau du canal 4 (Fig. 34) a été appelé YEp-4.

Le plasmide pAH20, publié par A.G. Hinnebusch et G.R. Fink (385) lors du clonage du gène *GCN 4*, intervenant dans la régulation générale du métabolisme des acides aminés, nous a été envoyé par J. Cannon (University of Missouri-Columbia), car susceptible de porter le gène, codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure. En effet J. Cannon a localisé le gène de l'enzyme de branchement du glycogène sur le chromosome n°V, non loin du centromère, par cartographie génétique. Ce résultat a permis de confirmer la localisation chromosomique de ce gène obtenue par électrophorèse en champs pulsés. J. Cannon, n'ayant pu cloner le gène codant par l'enzyme de branchement par complémentation de mutation, a supposé que pAH20 localisé sur le chromosome n°V voisin du centromère, pouvait être porteur non seulement de *GCN 4*, mais encore du



**Fig. 34:** Profil d'électrophorèse des plasmides hybrides YEp24 digérés par EcoRI.

Les canaux de 1 à 4 représentent le profil d'électrophorèse de 4 plamides hybrides YEp24 digérés par EcoRI. Le canal 5 représente le profil d'électrophorèse du plasmide YEp24 digéré par EcoRI. Le canal 6 représente le profil d'électrophorèse de l'ADN de phage $\lambda$  digéré par HindIII.

gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène.

*\* Transformation de JM 19 par le plasmide pAH20.*

pAH20, plasmide hybride de YEp13, porteur d'un fragment d'ADN de levure d'une taille de 6,2 kpb, complémente la souche mutante JM 19, déficiente pour l'activité de branchement du glycogène. Par conséquent, pAH20 est un troisième plasmide, porteur du gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène.

*\* Comparaison des cartes de restriction des trois plasmides:*

*YCp-11, YEp-4 et pAH20.*

Les trois plasmides YCp-11, YEp-4 et pAH20 ont été soumis, en parallèle avec les plasmides YCp50, YEp24 et YEp13 natifs respectivement, à une série de digestions simples, doubles et triples par les endonucléases de restriction: EcoRI, BamHI, HindIII, BglII, BglI, SalI, PvuII, MluI, XbaI et BstEII. Les plasmides digérés sont analysés par électrophorèse et à partir des tailles des différents fragments obtenus, en tenant compte de la position des sites de restriction dans les plasmides natifs, une carte de restriction des plasmides YCp-11, YEp-4 et pAH20 est proposée (Fig. 35).

La superposition de ces trois cartes permet de localiser le gène GCN 4 porté par pAH20 et YCp-11. Le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène se situerait sur une portion d'ADN d'une taille de 2,2 kpb, communes aux trois cartes.

*\* Construction de la sonde EcoRI-HindIII de 0,5 kpb.*

Afin de vérifier que cette zone est effectivement commune aux trois plasmides YCp-11, YEp-4 et pAH20 ont été digérés par EcoRI, HindIII et doublement digérés par EcoRI et HindIII. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse et transférés sur membrane de nitrocellulose par la méthode de Southern (345). La figure 36 montre que les trois

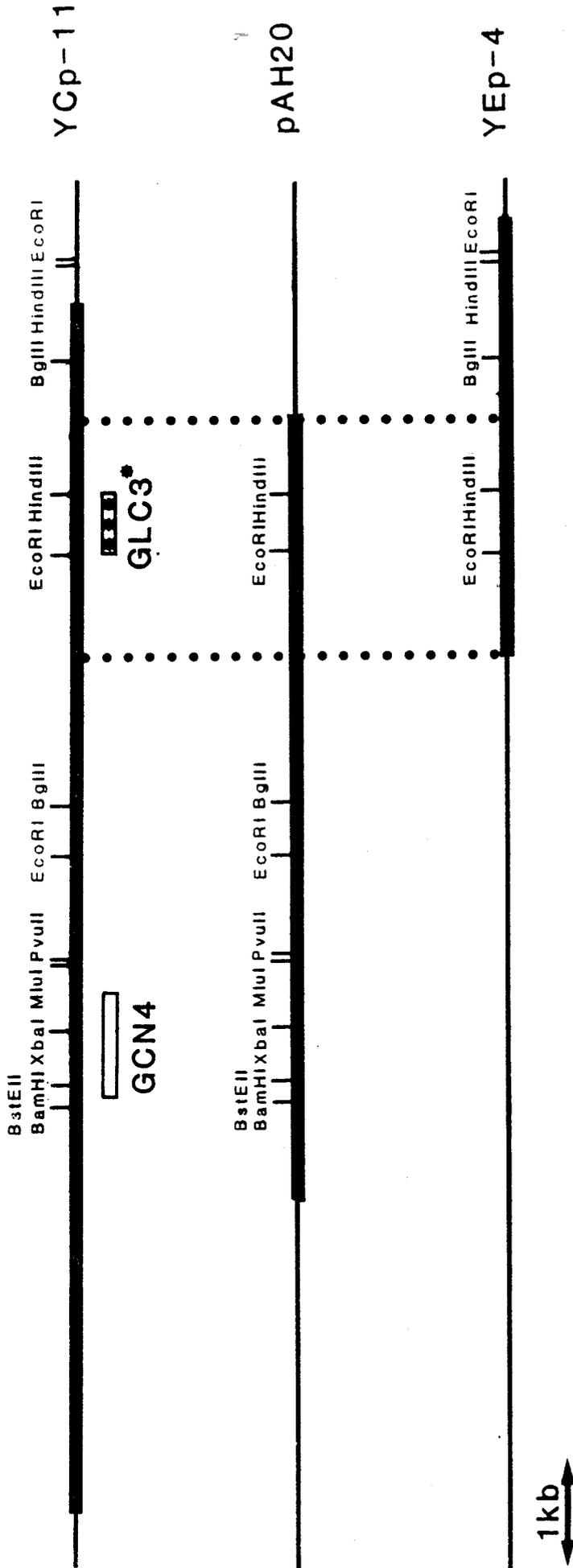
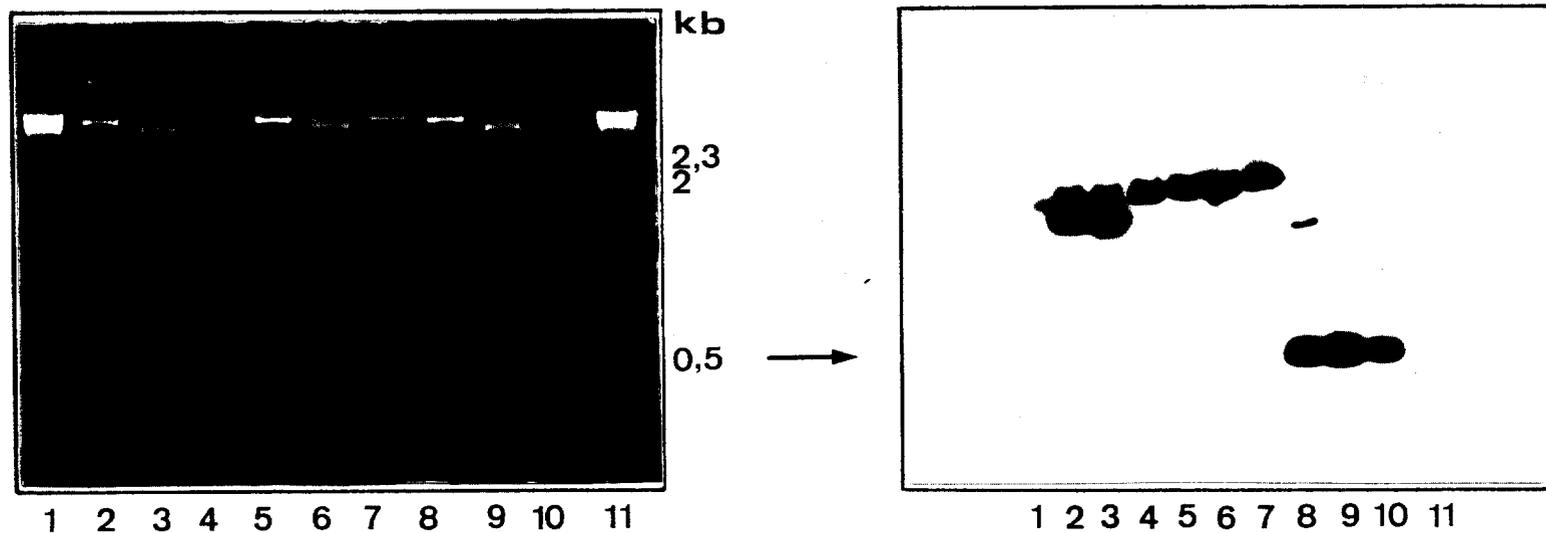


Fig. 35: Carte de restriction des fragments d'ADN complétant la mutation du gène *glc 3* de levure "bleue", défectueuse en l'activité de branchement du glycoogène.

Les trois fragments (■) sont contenus dans des plasmides vecteurs: YEp50, YEp13 et YEp24. Les tailles des fragments de restriction sont estimées par électrophorèse.

□ : *GCN 4*, gène intervenant dans le "contrôle général des acides aminés"

■ : Sonde radioactive de 0,563 Kb complémentaire de *GLC 3*



**Fig. 36:** Profil d'électrophorèse des plasmides YCp-11, YEp-4 et pAH20 digérés par EcoRI et HindIII et hybridation en présence de la sonde EcoRI-HindIII.

- I. Les canaux de 2 à 4 représentent le profil d'électrophorèse des plasmides YCp-11, YEp-4 et pAH20 digérés par EcoRI. Les canaux de 5 à 7 représentent le profil d'électrophorèse des plasmides digérés par HindIII. Les canaux de 8 à 10 représentent le profil d'électrophorèse des plasmides digérés par EcoRI et HindIII. Les canaux 1 et 11 représentent le profil d'électrophorèse de l'ADN de phage  $\lambda$  digéré par HindIII.
- II. Hybridation moléculaire en présence de la sonde EcoRI-HindIII de 0,5 kpb.

plasmides possèdent la même bande de 0,5 kpb EcoRI-HindIII révélée par la sonde. Par conséquent, YCp-11, YEp-4 et pAH20 se superposent sur la zone de 2,2 kpb.

*\* GLC 3 est le gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.*

Au voisinage du centromère du chromosome V et du gène *GCN 4*, J.R. Pringle (communication personnelle) a localisé par cartographie génétique *GLC 3*, gène intervenant dans le métabolisme du glycogène (Fig. 37). La carte de restriction a permis de reconnaître le gène voisin de *GCN 4* et de caractériser le fragment de 2,2 kpb comme porteur du locus *glc3*. Par conséquent, *GLC 3* est le gène intervenant dans l'activité de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

**h) *GLC 3* serait le gène de structure de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.**

Le phénotype correspondant à une augmentation du nombre de copies du gène *GLC 3* a été obtenu en transformant *JM 19* et *JC 482* avec le plasmide multicopie YEp-4, contenant le gène de l'enzyme de branchement du glycogène.

*\* Vaporisation à l'iode des transformants.*

Les transformants *Ura+* cultivés sur un milieu YPAD solide, trois jours à 30°C sont vaporisés à l'iode.

Dans le tableau XI, sont récapitulées les colorations obtenues pour les transformants.

La sectorisation, résultant de la perte du plasmide dans la descendance, témoigne de l'instabilité du plasmide épisomique. La souche sauvage *JC 482*, ayant une activité de l'enzyme de branchement normale, transformée par le plasmide YEp-4, se colore en rouge-orange. Le

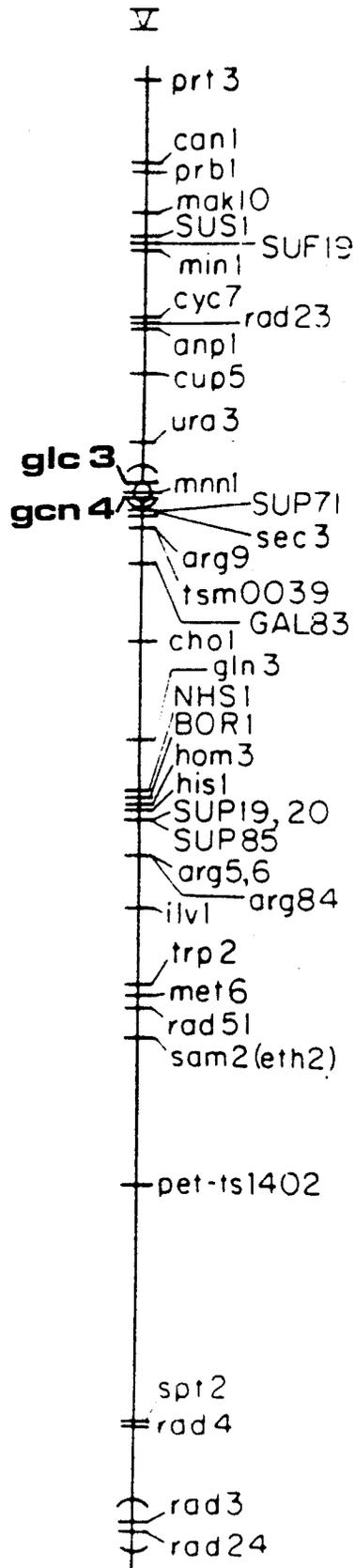


Fig. 37: Carte génétique du chromosome V de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après R. Mortimer et D. Schild (391).

**Tableau XI :** Coloration après vaporisation à l'iode de souches sauvages, mutantes et transformantes de levure, incubée 3 jours à 30°C sur milieu YPAD.

( Souche :	Coloration )
( Sauvage <i>JC 482</i> :	brun-rouge )
( Transformante <i>JC 482</i> + YEp-4 :	orange sectorisée )
( (plasmide multicopie instable) :	de brun-rouge )
( Transformante <i>JM 19</i> + YEp-4 :	brun-rouge )
( (plasmide multicopie instable) :	sectorisée de bleu )
( Transformante <i>JM 19</i> + YCp-11 :	brun-rouge )
( (plasmide centromérique stable) :	)
( Mutante <i>JM 19</i> :	bleue )

polysaccharide qui s'accumule devrait être encore plus branché que le glycogène.

*\* Dosage de l'activité de l'enzyme de branchement des différentes souches.*

D'après la figure 38, *JC 482* et *JM 19* transformées par *YEp-4* ont une activité d'enzyme de branchement 2 à 4 fois plus importante que les niveaux d'activité obtenus pour la souche sauvage *JC 482*.

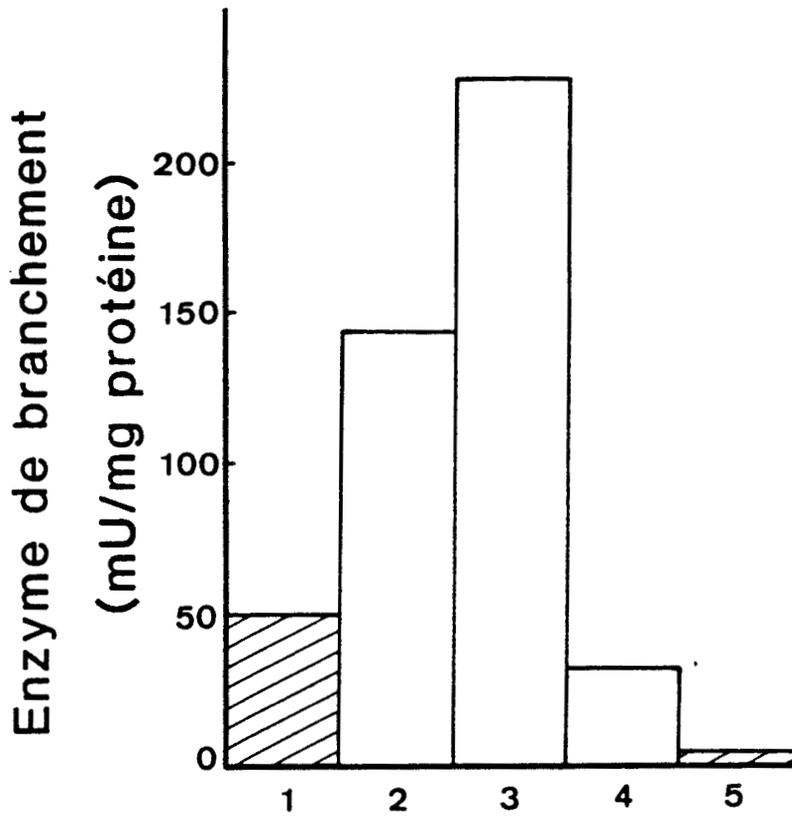
La transformation de la souche mutante *JM 19* ne présentant pas d'activité de branchement détectable assure que la surproduction d'activité de branchement en présence de *YEp-4* implique la transcription du gène *GLC 3*, porté par le plasmide.

On remarque que même si le plasmide *YEp-4* est instable, il est présent dans la majorité des levures transformées après culture en milieu *YPAD* (non sélectif), car les levures *JM 19 + YEp-4* ne sont que sectorisées de bleu. Le taux de surproduction restant peu élevé, *YEp-4* porterait donc le gène de structure de l'enzyme de branchement et non un gène intervenant dans la régulation du gène de l'enzyme de branchement.

*\* Révélation de l'activité de l'enzyme de branchement sur gel de polyacrylamide des différentes souches.*

Comme le montre la figure 39, pour un dépôt d'une même quantité de protéines (350 µg), la révélation de l'activité de branchement directement sur gel par coloration à l'iode est totalement comparable aux activités mesurées sur extraits enzymatiques.

De plus, on remarque les trois formes d'enzyme de branchement d'ionisation différentes sont révélées. Dans le cas où *GLC 3* est surproduit plus de 4 fois, ces 3 formes se distinguent particulièrement.



**Fig. 38:** Différences d'activité de l'enzyme de branchement des souches *JC 482* (1), *JC 482 + YEp-4* (2), *JM 19 + YEp-4* (3), *JM 19 + YCp-11* (4) et *JM 19* (5).

Les 5 souches sont cultivées en milieu riche YPAD et les cellules sont prélevées à la densité de  $2,8 \times 10^8$  cellules/ml.

-  : Souches sauvages
-  : Souches transformées

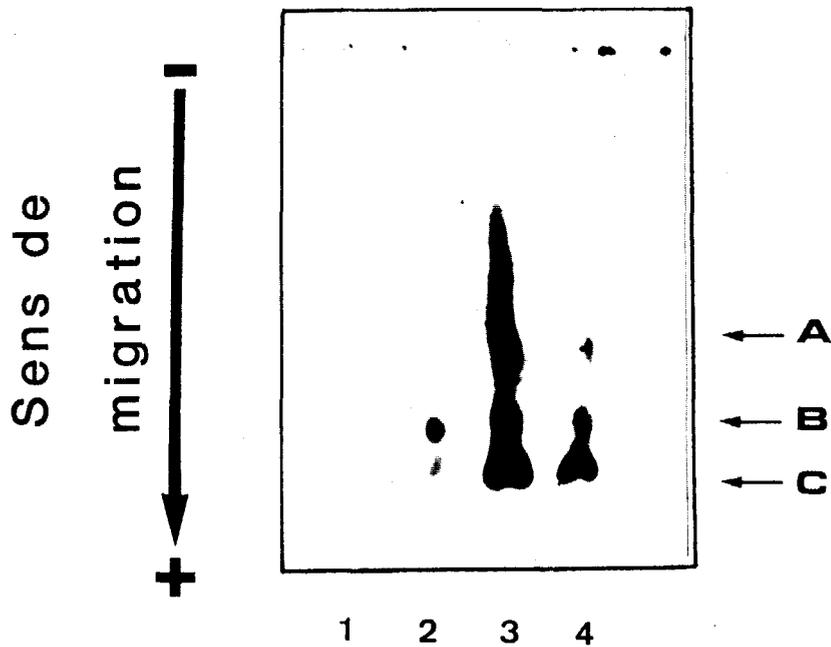


Fig. 39: Profil d'électrophorèse non dénaturante en gel de polyacrylamide et révélation de l'activité de branchement sur gel des extraits enzymatiques des souches *JM 19* (1), *JM 19 + YCp-11* (2), *JM 19 + YEp-4* (3) et *JC482 + YEp-4* (4).

Lors de la surexpression du même gène *GLC 3*, on retrouve les 3 isoformes (A, B et C) d'enzyme de branchement du glycogène d'ionisation différente.

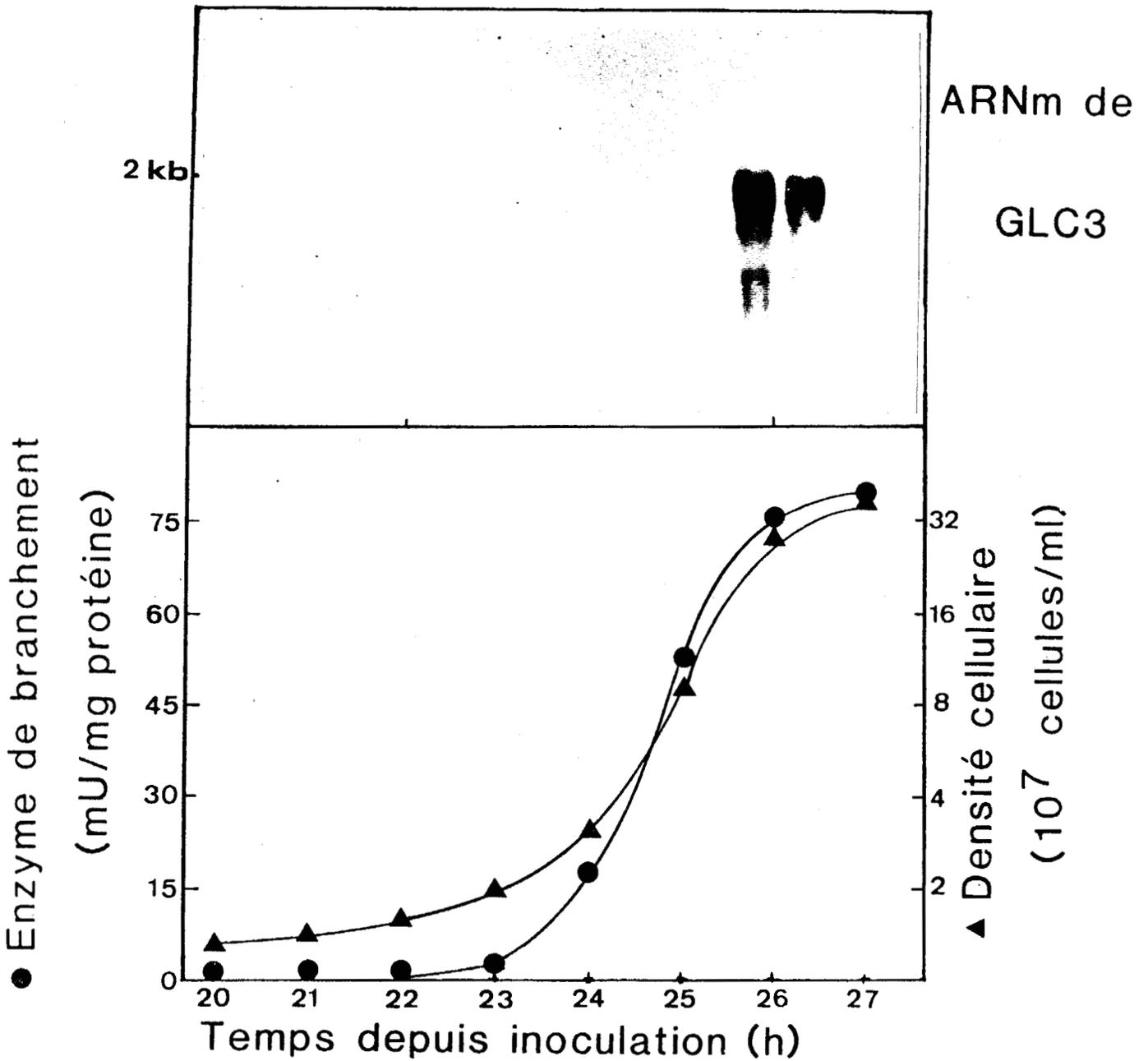
Que l'activité de branchement soit révélée sur gel ou par dosage, on remarque, que l'activité de branchement de la souche *JC 482* + *YE<sub>p</sub>-4* est plus faible que celle de *JM 19* + *YE<sub>p</sub>-4*. Cette différence peut s'expliquer par une perte aléatoire du plasmide *YE<sub>p</sub>-4* instable plus importante lors de la culture en milieu non sélectif, pour la souche *JC 482* ou par une absence de régulation de l'expression de *GLC 3* dans la souche *JM 19*.

2) Etude des ARN messagers de *GLC 3* au cours de la croissance en milieu glucose.

Les ARN totaux sont préparés à partir des cellules de la souche sauvage *JC 482* récoltées à  $2 \times 10^7$  cellules/ml, densité cellulaire correspondant au moment où l'activité de branchement n'est pas détectable et à  $2,8 \times 10^8$  cellules/ml, quand l'activité de branchement est maximale, lors de la croissance sur milieu YPAD.

Une bande d'ARN correspondant à un ARN de 2 kb a été détectée par la sonde *EcoRI-HindIII* de 0,5 kb, en fin de phase exponentielle de croissance. Aucun transcript de *GLC 3* n'est observé en début de phase exponentielle, ce qui prouve que le gène *GLC 3* est réprimé pendant le début de la phase exponentielle (Fig. 40).

Un niveau important de transcripts est détecté dans les cellules qui prolifèrent encore quand le taux de glucose du milieu diminue, moment précis où l'accumulation du glycogène atteint son maximum. Le gène *GLC 3* ne semble être soumis que partiellement à une répression par le glucose, puisque son action apparaît avant que la totalité du glucose ne soit disparue du milieu. L'accumulation de glycogène commence d'ailleurs quand 50% du glucose a été consommé (282).



**Fig. 40:** Régulation transcriptionnelle de *GLC 3* au cours de la croissance sur milieu glucosé.

Les transcripts de *GLC 3* s'accumulent, dans les cellules de levure sauvage, en fin de la phase exponentielle.

La coïncidence de l'apparition des transcripts de *GLC 3* et de l'accumulation du glycogène suggère une régulation coordonnée de la glycogène synthétase et de l'enzyme de branchement du glycogène.

Les transcripts de *GLC 3* ne sont pas comparés aux ARNm d'un gène, qui s'exprimerait constitutivement, car les cellules de levure génèrent différents profils d'ARNm entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (406). Par conséquent, en partant du même nombre de cellules initiales et en chargeant le gel avec des taux d'ARNm les plus proches, chaque canal après coloration au bromure d'éthidium a été comparé selon la présence des ARN ribosomiaux, qui prédominent dans une préparation d'ARN totaux (386).

En conclusion, *GLC 3*, gène de structure de l'enzyme de branchement du glycogène de levure est induit transcriptionnellement en fin de phase exponentielle.

#### VI. Séquence du gène *GLC 3*, codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

Le gène *GLC 3* étant le premier gène codant pour l'enzyme de branchement du glycogène cloné chez un Eucaryote, la séquence nucléotidique de *GLC 3* a été entreprise. En effet, seules les séquences des gènes *GLG B* d'*E. coli* et *GLG B* de *Cyanobacterium synechococcus sp. PCC7942* sont connues actuellement et 62% d'identité en acides aminés ont été retrouvés dans la partie centrale des deux séquences en acides aminés déduites des séquences nucléotidiques.

La taille du fragment d'ADN portant le gène *GLC 3* est de 2,2 kpb et la taille du transcript est d'environ 2 kb. La séquence de *GLC 3* est donc constituée d'au moins 2000 nucléotides, qui pourraient coder pour une protéine de l'ordre de 76000 Da.

	AA	2
GCTTTAGTTGGTGATAAGACATTAGCGTTTTGGTTGATGGATGCCGCTATGTACACCGAT	62	
<i>AlaLeuValGlyAspLysThrLeuAlaPheTrpLeuMetAspAlaAlaMetTyrThrAsp</i>	20	
ATGACTGTATTGAAGGAACCATCCATCGTTATTGACCGTGGTATTGCTCTACACAAGATG	122	
<i>MetThrValLeuLysGluProSerIleValIleAspArgGlyIleAlaLeuHisLysMet</i>	40	
ATTAGGCTGATCACTCACTCGCTGGGAGGCGAGGCTTATTTGAACTTCGAAGGTAATGAG	182	
<i>IleArgLeuIleThrHisSerLeuGlyGlyGluAlaTyrLeuAsnPheGluGlyAsnGlu</i>	60	
TTCGGTCATCCAGAATGGTTGGATTTCCCTAATGTTAACAATGGCGATACGTACAAGTAT	242	
<i>PheGlyHisProGluTrpLeuAspPheProAsnValAsnAsnGlyAspThrTyrLysTyr</i>	80	
GCTCGTAGGCAGTTTAATTTGGCTGATGATCCCTTACTGCGTTACCAGAATTTAAATGAG	302	
<i>AlaArgArgGlnPheAsnLeuAlaAspAspProLeuLeuArgTyrGlnAsnLeuAsnGlu</i>	100	
TTTGATAGATCAATGCAATTATGTGAGAAAAGGCATAAGTGGCTGAACACGAAACAGGCT	362	
<i>PheAspArgSerMetGlnLeuCysGluLysArgHisLysTrpLeuAsnThrLysGlnAla</i>	120	
TATGTTTCATTAAAACATGAAGGTGACAAAATGATTGTGTTTGAAGAAATAATCTGTTG	422	
<i>TyrValSerLeuLysHisGluGlyAspLysMetIleValPheGluArgAsnAsnLeuLeu</i>	140	
TTTATTTTCAACTTCCATCCTACAAACAGCTACAGCGATTATAGAGTTGGTGTGCGAAAAA	482	
<i>PheIlePheAsnPheHisProThrAsnSerTyrSerAspTyrArgValGlyValGluLys</i>	160	
GCTGGTACTTATCACATCGTGTGAACTCAGATCGTGCTGAATTTGGTGGACATAACAGA	542	
<i>AlaGlyThrTyrHisIleValLeuAsnSerAspArgAlaGluPheGlyGlyHisAsnArg</i>	180	
ATCAACGAAAGTTCCGAATTC	563	
<i>IleAsnGluSerSerGluPhe</i>	186	

**Fig. 41:** Séquence nucléotidique sur 563 nucléotides et séquence protéique sur 186 acides aminés de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

Le gène *GLG B* d'*E. coli* contient un cadre ouvert de lecture de 2181 pb codant pour un polypeptide de 727 acides aminés, soit une masse moléculaire de 84231 Da et le gène *GLG B* de *Cyanobacterium synechococcus* a un cadre ouvert de lecture de 2322 pb codant pour un polypeptide de 774 acides aminés, soit une masse moléculaire de 89206 Da.

Le gène *GLC 3* a été séquencé actuellement sur 563 pb comprises entre les sites *EcoRI* et *HindIII*. Sur ces 563 pb, on retrouve un cadre ouvert de lecture, ce qui a permis d'en déduire la structure primaire de l'enzyme de branchement de la levure sur 186 acides aminés (Fig. 41).

La séquence de *GLC 3* sera poursuivie afin de déterminer toute la structure primaire de l'enzyme de branchement du glycogène de levure et particulièrement afin d'étudier la régulation transcriptionnelle de *GLC 3* par mutagenèse dirigée dans sa région 5'.

# **DISCUSSION**

## DISCUSSION

### 1) La morphologie anormale de la souche mutante JM 19.

La fusion des parois cellulaires des cellules filles avec celles des cellules mères observée en microscopie électronique à balayage permet d'expliquer la croissance en massifs sous forme de "grappe" de la souche mutante JM 19, déficiente pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

Cette même morphologie anormale a été rencontrée dans le cas de la souche mutante *rgr1*, dont les cellules filles contenant chacune un noyau poussent en grappe (377). La coloration au calcofluor révèle que le renflement au niveau du point d'attache, observé également pour JM 19, est un anneau de chitine.

D'autres gènes affectant la morphologie cellulaire et la distribution des bourgeons sont connus. Ainsi ce même phénotype est observé chez les cellules mutantes pour le gène *CDC 4*, quand le cycle cellulaire s'arrête à température restrictive, mais seule la cellule mère possède un noyau. On retrouve ce phénotype chez les mutants *cdc 3*, *cdc 10*, *cdc 11* et *cdc 12* à température restrictive (378, 380).

Le fait de retrouver des anomalies morphologiques semblables chez les mutants *cdc*, *rgr 1* ou *glc 3* est encore peu expliquable.

### 2) L'enzyme de branchement de levure assurerait une synthèse séquentielle de polysaccharides.

L'étude du spectre d'absorption du produit formé, coloré à l'iode après action combinée de l'enzyme de branchement de levure et de la phosphorylase a de muscle de Lapin, montre que sans polysaccharide "amorce" une molécule branchée, dont le maximum d'adsorption est à 600 nm, est synthétisée. Quand la concentration en enzyme de branchement

est augmentée, ce maximum d'absorption se déplace vers une plus faible longueur d'onde, proche de celle du maximum d'absorption de l'amylopectine. Ce même déplacement est observé quand le temps de réaction enzymatique est augmenté. Par conséquent, l'enzyme de branchement de levure est capable de synthétiser un polysaccharide branché de type "amylopectine".

Le mécanisme d'action de l'enzyme de branchement de levure semble être cependant plus complexe qu'un branchement progressif de polysaccharide. En effet, en plus de synthétiser un polysaccharide ressemblant à l'amylopectine, l'enzyme de branchement synthétise également après 30 min. d'incubation un polysaccharide, dont le maximum d'absorption est à 460 nm, longueur d'onde proche du maximum du spectre à l'iode du glycogène. L'enzyme de branchement de levure synthétise donc un polysaccharide plus branché de type "glycogène".

D'après ces résultats obtenus *in vitro*, le mécanisme d'action de l'enzyme de branchement serait séquentiel. La raison pour laquelle l'enzyme de branchement ne synthétise pas directement un polysaccharide de type glycogène, mais passe par un intermédiaire de type amylopectine *in vitro* n'est pas encore expliquée. D'après Z.H. Gunja, la proportion d'enzyme de branchement est un facteur de contrôle du degré de branchement. L'amylopectine synthétique serait alors un intermédiaire de synthèse du glycogène. Dans le cas où l'action combinée de l'enzyme de branchement et de la phosphorylase a est comparable à l'action combinée de l'enzyme de branchement et de la glycogène synthétase, ces résultats pourraient être appliqués *in vivo*. On peut en effet supposer que les polysaccharides synthétisés lors du début de l'induction de l'enzyme de branchement de levure ont une structure ressemblant plus à l'amylopectine, qu'au glycogène. Quand une certaine concentration en enzyme de branchement est atteinte, lors de l'induction en cours de

croissance sur milieu glucose, les polysaccharides de type glycogène seraient alors synthétisés.

Une étude de la structure du glycogène au cours de son accumulation lors de la croissance sur milieu glucose permettrait d'élucider le mécanisme d'action de l'enzyme de branchement *in vivo*.

3) Caractérisation biochimique de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.

a) **Masse moléculaire de l'enzyme de branchement du glycogène de levure.**

Le fragment d'ADN complétant la mutation de *JM 19* ayant une taille de 2,2 kpb et la taille du transcript étant d'environ 2 kb, la masse moléculaire de l'enzyme de branchement de levure est de l'ordre de 76000 Da. Après purification par isoélectrofocalisation, on retrouve une bande majoritaire à 70000 ± 2000 Da, qui était minoritaire lors de l'étape de purification précédente, ce qui permet de supposer que la masse moléculaire de l'enzyme de branchement est d'environ 70000 Da.

La masse moléculaire de l'enzyme de branchement de levure serait donc de l'ordre de celle des enzymes de branchement bactériennes (84), animales (90) et végétales (35).

b) **L'enzyme de branchement existe sous forme d'une famille d'isoenzymes.**

L'isoélectrofocalisation de l'enzyme de branchement de levure et sa révélation directe sur gel après électrophorèse non dénaturante montrent, que l'enzyme de branchement de levure existe sous trois formes de pHi différents de 5,5 à 5,8.

C.P. Zimmerman et A.M. Gold ont montré qu'une famille d'au moins trois formes d'enzyme de branchement de pHi variants de 5,6 à 5,8 est

présente dans le muscle squelettique, le foie, le cerveau et le coeur de Lapin. K. Satoh et K. Sato ont prouvé que l'enzyme de branchement du muscle squelettique, du foie, du cerveau et du coeur de Rat se présente en électrophorèse native sous forme de 5 bandes, qui ne diffèrent pas de position en fonction du tissu. Egalement l'enzyme de branchement isolé du cerveau et du muscle Humain existe sous plus de deux isoformes.

Les bandes multiples, faiblement espacées, observées en électrophorèse non dénaturante, suggèrent que les formes diffèrent de façon uniforme, probablement par la présence d'un nombre variable de groupements chargés, tels des groupements phosphoryls. Cependant il a été prouvé, que les différentes formes d'enzyme de branchement détectées dans le cerveau et le muscle Humain ne sont pas affectées, quand les extraits bruts sont incubés en présence de protéine kinase dépendante de l' AMPc, d'AMPC ou d'ATP. Ainsi il serait peu probable, que les formes d'enzyme de branchement diffèrent par un degré de phosphorylation.

L'enzyme de branchement de muscle de Lapin ne contient ni glucosamine, ni galactosamine, ni mannosamine. Un traitement à la neuraminidase ne change pas le profil d'électrophorèse; les différentes formes ne sont donc pas le résultat d'une sialylation différente.

L'enzyme de branchement de foie de Rat se présente sous deux formes BEI et BEII associée et non associée respectivement à un ARN (§ Généralités). Ces deux formes présentent les mêmes cinq bandes différentes, séparées par électrophorèse non dénaturante suivie d'une révélation d'activité sur gel. Par conséquent, la présence d'un ARN pour une des deux formes n'explique pas l'existence de la famille de cinq espèces différentes.

Il a été montré que chez les individus âgés, les formes les plus acides, parmi des familles d'autres enzymes différant par de faibles écarts de pHi, sont plus abondantes et résultent d'une déamidation

progressive des résidus glutamine et asparagine (387). Pour la triosephosphateisomérase, deux résidus ASN spécifiques sont soumis à une déamidation non enzymatique (388). La déamidation serait donc impliquée dans le catabolisme normal de l'enzyme. La construction de la carte peptidique des isoformes permettrait de localiser la séquence en acides aminés variant d'une forme à l'autre.

Pour l'enzyme de branchement de levure, on remarque que lorsque le gène *GLC 3* est à une copie par cellule (*JC 482* ou *JM 19* + *YCp-11*), l'enzyme se présente essentiellement sous deux formes, dont la bande mineure est plus acide, que la bande majeure. Quand le gène *GLC 3* est surexprimé (*JM 19* + *YEp-4* ou *JC 482* + *YEp-4*), l'enzyme de branchement de levure est sous trois formes actives différentes, où la forme la plus acide semble être la forme la plus active ou la plus abondante. Ainsi malgré la surexpression, on retrouve les trois formes et la surexpression du même gène augmente l'activité totale des trois formes et préférentiellement la forme la plus acide. Par conséquent, lors de la surexpression de *GLC 3*, le "phénomène d'acidification" des formes serait plus important.

L'origine et le rôle de ces différentes formes d'enzyme de branchement observées chez différents tissus animaux et chez la levure ne sont pas encore élucidés.

#### 4) Stabilité du plasmide centromérique YCp-11.

Lors du clonage par complémentation de la mutation du gène *GLC 3*, un unique plasmide YCp-11, parmi les 3200 transformants *Ura+* retrouvés, était porteur de *GLC 3*. 0,03% des plasmides portent le gène *GLC 3*, contre 0,15% pour le gène *ADE 2* ou 0,14% pour le gène *KAR 1* (342, 381, 389-390).

Lors du test de stabilité mitotique, on a observé une perte de plus de 25% du plasmide YCp-11 en 45 générations. Ce pourcentage est en contradiction avec une des propriétés du plasmide centromérique, qui est d'avoir une fréquence de ségrégation mitotique inversement proportionnelle avec sa taille. Ainsi les plasmides contenant de grands fragments d'ADN étranger sont plus stables que le vecteur YCp50, qui est perdu à une fréquence de 50% en 30 générations. Le plasmide YCp50 porteur de *KAR 1* sur un fragment de 8 kpb est perdu à une fréquence de 1 à 6% en 30 générations et le plasmide YCp50 porteur de *CDC 8* sur 8 kpb est perdu à une fréquence de 2% en 10 générations et de 4% en 20 générations.

Le fragment d'ADN porté par YCp-11 a une taille de 11 kpb, qui devrait encore plus stabiliser le plasmide. YCp-11 difficilement sélectionné, présentant une certaine instabilité devrait avoir inséré un fragment d'ADN étranger particulier.

De plus la sonde n°2 de 2,7 kpb EcoRI-EcoRI, utilisée pour révéler la localisation chromosomique de *GLC 3*, s'hybride avec d'autres chromosomes, suggérant qu'au voisinage de *GLC 3* existe une séquence répétée dans le génôme de la levure, telle une séquence centromérique. Maintenant que le gène codant pour l'enzyme de branchement a été identifié à *GLC 3*, la carte de Mortimer (391) montre que *GCN 4* et *GLC 3* sont voisins, mais le centromère du chromosome n°V semble les séparer. L'hybridation de la sonde complémentaire de *mss1* (mitotic stabilizing sequence)(384), séquence centromérique fonctionnelle du chromosome V avec la bande de 2,7 kpb EcoRI-EcoRI de YCp-11 permettrait de vérifier cette hypothèse.

Si le centromère du chromosome V est proche de *GLC 3*, la difficulté de sélection de YCp-11 et sa relative instabilité sont expliquables. En effet, YCp50 étant une plasmide centromérique, YCp-11 deviendrait un

plasmide dicentrique. Or les réarrangements de tels plasmides sont fréquents, car le mouvement occasionnel des centromères à des pôles opposés mènent à une rupture mécanique des séquences plasmidiques (392). Les réarrangements impliquent la délétion d'une ou des deux séquences centromériques originellement présentes dans le plasmide. Par conséquent, lors du clonage par complémentation de mutation, les plasmides YCp50 porteur de *GLC 3* sont plus fréquents que 0,03%, mais ils se réarrangent au cours des générations. La délétion de la séquence centromérique du chromosome V proche de *GLC 3* pourrait en effet entraîner la perte du gène *GLC 3* et donc de l'information complémentante.

#### 5) Régulation du métabolisme du glycogène.

La régulation du métabolisme du glycogène chez la levure, comme dans le foie, semble essentiellement dûe à l'interconversion de deux formes d'enzymes, actives ou inactives par phosphorylation-déphosphorylation. Ainsi les protéines kinases et phosphatases ont un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme du glycogène, en agissant en fonction du taux de glucose-6-phosphate, de calcium et d'AMPC dans la cellule. Afin de comprendre ce mécanisme "ON/OFF", les connaissances sur la glycogène synthétase et phosphorylase seront reprises et l'incidence d'une régulation transcriptionnelle sera présentée.

La glycogène synthétase et la glycogène phosphorylase présentes dans les cellules du mutant *cdc35* avant et après incubation en présence de glucose sont très différentes et ces différences sont maintenues après gel filtration. Ainsi comme dans le foie, la glycogène synthétase et la glycogène phosphorylase pourraient s'interconvertir sous forme active ou inactive par un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation. En présence de glucose, la glycogène synthétase active et la glycogène

phosphorylase inactive seraient déphosphorylées. Le mutant *cdc 35* a alors été utilisé comme source de formes enzymatiques actives ou inactives.

a) La glycogène synthétase.

La forme a de la glycogène synthétase, obtenue en présence de glucose n'est pas sensible au glucose-6-phosphate et au sulfate, elle présente une vitesse maximale en présence d'UDPG 10 fois supérieure à celle de la forme b, et a la même affinité pour ce substrat que la forme b. La forme b est sensible au glucose-6-phosphate.

Les glycogène synthétases du foie, du coeur, du cerveau et du tissu adipeux présentent plusieurs sites de phosphorylation. Chez la levure, ces sites de phosphorylation n'ont pas été démontrés actuellement.

Cependant la forme I de la glycogène synthétase d'une souche sauvage de levure séparés par chromatographie sur DEAE-cellulose de la forme D est phosphorylable *in vitro* par la sous unité catalytique de la protéine kinase AMPc dépendante de coeur bovin en présence d'ATP marqué. La forme I constituée de deux polypeptides de 76 et 83 kDa est phosphorylée et voit son rapport d'activité diminuer. La forme D d'une souche sauvage de levure séparée par chromatographie sur DEAE-cellulose de la forme I ou la forme D d'une souche mutante de levure *glc 7* (393) ne présentant que la forme dépendante au glucose-6-phosphate de la glycogène-synthétase peut être phosphorylée *in vitro*, mais n'est pas inactivée. L'incorporation d'ATP marqué étant très faible, on peut supposer que la forme D était déjà phosphorylée. De plus un traitement des cellules au lithium, qui aurait pour rôle de stimuler une phosphatase ou d'inhiber une kinase spécifique de la glycogène synthétase, n'a aucun effet sur le mutant *glc7*. Par conséquent, la mutation, qui causerait la déficience en

une phosphatase ou une kinase intervenant dans la régulation de la glycogène synthétase, existerait.

**b) La glycogène phosphorylase.**

La glycogène phosphorylase de levure est activée allostériquement par une phosphorylation réversible à un résidu thréonine spécifique et est inhibée allostériquement par la fixation du glucose-6-phosphate (394). La forme a de la phosphorylase a une vitesse maximum 14 fois supérieure à celle de la forme b en présence de glucose-1-phosphate et les deux formes présentent le même Km. La forme a est présente dans les cellules du mutant *cdc 35* en absence de glucose et son activité n'augmente pas lors de l'incubation de l'extrait enzymatique en présence d'ATP-Mg, d'AMPc ou de calcium.

La forme b, non phosphorylée est moins active, elle est potentiellement inhibée par le glucose-6-phosphate et est activée 50 à 100 fois en présence d'ATP-Mg ou de calcium. Des formes de phosphorylases partiellement inactives ont été isolées de la levure et leur activité est corrélée avec leur contenu en groupement phosphate (395).

**c) La phase de transition et la phase stationnaire.**

Il a été montré que l'accumulation de glycogène en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire de croissance sur milieu glucosé s'accompagne de l'augmentation de la concentration des activités totales de la phosphorylase et de la glycogène synthétase. Une régulation transcriptionnelle de la phosphorylase a été prouvée.

De plus ce travail montre que les transcripts de *GLC 3* sont indétectables en début de phase exponentielle, mais apparaissent en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire, appelée phase de

transition. L'activité de l'enzyme de branchement du glycogène est alors induite transcriptionnellement lors de la phase de transition.

Lors de cette phase, des changements de concentration de nombreux métabolites se produisent. L'AMPC, dont la concentration diminue tout au long de la croissance sur milieu glucosé, atteint une valeur constante de 0,7 nmol/g de poids sec. La concentration en fructose-2,6-bisphosphate et en fructose-1,6-bisphosphate diminue fortement et la concentration en hexose-monophosphate diminue faiblement d'un facteur de deux (284). En phase exponentielle, la fructose-6-phosphate-2-kinase et la tréhalase seraient activées par phosphorylation par une protéine kinase AMPC dépendante et en fin de phase de transition seulement, quand la concentration en AMPC a déjà atteint sa valeur minimum, les activités de ces deux enzymes diminuent, laissant suggérer, que d'autres éléments que l'AMPC interviennent dans la régulation de ces deux enzymes. La résultante est une diminution de la concentration en fructose-2,6-bisphosphate, qui est un activateur de la fructokinase (396). Ainsi la phosphofructokinase, étant inhibée lors de la phase de transition, provoque une chute de la concentration en fructose-1,6-bisphosphate et par conséquent, une inhibition de la glycolyse. La production d'hexose-6-phosphate s'intensifie et les hexose-6-phosphate sont utilisés en vue de synthétiser du glycogène, ce qui provoque une diminution très progressive d'un facteur de deux du taux d'hexose-6-phosphate.

L'expérience effectuée sur le mutant thermosensible *cdc 35*, déficient pour l'adénylate cyclase, à température non permissive, permet de vérifier que le 2-deoxy-glucose induit l'activation de la glycogène synthétase et que cette activation ne dépend pas d'un changement de concentration en AMPC. L'AMPC ne semble pas être l'unique candidat dans la régulation du métabolisme du glycogène. Pour l'enzyme de branchement,

l'addition de 2-deoxy-glucose n'a aucun effet sur son activité. Dans cette expérience qui a été faite avant celles qui prouvent que l'enzyme de branchement est induite transcriptionnellement, l'enzyme de branchement n'était pas présente. Par conséquent, le fait de n'avoir aucune réponse à l'addition de 2-deoxy-glucose, ne prouve pas que l'enzyme de branchement n'existe pas sous deux formes interconvertibles, mais prouve que l'addition de 2-deoxy-glucose, ne permet pas de lever la répression de la transcription de *GLC 3*. L'événement ou la suite d'événements nécessaires à la dérépression de la transcription de l'enzyme de branchement ne semble pas être affecté par la phosphorylation du 2-deoxy-glucose, mais peut être l'est par le glucose-6-phosphate, qui lui est métabolisable. La production d'hexose-6-phosphate tel le glucose-6-phosphate, dont la concentration augmente fortement après induction par le glucose et dont la concentration est élevée lors de la phase de transition semble stimuler la déphosphorylation de la glycogène phosphorylase et de la glycogène synthétase.

En phase de transition, la glycogène phosphorylase existe donc essentiellement sous sa forme b, ce qui concorde avec la diminution de la concentration en AMPc et de l'activité protéine kinase AMPc dépendante (284, 397). La glycogène synthétase essentiellement sous sa forme a atteint son maximum d'activation quand la synthèse de glycogène est maximale. Lors de l'entrée en phase stationnaire de croissance, la forme active de la glycogène synthétase demeure constante, alors que l'activité totale augmente encore, menant le rapport d'activité à 50%. La forme b de la phosphorylase ayant une faible activité de dégradation, a cependant une activité suffisante pour dégrader faiblement le glycogène. Ainsi la synthèse et la dégradation du glycogène s'équilibrent, puis la phosphorylase assure une graduelle diminution du contenu

intracellulaire en glycogène. La concentration en glucose-6-phosphate étant faible en phase stationnaire la dégradation du glycogène se poursuit (282, 398).

Quand les cellules de levure en phase stationnaire de croissance sont transférées dans un milieu riche, le taux de glycogène diminue rapidement (399). On suppose que la phosphorylase est activée par phosphorylation, d'autant plus que dans de telles conditions, le taux d'AMPC et l'activité protéine kinase AMPC dépendante augmente dans la levure (284, 397, 400-401). La phosphorylation serait catalysée par une phosphorylase kinase spécifique et peut être également par une protéine kinase AMPC dépendante.

**d) Un mécanisme dépendant ou indépendant du taux d'AMPC.**

La démonstration d'une induction transcriptionnelle de l'enzyme de branchement et de la phosphorylase n'est pas en accord avec une synthèse constitutive de ces enzymes qui participeraient à la régulation du taux de glycogène durant la phase exponentielle de croissance par interconversion de formes grâce au mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation médié par la cascade de régulation AMPC dépendante (402-403). Des mutants déficients dans l'accumulation du glycogène ont une activité protéine kinase AMPC dépendante activée aussi bien par inactivation de la sous unité régulatrice (*bcy 1*)(404-405) que par une faible concentration en AMPC (*ira 1*)(406). Cependant des mécanismes indépendants du taux d'AMPC semblent être importants dans la régulation de l'accumulation du glycogène dans la levure (407). Des mutants déficients dans l'accumulation du glycogène ont en effet été isolés et leurs déficiences sont indépendantes du contrôle mettant en jeu l'AMPC. La levure contient une activité protéine kinase AMPC dépendante. Le gène *BCY 1* code pour sa sous unité régulatrice et trois

gènes *TPK 1*, *TPK 2* et *TPK 3* codent pour les trois sous unités catalytiques. Le mutant *bcy 1<sup>-</sup>*, ayant la sous unité régulatrice de la protéine kinase AMPc dépendante déficiente, n'accumule pas de glycogène. Des gènes *tpk* mutants supprimeurs de toutes les déficiences causées par *bcy 1<sup>-</sup>* ont été isolés et appelés *tpk<sup>w</sup>*. Ainsi une souche *bcy 1<sup>-</sup>* contenant l'allèle *tpk 1<sup>w1</sup>* accumule le glycogène en fin de phase exponentielle. Afin d'éliminer une régulation dépendante de la présence d'AMPc, une souche *bcy 1<sup>-</sup>-tpk 1<sup>w1</sup>-cyr 1*, déficiente pour l'adénylate cyclase a été construite. Le taux d'AMPc ne semble pas être responsable de la régulation du métabolisme du glycogène de la souche *bcy 1<sup>-</sup>tpk<sup>w</sup>*, car en absence d'activité adénylate cyclase, on observe le même niveau d'accumulation de glycogène. Il existe donc un mécanisme cellulaire qui ne nécessite pas d'AMPc. Les produits des gènes *RAS 1* et *RAS 2* modulent l'activité de l'adénylate cyclase (408-409) et ceux du gène *CDC 25* contrôlent l'activité des protéines RAS (410-411). Afin de savoir si les produits de ces gènes sont nécessaires à la propre régulation de la souche *bcy 1<sup>-</sup>tpk<sup>w1</sup>*, ces gènes ont été délétés. Ainsi ni les protéines *CDC 25*, ni les protéines RAS ne sont nécessaires à la survie d'une souche n'ayant plus de sous unité régulatrice de la protéine kinase AMPc dépendante fonctionnelle et contenant une sous unité catalytique de la protéine kinase.

Les cellules de levure peuvent donc assurer la régulation du métabolisme du glycogène sans protéine kinase répondant au taux d'AMPc. Il existerait donc un mécanisme de contrôle du métabolisme du glycogène indépendant de l'AMPc. J.F. Cannon prouve également que l'AMPc n'est pas le seul facteur de régulation du métabolisme du glycogène. En effet l'activité protéine kinase AMPc dépendante affecterait le niveau d'accumulation du glycogène, mais non sa cinétique d'accumulation (412).

e) Action coordonnée des enzymes du métabolisme du glycogène.

Comme la glycogène synthétase et la glycogène phosphorylase semblent être régulées par un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation, ces deux enzymes seraient les enzymes clefs de la régulation du métabolisme du glycogène. L'enzyme de branchement, régulée transcriptionnellement, agirait par une action combinée avec la glycogène synthétase, qui elle serait régulée par un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation. Chez la bactérie *E. coli*, la glycogène synthétase, l'ADPG pyrophosphorylase et l'enzyme de branchement sont dérèprimées de façon coordonnée en fin de phase exponentielle et pourtant seule l'expression des gènes *GLG A* (glycogène synthétase) et *GLG C* (ADPG pyrophosphorylase) est sous un contrôle positif par l'AMPc, la guanosine 5'-diphosphate-3'diphosphate et la protéine-récepteur de l'AMPc (116). Par conséquent, chez la bactérie, il a été proposé, que le gène *GLG B* réside sur un opéron séparé de *GLG A* et *GLG C* et le contrôle de l'expression de ces gènes nécessiterait au moins deux systèmes de régulation.

Finalement, la régulation du métabolisme du glycogène chez la levure est complexe, car non seulement elle conjugue un contrôle dépendant de l'AMPc et un contrôle indépendant, menant à une interconversion probablement par phosphorylation-déphosphorylation de la glycogène synthétase et de la glycogène phosphorylase, mais encore elle implique l'induction transcriptionnelle en fin de phase exponentielle de la glycogène phosphorylase et de l'enzyme de branchement du glycogène.

# **CONCLUSION**

### CONCLUSION

Au cours de ce travail, une étude biochimique et génétique de l'enzyme de branchement du glycogène de levure ont été exposées.

L'étude biochimique a permis de mettre en évidence les changements de concentration en glycogène et d'activité de l'enzyme de branchement de la levure au cours de la croissance sur milieu glucose à 2%. Ainsi le glycogène commence à s'accumuler en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire, moment où 50% du glucose du milieu a été consommé. L'activité de l'enzyme de branchement n'est pas détectable en début de phase exponentielle, mais est induite d'un facteur d'activation de plus de 95% en fin de phase exponentielle, quand la vitesse de synthèse du glycogène est maximale.

La synthèse *in vitro* d'un polysaccharide branché par l'action combinée de l'enzyme de branchement de levure et de la phosphorylase a de muscle de Lapin serait séquentielle. En effet, un polysaccharide branché ressemblant à l'amylopectine, puis au cours de la réaction enzymatique un polysaccharide branché ressemblant au glycogène sont synthétisés.

La purification partielle de l'enzyme de branchement (1500 fois) du glycogène de levure a permis d'identifier trois formes d'enzyme de branchement ayant des points isoélectriques proches, mais différents de 5,5 à 5,8. Une même famille d'isoformes d'enzyme de branchement a été retrouvée dans les tissus de Lapin et de Rat (foie, coeur, muscle et cerveau), dans le muscle et le cerveau humain. L'origine et le rôle de ces isoformes ne sont pas encore expliqués.

L'étude génétique a montré que l'enzyme de branchement du glycogène est induite transcriptionnellement en fin de phase exponentielle, comme cela a pu être démontré pour la phosphorylase. Ainsi le gène *GLC 3* codant pour l'enzyme de branchement du glycogène a été cloné par complémentation de la mutation d'une souche *JM 19* colorée en bleu après vaporisation à l'iode et déficiente pour l'activité de l'enzyme de branchement.

*GLC 3* localisé sur le chromosome V au voisinage du centromère et de *GCN 4* est transcript en un ARNm de 2 kb, uniquement en fin de phase exponentielle, moment où l'activité de l'enzyme de branchement est induite. D'après les résultats génétiques et biochimiques, l'enzyme de branchement serait une protéine d'une masse moléculaire d'environ 70 kDa. Sa séquence sur 186 acides aminés a été déduite de sa séquence nucléotidique, qui a été entamée.

Dans le but de séquencer le premier gène d'Eucaryote codant pour l'enzyme de branchement du glycogène et d'étudier l'origine de la régulation transcriptionnelle par mutagenèse dirigée, la séquence de l'enzyme de branchement sera poursuivie.

Finalement, la régulation du métabolisme du glycogène est très complexe, car elle superpose une régulation transcriptionnelle de l'enzyme de branchement et de la glycogène phosphorylase et une régulation stricte, qui semble dépendre de la phosphorylation-déphosphorylation de la glycogène synthétase et de la glycogène phosphorylase. L'enzyme de branchement ayant une action combinée avec la glycogène synthétase afin d'assurer la biosynthèse du glycogène bénéficie donc de sa propre régulation transcriptionnelle et de la régulation stricte de la glycogène synthétase.

# **BIBLIOGRAPHIE**

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Mendel G. 1865. *Verh. Naturforsch. Ver. Brünn.* 4: 3-47.
2. Bhattacharyya M.K., Smith A.M., Ellis T.H.N., Hedley C. and Martin C. 1990. *Cell* 60: 115-122.
3. Andersen D.H. 1952. *Carbohydrate Metabolism*, ed. V.A. Najjar (Baltimore: Johns Hopkins Press) 28.
4. Kiel J.A.K.W., Elgersma H.S.A., Beldman G., Vossen J.P.M.J. and Venema G. 1989. *Gene* 78: 9-17.
5. Swinton S. and Woods L. 1989. *Biofutur* 80:36-38.
6. Okada S., Kitahata S., Yoshikawa S., Sugimoto T. and Sugimoto K. 1982. *Fr. Demande* 22: 175-177.
7. Takeda Chemical Industries, Ltd.; Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. 1985. *Jpn. KoKai Tokkyo Koho* 6.
8. Swinton S.J. and Woods L.F.J. 1989. *Food Biotechnology* 3: 197-202.
9. Tvaroska I., Perez S. and Marchessault R.H. 1978. *Carbohydr. Res.* 61:97-106.
10. Köpper S. and Zehavi U. 1989. *Carbohydr. Res.* 193: 296-302.
11. Preiss J. and Walsh D.A. 1981. *Biology of Carbohydrates*, ed. V. Ginsburg, John Wiley and Sons, New York. 1: 199-314.
12. Swinkels J.J.M. 1985. *Starch Conversion Technology*, Van Beynum G.M.A. and Roels, J.A., Marcel Dekker, Inc., New York. 15-46.
13. Banks W. and Greenwood C.T. 1975. *Starch and its Components*, Halsted Press, New York.
14. Rutenberg M.W. 1980. *Handbook of Water-soluble Gums and Resins* (R.L. Davidson, ed.), Mc Graw-Hill Book Company, New York.
15. Hizukuri S. 1981. *Carbohydr. Res.* 94: 205-213.
16. Takeda C., Takeda Y. and Hizukuri S. 1983. *Cereal Chem.* 60: 212-218.
17. Erlander S.R., Griffin H.L. and Senti F.R. 1965. *Stärke* 17: 151-155.
18. Szejtli J. and Augustat S. 1966. *Stärke* 18: 38-43.
19. Szejtli J. 1963. *Periodica Polytechnica Chem. (Budapest)* 7: 259-264.
20. Sterling D. 1978. *J. Texture Stud.* 9: 225-230.
21. Manners D.J. and Matheson N.K. 1981. *Carbohydr. Res.* 90: 99-110.
22. Meyer K.H. and Bernfeld P. 1940. *Helv. Chim. Acta.* 23: 875-881.

23. French D. 1972. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 1: 8-25.
24. Steinitz K. 1967. *Adv. Clin. Chim.* 9: 227-354.
25. Brammer G.L., Rougvie M.A. and French D. 1972. *Carbohydr. Res.* 24: 343-354.
26. Gunja-Smith Z., Marshall J.J., Mercier C., Smith E.E. and Whelan W.J. 1970. *FEBS Lett.* 12: 101-104.
27. Orrell S.A., Buedung J.R. and Reissig M. 1964. In Whelan W.J. (ed.): *Control of Glycogen Metabolism*. Boston, Little, Brown and Co. 29.
28. Geddes R. 1986. *Bioscience Reports* 6: 415-428.
29. Matsuda K. and Hata K. 1985. *Denpun Kagaku* 32: 118-127.
30. Krisman C.R. and Barengo R. 1975. *Eur. J. Biochem.* 52: 117-123.
31. Geddes R., Harvey J.D. and Wills P.R. 1977. *Eur. J. Biochem.* 81: 465-472.
32. Hata K., Hata M. and Matsuda K. 1984. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 31: 146-151.
33. Jackson C.L. and Bryant R.G. 1989. *Biochemistry* 28: 5024-5028.
34. Zang L.H., Laughlin M.R., Rothman D.L. and Shulman R.G. 1990. *Biochemistry* 29: 6815-6820.
35. Boyer C.D. and Preiss J. 1978. *Carbohydr. Res.* 61: 321-334.
36. Krisman C.R. 1962. *Biochim. Biophys. Acta.* 65: 307-315.
37. Drummond G.S., Smith E.E. and Whelan W.J. 1972. *Eur. J. Biochem.* 26: 168-176.
38. Wurzburg O.B. 1972. *Handbook of Food Additives, 2nd Ed.* (T.E. Furia, ed.), CRC Press, Cleveland Ohio.
39. Glicksman M. 1969. *Gum Technology in the Food Industry*, Academic Press, New York.
40. Hollo J. and Szeitli J. 1968. *Starch and its Derivatives*, London. Ed. JA Radley. 203.
41. Brown B.I. and Brown D.H. 1966. *Methods Enzymol.* 8: 395-403.
42. Illingworth B., Brown D.H. and Cori C.F. 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47: 469-478.
43. Hawker J.S., Ozbun J.L., Ozaki H., Greenberg E. and Preiss J. 1974. *Arch. Biochem.* 160: 530-551.
44. Krisman C.R. and Kopun M. 1982. *Eur. J. Cell. Biol.* 27: 18-25.
45. Krisman C.R. 1962. *Anal. Biochem.* 4: 17-26.
46. Krisman C.R., Tolmasky D.S. and Raffo S. 1985. *Anal. Biochem.* 147: 491-496.

47. Satoh K. and Sato K. 1980. *Anal. Biochem.* 108: 16-24.
48. Trevelyan W.E. and Harrison J.S. 1956. *Biochem. J.* 63: 23-34.
49. Miyayama H. and Takeuchi T. 1973. *J. Electron. Microsc.* 22: 63-72.
50. Thorpe T.A. and Meier D.D. 1974. *Phytochemistry* 13: 1329-1334.
51. Anemiya T. and Ueno S. 1977. *Acta Histochem. Cytochem.* 10: 1-9.
52. Anemiya T. and Ueno S. 1976. *Histochemistry* 47: 125-131.
53. Kaskel D., Schedtler C.M., Huckwin O; and Cioli S. 1974. *Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 191: 247-264.
54. Takeuchi T. and Miyayama H. 1973. *Histochem. J.* 5: 451-461.
55. Maeno M., Takagi K. and Akagi M. 1980. *Gastroenterol. Jpn.* 15: 311-323.
56. Hamorth W.N., Peat S. and Bourne E.J. 1944. *Nature* 154: 236-239.
57. Holme T. and Palmstierna H. 1956. *Acta Chem. Scand.* 10: 578-586.
58. Madsen N.B. 1963. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41: 561-571.
59. Sigal N., Cattaneo J. and Segel I.H. 1964. *Arch. Biochem. Biophys.* 108: 440-451.
60. Zevenhuizen L.P.T.M. 1966. *J. Microbiol. Serol.* 32: 356-372.
61. Mulder E.G., Deinema M.H., Vanween W.L. and Zevenhuisen L.P.T.M. 1962. *Rec. Trav. Chim.* 81: 797-809.
62. Strange R.E., Dark F.A. and Ness A.G. 1961. *J. Gen. Microbiol.* 25: 61-76.
63. Segel I.H., Cattaneo J. and Sigal N. 1963. *Proc. Int. C.N.R.S. Symp. Mech. Regulation Cellular Activities of Microorganisms.* 337-355.
64. Schwartz M. 1966. *J. Bacteriol.* 92: 1083-1089.
65. Creuzet-Sigal N., Latil-Damotte M., Cattaneo J. and Puig J. 1972. *Biochemistry of Glycosidic Linkage (Pras R. and Pontis H.G., eds.)*. Academic Press, New York. 647-680.
66. Malette M.F. 1963. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102: 521-535.
67. Mc Grew S.B. and Malette M.F. 1965. *Nature* 208: 1096-1097.
68. Mc Grew S.B. and Malette M.F. 1962. *J. Bacteriol.* 83: 844-850.
69. Marr A.G., Nilson E.H. and Clark D.J. 1963. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102: 536-548.
70. Pirt S.J. 1965. *Proc. Roy. Soc. B.* 163: 224-231.
71. Ribbons D.W. and Dawes E.A. 1963. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102: 564-586.
72. Strange R.E. 1968. *Nature* 220: 606-607.
73. Strasdine G.A. 1968. *Can. J. Microbiol.* 14: 1059-1062.

74. **Strasidine G.A.** 1972. *Can. J. Microbiol.* 18: 211-217.
75. **Mackey B.M. and Morris J.G.** 1971. *J. Gen. Microbiol.* 66: 1-13.
76. **Yung S.G., Paule M., Beggs R., Greenberg E. and Preiss J.** 1984. *Arch. Microbiol.* 138: 1-8.
77. **Walker G.J. and Builder J.E.** 1971. *Eur. J. Biochem.* 20: 14-21.
78. **Zevenhuizen L.P.T.M.** 1964. *Biochim. Biophys. Acta.* 81: 608-611.
79. **Cattaneo J., Chambost J.P. and Creuzet-Sigal N.** 1978. *Arch. Biochem. Biophys.* 190: 85-96.
80. **Kawaguchi K., Fox J., Holmes E., Boyer C. and Preiss J.** 1978. *Arch. Biochem. Biophys.* 190: 385-397.
81. **Fox J., Kennedy L.D., Hawker J.S., Ozburn J.L., Greenberg E., Lammel C. and Preiss J.** 1972. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 90-103.
82. **Holmes E. and Preiss J.** 1979. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 196: 436-448.
83. **Cattaneo J., Magnan M. and Bigliardi J.** 1979. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 196: 449-458.
84. **Boyer C. and Preiss J.** 1977. *Biochemistry* 16: 3693-3699.
85. **Holmes E., Boyer C. and Preiss J.** 1982. *J. Bacteriol.* 151: 1444-1453.
86. **Martin R.G. and Ames B.N.** 1981. *J. Biol. Chem.* 236: 1372-1379.
87. **Baecker P.A., Greenberg E. and Preiss J.** 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 8738-8743.
88. **Sigal N., Cattaneo J., Chamboste J.P. and Favard A.** 1965. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 20: 616-618.
89. **Okada S., Yoshikawa S., Taniguchi M. and Kitahata S.** 1983. *Denpun Kagaku* 30: 223-230.
90. **Gibson W.B., Brown B.I. and Brown D.H.** 1971. *Biochemistry* 10: 4253-4262.
91. **Petrova A.N., Golubeva L.I. and Kretovich V.L.** 1988. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 298: 1485-1487.
92. **Okita T.W., Rodriguez R.L. and Preiss J.** 1981. *J. Biol. Chem.* 256: 6944-6952.
93. **Leung P., Lee Y.M., Greeberg E., Esch K., Boylan S. and Preiss J.** 1986. *J. Bacteriol.* 167: 82-88.
94. **Haziza C., Stragier P. and Patte J.C.** 1982. *EMBO J.* 1: 379-384.
95. **Fox J., Kawaguchi K., Greenberg E. and Preiss J.** 1976. *Biochemistry* 15: 849-857.
96. **Haugen T.H., Ishaque A., Chatterjee A.K. and Preiss J.** 1974. *FEBS Lett.* 42: 205-208.

97. Haugen T.H., Ishaque A. and Preiss J. 1976. *J. Biol. Chem.* 251: 7880-7885.
98. Baecker P.A., Furlong C.E. and Preiss J. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 5084-5088.
99. Kumar A., Larsen C.E. and Preiss J. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 16256-16259.
100. Romeo T., Kumar A. and Preiss J. 1988. *Gene* 70: 363-376.
101. Yu F., Yen Y., Takeuchi E., Inouye M., Nakayama H., Tagaya M. and Fukui T. 1988. *J. Biol. Chem.* 263: 13706-13711.
102. Choi Y.L., Kawamukai M., Utsumi R., Sakai H. and Komano T. 1989. *FEBS Lett.* 243: 193-198.
103. Preiss J., Ozbun J.L., Hawker J.S., Greenberg E. and Lammel C. 1973. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 210: 265-278.
104. Latil-Damotte M. and Lares C. 1977. *Mol. Gen. Genet.* 150: 325-329.
105. Creuzet-Sigal N., Latil-Damotte M., Cattaneo J. and Puig J. 1972. *In Biochemistry of the Glycosidic Linkage.* Acad. Press. N.Y. 647-680.
106. Preiss J., Greenberg E. and Sabraw A. 1975. *J. Biol. Chem.* 250: 7631-7638.
107. Krebs E.G. and Preiss J. 1975. *M.T.P. Int. Rev. Sci.* 5: 337-389.
108. Preiss J. 1969. *Curr. Top. Cell. Reg.* 1: 125-161.
109. Preiss J. 1973. *The Enzymes* (Boyer P.D. ed.) 3rd Ed. 8: 73-119.
110. Preiss J. 1978. *Adv. Enzymol.* 45: 317-381.
111. Preiss J. 1972. *Intra. Sci. Chem. Reports* 6: 13-22.
112. Preiss J., Yung S.G. and Baeker P.A. 1983. *Mol. Cell. Biochem.* 57: 61-80.
113. Preiss J., Govons S., Eidels L., Mammel C., Greenberg E., Edelmann P. and Sabraw A. 1970. *Miami Winter Symp.* 1: 122-138.
114. Steiner K.E. and Preiss J. 1977. *J. Bacteriol.* 129: 246-253.
115. Romeo T. and Preiss J. 1989. *J. Bacteriol.* 171: 2773-2782.
116. Romeo T., Black J. and Preiss J. 1990. *Current Microbiology* 21: 131-137.
117. Lares C., Frixon C. and Creuzet-Sigal N. 1974. *J. Gen. Microbiol.* 82: 279-293.
118. Kiel J.A.K.W., Vossen J.P.M.J. and Venema G. 1987. *Mol. Gen. Genet.* 207: 294-301.
119. Kiel J., Boels J.M., Beldman G. and Venema G. 1990. *Gene* 89: 77-84.

120. **Fredrick J.F.** 1977. *Phytochemistry* 16: 55-57.
121. **Fredrick J.F.** 1975. *Evolution of Isozymes forming storage polyglucans in Algae, in Isozymes, IV. Genetics and Evolution* (Market, C.L. ed.) Academic Press, New York.
122. **Fredrick J.F.** 1970. *Taxon. Biol. Blue-Green Algae, Pap. Int. Symp., 1st Meeting. Edited by: Desikachary T.V. Univ. Madras: Madras, India.* 566-570.
123. **Fredrick J.F.** 1978. *J. Therm. Biol.* 3: 1-4.
124. **Fredrick J.F.** 1975. *Phytochemistry* 14: 1911-1913.
125. **Sachs J.** 1887. *Lectures of the physiology of Plants, Clarendon Press, Oxford.* 304.
126. **Ozbun J.L. and Preiss J.** 1971. *Plant Physiol.* 48: 765-769.
127. **Hawker J.S., Ozbun J.L. and Preiss J.** 1972. *Phytochemistry* 11: 1287-1293.
128. **Boyer C.D. and Preiss J.** 1978. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 80: 169-175.
129. **Hawker J.S. and Downton W.J.S.** 1974. *Phytochemistry* 13: 893-900.
130. **Marchall J.J. and Whelan W.J.** 1974. *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 234-238.
131. **Preiss J. and Boyer C.D.** 1978. *Mech. Saccharide Polym. Depolym., (Proc. Symp.). Edited by: Marshall J.J. Academic: New York.* 161-174.
132. **Marshall J.J.** 1972. *Wallerstein Lab. Commun.* 35: 49-102.
133. **French D.** 1975. *Biochemistry of Carbohydrates, Biochemistry Series One (Whelan W.J. ed.), University Park Press, Baltimore.* 5.
134. **Wolff I.A., Hofreiter B.T., Watson P.R., Deatherage W.L. and Mac Masters M.M.** 1955. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1654-1659.
135. **Boyer C.D., Garwood D.L. and Shannon J.C.** 1976. *Stärke* 12: 405-436.
136. **Baba T., Arai Y., Ono T., Munakata A., Yamaguchi H. and Itoh T.** 1982. *Carbohydr. Res.* 107: 215-230.
137. **Hedman K.D. and Boyer C.D.** 1982. *Biochem. Genet.* 20: 483-492.
138. **Hedman K.D. and Boyer C.D.** 1983. *Biochem. Genet.* 21: 1217-1222.
139. **Pollock C. and Preiss J.** 1980. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 578-588.
140. **Boyer C.D. and Preiss J.** 1981. *Plant Physiol.* 67: 1141-1145.
141. **Boyer C.D., Simpson E.K.G. and Damewood P.A.** 1982. *Starch* 34: 81-85.

142. Lavintman N. 1971. *An. Soc. Cient. Argent. Numéro spécial*: 77-84.
143. Dvornich W. and Whistler R.L. 1949. *J. Biol. Chem.* 181: 889.
144. Pan D. and Nelson O.E. 1984. *Plant Physiol.* 74: 324-328.
145. Fisher M. and Boyer C.D. 1983. *Plant Physiol.* 72: 813-816.
146. Singh B. and Preiss J. 1985. *Plant Physiol.* 79: 34-40.
147. Echeverria E. and Boyer C.D. 1986. *Am. J. Bot.* 73: 167-171.
148. Spilatro S.R. and Preiss J. 1987. *Plant Physiol.* 83: 621-627.
149. Spilatro S.R. and Preiss J. 1986. *Prog. Photosynth. Res., Proc. Int. Congr. Photosynth., 7 th.* 3: 701-704.
150. Dang P. and Boyer C.D. 1988. *Phytochemistry* 27: 1255-1259.
151. Dang P. and Boyer C.D. 1989. *Biochem. Genet.* 27: 521-532.
152. Boyer C.D. and Fisher M.B. 1984. *Phytochemistry* 23: 733-737.
153. Vos-Scheperkeuter G.H., De-Wit J.G., Ponstein A.S., Feenstra W.J. and Witholt B. 1989. *Plant Physiol.* 90: 75-84.
154. Borovsky D., Smith E.E. and Whelan W.J. 1975. *Eur. J. Biochem.* 59: 615-625.
155. Griffin H.L. and Wu Y.U. 1971. *Biochemistry* 10: 4330-4335.
156. Vos-Scheperkeuter G.H., Ponstein A.S., De Wit J.G., Feenstra W.J., Oostergetel G.T., Van Bruggen E.F. and Witholt B. 1987. *Food Hydrocolloids* 1: 387-391.
157. Borovsky D., Smith E.E. and Whelan W.J. 1976. *Eur. J. Biochem.* 62: 307-312.
158. Borovsky D., Smith E.E., Whelan W.J., French D. and Kikumoto S. 1979. *Arch. Biochem. Biophys.* 198: 627-631.
159. Borovsky D., Smith E.E. and Whelan W.J. 1975. *FEBS Lett.* 54: 201-205.
160. Whelan W.J. 1976. *J. Biochem.* 79: 42-43.
161. Borovsky D., Smith E.E. and Whelan W.J. 1975. *Biochem. Soc. Trans.* 3: 48-49.
162. Wu H.C.H. and Sarko A. 1978. *Carbohydr. Res.* 61: 7-40.
163. Bateson W. 1901. *J. Royal Hort. Soc.* 24: 1-32.
164. White O.E. 1917. *Proc. Amer. Philos. Soc.* 56: 487-588.
165. Smith A.M., Bettey M. and Bedford I.D. 1989. *Plant Physiol.* 89: 1279-1284.
166. Kooistra E. 1962. *Euphytica* 11: 357-373.
167. Gregory R.P. 1903. *The New Phytologist* 2: 226-228.
168. Kellenbarger S., Silveira V., Mc Cready R.M., Owen H.S. and Chapman J.L. 1951. *Agron. J.* 43: 337-340.

169. Greenwood C.T. and Thomson J. 1962. *Biochem. J.* 82: 156-164.
170. Colonna P. and Mercier C. 1984. *Carbohydr. Res.* 126: 233-247.
171. Schneider A. 1951. *Der Züchter* 21: 271-281.
172. Coxon D.T. and Davies D.R. 1982. *Theor. Appl. Genet.* 64: 47-50.
173. Bettey M; and Smith A.M. 1990. *Planta* 180: 420-428.
174. Davies D.R. 1980. *Biochem. Genet.* 18: 1207-1219.
175. Domoney C. and Casey R. 1985. *Nucleic Acids Res.* 13: 687-699.
176. Matters G.L. and Boyer C.D. 1981. *Phytochemistry* 20: 1805-1809.
177. Matters G.L. and Boyer C.D. 1982. *Biochem. Genet.* 20: 833-848.
178. Smith A.M. 1988. *Planta* 175: 270-279.
179. Edwards J., Green J.H. and Aprees T. 1988. *Phytochemistry* 27:  
1615-1620.
180. Smith A.M., Neuhaus E. and Stitt M. 1990. *Planta* 181: 310-315.
181. Goldner W. and Beevers H. 1989. *Phytochemistry* 28: 1809-1812.
182. Singh S. and Tripathi V.K. 1987. *Indian J. Hortic.* 44: 154-159.
183. Kumar A. and Sanwl G.G. 1979. *Indian J. Exp. Biol.* 17: 385-387.
184. Alexander A.G. 1973. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 210: 64-80.
185. Roberts E.J., Clarke M.A., Godshall M.A. and Parrish F.W. 1984.  
*Proc. Sugar Process. Res. Conf.* 60-71.
186. Boyer C.D. 1985. *Phytochemistry* 24: 15-18.
187. Robinson N.L. and Preiss J. 1987. *Plant Physiol.* 85: 360-364.
188. Smyth D.A. 1988. *Plant Sci.* 57: 1-8.
189. Nakamura Y., Yuki K., Park S.Y. and Ohya T. 1989. *Plant Cell  
Physiol.* 30: 833-839.
190. Landry L.G. and Smyth D.A. 1988. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 15:  
23-32.
191. Chang C.W. 1983. *Microchem. J.* 28: 363-373.
192. Chang C.W. 1984. *Stärke* 36: 85-91.
193. Okita T., Greenberg E., Kuhn D.N. and Preiss J. 1979. *Plant  
Physiol.* 64: 187-192.
194. Thorpe T.A. and Meier D.D. 1974. *Phytochemistry* 13: 1329-1334.
195. Thorpe T.A. and Meier D.D. 1974. *J. Exp. Bot.* 25: 288-294.
196. Bernard C. 1957. *C.R. Acad. Sci.* 44: 582-586.
197. Verhue W. and Hers H.G. 1966. *Biochem. J.* 99: 222-227.
198. Larner J. 1953. *J. Biol. Chem.* 202: 491-503.
199. Brown D.H. and Brown B.I. 1966. *Biochim. Biophys. acta.* 130:  
263-266.
200. Miyayama H. 1971. *Acta Histochem. Cytochem.* 4: 87-102.

201. Swatland H.J. 1978. *J. Anim. Sci.* 46: 113-117.
202. Villa-Moruzzi E., Locci-Cubeddu T. and Bergamini E. 1979. *Growth* 43: 73-79.
203. Villa-Moruzzi E., Bergamini E. and Gori-Bergamini Z. 1981. *Pfluegers Arch.* 391: 338-342.
204. Taylor A.W., Stothart J., Booth M.A., Thayer R. and Rao S. 1974. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 52: 119-122.
205. Moruzzi E.V. and Bergamini E. 1983. *Muscle Nerve* 6: 356-366.
206. Bergamini E., Ciccoli L. and Villa E. 1976. *Horm. Dev. Proc. Int. Symp.* Edited by: Macho L., Strbak V.V. Bratislava, Czech. 331-340.
207. Tsutou A., Nakamura S., Negami and Yamamura H. 1985. *Horm. Metab. Res.* 17: 545-546.
208. Tsutou A., Nakamura S., Negami A., Nakaza T., Kobayashi T., Mizuta K., Hashimoto E. and Yamamura H. 1985. *Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.* 81: 641-645.
209. Caudwell F.B. and Cohen P. 1980. *Eur. J. Biochem.* 109: 391-394.
210. Petrova A.N., Bolotina T.T. and Kobseva A.A. 1961. *Biokhimiya* 26: 1001-1007.
211. Korneeva G.A., Shvedova T.A. and Petrova A.N. 1979. *Dokl. Acad. Nauk. SSSR.* 248: 1472-1474.
212. Filippova R.D. and Petrova A.N. 1971. *Biokhimiya* 36: 1038-1042.
213. Petrova A.N. 1981. *Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod.* Edited by: Atanasova B., Bulg. Acad. Sci., Sofia, Bulg. 3: 180-184.
214. Petrova A.N. 1981. *Metody Sovrem. Biokhim.* Edited by: Kretovich V.L., Shol'ts K.F. "Nauka": Moscow, USSR. 14-16.
215. Petrova A.N. and Kobzeva A.A. 1975. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 204: 476-478.
216. Shvedova T.A. and Petrova A.N. 1978. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 14: 529-534.
217. Korneeva G.A., Shvedova T.A., Petrova A.N., Venkstern T.V. and Bayev A.A. 1977. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 237: 728-731.
218. Korneeva G.A., Venkstern T.V. and Petrova A.N. 1977. *Mol. Biol.* 11: 286-290.
219. Korneeva G.A., Petrova A.N., Venkstern T.V. and Bayev A.A. 1979. *Eur. J. Biochem.* 96: 339-347.
220. Borisova O.F., L'Vova T.N., Korneeva G.A. and Venkstern T.V. 1983. *Mol. Biol.* 17: 1186-1195.

221. Korneeva G.A., Shvedova T.A. and Shaposhnikov G.L. 1982. *Mol. Biol.* 16: 731-738.
222. Petrova A.N. and Shvedova T.A. 1974. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 218: 1242-1244.
223. Petrova A.N. and Belykh G.F. 1983. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 268: 499-502.
224. Shvedova T.A., Korneeva G.A., Otroshchenko V.A. and Venkstern T.V. 1986. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 289: 1514-1516.
225. Balasingam K. and Ferdinand W. 1970. *Biochem. J.* 118: 15-23.
226. Petrova A.N., Shvedova T.A. and Korneeva G.A. 1982. *Usp. Biol. Khim.* 22: 119-136.
227. Petrova A.N. and Rudik O.A. 1986. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 289: 1273-1275.
228. Westheimer F.H. 1986. *Nature* 319: 534-535.
229. Shvedova T.A., Korneeva G.A., Ostroshchenko V.A. and Venkstern T.V. 1987. *Nucleic Acid. Res.* 1987. 15: 1745-1752.
230. Shvedova T.A., Korneeva G.A. and Otroshchenkov V.A. 1989. *Biokhimiya* 54: 765-768.
231. Ibrahim M.Z.M., Paswe E. and Khayat M.Y.N. 1973. *J. Neurol. Sci.* 19: 117-131.
232. Salmoral E.M., Tolmasky D. and Krisman C.R. 1990. *Cell. Mol. Biol.* 36: 163-174.
233. Fink A.S., Hefferan P.M. and Howell R.R. 1975. *Comp. Biochem. Physiol.* 50: 525-530.
234. Romanini C. and Frascini A. 1970. *Ann. Ostet. Ginecol.* 92: 285-290.
235. Abiev G.S. and Korkmazov B.M. 1981. *Azerb. Med. Zh.* 58: 27-33.
236. Amemiya T. and Ueno S. 1977. *Acta Histochem.* 58: 269-274.
237. Abiev G.S. and Shakhmamedova A.I. 1975. *Tr. Azerb. Nauchno-Issled. Inst; Gig. Tr. Prof. Zabol.* 10: 122-130.
238. Denizot J.P. 1975. *Histochemistry* 45: 319-329.
239. Falcato-Ribeiro A.F., Chagas C. and Couceiro A. 1980. *IRCS Med. Sci.: Libr. Compend.* 8: 776-777.
240. Moczon T. 1975. *Acta Parasitol. Pd.* 23: 569-592.
241. Moczon T. 1977. *Acta Parasitol. Pd.* 24: 275-282.
242. Vaillant R. and Jarousee C. 1974. *C.R. Acad. Sci., Ser. D.* 278: 1751-1753.
243. Gilbert M. and Vaillant R. 1975. *Biochimie* 57: 597-602.

244. Vaillant R. 1975. *FEBS Lett.* 52: 22-24.
245. Karkola K. 1972. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 228: 56-61.
246. Catravas G.N. and Mc Hale C.G. 1971. *Biochim. Biophys. Acta* 252: 285-295.
247. Zapolska-Downar B. 1983. *Folia Histochem. Cytochem.* 21: 203-210.
248. Satoh K. and Sato K. 1980. *Biochem; Biophys. Res. Commun.* 96: 28-33.
249. Heritier F. 1973. Avail. Univ. Microfilms, Ann. Arbor., Mich., Order n<sup>o</sup>73-13, 706. *Diss. Abstr. Int. B.* 33(12) (Pt.1), 5708.
250. Zimmerman C.P. and Gold A.M. 1983. *Biochemistry* 22: 3387-3392.
251. Satoh K. and Sato K. 1982. *J. Biochem.* 91: 1129-1137.
252. Zimmerman C.P. and Gold A.M. 1982. *Biochem. Med.* 28: 83-93.
253. Illingworth B. and Cori G.T. 1952. *J. Biol. Chem.* 199: 653-660.
254. Landing B.H., Reed G.B., Dixon J.F.P., Neustein H.B. and Donnell G.N. 1968. *Lab. Invest.* 19: 546-547.
255. Holleman L.W.J., Van Der Haar J.A. and DE Vaan G.A.M. 1966. *Lab. Invest.* 15: 357.
256. Andersen D.H. 1956. *Lab. Invest.* 5: 11-20.
257. Sidbury J.B., Mason J., Burns W.B. and Ruebner B.H. 1962. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 111: 157-181.
258. Mc Master K.R., Powers J.M., Hennigar G.R., Wohltmann H.J. and Farr G.H. 1979. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 103: 105-111.
259. Craig S.M. and Uzman L.L. 1958. *Pediatrics* 22: 20-32.
260. Cori G.T. 1957. *Modern Problems in Pediatrics*, ed. Hottinger et al. (Basle, New York: Karger). 3: 344-350.
261. Brown B.I. and Brown D.H. 1966. *Proc. Nat. Anal. Sci.* 56: 725-729.
262. Legum C.P. and Nitowsky 1969. *J. Ped.* 74: 84-89.
263. Fernandes J. and Huijing F. 1968. *Arch. Dis. Child.* 43: 347-352.
264. Howell R.R., Kaback M.M. and Brown B.I. 1971. *J. Ped.* 78: 638-642.
265. Edstrom R.D. 1972. *J. Biol. Chem.* 247: 1360-1367.
266. Mercier C. and Whelan W.J. 1973; *Eur. J. Biochem.* 40: 221-223.
267. Illingworth B., Brown B.I. and Brown D.H. 1965. *Carbohydrate metabolism and its disorders*, ed. Dickens F., Randle P.J., Whelan W.J., Acad. Press. 123-150.
268. Brown D.H. and Brown B.I. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 636-643.
269. Levin B., Burgess E.A. and Mortimer P.E. 1968. *Arch. Dis. Child.* 43: 548-555.

270. Matsumoto A., Kamata T. and Matsuda K. 1983. *J. Biochem.* 94: 451-458.
271. Matsumoto A. and Matsuda K. 1983. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 30: 212-222.
272. Abramsky T. and Tatum E.L. 1976. *Biochim. Biophys. Acta* 421: 106-114.
273. Matsumoto A., Nakajima T. and Matsuda K. 1990. *J. Biochem.* 107: 118-122. 274. Matsumoto A., Nakajima T. and Matsuda K. 1990. *J. Biochem.* 107: 123-126.
275. Manners D.J. 1971. *The Yeasts, 1st edn.* (Rose A.H. and Harrison T.S., ed.), Academic Press, London and New York. 2: 419-439.
276. Patel G.B. and Ingledew W.M. 1973. *J. Inst. Brew.* 79: 392-396.
277. Kuenzi M.T. and Fiechter A. 1972. *Arch. Mikrobiol.* 84: 254-265.
278. Kane S.M. and Roth R. 1974. *J. Bacteriol.* 18: 8-14.
279. Roth R. 1970. *J. Bacteriol.* 101: 53-57.
280. Rothman-Denes L.B. and Cabib E. 1970. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66: 967-974.
281. Gunja-Smith Z., Patil N.B. and Smith E.E. 1977. *J. Bacteriol.* 130: 818-825.
282. Lillie S.H. and Pringle J.R. 1980. *J. Bacteriol.* 143: 1384-1394.
283. Costa-Carvalho V.L.A., Meirelles D.F. and Rocha-Leao M.H.M. 1986. *Biotechnology Lett.* 8: 57-62.
284. Francois J., Eraso P. and Gancedo C. 1987. *Eur. J. Biochem.* 164: 369-373.
285. Trevelyan W.E. and Harrison U.S. 1956. *Biochem. J.* 63: 23-33.
286. Rothman L.B. and Cabib E. 1969. *Biochemistry* 8: 3332-3341.
287. Becker J.U., Vohmann H.J. and Eilers-König O. 1979. *Arch. Microbiol.* 123: 143-149.
288. Becker J.U., Shehata M.I. and Mizani S.M. 1982. *J. Gen. Microbiol.* 128: 455-461.
289. Suomalainen H. and Pfäffli S. 1961. *J. Inst. Brew.* 67: 249-255.
290. Grba S., Oura E. and Suomalaonen H. 1975. *Eur. J. Biochem.* 2: 29-37.
291. Den Hollander J.A., Ugurbil K. and Shulman R.G. 1986. *Biochemistry* 25: 212-219.
292. Padrao G.R.B., Malamud D.R., Panek A.D. and Matton J.R. 1982. *Mol. Gen. Genet.* 185: 255-261.

293. Panek A.D. 1985. *J. Biotechnol.* 3: 121-130.
294. Panek A.D. 1975. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2: 39-46.
295. Quain D.E. and Haslam J.M. 1979. *J. Gen. Microbiol.* 113: 195-198.
296. Manners D.J. and Khin M. 1956. *Biochem. J.* 63: 16.
297. Gunja Z.H., Manners D.J. and Maung K. 1960. *Biochem. J.* 75:  
441-450.
298. Gunja Z.H. and Manners D.J. 1959. *Chem. Ind.* 1017.
299. Hopkins R.H. 1955. *European Brewery Convention. Congress.* 52.
300. Kjööberg O. and Manners D.J. 1963. *Biochem. J.* 86: 10.
301. Boyer H.W. and Roulland-Dussoix 1969. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
302. Gibson T.J. 1984. *Ph.D. thesis, Cambridge University, England.*
303. Boutelet F., Petitjean A; and Hilger F. 1985. *EMBO J.* 4: 2635-2641.
304. Broach J.R., Strathern J.N. and Hicks J.B. 1979. *Gene* 8: 121-133.
305. Sutcliffe J.G. 1979. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43:  
77-90.
306. Broach J.R. 1982. *Cell* 28: 203-204.
307. Ratzkin B. and Carbon J. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 487-491.
308. Bach M.L., Lacroute F. and Btstein D. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
76: 386-390.
309. Rose M., Grisafi P. and Botstein D. 1984. *Gene* 29: 113-124.
310. Mann C. and Davis R.W. 1986. *Mol. Cell. Biol.* 6: 241-245.
311. Struhl K., Stinchcomb D.T., Scherer S. and Davis R.W. 1979. *Proc.*  
*Natl. Acad. Sci.* 73: 1035-1039.
312. Tschumper G. and Carbon J. 1980. *Gene* 10: 157-166.
313. Thomas J.H. 1984. *Ph. D. Thesis, M.I.T. Cambridge, MA.*
314. Rose M.D. and Fink G.R. 1987. *Cell* 48: 1047-1060.
315. Clarke L. and Carbon J. 1980. *Nature* 287: 504-509.
316. Messing J., Gronenborn B., Müller-Hill B. and Hofschneider P.H.  
1977. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 3642-3646.
317. Gronenborn B. and Messing J. 1978. *Nature* 272: 375-377.
318. Messing J. and Vieira J. 1982. *Gene* 19: 269-276.
319. Messing J. 1983. *Methods Enzymol.* 101: 20-78.
320. Norrander J., Kempe T. and Messing J. 1983. *Gene* 26: 101-106.
321. Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. 1985. *Gene* 33:  
103-119.
322. Langley K.E., Villarejo M.R., Fowler A.V., Zamenhof P.J. and Zabin  
I. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 1254-1257.
323. Francois J., Villanueva M.E. and Hers H.G. 1988. *Eur. J. Biochem.*  
174: 551-559.

324. Saez M.J. and Lagunas R. 1976. *Mol. Cell. Biochem.* 13: 73-78.
325. Burr B. and Nelson J. 1975. *Eur. J. Biochem.* 56: 539-546.
326. Bradford M.M. 1976. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
327. Becker J.U. 1978. *Anal. Biochem.* 86: 56-64.
328. Stein M.W. 1962. *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H.U., ed.) 1st ed. Verlag Chemie, Weinheim, Berstra., Germany. 117-125.
329. Laemmli K.U. 1970. *Nature* 227: 680-685.
330. Kerckaert J.P. 1978. *Anal. Biochem.* 354-360.
331. Gabriel O. 1971. *Methods Enzymol.* 22: 565-578.
332. Mandel M. and Higa A. 1970. *J. Mol. Biol.* 53: 154;
333. Cohen S.N., Chang A.C.Y. and Hsu L. 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2110-2114.
334. Dagert M. and Ehrlich S.D. 1979. *Gene* 6: 23.
335. Kushner S.R. 1978. *Genetic Engineering* (ed. Boyer H.B. and Nicosia S.). Elsevier, North-Holland, Amersham. 171.
336. Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. 1983. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.
337. Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
338. Clewell D.B. 1972. *J. Bacteriol.* 110: 667-676.
339. Chang A.C.Y. and Cohen S.N. 1978. *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156.
340. Tanaka T. and Weisblum B. 1975. *J. Bacteriol.* 121: 354.
341. Cryer D.R., Eccleshall R. and Marmur J. 1975. *Methods Cell Biol.* 12: 39-44.
342. Rose M.D., Novick P., Thomas J.H., Botstein D. and Fink G.R. 1987. *Gene* 60: 237-243.
343. Mac Donnell M.W., Simon M.N. and Studier F.W. 1977. *J. Mol. Biol.* 110: 119-146.
344. Daniels D.L., Schroeder J.L., Szybalski W., Coulson A.R., Hong G.F., Hill D.F., Petersen G.B. and Blattner F.R. 1983. *Lambda-II*, Hendrix R.W., Roberts J.W., Stahl F.W. and Weisberg R.A. (ed). Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
345. Southern E.M. 1975. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
346. Weislander L. 1979. *Anal. Biochem.* 98: 305-309.
347. Feinberg A.P. and Vogelstein B. 1984. *Anal. Biochem.* 137: 266.
348. Carle G.F. and Olson M.V. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 3756-3760.

349. Schwartz D.C. and Cantor C.R. 1984. *Cell* 37: 67-75.
350. Chu G., Vollrath D. and Davis R.W. 1986. *Science* 234: 1582-1585.
351. Blumberg D.D. 1987. *Acad. Press.* 152: 20-24.
352. Fedorcsak I. and Ehrenberg L. 1966. *Acta Chem. Scand.* 20: 107.
353. Berger S.L. 1975. *Anal. Biochem.* 67: 428-437.
354. Kirby K.S. 1956. *Biochem. J.* 64: 405.
355. Waldron C. and Lacroute F. 1975. *J. Bacteriol.* 122: 855-865.
356. Messenguy F. and Dubois E. 1983. *Mol. Gen. Genet.* 189: 148-156.
357. Alvine J.C., Kemp D.J. and Stark G.R. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5350-5354.
358. Schreir P.H. and Cortese R. 1979. *J. Mol. Biol.* 129: 169-172.
359. Sanger F., Miklen S. and Coulson A.R. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.
360. Messing J. 1983. *Methods Enzymol.* 101: 20-78.
361. Tabor S. and Richardson C.C. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 4767-4771.
362. Biggin M.D., Gibson T.J. and Hong G.F. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3963-3965.
363. Garoff H. and Ansorge W. 1981. *Anal. Biochem.* 115: 450-457.
364. Francois J. and Hers H.G. 1988. *Eur. J. Biochem.* 174: 561-567.
365. Algranati I.D and Cabib E. 1962. *J. Biol. Chem.* 237: 1007-1013.
366. Rothman L.B. and Cabib E. 1966. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25: 644-650.
367. Rothman L.B. and Cabib E. 1967. *Biochemistry* 6: 2098-2106.
368. Rothman L.B. and Cabib E. 1967. *Biochemistry* 6: 2107-2112.
369. Melpidou A.E. and Oikonomakos N.G. 1983. *FEBS Lett.* 154: 105-110.
370. Morgan H.E. and Parmeggiani A. 1964. *J. Biol. Chem.* 239: 2440-2445.
371. Gancedo C. and Gancedo J.M. 1985. *Eur. J. Biochem.* 148: 593-597.
372. Sols A., De La Fuente G., Villar-Palasi C. and Asensio C. 1958. *Biochim. Biophys. Acta.* 30: 92-98.
373. Van Steveninck J. 1968. *Biochim. Biophys. Acta.* 163: 386.
374. Stalmans W., Laloux M. and Hers H.G. 1974. *Eur. J. Biochem.* 49: 415-420.
375. Sherman F. and Stewart J.W. 1982. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces.* Cold Spring Harbor. Edited by Strathern J.N., Jones E.W. and Broach J.R. 301-333.
376. Chester V.E. 1968. *J. Gen. Microbiol.* 51: 49-56.
377. Sakai A., Shimizu Y., Kondou S., Chibazakura T. and Hishinuma F. 1990. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4130-4138.

378. Pringle J.R., Lillie S.H., Adams A.E.M., Jacobs C.W., Haarer B.K., Coleman K.G., Robinson J.S., Bloom L. and Preston R.A. 1986. *Yeast Cell Biology*, J. Hicks (ed.), Liss A.R., Inc. New York. 47-80.
379. Ohya Y., Miyamoto S., Ohsumi Y. and Anraku Y. 1986. *J. Bacteriol.* 165: 28-33.
380. Hartwell L.H., Mortimer R.K., Culotti J. and Culotti M. 1973. *Genetics* 74: 267-286.
381. Hieter P., Mann C., Snyder M; and Davis R.W. 1985. *Cell* 40: 381-392.
382. Mortimer R.K. and Hawthorne D.C. 1966. *Genetics* 53: 165-173.
383. Wickner R.B., Boutelet F. and Hilger F. 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3: 415-420.
384. Maine G.T., Surosky R.T. and Tye B.K. 1984. *Mol. Cell. Biol.* 4: 86-91.
385. Hinnebusch A.G. and Fink G.R. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 5374-5378.
386. Hwang P.K., Tugendreich S. and Fletterick R.J. 1989. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1659-1666.
387. Dreyfus J.C., Kahn A. and Shapira F. 1978. *Curr. Top. Cell. Regul.* 14: 243-297.
388. Yuan F.M., Talent J.M. and Gracy R.W. 1981. *Mech. Ageing Dev.* 17: 151-162.
389. Stinchcomb D.T., Mann C. and Davis R.W. 1982. *J. Mol. Biol.* 158: 157-179.
390. Kuo C.L. and Campbell J.L. 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1730-1737.
391. Mortimer R.K. and Schild D. 1980. *Microbiol. Rev.* 44: 519.
392. Mann C. and Davis R.W. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 228-232.
393. Peng Z.Y, Trumbly R.J. and Reimann E.M. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 13871-13877.
394. Hwang P.K. and Fletterick R.J. 1986. *Nature* 324: 80-84.
395. Becker J.U., Wingender-Drissen R. and Schiltz E. 1983. *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 667-678.
396. Bartrons R., Van Schaftingen E., Vissers S. and Hers H.G. 1982. *FEBS Lett.* 143: 137-140.
397. Watson D.C. and Berry D.R. 1977. *FEMS Microbiol. Lett.* 1: 175-177.
398. Quain D.E. and Haslam J.M. 1979. *J. Gen. Microbiol.* 113: 195-198.
399. Becker J.U. 1982. *J. Gen. Microbiol.* 128: 447-454.
400. Matsumoto K., Uno I. and Ishikawa T. 1983. *Exp. Cell. Res.* 146: 151-161.

401. Purwin C., Leidig F. and Holzer H. 1982. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1482-1489.
402. Pohl G., Wingender-Drissen R. and Becker J.U. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 331-338.
403. Wingender-Drissen R. and Becker J.U. 1983. *FEBS Lett.* 163: 33-36.
404. Cannon J.F. and Tatchell K. 1987. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2653-2663.
405. Toda T., Cameron S., Sass P., Zoller M., Scott J.D., Mc Mullen B., Hurwitz M., Ktebs E.G. and Wigler M. 1987. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1371-1377.
406. Tanaka K., Matsumoto K. and Tohe A. 1989. *Mol. Cell. Biol.* 9: 757-768.
407. Cameron S., Levin L., Zoller M. and Wigler M. 1988; *Cell* 53: 555-566.
408. Toda T., Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T., Broek D., Cameron S. and Broach J., Matsumoto K. and Wigler M. 1985. *Cell* 40: 27-36.
409. Broek D., Samiy N., Fasano O., Fujiyama A., Tamanoi F., Northup J. and Wigler M. 1985. *Cell* 41: 763-769.
410. Robinson L.C., Gibbs J.B., Marshall M.S., Sigal I.S. and Tatchell K. 1987. *Science* 235: 1218-1221.
411. Broek D., Toda T., Michaeli T., Levin L., Birchmeier C., Zoller M. Powers S. and Wigler M. 1987. *Cell* 48: 789-799;
412. Cannon J.F., Gitan R. and Tatchell K. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 11897-11904.



**RESUME :**

Alors que la glycogène synthétase catalyse uniquement la synthèse des liaisons alpha-1,4, l'enzyme de branchement du glycogène de la levure de boulangerie forme des liaisons alpha-1,6, faisant du glycogène, un polymère ramifié.

L'enzyme de branchement du glycogène est induite transcriptionnellement en fin de phase exponentielle de croissance sur milieu glucosé, moment où la glycogène synthétase est la plus active, moment où la glycogène phosphorylase est la moins active, et où la synthèse de glycogène est maximale. Aucune induction par le glucose, ni de dépendance au glucose-6-phosphate n'ont été mis en évidence pour l'enzyme de branchement.

La purification partielle de l'enzyme de branchement d'un facteur de 1500 fois montre, que cette enzyme existerait sous 3 isoformes de points isoélectriques s'échelonnant de 5,5 à 5,8, pour une masse moléculaire de l'ordre de 70 kDa.

Le gène *GLC 3*, codant pour l'enzyme de branchement du glycogène de levure, a été cloné par complémentation de la mutation d'une souche mutante, colorée en bleu après vaporisation à l'iode, déficiente pour cette enzyme. *GLC 3*, localisé sur le chromosome V, voisin du centromère et du gène *GCN 4*, est transcript uniquement en fin de phase exponentielle en un ARN messager de 2 kb.

Dans le but de séquencer le premier gène d'Eucaryote codant pour l'enzyme de branchement du glycogène et d'étudier l'origine de la régulation transcriptionnelle de ce gène, la séquence actuellement connue sur 563 nucléotides sera poursuivie.

**MOTS CLEFS :**

*Saccharomyces cerevisiae* / Enzyme de branchement du glycogène / Métabolisme du glycogène / *GLC 3* / Chromosome V.